

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

Immunologische Wirkungen von BRAF- und MEK-Inhibitoren und deren Kombination
auf humane PMBC, Dendritische Zellen und Melanomzellen

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

Vorgelegt von

Megi Kellezi
aus Tirana

Mainz, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. Philipp Drees

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 10. Oktober 2025

Nachnutzungslizenz: Urheberrechtsschutz (in C-1.0)

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Hintergrund	1
1.2 Ziel der Dissertation.....	2
2 Literaturdiskussion	4
2.1 Entstehung des malignen Melanoms	4
2.2 Melanozyten-Homöostase	4
2.3 Melanomentstehung	5
2.4 Melanomtypen.....	6
2.5 Driver-Mutationen.....	7
2.5.1 MAPK- und Phosphoinositol-3-Kinase-(PI3K)-Signaling.....	7
2.5.2 BRAF-Mutationen	8
2.5.3 NRAS-Mutationen	10
2.5.4 Weitere Driver-Mutationen	11
2.6 Einfluss von BRAF-V600E auf das Tumormikromilieu	12
2.7 Systemische Therapien von malignen Melanomen.....	16
2.7.1 Immuncheckpoint-Inhibitoren (ICI)	17
2.7.2 Zielgerichtete Therapien – Hemmung des MAPK- Signalwegs	19
2.7.3 Kombinationstherapien	20
2.8 Immunmodulatorische Wirkungen von BRAFi und MEKi	22
2.8.1 <i>Off-Target</i> -Effekte von MAPKi auf die Tumormikromilieu	22
2.8.2 Immunologische Effekte von BRAFi und MEKi auf dendritische Zellen	24
3 Material und Methoden.....	27
3.1 Materialien.....	27
3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	27
3.1.2 Chemikalien, Reagenzien, Supplemente, Medien, Puffer und Kits	30
3.1.3 Antikörper	32
3.1.4 Zelllinien.....	33
3.1.5 Software (elektronische Medien).....	33
3.2 Methoden	34
3.2.1 Steriles Arbeiten.....	34

3.2.2	Cytometric Bead Array (CBA)	38
3.2.3	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	39
3.2.4	Herstellung humaner dendritischer Zellen (DCs) aus peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC)	40
3.2.5	Vorbereitung von Melanomzell-Kokulturen mit PBMC	41
3.2.6	MTT-Zellviabilitätsassay.....	42
4	Ergebnisse	44
4.1	Der Effekt von BRAFi und/oder MEKi auf die Zytokinproduktion humaner PBMC.....	45
4.1.1	Die Wirkung von BRAFi und/oder MEKi auf die IL-1 β Produktion humaner PBMC	47
4.1.2	Die Wirkung von BRAFi und/oder MEKi auf die IL - 6 Produktion humaner PBMC	49
4.1.3	Die Wirkung von BRAFi und/oder MEKi auf die IL-8 Produktion humaner PBMC	51
4.1.4	Zusammenhang zwischen der IL-1 β -, IL-6- und IL-8-Sekretion der PBMC nach Inkubation mit BRAFi.....	52
4.2	Der Einfluss von BRAFi und/oder MEKi auf die Zytokinproduktion IL-1 β , IL-6 und IL-8 von MO-DC	55
4.2.1	Der Einfluss von BRAFi und/oder MEKi auf die IL-6 Produktion von MO-DC 57	
4.2.2	Der Einfluss von BRAFi und/oder MEKi auf die IL-8 Produktion von MO-DC 59	
4.3	Der Effekt von BRAFi und/oder MEKi auf die PBMC/Melanomzell-Kokulturen.....	61
4.3.1	Der Effekt von BRAFi und/oder MEKi auf die Viabilität von PBMC/Melanomzell-Kokulturen.....	61
4.3.2	Der Einfluss von BRAFi und/oder MEKi auf die IL-1 β -Expression in PBMC/BRAF ^{V600E} -Melanomzell-Kokulturen	63
4.3.3	Der Einfluss von BRAFi und/oder MEKi auf die IL-6-Expression in PBMC/BRAF ^{V600E} -Melanomzell- und PBMC/BRAF ^{WT} -Melanomzell-Kokulturen.....	65
4.3.4	Der Einfluss von BRAFi und/oder MEKi auf die IL-8-Expression in PBMC/BRAF ^{V600E} -Melanomzell- und PBMC/BRAF ^{WT} -Melanomzell-Kokulturen.....	67
5	Diskussion	69
5.1	Auswirkungen von BRAFi und/oder MEKi auf die Interleukinproduktion von humanen Immunzellen	69
5.1.1	Auswirkungen von BRAFi und/oder MEKi auf die IL-1 β -Produktion von humanen Immunzellen.....	69
5.1.2	IL-1 β -Polymorphismen als mögliche Ursache für spenderabhängige BRAF-Responsivität und erhöhte Basalkonzentrationen	70
5.1.3	BRAFi als Koaktivator der IL-1 β Stimulation.....	71
5.1.4	Produktion von IL-6 und IL-8 durch humane Immunzellen nach BRAFi-Applikation	72

5.1.5	Rolle von IL-1 β bei der Induktion der IL-6- und IL-8-Produktion in PBMC nach BRAFi-Applikation	73
5.2	Strukturelle und pharmakokinetische Unterschiede der verwendeten Inhibitoren	74
5.3	Beeinflussung der Interleukin-Konzentration durch das Alter, das Geschlecht und die Blutgruppe	76
5.4	Dendritische Zellen.....	77
5.5	BRAF ^{V600E} Melanome erwerben eine immunsuppressive Mikroumgebung	78
5.6	Einfluss von BRAFi und MEKi auf die TME und die Immunantwort.....	79
5.7	Effekt von BRAFi/MEKi auf Melanomzellen und Melanomzellen/Immunzellen-Kokulturen	80
5.7.1	Unterschied zwischen Mono- und Kokulturen.....	80
5.7.2	Modulation der Interleukin-Expression durch den BRAF-Status	81
5.7.3	Vergleich der unterschiedlichen Effekte von BRAF- und MEK-Inhibitoren auf die Interleukinproduktion sowie die Zellviabilität.....	82
5.7.4	Variationen innerhalb einer Melanomzelllinie	84
5.8	Limitationen.....	84
6	Zusammenfassung.....	85
7	Literaturverzeichnis	86
8	Anhang.....	116
9	Danksagung.....	134
10	Lebenslauf	135

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
AJCC	Engspr. Abk. für American Joint Committee on Cancer
AMP	Adenosinmonophosphat
APC	Antigenpräsentierende Zelle
ARAF	Engspr. Abk. für A-Raf-Proto-Oncogene
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	Engspr. Abk. für BCL2 associated agonist of cell death
BCL-2	Engspr. Abk. für B-cell lymphoma-2
BCLA2A1	Engspr. Abk. für BCL2 Related Protein A1
BIM	Engspr. Abk. für Bcl-2–interacting mediator of cell death
BIN	Binimetinib
BIRC7	Engspr. Abk. Für Baculoviral IAP repeat-containing protein 7
BMDC	Engspr. Abk. für Bone marrow derived dendritic cell
BRAF	Engspr. Abk. für Rapidly accelerated fibrosarcoma
BRAF_i	BRAF-Inhibitoren
CAF	Engspr. Abk. für Cancer-associated fibroblast
CANTOS	Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcomes Study
CBA	Engspr. Abk. für Cytometric Bead Array
CCL2	Chemokine CC-Chemokin-Ligand-2
CD	Engspr. Abk. für Cluster of differentiation
CDK4	Cyclin-abhängige Kinase 4
CDKN2A	Engspr. Abk. für Cyclin dependent kinase inhibitor 2A
c-KIT	Engspr. Abk. für cellular KIT
c-MET	Tyrosine-Proteinkinase Met
CO₂	Kohlenstoffdioxid
COB	Cobimetinib

CRAF	Englspr. Abk. für Cellular Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
CTLA4	Zytotoxisches T-Lymphozyten-Antigen 4
CXCL8	CXC-Motiv-Chemokin 8
DAB	Dabrafenib
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTIC	Dacarbazin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Englspr. Abk. für Epidermal Growth Factor
ELK-1	ETS Like-1 protein
ENC	Encorafenib
ErbB3	Erb-B2 Rezeptor-Tyrosinkinase 3
ETS	Englspr. Abk. für Erythroblast transformation-specific
FCS	Englspr. Abk. für Fetal calf serum
FDA	Englspr. Abk. für Federal Drug Administration
FGF2	Englspr. Abk. für Basic fibroblast growth factor
FOXD3	Englspr. Abk. für Forkhead Box D3
FOXP3	Englspr. Abk. für Forkhead Box P3
FSC	Englspr. Abk. für Forward Scatter
GTP	Guanosintriphosphat
HGF	Englspr. Abk. für Hepatocyte growth factor
HLA-G	Humanes Leukozyten-Antigen G
HRAS	Englspr. Abk. für Harvey-Rat-Sarcoma-Viral-Oncogene-Homolog
ICAM-1	Englspr. Abk. für Intercellular adhesion molecule
IGFL	Englspr. Abk. für Insulin-like growth factor 1
IL	Interleukin
KRAS	Englspr. Abk. für Kirsten-Rat-Sarcoma
LAG-3	Lymphozyten-Aktivierungsgen 3

LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Engl spr. Abk. für Mitogen-activated protein kinase
MC1R	Melanocortin-1-Rezeptor
MCL-1	Engl spr. Abk. für Induced Myeloid Leukemia Cell Differentiation Protein
mDC	myeloide DC
MDSC	Engl spr. Abk. für Myeloid-derived Suppressor Cells
MEK/ERK	Engl spr. Abk. für Extracellular signal-regulated kinase
MEKi	MEK Inhibitoren
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHCII	Engl spr. Abk. für Major histocompatibility complex II
MITF	Engl spr. Abk. für Melanocyte Inducing Transcription Factor
ml	Mililiter
MO-DC	Engl spr. Abk. für Monocyte derived dendritic cells
mRNA	Engl spr. Abk. für Messenger ribonucleic acid
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid)
NF-1	Engl spr. Abk. für Neurofibromatose Typ 1
NRAS	Neuroblastom-RAS-Virus-Onkogen-Homolog
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAX3	Engl spr. Abk. für Paired Box 3
PBMC	Engl spr. Abk. für peripheral blood mononuclear cells, Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Engl spr. Abk. für Phosphate Buffered Saline
PD1	Engl spr. Abk. für Programmed cell death protein
pDC	plasmazytoide DC
PDGFR	Engl spr. Abk. für Platelet-Derived-Growth-Factor
PDL-1	Engl spr. Abk. für Protein Programmed death-ligand 1
pERK	phosphoryliertes ERK
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PolyI:C	Engl spr. Abk. für Polyinosinic:polycytidylic acid

PTEN	Englspr. Abk. für Phosphatase and Tensin homolog
R848	Resiquimod
RAS	Englspr. Abk. für rat sarcoma
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Englspr. Abk. für revolutions per minute/ Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SOX3	Englspr. Abk. für SRY-related HMG-box
SSC	Englspr. Abk. für Side Scatter
SSM	Superfiziell spreitendes Melanom
β-Me	β-Mercaptoethanol
TAM	Englspr. Abk. für Tumor-associated macrophage
TCR	Englspr. Abk. Für T-cell receptor
tDC	tolerogene dendritischen Zellen
TERT	Telomerase Reverse Transkriptase
Th	T-Helferzelle
TILs	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TLR	Englspr. Abk. für Toll-like Receptor
TME	Englspr. Abk. für Tumor microenvironment
TNF-α	Englspr. Abk. für TNF receptor associated factor α
TP53	Tumorsupressor p53
TRA	Trametinib
Tregs	Regulatorische T-Zelle
UV	Ultraviolett
VEGF	Englspr. Abk. für Vascular-Endothelial-Cell-Growth-Factor
VEM	Vemurafenib
wt	wildtypisch, Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 1: Schema der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen	2
Abbildung 2: Epidermale Melanineinheit	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung des onkogenen BRAF-Signalwegs mit Verbindung zum PI3K-AKT-Signalweg	10
Abbildung 4: Immunsuppressive Tumormikroumgebung (TME) bei BRAF-V600E Melanom und immunmodulatorische Effekte von BRAF-Inhibitoren	15
Abbildung 5: Zugelassene systemische Therapien für das Maligne Melanom	22
Abbildung 6: Unterschiedliche Phasen vor und nach der Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Paque	37
Abbildung 7: Schematische Darstellung eines CBA-Assays	38
Abbildung 8: Generierung dendritischer Zellen aus Monozyten	41
Abbildung 9: Aufbau von Melanom Zell-Cokulturen mit PBMCs	42
Abbildung 10: Strukturen von MTT und dem gefärbten Formazan-Produkt	43
Abbildung 11: Einfluss von Resiquimod (R848) auf die Interleukin-(IL)-1 β , IL-6 und IL-8 Sekretion von Peripheral blood mononuclear cells (PBMC)	45
Abbildung 12: Einfluss von BRAFi und/oder MEKi auf die Interleukin-(IL)-1 β -Sekretion von Peripheral blood mononuclear cells (PBMC)	47
Abbildung 13: Einfluss von BRAFi und/oder MEKi auf die Interleukin-(IL)-6-Sekretion von Peripheral blood mononuclear cells (PBMC)	49
Abbildung 14: Einfluss von BRAFi und/oder MEKi auf die Interleukin-(IL)-8-Sekretion von Peripheral blood mononuclear cells (PBMC)	51
Abbildung 15: Exemplarischer Vergleich der Interleukin-(IL)- β -Sekretion in Peripheral blood mononuclear cells (PBMC)	52
Abbildung 16: Exemplarischer Vergleich der Interleukin-(IL)-6- und IL-1 β -Sekretion in Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) von BRAFi- <i>Respondern</i> und BRAFi- <i>Non-Respondern</i>	53
Abbildung 17: Exemplarischer Vergleich der Interleukin-(IL)-8- und IL-1 β -Sekretion in Peripheral blood mononuclear cells (PBMC)	54
Abbildung 18: Einfluss von Resiquimod (R848) auf die Interleukin-(IL)-1 β -, IL-6- und IL-8-Sekretion in Monocyte derived dendritic cells (MO-DC)	55
Abbildung 19: Einfluss von BRAFi und/oder MEKi auf die Interleukin-(IL)-6-Sekretion in Monocyte derived dendritic cells (MO-DC)	57

Abbildung 20: Einfluss von BRAFi und/oder MEKi auf die Interleukin-(IL)-8-Sekretion in Monocyte derived dendritic cells (MO-DC)	59
Abbildung 21: Einfluss von BRAFi und/oder MEKi auf die Zellviabilität von BRAF ^{WT} -Melanomzellen und BRAF ^{V600E} -Melanomzellen	61
Abbildung 22: Einfluss von BRAFi und/oder MEKi auf die Interleukin-(IL)-1 β -Sekretion in PBMC- bzw. BRAF ^{V600E} -Melanomzell-Monokulturen sowie in PBMC/BRAF ^{V600E} -Melanom-Zell-Kokulturen	63
Abbildung 23: Einfluss von BRAFi und/oder MEKi auf die Interleukin-(IL)-6-Sekretion in PBMC- bzw. BRAF ^{V600E} - bzw. BRAF ^{WT} -Melanomzell-Monokulturen sowie in PBMC/Melanomzell-Kokulturen	65
Abbildung 24: Einfluss von BRAFi und/oder MEKi auf die Interleukin-(IL)-8-Sekretion in PBMC- bzw. BRAF ^{V600E} - bzw. BRAF ^{WT} -Melanomzell-Monokulturen sowie in PBMC/Melanomzell-Kokulturen	67
Abbildung 25: Chemische Strukturen von der in unserer Arbeit angewendeten BRAF Inhibitoren (BRAFi) und MEK Inhibitoren (MEKi)	75
Abbildung 26: Frequenz der Responsivität humaner Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) auf eine BRAFi-Behandlung bezüglich der Produktion von Interleukin-(IL)-1 β , IL-6 und IL-8	75
Abbildung 27: Basale Konzentration von Interleukin-(IL)-1 β -, IL-6- und IL-8 Sekretion von Peripheral blood mononuclear cells (PBMC).....	116
Abbildung 28: Basale Konzentration von Interleukin-(IL)-1 β -, IL-6- und IL-8 Sekretion von Monocyte derived dendritic cells (MO-DC).....	117
Abbildung 29: Einfluss von BRAFi und/oder MEKi auf die Interleukin-(IL)-1 β -, IL-6 und IL-8 Sekretion von Peripheral blood mononuclear cells (PBMC).....	118
Abbildung 30: Einfluss von BRAFi und/oder MEKi auf die Interleukin-(IL)-1 β -, IL-6- und IL-8-Sekretion in Monocyte derived dendritic cells (MO-DC)	119
Abbildung 31: Frequenz der Responsivität der aus Monocyte derived dendritic cells (MO-DC) auf eine BRAFi-Behandlung.....	122
Abbildung 32: Vergleich der Konzentrationen von Interleukin (IL)-6 (pg/ml) und Interleukin (IL)-1 β (pg/ml) in humanen PBMC.....	124
Abbildung 33: Vergleich der Konzentrationen von Interleukin (IL)-8 (pg/ml) und Interleukin (IL)-1 β (pg/ml) in humanen PBMC.....	126
Abbildung 34: Vergleich der Konzentrationen von Interleukin (IL)-6 (pg/ml) und Interleukin (IL)-8 (pg/ml) in humanen PBMC.....	128
Abbildung 35: Gating Strategie von den gesamten Zellen zur Charakterisierung dendritischen Zellen	129
Abbildung 36: Wirkung von R848 auf die Oberflächenexpression der kostimulatorischen Molekülen CD80, CD86 und CD83 der MO-DC.....	131
Abbildung 37: Einfluss von BRAFi und/oder MEKi auf die Zellviabilität von BRAF-WT-Melanomzellen und BRAF-V600E-Melanomzellen	133

Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: Liste der Geräte und Hersteller	27
Tabelle 2: Liste der Materialien und Hersteller.....	29
Tabelle 3: Liste der Chemikalien und Hersteller	30
Tabelle 4: Liste der Supplemente	31
Tabelle 5: Liste der Medien	31
Tabelle 6: Liste der Puffer	31
Tabelle 7: Liste der Kits.....	32
Tabelle 8: Liste der Antikörper.....	32
Tabelle 9: Liste der Zelllinien	33
Tabelle 10: Liste der genutzen Software	33
Tabelle 11: Ansätze zur Analyse des potenziellen Einflusses von BRAFi und MEKi auf die Zytokin-Produktion von PBMC.	37
Tabelle 12: Interleukin-(IL)-1 β Responsivität der Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) der Spender 1– 27 gegenüber den BRAFi Dabrafenib (DAB), Vemurafenib (VEM) und Encorafenib (ENC, jeweils 0.25 μ M).....	37
Tabelle 13: Interleukin-(IL)-6 Responsivität der Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) der Spender 1– 27 gegenüber den BRAFi Dabrafenib (DAB), Vemurafenib (VEM) und Encorafenib (ENC, jeweils 0.25 μ M).....	120
Tabelle 14: Interleukin-(IL)-8 Responsivität der Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) der Spender 1– 27 gegenüber den BRAFi Dabrafenib (DAB), Vemurafenib (VEM) und Encorafenib (ENC, jeweils 0.25 μ M).....	121
Tabelle 15: Interleukin-(IL)-6 Responsivität der aus Monocyte derived dendritic cells (MO-DC) der Spender 1– 27 gegenüber den BRAFi Dabrafenib (DAB), Vemurafenib (VEM) und Encorafenib (ENC, jeweils 0.25 μ M).....	121
Tabelle 16: Interleukin-(IL)-8 Responsivität der aus Monocyte derived dendritic cells (MO-DC) der Spender 1– 27 gegenüber den BRAFi Dabrafenib (DAB), Vemurafenib (VEM) und Encorafenib (ENC, jeweils 0.25 μ M).....	122

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

Das maligne Melanom ist eine potenziell tödliche Hauterkrankung mit einer weltweit steigenden Inzidenz (1). Bis vor wenigen Jahren waren die Behandlungsmöglichkeiten des metastasierten Melanoms in fortgeschrittenen Stadien begrenzt. Die mittlere Überlebenszeit der Betroffenen betrug lediglich 6 bis 9 Monate (2).

Die jüngsten Fortschritte in der molekularen Onkologie und besonders die Entdeckung der Bedeutung des Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) Signalwegs für die Tumorprogression ermöglichten die Entwicklung neuer Strategien zur Behandlung des malignen Melanoms (3, 4). Etwa 40–50 % der kutanen Melanome sind von einer *v-raf fibrosarcoma (Raf) murine sarcoma viral oncogene homolog B* (BRAF) Mutation betroffen (5). Patienten mit einer BRAFV600-Mutation können mittlerweile zielgerichtet behandelt werden. Unter physiologischen Bedingungen wird das BRAF-Protein vor allem durch Wachstumsfaktoren aktiviert und führt wiederum zu einer konstitutiven Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kinase/*Extracellular-Signal-Regulated-Kinase* (MEK/ERK) Signalkaskade. Die nachgeschaltete MEK/ERK-Signalkaskade stimuliert ihrerseits u. a. die für das Tumorwachstum wichtige Angiogenese (6).

Im Jahr 2011 wurde Vemurafenib (VEM) als erster BRAF-Inhibitor (BRAFi) von der *Food and Drug Administration* (FDA) für den klinischen Einsatz zugelassen (7). Die BRAFi-Therapie ist hinsichtlich der Rate des progressionsfreien Überlebens (PFS) und der Ansprechraten herkömmlichen Chemotherapien deutlich überlegen (8). Später folgte die Zulassung der BRAFi Dabrafenib (DAB) und Encorafenib (ENC) (9). Generell führt eine BRAFi-Monotherapie bei 90 % der Patienten zu Nebenwirkungen und erhöht die Vulnerabilität für sekundäre Tumoren wie Keratoakanthome (KA), Plattenepithelkarzinome (cuSCC) und andere Neoplasien, einschließlich Genital- und Mundschleimhauttumoren sowie Basalzellkarzinomen (10). Diese Tumoren entstehen durch eine Hyperaktivierung des BRAF-Proteins, wodurch die Dimerisierung und die konsekutive Aktivierung von *Cellular Rapidly Accelerated Fibrosarcoma* (C-Raf) gefördert wird und letztlich zu einer paradoxen Aktivierung der MAPK-Signalkaskade führt (11). Auch das Auftreten von Resistenzen nach ca. 6–7 Monaten bei 90 % der Betroffenen könnte auf diesen Mechanismus zurückzuführen sein (12).

Durch die Einführung von Kombinationstherapien aus BRAFi und MAPK/ERK-Kinase Inhibitoren (MEKi) (DAB + Trametinib (TRA), VEM + Cobimetinib (COB), ENC + Binimetinib (BIN)) konnte die Resistenzbildung verzögert, das Gesamtüberleben der Melanompatienten verbessert und das Auftreten von kutanen Neoplasien reduziert werden, da hierdurch eine paradoxe ERK-Aktivierung verhindert wird (13,14).

Essenziell für die Tumorentwicklung sind nicht nur genomische Mutationen, sondern auch die Interaktion der Tumorzellen mit dem sie umgebenden Tumormikromilieu (*tumor microenvironment*, TME) und die Modulation der Immunantwort (15). Zellen der TME (z. B. krebsassoziierte Fibroblasten, CAF) fördern durch die Sekretion von *Epidermal-Growth-Factor* (EGF), *Hepatocyte-Growth-Factor* (HGF), *Insulin Growth Factor-like Family Member 1 and 2* (IGFL1, IGFL2) die Angiogenese. In diesem Zusammenhang wurde nachgewiesen, dass auch Immunzellen über lösliche Mediatoren wie Interleukin-(IL)-1 β , IL-6 und IL-8 das Tumorwachstum fördern (16). Präklinische Studien zeigen, dass eine BRAFi/MEKi-Therapie neben antitumoralen Wirkungen auch Off-Target-Effekte wie die Stimulation von T-Zellen sowie Veränderungen in der Interleukin-Produktion in gesunden murinen und humanen Immunzellen hervorrufen kann (9,17–20).

1.2 Ziel der Dissertation

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse möglicher immunmodulatorischer Off-Target Effekte der verschiedenen BRAFi bzw. MEKi (MAPKi) auf humane Immunzellen (Abbildung 1). Für die Untersuchung wurden humane mononukleäre Immunzellen aus dem peripheren Blut (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) gesunder Spender isoliert. Im Fokus der Analyse lagen Gesamt-PBMC und aus Blut-Monozyten abgeleitete Dendritische Zellen (MO-DC) sowie Melanomzellen.

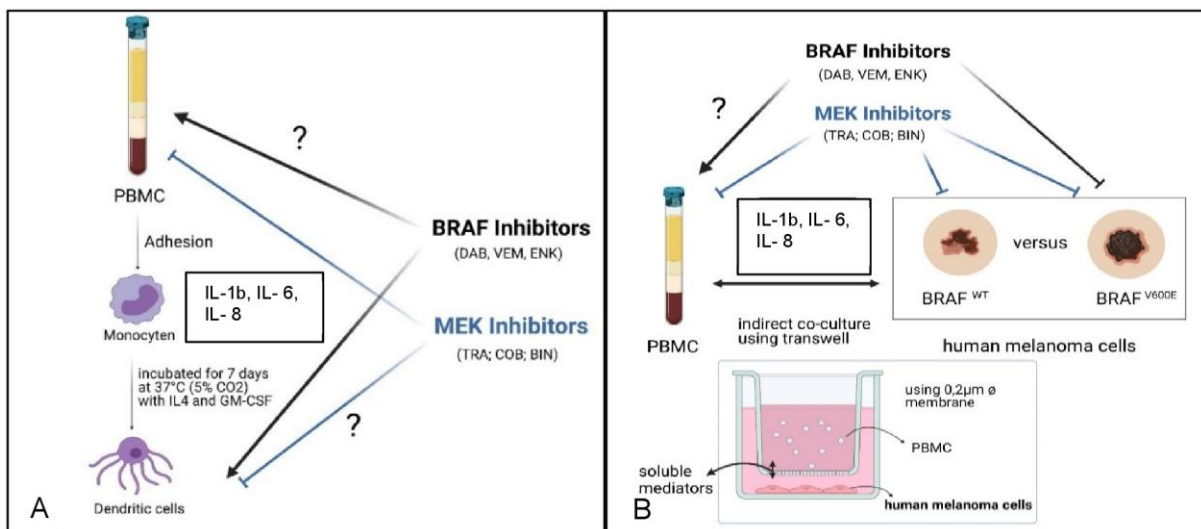


Abbildung 1: Schema der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen. Untersuchung potenzieller Off-Target-Effekte der BRAFi und MEKi mit einem Fokus auf die Zytokin-Produktion. A) Analyse von humanen PBMC und MO-DC B) Analyse von Koculturen aus PBMC und Melanomzelllinien (eigene Abbildung erstellt mit Biorender.com)

Im Detail sollte untersucht werden, inwieweit MAPKi die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (IL-1 β , IL-6, IL-8) modulieren, die sich ihrerseits auf die Wirksamkeit einer Behandlung mit MAPKi auswirken könnten. Weiter sollte untersucht werden, ob PBMC, die in

Reaktion auf BRAFi die IL-1 β , IL-6- und IL-8-Produktion steigern, die antitumorigenen Effekte von BRAFi und MEKi auf Melanomzellen über lösliche Mediatoren verändern (Abbildung 1B).

2 Literaturdiskussion

2.1 Entstehung des malignen Melanoms

Das maligne Melanom, auch schwarzer Hautkrebs genannt, entwickelt sich aus Zellen des melanozytären Systems und ist durch eine frühe lymphogene und hämatogene Metastasierung und eine entsprechend ungünstige Prognose gekennzeichnet (21). Vorrangig finden sich Fernmetastasen im zentralen Nervensystem (ZNS), in der Leber und in der Lunge (22).

2.2 Melanozyten-Homöostase

Melanozyten sind pigmentproduzierende Zellen, die sich hauptsächlich im *Stratum basale* der Epidermis befinden. In dieser obersten Schicht der Haut machen Melanozyten etwa 5–10 % der Zellen aus (9). Melanozyten kommen aber auch im Bulbus der Haarfollikel, in Schleimhautoberflächen sowie in anderen Organsystemen (z. B. Herz, *Stria vascularis* der Cochlea des Innenohrs, Meningen, Aderhaut des Auges) vor (23, 24). Dermale Melanozyten finden sich auch in Nävi (Muttermale) (25). Etwa 95 % der primären Melanome entstehen aus Melanozyten der Haut (26). Daher beziehen sich die folgenden Ausführungen, wenn nicht anders vermerkt, auf kutane Melanome.

Die Vorläufer der Melanozyten, die Melanoblasten, wandern während der Embryonalentwicklung aus dem dorsalen Teil des sich schließenden Neuralrohrs in die Epidermis und in die Haarfollikel (27). Unter dem Einfluss verschiedener Transkriptionsfaktoren (z. B. *SRY-Box Transcription Factor 10* (SOX10), *Paired Box Gene 3* (PAX3), *Forkhead Box D3* (FOXD3)) und insbesondere dem Mikrophthalmie-assoziierten Transkriptionsfaktor (MITF) differenzieren sie zu Melanozyten (27). Die Melanozyten sind über Zelladhäsionsmoleküle wie E-Cadherin eng mit Keratinozyten verbunden und bilden sogenannte epidermale Melanineinheiten (28). In diesen Einheiten transportiert ein Melanozyt über seine dendritischen Fortsätze das in zellulären Organellen (Melanosomen) gelagerte Melanin (29) zu benachbarten Keratinozyten (Abbildung 2). Mit zunehmender Reife akkumulieren Keratinozyten das Melanin-Pigment, wodurch eine Schutzbarriere gegen durch ultraviolettes (UV) Licht induzierte Desoxyribonukleinsäure-(DNA)-Schäden und gegen die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies geschaffen wird (30).

Melanin kommt in zwei chemischen Formen vor. Das dunklere Eumelanin (31) absorbiert UV-Photonen (32) wirksamer als das hellere Phäomelanin (33). Phäomelanin entsteht durch den Einbau schwefelhaltiger Gruppen (L-Cystein) in Melanin-Vorstufen (34). Die Menge an Phäomelanin ist bei dunkel- und hellhäutigen Menschen fast identisch. Die Eumelanin-Menge

entscheidet dagegen über die Hautpigmentierung, die UV-Empfindlichkeit und damit über das Melanom-Risiko.

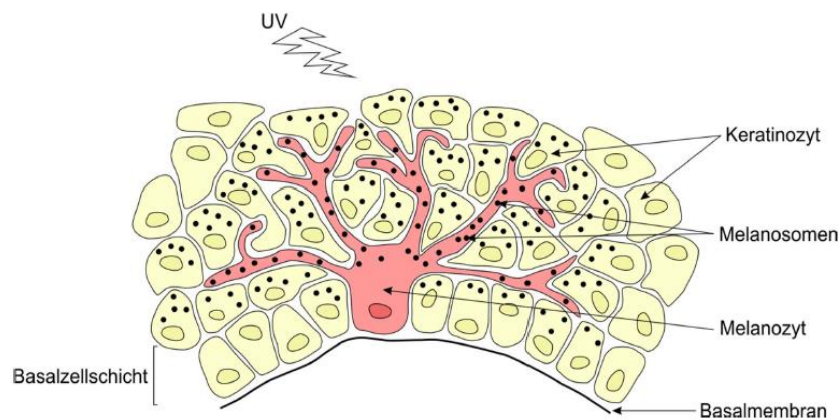


Abbildung 2: Epidermale Melanineinheit (35)

2.3 Melanomentstehung

Eine Störung des Gleichgewichts der Signalkaskaden in der epidermalen Melanineinheit kann zu einer kontinuierlichen Proliferation von Melanozyten bis hin zur Entwicklung eines Melanoms führen (36). Die Exposition der Haut gegenüber solarer UVA- (λ 315–400 nm) und UVB- (λ 280–315 nm) Strahlung gilt als Hauptrisikofaktor für die Entstehung von malignen Melanomen (37). Etwa 60–70 % der kutanen Melanome werden durch UV-Strahlung verursacht (38). Dieser Mechanismus weist jedoch paradoxe Merkmale auf. Bei für Melanome anfälligen hellhäutigen Personen sind häufiger Stellen betroffen, die intermittierend dem Sonnenlicht ausgesetzt sind (z. B. Rumpf, Arm, Beine) und seltener chronisch exponierte Areale (z. B. Gesicht). Dieser Befund stützt die Hypothese, dass eine chronische Exposition eine protektive Wirkung ausübt (39). Der Melanocortin-1-Rezeptor (MC1R) beeinflusst über verschiedene Mechanismen die Mutagenese und damit das Krebsrisiko. Durch die Anregung der Melanisierung (Bräunung) der Epidermis schützt der MC1R die Haut vor UV-induzierten DNA-Schäden. Gleichzeitig wirkt er positiv auf die Nukleotid-Exzisions-DNA-Reparatur (25). MC1R-Polymorphismen führen zu unterschiedlichen Phänotypen. Menschen mit rotem Haar, heller Haut und hellen Augen weisen eine geringere Pigmentierung auf, wodurch sich ihre Empfindlichkeit gegenüber einer UV-Exposition erhöht (40).

Keratinozyten bilden nicht nur eine hochwirksame UV-Barriere, sondern spielen auch für die Melanozyten-Proliferation eine Rolle (38). Das von ihnen produzierte Melanozyten-stimulierende Hormon (MSH) und das adrenocorticotropes Hormon (ACTH) aktivieren den MC1R auf der Oberfläche von Melanozyten. Die daraufhin ausgelöste intrazelluläre Kaskade führt zu einer Expression von MITF (42). Dieser Melanozyten-spezifische Transkriptionsfaktor spielt eine wichtige, aber auch paradoxe Rolle bei der Entstehung von malignen Melanomen

(43). Durch die Aktivierung der Expression verschiedener Gene unterdrückt MITF die Invasion und Metastasierung von malignen Melanomen (26–29), fördert aber gleichzeitig auch das Überleben der Melanomzellen durch die Expression anti-apoptotischer Proteine wie *B-Cell Lymphoma* (BCL2), *BCL2-Related Protein A1* (BCLA2A1), und *Baculoviral IAP Repeat Containing 7* (BIRC7) (44, 45).

Das wichtigste interzelluläre Adhäsionsmolekül zwischen Melanozyten und Keratinozyten ist E-Cadherin, das unter normalen Bedingungen von beiden Zelltypen exprimiert wird (43). Melanome exprimieren häufig kein E-Cadherin, sondern N-Cadherin. Dieses veränderte Expressionsverhalten beeinträchtigt ihre Interaktion mit Keratinozyten. N-Cadherin exprimierende Melanozyten assoziieren bevorzugt mit Fibroblasten und vaskulären Endothelzellen (47).

Laut des Clark-Mehrstufenmodells der Melanom-Pathogenese kommt es bis zur Entwicklung von Melanomen zu einer Reihe vorheriger histopathologischer Veränderungen. Dazu zählen gutartige melanozytäre Nävi und dysplastische Nävi. Die Melanom-Entwicklung beruht auf der Akkumulation von pathologischen genetischen und epigenetischen Ereignissen. Ein mögliches primäres Ereignis bei einer melanozytären Neoplasie ist der Erwerb einer BRAF-Mutation (48, 49).

2.4 Melanomtypen

Die auf histologische Wachstumsmuster basierende Klassifikation beinhaltet mit dem superfiziell spreitenden Melanom, dem nodulären Melanom, dem *Lentigo maligna* und dem akrolentiginösen Melanom vier Melanom-Typen (50, 51). Die Anwendung dieser Klassifikation ist jedoch umstritten (52), da eine erhebliche Anzahl von Melanomen keiner dieser Kategorien zugeordnet werden kann und der histogenetische Typ keinen unabhängigen prognostischen Faktor darstellt (53). Zudem entstehen viele Melanome, einschließlich der Akren- und Schleimhautmelanome, nicht aus melanozytären Nävi, sondern *de novo* (49).

Bastian *et al.* entwickelten auf der Basis der Genomsequenzierung Anfang der 2000er eine Neueinteilung, die klinisch-pathologische Merkmale und somatische genetische Veränderungen der Melanome berücksichtigt (54). Basierend auf dem Mutationsmuster (z. B. BRAF, Neuroblastoma-RAS (NRAS), Stammzellefaktoren-Rezeptor (c-KIT)), dem Ort des Primärs und dem Grad der Schädigung durch UV-Strahlung differenzierten sie zwischen Melanomen auf sonnenlichtexponierter, chronisch geschädigter Haut (CSD-Melanom), Melanomen der Haut ohne chronische Sonnenschäden (Nicht-CSD-Melanom), Melanomen auf Handflächen, Fußsohlen und Nagelbetten (Akrolentiginöses Melanom) und Melanomen auf Schleimhäuten (mukosales Melanom) (53).

2.5 Driver-Mutationen

Im Vergleich zu den meisten soliden Tumoren weisen maligne Melanome und insbesondere die kutanen Formen eine deutlich komplexere Mutationslast auf (55). An der Pathogenese sind mehrere Signalkaskaden beteiligt (56). Neuere Studien belegen, dass UV-induzierte Mutationen die Umwandlung von melanozytären Nävi in Melanome fördern. Dazu zählen Driver-Mutationen in den Genen für *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A* (CDKN2A), Tumor-Protein 53 (TP53), Neurofibromin 1 (NF1), *Ras-related C3 botulinum Toxin substrate* (RAC1) und *Phosphatase and Tensin Homolog* (PTEN) (30, 31). Rund 46 % der Driver-Mutationen sind mit UV-induzierten DNA-Schäden assoziiert (32). Außerdem weisen Tumore aus UV-exponierten Arealen eine höhere Mutationslast auf als Tumore in Bereichen mit geringerer UV-Strahlen-Exposition (33). In Abhängigkeit von den Driver-Mutationen lassen sich viele Melanome in vier molekulare Subtypen unterteilen: (i) Melanome mit BRAF-Mutation, (ii) Melanome mit NRAS-Mutation, (iii) Melanome mit NF1-Mutation und (iv) BRAF/NRAS/NF1-Wildtyp-(WT)-Tumoren (57). Neben den Genen der zuvor genannten Hauptsignalwege können auch weitere Gene von Mutationen betroffen sein, darunter *CYP19A1* (eine Monooxygenase der Cytochrom-P450-Familie), *ESR1* (Östrogenrezeptor 1), *IDH1* (Isocitrat-Dehydrogenase, ein Enzym des Citratzyklus) sowie *SF3B1* (eine Untereinheit des RNA-Spleißfaktors 3B) (56).

Etwa 7–15 % der Melanom-Patienten weisen eine positive familiäre Anamnese auf (1). Familiäre Melanome treten oft zusammen mit anderen Malignitätsphänomenen auf. Dazu zählen das familiäre atypische multiple Maulwurf-Melanom-Syndrom (FAMMM-Syndrom) und seine Variante, das Melanom-Astrozytom-Syndrom (MAS) (58). Die häufigsten Mutationen bei einer positiven Familienanamnese betreffen CDKN2A (p16); seltener sind Mutationen in der Cyclin-abhängigen Kinase 4 (CDK4) (58–60).

2.5.1 MAPK- und Phosphoinositol-3-Kinase-(PI3K)-Signaling

Der MAPK-Signalweg, bestehend aus der Kinase-Kaskade RAS-RAF-MEK-ERK, ist der am häufigsten überaktivierte Signalweg beim malignen Melanom (Abbildung 5) (61). Auch der mit der MAPK-Signalkaskade verbundene PI3K-Proteinkinase-B-(AKT)-Signalweg ist für die Entwicklung von malignen Melanomen von Bedeutung. Der PI3K-AKT-Signalweg steuert die Proliferation, das Wachstum, die Apoptose und die Umstrukturierung des Zytoskeletts (62). Die Zielgene beider Signalwege können interagieren und das daraus resultierende Netzwerk führt zum Progress des Tumors (63). Wesentlich ist, dass der PI3K-AKT-Signalweg auch durch RAS aktiviert werden kann (64).

Eine PTEN-Deletion ist die häufigste genetische Variation in der PI3K-AKT-Kaskade (53). PTEN fördert die Expression pro-apoptotischer Moleküle (z. B. *BH3 interacting domain death agonist*) und von Caspasen und unterdrückt die Expression anti-apoptotischer Proteine wie BCL2. Ein PTEN-Verlust verursacht somit ein abnormes Zellwachstum und eine Abnahme der

Apoptose (Abbildung 3). Bei der Melanom-Pathogenese kommt es meistens nicht zu einer Strukturveränderung des PTEN-Proteins, vielmehr ist es entweder funktionell inaktiv oder sein Gen ist durch Hypermethylierung stummgeschaltet (65). Laut einer Studie von Cabrita *et al.* unterdrücken entdifferenzierte PTEN-negative Melanome die T-Zell-Infiltration in den Tumor, verkürzen das Überleben der Patienten und fördern Resistenzen gegenüber zielgerichteten Therapien und Immuntherapien (66).

2.5.2 BRAF-Mutationen

Etwa 40–60 % aller Patienten mit malignen Melanomen weisen eine Mutation im Codon 600 des BRAF-Gens auf (67). Dabei handelt es sich in 90 % der Fälle um einen Basenaustausch von Thymin zu Adenin, wodurch im BRAF-Protein die hydrophobe Aminosäure Valin (V) durch die hydrophile Aminosäure Glutaminsäure (E) ersetzt wird (BRAF-V600E) (68). Dieser Aminosäure-Austausch führt zu einer konstitutiven BRAF-Hyperaktivität; ca. 500-fach im Vergleich zu nicht mutierten BRAF (69). Die zweithäufigste BRAF-Mutation V600K, bei der Valin durch Lysin substituiert ist, tritt bei ~20 % der Patienten mit BRAF-Mutationen auf und ist häufig mit chronischen Sonnenschäden assoziiert, wobei auch ein höheres Alter einen Risikofaktor darstellt (70). Melanome mit BRAF-V600K-Mutation zeigen eine erhöhte Neigung zur Metastasierung in Lunge und ZNS (71). Weniger häufig sind BRAF-V600R-Mutationen (Ersatz von Valin durch Arginin), die etwa 5–7 % der Patienten betreffen (72).

Die Mitglieder der RAS-Genfamilie sind potente Protoonkogene. RAS-Proteine mit dysregulierter Guanosintriphosphat-(GTP)-ase Aktivität und dadurch fehlender Deaktivierung tragen zur Tumorphagenese bei (73). RAS-Proteine sind mit der Zellmembran assoziiert und kommen in drei gewebsspezifischen Isoformen vor (*Harvey-Rat-Sarcoma-Viral-Oncogene-Homolog* (HRAS), *Kirsten-Rat-Sarcoma* (KRAS), NRAS) (74). NRAS-Mutationen treten bei bis zu 20–30 % der malignen Melanome auf und sind daher am häufigsten (75–77). Aktiviertes RAS stimuliert Proteine der RAF-Familie und aktiviert den nachgeschalteten PI3K-AKT-Signalweg (76). Die RAF-Kinase-Familie besteht aus den drei ähnlich aufgebauten Serin-Threonin-Kinasen *A-Raf-Proto-Oncogene* (ARAF), BRAF und CRAF (auch Raf-1) (78, 79). Diese Proteine unterscheiden sich in ihren funktionellen Domänen und insbesondere in den für die RAF-Interaktion essenziellen Bindungsdomänen (80). Das BRAF-Protein besitzt eine wesentlich höhere basale Kinase-Aktivität als CRAF oder ARAF, was auf eine unterschiedliche Anzahl von RAS-GTP abhängigen Phosphorylierungsstellen zurückzuführen ist; diese sind entscheidend für eine maximale Aktivierung (82). Da BRAF nur zwei dieser Stellen (S598 und T601) besitzt und CRAF vier, wird BRAF schneller aktiviert (81). Weiter bindet BRAF mit einer höheren Affinität an MEK1 und MEK2, was BRAF zum stärksten Aktivator der MAPK-Signaltransduktionskaskade macht (82, 83).

Zur Aktivierung der MAPK-Signalkaskade binden extrazelluläre Botenstoffe (z. B. Zytokine, Wachstumsfaktoren) an spezifische Zelloberflächenrezeptoren (z. B. Tyrosine-Proteinkinase Met (c-MET) und Rezeptor-Tyrosinkinase Erb-B2 Typ 3 (ErbB3)) (Abbildung 3) (84). Die darauffolgende Dimerisierung dieser Rezeptor-Tyrosinkinasen aktiviert das onkogene G-Protein RAS. Durch den Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) durch GTP mit Hilfe von *Son-of-Sevenless*-(SOS)-Faktoren wechselt RAS von seiner inaktiven in die aktive Form (85). RAS-GTP ist der Ausgangspunkt für eine Kaskade von Phosphorylierungsreaktionen, an denen RAF, MEK1/2 und ERK1/2 beteiligt sind (86). Als Endpunkt dieser Kettenreaktion wirkt ERK auf Transkriptionsfaktoren wie *Erythroblast transformation-specific* (ETS), *ETS Like-1 protein* (ELK-1), Myc oder indirekt auf intrazelluläre Signalmoleküle wie *p90 ribosomal S6 kinases* (p90-RSK) und steuert Differenzierungs- und Proliferationsprozesse (86–90).

Unter anderem reguliert der RAS/RAF/MAPK-Signalweg die Apoptose, indem er Moleküle wie *Bcl-2-associated death protein* (BAD), *Bcl-2-interacting mediator of cell death* (BIM), *myeloid cell leukemia-1* (MCL-1), Caspase 9 und BCL2 posttranslational modifiziert bzw. phosphoryliert (91,92).

Da melanozytäre Nävi häufig von einer BRAF-Mutation betroffen sind, scheint der RAS/RAF/MAPK-Signalweg eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Neoplasien zu spielen. Eine solche Mutation reicht aber für die Tumorgenese nicht aus (93,94). Die UV-Strahlung verursacht weitere somatische Mutationen in den *Telomerase-Reverse-Transkriptase* (*TERT*)- und *CDKN2A*-Genen (95), die mit der BRAF-Mutation synergistisch wirken können. Bei Mäusen mit BRAF-V600E-Mutationen beschleunigt UV-Strahlung die Tumorentstehung (96).

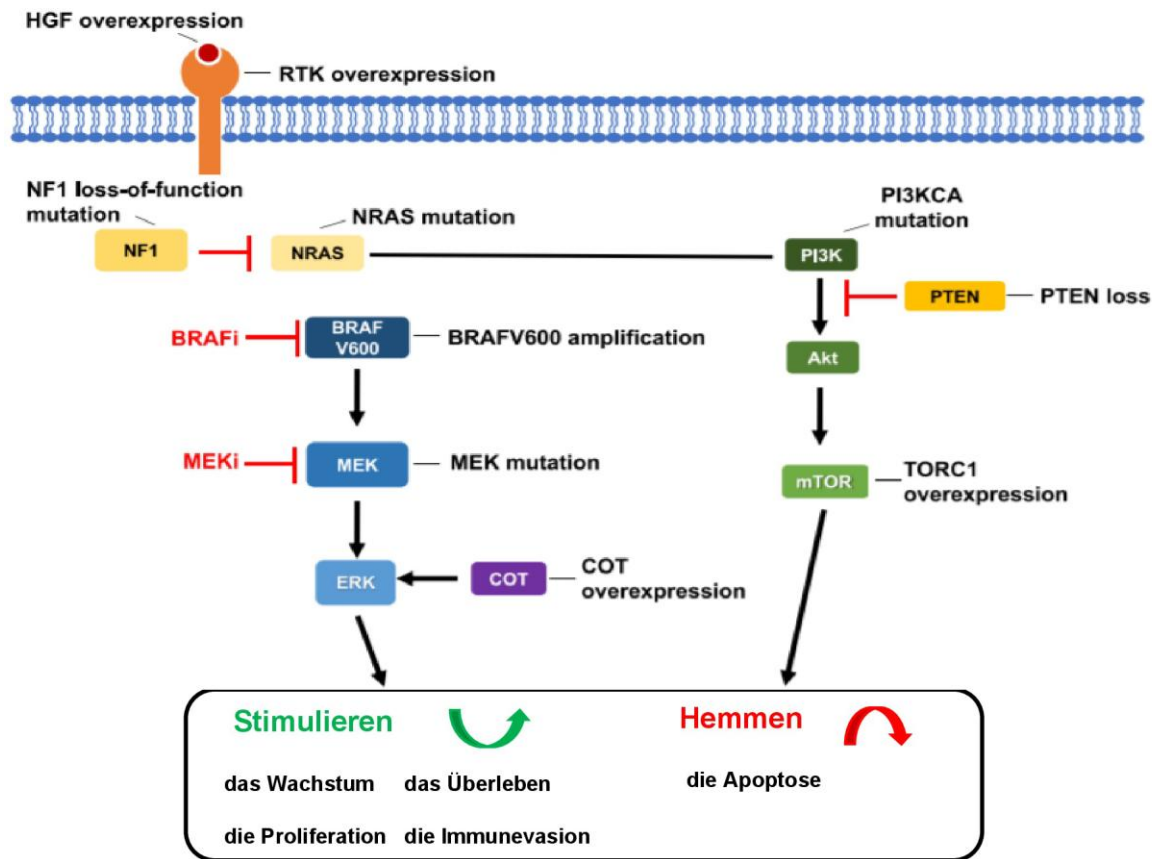


Abbildung 3: Schematische Darstellung des onkogenen BRAF-Signalwegs mit Verbindung zum PI3K-AKT-Signalweg (modifiziert nach (97)). Die PI3K-AKT-Kaskade wird durch die Bindung von extrazellulären Liganden an Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) ausgelöst. Die Bindung führt zur Phosphorylierung und Aktivierung der über eine Adapteruntereinheit an die RTK gebundene PI3K. Durch eine allosterische Aktivierung wandelt PIP₂ in das Membranlipid PIP₃ um, das verschiedene Signalproteine einschließlich AKT rekrutiert. Die Interaktion von PIP₃ führt bei AKT zu einer Konformationsänderung und Phosphorylierung, wodurch das Protein aktiviert wird. AKT ist ein Protoonkogen-Produkt. Nach seiner Aktivierung transloziert AKT in den Nucleus und modifiziert wichtige an der Apoptose beteiligte Proteine (z. B. BACL-2) und Proteintranslation (z. B. mTOR). PTEN dephosphoryliert PI3K Substrate, wie PDK1 und AKT und wirkt als negativer Regulator dieser Kaskade (98).

2.5.3 NRAS-Mutationen

Mutationen im NRAS-Gen gehören zu den häufigsten Treiberereignissen im MAPK- und PI3K-AKT-Signalweg. In ca. 20–30 % der Melanome zeigt NRAS eine Punktmutation am Codon 61, das für Leucin codiert (99). NRAS-Mutationen führen zu ungünstigen Prognosen, schweren Verläufen und fördern potenziell die Resistenzbildung unter Therapie. Aktiviertes NRAS stimuliert sowohl die MAPK- als auch die PI3K-AKT-Kaskade, während BRAF nur die MAPK-Kaskade aktiviert (100). Laut Literatur zeigen Zellen entweder Mutationen im NRAS oder in BRAF (101). Diese Mutationen schließen sich auf Einzelzelebene gegenseitig aus, jedoch nicht im ganzen Tumor (102). Da BRAF-Mutationen in Melanomzellen häufiger vorkommen als NRAS-Mutationen (60 % vs. 20 %), scheinen BRAF-mutierte Zellen einen Progressionsvorteil zu besitzen (101).

2.5.4 Weitere Driver-Mutationen

Bei ca. 6–10 % der Schleimhaut- und akrolentiginösen Melanome sind aktivierende Mutationen im Stammzellfaktor-Rezeptor (c-KIT, CD117) nachweisbar (103). c-KIT ist ein membranständiger Klasse-III-Tyrosinkinase-Rezeptor (104). Bei Bindung seines Liganden kommt es zur Dimerisierung und Autophosphorylierung des Rezeptors, wodurch intrazelluläre Signalkaskaden (MAPK, PI3K) aktiviert werden. C-KIT ist am Erhalt der Homöostase verschiedener Zellen beteiligt (z. B. hämatopoetische Zellen, Mastzellen, Keimzellen, Melanozyten) (105, 106). Aktivierende Hotspot-Mutationen in den Exonen 9, 11, 13 und 17 des c-KIT-Gens korrelieren mit der Entstehung eines malignen Melanoms. Solche Tumoren reagieren auf Tyrosinkinase-Inhibitoren (Imatinib, Nilotinib, Dasatinib) (107). Den größten Therapieerfolg zeigten Patienten mit Mutationen in den Exons 11 und 13 (108).

In den S3-Leitlinien wird bei der molekulargenetischen Diagnostik des malignen Melanoms die Bestimmung des BRAF- und c-KIT-Mutationsstatus erst bei fortgeschrittenen, irresektablen Melanomen (ab Stadium III) empfohlen, da eine Behandlung mit BRAFi erst ab Stadium IIIA zugelassen ist. Früher wurde oft der Primarius zur Bestimmung der Mutationslast verwendet; inzwischen wird meist Metastasen-Material zur Untersuchung herangezogen, da sich der Mutationsstatus mit der Zeit verändern kann (109,110).

Am dritthäufigsten kommen in Melanomen NF1-Mutationen vor (111). Melanome mit NF1-Mutationen entstehen typischerweise an chronisch sonnenexponierten Hautarealen oder bei älteren Menschen und zeigen eine hohe Mutationslast (111, 112). Sie sind mit einem schlechten Gesamtüberleben verbunden und sprechen schlecht auf BRAFi an. NF1-Mutationen treten häufig bei bestimmten Subtypen auf, insbesondere bei desmoplastischen Melanomen (113, 114). Veränderungen im NF1-Tumorsuppressor-Gen sind häufig mit RAS- oder BRAF-Mutationen assoziiert (115). NF1-Keimbahnmutationen führen zur Neurofibromatose Typ I. Dieses häufige Tumorsyndrom wird durch eine Dysregulation des RAS/MAPK-Signalwegs (RASopathie) verursacht.

Bei 20–25 % der malignen Melanome handelt es sich um triple-negative Entitäten. In dieser heterogenen Untergruppe fehlen Mutationen in *BRAF*, *NRAS*, *HRAS*, *KRAS* und *NF1*. Die Driver-Mutationen betreffen Gene für *Anaplastic lymphoma kinase* (ALK) (3,5 %), *Serine/Threonine Kinase 31* (STK31) (8,7 %), *Diacylglycerol-Kinase-Iota* (DGKI) (4,7 %), *Kinase-Insert-Domain-Receptor* (KDR) (6,4 %) oder *Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 4* (ERBB4) (11,6 %) (57).

Neben somatischen Mutationen können maligne Melanome auch auf Keimbahnmutationen von Driver-Genen beruhen. 10 % aller Melanompatienten weisen eine positive Familienanamnese, was das Risiko für die Entwicklung eines Melanoms verdoppelt (116). Während bei sporadisch entstandenen Melanomen Mutationen in Genen der MAPK-

Signalkaskade dominieren, die derzeit das Ziel der meisten gerichteten Therapien ist (117), ist bei familiären Melanomen meist das CDKN2A-Gen betroffen. 20–40 % der Melanome mit familiärer Belastung zeigen solche Mutationen; am häufigsten finden sie sich in Melanomen der Akren und Schleimhäute (118).

Auch zellzyklus-regulierende Moleküle (p14, p16) fördern die Melanomgenese. p14^{ARF} steuert die Funktion des Tumorsuppressors p53. Eine Deletion des p14-Gens führt zum Abbau von p53 und einer unkontrollierten Zellproliferation (119). Die häufig bei familiären Melanomen vorkommenden p16^{INK4a}-Mutationen beeinflussen den *Cyclin D1- Cyclin-dependent kinase 4* (CCND1–CDK4-Komplex) und wirken proliferationsfördernd (120).

2.6 Einfluss von BRAF-V600E auf das Tumormikromilieu

Neben der Kommunikation über lösliche Faktoren (z. B. parakrine Wachstumsfaktoren) interagieren Zellen auch über Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion und *Gap Junctions* (121). Veränderte Wechselwirkungen zwischen neoplastischen und gesunden Zellen der TME können zum unkontrollierten Tumorwachstum und zur Tumorerkrankung beitragen (122). So fördern beispielsweise die tumorassoziierten Makrophagen (TAMs) durch die Ausschüttung von Proteasen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren das Tumorwachstum und die Angiogenese (123). Darüber hinaus unterstützen tumorassoziierte Fibroblasten (CAFs) das Tumorwachstum. Sie werden durch von Tumorzellen und anderen Stromazellen freigesetzte Faktoren wie *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β), *Epidermal-Growth-Factor* (EGF), „*Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF) und *Fibroblast Growth Factor 2* (FGF)-2 aktiviert und sezernieren EGF, *Hepatocyte-Growth-Factor* (HGF), *Insulin Growth Factor-like Family Member 1 und 2* (IGFL1 und IGFL2) (123).

In Melanomen und Schilddrüsenkarzinomen wurde eine Assoziation der BRAF-V600E-Mutation mit immunmodulatorischen Effekten auf die vorgenannten Zelltypen nachgewiesen (Abbildung 4A) (6,68,124).

Darüber hinaus sezernieren Tumorzellen immunmodulatorische Zytokine (z. B. *Vascular-Endothelial-Cell-Growth-Factor* (VEGF)) und andere Mediatoren (z. B. Stickstoffmonoxid (NO)), die die Tumorprogression und einen chronischen Entzündungszustand im TME fördern (16). Aufgrund dieser chronischen Entzündung wandern immunsuppressive Zellen (z. B. regulatorische T-Zellen (Tregs) und Tumor-assoziierte neutrophile Granulozyten (TAN)) in die TME ein (125). Chemotaktisch angezogen werden auch Monozyten, die aufgrund der Milieufaktoren in der TME zu TAMs differenzieren (125). Immunregulatorische Mediatoren (z. B. IL-6, IL-10, *Transforming-growth-factor-beta* (TGF-β)) unterstützen die Differenzierung von Monozyten zu TAMs (126). Von TAMs sezernierte Proteasen tragen zu einer

immunsuppressiven TME bei, die die Metastasierung und Neoangiogenese von Tumoren begünstigt (127).

Pro-inflammatorische Zytokine (z. B. IL-1, IL-6, IL-17, IL-21 und IL-23) wirken tumorfördernd, indem sie die Apoptose verhindern und die Zellproliferation anregen (128). IL-8 und VEGF fördern die Epithelial-Mesenchymal-Transition (EMT) und die Angiogenese. Zudem fördern TAMs, tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) wie IL-17+ und krebssassoziierte Fibroblasten (CAF) die Aufrechterhaltung des immunsuppressiven Milieus (129). In experimentellen Tumormodellen und bei Tumorpatienten wurde eine Korrelation zwischen der Häufigkeit bestimmter Untergruppen tumorinfiltrierender Leukozyten bzw. Stromazellen in der TME und dem Krankheitsverlauf beobachtet (130–132). Hierbei waren Makrophagen des M2-Phänotyps, *myeloid-derived suppressor cells* (MDSCs), dendritische Zellen (DCs) und Tregs mit einem Fortschritt der Tumorentwicklung assoziiert (133).

Im Vergleich zu BRAF-WT-Tumoren zeigt das Mikromilieu bei BRAF-mutierten Tumoren eine doppelt so hohe Dichte an *Forkheadbox-Protein*-(FOXP3)-positiven Tregs, die über eine Hemmung der Anti-Tumorantwort die Prognose verschlechtern (134). Eine vergleichbar erhöhte Anzahl an Tregs wurde bei einem induzierbaren, autochthonen, murinen, BRAF-mutierten Tumormodell im Frühstadium festgestellt (135). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass immunsuppressive Moleküle (z. B. Humanes Leukozyten-Antigen G (HLA-G), *Programmed-Death-Ligand 1* (PD-L1)) von BRAF-V600-mutierten Tumoren überexprimiert werden (136), wodurch die Infiltration mit Tregs und TAMs gefördert wird (137).

Auch lösliche Mediatoren spielen in diesem Kontext eine bedeutende Rolle. Studien fanden starke Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen BRAF-Mutationen und einer veränderten Chemokin-Ausschüttung in der TME (136). *In vitro* induzierte die BRAF-V600E-Mutation die Sekretion von IL-1 α , IL-6, IL-10 sowie VEGF durch Melanomzellen (138,139). Diese immunmodulatorischen Zytokine fördern die Rekrutierung von MDSC und Tregs in die TME und unterdrücken die T-Effektorzell-Aktivität (140). Ähnliche Beobachtungen machten auch Sumimoto *et al.*, die für BRAF-V600-mutierte Melanomzelllinien eine erhöhte IL-6- und IL-10-Expression detektierten.

Husain *et al.* konnten in Gewebeproben von anaplastischen Schilddrüsenkarzinomen hohe Konzentrationen von VEGF-A, VEGF-C und IL-6 nachweisen, deren Konzentrationen mit dem BRAF-V600E-Mutationsstatus positiv korrelierten (141). IL-6 ist ein pleiotropes immunmodulatorisches Zytokin, das über Aktivierung von Januskinasen (JAKs) und den nachgeschalteten Transkriptionsfaktor *Signal-Transducer-and-activator-of transcription 3* (STAT3) die Tumorentwicklung fördert. Dementsprechend war neben den hohen IL-6-Konzentrationen in Lungen-, Nieren- und Brusttumoren eine erhöhte Expression von STAT3 nachweisbar (142).

Die Sekretion der beiden tumorfördernden Chemokine CC-Chemokin-Ligand-2 (CCL2) und IL-8 (auch bekannt als CXCL8, CXC-Motiv-Chemokin 8) wird ebenfalls von BRAF-Mutationen beeinflusst. Die Expression von IL-8 und seines Rezeptors korreliert oft mit dem Stadium und Differenzierungsgrad von Tumoren (143). In einem Glioblastom-Mausmodell war eine erhöhte CCL2-Expression auf die BRAF-Mutation zurückzuführen (144). Auch bei kolorektalen Tumoren steht der BRAF-Mutationsstatus mit dem IL-8-Spiegel in Verbindung und erhöht die IL-8-Expression durch einen C/EBP-Homologous-Protein-(CHOP)-abhängigen Mechanismus (145). Laorden *et al.* wiesen nach, dass IL-8 *in vitro* das Wachstum von Melanomen, die neben mutiertem NRAS auch eine BRAF-Mutation aufwiesen, durch eine BRAFi-induzierte paradoxe Aktivierung des ERK-Signalweges stimuliert. Dieser Effekt ließ sich jedoch durch die Hemmung des MEK-Signalwegs aufheben (146).

Die beiden pro-inflammatorischen Chemokine CCL7 und CCL8 (142) wirken chemotaktisch u. a. auf DCs (147). Zudem fördert CCL7 die Epithelial-Mesenchymal-Transition (EMT) (148). Die Erhöhung der CCL7-Sekretion infolge einer BRAF-V600E-Mutation erhöht bei Patienten mit Langerhans-Zell-Histiozytose (LCH) das Metastasierungspotenzial. In Melanomzellen korrelierte die BRAF-Mutation mit erhöhten mRNA-Spiegeln des C-X-C-Chemokinrezeptors Typ 4 (CXCR4) und mit einem aggressiveren Tumorverlauf (149). In diesen Zellen verringerte die pharmakologische Hemmung der BRAF/MEK-Signalübertragung die Sekretion protumorigener Faktoren (IL-1 α/β , IL-6, IL-8, IL-10, VEGF) (150). Dieser Befund weist darauf hin, dass eine Hemmung der MAPK-Signalübertragung die immunologischen Effekte einer BRAF-Mutation entgegenwirken kann (Abbildung 4B).

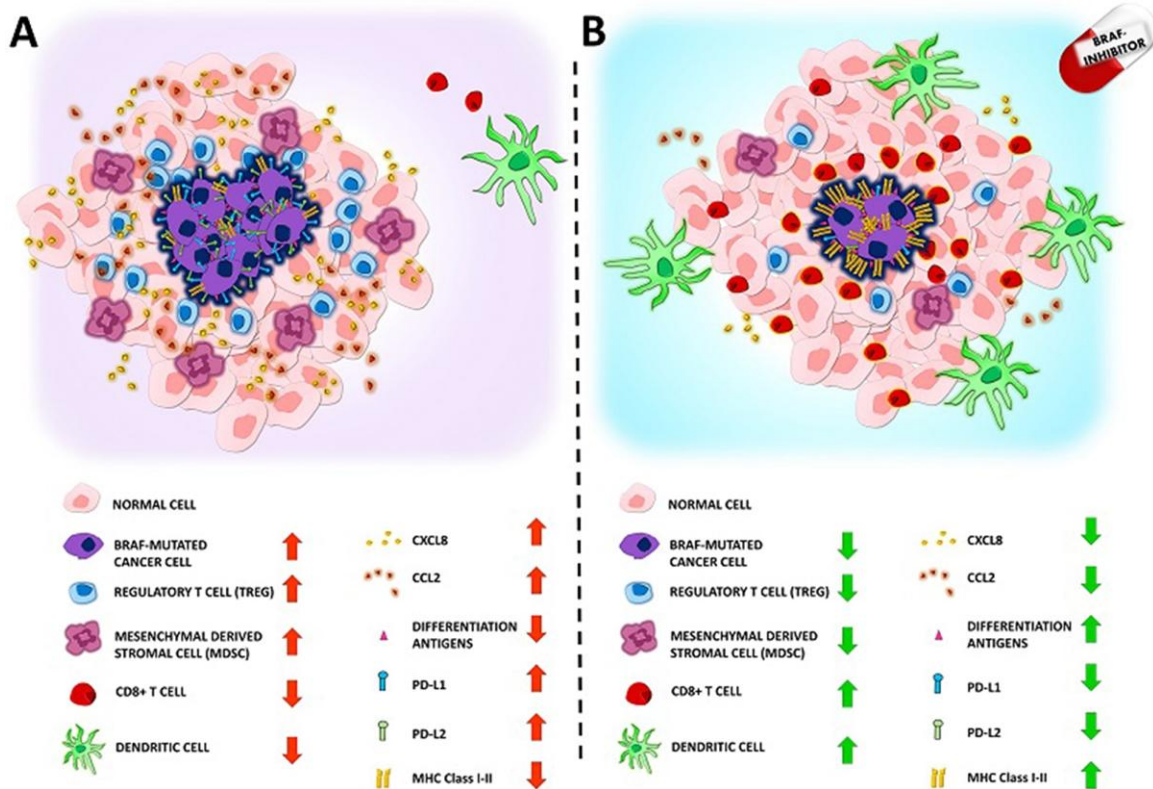


Abbildung 4: Immunsuppressive Tumormikroumgebung (TME) bei BRAF-V600E Melanom (A) und immunmodulatorische Effekte von BRAF-Inhibitoren (B) (136). Viele Merkmalen von Tumoren wie ein kontinuierliche proliferative Signalgebung, Widerstand gegen Apoptose, Stimulierung von Angiogenese, Einleitung von Invasion und Metastasierung werden in unterschiedlichem Maße durch die TME beeinflusst (151). So bietet die TME sowie ihre assoziierten Signalwege ein Hauptziel immuntherapeutischer Ansätze (152, 153). Veränderungen in der TME scheinen zur Resistenzentwicklung gegen BRAFi/MEKi beizutragen. In einem murinen autochthonen Melanom-Modell wurden Resistenzen gegenüber MAPKi nachgewiesen, die auf eine Neubildung von MDSC in der TME zurückzuführen waren. Initial führte die Behandlung mit MAPKi in der TME zur m-MDSC Depletion, die auf eine CCL2 Herunterregulation zurückzuführen war (154).

Diese Resistenzen konnten zunächst durch BRAFi überbrückt werden; durch die Reaktivierung des MAPK-Signalwegs durch eine Aufregulation von Zielantigenen, die direkt Tumorzellproliferation/Apoptose regulieren, entwickelten die Melanomzellen aber im weiteren Verlauf zusätzlich eine BRAFi-Resistenz (154). Interessanterweise war die kombinierte *Checkpoint*-Blockade (Anti-CTLA-4 und Anti-PD-1) gegen BRAFi-resistente Melanome nicht effektiv. Jedoch konnte durch die zusätzliche Blockierung von MDSC (Anti-Gr-1 und CCR2-Antagonist) das Fortschreiten von BRAFi-resistenten Tumoren gehemmt werden. Unsere Befunde zeigen deutlich, wie von Melanomzellen hervorgerufene extrinsische Immunsuppressionswege die TME steuern. Dies betont die Wichtigkeit, sowohl extrinsische als auch intrinsische Mechanismen der Medikamentenresistenz zu adressieren.

Laut einer Studie von Young *et al.* führt die Wechselwirkung von Melanomzellen, TAMs und CAFs in der TME zu einer Behandlungstoleranz (155). Dabei wird ein Zytokin-Signalnetzwerk aktiviert, das anschließend die BCL-2 Expression erhöht. Die BRAFi-Therapie führt zu einer verstärkten Infiltration von Monozyten in die TME, wo sie zu TAMs differenzieren. Dies führt wiederum zu einer erhöhten Produktion von IL-1 β . CAFs werden ihrerseits durch IL-1 β dazu

stimuliert, Chemokine wie z. B. GRO- α zu produzieren; diese binden an Tumorzellen und führen zur Expression anti-apoptotischer Gene wie BCL-2.

Khalili *et al.* untersuchten den Effekt einer BRAF-V600E-Mutation auf die Expression von immunregulatorischen Genen in Melanomen sowie auf die durch CAFs indizierte Immunsuppression (156). Die durch BRAF-V600E stimulierte Transkription von IL-1 α und IL-1 β in Melanozyten und Melanomzelllinien ließ sich durch den BRAFi Vemurafenib verringern. Die Behandlung von aus Melanompatienten isolierten CAFs mit IL-1 α/β verstärkte über eine Steigerung der Cyclooxygenase-(COX)-2 und PD-L1-Expression ihre immunsuppressive Wirkung auf Melanom-spezifische zytotoxische T-Zellen.

Straussman *et al.* testeten die Auswirkungen der Interaktion zwischen Tumor und TME auf Arzneimittelresistenzen (157). Kokulturen von *Green-fluorescent-protein*-markierten humanen Tumorzellen und Bindegewebszellen sowie nativen Tumorzellen wurden mit einer Reihe von anti-Tumor-Agenzien inkubiert. Dazu zählte auch PLX4720, ein Analogon von VEM. Laut Proteom-Analyse exprimieren Stromazellen den Wachstumsfaktor *Hepatocyte growth factor* (HGF), der an den HGF-Rezeptor Met bindet und den MAPK- sowie den PI3K-Signalweg aktiviert. Immunhistochemische Analysen des Tumorgewebes vor und nach der Behandlung belegten bei Patienten mit BRAF-mutiertem Melanom eine statistisch signifikante Korrelation zwischen stromaler HGF-Expression und angeborener Resistenz gegenüber der Behandlung. Die doppelte Hemmung von RAF und MET führte zu einer Umkehrung der Medikamentenresistenz, was darauf hindeutet, dass die RAF/MET-Kombinationstherapie eine potenzielle therapeutische Strategie für BRAF-mutiertes Melanom sein könnte (157).

2.7 Systemische Therapien von malignen Melanomen

Maligne Melanome werden heutzutage häufig in frühen Krankheitsstadien diagnostiziert und primär durch Exzision der Läsion mit angemessenem Sicherheitsabstand therapiert (158). Bei der chirurgischen Resektion beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate 98 % bzw. 90 % bei einer lokalisierten Erkrankung im Stadium I bzw. II (159). Zu den für die Prognoseeinschätzung relevanten Faktoren zählt die histologisch nachgewiesene Tumordicke nach Breslow (160). Die Tumordicke ist definiert als die vertikale Ausdehnung des Tumorgewebes vom Stratum granulosum der Epidermis bis zum tiefsten Punkt des Tumorgewebes. Weitere Prognosekriterien sind die Ulzeration, die Mitoserate und der Lymphknotenbefall (159). Das Staging orientiert sich an der Tumor-, Lymphknoten- und Metastasenklassifikation (TNM-Klassifikation) (161). Die empfohlene Therapie richtet sich nach dem Krankheitsstadium des Patienten. Im metastasierten Stadium verhindern die hohe Anzahl von Metastasen, die schlechte Zugänglichkeit und die schlechte Erkennbarkeit kleiner metastatischer Läsionen eine kurative chirurgische Resektion. Vor der Entwicklung der neuen Therapien war

hochdosiertes IL-2 die einzige zugelassene systemische Behandlung bei Melanom-Patienten, die als einzige zu einer Remission führen konnte (162). Weniger als 10 % der Patienten mit metastasierten malignen Melanomen überlebten länger als fünf Jahre.

1975 war das Alkylierungsmittel Dacarbazin (DTIC) aufgrund seiner geringen Toxizität das einzige von der FDA zugelassene Chemotherapeutikum zur Behandlung des metastasierten Melanoms (163,164). Aktuell werden in Deutschland außerdem Vindesin, Cisplatin und Interferon-(IFN)- α eingesetzt (165). Da das maligne Melanom nur eine geringe Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika aufweist, erreichen diese Substanzen keine reproduzierbaren Ansprechraten über 20 % und bieten keinen Überlebensvorteil für die Patienten. Daher werden konventionelle Chemotherapeutika in der Regel nur bei therapierefraktären Fällen im palliativen Kontext verwendet (166). Eine Revolution in der Behandlung des metastasierten Melanoms brachte die Einführung von Mitogen-aktivierte-Proteinkinase-(MAPK)-Inhibitoren und Immun-Checkpoint-Inhibitoren (ICI), die im Folgenden ausführlich erläutert werden (167).

2.7.1 Immuncheckpoint-Inhibitoren (ICI)

Die ICI-Therapie gehört seit ihrer Zulassung 2011 zu den bedeutendsten Fortschritten in der Melanom-Behandlung. Ca. 40–60 % der metastasierten Melanom-Patienten sprechen auf eine Behandlung mit ICI an (150). Unter physiologischen Bedingungen verhindern Immuncheckpoints Autoimmunreaktionen und schützen gesundes Gewebe während einer durch Krankheitserreger ausgelösten Immunantwort, indem sie das Ausmaß der Immunreaktion limitieren (168). Tumorzellen nutzen diese Mechanismen, um dem Immunsystem zu entgehen. Bei der ICI handelt es sich um blockierende Antikörper. Diese wirken an verschiedenen Punkten der Interaktion von Antigen-präsentierenden Zellen (APC), T-Zellen und Tumorzellen, indem sie die Stimulation von T-Helferzellen sowie zytotoxische T-Zellen (CTL) durch APC aktivieren und regulatorische T-Zellen inhibieren (Abbildung 5) (169). Ein großer Vorteil der ICI-Therapien ist ihre vom Mutationsstatus des Melanoms unabhängige Wirkung (170).

Für eine T-Zell-Aktivierung werden drei Signale benötigt. Das erste, Antigen-spezifische Signal wird ausgelöst, wenn der T-Zell-Rezeptor (TCR) einer T-Zelle an ein von APC präsentiertes Tumorantigen (gebunden an *Major Histocompatibility Complex* (MHC-1 oder -2)) bindet. Das zweite Signal resultiert aus der Interaktion kostimulatorischer Oberflächenmarker (engl. *cluster of differentiation*, CD) auf APC (CD80/CD86) und T-Zellen (CD28). Das dritte Signal wird mit der vollständigen T-Zell-Aktivierung erzielt, wenn das Zytokin IL-2 an seinen entsprechenden Rezeptor auf der T-Zelle bindet (171). CTLA-4 ist ein von T-Zellen exprimierter Rezeptor, der ebenfalls CD80/CD86 bindet, wobei es eine höhere Affinität als CD28 aufweist, ohne dass es dabei zur T-Zell Aktivierung kommt (172). CTLA-4 antagonisiert somit das kostimulatorische

T-Zellsignal, der ebenfalls CD80/CD86 bindet und dabei eine höhere Affinität als CD28 aufweist (173,174).

Patienten mit heterozygoten *Loss-of-Function*-Mutationen im CTLA-4-Gen zeigen ähnlich wie Patienten, die mit anti-CTLA-4-Antikörper behandelt wurden, eine komplexe Autoimmunreaktionen (z. B. Enteropathie, autoimmune Zytopenie, Arthritis und granulomatöse Lungenerkrankungen) (175, 176). Daher ist CTLA-4 ein wichtiger Negativregulator der Autoimmunität.

CTLA-4 wird überwiegend von aktivierten T-Lymphozyten (CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen) sowie Tregs exprimiert und ist wie vorstehend ausgeführt an der Inhibierung der T-Zell-Aktivierung beteiligt (177). Eine CTLA-4-Blockade fördert daher die Proliferation von T-Zellen und löst somit anti-tumorale Effekte aus (178). Der das zytotoxische T-Lymphozyten-assoziierte Antigen 4 (CTLA-4) blockierende Antikörper Ipilimumab ist der erste von der FDA 2011 zugelassene ICI (179). Laut klinischen Studien verbessert Ipilimumab im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie das mediane Gesamtüberleben bei metastasierten Melanom-Patienten um etwa 10–20 % (180).

Programmed death-1 (PD-1) ist ein von aktivierten T-Zellen exprimierter Oberflächenrezeptor, der bei der Verhinderung der Autoimmunität eine Rolle spielt. Bei der Interaktion von PD-1 mit seinen Liganden PD-L1/PD-L2, die von protolerogenen Immunzellen sowie Tumorzellen exprimiert werden, wird die T-Zell-Aktivierung gehemmt und damit die Immunantwort reduziert (170). In Europa wurden Nivolumab und Pembrolizumab 2015 als PD-1-blockierende Antikörper zur Behandlung des malignen Melanoms zugelassen. 2017 erhielt Atezolizumab als erster PD-L1-Antikörper die Zulassung (168).

Obwohl anti-CTLA-4- und anti-PD-1-Antikörper vergleichbare Nebenwirkungen verursachen, treten diese bei anti-PD-1-Antikörpern seltener und in einer geringeren Ausprägung auf (181,182). Die behandlungsbedingte überschießende Immunreaktion löst Juckreiz, Hautausschlag, Diarrhöe/Kolitis, Hepatitis, Pneumonitis und Endokrinopathien (183,184) aus. Kombinationstherapien sollen das Problem der begrenzten Wirksamkeit von ICI-Monotherapien überwinden, Resistenzbildung verhindern und synergistische Effekte erzielen (Abbildung 5). Derzeit sind Kombinationen aus Chemotherapeutika sowie PD-1/PD-L1-, CTLA-4- und VEGF-Inhibitoren zugelassen (168).

Das Zelloberflächenmolekül LAG-3 wird in vielen Tumorentitäten verstärkt exprimiert und inhibiert die Aktivität und Proliferation von T-Zellen (185–187). Seit 2022 hat auch die duale Behandlung mit Relatlimab (Antikörper gegen *Lymphocyte-activation gene 3* (LAG-3) - Rezeptor) und Nivolumab (PD-1-Antikörper) die Zulassung für fortgeschrittene (nicht operable oder metastasierte) Melanome bei Patienten ab 12 Jahren erhalten (188). In präklinischen Modellen zeigte diese Kombinationstherapie eine synergistische anti-Tumoraktivität (189).

2.7.2 Zielgerichtete Therapien – Hemmung des MAPK- Signalwegs

Die Identifizierung treibender Mutationen (Driver-Mutationen) im malignen Melanom eröffnete die Möglichkeit zur Entwicklung spezifischer, gegen zelluläre Signalwege oder mutierte Onkogene gerichteter Therapien (190,191). Die gezielte Inhibition des RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweges war ein Meilenstein für die Therapie des fortgeschrittenen malignen Melanoms in den Stadien III und IV (192).

Der erste orale Multikinase-Inhibitor Sorafenib, der die Tumorangio-genese und -progression blockieren sollte, zeigte jedoch aufgrund seiner stärkeren Wirksamkeit gegenüber CRAF im Vergleich zu BRAF nur eine eingeschränkte klinische Wirkung bei Melanom-Patienten mit BRAF-mutiertem Tumor (193).

2008 entwickelten Tsai *et al.* den ersten BRAF-V600E spezifischen Inhibitor (194,195). Das VEM-Analogon (PLX4720) hemmt die konstitutive BRAF-Aktivierung und damit nachfolgend das Zellwachstum. Im Gegensatz zu Sorafenib binden BRAFi-Präparate spezifisch an die ATP-Bindungstasche der aktiven BRAF-Konformation, insbesondere bei BRAF-V600E, was ihre Wirksamkeit und Spezifität erhöht (97,196,197).

Die Zulassung des BRAFi Vemurafenib im Jahr 2011, gefolgt von Dabrafenib und Encorafenib, durch die FDA revolutionierte die Behandlung metastasierter Melanome und verbesserte den klinischen Verlauf sowie das progressionsfreie Überleben (PFS) im Vergleich zur herkömmlichen Therapie (198, 199). In der prospektiven, randomisierten Phase-III-Studie BRIM-3 zeigte Vemurafenib gegenüber der Standardchemotherapie mit Dacarbazin bei unbehandelten metastasierten Melanomen eine signifikant höhere Wirksamkeit (Gesamtüberleben: 48,4 % vs. 5,5 %) (97).

BRAFi-Monotherapien führen aber wegen der Resistenzbildung innerhalb von 6–7 Monaten nach Behandlungsbeginn nicht langfristig zur Remission (200). Eine erworbene Resistenz gegen BRAFi kann ERK-abhängig oder -unabhängig auftreten (190, 201). Die Reaktivierung der MAPK-Signalkaskade kann auf verschiedene Mechanismen zurückgeführt werden, darunter aktivierende Mutationen in NRAS oder KRAS, genetische Veränderungen im nachgeschalteten MAPK-Signalweg wie MEK1/2- oder ERK-Mutationen sowie ein Verlust von CDKN2A (202, 203). Darüber hinaus können eine Aktivierung paralleler Signalwege wie des PI3K-Signalwegs (204, 205), eine Überexpression von Rezeptor-Tyrosinkinasen (z. B. EGFR, PDGFR- β , MET, ERBB3, IGF-1R) (204, 206–208) sowie BRAF-Amplifikationen (97) zur Resistenzentwicklung beitragen. Weiter belegen Untersuchungen, dass BRAFi in non-malignen Zellen zu einer paradoxen Aktivierung der MAPK-Signalkaskade führen kann (209, 210). Dabei induzieren BRAFi eine RAF-Dimerisierung (CRAF-Homodimere oder CRAF-BRAF-Heterodimere) und eine Transaktivierung desjenigen Monomers im Dimer, das nicht an das Medikament gebunden ist. Als Kombinationstherapien sind beim metastasierten Melanom

drei BRAFi/MEKi-Kombinationen zugelassen: DAB + TRA, VEM + COB und ENC + BIN (211,212). In der Phase-III-Studie COLUMBUS wies die Kombination ENC + COB ein günstigeres Sicherheitsprofil als die VEM-Monotherapie auf und verlängerte das PFS (213). Auch die COMBI-v-Studie, in der 704 Melanompatienten mit BRAF-V600-Mutationen entweder VEM oder DAB + TRA erhielten, zeigte ähnliche Ergebnisse. Auch hier führte die Kombinationstherapie mit BRAFi und MEKi zu einer Verlängerung von PFS und Gesamtüberleben (214).

Eine Kombinationstherapie aus BRAFi und MEKi verringert nicht nur die Rate der Resistenzbildung, sondern reduziert auch das Risiko therapieassoziiertes Hautnebenwirkungen (215). BRAFi-induzierte hyperproliferative Hautläsionen (z. B. kutane Plattenepithelkarzinome, Papillome, Hyperkeratosen) entstehen durch eine paradoxe Aktivierung von phosphoryliertem ERK in Keratinozyten (200) und werden unter Kombinationstherapie seltener beobachtet (215). Das Nebenwirkungsprofil von BRAFi/MEKi-Therapien ist insgesamt vergleichbar, zeigt jedoch Unterschiede im Detail: Unter DAB + TRA tritt häufig Fieber (Pyrexie) auf, während VEM + COB häufiger mit Photosensitivität einhergeht (216).

Auch bei einer BRAFi-MEKi-Kombinationsbehandlung entstehen im Durchschnitt nach 9–11 Monaten Resistenzen, was eine weitere Herausforderung für die Therapieentwicklung beim malignen Melanom darstellt (217). Lu *et al.* untersuchten Resistenz-vermittelnde Mechanismen bei BRAFi-Mono- und BRAFi/MEKi-Kombinationstherapien (218). In diesem Zusammenhang scheinen P21-aktivierte Kinasen eine Rolle zu spielen, indem sie über die Regulation der c-Jun-N-terminalen Kinasen und die Phosphorylierung von β -Catenin den ERK-Signalweg umgehen und die Apoptose von Tumorzellen hemmen.

Aktuell werden neue BRAFi mit unterschiedlichen Strukturen in präklinischen und klinischen Studien untersucht (219). BRAFi der zweiten Generation (Dabrafenib, Vemurafenib, Encorafenib) hemmen RAF-Dimere nur eingeschränkt, da sie aufgrund sterischer Hinderung nicht an das zweite Monomer des RAF-Dimers binden können (negative Allosterie) (219–221). Im Gegensatz dazu stabilisieren BRAFi der dritten Generation (TAK-632, LY3009120, AZ-628) die α C-Helix in ihrer aktiven Konformation und hemmen beide Monomere des RAF-Dimers (219). Daher begünstigen diese BRAFi nicht die paradoxe ERK-Aktivierung bei gesunden Zellen. Sie können adaptive und erworbene Resistenzen überwinden und sind bei BRAF-abhängigen Tumoren breit einsetzbar (222, 223).

2.7.3 Kombinationstherapien

Da die Wirksamkeit von BRAFi- und MEKi-Therapien durch adaptive Resistenzmechanismen begrenzt ist (etwa 50 % der *Responder* zeigen Progression innerhalb von 13 Monaten) (224), wurde die Kombination mit Immuncheckpoint-Inhibitoren (ICI) zur Verlängerung der

Krankheitskontrolle untersucht (225). Die Ergebnisse von präklinischen Modellen zur immunmodulatorischen Wirkung von BRAFi auf die TME verstärkten die Rationale zum Einsatz solcher Kombinationstherapien (226). Beobachtet wurden eine verstärkte T-Zell-Infiltration, erhöhte T-Zell-Aktivität sowie eine Reduktion tumorsuppressiver Tregs und MDSCs (227).

In murinen BRAF-V600E-Melanommodellen führte eine Dreifachkombination zu erhöhter intratumoraler IFN- γ -Expression, gesteigerter Expression melanosomaler Antigene und verringerter in vivo-Zytotoxizität sowie T-Zell-Infiltration (228). Die Phase-III-Studie IMspire evaluierte erstmals eine Dreifachkombination aus zielgerichteter Therapie und ICI: Vemurafenib (BRAFi), Cobimetinib (MEKi) und Atezolizumab (PD-L1-Inhibitor) verbesserten das Ansprechen und verlängerten das PFS (229). Im Gegensatz dazu zeigte die Kombination aus Dabrafenib, Trametinib und Spartalizumab (PD-1-Antikörper) in der COMBI-Studie keine Überlegenheit gegenüber der BRAFi/MEKi-Duotherapie, jedoch eine erhöhte Toxizität (230).

Ipilimumab wurde bereits 2013 in einer Phase-I-Studie bei therapienaiven BRAFV600-mutierten Melanompatienten untersucht, musste jedoch aufgrund signifikanter Toxizitäten (u. a. Lebertoxizität, Exantheme) abgebrochen werden (106).

Polkowska *et al.* hinterfragten die Beschränkung von BRAFi auf die Erstlinientherapie (231).

Eine retrospektive Analyse an Patienten mit fortgeschrittenem Melanom, die VEM, DAB und Ipilimumab erhielten, ergab vergleichbare Wirksamkeit der BRAFi – mit einem leichten Vorteil für VEM – unabhängig von der Therapielinie. Die Auswertung erfolgte nach den RECIST-Kriterien für BRAFi und den immune-related response criteria für Ipilimumab.

So testete Ackerman *et al.* verschiedene ICI-Therapieoptionen vor oder nach einer Behandlung mit einer zielgerichteten Therapie (232). Jedoch zeigten sowohl die BRAFi-Monotherapie als auch BRAFi/MEKi-Kombinationen (VEM, DAB oder DAB/TRA) ähnliche Ansprechraten – unabhängig davon, ob sie vor oder nach einer Immuntherapie appliziert wurden. Im Gegensatz dazu kamen Ascierto *et al.* zum Schluss, dass eine Behandlung mit Ipilimumab vor einer BRAFi-Applikation einen größeren Überlebensvorteil (medianes OS 14,5 bzw. 9,9 Monate) bietet als dessen Verabreichung nach VEM oder DAB, selbst bei Stadien mit ungünstigen Kriterien wie Hirnmetastasierung (233). Aktuell werden klinische Studien durchgeführt, um zu klären, welche Abfolge von Immuntherapie und zielgerichteter Therapie den größten therapeutischen Nutzen bietet.

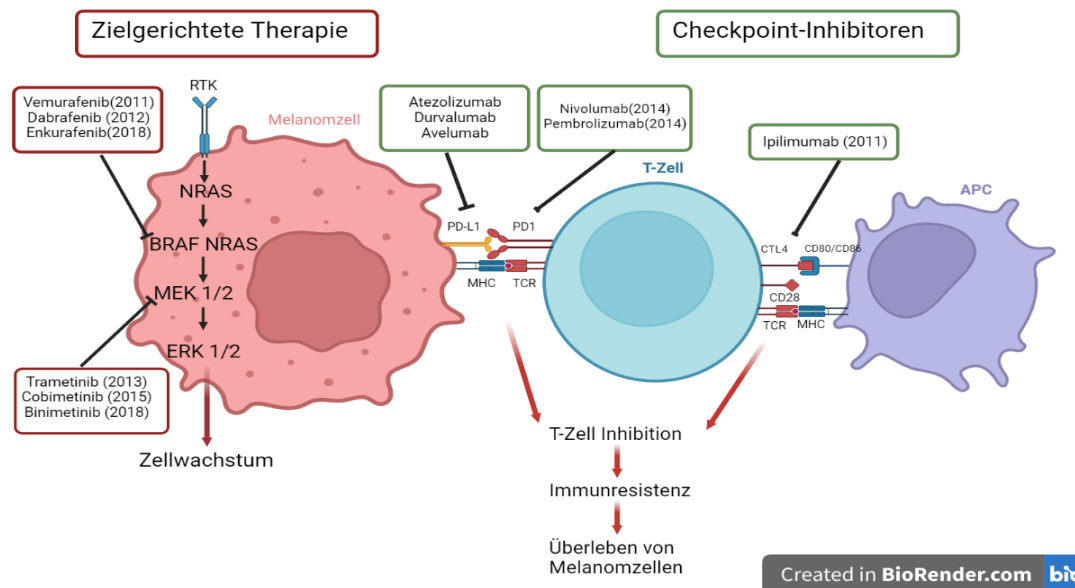


Abbildung 5: Zugelassene systemische Therapien für das maligne Melanom (Eigene Abbildung erstellt mit Biorender in Anlehnung an (234)).

2.8 Immunmodulatorische Wirkungen von BRAFi und MEKi

2.8.1 Off-Target-Effekte von MAPKi auf die Tumormikromilieu

Im Rahmen der T-Zell-Aktivierung spielen die durch die Interaktion des T-Zell-Rezeptors (TCR) mit einem hochaffin gebundenen MHC-Peptid-Komplex sowie durch die Bindung kostimulatorischer Oberflächenmoleküle (z. B. CD28) an ihre Liganden (CD80, CD86) ausgelösten Signale eine zentrale Rolle. Die dadurch aktivierten Signalkaskaden umfassen unter anderem die Phosphorylierung von ERK durch CRAF und/oder BRAF (235–237) (siehe Kapitel 2.7.1). Die ERK-Aktivierung ist essenziell für die T-Zell-Funktion; eine RAS-Hemmung kann die T-Zell-Aktivierung blockieren (238, 239). RAF-Inhibitoren können somit die T-Zell-Funktion modulieren und infolgedessen auch die Wirksamkeit von ICI beeinflussen (19), da deren Effekt häufig vollständig von der T-Zell-Aktivierung abhängig ist (240).

Liu *et al.* untersuchten die immunologischen Effekte des BRAFi DAB und des MEKi TRA sowohl *in vitro* an humanen CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen gesunder Spender als auch in einer humanen Tumorzelllinie sowie *in vivo* in einem CT26-Kolonkarzinom-Mausmodell (241). Während TRA den pERK-Spiegel in T-Zellen senkte und die T-Zell-Proliferation teilweise inhibierte, erhöhte DAB den pERK-Spiegel, ohne dabei die Proliferation von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen zu beeinflussen. Bei Vorliegen einer BRAF-V600E/K-Mutation induzierten beide Wirkstoffe in Tumorzellen die Expression von Apoptosemarkern und HLA-Molekülen und reduzierten die Produktion immunsuppressiver Faktoren wie PD-L1, IL-1, IL-8, NT5E (5'-Nukleotidase) und VEGFA (241). Auch in der *in vitro*-Analyse von Jiang *et al.* von humanen

BRAF-V600E-mutierten Melanomzelllinien zeigten MEKi mit einer Suppression der durch c-Jun und STAT3 vermittelten PD-L1-Expression und einer Apoptose-Induktion eine doppelte therapeutische Wirkung (242). Ähnliche Ergebnisse berichteten Hu-Lieeskovan *et al.* aus einem syngenem BRAF-V600E-Melanom-Mausmodell *in vivo*, in dem DAB, TRA und ein PD-1-Inhibitor eingesetzt wurden (243). Eine durch DAB induzierte Erhöhung von TAMs und Tregs im Tumorbereich konnte durch die zusätzliche Gabe von TRA verhindert werden. Der *in vitro* beobachtete suppressive Effekt von MEKi auf die Funktion von Effektor-T-Zellen ließ sich *in vivo* jedoch nicht bestätigen (243).

Smith *et al.* bestätigten, dass die TME als Resistenzquelle fungieren kann, insbesondere durch Verstärkung MAPK-abhängiger Signalwege während der MAPKi-Therapie (17). So führte die Kombination aus BRAFi und MEKi in BRAF-mutierten Melanomen und BRAF-V600E-Allotransplantaten zu einer Erhöhung der TAM-Zahl sowie der TNF- α -Konzentration. Die von TAMs produzierte TNF- α -Ausschüttung und die nachfolgende Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs, welcher die Expression des Transkriptionsfaktors MITF verstärkt, können zur Resistenzentwicklung beitragen (17). Dieser Prozess ist vermutlich auf die durch MITF vermittelte Hochregulation anti-apoptotischer Gene zurückzuführen (244). Haq *et al.* identifizierten darüber hinaus das MITF-Zielgen BCL2A1 als potenziellen Antagonisten der BRAF-Inhibition (245).

Wilmott *et al.* untersuchten die Wirkung der BRAFi DAB (GSK2118436) und VEM (PLX4720) auf Immunreaktionen in Tumorbiopsien von Patienten mit BRAF-mutiertem Melanom im Stadium III oder IV nach AJCC-Klassifikation (246). Anhand immunhistochemischer Marker (CD4 für T-Helfer-Zellen, CD8 für zytotoxische T-Zellen, CD20 für B-Zellen, CD1a für dendritische Zellen und Granzym B für CTL und NK-Zellen) analysierten sie Lokalisation und Dichte der TILs vor und nach der Behandlung. Die Auswertung ergab eine Zunahme der Infiltration durch CD8+-Lymphozyten und Granzym-B-positive Zellen in den BRAFi-behandelten Tumorproben. CD8+-T-Zellen waren sowohl intra- als auch peritumoral nachweisbar (246). Eine erhöhte Frequenz intratumoraler CTL korrelierte mit einer Reduktion der Tumorgroße und verringerter Stoffwechselaktivität des Tumors.

Frederick *et al.* analysierten die immunologischen Effekte einer VEM-Monotherapie und einer DAB/TRA-Kombinationstherapie an Biopsien von Patienten mit metastasierendem Melanom anhand von T-Zell-Marken, immunsuppressiven Zytokinen und der Melanom-Antigenexpression (247). Beide Therapien führten zu einer verstärkten Expression tumorspezifischer Antigene (MART, TYRP-1, TYRP-2, GP100) und reduzierten die intratumorale Expression. Darüber hinaus wurde eine Hochregulation der Immun-Checkpoints TIM-3 und PD-1 beobachtet. Während des Tumorprogress unter BRAFi-Monotherapie nahm die Infiltration durch CD8+-T-Zellen ab, was zu einer protumoralen Umgestaltung der TME führte und die kombinierte Anwendung von BRAFi und ICI nahelegt (247).

2.8.2 Immunologische Effekte von BRAFi und MEKi auf dendritische Zellen

DCs sind wie Monozyten, Makrophagen und B-Lymphozyten als APCs in der Lage, T-Zellen zu aktivieren (248). Unter homöostatischen Bedingungen in der Peripherie vermitteln DCs die Eigentoleranz gegenüber körpereigenen und harmlosen Umweltantigenen. DCs können anhand ihres Reifungszustands unterschieden werden. Unreife DCs nehmen Antigene über Makropinozytose, Phagozytose oder rezeptorvermittelte Endozytose auf und exprimieren die für die Aktivierung der T-Zellen erforderlichen kostimulatorischen Oberflächenmoleküle auf niedrigem Niveau (249). Während der Reifung wird die Expression der Rezeptoren für die Antigen-Aufnahme (250) verringert und die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86, CD40 sowie des Adhäsionsmoleküls CD54 (ICAM-1, *intercellular adhesion molecule*) erhöht. Weiter führt der Reifungsprozess bei DCs auch zur Expression von CD83 und zur Verlagerung von MHC-Klasse-II-Peptid-Komplexen an die Zelloberfläche (251).

Im Gegensatz zu anderen APCs exprimieren aktivierte DCs eine größere Menge an MHC-Klasse-II-Molekülen, kostimulatorischen Oberflächenmolekülen (248) und – abhängig vom Reifungsgrad bzw. Stimulus – das proinflammatorische Zytokin IL-12 (252). Anhand von Oberflächenmarkern lassen sich myeloide DCs (mDCs) und plasmazytoide DCs (pDCs) unterscheiden. pDCs ähneln Plasmazellen (im Maussystem jedoch teilen sie mit B-Zellen lediglich die Expression des Oberflächenmarkers B220), und weisen eine eher niedrigere Expression des Oberflächenmoleküls CD11c auf im Vergleich zu konventionellen dendritischen Zellen (cDC). Dagegen sezernieren pDCs große Mengen von Typ I-IFN und sind somit hauptsächlich an der Abwehr von Viren beteiligt. Darüber hinaus wurde auch eine antigenpräsentierende Funktion der pDCs beschrieben (253). Aktivierte mDCs können nach ihrer Migration in lymphatische Organe mit T-Zellen interagieren und eine spezifische Immunantwort gegen das von ihnen präsentierte Antigen induzieren (254, 255). Damit übernehmen mDCs eine zentrale Vermittlerrolle zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort.

Der RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg ist für die Funktion verschiedener Immunzellen von entscheidender Bedeutung. Daher stellt sich die Frage, ob BRAFi und MEKi die Funktionalität von Immunzellen beeinflussen und somit ihre antitumorale Wirkung modulieren könnten. Ein solcher Effekt wäre insbesondere bei der Anwendung einer MAPKi/ICI-Kombinationstherapie von Bedeutung, um die vielversprechendsten Wirkstoffe zu identifizieren, die die Immunfunktion von DCs, T-Zellen oder deren Interaktion nicht hemmen (256).

Riegel *et al.* kamen bei ihrer Analyse der Rolle von RAF-Kinasen und MEK1/2 zu dem Ergebnis, dass von beiden Signalwegen nur RAF-Kinasen für die DC-Aktivierung und -Funktion und für die CD4⁺-Regulation erforderlich sind (257). Die Autoren behandelten mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierte MO-DC mit LY3009120, einem Inhibitor von BRAF, BRAF-

V600 und CRAF, sowie mit TRA. Letzteres hatte einen Effekt auf die Expression von CD80 und erhöhte die CD83-Expression in geringem Umfang, während der RAF-Inhibitor zu einer signifikanten Inhibition dieser Oberflächenmarker führte. Während die Sekretion von IL-6, IL-8 und TNF α durch eine Inhibition von RAF oder MEK1/2 deutlich reduziert wurde, führten beide Inhibitoren zu einer gesteigerten Freisetzung von IL-12p70. Laut der Ergebnisse der Studie zeigen RAF und MEK1/2 bei der MO-DC-Aktivierung somit eine unterschiedliche Wirkung (258).

Vella *et al.* fanden keinen Effekt des BRAFi DAB auf den Immunphänotyp von humanen MO-DC (259). In Kombination mit dem MEKi TRA führte DAB jedoch zu einer verminderten Antigenpräsentation durch MO-DC.

Hoyer *et al.* untersuchten den Einfluss von BRAFi und MEKi auf die Zytokinproduktion (IL-8, IL-10 und IL-12p7) von MO-DC (260). Zur Reifung wurden die MO-DCs mit einem Zytokin-Cocktail aus IL-6, TNF- α , PGE2 und IL-1 β behandelt. Gleichzeitig wurden die Zellen mit BRAFi (VEM oder DAB) bzw. MEKi (TRA oder COB) inkubiert. VEM erhöhte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle die Produktion von IL-8, IL-12p70 sowie in geringerem Maße auch die von IL-10. Die Kombination aus VEM und COB führte zusätzlich zu einer verstärkten Sekretion von IL-10. Nach Behandlung mit DAB oder TRA konnte keine erhöhte Zytokinsekretion der DCs festgestellt werden. Im Gegensatz zu DAB in Kombination mit TRA veränderten VEM und VEM + COB nicht nur das Zytokin-Sekretionsmuster der DCs, sondern beeinflussten auch die Viabilität und hemmten die verstärkte Expression der Aktivierungsoberflächenmarker während des MO-DC-Reifungsprozesses (256).

Auch Tel *et al.* testeten die Funktionalität von DCs nach Applikation des BRAFi VEM (20). Dazu isolierten sie pDCs und mDCs aus PBMCs gesunder Spender oder aus PBMCs von mit VEM vorbehandelten Melanom-Patienten. Die Reifung von pDCs, mDCs und unreifen MO-DCs wurde durch R848 sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Vemurafenib induziert. Im Fokus der Untersuchung standen die Zytokin-Produktion und die DC-vermittelte T-Zellproliferation. VEM hemmte die Reifung und Zytokin-Produktion von DCs gesunder Probanden. Diese suppressive Wirkung von VEM auf die DC-Funktionalität blieb aus, wenn die gesamten PBMCs mit Vemurafenib inkubiert wurden. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund ist die verstärkte Aufnahme von Vemurafenib durch DCs in Abwesenheit anderer Zellen. Hajek *et al.* untersuchten die Wirkung von BRAFi in Kombination mit MEKi auf murine DCs aus der Milz sowie auf knochenmarksdifferenzierte (BM-)DC (256). Dabei stimulierten DAB, DAB + TRA und VEM + COB die Expression kostimulatorischer Rezeptoren (z. B. CD80, CD86). Darüber hinaus induzierten DAB, DAB plus TRA sowie VEM die Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β durch LPS-stimulierte BM-DCs; Dabrafenib allein führte sogar bei unstimulierten DCs zur IL-1 β -Produktion.

Neben der Verstärkung der IL-1 β -mRNA-Expression, aktivierte DAB alleine das Inflammasom über NLR4. Bei hohen Konzentrationen induzierte Dabrafenib die IL-1 β -Produktion über Caspase-1, welches für die Spaltung von pro-IL-1 β verantwortlich ist. Im Vergleich zu DAB waren durch die VEM hervorgerufenen IL-1 β -Konzentrationen deutlich niedriger. Zudem steigerte VEM die IL-1 β -mRNA-Expression und löste die Ausschüttung von IL-1 β ausschließlich durch die Aktivierung des NLR4/Caspase-1-Inflammasoms aus. In aus gesunden humanen Spendern isolierten MO-DCs zeigte DAB anders als in murinen MO-DCs keine erhöhte Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, während VEM wieder hochstimulierend wirkte (261). In Übereinstimmung mit den Befunden von Hoyer *et al.* wurde eine reduzierte Zellviabilität nach Behandlung mit VEM und VEM + COB nachgewiesen (256).

Ott *et al.* analysierten die Auswirkung von BRAFi (VEM) und MEKi (U0126) auf die auf die Zytokinproduktion und die Expression von Oberflächenmarkern bei mit dem *Toll-like-receptor*-(TLR)-3/MDA5 (*melanoma differentiation-associated protein 5*) Agonist PolyI:C gereiften humanen MO-DC (18). Die Behandlung mit U0126 über verschiedene Konzentrationen hinweg oder mit Vemurafenib in klinisch relevanter Höchstkonzentration senkte die Produktion von IL-12 und TNF α . Die Expression von CD83 und CD80 wurde durch den MEKi, nicht aber durch den BRAFi inhibiert. Ähnliche Effekte zeigten die beiden Inhibitoren auch bei der antigenpräsentierenden DC-Funktion, der Viabilität und der T-Zellaktivierungskapazität; auch hier blieb VEM wirkungslos, während der MEKi U0126 diese Parameter negativ beeinflusste.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

3.1.1.1 Geräte

Tabelle 1: Liste der Geräte und Hersteller

Laborgerät	Produktname	Firma
Autoklav	V-150	Systec Gmbh Linden
Durchflusszytometer	Attune® Nxt Flow Cytometer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA. USA
Eismaschine	Ziegra Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen
Inkubator	Inkubator Avantgarde.Linie CB	Binder GmbH, Tuttlingen
Mechanischer Summenzähler	/	Baumer Ltd., Swindon, UK
Mikroskop	Olympus CH-2	Olympus Europa SE & Co. KG., Hamburg
Hämozytometer (Neubauerzählkammer)	Neubauer Improved Bright line, Depth 0,100 mm 0,0025mm ²	Lo-Labortechnik GmbH, Friedrichsdorf
Hämozytometer (Neubauerzählkammer)	Neubauer Improved Bright line, Depth 0,100mm 0,0025mm ²	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG., Lauda-Königshofen
Reagenzglasgestell	4-Wege Flipper Gestell	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA. USA
Reagenzglasgestell	FlipStrip Microtube Racks with Lid	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA. USA
Reagenzglasgestell	Nalgene Unwire Reagenzglasgestelle: Resmer Fertigungstechnologie	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA. USA
Reagenzglasschüttler	RS-2	IDL GmbH, Nidderau
Sterilwerkbank	Thermo Sicherheitswerkbank Herasafe KS	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Tischzentrifuge	VWR Galaxy Mini	VWR International GmbH, Darmstadt
Vortexmischer	VWR 1719	VWR International GmbH, Darmstadt

Material und Methoden

Laborgerät	Produktname	Firma
Vortex	VWR Vortex Mixer	VWR International GmbH, Darmstadt
Wasserbad	GFL 1012	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Gefrierschränke		
	Economic	Robert Bosch GmbH, Stuttgart
	Economic-froster	Robert Bosch GmbH, Stuttgart
	HERA Freeze	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA. USA
	Labortiefkühlschrank	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA
	MediLine	Liebherr International AG, Bulle, CHE
	Premium NoFrost	Liebherr International AG, Bulle, CHE
Kühlschränke		
	MediLine	Liebherr International AG, Bulle, CHE
	Premium	Liebherr International AG, Bulle, CHE
	Timer	Oregon Scientific Inc., Tualatin, OR, USA
Zentrifugen		
	Eppendorf Centrifuge 5424 R	Eppendorf AG, Hamburg
	Heraeus Megafuge 40R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
	Heraeus Multifuge 1-LR	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
	Heraeus Multifuge X3R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau

3.1.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Liste der Materialien und Hersteller

Material	Hersteller
5 ml Rundbodenröhrchen	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
5 ml Rundbodenröhrchen mit Verschlusskappe, Polystyrol	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Aluminiumfolie	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Attune® 1X Focusing Fluid	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Attune® 1X Shutdown Solution	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Attune® Wash Solution	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Cellstar® 6 Well Cell Culture Plate, sterile, with lid	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, AUS
Cellstar® 96 Well Cell Culture Plate, sterile, with lid	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, AUS
Einweghandschuhe Vasco Nitril Blue S	B.Braun GmbH, Urbach
Einweghandschuhe Vasco Nitril Blue M	B.Braun GmbH, Urbach
Combitips advanced 0.2ml	Eppendorf AG, Hamburg
Combitips advanced 5ml	Eppendorf AG, Hamburg
Combitips advanced 50ml	Eppendorf AG, Hamburg
Petri dish, 94 x 16 mm, triple vented	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, AUS
Pipettenspitzen TipOne® (10/200/1000 µl)	Starlab International GmbH, Hamburg
Reaktionsgefäße (0,5/1,5)	Eppendorf AG, Hamburg
Röhrchen (15/50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Cellstar Serological Pipette steril (5/10/25ml)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, AUS
Cellstar (25cm ² /75 cm ² /175 cm ²) Cell Culture Flasks)	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Screw Cap Microzentrifuge Tubes 5.0 ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Nunc Tissue Culture Inserts 8 Well Strip (0,2 µm Anopore Membrane)	Nalge Nunc International, Naperville, USA
Schottflaschen (100ml/200ml)	Laborbestand

3.1.2 Chemikalien, Reagenzien, Supplemente, Medien, Puffer und Kits

Tabelle 3: Liste der Chemikalien und Hersteller

Chemikalie/Reagenz	Firma
3%ige Essigsäure mit Methylblau	Stemcell Technologies Inc., Vacouver, CAN
AbC™ Total Antibody Compensation Bead Kit	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Ampuwa Spüllösung 1000 ml	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg vor der Höhe
Aqua dest.	B.Braun GmbH, Urbach
Binimetinib (BIN)	Selleck Chemicals LLC, Houston, TX, USA
Cobimetinib (COB)	Selleck Chemicals LLC, Houston, TX, USA
Dabrafenib (DAB)	Selleck Chemicals LLC, Houston, TX, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO), Hybri-Max®	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Encorafenib (ENC)	Selleck Chemicals LLC, Houston, TX, USA
Ethanol 70% (EtOH)	Laborbestand
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
FcR Blocking Reagent, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Lipopolysaccharid (LPS)	Calbiochem GmbH, Bad Soden am Taunus
Resiquimod (R848)	Selleck Chemicals LLC, Houston, TX, USA
Terralin® Liquid	Schülke und Mayr GmbH, Norderstedt
Trypanblau-Lösung 0,4%	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Trypsin – EDTA S	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Trametinib (TRA)	Selleck Chemicals LLC, Houston, TX, USA
Stickstoff	Universitätsmedizin Johannes Gutenberg, Mainz
Solubilisation Solution/Stop Mix	Promega GmbH, Walldorf, Deutschland
Vemurafenib (VEM)	Selleck Chemicals LLC, Houston, TX, USA

3.1.2.1 Supplemente

Tabelle 4: Liste der Supplemente

Supplement	Hersteller
β -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Fetal calf serum (FCS)	Sigma-Aldrich Inc., St.Louis, MO, USA
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Recombinanter humaner Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden

3.1.2.2 Medien

Tabelle 5: Liste der Medien

Medium	Hersteller
Gibco RPMI Medium 1640 + L-Glutamine	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Dentrische Zellen-Medium (- RPMI + L-Glutamine, 1% β- Mercaptoethanol, 1% Penicillin/Streptomycin, 20ng/ml IL4, 20ng/ml GM-CSF)	Laborbestand
Melanomzellen-Medium (-RPMI, 1% Mercaptoethanol, 1% Penicillin/Streptomycin, 10% fetal calf serum (FCS))	Laborbestand
PBMC-Medium (-RPMI + L-Glutamine, 1% β- Mercaptoethanol, 1% Penicillin/Streptomycin)	Laborbestand

3.1.2.3 Puffer

Tabelle 6: Liste der Puffer

Puffer	Hersteller
Density Gradient Media Histopaque®-1077 (Ficoll-Hypaque)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, USA
FACS-Fixerlösung (- PBS; 0,7 % Paraformaldehyd)	Laborbestand
FACS-Puffer (-PBS; 2 mM EDTA, 2 %)	Laborbestand
Perm/Wash Buffer	BD Biosciences Inc., Franklin Lakes, NJ, USA

3.1.2.4 Kits

Tabelle 7: Liste der Kits

Kits	Hersteller
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega Corp. Madison, WI, USA
Human IL-1 β Flex Set	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Human IL-6 Flex Set	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Human IL-8 Flex Set	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Human Soluble Protein Master Buffer Kit	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA

3.1.3 Antikörper

Tabelle 8: Liste der Antikörper

Antikörper	Fluorophor	Klon	Isotyp	Konzentration	Hersteller
CD14	PE-Cyanine7	61D3	Mouse IgG1	1.0 μ g/Test	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA
CD1c	APC	L161	Mouse IgG1	0.06 μ g/Test	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA
CD80	PerCP-eFluor™ 710	2D10.4	Mouse IgG1	0.5 μ g/Test	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA
CD83	Super Bright 436	HB15e	Mouse IgG1	1.0 μ g/Test	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA
CD86	Super Bright 600	IT2.2	Mouse IgG2b	0.5 μ g/Test	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA
HLA-DR	APC-eFluor® 780	LN3	Mouse IgG2b	0.03 μ g/Test	Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA

3.1.4 Zelllinien

Tabelle 9: Liste der Zelllinien

Zelltyp	Abkürzung	Firma
Humane Melanomzellen	MeMal 19, MeMal 59a UKRV, MeMal 5	AG Prof. Dr. med. Andrea Tüttenberg, Hautklinik, Mainz
Humane Monocyte-derived dendritic cells	Mo-DC	Laborbestand

1. MeMal 5

Diese Zelllinie wurde aus einer kutanen/subkutanen Metastase bei einer 49-jährigen Patientin mit metastasiertem Melanom isoliert.

2. MeMal 19

Diese Zelllinie stammt von einer kutanen/subkutanen Metastase einer 62-jährigen Patientin mit metastasiertem superfiziell spreitendem Melanom (Stadium IV).

3. UKRV-15a und 4. MeMal 59a

Diese Zelllinie wurde in der Mainzer Hautklinik generiert und für weitere Forschungszielen von Prof. Andrea Tüttenberg zur Verfügung gestellt.

3.1.5 Software (elektronische Medien)

Tabelle 10: Liste der genutzten Software

Software	Firma
Attune® NxT Flow Cytometer Software	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Biorender	BioRender Inc., Toronto, ON, Kanada
FCS-Filter™	Soft Flow Inc., Pécs, Ungarn
FCAP-Array™	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA
Microsoft Office 2019	Microsoft Corp., Redmond, WA, USA
SparkControl™	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz

3.2 Methoden

3.2.1 Steriles Arbeiten

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen innerhalb einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Alle verwendeten Materialien wurden entweder steril geliefert oder vor Gebrauch autoklaviert.

3.2.1.1 Bestimmung der Lebendzellzahl

Für die Reproduzierbarkeit der Experimente ist die regelmäßige Bestimmung der Lebendzellzahl sehr wichtig. Dadurch kann sichergestellt werden, dass stets die gewünschte Zellzahl eingesetzt wird. Zur Ermittlung der Zellviabilität werden die Zellen mit Trypanblau angefärbt. Dabei handelt es sich um einen anionischen Bisazofarbstoff, der nur von abgestorbenen oder perforierten Zellen mit einer geschädigten Zellmembran und nicht von lebenden Zellen aufgenommen wird. Dadurch kann zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden. Für die Bestimmung der Lebendzellzahl werden die zu zählenden Zellen in ihrem entsprechenden Nährmedium resuspendiert und anschließend mit Trypanblau verdünnt. Der Verdünnungsfaktor richtet sich nach dem jeweiligen Zelltyp: Für DCs wurde ein Verhältnis von 1:2, für PBMCs 1:10 und für Melanomzellen 1:5 verwendet. Zur Berechnung der Zellzahl pro Milliliter wird die Anzahl gezählter Zellen mit dem Verdünnungsfaktor und dem Faktor $10^4/\text{ml}$ multipliziert, der sich aus dem Volumen der Zählkammer ergibt. Darin werden dann $10\ \mu\text{l}$ der entsprechenden Verdünnung auf beide Seiten der Zählkammer an den Rand des Deckglases befüllt. Anschließend wird die Zählkammer unter das Mikroskop gelegt und vier der großen Quadrate der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Um die Zellzahl pro mL zu berechnen, wird die Anzahl an gezählten Zellen mit dem Verdünnungsfaktor und dem konstanten $10^4/\text{ml}$, welcher sich aus dem Volumen der Zellkammer ableitet, multipliziert. Nach der Bestimmung der Zellzahl werden die Zellen in der gewünschten Endkonzentration und dem erforderlichen Volumen in Vertiefungen einer 96-well-Zellkulturplatte ausgesät und diese bei $37\ ^\circ\text{C}$ und $5\ \%$ CO_2 im Brutschrank gelagert.

3.2.1.2 Kultivierung von Melanomzelllinien

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgt in einem Inkubator bei 37°C und unter einer CO_2 -Atmosphäre von $5\ \%$. Für die Melanomzelllinien MeMal 5, MeMal 19, MeMal 59a und UKRV5a wird das Nährmedium RPMI 1640 mit Zusatz von $10\ \%$ fetalem Kälberserum (FCS), $1\ \%$ Penicillin und Streptomycin (P/S) und $1\ \%$ Mercaptoethanol benutzt. Die Zellen werden ab einer Konfluenz von $70\text{--}80\ \%$ abgelöst und auf neue Kulturflaschen verteilt. Die Passagenzahl gibt an, wie häufig die Zellen weiterkultiviert wurden.

Die DCs werden im Nährmedium RPMI 1640 mit dem Zusatz von $1\ \%$ β -Mercaptoethanol, $1\ \%$ Penicillin/Streptomycin, $20\ \text{ng/ml}$ IL-4 und $20\ \text{ng/ml}$ GM-CSF kultiviert.

3.2.1.3 Kryokonservierung von Melanomzelllinien

Durch Kryokonservierung können Zelllinien aufbewahrt werden, die dann für spätere Experimente zur Verfügung stehen, ohne dass sie ständig weiterkultiviert werden müssen.

Zunächst wird die einzufrierende Zelllinie geerntet, abzentrifugiert und anschließend im FCS resuspendiert. Dann wird die Lebendzellzahl bestimmt (siehe Kapitel 3.2.1.1), indem die Zellsuspension in einem Verhältnis von 1:5 (10 µl Zellsuspension + 40 µl Trypanblau) mit Trypanblau verdünnt wird. Die Zellkonzentration wird schließlich auf 1×10^6 /ml eingestellt. Daneben werden dann die Kryoröhrchen vorbereitet und die entsprechende Menge des Einfriermediums (FCS + 10 % DMSO) in einem 50ml Falcon Tube vorgelegt. Alle Materialien inklusive Einfriermedium, Zellpellet und die Kryoröhrchen werden dann in einer Kryobox kalt gelagert. Während die Zugabe von DMSO die Bildung von schädlichen Eiskristallen bei der Kryokonservierung verhindert, wirkt es jedoch auch osmotisch belastend auf die Zellen, weshalb der Einfrierprozess schnell durchgeführt werden muss. Für 10^6 Zellen wird 1 ml Einfriermedium benötigt. Das Volumen mit der entsprechenden Zellmenge wird mit den entsprechenden Volumina des Einfriermediums zusammengegeben und dann resuspendiert. In jedes Kryoröhrchen werden dann 1 ml der Zellsuspension zusammen mit 1 ml Einfriermedium pipettiert. Die Kryoröhrchen werden gut verschlossen in die auf 4 °C vorgekühlten Isopropanol-Container gestellt. Das Isopropanol gewährleistet ein kontinuierliches Herunterkühlen der Zellen um 1° C/min. Der Container wird dann bei – 80 °C über Nacht gelagert und schließlich am nächsten Tag in den mit flüssigem Stickstoff befüllten Tank überführt.

3.2.1.4 Reaktivierung von Melanomzellen

Für jedes Aliquot (ca. 1 ml Volumen) mit kryokonservierten Melanomzellen wird ein Falcon-Tube (50 ml) mit Zellnährmedium (RPMI + 10% FCS + 1% B-Mercapto + 1% P/S) vorbereitet und bei 4 °C kaltgestellt, um die kryokonservierten Zellen vor einem Temperaturschock zu schützen. Die Kryoröhrchen mit der eingefrorenen Zellsuspension werden dann aus dem Stickstofftank genommen und bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Beim Auftauen von kryokonservierten Zellen muss zügig gearbeitet werden, da sich diese in einer Mischung aus dem entsprechenden Nährmedium und DMSO befinden. Die Proben werden vorsichtig für ca. 3 min geschwenkt, bis nur noch minimale Eiskristalle zu sehen sind. Die nun aufgetaute Zellsuspension wird dann in das vorbereitete 50 ml Falcon-Tube überführt und es erfolgt eine Zentrifugation für 10 min und 4 °C bei 1200 rpm. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet durch vorsichtiges Abklopfen gelöst. Die Zellen werden dann durch Resuspendieren in ihrem spezifischen Zellmedium in eine beschriftete 10 ml Kulturmedium TC-Flasche (T25) überführt und dann bei 37 °C und 5% CO₂ Brutschrank gestellt.

3.2.1.5 Ernten und Splitten von Zellkulturen

Das verbrauchte Medium wird komplett mit einer serologischen Pipette aus der TC-Flasche (T75) entnommen und dann entsorgt. Die Flasche wird kurz mit 5 ml DPBS gewaschen und dieses wieder abgesaugt. Anschließend werden 7 ml des Trypsins/EDTA-Gemisches (für 75 cm² Kulturflaschen) zugegeben und dann für 5 min bei 37 °C in einen Inkubator mit 5 % CO₂ gestellt. Da es sich bei dem Trypsin um eine Endopeptidase handelt, ist die Einhaltung der Zeit im Inkubator wichtig, da sonst die Zellen geschädigt werden. Nach der Inkubation werden die Zellen durch leichtes Anklopfen abgelöst und das Trypsin anschließend durch Zugabe des Zellkulturmediums inaktiviert. Die Zellsuspension wird in ein passendes Falcon-Tube überführt und bei 1.200 rpm, 4 °C für 10 min zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand dekantiert. Das Zellpellet wird anschließend in 5 ml Kulturmedium resuspendiert, und die gewünschte Endkonzentration für die jeweiligen Versuche wird eingestellt.

3.2.1.6 Aufarbeitung von Buffy Coats zur Gewinnung von PBMC

Die Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll ist eine bewährte Methode, um PBMC von Buffy Coats zu isolieren (Abbildung 6). Diese Zellen, zu denen unter anderem B-Zellen, Monozyten, NK-Zelle, T-Zellen oder auch Thrombozyten zählen, spielen eine wichtige Rolle im Immunsystem bei der Abwehr von Infektionen. Bei Ficoll als Reagenz für die PBMC-Isolation handelt es sich um ein neutrales und stark verzweigtes hydrophiles Copolymer aus Saccharose und Epichlorhydrin, das sich leicht in Wasser und in wässrigen Lösungen löst. Die unterschiedlichen Zelldichten der Komponenten im Vollblut führen dazu, dass beim Zentrifugieren in Gegenwart eines Dichtegradientenmediums ein spezielles Migrationsmuster durch das Medium entsteht, wodurch unterschiedliche Zellpopulationen fraktioniert werden können. Der Buffy Coat (ca. 60 ml) wird gleichmäßig in drei unterschiedlichen, mit Ficoll-Hypaque gefüllten Falcon-Tubes (jeweils 20 ml), mit einer serologischen Pipette vorsichtig geschichtet. Anschließend werden die Falcon-Tubes für 40 min bei 20 °C mit 400 g, geringer Beschleunigung und ohne Bremsfunktion zentrifugiert. Dadurch wird eine Durchmischung der Ficoll-Blut-Schichten verhindert. Anschließend werden die einzelnen Bestandteile des Buffy Coats aufgetrennt, wodurch sich insgesamt drei Schichten bilden. Die oberste Schicht besteht aus zellfreiem Blutplasma, die mittlere enthält die PBMC, und die unterste Schicht umfasst Ficoll, Erythrozyten und Granulozyten. Etwa 15 ml Plasma werden entnommen, in separate Falcon-Tubes überführt und für 30 min bei 56 °C im Wasserbad inkubiert. Das denaturierte Plasma wird dann für 5 min bei 3000 rpm RT abzentrifugiert und das daraus gewonnene Serum wird im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Im nächsten Schritt werden die PBMC-Pellets vorsichtig abgenommen und in einem neuen Falcon-Tube mit DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline) auf 50 ml aufgefüllt. Nach der Zentrifugation bei 4 °C und 1.600 rpm für 10 min wird der Überstand vorsichtig dekantiert und das Zellpellet anschließend aufgebrochen.

Nach zwei weiteren Waschvorgängen mit DPBS wird RPMI und hitzeinkubiertes autologes Serum (1 ml) zugegeben und ein Gesamtvolumen von 50 ml eingestellt. Die PBMC werden im Verhältnis 1:9 mit Methylenblau vermischt und anschließend in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Abschließend werden die Zellen auf eine Endkonzentration von 2×10^7 Zellen/ml eingestellt und entweder bei 4 °C im Kühlschrank gelagert oder direkt für nachfolgende Versuche verwendet.

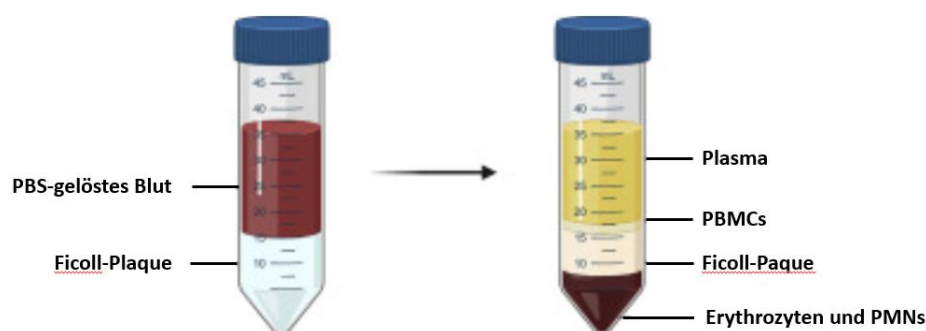


Abbildung 6: Unterschiedliche Phasen vor (links) und nach (rechts) der Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Paque (262)

3.2.1.7 Inkubation der Zellen mit den zu testenden Agenzien

Nach Isolation der PBMCs aus den Buffy Coats (siehe 3.2.1.6.) und der Einstellung der gewünschten Endkonzentration (2×10^7 Zellen/ml) werden mittels Dispenser je 50 µl/Well der Zellsuspension in eine 96-Well-Suspensions-Platte überführt. Im Anschluss werden die Zellen mit den zu testenden Agenzien inkubiert und dann über Nacht in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ gelagert. Das Endvolumen pro Well beträgt 100 µl und setzt sich aus jeweils 50 µl Zellsuspension und 50 µl des jeweiligen Agens zusammen (siehe Tabelle 11). Dimethylsulfoxid (DMSO) dient als Lösungsmittelkontrolle, Resiquimod (R848) als Positivkontrolle. Nach 24 Stunden Inkubation werden die Suspensionsplatten für 5 min bei 1.400 rpm und 4 °C zentrifugiert.

1. DMSO	1:250 (0.4 µl in 100µl Zellsuspension)
2. MEKi (TRA; BIN; COB)	0.05 µM
3. BRAFi (DAB; VEM; ENC)	0.25 µM
4. BRAFi+ MEKi	0.025 µM + 0.05 µM
5. BRAFi (DAB; VEM; ENC)	0.25 µM
6. BRAFi + MEKi	0.25 µM + 0.05 µM
7. R848	1 µg/ml

Tabelle 11: Ansätze zur Analyse des potenziellen Einflusses von BRAFi und MEKi auf die Zytokin-Produktion von PBMC. **1)** Dimethylsulfoxid (DMSO); **2)** MEKi = Mitogen-activated protein kinase kinase Inhibitoren (Trametinib (TRA), Binimetinib (BIN), Cobimetinib (COB) jeweils 0.05 µM); **3)** BRAFi = v-rat fibrosarcoma (Raf) murine

sarcoma viral oncogene homolog B Inhibitoren (Dabrafenib (DAB), Vemurafenib (VEM), Encorafenib (ENC), jeweils 0,25 μM); **4)** BRAFi (DAB, VEM, ENC jeweils 0,025 μM) + MEKi (TRA, BIN, COB jeweils 0,05 μM); **5)** BRAFi (DAB, VEM und ENC) jeweils 0,25 μM ; **6)** BRAFi jeweils 0,25 μM + MEKi jeweils 0,05 μM ; **7)** Resiquimod (R848) 1 $\mu\text{g/ml}$ als Positivkontrolle.

3.2.2 Cytometric Bead Array (CBA)

Der CBA-Assay ist ein Bead-basierter Immunoassay, bei dem fluoreszierenden Antikörper zum Nachweis verschiedener Zytokine, Chemokine oder Wachstumsfaktoren verwendet werden (Abbildung 7).

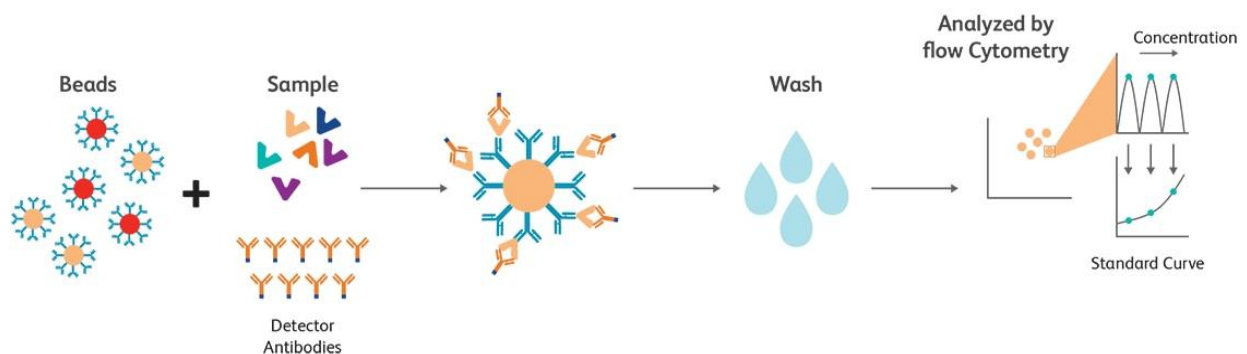


Abbildung 7: Schematische Darstellung eines CBA-Assays (263)

Jedes einzelne Capture-Bead im Array weist eine spezifische Fluoreszenzintensität auf und ist mit einem entsprechenden Capture-Antikörper beschichtet. Die verschiedenen Beads werden anschließend mit einer Probe oder einem Standard sowie einer Mischung aus Detektionsantikörpern, die mit dem Reportermolekül PE (Phycoerythrin) konjugiert sind, kombiniert.

Zur Quantifizierung der IL-1 β , IL-6 und IL-8 mittels CBA werden das Human Soluble Protein Master Buffer Kit und die Human Flex Sets von BD Biosciences verwendet. Zunächst werden zehn FACS-Röhrchen sowie zusätzliche Röhrchen entsprechend der Anzahl der zu analysierenden Proben beschriftet. Anschließend werden die Standards aufgetaut und eine Verdünnungsreihe in zehn 0,5 ml-Eppendorf-Gefäßen für die zu quantifizierenden Zytokine hergestellt. Der aufgetaute Standard (Top Standard) fungiert als die höchste Konzentration der Verdünnungsreihe und beträgt 2500 pg/ml, die niedrigste Konzentration liegt bei 10 pg/ml. Es werden, zusätzlich zu dem aufgetauten Standard, 50 μl DPBS + 1% FCS jedem Eppendorf Gefäß von der Standardreihe zugegeben. Im nächsten Schritt werden 50 μl aus dem Röhrchen mit der höchsten Konzentration entnommen und mit den 50 μl DPBS + 1% FCS im zweiten 0,5 ml Eppendorf Gefäß durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren vermischt. Dieser Vorgang wird schrittweise für alle weiteren Gefäßen durchgeführt. Für die letzte Standardprobe wird ausschließlich DPBS + 1% FCS verwendet. Parallel dazu wird auch der Bead-Master-Mix

vorbereitet. Dazu werden zwei 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße vorbereitet. Für jedes nachzuweisende Zytokin werden jeweils 0,2 µl der entsprechenden Capture-Beads in ein 1,5 ml-Röhrchen gegeben und mit 10 µl DPBS + 1 % FCS vermischt. Zusätzlich zum Bead-Master-Mix wird für jeden Ansatz ein PE-Master-Mix angesetzt, bestehend aus jeweils 0,2 µl des PE-Nachweisreagenz und 10 µl DPBS + 1 % FCS. In jedes beschriftete 5 ml-Röhrchen wird vorgelegter Bead-Master-Mix (10 µl) mit jeweils 10 µl der Standardreihe bzw. der zu analysierende Probe zusammengegeben und nach dem Vortexen 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation werden jeweils 10 µl des angesetzten PE-Master-Mix in die dafür vorgesehenen FACS-Röhrchen geben. Diese werden wieder gevortext und für 2 h im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss daran werden die Röhrchen mit 1 ml DPBS versetzt und für 10 min bei 4 °C und 1200 rpm zentrifugiert.

Der Überstand wird vorsichtig dekantiert, und es werden 200 µl DPBS + 1 % FCS mithilfe eines Dispensers zugegeben. Daraufhin werden die Proben mit einem Vortexer resuspendiert und schließlich mit dem Durchflusszytometer Attune® NxT analysiert.

3.2.3 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die FACS-Analyse (Fluorescence-Activated Cell Sorting) ist ein Verfahren zur Zählung und Analyse physikalischer sowie molekularer Eigenschaften von fluoreszenzmarkierten Partikeln in einem Flüssigkeitsstrom (264).

Für die FACS-Analyse werden 500 µl PBMC, die zuvor auf eine einheitliche Konzentration eingestellt wurden, in FACS-Röhrchen überführt und für 5 min bei 4 °C und 1.400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und 10 µl Fc-Block zugegeben, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern. Anschließend folgt die Inkubation im Dunkeln bei 4 °C für 15 min. Die fluoreszenzmarkierten Antikörper werden lichtgeschützt und kühl gelagert und vor der Zugabe in die FACS-Röhrchen mit einem Vortexer resuspendiert. Nach Abschluss der Inkubationszeit werden den Proben 50 µl FACS-Puffer zugegeben. Sowohl die unbehandelte als auch die mit R848 stimulierte Probe werden mit einem Antikörper-Mix vermischt, der alle für das jeweilige Experiment relevanten Antikörper enthält. Zunächst werden die Antikörper-Suspensionen zentrifugiert und anschließend den entsprechenden FACS-Röhrchen mit den vorbereiteten PBMC zugesetzt. Zur Kontrolle werden Einzelfärbungen (jeweils eine Kontrollprobe pro Fluorochrom und Isotyp) durchgeführt, um falsch-positive Signale zu vermeiden. Für jede Einzelfärbung werden 50 µl Antikörperlösung mit 50 µl FACS-Puffer vermischt. Nach Zugabe der beiden Komponenten werden die Rundbodenröhrchen gevortext und für 20 min bei 4 °C gelagert. Anschließend werden die Proben mit 1 ml FACS-Puffer versetzt und für 5 Minuten bei 1.400 rpm zentrifugiert. Danach wird der Überstand dekantiert. Im letzten Schritt werden die Proben mit einer Fixierlösung aus PBS, 0,7 % Paraformaldehyd (PFA) und EDTA behandelt. Die Proben

können bis zu zwei Wochen lichtgeschützt gelagert werden, bevor sie mit dem Durchflusszytometer Attune® NxT quantifiziert und ausgewertet werden.

3.2.4 Herstellung humaner dendritischer Zellen (DCs) aus peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC)

Dendritische Zellen können *in vitro* entweder aus hämatopoetischen Vorläuferzellen (265) oder aus peripheren Blutmonozyten (266) differenzieren (Abbildung 8). Zur Generierung unreifer DCs werden Monozyten mit Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) und Interleukin-4 (IL-4) kultiviert. Dabei regulieren sie die Expression bestimmter Oberflächenmarker herunter, unter anderem solcher, die Teil des LPS-Rezeptorkomplexes sind (267).

Zur Differenzierung humaner dendritischer Zellen aus PBMC werden zunächst PBMC-Medium und DPBS im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt. Zur Vorbereitung wird das Zellmedium in ein Falcon-Röhrchen (50 ml) vorgelegt und mit 2%-igem Plasma des Gesamtvolumens vom entsprechenden Spender sowie mit den aus den Buffy Coats gewonnenen PBMCs versetzt. Das restliche Volumen wird mit PBMC-Medium aufgefüllt. Die Kulturplatten werden für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ in den Inkubator gestellt. Anschließend wird der Überstand der 6-Well-Platten verworfen und die einzelnen Wells mit je 2 ml DPBS gewaschen (3x) und das DPBS schließlich wieder verworfen. Da die Monozyten in den einzelnen Wells adhären, werden die restlichen non-adhären Zellen durch die einzelnen Waschvorgänge abgespült, um eine reine DC-Kultur zu gewährleisten. Im nächsten Schritt wird pro Well 3 ml Vollmedium zugegeben (bestehend aus 2 % autologem Plasma, 11 µl GM-CSF/IL-4 pro ml Medium [20 ng/ml] und PBMC-Medium als Restvolumen). Anschließend werden die 6-Well-Platten für 7 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Der Mediumwechsel wird jeweils an Tag 3 und an Tag 6 durchgeführt. Dazu wird das Medium vorsichtig entfernt und durch frisch vorbereitetes Vollmedium ersetzt. An Tag 7 werden die differenzierten DCs mithilfe einer serologischen Pipette durch sanftes Abspülen in 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt und bei Raumtemperatur 8 Minuten lang mit 1.400 rpm zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes werden 1 ml PBMC-Medium, 200 µl Plasma sowie jeweils 20 ng/ml IL-4 und GM-CSF zugegeben. Nach Verdünnung der Zellsuspension im Verhältnis 1:2 mit Trypanblau werden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer mikroskopisch ausgezählt und auf eine Endkonzentration von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt.

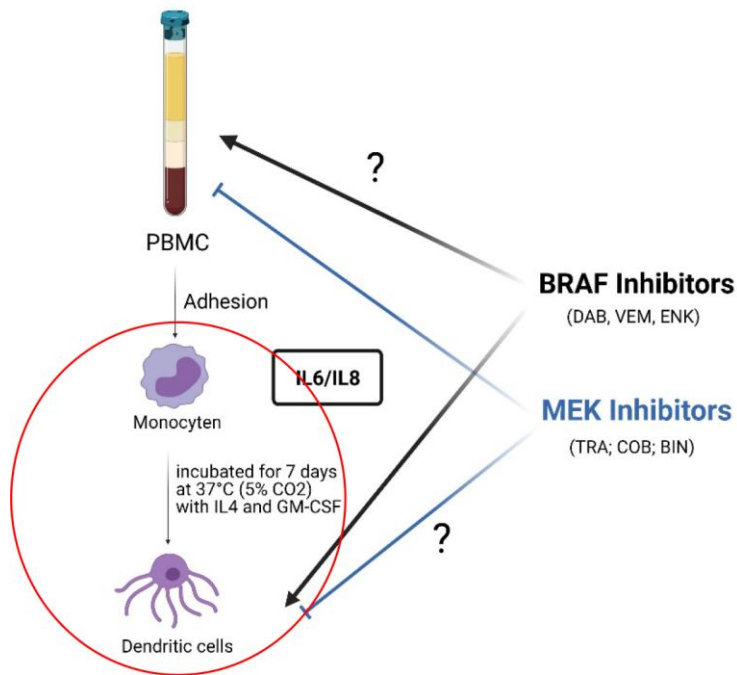


Abbildung 8: Generierung dendritischer Zellen aus Monozyten. (Eigene Abbildung, erstellt with Biorender.com)

3.2.5 Vorbereitung von Melanomzell-Kokulturen mit PBMC

Die Zellkulturflaschen mit Melanomzelllinien werden dem Brutschrank entnommen. Zunächst wird das alte Medium der kultivierten Melanomzellen abgesaugt und anschließend verworfen. Vor dem Ernten werden die Zellkulturflaschen (T75) mit 5 ml DPBS Puffer gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA (7 ml) für 5 min im Brutschrank inkubiert und geerntet. Anschließend werden die Melanomzellen mit 25 ml Zellmedium (RPMI mit 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % β -Mercaptoethanol) neutralisiert, in ein 50 ml-Röhrchen überführt und auf 50 ml aufgefüllt. Die Röhrchen werden bei 4 °C für 10 Minuten bei 1.200 rpm zentrifugiert und der Überstand wird anschließend dekantiert. Das Zellpellet wird in 5 ml frischem Zellmedium resuspendiert und anschließend im Verhältnis 1:5 mit Trypanblau verdünnt.

Nach der Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer wird eine Konzentration von 2×10^5 /ml eingestellt. Die Zellen werden anschließend in 96-Well-Platten ausplattiert (50 μ l der Zellsuspension; 1000 Zellen/Well) und dann für 3-4 h im Brutschrank adhären lassen. Parallel dazu werden die Buffy Coats aufgearbeitet, um PBMC zu isolieren. Für jede Zelllinie werden insgesamt 40 Wells ausplattiert. Während 20 Wells nur mit Melanomzellen ausplattiert werden, sind die anderen 20 Wells mit PBMC inkubiert. Nach der Adhäsion der Melanomzellen werden 50 μ l Zellmedium und 200 μ l der jeweiligen Medikamentenmischung zugegeben und gemeinsam inkubiert. Folgende Medikamente werden dafür getestet:

1. BRAFi (jeweils 0.25 μ M) : DAB, VEM, ENC
2. MEKi (jeweils 0.05 μ M) : TRA, COB, BIN

3. BRAFi (jeweils 0.025 μM) und MEKi (jeweils 0.05 μM) Kombinationen: DAB+TRA; VEM+COB; ENC+BIN.
4. DMSO (Einsatz als Negativkontrolle)

Um einen Austausch zwischen den PBMC und den Melanomzellen zu ermöglichen, werden für die Hälfte der eingesetzten Zellen Zellkultureinsätze genutzt (Abbildung 9). Die Inserts besitzen eine Porengröße von 0,2–0,4 μm (Nunc Tissue Culture Inserts, 8-Well Strip, 0,2 μm Anopore-Membran), wodurch lediglich lösliche Mediatoren wie Zytokine, nicht jedoch PBMC, die Membran passieren können. Damit der Austausch zwischen PBMC und Melanomzellen über lösliche Mediatoren erfolgen kann, muss beim Einsetzen der Tissue Culture Inserts darauf geachtet werden, dass sich keine Luftblasen zwischen dem Einsatz und dem Medium auf dem Plattenboden bilden, da diese als Barriere wirken könnten. Es werden 50 μl der vorbereiteten PBMC in die Zellkultureinsätze pipettiert. Die Zellen (PBMC, Melanomzelllinien sowie PBMC-Melanomzelllinien-Kokulturen) in den 96-Well-Platten werden anschließend für 24 und 48 h bei 37 °C und 5 % CO_2 im Brutschrank mit den jeweiligen Medikamenten inkubiert.

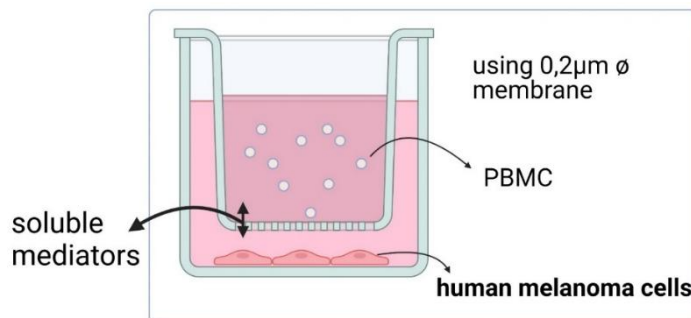


Abbildung 9: Aufbau von Melanom Zell-Cokulturen mit PBMC. (Eigene Abbildung, erstellt with Biorender.com)

3.2.6 MTT-Zellviabilitätsassay

Nach der Inkubation werden die Zellen in 96-Well-Platten für 5 min bei 4 °C und 1.400 rpm abzentrifugiert. Von den Melanomzelllinien, die ohne PBMC inkubiert wurden (siehe 3.2.5), werden jeweils 100 μl pro Well mittels Multipipette abgenommen und in eine neue Platte überführt. Diese wird anschließend bei -20 °C gelagert, bis der CBA-Assay durchgeführt wird. Bei den PBMC-Melanomzelllinien-Kokulturen werden zunächst die PBMC abgesaugt, die Zelleinsätze entfernt und anschließend 100 μl des Kulturüberstands entnommen, in eine neue Platte überführt und im Gefrierschrank gelagert. Anschließend wird der MTT-Assay durchgeführt, indem pro Well 25 μl MTT-Lösung mithilfe einer Mehrkanalpipette zugegeben und leicht resuspendiert wird. In der Regel wird im Rahmen des MTT-Zellviabilitätsassays auch ein Blank-Ansatz mitgeführt. Dafür werden 25 μl MTT-Substanz zusammen mit 100 μl des verwendeten Mediums in drei Wells pipettiert und bei der Auswertung dann der Mittelwert ermittelt. Diese Ansätze werden anschließend für 4 h bei 37 °C und 5% CO_2 im Brutschrank

inkubiert und im Anschluss daran pro Well 100 µl Solubilisierungspuffer zugegeben und resuspendiert. Die 96-Well-Platten werden schließlich lichtgeschützt bei Raumtemperatur aufbewahrt und nach 4 h (maximal über Nacht) in einem Multiwell-Spektrophotometer (ELISA-Reader) quantifiziert.

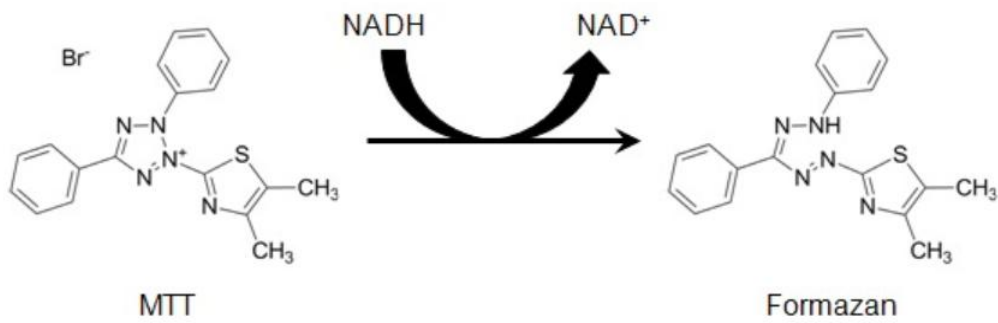


Abbildung 10: Strukturen von MTT und dem gefärbten Formazan-Produkt. Modifiziert nach (268)

4 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die immunologischen *Off-Target*-Effekte der klinisch etablierten Behandlung mit BRAFi und MEKi – sowohl als Monotherapie als auch in Kombination – an humanen Immunzellen zu analysieren. Untersucht wurden die konzentrationsabhängigen Effekte von BRAFi und/oder MEKi auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine in Immunzellen. Der Schwerpunkt der Untersuchung lag auf der Sekretion von IL-1 β , IL-6 und IL-8 in PBMC gesunder Spender. In einer vorangegangenen Arbeit (261) wurde gezeigt, dass DAB die IL-1 β -Expression und die Caspase-1-Aktivierung in MO-DC verstärkt und dass primäre DC, isoliert aus PBMC einiger Blutspender, eine erhöhte IL-1 β -Produktion als Reaktion auf DAB aufweisen. Daher wurden in der vorliegenden Analyse zusätzlich von der Mehrzahl der PBMC-Spender MO-DC isoliert und ihre Zytokinsekretion unter dem Einfluss von BRAFi und/oder MEKi untersucht. Dabei wurde ebenfalls untersucht, ob die Zytokinsekretion von PBMC und MO-DC derselben Spender miteinander korreliert. Weiter wurde evaluiert, ob bestimmte Faktoren (z. B. Alter, Blutgruppe, Geschlecht) für die Zugehörigkeit zur *Responder*- bzw. *Non-Responder*-Gruppe prädisponieren.

Darüber hinaus wurde untersucht, ob Immunzellen über lösliche Mediatoren (IL-1 β , IL-6, IL-8) die Tumorentwicklung beeinflussen können. Damit sollte überprüft werden, ob und inwieweit PBMC, die unter dem Einfluss von BRAFi und/oder MEKi eine verstärkte Zytokinexpression aufweisen, den Effekt der zielgerichteten Therapie auf Melanomzellen über lösliche Mediatoren modulieren. Hierzu wurde die Zytokinexpression in Melanomzelllinien, PBMC und Kokulturen mittels CBA gemessen sowie die Auswirkung der MAPKi auf die Zellviabilität mithilfe des MTT-Assays analysiert.

4.1 Der Effekt von BRAFi und/oder MEKi auf die Zytokinproduktion humaner PBMC

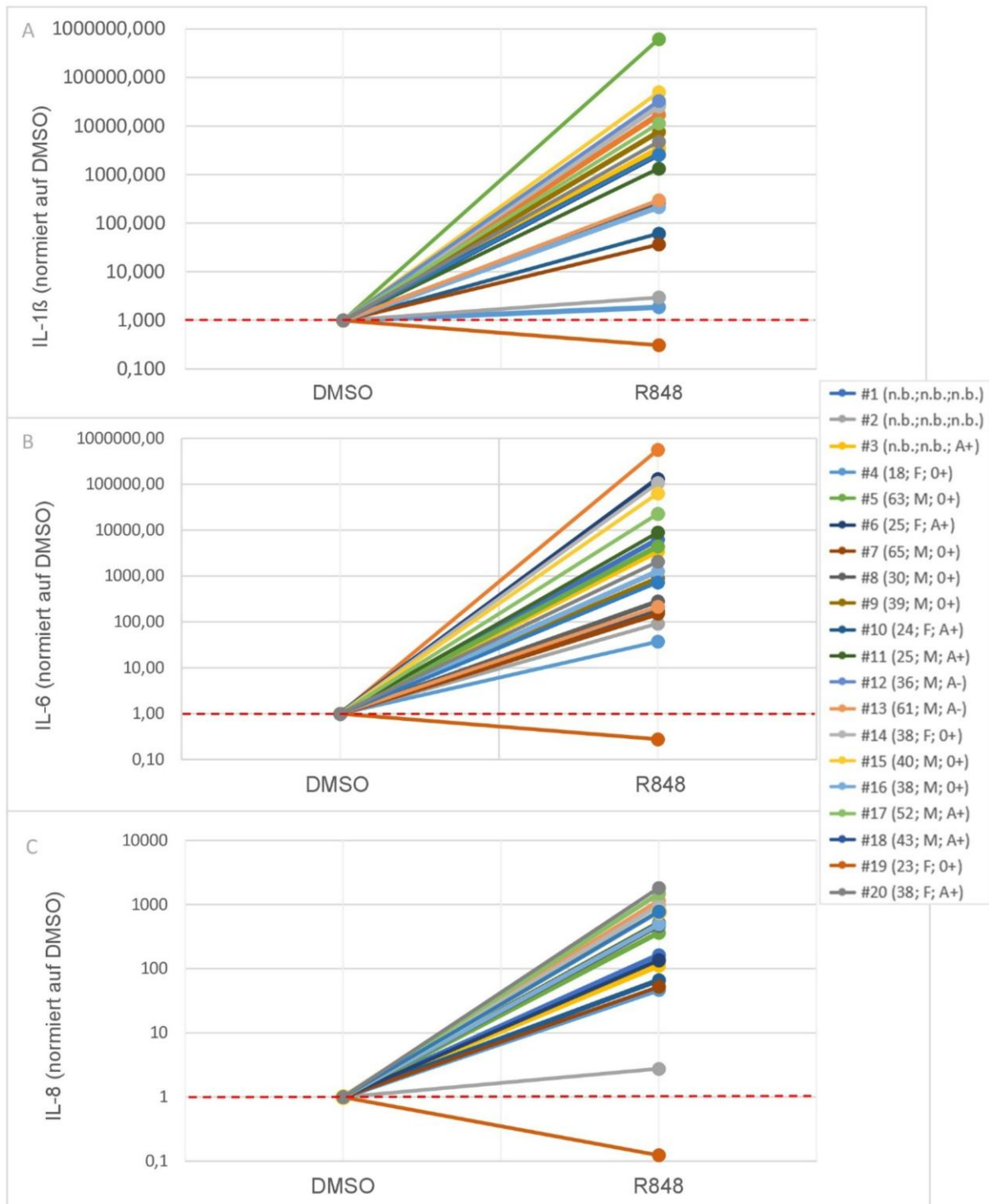


Abbildung 11: Einfluss von Resiquimod (R848) auf die Interleukin-(IL)-1 β , IL-6 und IL-8 Sekretion von Peripheral blood mononuclear cells (PBMC). 2 x 10⁶/ml PBMC gesunder Spender wurden in 96 Well-Platten ausgesät (jeweils 50 μ l) und mit 1 μ g/ml R848 (50 μ l) über Nacht behandelt (37 °C, 5 % CO₂). Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden die Überstände abgenommen. Mittels Cytometric Bead Array (CBA) wurde die IL-1 β - (A), IL-6- (B) und IL-8-Produktion (C) gemessen. Angegeben sind nach der Probandennummer (#) das Alter (Jahre), das Geschlecht (F/M) und die Blutgruppe der Spender. („n.b.“ = nicht bekannte Angaben). Als Negativkontrolle wurden PBMC mit Dimethylsulfoxid (DMSO) (1 ‰) behandelt. Das Diagramm zeigt die IL-Konzentrationen normiert auf die Konzentration in der DMSO-Kontrolle (eigene Abbildung).

Abbildung 11 stellt die Auswirkung einer Inkubation mit 1 µg/ml R848 (Positivkontrolle) auf die Zytokinproduktion von PBMC aus 20 gesunden Spendern dar. Nach der Inkubation mit R848 reagierten die PBMC der meisten Spender mit einer erhöhten Sekretion der drei untersuchten Zytokine (Abbildung 11A: IL-1β; Abbildung 11B: IL-6; Abbildung 11C: IL-8) im Vergleich zu den mit DMSO (1 %, Lösungsmittelkontrolle) behandelten Zellen. Bei wenigen Spendern (*Non-Responder*, z. B. Spender 19) führte eine Stimulation mit dem TLR7/8-Liganden R848 zu keinem Effekt auf die Ausschüttung der drei Zytokine durch PBMC.

4.1.1 Die Wirkung von BRAFi und/oder MEKi auf die IL-1 β Produktion humaner PBMC

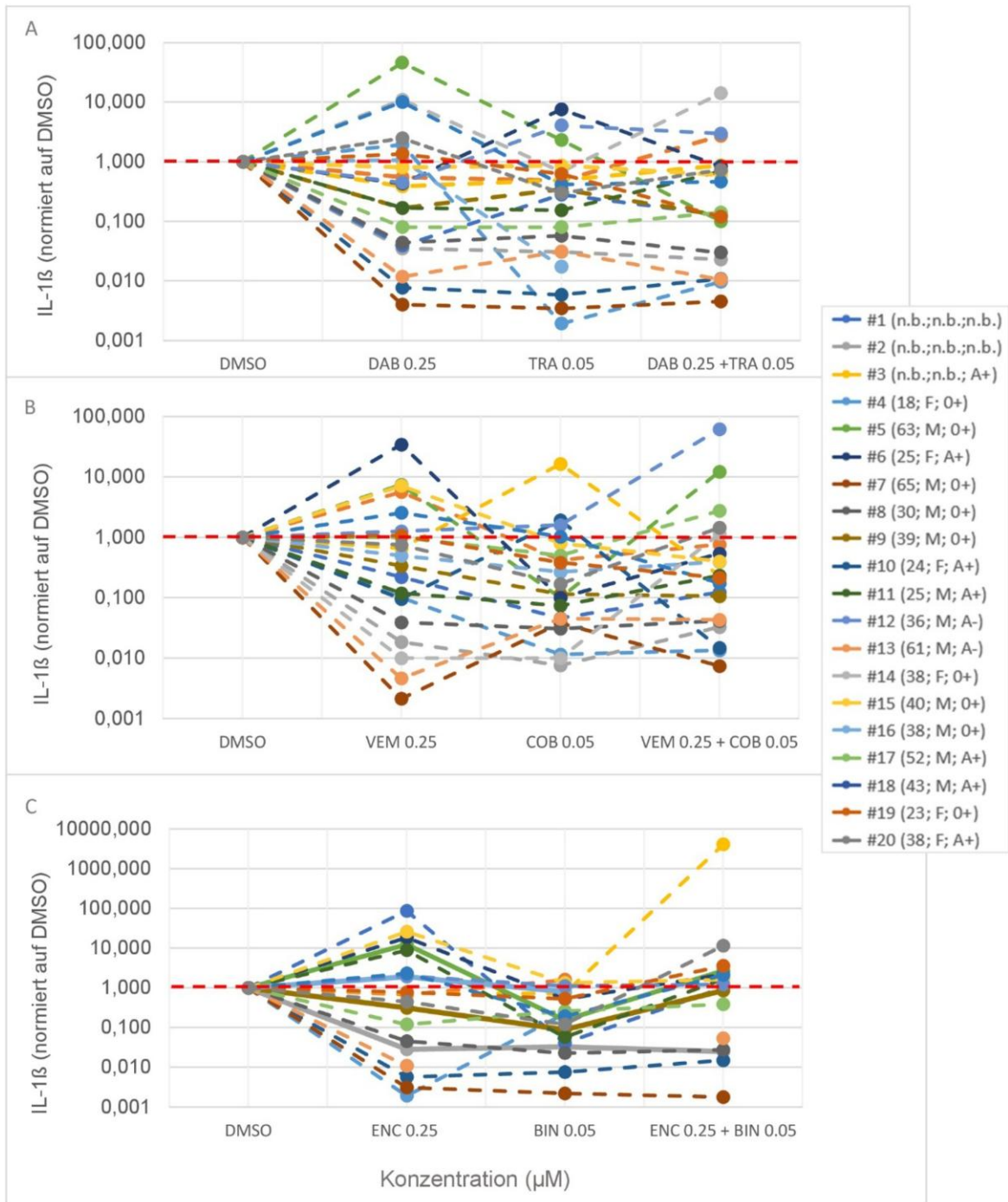


Abbildung 12: Einfluss von BRAFi und/oder MEKi auf die Interleukin-(IL)-1 β -Sekretion von Peripheral blood mononuclear cells (PBMC). 2×10^6 /ml PBMC gesunder Spender wurden in 96 Well-Platten ausgesät (jeweils 50 μ l) und mit jeweils 50 μ l einer BRAFi- (0.05 μ M), MEKi- (0.25 μ M) bzw. BRAFi (0.05 μ M) + MEKi (0.25 μ M) Lösung behandelt: **(A)** Dabrafenib (DAB), Trametinib (TRA) bzw. DAB + TRA; **(B)** Vemurafenib (VEM), Binimetinib (BIN) bzw. VEM+ BIN; **(C)** Encorafenib (ENC), Cobimetinib (COB) bzw. ENC + COB). Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden die Überstände abgenommen. Mittels Cytometric Bead Array (CBA) wurde die IL-1 β -Produktion bestimmt. Angegeben sind nach der Probandennummer (#) das Alter (Jahre), das Geschlecht (F/M) und die Blutgruppe der Spender. („n.b.“= nicht bekannte Angaben). Als Negativkontrolle wurden PBMC mit Dimethylsulfoxid (DMSO) (1 %) behandelt. Dargestellt ist die IL-1 β -Konzentration (logarithmische Darstellung), normiert auf die Konzentration der DMSO-Kontrolle. BRAFi = v-rat fibrosarcoma (Raf) murine sarcoma viral oncogene homolog B Inhibitor; MEKi = Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase (eigene Abbildung)

Abbildung 12 zeigt die IL-1 β -Sekretion der PBMC nach einer Behandlung mit verschiedenen BRAFi und MEKi. Die BRAFi (DAB, VEM, ENC) wurden in zwei Konzentrationen (0.025 μ M, 0.25 μ M) verwendet (siehe Anhang Abbildung 29). Da sich die Ergebnisse zwischen den beiden Konzentrationen nicht deutlich unterscheiden, sind in Abbildung 12 ausschließlich die Ergebnisse mit der höheren Konzentration dargestellt. Die IL-1 β -Sekretion variierte deutlich in Abhängigkeit vom eingesetzten Inhibitor. Die PBMC einiger Spender reagierten auf die Behandlung mit allen drei BRAFi mit einer verstärkten Ausschüttung von IL-1 β . DAB und ENC (Abbildung 12A, -C) stimulierten die IL-1 β -Ausschüttung bei elf von 20 Spendern und VEM bei neun von 20 Spendern (Abbildung 12B). Im Gegensatz zu DAB und VEM zeigte ENC bei der niedrigeren Konzentration (0.025 μ M) den stärksten Effekt (siehe Anhang Abbildung 29). Einige Spender (z. B. Spender 2, 7 und 13) zeigten unter BRAFi-Behandlung eine verringerte IL-1 β -Sekretion und wurden daher als BRAFi-*Non-Responder* klassifiziert. Die getesteten MEKi (TRA, COB, BIN) zeigten keinen eindeutigen Einfluss auf die IL-1 β -Sekretion, schwächten jedoch in Kombination mit BRAFi deren stimulierenden Effekt ab. Einige Spender (z. B. Spender 14) sprachen auf DAB (Abbildung 12A), nicht jedoch auf VEM und ENC an (Abbildung 12B, -C) und zeigten somit eine substanzabhängige *Responder-/Non-Responder*-Eigenschaft. Allgemein bestand eine große Varianz hinsichtlich der Auswirkungen der MAPKi. Im Gegensatz zu IL-6 und IL-8 wird IL-1 β auf zwei Ebenen reguliert: durch die Translation der pro-IL-1 β -mRNA und durch Aktivierung des Inflammasoms (269). Dieser Unterschied könnte die unterschiedlichen Ergebnisse bei den proinflammatorischen Interleukine erklären (siehe Diskussion Kapitel 5.1.2).

4.1.2 Die Wirkung von BRAFi und/oder MEKi auf die IL - 6 Produktion humaner PBMC

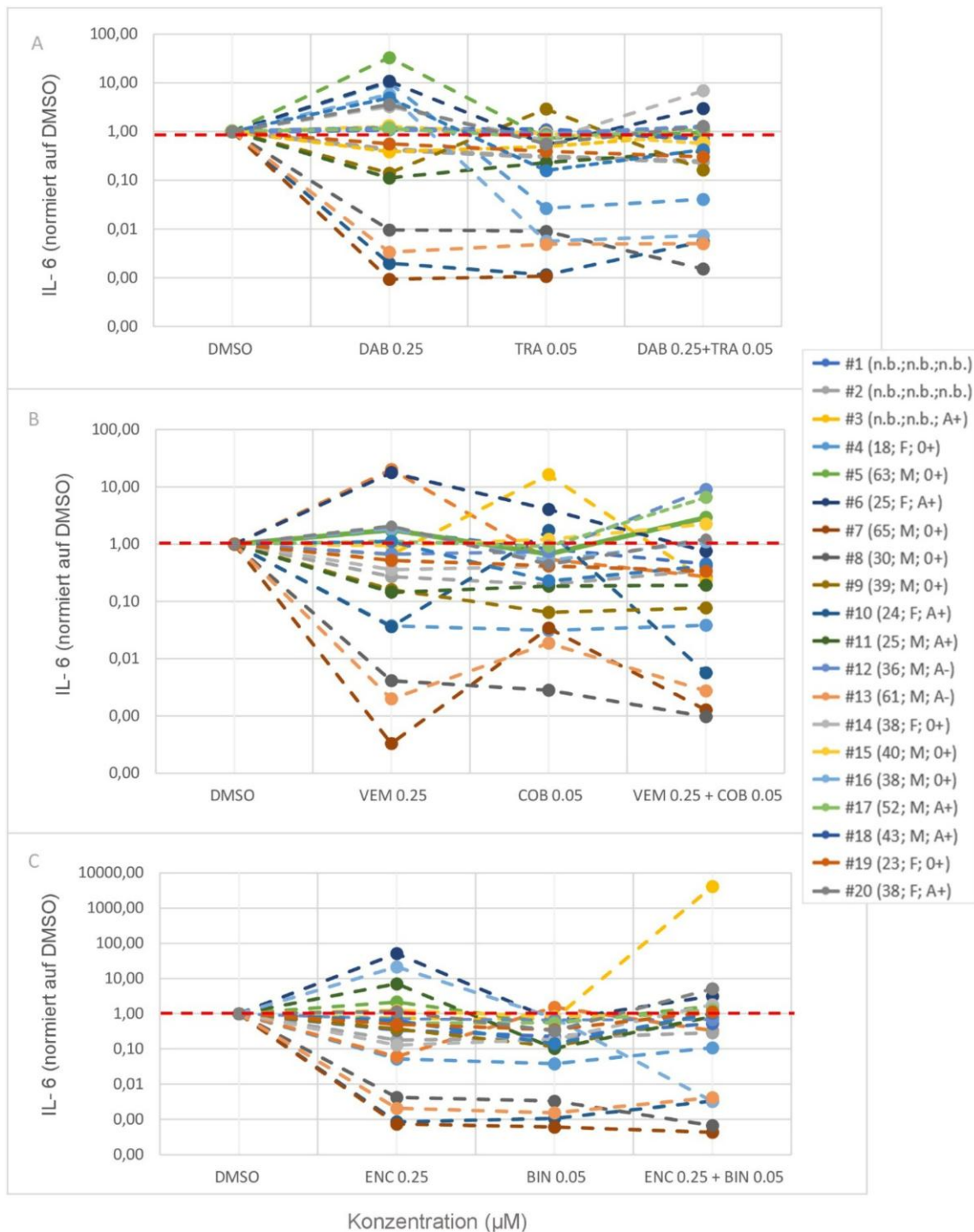


Abbildung 13: Einfluss von BRAFi und/oder MEKi auf die Interleukin-(IL)-6-Sekretion von Peripheral blood mononuclear cells (PBMC). $2 \times 10^6/\text{ml}$ PBMC gesunder Spender wurden in 96 Well-Platten ausgesät (jeweils 50 μl) und mit jeweils 50 μl einer BRAFi- (0.05 μM), MEKi- (0.25 μM) bzw. BRAFi (0.05 μM) + MEKi (0.25 μM) Lösung behandelt: **(A)** Dabrafenib (DAB), Trametinib (TRA) bzw. DAB + TRA; **(B)** Vemurafenib (VEM), Binimetinib (BIN) bzw. VEM+ BIN; **(C)** Encorafenib (ENC), Cobimetinib (COB) bzw. ENC + COB). Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden die Überstände abgenommen. Mittels Cytometric Bead Array (CBA) wurde die IL-6-Produktion bestimmt. Angegeben sind nach der Probandennummer (#) das Alter (Jahre), das Geschlecht (F/M) und die Blutgruppe der Spender. („n.b.“= nicht bekannte Angaben). Als Negativkontrolle wurden PBMC mit Dimethylsulfoxid (DMSO) (1 %) behandelt. Das Diagramm zeigt die IL-6-Konzentrationen (logarithmische Darstellung) normiert auf die Konzentration in der DMSO-Kontrolle. BRAFi = v-rat fibrosarcoma (Raf) murine sarcoma viral oncogene homolog B Inhibitor; MEKi = Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase (eigene Abbildung)

Als Nächstes wurde die Auswirkung von MAPK-Inhibitoren auf die IL-6-Produktion untersucht. Zu diesem Zweck wurden die klinisch eingesetzten BRAF^{V600E}-Inhibitoren DAB, VEM und ENC in einer Konzentration von 0.25 µM und 0.025 µM (aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht alle Dosierungen und Kombinationen hier gezeigt) (s. Anhang Abbildung 27B) und die gleichzeitig verabreichten MEKi TRA, BIN und COB (0.05 µM) und deren Kombination (BRAFi 0.25 µM und MEKi 0.05 µM/BRAFi 0.025 µM und MEKi 0.05 µM) in dieser Analyse mit einbezogen.

Einige PBMC-Donoren reagierten auf die Applikation von DAB und ENC (Abbildung 13A, -C) mit einer erhöhten IL-6-Ausschüttung gegenüber der Lösungsmittelkontrolle, wobei diese Stimulation unter VEM-Behandlung (Abbildung 13B) moderater als bei DAB und ENC ausfiel. Die gleichzeitige Gabe von MEKi reduzierte den stimulierenden Effekt der BRAFi, was auf eine paradoxe ERK-Aktivierung zurückzuführen ist (s. Diskussion Kapitel 5.1.4). Bei alleiniger Stimulation der PBMC mit COB zeigten die Überstände bei einzelnen Spendern ebenfalls erhöhte IL-6-Werte, wobei der Effekt insgesamt schwächer ausfiel als unter BRAFi-Behandlung. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen zur IL-1β-Ausschüttung zeigte sich auch bei der IL-6-Sekretion kein Zusammenhang zwischen dem Ansprechen der PBMC auf die MAPKi und Alter, Blutgruppe oder Geschlecht der Spender.

4.1.3 Die Wirkung von BRAFi und/oder MEKi auf die IL-8 Produktion humaner PBMC

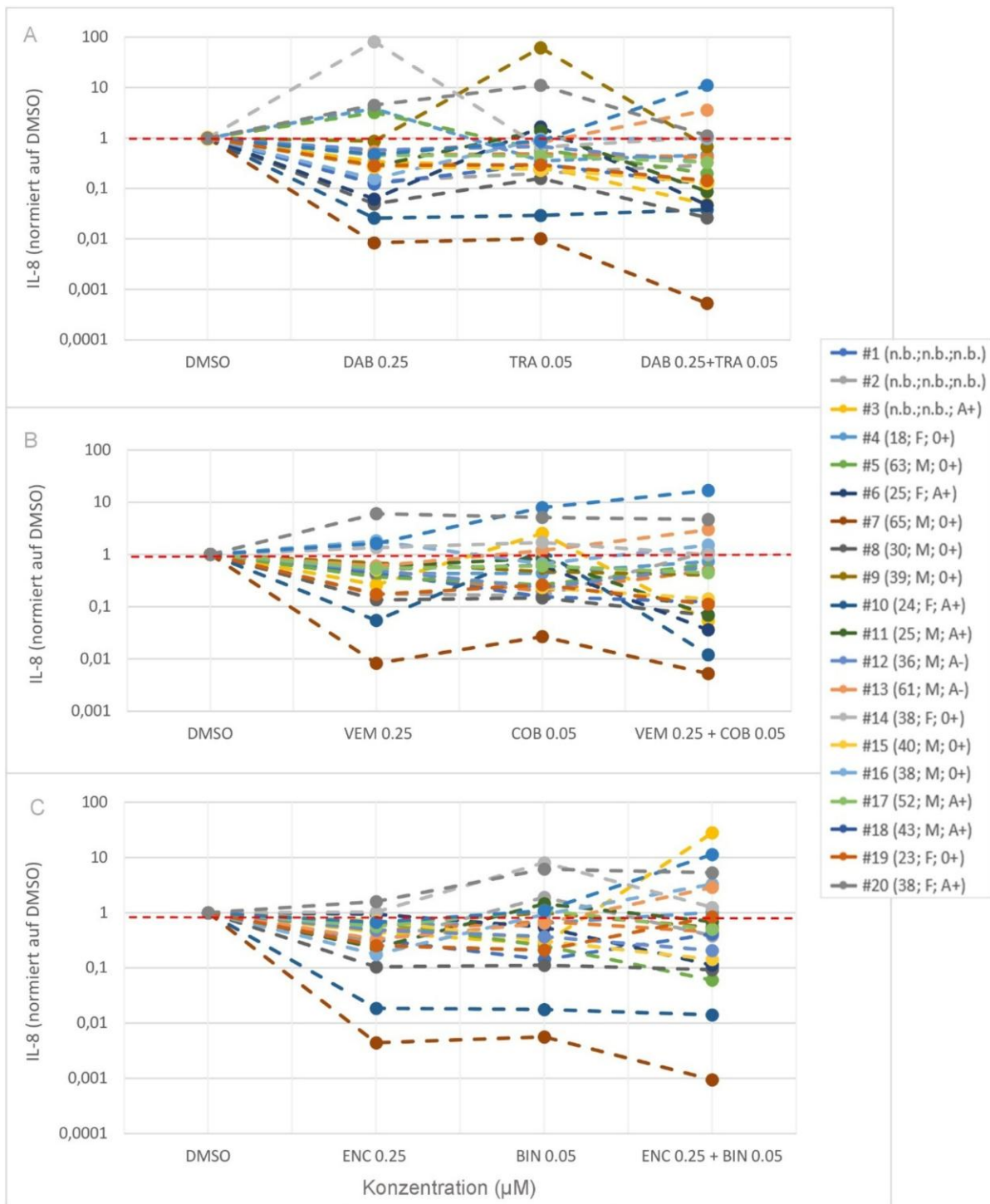


Abbildung 14: Einfluss von BRAFi und/oder MEKi auf die Interleukin-(IL)-8-Sekretion von Peripheral blood mononuclear cells (PBMC). $2 \times 10^6/\text{ml}$ PBMC gesunder Spender wurden in 96 Well-Platten ausgesät (jeweils $50 \mu\text{l}$) und mit jeweils $50 \mu\text{l}$ einer BRAFi- ($0.05 \mu\text{M}$), MEKi- ($0.25 \mu\text{M}$) bzw. BRAFi ($0.05 \mu\text{M}$) + MEKi ($0.25 \mu\text{M}$) Lösung behandelt: **(A)** Dabrafenib (DAB), Trametinib (TRA) bzw. DAB + TRA; **(B)** Vemurafenib (VEM), Binimetinib (BIN) bzw. VEM+ BIN; **(C)** Encorafenib (ENC), Cobimetinib (COB) bzw. ENC + COB). Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden die Überstände abgenommen. Mittels Cytometric Bead Array (CBA) wurde die IL-8-Produktion bestimmt. Angegeben sind nach der Probandennummer (#) das Alter (Jahre), das Geschlecht (F/M) und die Blutgruppe der Spender. („n.b.“= nicht bekannte Angaben). Als Negativkontrolle wurden PBMC mit Dimethylsulfoxid (DMSO) (1%) behandelt. Das Diagramm zeigt die IL-8-Konzentrationen (logarithmische Darstellung) normiert auf die Konzentration in der DMSO-Kontrolle. BRAFi = v-rat fibrosarcoma (Raf) murine sarcoma viral oncogene homolog B Inhibitor; MEKi = Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase (eigene Abbildung)

Um die Auswirkung von BRAFi und MEKi auf die Expression von IL-8 zu beleuchten, wurden die PBMC von 20 gesunden Spendern aus Buffy Coats mittels Ficoll isoliert und anschließend mit den oben genannten Konzentrationen (Abbildung 14) für 24 h behandelt. Nach der Inkubation wurden die IL-8 Levels in den Überständen der PBMC parallel zu IL-1 β und IL-6 durchflusszytometrisch bestimmt. IL-8 wies im Vergleich zu den anderen getesteten Zytokinen die höchste basale Konzentration auf; die gemessenen Werte überstiegen die höchste Konzentration der Standardreihe (2500 pg/ml) (s. Anhang Abbildung 27). Während sich die IL-1 β - und IL-6-Ausschüttung der PBMC im Wesentlichen nur nach einer BRAFi-Applikation erhöhte, waren erhöhte IL-8-Konzentrationen auch nach einer MEKi- oder Kombinationsbehandlung mit BRAFi und MEKi nachweisbar. Unter ENC-Behandlung fiel der Anstieg der IL-8-Konzentration jedoch geringer aus als bei den beiden anderen Zytokinen (vgl. Abbildung 12C, Abbildung 13C, Abbildung 14C).

4.1.4 Zusammenhang zwischen der IL-1 β -, IL-6- und IL-8-Sekretion der PBMC nach Inkubation mit BRAFi

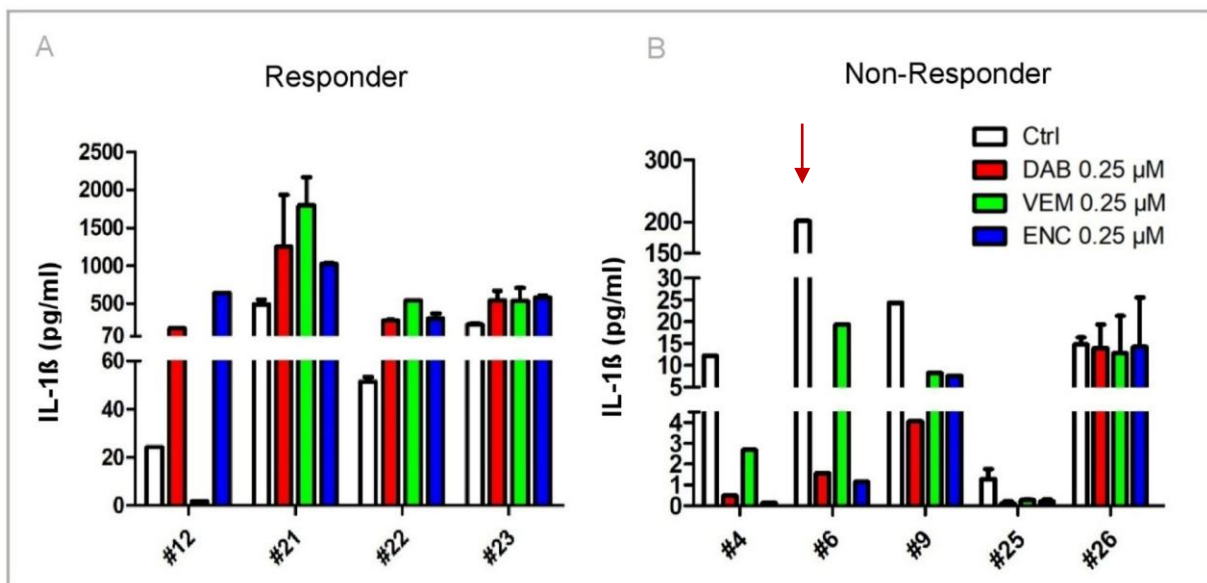


Abbildung 15: Exemplarischer Vergleich der Interleukin-(IL)-1 β -Sekretion in Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) von BRAFi-Respondern und BRAFi-Non-Respondern. PBMC gesunder Spender (2×10^6 /ml) wurden in 96 Well-Platten ausgesät (jeweils 50 μ l). Die Wells wurden mit 50 μ l BRAFi (Dabrafenib (DAB), Vemurafenib (VEM) und Encorafenib (ENC)) in einer Konzentration von 0.25 μ M inkubiert (37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂). Nach 24 h wurden die Überstände abgenommen. Die IL-1 β -Konzentrationen wurden durchflusszytometrisch bestimmt. Als Negativkontrolle wurden PBMC mit Dimethylsulfoxid (1%) behandelt (Ctrl). Die Daten geben den Mittelwert \pm Standardabweichung von Duplikaten (ab Spender 21 wurden die PBMC als Duplikate eingesetzt). Die Diagramme zeigen die IL-1 β -Produktion (A) der Responder #12 (36 J, M, A+); #21 (42 J, M, 0+); #22: (27 J, M, A+); #23: (39 J, W, 0+) und (B) der Non-Responder #4: (18 J, W, 0+); #6: (25 J, W, A+); #9: (39 J; M; 0-); #25: (64 J, M, A+) #26: (29 J; M; 0+). Angegeben sind nach der Probandennummer (#) das Alter (Jahre), das Geschlecht (F/M) und die Blutgruppe der Spender. BRAFi = v-rat fibrosarcoma (Raf) murine sarcoma viral oncogene homolog B Inhibitor; MEKi = Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase (eigene Abbildung)

Insgesamt wurden die PBMC von 27 Spendern getestet. Dabei wurden die Spender 12, 21, 22 und 23 als repräsentative Responder und 4, 6, 9, 25 und 26 als repräsentative Non-Responder in Bezug auf die IL-1 β -Produktion identifiziert. Auffällig war, dass insbesondere

Spender mit erhöhter basaler IL-1 β -Konzentration in den PBMC-Überständen dazu tendierten, die IL-1 β -Produktion nach BRAFi-Inkubation weiter zu steigern. Die in Abbildung 15A und -B dargestellten Befunde deuten darauf hin, dass eine erhöhte Expression von IL-1 β unter Basalbedingungen für eine BRAFi-induzierte Expressionssteigerung „prädisponierte“. Dieser Zusammenhang ließ sich jedoch nicht bei allen Spendern beobachten. So zeigten die PBMC von Spender 6 (Abbildung 15B) trotz hoher basaler IL-1 β -Produktion keine erhöhte Zytokinfreisetzung nach BRAFi-Behandlung.

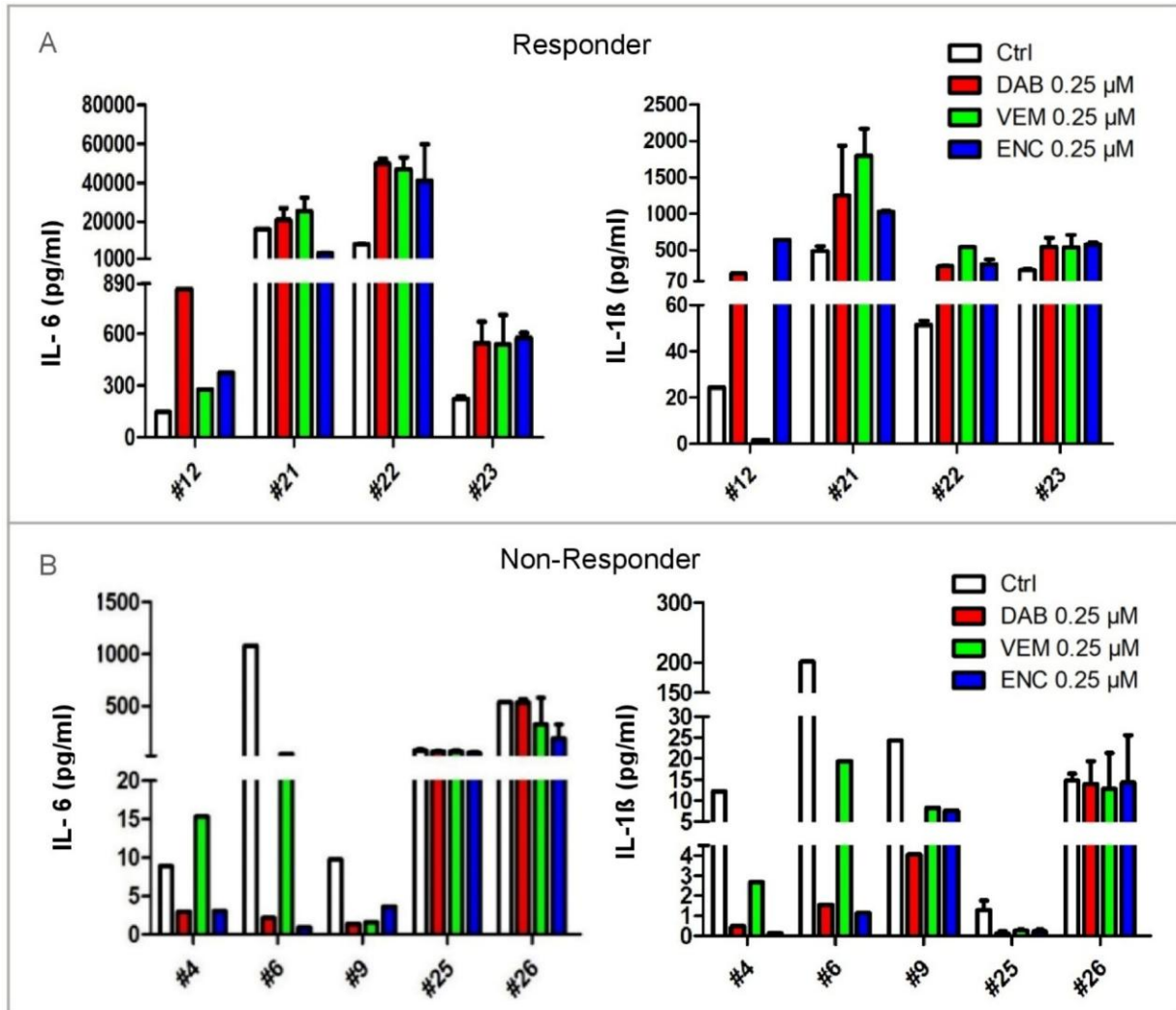


Abbildung 16: Exemplarischer Vergleich der Interleukin-(IL)-6- und IL-1 β -Sekretion in Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) von BRAFi-Respondern und BRAFi-Non-Respondern. PBMC gesunder Spender (2×10^6 /ml) wurden in 96 Well-Platten ausgesät (jeweils 50 μ l). Die Wells wurden mit 50 μ l BRAFi (Dabrafenib (DAB), Vemurafenib (VEM) und Encorafenib (ENC)) in einer Konzentration von 0.25 μ M inkubiert (37 $^{\circ}$ C, 5 % CO_2). Nach 24 h wurden die Überstände abgenommen. Die IL-1 β - und IL-6-Konzentrationen wurden durchflusszytometrisch bestimmt. Als Negativkontrolle wurden PBMC mit Dimethylsulfoxid (1%) behandelt (Ctrl). Die Daten geben den Mittelwert \pm Standardabweichung von Duplikaten (ab Spender 21 wurden die PBMC als Duplikate eingesetzt). Die Diagramme zeigen die IL-6 und IL-1 β -Produktion **(A)** der Responder #12 (36 J, M, A+); #21 (42 J, M, 0+); #22: (27 J, M, A+); #23: (39 J, W, 0+) und **(B)** der Non-Responder #4: (18 J, W, 0+); #6: (25 J, W, A+); #9: (39 J; M; 0-); #25: (64 J, M, A+) #26: (29 J; M; 0+). Angegeben sind nach der Probandennummer (#) das Alter (Jahre), das Geschlecht (F/M) und die Blutgruppe der Spender. BRAFi = v-rat fibrosarcoma (Raf) murine sarcoma viral oncogene homolog B Inhibitoren (eigene Abbildung)

Abbildung 16 zeigt, dass BRAFi vorzugsweise die IL-6-Produktion in den PBMC derjenigen Spender (#12, #21, #22 und #23) erhöhte, die auch mit einer erhöhten IL-1 β -Expression auf die BRAFi-Inkubation reagierten (Abbildung 16A). Ein ähnliches Phänomen konnte auch bei Non-Respondern (#4, #6, #9, #25 und #26) im Hinblick auf die IL-1 β -Produktion unter BRAFi-Behandlung beobachtet werden (Abbildung 16B).

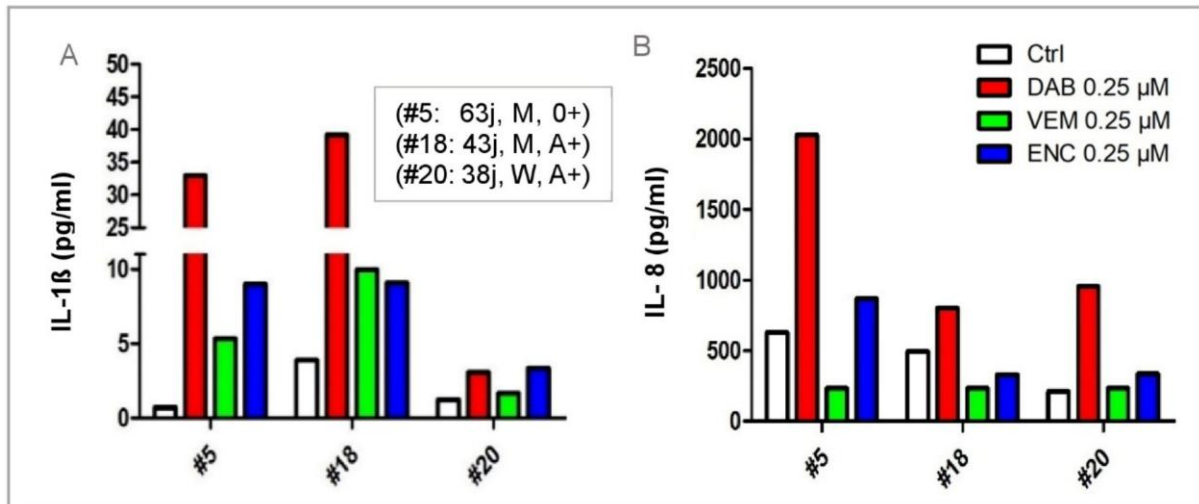


Abbildung 17: Exemplarischer Vergleich der Interleukin-(IL)-8- und IL-1 β -Sekretion in Peripheral blood mononuclear cells (PBMC). PBMC gesunder Spender (2×10^6 /ml) wurden in 96 Well-Platten ausgesät (jeweils 50 μ l). Die Wells wurden mit 50 μ l BRAFi (Dabrafenib (DAB), Vemurafenib (VEM) und Encorafenib (ENC)) in einer Konzentration von 0.25 μ M inkubiert (37 $^{\circ}$ C, 5 % CO $_2$). Nach 24 h wurden die Überstände abgenommen. Die IL-1 β - (A) und IL-8-Konzentrationen (B) wurden durchflusszytometrisch bestimmt. Als Negativkontrolle wurden PBMC mit Dimethylsulfoxid (1%) behandelt (Ctrl). Die Daten geben den Mittelwert \pm Standardabweichung von Duplikaten (ab Spender 21 wurden die PBMC als Duplikate eingesetzt). Angegeben sind nach der Probandennummer (#) das Alter (Jahre), das Geschlecht (F/M) und die Blutgruppe der Spender (eigene Abbildung).

Nach einer DAB-Applikation (0,25 μ M) zeigten vor allem die Spender mit erhöhter IL-1 β -Konzentration in den PBMC-Überständen eine verstärkte IL-8-Produktion. Abbildung 17 stellt die Daten dreier repräsentativer Spender dar, deren PBMC auf die BRAFi mit einer parallelen Erhöhung der IL-1 β - (Abbildung 17A) und IL-8-Sekretion (Abbildung 17B) reagierten. Ein paralleler Anstieg der IL-1 β - und IL-8-Sekretion war auch unter ENC-Einfluss nachweisbar. Diese trat jedoch nicht bei allen Spendern auf (#18) und war viel schwächer als nach einer DAB-Inkubation. Nach einer VEM-Inkubation konnte eine solche Korrelation nicht nachgewiesen werden.

4.2 Der Einfluss von BRAFi und/oder MEKi auf die Zytokinproduktion IL-1 β , IL-6 und IL-8 von MO-DC

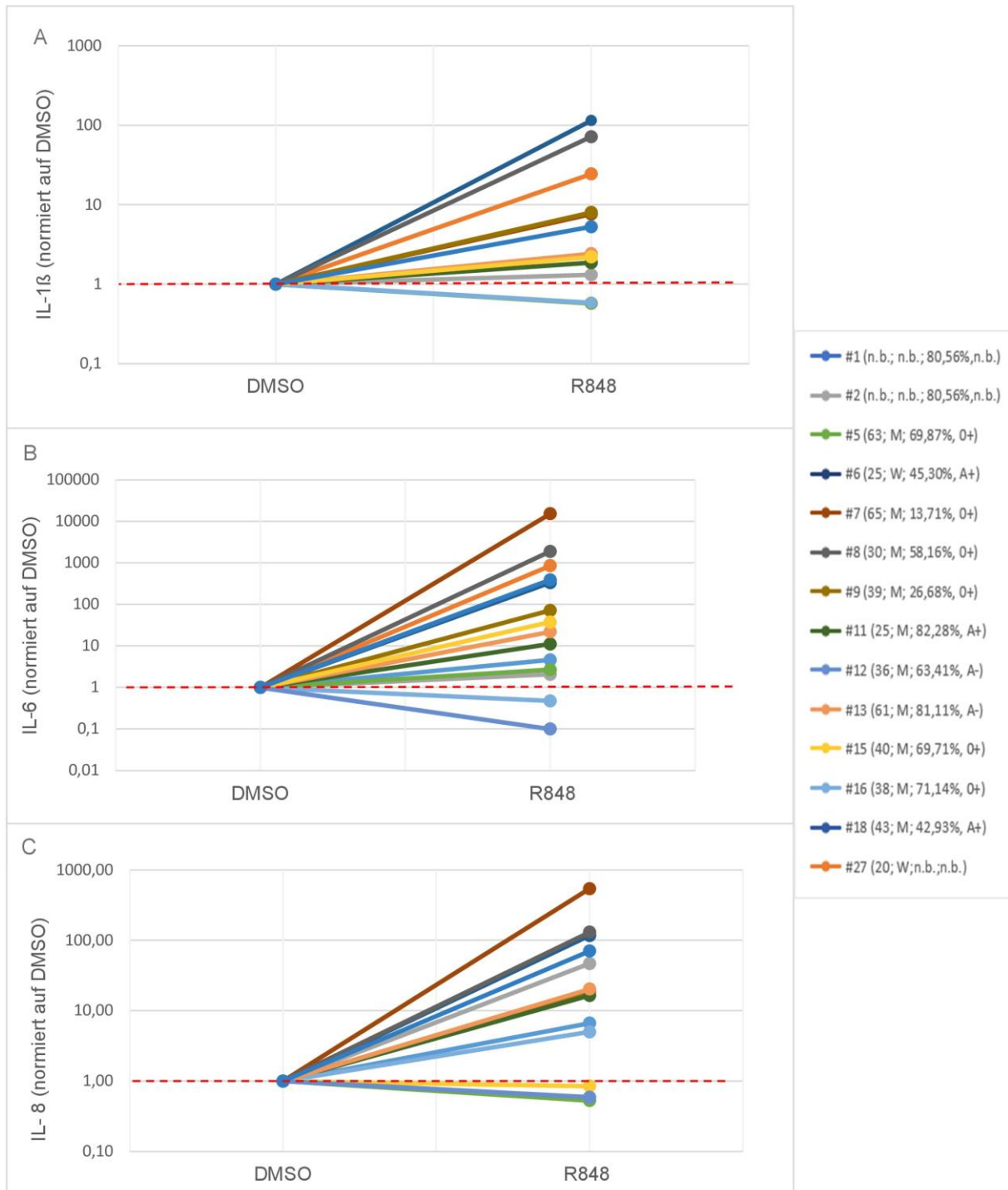


Abbildung 18: Einfluss von Resiquimod (R848) auf die Interleukin-(IL)-1 β , IL-6- und IL-8-Sekretion in Monocyte derived dendritic cells (MO-DC). Von 14 Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) Spendern wurden durch Plastikadhäsion Monozyten von den restlichen Zellen separiert und 6 d lang jeden zweiten Tag mit 11 μ l IL-4/ Granulocyte-colony-stimulating-factor (GM-CSF) (20 ng/ml) behandelt. Die gewonnenen MO-DC (2 x 10⁶ Zellen/ml) wurden mit 1 μ g/ml R848 (50 μ l) über Nacht behandelt (37 °C, 5 % CO₂). Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden die Überstände abgenommen. Mittels Cytometric Bead Array (CBA) wurde die IL-1 β - (A), IL-6- (B) und IL-8-Produktion (C) gemessen. Angegeben sind nach der Probandennummer (#) das Alter (Jahre), das Geschlecht (F/M), der Anteil der CD14- CD1c+ Zellen (in %) und die Blutgruppe der Spender. („n.b.“= nicht bekannte Angaben). Als Negativkontrolle wurden PBMC mit Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelt. Das Diagramm zeigt die IL-Konzentrationen normiert auf die Konzentration in der DMSO-Kontrolle (eigene Abbildung).

DC sind antigenpräsentierende Zellen, die oft bei Studien entweder durch *in vivo* Targeting oder durch Beladung mit Antigen *ex vivo* eingesetzt werden (270,271). Da der RAS/RAF/MEK/ERK-MAPK-Signalweg eine regulatorische Rolle in verschiedenen Immunzellen spielt, können Kinase-Inhibitoren deren Funktion unterschiedlich beeinflussen (272). Daher wurde in der vorliegenden Studie der Einfluss einer BRAFi- und/oder MEKi-Stimulation auf die Zytokinproduktion von DC *in vitro* untersucht. Die MO-DC wurden aus den PBMC von 14 Spendern mittels Plastikadhärenz und anschließender Behandlung mit IL-4 und GM-CSF generiert (siehe Kapitel 3.2.4).

Ähnlich wie bei den PBMC (Abbildung 11) erhöhte eine Inkubation der MO-DC mit R848 in den meisten Fällen zu einer erhöhten Sekretion von IL-1 β , IL-6 und IL-8 (Abbildung 18). Im Vergleich zu den PBMC fiel der stimulierende Effekt von R848 bei den MO-DC deutlich geringer aus. Zudem lag die Sekretion von IL-1 β bei den meisten MO-DC-Spendern nach einer nächtlichen Kultivierung unterhalb der Nachweisgrenze (siehe Anhang Abbildung 30A).

4.2.1 Der Einfluss von BRAFi und/oder MEKi auf die IL-6 Produktion von MO-DC

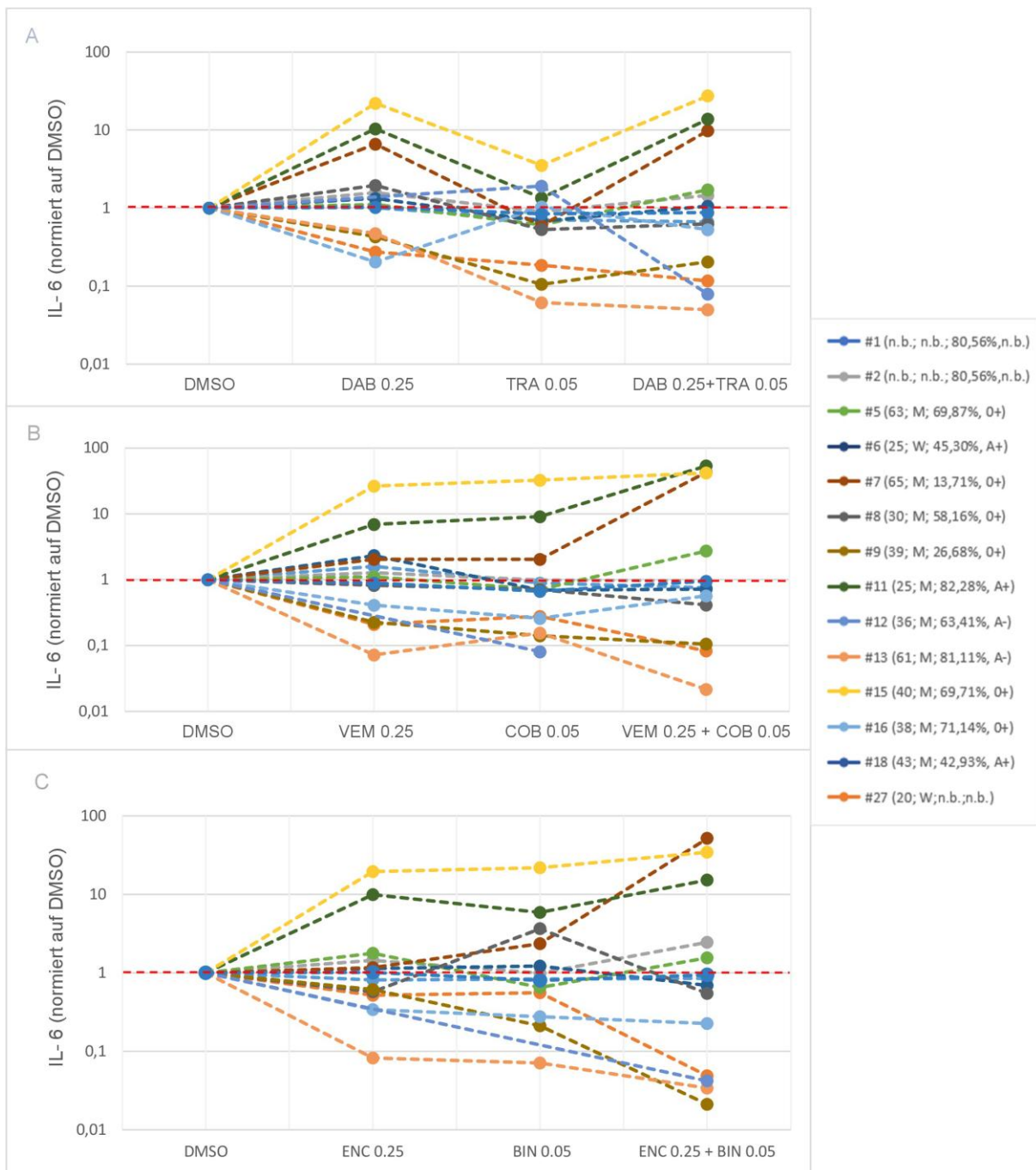


Abbildung 19: Einfluss von BRAFi und/oder MEKi auf die Interleukin-(IL)-6-Sekretion in Monocyte derived dendritic cells (MO-DC). Von 14 Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) Spendern wurden durch Plastikadhäsion Monozyten von den restlichen Zellen separiert und 6 d lang jeden zweiten Tag mit 11 μ l IL-4/Granulocyte-colony-stimulating-factor (GM-CSF) (20 ng/ml) behandelt. Die gewonnenen MO-DC (2×10^6 Zellen/ml) wurden mit 50 μ l einer BRAFi- (0.05 μ M), MEKi- (0.25 μ M) bzw. BRAFi (0.05 μ M) + MEKi (0.25 μ M) Lösung über Nacht behandelt (37 °C, 5 % CO₂): **(A)** Dabrafenib (DAB), Trametinib (TRA) bzw. DAB + TRA; **(B)** Vemurafenib (VEM), Binimetinib (BIN) bzw. VEM+ BIN; **(C)** Encorafenib (ENC), Cobimetinib (COB) bzw. ENC + COB). Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden die Überstände abgenommen. Mittels Cytometric Bead Array (CBA) wurde die IL-6-Produktion gemessen. Angegeben sind nach der Probandennummer (#) das Alter (Jahre), das Geschlecht (F/M), der Anteil der CD14- CD1c+ Zellen (in %) und die Blutgruppe der Spender. („n.b.“= nicht bekannte Angaben). Als Negativkontrolle wurden PBMC mit Dimethylsulfoxid (DMSO) (1 %) behandelt. Das Diagramm zeigt die IL-6-Konzentrationen (logarithmische Darstellung) normiert auf die Konzentration in der DMSO-Kontrolle. BRAFi = v-rat fibrosarcoma (Raf) murine sarcoma viral oncogene homolog B Inhibitor; MEKi = Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase (eigene Abbildung).

Zur Analyse des Einflusses von BRAFi und/oder MEKi auf die IL-6-Sekretion von MO-DC wurden die Zellen mit MAPKi (Abbildung 19) inkubiert. Die MO-DC zeigten eine divergente IL-6-Expression als Reaktion auf die BRAFi/MEKi-Behandlung ohne ein erkennbares Muster. Nur bei einem Teil der MO-DC-Spender kam es infolge der Behandlung zu einer erhöhten IL-6-Expression. Beispielsweise zeigten die mit DAB, VEM und ENC behandelten MO-DC der Spender 11 und 15 im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle eine erhöhte IL-6-Expression. Eine Inkubation der Zellen mit dem MEKi TRA (Abbildung 19A) zeigte – im Gegensatz zu einer Behandlung mit COB oder BIN – keinen Effekt. Die BRAFi/MEKi-Kombinationsbehandlungen führten hingegen zu einer verstärkten IL-6-Sekretion. Im Gegensatz dazu zeigten die MO-DC von Spender 18 kaum eine Reaktion auf die MAPKi. Bei den MO-DC der Spender 13 und 16 führte die Behandlung mit MAPKi zu einer Abnahme der IL-6-Expression.

4.2.2 Der Einfluss von BRAFi und/oder MEKi auf die IL-8 Produktion von MO-DC

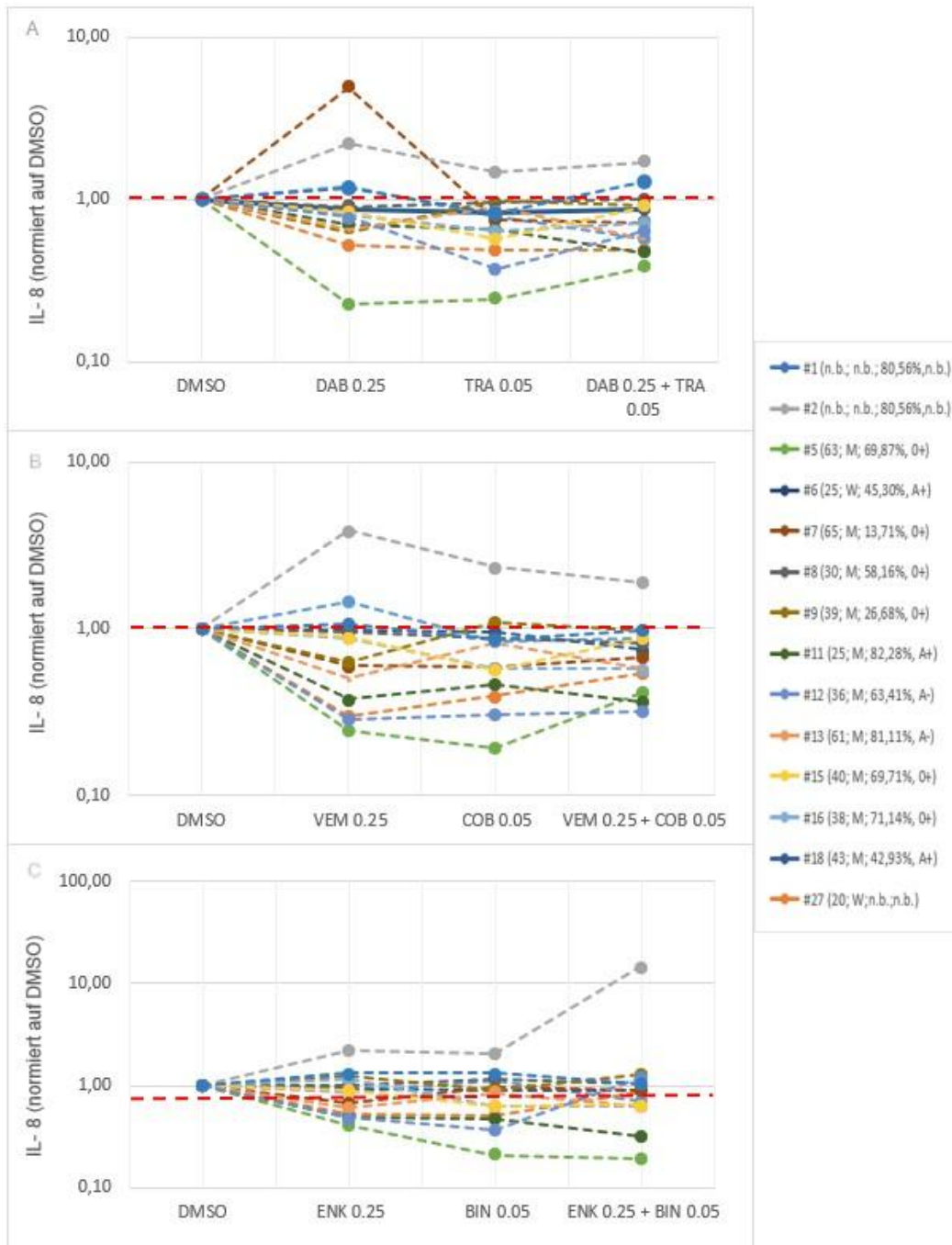


Abbildung 20: Einfluss von BRAFi und/oder MEKi auf die Interleukin-(IL)-8-Sekretion in Monocyte derived dendritic cells (MO-DC). Von 14 Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) Spendern wurden durch Plastikadhäsion Monozyten von den restlichen Zellen separiert und 6 d lang jeden zweiten Tag mit $11 \mu\text{l}$ IL-4/Granulocyte-colony-stimulating-factor (GM-CSF) (20 ng/ml) behandelt. Die gewonnenen MO-DC (2×10^6 Zellen/ml) wurden mit $50 \mu\text{l}$ einer BRAFi- ($0.05 \mu\text{M}$), MEKi- ($0.25 \mu\text{M}$) bzw. BRAFi ($0.05 \mu\text{M}$) + MEKi ($0.25 \mu\text{M}$) Lösung über Nacht behandelt (37°C , $5\% \text{ CO}_2$): **(A)** Dabrafenib (DAB), Trametinib (TRA) bzw. DAB + TRA; **(B)** Vemurafenib (VEM), Binimetinib (BIN) bzw. VEM+ BIN; **(C)** Encorafenib (ENC), Cobimetinib (COB) bzw. ENC + COB). Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden die Überstände abgenommen. Mittels Cytometric Bead Array (CBA) wurde die IL-8-Produktion gemessen. Angegeben sind nach der Probandennummer (#) das Alter (Jahre), das Geschlecht (F/M), der Anteil der CD14- CD1c+ Zellen (in %) und die Blutgruppe der Spender. („n.b.“= nicht bekannte Angaben). Als Negativkontrolle wurden PBMC mit Dimethylsulfoxid (DMSO) (1%) behandelt. Das Diagramm zeigt die IL-8-Konzentrationen (logarithmische Darstellung) normiert auf die DMSO-Kontrolle. BRAFi = v-rat fibrosarcoma (Raf) murine sarcoma viral oncogene homolog B Inhibitor; MEKi = Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase (eigene Abbildung).

Ähnlich wie bei der IL-6-Sekretion (Abbildung 19) zeigte nur ein kleiner Teil der Spender eine behandlungsabhängige Hochregulation von IL-8 (Abbildung 20). Insgesamt exprimierten MO-DC im Vergleich zu PBMC in den Ansätzen mit DMSO und R848 deutlich geringere Mengen an IL-8 (Abbildung 11).

4.3 Der Effekt von BRAFi und/oder MEKi auf die PBMC/Melanomzell-Kokulturen

4.3.1 Der Effekt von BRAFi und/oder MEKi auf die Viabilität von PBMC/Melanomzell-Kokulturen

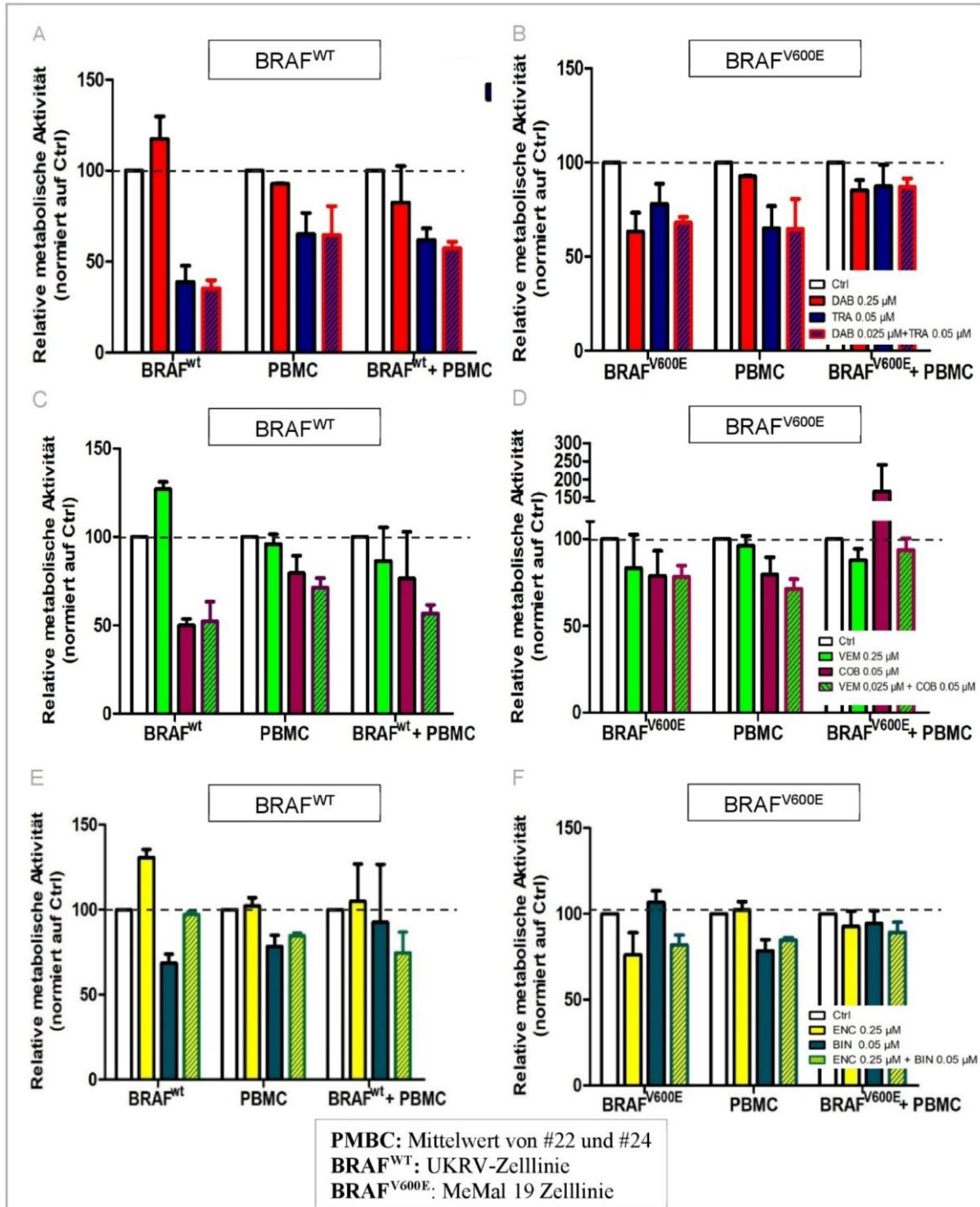


Abbildung 21: Einfluss von BRAFi und/oder MEKi auf die Zellviabilität von BRAF^{WT}-Melanomzellen und BRAF^{V600E}-Melanomzellen. Gezeigt ist der Effekt von BRAFi/MEKi auf die Zellviabilität der Zelllinien UKRV (BRAF^{WT}-Melanomzellen, A, C, E) und MeMal 19 (BRAF^{V600E}-Melanomzellen, B, D, F) in Monokultur, auf Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (Mittelwerte der Spender #22: 27 J, M, A+ und 24: 19 J, W, 0+) und auf PBMC/Melanomzell-Kokulturen. (A, B) Dabrafenib (DAB), Trametinib (TRA) bzw. DAB + TRA; (C, D) Vemurafenib (VEM), Binimetinib (BIN) bzw. VEM+ BIN; (E, F) Encorafenib (ENC), Cobimetinib (COB) bzw. ENC + COB). Das Diagramm zeigt die relative metabolische Aktivität der Ansätze normiert auf den Kontrollansatz (Ctrl = 100 %). Dargestellt sind die Werte der Duplikate ± Standardabweichung.

Zur Analyse der Auswirkungen von BRAFi und MEKi auf die Zellviabilität von BRAF^{WT}-Melanomzellen (UKRV, Abbildung 21A, -C -E) und BRAF^{V600E}-Melanomzellen (MeMal 19, Abbildung 21B, -D, -F) wurden MTT-Assays durchgeführt. Nach der Inkubation mit den BRAFi und MEKi wurden jeweils 100 µl der Kulturen mit 25 µl MTT-Lösung für 4 h im Dunkeln inkubiert (37 °C, 5 % CO₂) und anschließend mit 100 µl Solubilisierungspuffer behandelt. Aufgrund stark streuender Werte bei den PBMC-Spendern wurden die Mittelwerte zweier Spender (#22 und #24) dargestellt. Nach der Inkubation mit den BRAFi und MEKi wurden jeweils 100 µl der Kulturen mit 25 µl MTT-Lösung für 4 h im Dunkeln inkubiert (37 °C, 5 % CO₂) und anschließend mit 100 µl Solubilisierungspuffer behandelt (siehe Methoden Kapitel 3.2.5).

Eine Inkubation mit BRAFi (Abbildung 21A, -C, E) beeinflusste die Viabilität der BRAF^{WT} Melanomzellen (UKRV) in keinem der getesteten Ansätze. Dagegen führte eine Behandlung mit MEKi zu einer verminderten Zellviabilität.

Im Gegensatz zu BRAF^{WT}-Zelllinien, zeigten die UKRV/PBMC-Kokulturen eine verminderte Zellviabilität unter BRAFi-Behandlung (DAB und VEM). Die BRAF^{WT}/PBMC-Kokulturen reagierten empfindlicher auf die MEK-Inhibition, insbesondere bei Kombination mit BRAFi. Bei der BRAF^{V600E}-mutierten Zelllinie MeMal 19 zeigte sich im MTT-Assay eine deutliche Reduktion der Zellviabilität nach BRAFi-Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Zudem war die metabolische Aktivität im Vergleich zur Lösungskontrolle auch unter MEKi leicht reduziert, was auf eine Inhibition der Proliferationsrate durch die Behandlung hinweist (Abbildung 21B, -D, -F). Binimetinib (Abbildung 21F) zeigte in diesem Experiment keinen vergleichbaren Effekt auf die BRAF^{V600E} Melanomzellen zu haben. Im Vergleich zwischen den BRAF^{WT}/PBMC- und den BRAF^{V600E}/PBMC-Kokulturen zeigte die MAPKi-Behandlung auf die Viabilität der mutierten Zellen nahezu keinen Effekt, während bei UKRV/#26 ein deutlicher Rückgang beobachtet wurde.

4.3.2 Der Einfluss von BRAFi und/oder MEKi auf die IL-1 β -Expression in PBMC/BRAF^{V600E}-Melanomzell-Kokulturen

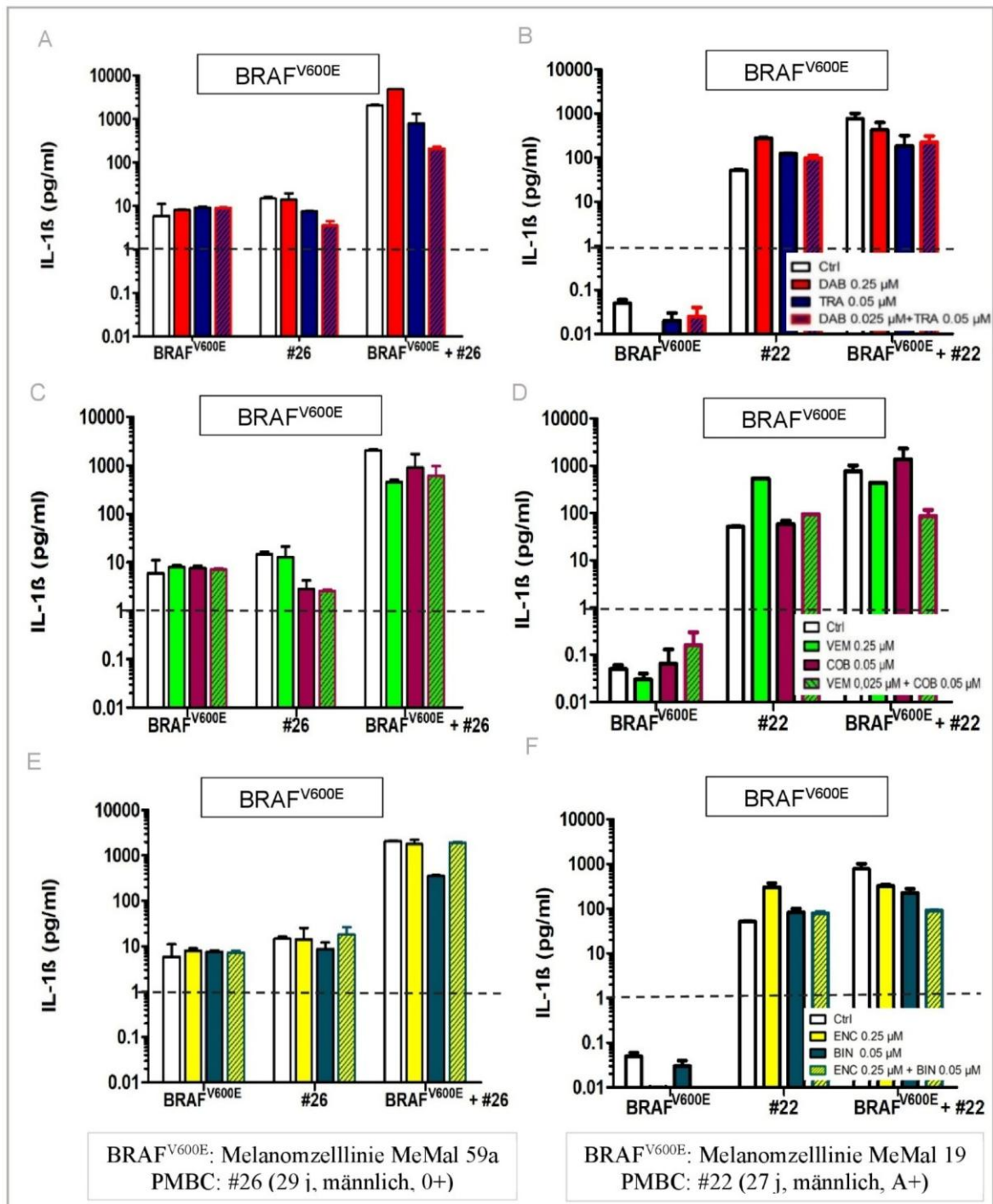


Abbildung 22: Einfluss von BRAFi und/oder MEKi auf die Interleukin-(IL)-1 β -Sekretion in PBMC- bzw. BRAF^{V600E}-Melanomzell-Monokulturen sowie in PBMC/BRAF^{V600E}-Melanom-Zell-Kokulturen. Humane BRAF^{V600E}-Melanom-Zelllinien (MeMal 59a: A, C, E; MeMal 19: (B, D, F) wurden in einer Konzentration von 2×10^5 /ml in 96-Well-Platten ausplattiert und mit BRAFi- (0.05 μ M), MEKi- (0.25 μ M) bzw. BRAFi (0.05 μ M) + MEKi (0.25 μ M) Lösung behandelt: (A, B) Dabrafenib (DAB), Trametinib (TRA) bzw. DAB + TRA; (C, D) Vemurafenib (VEM), Binimetinib (BIN) bzw. VEM+ BIN; (E, F) Encorafenib (ENC), Cobimetinib (COB) bzw. ENC + COB. Danach wurden den Ansätzen Peripheral blood mononuclear cells (PBMC, 2×10^7 /ml in 50 μ l; MeMal 19 Spender #22: 27 Jahre alt, männlich, Blutgruppe A+) / MeMal 59a #26: 29 Jahre alt, männlich, Blutgruppe 0+) zugefügt. Die Kokulturen wurden für 48 h im Brutschrank (37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂) inkubiert. Mittels Cytometric Bead Array (CBA) wurde die IL-1 β -Produktion bestimmt. Dimethylsulfoxid (DMSO, 1%) wurde als Lösungsmittelkontrolle (Ctrl) verwendet. Die Daten sind logarithmisch dargestellt. BRAFi = v-rat fibrosarcoma (Raf) murine sarcoma viral oncogene homolog B Inhibitor; MEKi = Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase (eigene Abbildung).

Zwei BRAF^{V600E}-Melanomzelllinien (MeMal 19 und MeMal 59a) wurden mit PBMC von zwei gesunden Spendern kokultiviert.

Im Gegensatz zur Veränderung der IL-1 β -Expression in BRAF^{V600E}-Melanomzell/PBMC-Kokulturen unter DAB (Abbildung 22A, -E) zeigte die BRAFi-Applikation bei PBMC von Spender 26 (*Non-Responder*) keinen Einfluss auf die IL-1 β -Produktion. Sowohl in der MeMal 59a/PBMC#26-Kokultur als auch in den PBMC#26-Monokulturen (Abbildung B; -D, -F) wurde die IL-1 β -Sekretion durch MEKi deutlich unterdrückt. Eine MEK-Inhibition in den BRAF^{V600E}-Zelllinien selbst wurde nicht beobachtet.

Die IL-1 β -Sekretion in der MeMal-19-Zelllinie (Abbildung 22B, -D, -F) lag unterhalb der Nachweisgrenze (10 pg/ml). Obwohl Spender 22 (PBMC) als Responder eingestuft wurde, zeigten die PBMC/MeMal-19-Kokulturen eine verminderte IL-1 β -Expression im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. Während nach Applikation von TRA und BIN keine Erhöhung der IL-1 β -Sekretion nachgewiesen wurde, zeigte die MeMal-19/PBMC-Kokultur unter COB eine verstärkte Produktion.

Interessanterweise war die IL-1 β -Sekretion in den Kokulturen – unabhängig von der Responsivität der PBMC gegenüber BRAFi – derjenigen in den Monokulturen deutlich überlegen (siehe Diskussion 5.7).

4.3.3 Der Einfluss von BRAFi und/oder MEKi auf die IL-6-Expression in PBMC/BRAF^{V600E}-Melanomzell- und PBMC/BRAF^{WT}-Melanomzell-Kokulturen

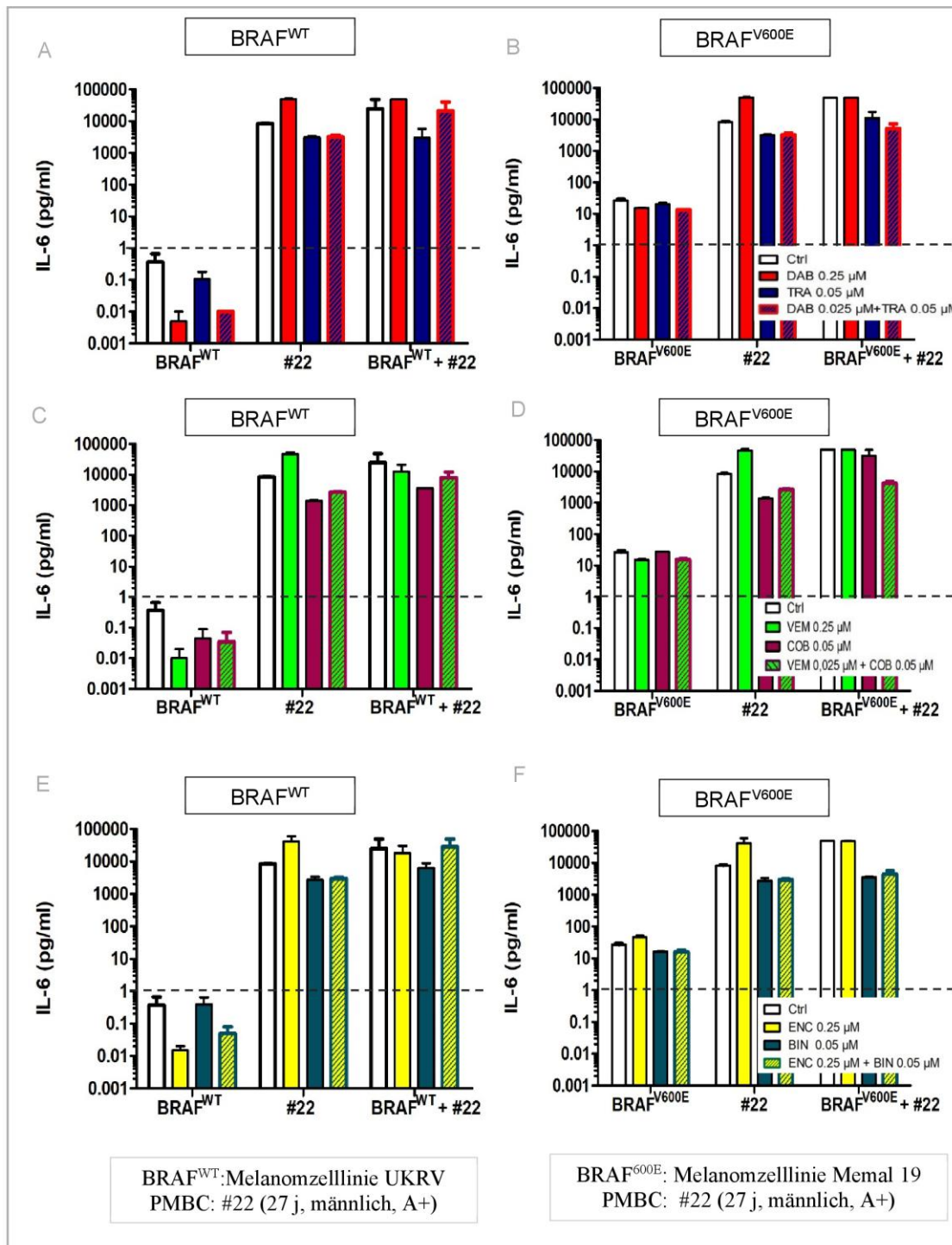


Abbildung 23: Einfluss von BRAFi und/oder MEKi auf die Interleukin-(IL)-6-Sekretion in PBMC- bzw. BRAF^{V600E}- bzw. BRAF^{WT}-Melanomzell-Monokulturen sowie in PBMC/Melanomzell-Kokulturen. Humane BRAF^{WT}- (UKRV: A, C, E) und BRAF^{V600E}- (MeMal 19: B, D, F) Zellen wurden in einer Konzentration von 2×10^5 /ml in 96-Well-Platten ausplattiert und mit BRAFi- (0.05 μM), MEKi- (0.25 μM) bzw. BRAFi (0.05 μM) + MEKi (0.25 μM) Lösung behandelt: (A, B) Dabrafenib (DAB), Trametinib (TRA) bzw. DAB + TRA; (C, D) Vemurafenib (VEM), Binimetinib (BIN) bzw. VEM+ BIN; (E, F) Encorafenib (ENC), Cobimetinib (COB) bzw. ENC + COB). Danach wurden den Ansätzen Peripheral blood mononuclear cells (PBMC), 2×10^7 /ml in 50 μl; Spender #22: 27 Jahre alt, männlich, Blutgruppe A+) zugefügt. Die Kokulturen wurden für 48 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Mittels Cytometric Bead Array (CBA) wurde die IL-6-Produktion bestimmt. Dimethylsulfoxid (DMSO, 1%) wurde als Lösungsmittelkontrolle (Ctrl) verwendet. Die Daten sind logarithmisch dargestellt. BRAFi = v-rat fibrosarcoma (Raf)

murine sarcoma viral oncogene homolog B Inhibitor; MEKi = Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase (eigene Abbildung).

Zur Analyse des Effekts der MAPKi auf die IL-6-Sekretion in Melanomzell-Monokulturen und Melanomzell/PBMC-Kokulturen wurden PBMC gesunder Spender sowie die BRAF^{V600E}-Melanomzelllinie MeMal 19 bzw. die BRAF^{WT}-Zelllinie UKRV verwendet.

Während die BRAF^{WT}-Melanom-Zelllinie auf eine BRAFi-Applikation mit einer verminderten IL-6-Expression reagierte (Abbildung 23A, -C, -E), zeigte die BRAF^{V600E}-Melanomzelllinie nahezu keine Veränderung (Abb. 23B, -D, -F). Des Weiteren inhibierte eine parallele Gabe von BRAFi und MEKi anders als eine alleinige BRAFi-Gabe in BRAF^{V600E}-Melanom-Zell/PBMC-Kokulturen deutlich die IL-6 Zytokinproduktion (Abbildung 23B, -D, -F). Die BRAF^{WT}-Melanom-Zell/PBMC-Kokulturen reagierten weder auf eine BRAFi-Monotherapie noch auf eine BRAFi/MEKi-Kombinationstherapie mit einer Reduktion der IL-6-Expression (Abbildung 23A, -C, -E). Die IL-6-Sekretion wird bei beiden PBMC-Spendern durch jedes BRAFi-Agens induziert. In BRAF^{WT}-Melanomzell/PBMC-Kokulturen zeigte sich, dass die IL-6-Produktion durch MEKi stärker moduliert wurde als durch die Kombinationstherapie mit BRAFi und MEKi (Abbildung 23A, -C, -E).

4.3.4 Der Einfluss von BRAFi und/oder MEKi auf die IL-8-Expression in PBMC/BRAF^{V600E}-Melanomzell- und PBMC/BRAF^{WT}-Melanomzell-Kokulturen

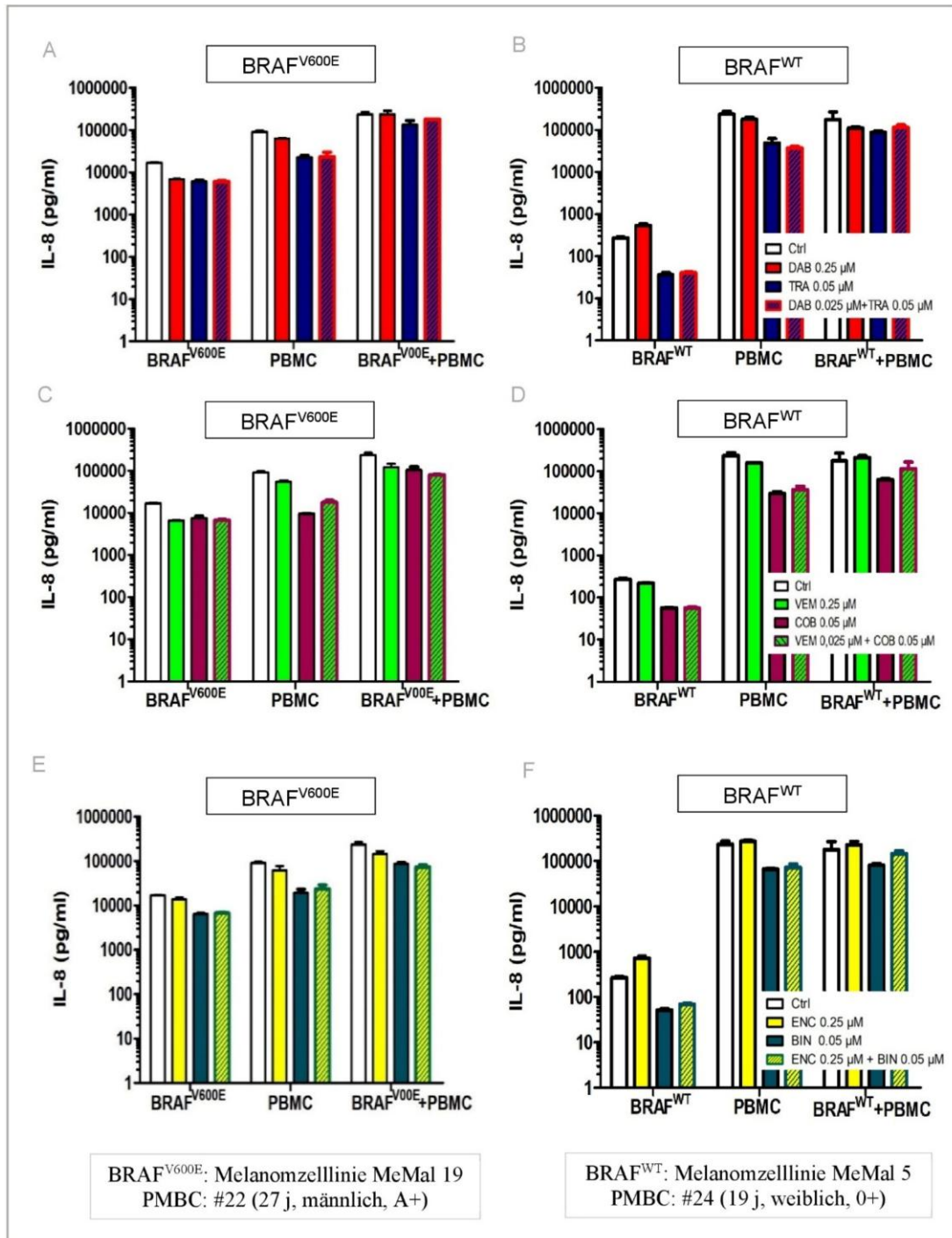


Abbildung 24: Einfluss von BRAFi und/oder MEKi auf die Interleukin-(IL)-8-Sekretion in PBMC- bzw. BRAF^{V600E}- bzw. BRAF^{WT}-Melanomzell-Monokulturen sowie in PBMC/Melanomzell-Kokulturen. Humane BRAF^{V600E}- (MeMal 19: A, C, E) und BRAF^{WT}- (MeMal 5: B, D, F) Zellen wurden in einer Konzentration von 2 x 10⁵/ml in 96-Well-Platten ausplattiert und mit BRAFi- (0.05 μM), MEKi- (0.25 μM) bzw. BRAFi (0.05 μM) + MEKi (0.25 μM) Lösung behandelt: **(A, B)** Dabrafenib (DAB), Trametinib (TRA) bzw. DAB + TRA; **(C, D)** Vemurafenib (VEM), Binimetinib (BIN) bzw. VEM+ BIN; **(E, F)** Encorafenib (ENC), Cobimetinib (COB) bzw. ENC + COB. Danach wurden den Ansätzen Peripheral blood mononuclear cells ((PBMC), 2 x 10⁷/ml in 50 μl; Spender #22: 27 Jahre alt, männlich, Blutgruppe A+; #24: 19 Jahre alt, männlich, Blutgruppe 0+) zugefügt. Die Kokulturen wurden für 48 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Mittels Cytometric Bead Array (CBA) wurde die IL-8-Produktion bestimmt. Dimethylsulfoxid (DMSO, 1%) wurde als Lösungsmittelkontrolle (Ctrl) verwendet. Die Daten sind logarithmisch dargestellt. BRAFi = v-rat fibrosarcoma (Raf) murine sarcoma viral oncogene homolog B Inhibitor; MEKi = Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase (eigene Abbildung).

Zur Analyse des Effekts der MAPKi auf die IL-8-Sekretion in Melanomzell-Monokulturen und Melanomzell/PBMC-Kokulturen wurden PBMC gesunder Spender sowie die BRAF^{V600E}-Melanomzelllinie MeMal 19 bzw. die BRAF^{WT}-Zelllinie MeMal 5 verwendet.

Eine BRAFi-Gabe führte bei BRAF^{WT}-Melanomzelllinien zu einer erhöhten IL-8-Sekretion; dieser Effekt war unter DAB und ENC stärker ausgeprägt (Abbildung 24B, -F) als unter VEM (Abbildung 24D). Im Gegensatz dazu zeigten BRAFi bei der BRAF^{V600E}-Melanomzelllinie MeMal 19 keine vergleichbare Wirkung (Abbildung 24A; -C, -E). Zudem zeigte sich bei der BRAF^{WT}-Melanomzelllinie (MeMal 5) eine Hemmung der IL-8-Produktion durch MEKi bei allen getesteten Agenzien, während bei der BRAF^{V600E}-Zelllinie keine Veränderung beobachtet wurde.

5 Diskussion

5.1 Auswirkungen von BRAFi und/oder MEKi auf die Interleukinproduktion von humanen Immunzellen

Proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β (269), IL-6 (273) und IL-8 (274) spielen eine wesentliche Rolle bei der Initiierung und Progression verschiedener Tumorentitäten (z. B. Mammakarzinom, Kolonkarzinom, Prostatakarzinom, malignes Melanom). Ihre Expression korreliert häufig mit dem Tumorstadium. Potenzielle *Off-Target*-Effekte von BRAFi und MEKi könnten die Produktion von Zytokinen in humanen Immunzellen und in der TME beeinflussen. Die Interaktion zwischen den durch die MAPK-gerichtete Therapie induzierten Entzündungsmediatoren, Tumorzellen und der TME scheint für die Modulation der antitumoralen Immunantwort von großer Relevanz zu sein.

5.1.1 Auswirkungen von BRAFi und/oder MEKi auf die IL-1 β -Produktion von humanen Immunzellen

IL-1 β kann die Tumorinduktion und -ausbreitung fördern. In diesem Kontext ist die in der vorliegenden Arbeit und in anderen Studien nachgewiesene Induktion der IL-1 β -Produktion durch antitumoröse Therapien von besonderem Interesse (261). Darüber hinaus sind langfristig erhöhte IL-1 β -Spiegel bei chronischen Entzündungen an der Entstehung verschiedener solider Tumoren beteiligt (275, 276). Frauen mit einem Polymorphismus im Gen für den IL-1-Rezeptor Antagonist (IL1RN-VTNR) zeigen in verschiedenen ethnischen Gruppen eine erhöhte Anfälligkeit für Gebärmutterhalskrebs (277). In Indien erhöhen sowohl der IL1RN-VTNR-Polymorphismus als auch die IL-1 β -511T-Mutation unabhängig voneinander das Risiko für Gebärmutterhalskrebs (278). Bei betroffenen Frauen besteht ein Zusammenhang zwischen erhöhten IL-1 β -Plasmaspiegeln und bestimmten IL-1 β -Genotypen.

Zudem ist IL-1 β für die Auslösung angeborener Immunantworten und die Gestaltung adaptiver Immunreaktionen zur Bekämpfung akuter Entzündungen unerlässlich (279). Allerdings können *Gain-of-Function*-Mutationen in Inflammasom-Komponenten zu einer übermäßigen IL-1 β -Produktion führen, was zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen beitragen kann (280). Daher können erhöhte basale IL-1 β -Konzentrationen auch auf aktive Entzündungsprozesse oder Autoimmunerkrankungen hinweisen. Zukünftig könnte diese Annahme überprüft werden, indem Entzündungsmarker (z. B. C-reaktives Protein (CRP), Leukozyten) im Serum der Spender analysiert und relevante Vorerkrankungen erfragt werden.

Die IL-1 β -Überexpression wird teilweise auf eine Amplifikation des IL-1 β -Gens zurückgeführt. Darüber hinaus ist bekannt, dass weitere bislang unbekannte Ursachen – darunter allelische Unterschiede – zur erhöhten Produktion beitragen können (281). Kleine Variationen in den IL-1 β -Gensequenzen könnten die IL-1 β -Genexpression beeinflussen. Zu den potenziellen

Regionen, in denen Sequenzunterschiede die IL-1 β -Genexpression direkt beeinflussen, zählen neben dem Promotorbereich (z. B. der TATA-Box) und der Enhancer-Region des IL-1 β -Gens auch Abschnitte, die den Spleißmechanismus oder die Effizienz des prä-mRNA-Spleißens betreffen. Darüber wirken sich auch strukturelle Veränderungen im Genom (z. B. Methylierung, Chromatin-Veränderungen) auf das Ausmaß der Expression aus (281).

5.1.2 IL-1 β -Polymorphismen als mögliche Ursache für spenderabhängige BRAF-Responsivität und erhöhte Basalkonzentrationen

Die Identifikation von IL-1 β -Polymorphismen stellt zudem einen pharmakologisch relevanten Faktor dar, der potenziell zur Optimierung der Sicherheit und Wirksamkeit der Melanomtherapie beitragen kann. In diesem Zusammenhang steht die Möglichkeit im Fokus, Nebenwirkungen – etwa DAB-induzierte Pyrexie oder VEM-induzierte Phototoxizität (möglicherweise vermittelt durch andere Interleukine) – vorherzusagen und zu vermeiden.

Die vorliegende Arbeit ergab eine heterogene Reaktion der PBMC verschiedener Spender auf die Behandlung mit BRAF-Inhibitoren (BRAFi) (s. Abbildung 12 u. Abbildung 29A). Bei acht von 27 Spendern wurde eine erhöhte basale IL-1 β -Konzentration festgestellt. Nach der Behandlung mit BRAFi (DAB, VEM oder ENC, jeweils 0.25 μ M) zeigten die PBMC einiger Spender eine verstärkte IL-1 β -Sekretion, während bei anderen keine Veränderung beobachtet wurde (vgl. Abbildung 12). Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die Spender in zwei Gruppen eingeteilt: IL-1 β -*Responder* und IL-1 β -*Non-Responder*. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen von Young *et al.*, die in ihrer Studie eine ähnliche Variabilität feststellten. In Melanom-Biopsien von Patienten, die mit BRAFi behandelt wurden, war nur bei etwa der Hälfte eine erhöhte IL-1 β -mRNA-Expression nachweisbar (155).

In der vorliegenden Studie zeigten elf der 27 Spender eine erhöhte IL-1 β -Sekretion nach DAB-Behandlung (0.25 μ M); unter VEM (0.25 μ M) waren es sieben, und unter ENC (0.25 μ M) acht Spender (vgl. Abbildung 26).

Die Tatsache, dass R848 als potenter TLR7/8-Agonist bei den allermeisten Spendern IL-1 β induziert, bestätigt (vgl. Abbildung 11), dass bei den Probanden keine Defizienz in der Zytokininduktion vorlag.

Das Vorkommen basal detektierbarer IL-1 β -Konzentration nur bei bestimmten Spendern sowie die individuelle Responsivität gegenüber BRAFi könnten auf Polymorphismen im IL-1 β -Genlocus (282) oder in den Bestandteilen des Inflammasoms (283) hinweisen. Verschiedene Studien zeigen, dass bestimmte Allele im Kernbereich des IL-1-Gens (z. B. SNP B15 TT>CC) sowie im proximalen Promotorbereich (SNP B14 TT>CC) mit einer gesteigerten IL-1-Expression assoziiert sind und dass diese Varianten mit einer erhöhten Anfälligkeit für verschiedene Erkrankungen oder einem schwereren Krankheitsverlauf korrelieren. Dazu

zählen Infektionskrankheiten wie Tuberkulose (284), autoimmune und autoinflammatorische Erkrankungen wie Psoriasis (285) sowie Tumorerkrankungen wie Prostatakrebs (286) (269).

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den klinisch beobachteten Nebenwirkungen von DAB, das bei etwa 40–50 % der Patienten Fieber auslöst (287). Das proinflammatorische Zytokin IL-1 β besitzt eine ausgeprägte pyrogene Aktivität (288). Möglicherweise hängt die Pyrexie mit einem IL-1 β -induzierenden Mechanismus von BRAFi bei bestimmten Polymorphismen im IL-1 β -Gen zusammen. Eine Studie zur möglichen Assoziation zwischen SNPs in der IL-1 β -Promoterregion und der DAB-induzierten IL-1 β -Produktion ergab keinen signifikanten Zusammenhang (289). Kulkarni *et al.* führten eine genomweite Genotypisierung von 1006 Melanompatienten durch, die mit DAB behandelt wurden, mit dem Ziel, mögliche Zusammenhänge zwischen SNPs bzw. HLA-Allelen und der DAB-induzierten Pyrexie zu identifizieren. Die Analyse von sechs Millionen SNPs und 150 HLA-Allelen ergab keine signifikante Assoziation (290).

5.1.3 BRAFi als Koaktivator der IL-1 β Stimulation

In der vorliegenden Untersuchung zählten die Spender mit einer bereits unter Basalbedingungen detektierbaren IL-1 β -Expression bevorzugt zu den *Respondern* (Abbildung 15). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die IL-1 β -Expression nicht ausschließlich durch BRAFi induziert wird, sondern dass BRAFi in diesem Kontext eher als Koaktivatoren fungieren.

Die Bestandteile des Inflammasoms sind potenzielle molekulare Ziele, die für die Erhöhung der IL-1 β -Produktion durch BRAFi verantwortlich sind. Laut einer Studie von Hayek *et al.* aktivieren DAB und VEM das *NLR Family CARD Domain Containing 4* (NLRC4)/Caspase-1-Inflammasom. Bei hohen Konzentrationen führte DAB zusätzlich zu einer Caspase-1-unabhängigen Aktivierung des Inflammasoms (261). In murinen BM-DC stimulierte DAB die Inflammasom-Aktivität unabhängig vom Aktivierungszustand, während VEM nur in LPS-stimulierten BM-DC eine Erhöhung der IL-1 β -mRNA-Spiegel bewirkte.

Die TATA-Box im Promotorbereich des IL-1-Gens verfügt über Bindungsstellen für myeloidzell-spezifische Transkriptionsfaktoren (z. B. PU.1 und CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP- α)) (291). Inflammatorische Signale wie TLR-Liganden, TNF- α und IL-1 aktivieren den Signalweg-Adapter MyD88 (Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88), der Transkriptionsfaktoren wie C/EBP- α stimuliert (292). Das auch als Reaktion auf den bakteriellen TLR4-Liganden LPS aktivierte C/EBP- α trägt zur Steigerung der IL-1-Genexpression bei (269, 293). In diesem Zusammenhang wiesen Marucha *et al.* nach, dass proinflammatorische Zytokine (IL-1, TNF- α) in humanen Neutrophilen die Neusynthese von IL-1 und die Halbwertszeit der IL-1-mRNA beeinflussen (294). Ein potenzieller Mechanismus für

die Förderung der IL-1 β -Produktion durch BRAFi könnte auch die Stimulation von TNF- α sein. Diese Hypothese konnte jedoch in Studien nicht bestätigt werden (261).

5.1.4 Produktion von IL-6 und IL-8 durch humane Immunzellen nach BRAFi-Applikation

Die vorliegende Arbeit zu den Auswirkungen von BRAFi und MEKi auf die Produktion von IL-1 β , IL-6 und IL-8 in humanen PBMC ergab deutliche individuelle Unterschiede zwischen den Spendern (Abbildung 27). Einige Spender reagierten als *Responder*, andere hingegen als *Non-Responder*. Zudem sprachen einige Spender nicht auf alle getesteten BRAFi an. Die Tatsache, dass nur bestimmte Spender auf BRAFi ansprechen, deutet darauf hin, dass genetische Unterschiede – möglicherweise in Form allelischer Varianten – eine Rolle spielen könnten. Diese Unterschiede könnten die individuelle Empfindlichkeit gegenüber den Inhibitoren beeinflussen und dadurch die Produktion der untersuchten Zytokine modulieren.

Während in der vorliegenden Studie eine Induktion der IL-6- und IL-8-Produktion durch BRAFi *in vitro* in humanen Immunzellen nachgewiesen werden konnte, berichteten Schilling *et al.* hingegen über eine Hemmung der IL-6-Produktion in *monocytic subtypes of myeloid-derived suppressor cells* (moMDSC) bei BRAF-mutierten Melanomen durch VEM (295). Hartman *et al.* (2017) untersuchten die Auswirkungen der Medikamente VEM und TRA auf die Expression von IL-8 (CXCL8) und CTGF in humanen Melanomzellen mit der BRAF^{V600E}-Mutation (296). Sowohl Vemurafenib als auch Trametinib reduzierten die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der für die Expression von IL-8 verantwortlich ist. Dies führte zu einer signifikanten Reduktion der IL-8-Expression und -Sekretion. Diese Ergebnisse widersprechen sich nicht zwangsläufig, sondern verdeutlichen die komplexe und zelltypspezifische Regulation der Zytokinproduktion. Gesunde myeloide Zellen und Melanomzellen können unterschiedlich auf BRAF-Inhibitoren reagieren, was die beobachteten Unterschiede in der Zytokinproduktion erklärt. Diese differenzielle Regulation unterstreicht die Notwendigkeit, die Auswirkungen von Therapien auf verschiedene Zelltypen im Tumormikromilieu zu berücksichtigen, um ein umfassendes Verständnis der immunologischen Effekte zu gewinnen.

Dank der neuesten Fortschritte in der molekularen Sequenzierungstechnologie können genetische Polymorphismen – wie Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs), insbesondere solche in regulatorischen oder kodierenden Genregionen (cSNPs) – heute als Ausgangspunkt neuer Erkenntnisse dienen (297). Genetische Variationen in den Zielproteinen von Medikamenten können sowohl die therapeutische Wirksamkeit als auch das Auftreten unerwünschter Nebenwirkungen beeinflussen – wie beispielsweise bei β_2 -Adrenozeptor-Agonisten (298) und Antipsychotika wie Clozapin (299) nachgewiesen wurde (300). Neben DNA-Polymorphismen und Mutationen spielen auch epigenetische Kontrollmechanismen – wie etwa die DNA-Methylierung – eine wichtige Rolle für die individuelle Responsivität. Auch

Umwelt- und Lebensstilfaktoren – wie Erkrankungen, Alkoholkonsum, Rauchen oder Ernährung – können zur Variabilität der Wirksamkeit von Medikamenten beitragen (300). Zukünftig sollten pharmakogenomische Studien die Entwicklung therapeutischer Wirkstoffe auf Grundlage individueller molekularer Charakteristika gezielt vorantreiben.

Eine weitere mögliche Ursache für die erhöhte Produktion von IL-1 β , IL-6 und IL-8 nach DAB-Behandlung ist die paradoxe Aktivierung von ERK in BRAF-V600-Wildtyp-Zellen. Bei BRAF-WT-Zellen lösen BRAFi durch eine Konformationsänderung des BRAF-Proteins eine paradoxe Aktivierung des MAPK-Signalwegs aus. Die anschließende Interaktion mit RAS bewirkt eine allosterische Transaktivierung und Phosphorylierung des RAF-Dimerpartners sowie eine Aktivierung der nachgeschalteten Signalübertragung. Die paradoxe Aktivierung des MAPK-Signalwegs durch den BRAFi DAB, gekennzeichnet durch eine erhöhte ERK-Phosphorylierung, wurde in murinen Splenozyten nachgewiesen (301). Darüber hinaus zeigten Callahan *et al.* *in vitro* und *in vivo*, dass ein pan-RAF-Inhibitor die ERK-Phosphorylierung in CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen erhöhte (302). Interessanterweise beobachteten Hu-Lieskovan *et al.*, dass der MEKi TRA die Funktion von Effektor-T-Zellen *in vitro*, jedoch nicht *in vivo* beeinträchtigte (243). In ihren Arbeiten zu den Auswirkungen von MEKi auf murine T-Zell-Stadien stellten Ebert *et al.* (303) fest, dass diese Inhibitoren zwar das Priming naiver CD8⁺-T-Zellen im Lymphknoten behinderten, die Anzahl antigenspezifischer CD8⁺-T-Zellen im Tumor jedoch zunahm.

5.1.5 Rolle von IL-1 β bei der Induktion der IL-6- und IL-8-Produktion in PBMC nach BRAFi-Applikation

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass BRAFi die Expression von IL-6 in PBMC signifikant stimulieren, insbesondere bei Spendern (#12, #21, #22 und #23), die gleichzeitig unter BRAFi-Behandlung eine erhöhte IL-1 β -Expression zeigten. Diese Ergebnisse stimmen mit den Befunden von Jung *et al.* überein, die eine Korrelation zwischen vermehrter IL-1 β -Produktion und erhöhten IL-6-Spiegeln in PBMC-Überständen nach DAB-Applikation berichteten (304).

Unsere Ergebnisse lassen jedoch keine eindeutigen Rückschlüsse darauf zu, dass die IL-6-Produktion direkt von IL-1 β abhängt. Der Nachweis eines solchen Mechanismus erfordert zusätzliche Experimente, z. B. die Behandlung von PBMC mit IL-1 β -neutralisierenden Antikörpern vor der Inkubation mit BRAFi. Interessanterweise wurde berichtet, dass IL-1 β -/IL-6-neutralisierende Antikörper keinen Einfluss auf die DAB-induzierte Überexpression von Oberflächenmarkern in BM-DC haben (M. Bros, *persönliche Mitteilung*), was auf komplexe Regulationsmechanismen hinweist.

Ein ähnlicher stimulierender Effekt wie bei IL-6, wurde in unseren Untersuchungen auch bei IL-8 nach DAB-Applikation vor allem bei den Spendern beobachtet, in dessen Überstände

erhöhte IL-1 β Konzentration zu messen waren (Abbildung 17). Einen vergleichbaren, aber schwächeren Effekt zeigte auch ENC.

Unsere Ergebnisse stehen nicht im Widerspruch zu den bisherigen Studien, sondern verdeutlichen vielmehr eine komplexe, zelltypspezifische Regulation der IL-6- und IL-8-Sekretion, die sowohl durch BRAFi als auch durch IL-1 β beeinflusst wird. Zukünftige Studien sollten darauf abzielen, die zugrunde liegenden Mechanismen genauer zu untersuchen, insbesondere durch den gezielten Einsatz von Signalwegs-Inhibitoren und neutralisierenden Antikörpern.

5.2 Strukturelle und pharmakokinetische Unterschiede der verwendeten Inhibitoren

Den Befunden der vorliegenden Arbeit zufolge spielen bei der Interleukin-Produktion in humanen PBMC und MO-DC nach BRAFi- und/oder MEKi-Inkubation nicht nur spenderabhängige Faktoren eine Rolle. Vielmehr deuten die Befunde auf substanzspezifische – und nicht auf klassenspezifische – *Off-Target*-Effekte der BRAF^{V600E}-Inhibitoren hin. Die verwendeten Inhibitoren unterscheiden sich in ihren strukturellen und pharmakodynamischen Eigenschaften. DAB, VEM und ENC sind selektive Typ-1-BRAFi mit einem ähnlichen chemischen Aufbau, die mit Adenosintriphosphat konkurrieren (Abbildung 25) (305).

Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) beträgt für DAB 0,65 nM, für VEM 10 nM und für ENC 0,35 nM (305). Alle drei BRAFi wirken sowohl auf BRAF-Mutationen als auch auf den BRAF-Wildtyp (305). ENC ist am wirksamsten bei der Hemmung der Proliferation der meisten Zelllinien mit BRAF-Mutationen (IC₅₀ < 40 nM), gefolgt von DAB (< 100 nM) und VEM (< 1000 nM) (306). Damit übereinstimmend führten in der vorliegenden Studie DAB und ENC im Vergleich zu VEM zu einer stärkeren IL-8-Produktion in den BRAF-WT-Zellen (Abbildung 24B, -D, -F). Bei der Bewertung der Befunde ist zu berücksichtigen, dass die Mittelwerte auf Daten von lediglich zwei BRAF-WT-Zelllinien basieren, sodass eine statistische Absicherung der Ergebnisse nicht möglich war. Außerdem zeigt DAB im Vergleich zu VEM eine stärkere Selektivität für BRAF-V600E, was sich im Verhältnis der IC₅₀-Werte für BRAF-V600E zu BRAF-WT widerspiegelt (0,3 für VEM (307) und 0,05 für DAB (308)). DAB weist eine vergleichbare Wirksamkeit bei der Hemmung von BRAF-V600E und BRAF-V600K auf (309). Die Dissoziationshalbwertszeit (t_{1/2}diss) von ENC beträgt über 30 h und ist damit deutlich länger als die von DAB (2 h) und VEM (0,5 h), was zu einer verlängerten pharmakologischen Wirkung führt (310).

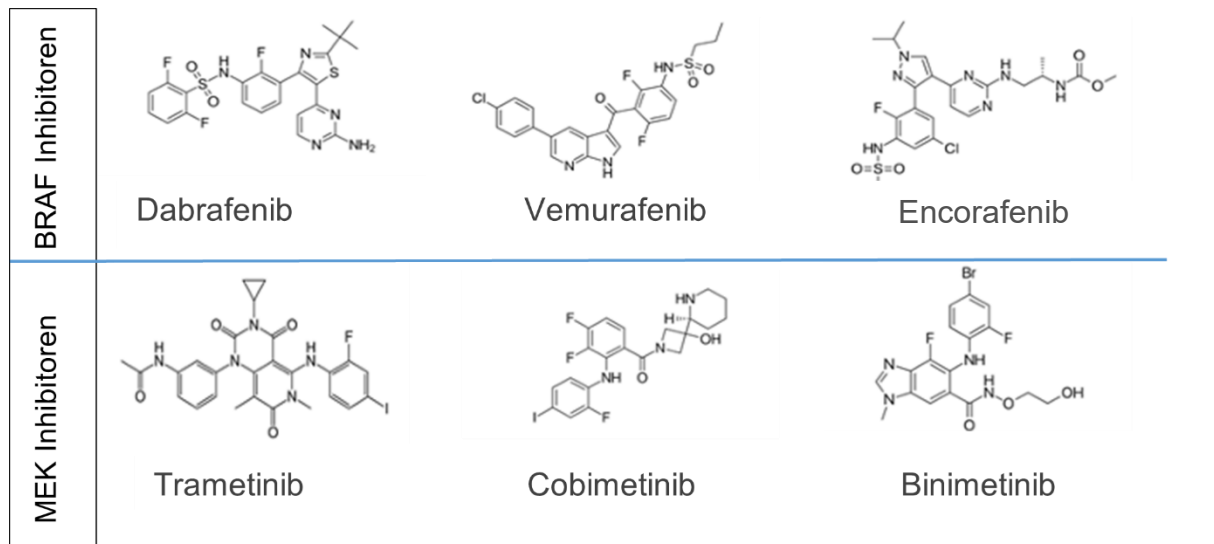


Abbildung 25: Chemische Strukturen der in dieser Arbeit verwendeten BRAF-Inhibitoren (BRAFi) und MEK-Inhibitoren (MEKi) (modifiziert nach (305)).

In einer weiteren Studie aus unserem Labor wurde die Wirkung der drei zugelassenen BRAFi (DAB, VEM, ENC) in klinischer Dosierung auf murine BM-DC untersucht. In diesem Modell beeinflussten nicht alle BRAFi die Zytokinexpression. In murinen BM-DC erhöhte ausschließlich DAB die IL-1 β - und IL-6-mRNA-Spiegel (M. Bros, persönliche Mitteilung). Abbildung 26 zeigt die Frequenz der Responsivität humaner PBMC hinsichtlich der Expression von IL-1 β , IL-6 und IL-8 im untersuchten Spenderkollektiv. Dabei zeigte DAB die höchste Wirksamkeit in Bezug auf alle drei Zytokine.

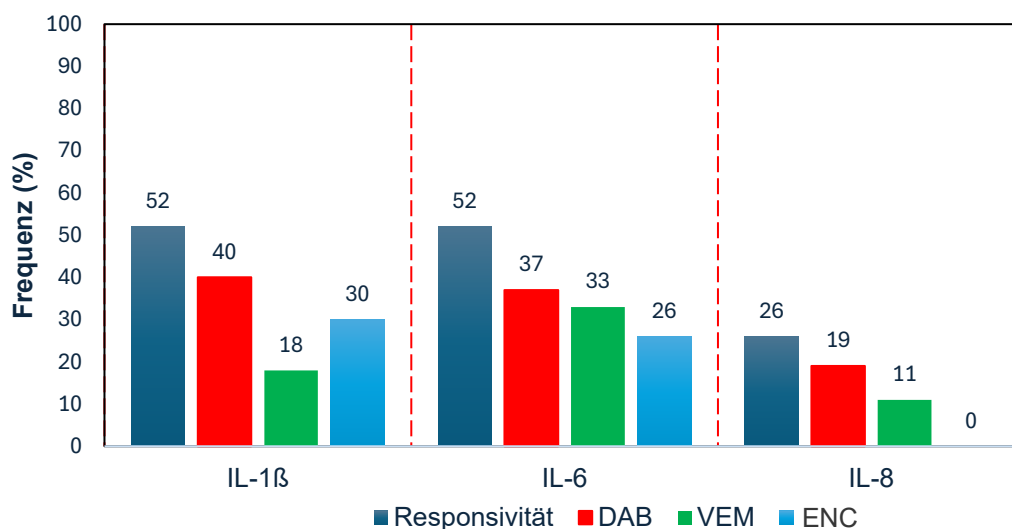


Abbildung 26: Frequenz der Responsivität humaner Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) auf eine BRAFi-Behandlung bezüglich der Produktion von Interleukin-(IL)-1 β , IL-6 und IL-8. BRAFi Dabrafenib (DAB), Vemurafenib (VEM) und Encorafenib (ENC, jeweils 0.25 μ M). BRAFi = v-rat fibrosarcoma (Raf) murine sarcoma viral oncogene homolog B Inhibitoren

Die Experimente mit MEKi ergaben vergleichbare Resultate. Sowohl in BRAFV600E- als auch in BRAF-WT-Melanomzelllinien verringerten die MEKi TRA und COB die Stoffwechselaktivität der Tumorzellen, während BIN keine vergleichbare Wirkung zeigte (Abbildung 21). TRA hemmt MEK1 und MEK2 mit IC₅₀-Werten zwischen 0,7 und 0,9 nM. COB weist eine niedrigere IC₅₀ für MEK1 (0,95 nM) auf als für MEK2 (199 nM).

Binimetinib ist ein Inhibitor von MEK1 und MEK2 mit deutlich höheren IC₅₀-Werten zwischen 12 und 46 nM (311), was auf die geringste Hemmwirkung unter den genannten Inhibitoren hinweist.

5.3 Beeinflussung der Interleukin-Konzentration durch das Alter, das Geschlecht und die Blutgruppe

Bei der Untersuchung eines potenziellen Zusammenhangs zwischen dem Alter der Probanden und den IL-1 β -, IL-6- sowie IL-8-Konzentrationen – sowohl im Basalzustand als auch nach Inkubation mit BRAFi und MEKi – in humanen PBMC und DC war keine Korrelation erkennbar. Laut Fagiolo *et al.* zeigen unstimulierte Zellkulturen peripherer mononukleärer Zellen keine altersabhängigen Unterschiede in den basalen Spiegeln von IL-1 β , IL-6 und TNF- α (312). Nach Mitogen-Stimulation zeigten ältere Personen im Vergleich zu jüngeren eine deutlich stärkere Zunahme der Interleukinproduktion. Die Konzentrationen der untersuchten Zytokine waren in unstimulierten Zellkulturen von jüngeren und älteren Personen vergleichbar. Auch die Serumspiegel von TNF- α zeigten keine signifikanten Unterschiede. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die zelluläre Produktion dieser Zytokine im Alter erhalten bleibt und dass Zellen älterer Menschen ihre Produktion als Reaktion auf geeignete Reize steigern können.

Bei der Interpretation der vorliegenden Befunde ist zu berücksichtigen, dass die untersuchten Probanden zwischen 18 und 65 Jahren alt waren, wobei über 52 % der Teilnehmenden zwischen 25 und 43 Jahren lagen. Aufgrund der geringen Altersstreuung kann das Studienkollektiv nicht als repräsentativ angesehen werden.

Zudem ergab die vorliegende Untersuchung keinen Unterschied in der Produktion von IL-1 β , IL-6 und IL-8 in PBMC oder DC zwischen männlichen und weiblichen Probanden. Lynch *et al.* (313) beschrieben eine deutliche Abhängigkeit der IL-1-Produktion von den Phasen des Menstruationszyklus bei Frauen in *in-vitro*-PBMC-Tests. Während der Lutealphase wurde eine 5- bis 10-fach, während der Follikelphase eine 13- bis 28-fach erhöhte IL-1-Sekretionsrate im Vergleich zu Männern gemessen. Diese Befunde legen einen Zusammenhang zwischen der IL-1-Produktion und Sexualhormonen (z. B. Östrogene, Gestagene) nahe. Der Menstruationszyklus wurde in der vorliegenden Untersuchung nicht berücksichtigt.

Auch die Blutgruppe der PBMC-Donner wurde in unseren Experimenten untersucht. Dabei zeigte sich weder eine Korrelation zwischen der Interleukinproduktion und der Blutgruppe noch

ein verstärkter Einfluss von BRAFi oder MEKi in Abhängigkeit von der Blutgruppe. Diverse Studien weisen darauf hin, dass Personen mit Blutgruppe A bei bestimmten Erkrankungen – wie beispielsweise COVID-19 – ein erhöhtes Risiko für schwerere Verläufe haben könnten (314). Diese Patientengruppe zeigt tendenziell erhöhte Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 (315), was eine verstärkte Immunreaktion begünstigen und möglicherweise zur Entstehung schwerer Krankheitsverläufe beitragen könnte.

5.4 Dendritische Zellen

Jung *et al.* zeigten, dass Monozyten, die durch Plastikadhärenz aus PBMC isoliert wurden, sowie die entsprechenden PBMC in den meisten Fällen eine verstärkte IL-1 β -Produktion nach Behandlung mit DAB aufwiesen (316). Wir kamen zu vergleichbaren Befunden. Hajek *et al.* beobachteten hingegen bei murinen, milzabgeleiteten und LPS-stimulierten Monozyten und Makrophagen nur eine geringfügig erhöhte intrazelluläre IL-1 β -Expression nach Gabe eines BRAFi. Eine durch DAB induzierte IL-1 β -Aufregulation konnte jedoch auch in primären humanen DC einiger Spender beobachtet werden. Die unterschiedliche Reaktion primärer humaner Monozyten und MO-DC könnte auf die Behandlung der PBMC mit IL-4 und GM-CSF im Rahmen der DC-Differenzierung zurückzuführen sein. Die durch IL-4 und GM-CSF ausgelösten Veränderungen in Genexpression und Metabolismus könnten auch die molekularen Angriffspunkte der BRAFi beeinflussen. Studien zeigen, dass IL-4 die Stabilität der IL-1-mRNA in LPS-stimulierten Monozyten hemmt (317).

In der vorliegenden Studie veränderte die Gabe von BRAFi und MEKi das Zytokinmuster humaner MO-DC, ohne dass sich eine eindeutige Tendenz erkennen ließ. Die Expression von IL-1 β , das im Basalzustand nicht nachweisbar war, erhöhte sich nach Stimulation mit R848. Die MO-DC einiger Spender zeigten nach Exposition gegenüber BRAFi eine erhöhte IL-1 β -Expression. Dieser Effekt wurde durch die gleichzeitige Gabe von MEKi in den meisten Fällen nicht beeinflusst. DAB und VEM zeigten hinsichtlich der IL-6-Produktion eine stärkere stimulierende Wirkung als ENC. Zudem neutralisierte die zusätzliche Gabe von TRA die durch DAB induzierte IL-6-Expressionssteigerung, während COB keinen hemmenden Effekt auf den VEM-induzierten Effekt zeigte. Bei äquimolarer Gabe war die inhibitorische Wirkung auf die IL-8-Produktion von TRA stärker als von COB und BIN. Im Gegensatz zu den beobachteten Effekten auf die IL-6-Produktion wurde die IL-8-Produktion durch alle drei Kombinationen aus BRAF-V600E- und MEK-Inhibitoren gehemmt. In Anlehnung an die teilweise stimulierende Aktivität von TRA auf die murine BMDC von Hajek *et al.* (261), wiesen Vella und seine Kollegen (259) eine ähnliche stimulierende Wirkung dieses MEK-Inhibitors auch auf MO-DC nach. In den vorliegenden Versuchen sowie in der Studie von Ott *et al.* (18) blieb dieser Effekt aus, was möglicherweise auf methodische Unterschiede bei der DC-Differenzierung, der Gabe der Reifungsstimuli oder der Dauer der Inhibitor-Applikation zurückzuführen ist. Unter dem

Einfluss von Reifungsstimuli kam es zu einer Hemmung der ERK-Aktivität sowie zu einer erhöhten Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen, kostimulatorischen und Adhäsionsmolekülen (318, 319). Diese Befunde deuten darauf hin, dass der ERK-Signalweg am Erhalt des unreifen Phänotyps von dendritischen Zellen beteiligt ist (302). Vella *et al.* zeigten, dass die MEK-Inhibitoren U0126 und PD98059 die phänotypische Reifung von MO-DC unter dem Einfluss von LPS oder TNF- α fördern (318, 320). Unterschiede in den verwendeten Reifungsstimuli könnten die abweichenden Befunde erklären (18). Daher sind zusätzliche Studien erforderlich, um die Expression der Zielstrukturen für BRAF-V600E-Inhibitoren in DC zu analysieren.

Hoyer *et al.* analysierten die IL-1 β -Sekretion in LPS-stimulierten BM-DC nach Behandlung mit DAB, DAB + TRA und VEM (256). Die Ergebnisse waren weitgehend mit den Befunden der vorliegenden Studie an humanen MO-DC vergleichbar. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen führte die Kombination von VEM und COB jedoch zu einer vollständigen Inhibition der IL-1 β -Sekretion (256). Beim Vergleich verschiedener Studien sollten speziesspezifische Effekte berücksichtigt werden. Vosgianian *et al.* (321) wiesen eine stimulierende Wirkung von VEM auf menschliche T-Zellen nach, konnten jedoch keinen Einfluss auf die Zytokinproduktion von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen oder auf eine T-zellvermittelte antitumorale Reaktion in murinen BRAF-WT- und BRAF-WT-Insulinom-Modellen nachweisen (322). Bei diesen Mäusen handelt es sich um nahezu reinerbige Nachkommen einer Inzuchtlinie, wohingegen die humanen Immunzellen von anonymen Blutspendern stammten.

Im vorherigen Abschnitt wurde die Möglichkeit einer verstärkten Zytokin-Induktion in humanen PBMC durch den *Off-Target*-Effekt von BRAFi/MEKi diskutiert. Hajek *et al.* beobachteten, dass die MEK-Inhibitoren TRA und COB keine antagonistische Wirkung im Vergleich zu den BRAF-Inhibitoren DAB und VEM aufweisen. Daraus ergibt sich, dass die stimulierenden Effekte der BRAFi auf DC vermutlich nicht durch eine paradoxe ERK-Aktivierung bedingt waren. Diese Befunde stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, in der BRAF- und MEK-Inhibitoren die IL-8-Expression in vergleichbarer Weise beeinflussen.

Riegel *et al.* vermuteten, dass BRAFi und MEKi keine lineare Wirkung auf den MAPK-Signalweg entfalten, sondern unterschiedliche Rollen in der Biologie von DC spielen (16, 323).

5.5 BRAF^{V600E} Melanome erwerben eine immunosuppressive Mikroumgebung

Nach aktuellen Daten verfügen Tumoren mit BRAF-Mutationen über verschiedene immunologische Abwehrmechanismen (324). Diese immunologisch „kalten“ Tumoren entziehen sich häufig einer effektiven, T-Zell-vermittelten Immunantwort.

Bradley *et al.* stellten in diesem Zusammenhang fest, dass BRAF-V600E-Tumoren eine rasche Internalisierung und intrazelluläre Sequestrierung von MHC-Klasse-I-Molekülen bewirken, wodurch sowohl die Antigenpräsentation gegenüber T-Zellen als auch deren Effektorfunktion beeinträchtigt werden (325). Ho *et al.* berichten, dass BRAF-mutierte Tumoren ein immunsuppressive TME schaffen, indem sie die Tumorantigenpräsentation durch antigenpräsentierende Zellen (APC), wie DC und Makrophagen, stören (326). Während ihrer Entwicklung zeigen diese Tumoren eine verminderte Expression von TNF- α , IL-2 sowie weiterer immunologischer Faktoren, die für die Reifung dendritischer Zellen und die Polarisation von M1-Makrophagen entscheidend sind – darunter CD40L auf CD4⁺-tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL). Darüber hinaus stellten die Autoren eine verminderte Expression von für M1-Makrophagen typischen Zytokinen – darunter IL-1 β und IL-12 – sowie eine erhöhte Expression von M2-Makrophagen-assoziierten Genen wie *Mrc1* (Mannose-Rezeptor C-Typ 1), *Arg1* (Arginase 1) und *MMP9* (Matrix-Metalloproteinase 9) in Makrophagen fest (327). M1-Makrophagen fördern im Allgemeinen die Th1-Differenzierung durch die Produktion von IL-12, während M2-Makrophagen durch die Sekretion von IL-10 und VEGF die Immunantwort dämpfen (328).

5.6 Einfluss von BRAFi und MEKi auf die TME und die Immunantwort

In der Studie von Ho *et al.* führte PLX4720 (eine Isoform von VEM) in einem BRAF-V600E/PTEN-Melanommodell zu einer erhöhten Expression von CD40L und IFN- γ in tumorinfiltrierenden CD4⁺-T-Zellen sowie zu einer Hemmung der Akkumulation von Tregs und CD11b⁺/Gr-1⁺-myeloiden Zellen im Tumor (326). Diese Befunde verdeutlichen, dass BRAF-V600E-Inhibitoren gezielt Funktionen von CD4⁺-T-Zellen modulieren können. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass BRAFi die Expression von MHC-I- und CD70-Molekülen auf APC in einer CD40L- und IFN- γ -abhängigen Weise verstärken (326, 327).

In Mäusen, die mit C57BL/6J-PTEN^{ΔF}/--BRAFV600E⁺-Melanomzelllinien inokuliert wurden, zeigten BRAFi immunmodulatorische Effekte, darunter eine Zunahme tumorinfiltrierender T-Lymphozyten, eine Abnahme intratumoraler Tregs und CD11b⁺/Gr-1⁺-myeloider Zellen sowie eine verringerte Expression von CCL2, IL-1 α und IL-1 β in den Tumorzellen (246, 247, 329). Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass Tumoren, die durch die Inokulation von Tumorzellen entstehen, vermutlich immunogener sind als endogene Tumoren und die TME letzterer nicht vollständig widerspiegeln (243).

Laut Jiang *et al.* weisen BRAF-V600E-Inhibitor-resistente Melanomzellen eine verstärkte Aktivierung des MAPK-Signalwegs sowie eine erhöhte PD-L1-Expression auf, was potenziell die T-Zell-Aktivität und die antitumorale Immunität verringert (242). Frederick *et al.* zeigten, dass die Hemmung von BRAF-V600E in Melanomen die PD-1-Expression auf infiltrierenden

T-Zellen erhöht (247). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass intratumorale CD4⁺-T-Zellen nach einer Behandlung mit VEM potenziell empfindlicher auf den PD-1/PD-L1-Signalweg reagieren. Diese Befunde unterstützen die Überlegung, eine Kombinationstherapie aus PD-1-Blockade und BRAF^{V600E}-Inhibitoren zur Hemmung des Tumorwachstums oder zur Vermeidung einer Resistenzentwicklung gegenüber BRAF^{V600E}-Inhibitoren einzusetzen.

5.7 Effekt von BRAFi/MEKi auf Melanomzellen und Melanomzellen/Immunzellen-Kokulturen

Die Nutzung von patientenstammendem Tumorgewebe und -zellen hat zu erheblichen Fortschritten in der personalisierten Krebstherapie und Präzisionsmedizin geführt. Eine wesentliche Einschränkung dieser Technologie besteht jedoch im Fehlen einer vollständigen Tumormikroumgebung, einschließlich immunologischer und stromaler Zellpopulationen (330). Zur Überwindung dieser Einschränkung haben wir Transwell-Kokulturen eingesetzt, in denen PBMC mit Tumorzellen kombiniert wurden, um die Wirkung von BRAFi und MEKi auf deren Viabilität und Interleukinproduktion zu untersuchen (siehe Ergebnisse, Kapitel 4.3).

5.7.1 Unterschied zwischen Mono- und Kokulturen

PBMC-/Melanomzell-Kokulturen zeigten in unserer Studie deutlich erhöhte IL-6- und IL-1 β -Spiegel im Vergleich zu Monokulturen von PBMCs und Melanomzelllinien, unabhängig vom BRAF-Status (siehe Kapitel 4.3.2 u. 4.3.3). Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen von Goyeneche *et al.* überein. Dabei untersuchten sie die Interaktion zwischen Uvealmelanom-(UM)-Zellen und gesunden PBMC, indem sie diese fünf Tage lang kultivierten (331). Die Kokulturen aus UM-Zellen und PBMC führten zur Entstehung von Zellen mit MDSC-typischen Oberflächenmarkern. Dabei wurden erhöhte Konzentrationen von Faktoren gemessen, die sowohl die MDSC-Expansion (GM-CSF, IL-6) als auch immunsuppressive Funktionen (IFN- γ , IL-1 β , IL-10) fördern. Ein direkter Vergleich der beiden Studien ist jedoch nur eingeschränkt möglich, da sie sich auf histologisch unterschiedliche Melanomarten beziehen, unterschiedliche Kultivierungszeiten verwenden und möglicherweise weitere unbekannte Mutationen vorliegen könnten.

Ott *et al.* zeigten, dass die Zytokinproduktion sowie die Expression von Aktivierungsmarkern in dendritischen Zellen, die mit BRAF-mutierten Melanomzellen kokultiviert wurden, signifikant vermindert waren (18). Diese Effekte konnten jedoch durch eine Inhibition des MAPK-Signalwegs rückgängig gemacht werden. Ein möglicher Unterschied zu unserer Studie besteht vermutlich in den verwendeten Zelltypen (dendritische Zellen vs. PBMC) sowie in deren jeweiliger Reaktion auf die Melanomzellen, die unterschiedliche Signalwege und Immunantworten aktivieren können. Ein weiterer Erklärungsansatz für die erhöhte Interleukinproduktion in den Kokulturen im Vergleich zu isolierten PBMCs könnte in der

allogenen Natur des Systems liegen. Da die PBMC von gesunden Spendern und nicht von den Melanompatienten selbst stammen, erkennen die Immunzellen die Melanomzellen als „fremd“ und induzieren eine verstärkte Immunreaktion.

5.7.2 Modulation der Interleukin-Expression durch den BRAF-Status

Besonders bemerkenswert ist, dass die BRAF^{V600E}-Melanomzelllinien im Vergleich zu den nicht mutierten Zelllinien in unserer Studie eine höhere Konzentration von IL-1 β , IL-6 und IL-8 aufwiesen.

Im Einklang mit unseren Ergebnissen fanden Khalili *et al.* (332), dass die Expression von BRAFV600E in Melanozyten und Melanomzelllinien die Transkription von IL-1 α und IL-1 β induziert. Eine mögliche Erklärung für die erhöhten IL-6- und IL-8-Spiegel ist, dass die gesteigerte IL-1 β -Produktion in BRAFV600E-mutierten Melanomzellen als Auslöser für die verstärkte Sekretion von IL-6 und IL-8 dient. Die IL-6-Sekretion wird zellspezifisch durch immunologische, hormonelle und metabolische Stimuli gesteuert (333). Die Arbeit von Tosato *et al.* lieferte wichtige Erkenntnisse zur Rolle von IL-1 β bei der Induktion der IL-6-Produktion. Sie zeigten, dass IL-1 β in verschiedenen Zelltypen, darunter periphere Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen, die IL-6-Sekretion fördert (334). Die spezifische Hemmung der IL-1 β -induzierten IL-6-Produktion in Monozyten durch IL-1 β -blockierende Antikörper schloss in ihren Versuchen einen Effekt durch Verunreinigungen in der IL-1-Zubereitung aus. Flower *et al.* untersuchten die Regulierung der IL-6-Sekretion in humanen Adipozyten und PBMC (335) durch proinflammatorische Zytokine (TNF- α , IL-1 β). Laut ihren Befunden regulieren alle Immunmodulatoren (LPS, TNF- α , IL-1 β) die IL-6-Freisetzung in PBMC. In Adipozyten war jedoch nur IL-1 β in der Lage, die IL-6-Sekretion zu steuern (333). Laut Schuett *et al.* induzieren IL-1 und der *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF) in Monozyten und Makrophagen die IL-6-Expression (336). Zudem zeigen mehrere Studien, dass IL-1 auch die Produktion von IL-6 in Neuronen induziert (337). Tsakiri *et al.* wiesen nach, dass der neutrale Sphingomyelinase (nSMase)/Src-Kinase-Signalweg die Synthese von IL-6 in Neuronen anregt und dass die IL-1 β -induzierte IL-6-Synthese in Neuronen von der Aktivierung der NR2B-Untereinheit der Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) (und möglicherweise CaMKIV) und vom cAMP-Response-Element-bindenden Protein (CREB) abhängt.

Eine weitere plausible Erklärung für die erhöhte Produktion von Interleukinen in BRAF-mutierten Zellen ist, dass die BRAF-Mutation die Zytokinexpression über die MAPK-Signalwege stimuliert. Conciatori *et al.* untersuchten die Rolle der MAPK- und PI3K-Signalwege bei der Regulierung der IL-8-Expression in einer Gruppe von 28 kolorektalen Karzinomzelllinien, die hinsichtlich ihres BRAF-, KRAS-, PTEN- und PI3K-Mutationsstatus charakterisiert wurden (338). Die Produktion von IL-8 wurde signifikant durch den MAPK-Signalweg beeinflusst. ERK und c-Jun-N-terminal-Kinase förderten die IL-8-Transkription über

AP-1 und NF- κ B, während p38 die Stabilität der IL-8-mRNA unterstützte. Eine signifikante Korrelation zwischen der IL-8-Expression und dem BRAF-Status wurde festgestellt, was die Bedeutung dieser Signalwege bei der Regulierung der IL-8-Produktion unterstreicht (332). Bei Sumimoto *et al.* wiesen Melanomzellen mit der BRAF-V600E-Mutation eine gesteigerte Expression immunmodulatorischer Zytokine (z.B. IL-6, IL-10) auf, die das Auftreten immunsuppressiver Zellen (z.B. MDSC, Treg) in der TME begünstigten (139). Zur Untersuchung der Rolle des durch die BRAF^{V600E}-Mutation aktivierten MAPK-Signalwegs bei der Produktion von IL-10, VEGF und IL-6 wurde in drei BRAF-mutierten Melanomzelllinien BRAF^{V600E}-spezifische RNAi eingesetzt. Dabei kam ein Lentivirus zum Einsatz, das BRAF^{V600E}-spezifische Short-Hairpin-RNA (shRNA) exprimiert. Dies führte zu einer signifikanten Reduktion der IL-10-, VEGF- und IL-6-Produktion sowie zu einer Hemmung der ERK-Phosphorylierung, was die zentrale Rolle des MAPK-Signalwegs bei der Regulation dieser Faktoren hervorhebt (139).

5.7.3 Vergleich der unterschiedlichen Effekte von BRAF- und MEK-Inhibitoren auf die Interleukinproduktion sowie die Zellviabilität

Die Kombination von BRAFi und MEKi wurde entwickelt, um Resistenzmechanismen zu überwinden und paradoxe ERK-Aktivierung in Immunzellen zu verhindern (339). Allerdings spielt die ERK-Signalgebung eine Schlüsselrolle in der Funktion von Immunzellen, sodass der Einsatz von MEKi unbeabsichtigte Veränderungen ihrer Funktion zur Folge haben könnte. In einem BRAF^{V600E}-Mausmelanommodell führte die Verabreichung von DAB zu einem Anstieg der TAMs und Tregs (341). Dieser Anstieg konnte jedoch durch eine kombinierte Therapie mit DAB und TRA signifikant reduziert werden, was auf das synergistische Potenzial dieser Kombination in der Modulation der TME hinweist.

Interessanterweise zeigte sich in unserer Arbeit bei der Gabe von MEK-Inhibitoren sowie bei der Kombination von BRAFi und MEKi in den Kokulturen (unabhängig vom BRAF-Status) eine Herunterregulation der IL-1 β -, IL-6- und IL-8-Sekretion. Bei IL-6 zeigte sich in BRAFV600E-Melanomzelllinien/PBMC-Kokulturen eine stärkere Hemmung durch die Kombination aus BRAFi und MEKi im Vergleich zur alleinigen Gabe von MEKi, während in BRAF-Wildtyp-Melanomzelllinien/PBMC-Kokulturen eine stärkere Herabregulation durch MEKi alleine beobachtet wurde. BRAFi stimulierte die IL-6-Produktion in PBMCs, zeigte jedoch in den Kokulturen überwiegend keinen Effekt. Dies deutet darauf hin, dass eine zusätzliche MEK-Inhibition notwendig ist, um die komplexen Interaktionen und Signalwege in der Kokultur zu überwinden und einen konsistenten hemmenden Effekt auf die Interleukinproduktion zu erzielen. Ähnlich wie in der Studie von Goyeneche *et al.* (331) könnte es in unseren Kokulturen auch einen Mechanismus geben, durch den Melanomzellen der Immunüberwachung entkommen. Dies könnte beispielsweise durch die Bildung von Resistenzen gegenüber einer BRAFi-Monotherapie geschehen. Die A375-Melanomzelllinie mit der BRAFV600E-Mutation,

wie in einer Studie von Sumimoto et al. beschrieben (139), wurde mit dem MEK-Inhibitor U0126 in einer Konzentration von 25 μM für 8 h behandelt. Dies führte zu einer Unterdrückung der ERK-Phosphorylierung. Die mRNA-Expression immunsuppressiver Faktoren, einschließlich IL-6, IL-10 und VEGF, wurde durch die U0126-Behandlung deutlich verringert. In unseren Versuchen zeigte die Monokultur der BRAF^{V600E}-Melanomzelllinie (MeMal19) jedoch keine signifikante Herabregulation der IL-6-Produktion durch den MEK-Inhibitor. Eine Abnahme konnte jedoch bei IL-8 beobachtet werden, wobei MEKi zu einer Reduktion der IL-8-Expression in der BRAFV600E-Melanomzelllinie führte und dieser Effekt sogar stärker in der BRAFWT-Zelllinie ausgeprägt war.

Zudem zeigten BRAF-WT-Melanomzelllinien (MeMal 5) eine erhöhte IL-8-Sekretion besonders nach Applikation von DAB und ENC (Abbildung 24A, -B, -F), BRAF-V600E-Melanom-Zelllinien (MeMal 19) dagegen eine Abnahme der IL-8-Sekretion (Abbildung 24A, -C, -E). Im Einklang damit fanden Conciatori *et al.* heraus, dass die Veränderung der IL-8-Produktion durch DAB mit dem Export des Transkriptionsfaktors C/EBP Homologous Protein (CHOP) aus dem Zellkern in BRAF-mutierten Zellen und mit der Bindung von CHOP an den IL-8-Promotor in WT-Zellen in Zusammenhang steht (338). In nicht entarteten Zellen mit wildtypischem BRAF führt DAB zu einer paradoxen ERK-Aktivierung, einer nuklearen CHOP-Akkumulation und der Bindung an den IL-8-Promotor. Dies, zusammen mit einer erhöhten AP-1-Aktivierung, führt zu einer verstärkten IL-8-Transkription. TRA hingegen hemmt die Aktivierung von ERK, AP-1 und CHOP, was zu einer Herunterregulierung der IL-8-Transkription führt. In BRAF-mutierten Zelllinien verbleibt CHOP nach BRAF- oder MEK-Inhibition im Zytoplasma mit einer perinukleären Verteilung erhalten, was die Herunterregulierung der IL-8-Expression erklärt.

In unseren Untersuchungen zeigten BRAFi keinen Einfluss auf die Stoffwechselaktivität von BRAF-WT-Melanomzelllinien. Dagegen führten die MEK-Inhibitoren TRA und COB zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität aller Tumorzellen, unabhängig vom BRAF-Mutationsstatus. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in der Studie von Ciuffreda *et al.* erzielt. Sie untersuchten die wachstumshemmenden und antiangiogenetischen Effekte des MEK-Inhibitors PD0325901 in humanen Melanomzelllinien (342). PD0325901 hemmte signifikant das Zellwachstum sowohl in BRAF-mutierten als auch in Wildtyp-Melanomzelllinien, wobei die IC50-Werte im Nanomolarbereich lagen, selbst bei weniger empfindlichen Zellmodellen. Die Wachstumshemmung wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in Xenotransplantationsmodellen beobachtet. Diese Effekte waren mit einer G1-Phasen-Arretierung sowie einer anschließenden Induktion von Apoptose verbunden, unabhängig vom BRAF-Mutationsstatus.

5.7.4 Variationen innerhalb einer Melanomzelllinie

Kokulturen von peripheren mononukleären Blutzellen und Melanomzellen (BRAF-Wildtyp/BRAFV600E) zeigten in unserer Studie ein verändertes Zytokinmuster als Reaktion auf die Behandlung mit BRAF- und MEK-Inhibitoren, verglichen mit den Zytokinmustern der einzeln kultivierten Zelltypen. In unseren Kokulturen von Melanomzelllinien und PBMCs wurde die IL-1 β -Sekretion durch die Kombination von BRAFi und MEKi stärker gehemmt. In der MeMal59a-Zelllinie/PBMC-Kokultur entfalten die Kombinationen ENC/BIN und VEM/COB jedoch eine vergleichbare Wirkung wie in der MeMal19-Zelllinie/PBMC-Kokultur. Diese Heterogenität könnte als prädiktiver Marker genutzt werden, um Melanompatienten zu identifizieren, die beispielsweise von einer IL-1 β -Antikörpertherapie profitieren würden, sowie solche, bei denen diese Therapie nicht wirksam wäre. Ob ein allogenes System aus Melanomzellen und PBMCs, das in vereinfachter Form die tumorimmunologischen Verhältnisse eines Patienten widerspiegelt, als prädiktiver Test für das Therapieansprechen dienen kann, sollte in größeren Studien geprüft werden.

5.8 Limitationen

In dieser Arbeit bestehen mehrere Limitationen, die berücksichtigt werden sollten. Eine wesentliche Einschränkung stellt die geringe Anzahl an Probanden dar, die die Generalisierbarkeit der Ergebnisse beeinflussen könnte. Darüber hinaus stellt die natürliche Heterogenität der humanen PBMC und DCs eine Herausforderung dar, da sie die Vergleichbarkeit der Experimente erschwert. Ein weiterer Aspekt ist die Variabilität in den Kokulturversuchen, bei denen häufig wechselnde und begrenzt kombinierbare Zelltypen untersucht wurden. In-vitro-Studien mit Zelllinien können die Vielfalt genetischer und epigenetischer Veränderungen in Patiententumoren nicht vollständig abbilden. Diese Faktoren könnten die Reproduzierbarkeit und Interpretation der Ergebnisse beeinflussen.

Bei der Interpretation der Ergebnisse der Zytokinanalyse ist zu berücksichtigen, dass PBMCs eine heterogene Zellpopulation umfassen, darunter CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Monozyten, Makrophagen, basophile und dendritische Zellen. Der prozentuale Anteil dieser Subpopulationen variiert spenderabhängig, wodurch interindividuelle Vergleiche der absoluten Zytokinkonzentrationen zwischen verschiedenen Patienten nur begrenzt aussagekräftig sind.

6 Zusammenfassung

Das maligne Melanom ist eine aggressive Hautkrebserkrankung mit bis vor Kurzem begrenzten Behandlungsoptionen. Etwa 40–50 % der kutanen Melanome weisen eine v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B (BRAF)-V600E-Mutation auf, die zu einer konstitutiven Aktivierung des extrazellulär signalregulierten Kinasewegs (ERK) führt und die Regulation des Zellwachstums und der Zellteilung entscheidend beeinflusst. Fortschritte in der molekularen Onkologie führten zur Entwicklung von BRAF-Inhibitoren (BRAFi), die sich gezielt gegen diese Mutation richten. Die BRAFi-Therapie weist jedoch diverse Nebenwirkungen auf und führt in vielen Fällen zur Resistenzbildung. Kombinationen mit Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kinase-(MEK)-Inhibitoren (MEKi) tragen zur Überwindung dieser Resistenzen bei und verbessern das Überleben der Betroffenen. Neben einer antitumoralen Wirkung zeigen BRAFi/MEKi auch immunmodulatorische Effekte wie die Modulation des Tumormikromilieus, die Veränderung des Immunphänotyps, die Modifikation der T-Zell-Aktivierung und der Antigenpräsentation sowie unerwünschte Nebenwirkungen wie Phototoxizität oder Pyrexie.

Die vorliegende Arbeit analysiert diese immunologischen Effekte in vitro an humanen Immunzellen (periphere mononukleäre Blutzellen, PBMC; monocyte-derived dendritic cells, MO-DC) und Melanomzellen anhand der Produktion proinflammatorischer Zytokine (Interleukin-(IL)1 β , IL-6 und IL-8). BRAFi (insbesondere Dabrafenib (DAB)) induzierten bei den PBMC einiger Spender eine erhöhte IL-1 β - und IL-6-Produktion, die durch eine gleichzeitige MEKi-Behandlung möglicherweise aufgrund der paradoxen ERK-Aktivierung aufgehoben wurde. Eine erhöhte IL-1 β -Produktion unter Basalbedingungen prädisponierte in einigen Fällen für die BRAFi-induzierte Expressionssteigerung. Dieser Befund lässt darauf schließen, dass BRAFi allein IL-1 β nicht induzieren, sondern als Koaktivatoren wirken. BRAFi (DAB > Encorafenib (ENC)) induzierten IL-8 vorwiegend bei IL-1 β -respondierenden Spendern.

Es konnte keine Verbindung zwischen dem Alter, dem Geschlecht oder der Blutgruppe der PBMC-Spender und der Reaktion der PBMCs auf BRAFi und MEKi nachgewiesen werden. Zudem fehlte eine Korrelation zwischen dem Verhalten der PBMC und MO-DC desselben Spenders hinsichtlich der Zytokinproduktion unter BRAFi/MEKi-Inkubation. In MO-DC war keine spezifische Expressionssteigerung der drei Zytokine unter BRAFi/MEKi nachweisbar. Kokulturen aus PBMC und Melanom-Zellen (BRAF-WT/BRAF-V600E) zeigten veränderte Zytokin-Muster als Reaktion auf BRAFi/MEKi-Behandlung, die sich jedoch von denen der Monokulturen unterschieden.

Abschließend lässt sich schlussfolgern, dass humane Immunzellen bezüglich der Zytokin-Expression eine große Heterogenität aufweisen, was die Interpretation der Befunde erschwert. Zur Validierung der nachgewiesenen Tendenzen sollten daher Studien mit Tumorausmodellen und größeren Spenderkollektiven durchgeführt werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Goldstein AM, Tucker MA. Genetische Epidemiologie des kutanen Melanoms: Eine globale Perspektive. *Archives of Dermatology*. 2001; Band 137:1121–1123. doi:10.1001/archderm.137.9.1121.
2. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, u. a. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *Journal of Clinical Oncology*. 20. Dezember 2009;27(36):6199–206.
3. Singh S, Numan A, Agrawal N, Tambuwala MM, Singh V, Kesharwani P. Role of immune checkpoint inhibitors in the revolutionization of advanced melanoma care. Bd. 83, *International Immunopharmacology*. 2020.
4. Ottaviano M, Giunta EF, Tortora M, Curvietto M, Attademo L, Bosso D, u. a. Molecular Sciences Review BRAF Gene and Melanoma: Back to the Future. *J Mol Sci [Internet]*. 2021 [zitiert 28. Oktober 2022];22.
5. Karasarides M, Chiloeches A, Hayward R, Niculescu-Duvaz D, Scanlon I, Friedlos F, u. a. B-RAF is a therapeutic target in melanoma. *Oncogene*. 2004;23(37).
6. Caronia LM, Phay JE, Shah MH. Role of BRAF in thyroid oncogenesis. Bd. 17, *Clinical Cancer Research*. 2011.
7. Brower V. BRAF inhibitors: research accelerates in wake of positive findings. Bd. 102, *Journal of the National Cancer Institute*. 2010.
8. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, u. a. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *New England Journal of Medicine*. 2011;364(26).
9. Boni A, Cogdill AP, Dang P, Udayakumar D, Njauw CNJ, Sloss CM, u. a. Selective BRAFV600E inhibition enhances T-cell recognition of melanoma without affecting lymphocyte function. *Cancer Res*. 2010;70(13).
10. Boussemart L, Girault I, Malka-Mahieu H, Mateus C, Routier E, Rubington M, u. a. Secondary tumors arising in patients undergoing BRAF inhibitor therapy exhibit increased BRAF-CRAF heterodimerization. *Cancer Res*. 2016;76(6).
11. Holderfield M, Nagel TE, Stuart DD. Mechanism and consequences of RAF kinase activation by small-molecule inhibitors. Bd. 111, *British Journal of Cancer*. 2014.
12. Xia J, Jia P, Hutchinson KE, Dahlman KB, Johnson D, Sosman J, et al. A meta-analysis of somatic mutations from next generation sequencing of 241 melanomas: a road map

- for the study of genes with potential clinical relevance. *Mol Cancer Ther* [Internet]. 1. Juli 2014 [zitiert am 26. Oktober 2022];13(7):1918–1928.
13. Larkin J, Ascierto PA, Dréno B, Atkinson V, Liszkay G, Maio M, u. a. Combined Vemurafenib and Cobimetinib in BRAF -Mutated Melanoma . *New England Journal of Medicine*. 2014;371(20).
 14. Robert C, Karaszewska B, Schachter J, Rutkowski P, Mackiewicz A, Stroiakovski D, u. a. Improved Overall Survival in Melanoma with Combined Dabrafenib and Trametinib. *New England Journal of Medicine*. 2015;372(1).
 15. Schadendorf D, Fisher DE, Garbe C, Gershenwald JE, Grob JJ, Halpern A, et al. Melanoma. *Nature Reviews Disease Primers* [Internet]. 23. April 2015 [zitiert am 28. November 2022];1(1):15003.
 16. Jung T, Haist M, Kuske M, Grabbe S, Bros M. Immunomodulatory properties of BRAF and MEK inhibitors used for melanoma therapy—paradoxical ERK activation and beyond. Bd. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. 2021.
 17. Smith MP, Sanchez-Laorden B, O'Brien K, Brunton H, Ferguson J, Young H, et al. The immune microenvironment confers resistance to MAPK pathway inhibitors through macrophage-derived TNF α . *Cancer Discov* [Internet]. Oktober 2014 [zitiert am 3. November 2022];4(10):1214–1229.
 18. Ott PA, Henry T, Baranda SJ, Frleta D, Manches O, Bogunovic D, u. a. Inhibition of both BRAF and MEK in BRAFV600E mutant melanoma restores compromised dendritic cell (DC) function while having differential direct effects on DC properties. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. April 2013;62(4):811–22.
 19. Callahan MK, Masters G, Pratilas CA, Ariyan C, Katz J, Kitano S, et al. Paradoxical activation of T cells via augmented ERK signaling mediated by a RAF inhibitor. *Cancer Immunol Res* [Internet]. Januar 2014 [zitiert am 3. November 2022];2(1):70–79.
 20. Tel J, Koornstra R, de Haas N, van Deutekom V, Westdorp H, Boudewijns S, u. a. Preclinical exploration of combining plasmacytoid and myeloid dendritic cell vaccination with BRAF inhibition. *J Transl Med*. 2016;14(1).
 21. Lodde G, Zimmer L, Livingstone E, Schadendorf D, Ugurel S. Malignant melanoma. *Pathologe*. 2020;41(3):281–92.
 22. Orfanos CE, Garbe C. Malignes Melanom. In: Orfanos CE, Hrsg. *Therapie der Hautkrankheiten* [Internet]. 2002 [zitiert am 16. November 2022]; Seiten 931–967. Verfügbar unter: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-56219-8_41.

23. Brito FC, Kos L. Zeitlicher Verlauf und Verteilung von Melanozyten-Vorläuferzellen im Herzen der Maus. *Pigment Cell & Melanoma Research*. 2008 Oktober;21(5):464–470. doi:10.1111/j.1755-148X.2008.00489.x.
24. Tachibana M. Sound needs sound melanocytes to be heard. *Pigment Cell Res*. 1999;12(6):344–54.
25. D'orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T. UV Radiation and the Skin. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2013;14:12222–48.
26. McLaughlin CC, Wu XC, Jemal A, Martin HJ, Roche LM, Chen VW. Incidence of noncutaneous melanomas in the U.S. *Cancer*. 2005;103(5).
27. Clay MR, Halloran MC. Control of neural crest cell behavior and migration: Insights from live imaging. *Cell Adhesion & Migration* [Internet]. 2010 Okt–Dez [zitiert am 26. April 2025];4(4):586–594.
28. Snell RS. Monobenzylether of Hydroquinone: Its Effect on the Activity of Epidermal Melanocytes. *Arch Dermatol*. 1964;90(1):63–70.
29. Yamaguchi Y, Hearing VJ. Physiologische Faktoren, die die Hautpigmentierung regulieren. *IUBMB Life* [Internet]. 2009 [zitiert am 26. April 2025];35(2):193–199.
30. Haass NK, Herlyn M. Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma. *The journal of investigative dermatology Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc [and] European Society for Dermatological Research*. 2005;10(2):153–63.
31. Rosso S, Zanetti R, Pippione M, Sancho-Garnier H. Parallel risk assessment of melanoma and basal cell carcinoma: Skin characteristics and sun exposure. *Melanoma Res*. 1998;8(6):573–83.
32. Ito S, Wakamatsu K, Ozeki H. Chemical analysis of melanins and its application to the study of the regulation of melanogenesis. *Pigment Cell Res*. 2000;13(SUPPL. 8):1039.
33. Lowe NJ. Überblick über ultraviolette Strahlung, Sonnenschutzmittel und photoinduzierte Dermatosen. *Dermatologic Clinics* [Internet]. Januar 2006 [zitiert am 24. Oktober 2022];24(1):9–17.
34. Vincensi MR, D'Ischia M, Napolitano A, Procaccini EM, Riccio G, Monfrecola G, u. a. Pheomelanin versus eumelanin as a chemical indicator of ultraviolet sensitivity in fair-skinned subjects at high risk for melanoma: a pilot study. *Melanoma Res* [Internet]. 1998 [zitiert 24. Oktober 2022];8(1):53–8.

35. Linck-Paulus L. Analyse der Argonaut-2-Regulation im malignen Melanom und Charakterisierung einer neuen Argonaut-2-Spleißvariante [Dissertation]. Erlangen: Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg; 2021.
36. Altmann S. Auswirkungen ionisierender Strahlung auf die intrazelluläre pH-Homöostase und ROS-Bildung unter Einfluss des Zytoprotektivums Amifostin (Ethyol®) [Dissertation]. Bochum: Ruhr-Universität Bochum, Medizinische Fakultät; 2005.
37. Sample A, He YY. Mechanismen und Prävention von UV-induziertem Melanom. *Photodermatologie, Photoimmunologie und Photomedizin* [Internet]. 1. Januar 2018 [zitiert am 26. Oktober 2022];34(1):13–24.
38. Blum A, Volkenandt M. Hautkrebs. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 16. August 2002;127(33):1679–81.
39. Bastian BC. The molecular pathology of melanoma: An integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2014;9.
40. Dessinioti C, Antoniou C, Katsambas A, Stratigos AJ. Melanocortin 1 receptor variants: Functional role and pigmentary associations. Bd. 87, *Photochemistry and Photobiology*. 2011.
41. Koefinger P, Wels C, Joshi S, Damm S, Steinbauer E, Beham-Schmid C, u. a. The Cadherin Switch in Melanoma Instigated by HGF is Mediated through Epithelial-Mesenchymal Transition Regulators.
42. Kawakami A, Fisher DE. The master role of microphthalmia-associated transcription factor in melanocyte and melanoma biology. *Laboratory Investigation* [Internet]. 2017;97:649–56.
43. Hartman ML, Czyz M. MITF in melanoma: Mechanisms behind its expression and activity. Bd. 72, *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2015.
44. Hartman ML, Czyz M. Pro-survival role of MITF in melanoma. Bd. 135, *Journal of Investigative Dermatology*. 2015.
45. Hartman ML, Czyz M. Anti-apoptotic proteins on guard of melanoma cell survival. Bd. 331, *Cancer Letters*. 2013.
46. Tsao H, Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Melanoma: from mutations to medicine. Verfügbar unter: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.191999.112>.
47. Fukunaga-Kalabis M, Santiago-Walker A, Herlyn M. Matricellular Proteins Produced by Melanocytes and Melanomas: In Search for Functions.

48. Coradeschi S, Saffiotti A. Melanoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2006 [zitiert 26. Oktober 2022];355(1):129–35. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16822996/>.
49. Takata M, Murata H, Saida T. Molecular pathogenesis of malignant melanoma: a different perspective from the studies of melanocytic nevus and acral melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* [Internet]. Februar 2010 [zitiert 26. Oktober 2022];23(1):64–71.
50. Mihm MC, Clark WH, From L. The Clinical Diagnosis, Classification and Histogenetic Concepts of the Early Stages of Cutaneous Malignant Melanomas. *New England Journal of Medicine*. 13. Mai 1971;284(19):1078–82.
51. McGovern VJ, Cochran AJ, Van Der Esch EP, Little JH, MacLennan R, McGovern VJ, u. a. The classification of malignant melanoma, its histological reporting and registration: A revision of the 1972 Sydney classification. *Pathology*. 1986;18(1):12–21.
52. Ackerman AB. Malignant melanoma: A unifying concept. *Hum Pathol*. 1. November 1980;11(6):591–5.
53. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, u. a. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* [Internet]. 17. November 2005 [zitiert 26. Oktober 2022];353(20):2135–47.
54. Eyerich K, Tüting T. Personalisierte Medizin. *Der Hautarzt* 2018 70:1 [Internet]. 11. Januar 2019 [zitiert 26. Oktober 2022];70(1):4–4.
55. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov G V., Cibulskis K, Sivachenko A, u. a. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*. 2013;499(7457).
56. Lovly CM, Dahlman KB, Fohn LE, Su Z, Dias-Santagata D, Hicks DJ, u. a. Routine multiplex mutational profiling of melanomas enables enrollment in genotype-driven therapeutic trials. *PLoS One*. 2012;7(4).
57. Akbani R, Akdemir KC, Aksoy BA, Albert M, Ally A, Amin SB, u. a. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell*. 18. Juni 2015;161(7):1681–96.
58. Saura E, Eliades PJ, Shannon K, Stratigos AJ, Tsao H. Hereditary melanoma: Update on syndromes and management Genetics of familial atypical multiple mole melanoma syndrome. Bd. 74, *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2016.
59. Chong SS, McCall AE, Cota J, Subramony SH, Orr HT, Hughes MR, u. a. Homozygotes for CDKN2 (p16) germline mutation in Dutch familial melanoma kindreds. *Nat Genet*. 1995;10(3).

60. Scaini MC, Rossi E, de Siqueira Torres PLA, Zullato D, Callegaro M, Casella C, u. a. Functional impairment of p16INK4A due to CDKN2A p.Gly23Asp missense mutation. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2009;671(1–2).
61. Santarpia L, Lippman SM, El-Naggar AK. Targeting the MAPK–RAS–RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* [Internet]. Januar 2012 [zitiert am 16. November 2022];16(1):103–119.
62. Miricescu D, Totan A, Stanescu-Spinu II, Badoiu SC, Stefani C, Greabu M. PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in breast cancer: From molecular landscape to clinical aspects. Bd. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. 2021.
63. Cheung MC, Perez EA, Molina MA, Jin X, Gutierrez JC, Franceschi D, u. a. Defining the role of surgery for primary gastrointestinal tract melanoma. *Journal of Gastrointestinal Surgery* [Internet]. 5. April 2008 [zitiert 5. November 2022];12(4):7318.
64. Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: Cross-talk and compensation. Bd. 36, *Trends in Biochemical Sciences*. 2011.
65. Stahl JM, Cheung M, Sharma A, Trivedi NR, Shanmugam S, Robertson GP. Loss of PTEN promotes tumor development in malignant melanoma. *Cancer Res*. 2003;63(11).
66. Cabrita R, Mitra S, Sanna A, Ekedahl H, Lövgren K, Olsson H, u. a. The role of PTEN loss in immune escape, melanoma prognosis and therapy response. *Cancers (Basel)*. 2020;12(3).
67. Dhomen N, Marais R. BRAF Signaling and Targeted Therapies in Melanoma. Bd. 23, *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 2009.
68. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, u. a. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417(6892).
69. Wan PTC, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, u. a. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* [Internet]. 19. März 2004 [zitiert 15. November 2022];116(6):855–67.
70. Long G V., Menzies AM, Nagrial AM, Haydu LE, Hamilton AL, Mann GJ, u. a. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(10).
71. El-Osta H, Falchook G, Tsimberidou A, Hong D, Naing A, Kim K, u. a. BRAF mutations in advanced cancers: Clinical characteristics and outcomes. Bd. 6, *PLoS ONE*. 2011.

72. Cheng L, Lopez-Beltran A, Massari F, Maclennan GT, Montironi R. Molecular testing for BRAF mutations to inform melanoma treatment decisions: A move toward precision medicine. Bd. 31, *Modern Pathology*. 2018.
73. Rassow J, Deutzmann R, Hauser K, Netzker R. *Duale Reihe Biochemie*. 3. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2012. S. 456–458.
74. Parikh C, Subrahmanyam R, Ren R. Oncogenic NRAS, KRAS, and HRAS exhibit different leukemogenic potentials in mice. *Cancer Res [Internet]*. 1. August 2007 [zitiert am 16. November 2022];67(15):7139–7146.
75. Goel VK, Lazar AJF, Warneke CL, Redston MS, Haluska FG. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*. 2006;126(1).
76. Giehl K. Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis. Bd. 386, *Biological Chemistry*. 2005.
77. Palmieri G, Capone M, Ascierto ML, Gentilcore G, Stroncek DF, Casula M, u. a. Main roads to melanoma. Bd. 7, *Journal of Translational Medicine*. 2009.
78. Wellbrock C, Karasarides M, Marais R. The RAF proteins take centre stage. Bd. 5, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2004.
79. Rebocho AP, Marais R. ARAF acts as a scaffold to stabilize BRAF:CRAF heterodimers. *Oncogene*. 2013;32(26).
80. Matallanas D, Birtwistle M, Romano D, Zebisch A, Rauch J, von Kriegsheim A, u. a. Raf family kinases: Old dogs have learned new tricks. Bd. 2, *Genes and Cancer*. 2011.
81. Hood JD, Frausto R, Kiosses WB, Schwartz MA, Cheresh DA. Differential α integrin-mediated Ras-ERK signaling during two pathways of angiogenesis. *Journal of Cell Biology [Internet]*. 1. September 2003 [zitiert am 26. April 2025];162(5):933–943.
82. Diedrich B, Rigbolt KT, Röring M, Herr R, Kaeser-Pebernard S, Gretzmeier C, u. a. Discrete cytosolic macromolecular BRAF complexes exhibit distinct activities and composition. *EMBO J*. März 2017;36(5):646–63.
83. Marais R, Light Y, Paterson HF, Mason CS, Marshall CJ. Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic Ras and tyrosine kinases. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(7).
84. Cuevas BD, Abell AN, Johnson GL. Role of mitogen-activated protein kinase kinase kinases in signal integration. Bd. 26, *Oncogene*. 2007.

85. Lopez-Bergami P, Fitchman B, Ronai Z. Understanding signaling cascades in melanoma. Bd. 84, Photochemistry and Photobiology. 2008.
86. Fensterle J. A trip through the signaling pathways of melanoma. Bd. 4, JDDG - Journal of the German Society of Dermatology. 2006.
87. Mercer KE, Pritchard CA. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. Bd. 1653, Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer. 2003.
88. Panka DJ, Atkins MB, Mier JW. Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway in the treatment of malignant melanoma. Bd. 12, Clinical Cancer Research. 2006.
89. McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, Chappell WH, Russo S, Ove R, u. a. Emerging MEK inhibitors. Bd. 15, Expert Opinion on Emerging Drugs. 2010.
90. Madhunapantula S V., Robertson GP. Is B-Raf a good therapeutic target for melanoma and other malignancies? Bd. 68, Cancer Research. 2008.
91. Russo AE, Torrisi E, Bevelacqua Y, Perrotta R, Massimo L, McCubrey JA, u. a. Melanoma: Molecular pathogenesis and emerging target therapies (review). Bd. 34, International Journal of Oncology. 2009.
92. Gollob JA, Wilhelm S, Carter C, Kelley SL. Role of Raf Kinase in Cancer: Therapeutic Potential of Targeting the Raf/MEK/ERK Signal Transduction Pathway. Semin Oncol. 2006;33(4).
93. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, u. a. High frequency of BRAF mutations in nevi. Nat Genet. 2003;33(1).
94. Poynter JN, Elder JT, Fullen DR, Nair RP, Soengas MS, Johnson TM, u. a. BRAF and NRAS mutations in melanoma and melanocytic nevi. Melanoma Res. 2006;16(4).
95. Bandarchi B, Ma L, Navab R, Seth A, Rasty G. From melanocyte to metastatic malignant melanoma. Bd. 2010, Dermatology Research and Practice. 2010.
96. Viros A, Sanchez-Laorden B, Pedersen M, Furney SJ, Rae J, Hogan K, u. a. Ultraviolet radiation accelerates BRAF-driven melanomagenesis by targeting TP53. Nature. 2014;511(7510).
97. Subbiah V, Baik C, Kirkwood JM. Clinical Development of BRAF plus MEK Inhibitor Combinations. Bd. 6, Trends in Cancer. 2020.
98. Martini M, De Santis MC, Braccini L, Gulluni F, Hirsch E. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: An updated review. Bd. 46, Annals of Medicine. 2014.

99. Tsao H, Goel V, Wu H, Yang G, Haluska FG. Genetic Interaction between NRAS and BRAF Mutations and PTEN/MMAC1 Inactivation in Melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*. 2004;122(2):337–41.
100. Barras D. BRAF-Mutation beim kolorektalen Karzinom: Ein Update. *Biomark Cancer* [Internet]. 2015 [zitiert am 26. April 2025];7(Suppl 1):9–12. Verfügbar unter: <https://journals.sagepub.com/doi/10.4137/BIC.S25248>.
101. Dahl C, Guldberg P. The genome and epigenome of malignant melanoma. *APMIS* [Internet]. 2007 [zitiert am 26. April 2025];115(10):1161–1176. Verfügbar unter: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_855.xml.x.
102. Sensi M, Nicolini G, Petti C, Bersani I, Lozupone F, Molla A, u. a. Mutually exclusive NRASQ61R and BRAFV600E mutations at the single-cell level in the same human melanoma. *Oncogene*. 2006;25(24).
103. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF). S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms. Langversion 3.0. April 2018. AWMF-Register-Nr.: 032/024OL.
104. Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ, u. a. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J*. 1987;6(11):3341–51.
105. Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *Journal of Clinical Oncology*. 10. September 2006;24(26):4340–6.
106. Grichnik JM. Kit and melanocyte migration. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2006 [zitiert 24. Oktober 2022];126(5):945–7.
107. Carvajal RD, Antonescu CR, Wolchok JD, Chapman PB, Roman RA, Teitcher J, u. a. KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma. *JAMA* [Internet]. 8. Juni 2011 [zitiert 24. Oktober 2022];305(22):2327–34.
108. Kirkwood JM, Bastholt L, Robert C, Sosman J, Larkin J, Hersey P, u. a. Cancer Therapy: Clinical Phase II, Open-Label, Randomized Trial of the MEK1/2 Inhibitor Selumetinib as Monotherapy versus Temozolomide in Patients with Advanced Melanoma.
109. Yancovitz M, Litterman A, Yoon J, Ng E, Shapiro RL, Berman RS, u. a. Intra- and inter-tumor heterogeneity of BRAF(V600E) mutations in primary and metastatic melanoma. *PLoS One* [Internet]. 3. Januar 2012 [zitiert 24. Oktober 2022];7(1). Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22235286/>.
110. Colombino M, Capone M, Lissia A, Cossu A, Rubino C, De Giorgi V, u. a. BRAF/NRAS mutation frequencies among primary tumors and metastases in patients with

- melanoma. *J Clin Oncol* [Internet]. 21. Mai 2012 [zitiert 24. Oktober 2022];30(20):2522–9. Verfügbar unter: <https://europepmc.org/article/med/22614978>.
111. Krauthammer M, Kong Y, Bacchiocchi A, Evans P, Pornputtapong N, Wu C, u. a. Exome sequencing identifies recurrent mutations in NF1 and RASopathy genes in sun-exposed melanomas. *Nat Genet*. 2015;47(9).
112. Mar VJ, Wong SQ, Li J, Scolyer RA, McLean C, Papenfuss AT, u. a. BRAF/NRAS wild-type melanomas have a high mutation load correlating with histologic and molecular signatures of UV damage. *Clinical Cancer Research*. 2013;19(17).
113. Shain AH, Garrido M, Botton T, Talevich E, Yeh I, Sanborn JZ, u. a. Exome sequencing of desmoplastic melanoma identifies recurrent NFKBIE promoter mutations and diverse activating mutations in the MAPK pathway. *Nat Genet*. 2015;47(10).
114. Wiesner T, Kiuru M, Scott SN, Arcila M, Halpern AC, Hollmann T, u. a. NF1 mutations are common in desmoplastic melanoma. *American Journal of Surgical Pathology*. 2015;39(10).
115. Nissan MH, Pratilas CA, Jones AM, Ramirez R, Won H, Liu C, u. a. Loss of NF1 in cutaneous melanoma is associated with RAS activation and MEK dependence. *Cancer Res* [Internet]. 15. April 2014 [zitiert 27. Oktober 2022];74(8):2340–50. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24576830/>.
116. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Zanetti R, Masini C, u. a. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur J Cancer*. 1. September 2005;41(14):2040–59.
117. Schadendorf D, Fisher DE, Garbe C, Gershenwald JE, Grob JJ, Halpern A, u. a. Melanoma. *Nature Reviews Disease Primers* 2015 1:1 [Internet]. 23. April 2015 [zitiert 11. Oktober 2022];1(1):1–20.
118. Sulovari A, Chen YH, Hudziak JJ, Li D. Atlas of human diseases influenced by genetic variants with extreme allele frequency differences. *Hum Genet* [Internet]. 3. Oktober 2016 [zitiert 24. Oktober 2022];136(1):39–54.
119. Ming Z, Lim SY, Rizos H. Genetic alterations in the ink4a/arf locus: Effects on melanoma development and progression. Bd. 10, *Biomolecules*. 2020.
120. Primiero CA, Yanes T, Finnane A, Soyer HP, McInerney-Leo AM. A Systematic Review on the Impact of Genetic Testing for Familial Melanoma I: Primary and Secondary Preventative Behaviours. *Dermatology*. 2021;237(5).
121. Haass NK, Smalley KSM, Herlyn M. The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. Bd. 35, *Journal of Molecular Histology*. 2004.

122. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 7. Januar 2000;100(1):57–70.
123. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* [Internet]. November 2013 [zitiert 25. Oktober 2023];19(11):142337.
124. Dhomen N, Marais R. New insight into BRAF mutations in cancer. Bd. 17, *Current Opinion in Genetics and Development*. 2007.
125. Haist M, Stege H, Grabbe S, Bros M. The Functional Crosstalk between Myeloid-Derived Suppressor Cells and Regulatory T Cells within the Immunosuppressive Tumor Microenvironment. *Cancers* 2021, Vol 13, Page 210 [Internet]. 8. Januar 2021 [zitiert 31. Oktober 2022];13(2):210.
126. Czekay RP, Cheon DJ, Samarakoon R, Kutz SM, Higgins PJ. Cancer-Associated Fibroblasts: Mechanisms of Tumor Progression and Novel Therapeutic Targets. *Cancers (Basel)* [Internet]. 1. März 2022 [zitiert 1. November 2022];14(5). Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35267539/>.
127. M Rafiul Haque AS, Moriyama M, Kubota K, ishiguro noriko, Sakamoto M, chinju A, u. a. CD206 + tumor-associated macrophages promote proliferation and invasion in oral squamous cell carcinoma via eGf production. [zitiert 31. Oktober 2022]; Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51149-1>.
128. Jobst J, Kobold S. Neue Strategien für die onkologische Therapie: Interleukine im Fokus. *Deutsches Ärzteblatt* [Internet]. 26. November 2021 [zitiert am 26. April 2025]; Verfügbar unter: <https://www.aerzteblatt.de/archiv/221304>.
129. Landskron G, De La Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. Bd. 2014, *Journal of Immunology Research*. Hindawi Publishing Corporation; 2014.
130. Mlecnik B, Bindea G, Kirilovsky A, Angell HK, Obenauf AC, Tosolini M, u. a. The tumor microenvironment and Immunoscore are critical determinants of dissemination to distant metastasis. *Sci Transl Med* [Internet]. 24. Februar 2016 [zitiert 15. Oktober 2022];8(327).
131. Fridman WH, Zitvogel L, Sautès-Fridman C, Kroemer G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 1. Dezember 2017 [zitiert 15. Oktober 2022];14(12):717–34.
132. Becht E, Giraldo NA, Germain C, de Reyniès A, Laurent-Puig P, Zucman-Rossi J, u. a. Immune Contexture, Immunoscore, and Malignant Cell Molecular Subgroups for

- Prognostic and Theranostic Classifications of Cancers. *Adv Immunol.* 1. Januar 2016;130:95–190.
133. Kaplanov I, Carmi Y, Kornetsky R, Shemesh A, Shurin GV, Shurin MR, et al. Blocking IL-1 β reverses the immunosuppression in mouse breast cancer and synergizes with anti-PD-1 for tumor abrogation. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 22. Januar 2019 [zitiert am 26. April 2025];116(4):1361–1369.
134. Leslie C, Bowyer SE, White A, Grieu-Iacopetta F, Trevenen M, Iacopetta B, u. a. FOXP3+ T regulatory lymphocytes in primary melanoma are associated with BRAF mutation but not with response to BRAF inhibitor. *Pathology.* 2015;47(6).
135. Shabaneh TB, Molodtsov AK, Steinberg SM, Zhang P, Torres GM, Mohamed GA, u. a. Oncogenic BRAFV600E Governs Regulatory T-cell Recruitment during melanoma tumorigenesis. *Cancer Res.* 2018;78(17).
136. Croce L, Coperchini F, Magri F, Chiovato L, Rotondi M. Oncotarget 6623 www.oncotarget.com The multifaceted anti-cancer effects of BRAF-inhibitors The wild type BRAF gene. *Oncotarget* [Internet]. 2019 [zitiert 4. November 2022];10(61):6623–40.
137. Cunha LL, Marcello MA, Morari EC, Nonogaki S, Conte FF, Gerhard R, u. a. Differentiated thyroid carcinomas may elude the immune system by B7H1 upregulation. *Endocr Relat Cancer.* 2013;20(1).
138. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DF, Merad M, u. a. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med* [Internet]. 1. Mai 2018 [zitiert 4. November 2022];24(5):541.
139. Sumimoto H, Imabayashi F, Iwata T, Kawakami Y. The BRAF-MAPK signaling pathway is essential for cancer-immune evasion in human melanoma cells. *J Exp Med* [Internet]. 10. Juli 2006 [zitiert 4. November 2022];203(7):1651–6.
140. Sumimoto H, Imabayashi F, Iwata T, Kawakami Y. The BRAF-MAPK signaling pathway is essential for cancer-immune evasion in human melanoma cells. *Journal of Experimental Medicine.* 2006;203(7).
141. Husain A, Hu N, Sadow PM, Nucera C. Expression of angiogenic switch, cachexia and inflammation factors at the crossroad in undifferentiated thyroid carcinoma with BRAFV600E. *Cancer Lett.* 2016;380(2).
142. Hodge DR, Hurt EM, Farrar WL. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *Eur J Cancer.* 2005;41(16):2502–12.

143. Ha H, Debnath B, Neamati N. Role of the CXCL8-CXCR1/2 axis in cancer and inflammatory diseases. *Bd. 7, Theranostics*. 2017.
144. Chen R, Keoni C, Waker CA, Lober RM, Gutmann DH. KIAA1549-BRAF Expression Establishes a Permissive Tumor Microenvironment Through NFκB-Mediated CCL2 Production. *Neoplasia (United States)*. 1. Januar 2019;21(1):52–60.
145. Conciatori F, Bazzichetto C, Amoreo CA, Sperduti I, Donzelli S, Diodoro MG, et al. BRAF status modulates Interleukin-8 expression through a CHOP-dependent mechanism in colorectal cancer. *Communications Biology [Internet]*. 1. Oktober 2020 [zitiert am 4. November 2022];3:546.
146. Sanchez-Laorden B, Viros A, Girotti MR, Pedersen M, Saturno G, Zambon A, u. a. BRAF inhibitors induce metastasis in RAS mutant or inhibitor-resistant melanoma cells by reactivating MEK and ERK signaling. *Sci Signal [Internet]*. 25. März 2014 [zitiert 23. Oktober 2022];7(318). Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24667377/>.
147. de la Rosa G, Longo N, Rodríguez-Fernández JL, Puig-Kroger A, Pineda A, Corbí ÁL, u. a. Migration of human blood dendritic cells across endothelial cell monolayers: adhesion molecules and chemokines involved in subset-specific transmigration. *J Leukoc Biol*. 2003;73(5).
148. Morimoto A, Oh Y, Nakamura S, Shioda Y, Hayase T, Imamura T, u. a. Inflammatory serum cytokines and chemokines increase associated with the disease extent in pediatric Langerhans cell histiocytosis. *Cytokine*. 2017;97.
149. Mitchell B, Leone D, Feller JK, Bondzie P, Yang S, Park HY, u. a. Correlation of chemokine receptor CXCR4 mRNA in primary cutaneous melanoma with established histopathologic prognosticators and the BRAF status. *Melanoma Res*. 2014;24(6).
150. Kuske M, Haist M, Jung T, Grabbe S, Bros M. Immunomodulatory Properties of Immune Checkpoint Inhibitors—More than Boosting T-Cell Responses? *Cancers (Basel)*. 1. April 2022;14(7).
151. Xiao Y, Yu D. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. *Pharmacol Ther [Internet]*. 2021 [zitiert am 26. April 2025];221:107753. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107753>.
152. Umansky V, Sevko A. Melanoma-induced immunosuppression and its neutralization. *Semin Cancer Biol [Internet]*. August 2012 [zitiert 12. Januar 2025];22(4):319–26. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22349515/>.

153. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* 2012 12:4 [Internet]. 22. März 2012 [zitiert 12. Januar 2025];12(4):252–64. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/nrc3239>.
154. Steinberg SM, Shabaneh TB, Zhang P, Martyanov V, Li Z, Malik BT, u. a. Myeloid cells that impair immunotherapy are restored in melanomas with acquired resistance to BRAF inhibitors. *Cancer Res.* 2017;77(7).
155. Young HL, Rowling EJ, Bugatti M, Giurisato E, Luheshi N, Arozarena I, u. a. An adaptive signaling network in melanoma inflammatory niches confers tolerance to MAPK signaling inhibition. *J Exp Med* [Internet]. 1. Juni 2017 [zitiert 15. Oktober 2022];214(6):1691–710. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28450382/>.
156. Khalili JS, Liu S, Rodríguez-Cruz TG, Whittington M, Wardell S, Liu C, u. a. Oncogenic BRAF(V600E) promotes stromal cell-mediated immunosuppression via induction of interleukin-1 in melanoma. *Clinical Cancer Research.* 2012;18(19).
157. Straussman R, Morikawa T, Shee K, Barzily-Rokni M, Qian ZR, Du J, u. a. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature.* 26. Juli 2012;487(7408):500–4.
158. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. Melanoma of the Skin — Cancer Stat Facts [Internet]. National Cancer Institute. [zitiert am 15. Oktober 2022].
159. John: Melanoma Staging: Evidence-Based Changes in the American Joint Committee on Cancer (AJCC) Eighth Edition Cancer Staging Manual. Online-Fortbildung. Continuing Medical Education Accreditation and Designation Statement. 2025.
160. Rashed H, Flatman K, Bamford M, Teo KW, Saldanha G. Breslow density is a novel prognostic feature in cutaneous malignant melanoma. *Histopathology.* 2017;70(2).
161. Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, u. a. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: Validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *Journal of Clinical Oncology.* 2001;19(16).
162. Luke JJ, Schwartz GK. Chemotherapy in the management of advanced cutaneous malignant melanoma. *Clin Dermatol* [Internet]. 2013 [zitiert am 26. April 2025];31(3):290–297.
163. Rodrigues Velho T. Metastatic melanoma-a review of current and future drugs. Downloaded from www.drugsincontext.com Drugs in Context [Internet]. 2012;212242.
164. Bhatia S, Tykodi SS, Thompson JA. Treatment of Metastatic Melanoma: An Overview Prognostic Factors for Metastatic Melanoma.

165. Middleton MR, Grob JJ, Aaronson N, Fierlbeck G, Tilgen W, Seiter S, et al. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol*. 2000 Jan;18(1):158–66. doi:10.1200/JCO.2000.18.1.158. PMID: 10623706.
166. Systemische Therapie des metastasierten Melanoms: Ergebnisse randomisierter Studien der letzten zehn Jahre [Internet]. *Deutsches Ärzteblatt*. [zitiert am 28. November 2022].
167. Lodde G, Leven AS, Schadendorf D, Gutzmer R. Medikamentöse Therapie des inoperablen Melanoms. *Die Onkologie* [Internet]. 1. August 2023 [zitiert 9. Januar 2025];29(8):1. Verfügbar unter: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10186319/>.
168. Zander H, Müller-Egert S, Zwiewka M, Groß S, Ger Van Zandbergen , Engelbergs J. Checkpointinhibitoren in der Tumorthherapie Einleitung. *Bundesgesundheitsbl* 2020 [Internet]. 63:1322–30.
169. Onitilo AA, Wittig JA. Principles of Immunotherapy in Melanoma. *Surgical Clinics of North America*. 1. Februar 2020;100(1):161–73.
170. Simeone E, Grimaldi AM, Ascierto PA. Anti-PD1 and anti-PD-L1 in the treatment of metastatic melanoma. *Melanoma Manag* [Internet]. Februar 2015 [zitiert 17. Oktober 2022];2(1):41. Verfügbar unter: </pmc/articles/PMC6094609/>
171. Fehr T, Wüthrich RP. Monoklonale Antikörpertherapie bei der Organtransplantation. [Internet]. Januar 2008 [zitiert am 26. April 2025]. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.5167/uzh-8881>.
172. Rowshanravan B, Halliday N, Sansom DM. CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood* [Internet]. 4. Januar 2018 [zitiert am 26. April 2025];131(1):58–67.
173. Yokosuka T, Kobayashi W, Takamatsu M, Sakata-Sogawa K, Zeng H, Hashimoto-Tane A, u. a. Spatiotemporal Basis of CTLA-4 Costimulatory Molecule-Mediated Negative Regulation of T Cell Activation. *Immunity*. 2010;33(3).
174. Pentcheva-Hoang T, Egen JG, Wojnoonski K, Allison JP. B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity*. 2004;21(3).
175. Kuehn HS, Ouyang W, Lo B, Deenick EK, Niemela JE, Avery DT, u. a. Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4. *Science* (1979). 2014;345(6204).
176. Schubert D, Bode C, Kenefeck R, Hou TZ, Wing JB, Kennedy A, u. a. Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations. *Nat Med*. 2014;20(12).

177. Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei MG, Golstein P. A new member of the immunoglobulin superfamily—CTLA-4. *Nature* [Internet]. 16. Juli 1987 [zitiert am 26. April 2025];328(6127):267–270.
178. Camacho LH. CTLA-4 blockade with ipilimumab: Biology, safety, efficacy, and future considerations. *Cancer Med*. 2015;4(5).
179. Schardt J. Der Einsatz von Immuncheckpoint-Inhibitoren im onkologischen Alltag. *Z Rheumatol* [Internet]. 16. September 2020 [zitiert am 26. April 2025];79(8):809–817.
180. Hodi FS, O’Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, u. a. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine*. 2010;363(8).
181. Huang AC, Orlowski RJ, Xu X, Mick R, George SM, Yan PK, u. a. A Single Dose of Neoadjuvant PD-1 Blockade Predicts Clinical Outcomes in Resectable Melanoma. *Nat Med* [Internet]. 1. März 2019 [zitiert 17. Oktober 2022];25(3):454.
182. Kähler KC, Hassel JC, Heinzerling L, Loquai C, Thoms KM, Ugurel S, Zimmer L, Gutzmer R, u. a. Nebenwirkungsmanagement bei Immun-Checkpoint-Blockade durch CTLA-4- und PD-1-Antikörper beim metastasierten Melanom – ein Update. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. Erstveröffentlichung: 10. Juni 2020. doi:10.1111/ddg.14128_g.
183. Weber JS, Kähler KC, Hauschild A. Management of immune-related adverse events and kinetics of response with ipilimumab. *Journal of Clinical Oncology*. 20. Juli 2012;30(21):2691–7.
184. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, u. a. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 28. Juni 2012 [zitiert 17. Oktober 2022];366(26):2443–54.
185. Hemon P, Jean-Louis F, Ramgolam K, Brignone C, Viguier M, Bachelez H, u. a. MHC Class II Engagement by Its Ligand LAG-3 (CD223) Contributes to Melanoma Resistance to Apoptosis. *The Journal of Immunology*. 2011;186(9).
186. Workman CJ, Cauley LS, Kim IJ, Blackman MA, Woodland DL, Vignali DAA. Lymphocyte Activation Gene-3 (CD223) Regulates the Size of the Expanding T Cell Population Following Antigen Activation In Vivo. *The Journal of Immunology*. 2004;172(9).

187. Durham NM, Nirschl CJ, Jackson CM, Elias J, Kochel CM, Anders RA, u. a. Lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) modulates the ability of CD4 T-cells to be suppressed In Vivo. *PLoS One*. 2014;9(11).
188. Rößler A. Doppelter Checkpoint-Inhibitor vor Zulassung. *Pharmazeutische Zeitung* [Internet]. 25. Juli 2022 [zitiert am 26. April 2025]; Verfügbar unter: <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/doppelter-checkpoint-inhibitor-vor-zulassung-134585/>.
189. Tawbi HA, Schadendorf D, Lipson EJ, Ascierto PA, Matamala L, Castillo Gutiérrez E, u. a. Relatlimab and Nivolumab versus Nivolumab in Untreated Advanced Melanoma. *New England Journal of Medicine*. 2022;386(1).
190. Hauschild A, Grob JJ, Demidov L V., Jouary T, Gutzmer R, Millward M, u. a. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* [Internet]. 2012 [zitiert 14. Oktober 2022];380(9839):358–65. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22735384/>.
191. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, u. a. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *N Engl J Med* [Internet]. 6. Juni 2011 [zitiert 14. Oktober 2022];364(26):2507.
192. Funck-Brentano E, Malissen N, Roger A, Lebbé C, Deilhaes F, Frénard C, u. a. Which adjuvant treatment for patients with BRAFV600-mutant cutaneous melanoma? Bd. 148, *Annales de Dermatologie et de Venereologie*. 2021.
193. Eisen T, Ahmad T, Flaherty KT, Gore M, Kaye S, Marais R, et al. Sorafenib in advanced melanoma: a Phase II randomised discontinuation trial analysis. *Br J Cancer* [Internet]. 4. September 2006 [zitiert am 26. April 2025];95(5):581–586.
194. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, u. a. Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine*. 2010;363(9).
195. Tsai J, Lee JT, Wang W, Zhang J, Cho H, Mamo S, u. a. Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(8).
196. Rheault TR, Stellwagen JC, Adjabeng GM, Hornberger KR, Petrov KG, Waterson AG, u. a. Discovery of dabrafenib: A selective inhibitor of Raf Kinases with antitumor activity against B-Raf-driven tumors. *ACS Med Chem Lett*. 2013;4(3).
197. Koelblinger P, Thuerigen O, Dummer R. Development of encorafenib for BRAF-mutated advanced melanoma. Bd. 30, *Current Opinion in Oncology*. 2018.

198. Olszanski AJ. Current and future roles of targeted therapy and immunotherapy in advanced melanoma [Internet]. *J Manag Care Spec Pharm*. 2014;20(2): 195-206. Verfügbar über: www.amcp.org.
199. Zhu Z, Liu W, Gotlieb V. The rapidly evolving therapies for advanced melanoma—Towards immunotherapy, molecular targeted therapy, and beyond. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1. März 2016;99:91–9.
200. Sullivan RJ, Flaherty KT. Resistance to BRAF-targeted therapy in melanoma. *Eur J Cancer*. 2013 Apr;49(6):1297-1304.
201. 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;366(8):707-714.
202. Johnson DB, Menzies AM, Zimmer L, Eroglu Z, Ye F, Zhao S, et al. Acquired BRAF inhibitor resistance: a multicenter meta-analysis of the spectrum and frequencies, clinical behaviour, and phenotypic associations of resistance mechanisms. *Eur J Cancer*. 2015;51(18):2792-2799.
203. Marusiak AA, Edwards ZC, Hugo W, Trotter EW, Girotti MR, Stephenson NL, et al. Mixed lineage kinases activate MEK independently of RAF to mediate resistance to RAF inhibitors. *Nat Commun*. 2014;5:3901.
204. Penna I, Molla A, Grazia G, Cleris L, Nicolini G, Perrone F, et al. Primary cross-resistance to BRAFV600E-, MEK1/2- and PI3K/mTOR-specific inhibitors in BRAF-mutant melanoma cells counteracted by dual pathway blockade. *Oncotarget*. 2016;7(4):3947-3961.
205. Welsh SJ, Rizos H, Scolyer RA, Long GV. Resistance to combination BRAF and MEK inhibition in metastatic melanoma: where to next? *Eur J Cancer*. 2016;62:76-85.
206. Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature*. 2010;468(7326):973-977.
207. Blum D, LaBarge S. Registered report: Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *eLife*. 2014;3:e04000.
208. Wilson TR, Fridlyand J, Yan Y, Penuel E, Burton L, Chan E, et al. Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature*. 2012;487(7408):505-509.

209. Poulidakos 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;464(7287):427-430.
210. Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, Brandhuber BJ, Anderson DJ, Alvarado R, et al. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature*. 2010;464(7287):431-435.
211. Adashek JJ, Desai AP, Menta AK, Roszik J, Subbiah V. Abstract 1479: Pan-cancer efficacy of BRAF and/or MEK inhibitors in BRAF V600-mutant multiple non-melanoma cancers: a clinico-genomic study. *Cancer Res*. 2021;81(13_Suppl):1479.
212. Hyman DM, Puzanov I, Subbiah V, Faris JE, Chau I, Blay JY, et al. Vemurafenib in multiple nonmelanoma cancers with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med*. 2015;373(8):726-736.
213. Graß S. Neue BRAF-/MEK-Hemmer-Kombination für Melanomtherapie. *Im Focus Onkol*. 2018;21(9):24-25.
214. Juriker A. BRAF-V600-mutierte Melanome: Kombinationstherapie aus BRAF- und MEK-Inhibitor besser als BRAF-Inhibitor allein. *Arzneimitteltherapie*. 2015;33(4):134-136.
215. Flaherty KT, Infante JR, Daud A, Gonzalez R, Kefford RF, Sosman J, et al. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med* [Internet]. 2012 Nov 1 [zitiert 2022 Okt 15]; 367(18):1694-1703.
216. Daud A, Tsai K. Management of treatment-related adverse events with agents targeting the MAPK pathway in patients with metastatic melanoma. *The Oncologist* [Internet]. 18. Mai 2017 [zitiert am 26. April 2025];22(7):823–833.
217. Flaherty KT, Infante JR, Daud A, Gonzalez R, Kefford RF, Sosman J, et al. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med*. 2012;367(18):1694-1703.
218. Lu H, Liu S, Zhang G, Wu B, Zhu Y, Frederick DT, et al. PAK signalling drives acquired drug resistance to MAPK inhibitors in BRAF-mutant melanomas. *Nature*. 2017;550(7674):133-136.
219. Karoulia Z, Wu Y, Ahmed TA, Xin Q, Bollard J, Krepler C, et al. An integrated model of RAF inhibitor action predicts inhibitor activity against oncogenic BRAF signaling. *Cancer Cell*. 2016;30(3):485-498.
220. Zhang C, Spevak W, Zhang Y, Burton EA, Ma Y, Habets G, et al. RAF inhibitors that evade paradoxical MAPK pathway activation. *Nature*. 2015;526(7574):583-586.

221. Bollag G, Tsai J, Zhang J, Zhang C, Ibrahim P, Nolop K, et al. Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2012;11(11):873-886.
222. Xue JY, Lito P. Quest for clinically effective RAF dimer inhibitors. *J Clin Oncol.* 2020;38(19):2159-2161.
223. Peng SB, Henry JR, Kaufman MD, Lu WP, Smith BD, Vogeti S, et al. Inhibition of RAF isoforms and active dimers by LY3009120 leads to anti-tumor activities in RAS- or BRAF-mutant cancers. *Cancer Cell.* 2015;28(3):384-398.
224. Silva IP, Long GV. Systemic therapy in advanced melanoma: integrating targeted therapy and immunotherapy into clinical practice. *Curr Opin Oncol [Internet].* 2017 Nov 1 [zitiert am 26. April 2025];29(6):484–492.
225. Yan Y, Kumar AB, Finnes H, Markovic SN, Park S, Dronca RS, et al. Combining immune checkpoint inhibitors with conventional cancer therapy. *Front Immunol.* 2018 Jul 27;9:1739.
226. Dixon-Douglas JR, Patel RP, Somasundram PM, McArthur GA. Triplet therapy in melanoma—combined BRAF/MEK inhibitors and anti-PD-(L)1 antibodies. *Curr Oncol Rep [Internet].* 1. August 2022 [zitiert am 26. April 2025];24(8):1071–1079.
227. Pelster MS, Amaria RN. Combined targeted therapy and immunotherapy in melanoma: a review of the impact on the tumor microenvironment and outcomes of early clinical trials. *Ther Adv Med Oncol.* 2019;11:1758835919830826.
228. Ribas A, Lawrence D, Atkinson V, Agarwal S, Miller WH, Carlino MS, et al. Combined BRAF and MEK inhibition with PD-1 blockade immunotherapy in BRAF-mutant melanoma. *Nat Med.* 2019;25(6):936-940.
229. Ziogas DC, Konstantinou F, Bouros S, Theochari M, Gogas H. Combining BRAF/MEK inhibitors with immunotherapy in the treatment of metastatic melanoma. *Am J Clin Dermatol.* 2021;22(3):301-313.
230. Zink N. Dreierkombination mit PD-1-Antikörper beim BRAF-mutierten Melanom ungeeignet. *Hautnah Dermatol.* 2022;38(2):102-104.
231. Polkowska M, Ekk-Cierniakowski P, Czepielewska E, Kozłowska-Wojciechowska M. Efficacy and safety of BRAF inhibitors and anti-CTLA4 antibody in melanoma patients—real-world data. *Eur J Clin Pharmacol.* 2019 Mar 6;75(3):329-334.
232. Ackerman A, Klein O, McDermott DF, Wang W, Ibrahim N, Lawrence DP, et al. Outcomes of patients with metastatic melanoma treated with immunotherapy prior to or after BRAF inhibitors. *Cancer.* 2014;120(11):1695-1701.

233. Ascierto PA, Simeone E, Sileni VC, Del Vecchio M, Marchetti P, Cappellini GCA, et al. Sequential treatment with ipilimumab and BRAF inhibitors in patients with metastatic melanoma: data from the Italian cohort of the ipilimumab expanded access program. *Cancer Invest.* 2014;32(4):144-149.
234. Olbryt M. Molecular background of skin melanoma development and progression: therapeutic implications. *Postepy Dermatol Alergol.* 2019;36(6):729-738.
235. Tsukamoto H, Irie A, Senju S, Hatzopoulos AK, Wojnowski L, Nishimura Y. B-Raf-mediated signaling pathway regulates T cell development. *Eur J Immunol.* 2008;38(2):334-342.
236. Dillon TJ, Karpitski V, Wetzel SA, Parker DC, Shaw AS, Stork PJS. Ectopic B-Raf expression enhances extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling in T cells and prevents antigen-presenting cell-induced anergy. *J Biol Chem.* 2003;278(38):36085-36093.
237. Willoughby JE, Costello PS, Nicolas RH, Robinson NJ, Stamp G, Powrie F, et al. Raf signaling but not the ERK effector SAP-1 is required for regulatory T cell development. *J Immunol.* 2007;179(10):6913-6921.
238. Singh K, Deshpande P, Li G, Yu M, Pryshchep S, Cavanagh M, et al. K-RAS GTPase- and B-RAF kinase-mediated T-cell tolerance defects in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(25):E1629-E1637.
239. Malik NM, Gilroy DW, Kabouridis PS. Regulation of growth and survival of activated T cells by cell-transducing inhibitors of Ras. *FEBS Lett.* 2009;583(1):47-52.
240. Peggs KS, Quezada SA, Chambers CA, Korman AJ, Allison JP. Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *J Exp Med.* 2009;206(8):1717-1725.
241. 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 [Internet].* 1. April 2015 [zitiert am 26. April 2025];21(7):1639–1651.
242. Jiang X, Zhou J, Giobbie-Hurder A, Wargo J, Hodi FS. The activation of MAPK in melanoma cells resistant to BRAF inhibition promotes PD-L1 expression that is reversible by MEK and PI3K inhibition. *Clin Cancer Res.* 2013;19(3):598-609.
243. Hu-Lieskovan S, Mok S, Homet Moreno B, Tsoi J, Robert L, Goedert L, u. a. Improved antitumor activity of immunotherapy with BRAF and MEK inhibitors in BRAFV600E melanoma. *Sci Transl Med [Internet].* 18. März 2015 [zitiert 3. November 2022];7(279).

244. Levy C, Khaled M, Fisher DE. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med*. 2006;12(9):406-414.
245. Haq R, Yokoyama S, Hawryluk EB, Jönsson GB, Frederick DT, McHenry K, et al. BCL2A1 is a lineage-specific antiapoptotic melanoma oncogene that confers resistance to BRAF inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2013 Mar 12 [zitiert 2022 Nov 3];110(11):4321-4326.
246. Wilmott JS, Long GV, Howle JR, Haydu LE, Sharma RN, Thompson JF, et al. Selective BRAF inhibitors induce marked T-cell infiltration into human metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*. 2012;18(5):1386-1394.
247. Frederick DT, Piris A, Cogdill AP, Cooper ZA, Lezcano C, Ferrone CR, et al. BRAF inhibition is associated with enhanced melanoma antigen expression and a more favorable tumor microenvironment in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*. 2013;19(5):1225-1231.
248. Inaba K, Pack M, Inaba M, Sakuta H, Isdell F, Steinman RM. High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *J Exp Med* [Internet]. 1997 Aug 29 [zitiert 2022 Okt 22]; 186(5):665-672.
249. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* [Internet]. 1998 Mar 19 [zitiert am 26. April 2025];392(6673):245–252.
250. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products [Internet]. *J Exp Med*. 1995 Aug 1 [zitiert 2022 Okt 22]; 182(2):389-400.
251. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity [Internet]. *Nature*. 19. März 1998 [zitiert am 22. Oktober 2022];392(6673):245–252.
252. Reis e Sousa C, Hieny S, Scharon-Kersten T, Jankovic D, Charest H, Germain RN, et al. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas [Internet]. *J Exp Med*. 1997 Dec 1 [zitiert 2022 Okt 22]; 186(11):1819-1829.
253. Villadangos JA, Young L. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity*. 2008;29(3):352-361.
254. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245-252.

255. Steinman RM, Lustig DS, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *J Exp Med.* 1974;139(6):1431-1449.
256. Hoyer S, Eberlein V, Schuler G, Berking C, Heinzerling L, Schaft N, et al. BRAF and MEK inhibitors affect dendritic-cell maturation and T-cell stimulation. *Int J Mol Sci.* 2021;22(21):11474.
257. Riegel K, Schlöder J, Sobczak M, Jonuleit H, Thiede B, Schild H, et al. RAF kinases are stabilized and required for dendritic cell differentiation and function. *Cell Death Differ.* 2020;27(4):1249-1266.
258. Riegel K, Rajalingam K. The non-linearity of RAF-MEK signaling in dendritic cells. *Cell Cycle.* 2020;19(14):1715-1724.
259. Vella LJ, Pasam A, Dimopoulos N, Andrews M, Knights A, Puaux AL, et al. MEK inhibition, alone or in combination with BRAF inhibition, affects multiple functions of isolated normal human lymphocytes and dendritic cells. *Cancer Immunol Res.* 2014 Apr 1;2(4):351-360.
260. Hoyer S, Eberlein V, Schuler G, Berking C, Heinzerling L, Schaft N, u. a. BRAF and MEK Inhibitors Affect Dendritic-Cell Maturation and T-Cell Stimulation. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021;22:11951.
261. 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 [Internet]. *Oncotarget.* 2018;9(48):28204-28218.
262. Domínguez-Andrés J, Arts RJW, Bekkering S, Bahrar H, Blok BA, de Bree LCJ, et al. In vitro induction of trained immunity in adherent human monocytes. *STAR Protoc.* 2021 Mar 19;2(1):100246.
263. BD Biosciences. Introduction to BD® Cytometric Bead Arrays (CBA) [Internet]. [zitiert am 7. November 2021].
264. FACS and Array Core Facility Universitätsmedizin Mainz. Prinzip der Durchflußzytometrie [Internet]. [zitiert 2021 Nov 7].
265. Triantafilou M, Triantafilou K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol.* 2002 Jun 1;23(6):301-304.
266. Gogolak P, Rethi B, Szatmari I, Lanyi A, Dezso B, Nagy L, et al. Differentiation of CD1a- and CD1a+ monocyte-derived dendritic cells is biased by lipid environment and PPARγ. *Blood* [Internet]. 2007 Jan 15 [zitiert 2022 Oct 22]; 109(2):643-652.
267. Rescigno M, Di Sabatino A. Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. *J Clin Invest* [Internet]. 2009 Sep 1 [zitiert 2022 Oct 22]; 119(9):2441-2450.

268. Kamiloglu S, Sari G, Ozdal T, Capanoglu E. Guidelines for cell viability assays. *Food Front*. 2020 Sep;1(3):332-349.
269. Bent R, Moll L, Grabbe S, Bros M. Interleukin-1 beta: a friend or foe in malignancies? *Int J Mol Sci* [Internet]. 2018 Aug 1 [zitiert 2023 May 11]; 19(8):2155.
270. Amon L, Hatscher L, Heger L, Dudziak D, Lehmann CHK. Harnessing the complete repertoire of conventional dendritic cell functions for cancer immunotherapy. *Pharmaceutics* [Internet]. 2020 Jul 1 [zitiert 2023 May 11]; 12(7):620.
271. Salah A, Wang H, Li Y, Ji M, Ou WB, Qi N, et al. Insights into dendritic cells in cancer immunotherapy: from bench to clinical applications. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Jun 28;9:1422.
272. Dörrie J, Schaft N, Schuler G, Schuler-Thurner B. Therapeutic cancer vaccination with ex vivo RNA-transfected dendritic cells—an update. *Pharmaceutics* [Internet]. 2020 Feb 1 [zitiert 2023 May 11];12(2):133.
273. Kumari N, Dwarakanath BS, Das A, Bhatt AN. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumour Biol* [Internet]. 1. September 2016 [zitiert 12. Februar 2024];37(9):11553–72.
274. Liu Q, Li A, Tian Y, Wu JD, Liu Y, Li T, u. a. The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. 1. Oktober 2016 [zitiert 12. Februar 2024];31:61–71.
275. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2009 [zitiert 5. Februar 2024];27:519–50.
276. Khazim K, Azulay EE, Kristal B, Cohen I. Interleukin 1 gene polymorphism and susceptibility to disease. *Immunol Rev* [Internet]. 2018 Jan [zitiert am 5. Februar 2024];281(1):40–56.
277. Sousa H, Santos AM, Catarino R, Pinto D, Moutinho J, Canedo P, u. a. IL-1RN VNTR polymorphism and genetic susceptibility to cervical cancer in Portugal. *Mol Biol Rep* [Internet]. 2012 [zitiert 5. Februar 2024];39(12):10837–42.
278. Singh H, Sachan R, Goel H, Mittal B. Genetic variants of interleukin-1RN and interleukin-1beta genes and risk of cervical cancer. *BJOG* [Internet]. April 2008 [zitiert 5. Februar 2024];115(5):633–8.
279. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity* [Internet]. 12. Dezember 2013 [zitiert 8. Februar 2024];39(6):1003–18.

280. Cordero MD, Alcocer-Gómez E, Ryffel B. Gain of function mutation and inflammasome driven diseases in human and mouse models. *J Autoimmun* [Internet]. 1. Juli 2018 [zitiert 8. Februar 2024];91:13–22.
281. Zhang Y, Sacconi S, Shin H, Nikolajczyk BS. Dynamic Protein Associations Define Two Phases of IL-1 β Transcriptional Activation. *J Immunol* [Internet]. 1. Juli 2008 [zitiert 23. April 2025];181(1):503.
282. Bhat IA, Naykoo NA, Qasim I, Ganie FA, Yousuf Q, Bhat BA, u. a. Association of interleukin 1 beta (IL-1 β) polymorphism with mRNA expression and risk of non small cell lung cancer. *Meta Gene* [Internet]. 2014 [zitiert 5. Februar 2024];2(1):123.
283. Man SM, Kanneganti T-D. Regulation of inflammasome activation. *Immunol Rev* [Internet]. 2015 Jan [zitiert am 5. Februar 2024];265(1):6–21.
284. Zhang G, Zhou B, Li S, Yue J, Yang H, Wen Y, u. a. Allele-specific induction of IL-1 β expression by C/EBP β and PU.1 contributes to increased tuberculosis susceptibility. *PLoS Pathog* [Internet]. 1. Oktober 2014 [zitiert 8. Februar 2024];10(10).
285. Cubino N, Montilla C, Usategui-Martín R, Cieza-Borrela C, Carranco T, Calero-Paniagua I, u. a. Association of IL1B (-511 A/C) and IL6 (-174 G > C) polymorphisms with higher disease activity and clinical pattern of psoriatic arthritis. *Clin Rheumatol* [Internet]. 1. Juli 2016 [zitiert 8. Februar 2024];35(7):1789–94.
286. Xu H, Ding Q, Jiang HW. Genetic polymorphism of interleukin-1A (IL-1A), IL-1B, and IL-1 receptor antagonist (IL-1RN) and prostate cancer risk. *Asian Pac J Cancer Prev* [Internet]. 2014 [zitiert 8. Februar 2024];15(20):8741–7.
287. Thawer A, Miller WH, Gregorio N, Claveau J, Rajagopal S, Savage KJ, u. a. Management of Pyrexia Associated with the Combination of Dabrafenib and Trametinib: Canadian Consensus Statements. *Current Oncology* [Internet]. 1. Oktober 2021 [zitiert 8. Februar 2024];28(5):3537.
288. Dinarello CA. An expanding role for interleukin-1 blockade from gout to cancer. *Mol Med* [Internet]. 16. Dezember 2014 [zitiert 8. Februar 2024];20 Suppl 1(Suppl 1):S43–58. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25549233/>
289. Gutenberg Open Science: Off-Target-Effekte des BRAF-Inhibitors Dabrafenib in humanen Immunzellen [Internet]. [zitiert 7. Februar 2024].
290. Kulkarni D, Song K, Briley L, King K, Dabrowski C, Mookerjee B, u. a. Pyrexia in dabrafenib-treated melanoma patients is not associated with common genetic variation or HLA polymorphisms. *Pharmacogenomics* [Internet]. 1. April 2016 [zitiert 7. Februar 2024];17(5):459–62.

291. Dominici R, Cattaneo M, Malferrari G, Archi D, Mariani C, Grimaldi L, et al. Cloning and functional analysis of the allelic polymorphism in the transcription regulatory region of interleukin-1 α . *Immunogenetics*. 2002;54(2):82-86.
292. Toda Y, Tsukada J, Misago M, Kominato Y, Auron PE, Tanaka Y. Autocrine induction of the human pro-IL-1beta gene promoter by IL-1beta in monocytes. *J Immunol* [Internet]. 15. Februar 2002 [zitiert 10. Februar 2024];168(4):1984–91.
293. Zhang Y, Rom WN. Regulation of the interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene by mycobacterial components and lipopolysaccharide is mediated by two nuclear factor-IL6 motifs. *Mol Cell Biol* [Internet]. 1. Juni 1993 [zitiert 10. Februar 2024];13(6):3831–7. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7684503/>.
294. Fenton MJ. Review: transcriptional and post-transcriptional regulation of interleukin 1 gene expression. *Int J Immunopharmacol*. 1992;14(3):401-411.
295. Schilling B, Paschen A. Immunological consequences of selective BRAF inhibitors in malignant melanoma: neutralization of myeloid-derived suppressor cells. *Oncoimmunology* [Internet]. 1. August 2013 [zitiert am 13. August 2023];2(8):e25218.
296. Hartman ML, Rozanski M, Osrodek M, Zalesna I, Czyz M. Vemurafenib and trametinib reduce expression of CTGF and IL-8 in V600EBRAF melanoma cells. *Lab Invest*. 2017 Feb 1;97(2):217-227.
297. Evans WE, Relling M V. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* [Internet]. 15. Oktober 1999 [zitiert 9. Februar 2024];286(5439):487–91. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10521338/>
298. Tan S, Hall IP, Dewar J, Dow E, Lipworth B. Association between beta 2-adrenoceptor polymorphism and susceptibility to bronchodilator desensitisation in moderately severe stable asthmatics. *Lancet* [Internet]. 4. Oktober 1997 [zitiert 9. Februar 2024];350(9083):995–9.
299. Pickar D, Rubinow K. Pharmacogenomics of psychiatric disorders. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 1. Februar 2001 [zitiert 9. Februar 2024];22(2):75–83.
300. Pirmohamed M, Park BK. Genetic susceptibility to adverse drug reactions. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 1. Juni 2001 [zitiert 9. Februar 2024];22(6):298–305.
301. Holderfield M, Nagel TE, Stuart DD. Mechanism and consequences of RAF kinase activation by small-molecule inhibitors. *British Journal of Cancer* 2014 111:4 [Internet]. 18. März 2014 [zitiert 12. Februar 2024];111(4):640–5.

302. Callahan MK, Masters G, Pratilas CA, Ariyan C, Katz J, Kitano S, et al. Paradoxical activation of T cells via augmented ERK signaling mediated by a RAF inhibitor. *Cancer Immunol Res* [Internet]. 2014 Jan 1 [zitiert 2024 Feb 12];2(1):70-79.
303. Ebert PJR, Cheung J, Yang Y, McNamara E, Hong R, Moskalenko M, et al. MAP kinase inhibition promotes T cell and anti-tumor activity in combination with PD-L1 checkpoint blockade. *Immunity*. 2016 Mar 15;44(3):609-621.
304. Jung T, Haist M, Kuske M, Grabbe S, Bros M. Immunomodulatory properties of BRAF and MEK inhibitors used for melanoma therapy—paradoxical ERK activation and beyond. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 [zitiert 2024 Feb 12]; 22(18):9890.
305. Heinzerling L, Eigentler TK, Fluck M, Hassel JC, Heller-Schenck D, Leipe J, et al. Tolerability of BRAF/MEK inhibitor combinations: adverse event evaluation and management. *ESMO Open*. 2019 Jan 1;4(3):e000491.
306. Delord JP, Robert C, Nyakas M, McArthur GA, Kudchakar R, Mahipal A, u. a. Phase I Dose-Escalation and -Expansion Study of the BRAF Inhibitor Encorafenib (LGX818) in Metastatic BRAF-Mutant Melanoma. *Clin Cancer Res* [Internet]. 15. September 2017 [zitiert 9. Februar 2024];23(18):5339–48.
307. Petrelli F, Ardito R, Merelli B, Lonati V, Cabiddu M, Seghezzi S, u. a. Prognostic and predictive role of elevated lactate dehydrogenase in patients with melanoma treated with immunotherapy and BRAF inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *Melanoma Res* [Internet]. 1. Februar 2019 [zitiert 9. Februar 2024];29(1):1–12.
308. Infante JR, Fecher LA, Falchook GS, Nallapareddy S, Gordon MS, Becerra C, u. a. Safety, pharmacokinetic, pharmacodynamic, and efficacy data for the oral MEK inhibitor trametinib: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet Oncol* [Internet]. August 2012 [zitiert 9. Februar 2024];13(8):773–81.
309. Falchook GS, Lewis KD, Infante JR, Gordon MS, Vogelzang NJ, DeMarini DJ, u. a. Activity of the oral MEK inhibitor trametinib in patients with advanced melanoma: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet Oncol* [Internet]. August 2012 [zitiert 9. Februar 2024];13(8):782–9.
310. Adelman CH, Ching G, Du L, Saporito RC, Bansal V, Pence LJ, u. a. Comparative profiles of BRAF inhibitors: the paradox index as a predictor of clinical toxicity. *Oncotarget* [Internet]. 5. Mai 2016 [zitiert 9. Februar 2024];7(21):30453.
311. Cheng Y, Tian H. Current Development Status of MEK Inhibitors. *Molecules* [Internet]. 1. Oktober 2017 [zitiert 10. Februar 2024];22(10).

312. Fagiolo U, Cossarizza A, Scala E, Fanales-Belasio E, Ortolani C, Cozzi P, et al. Increased cytokine production in mononuclear cells of healthy elderly people. *Eur J Immunol* [Internet]. 1993 [zitiert 2024 Feb 5];23(9):2375-2378.
313. Gender differences in IL-1 alpha, IL-1 beta, and IL-1 receptor antagonist secretion from mononuclear cells and urinary excretion - PubMed [Internet]. [zitiert 5. Februar 2024]. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8207243/>
314. Ellinghaus D, Degenhardt F, Bujanda L, Buti M, Albillos A, Invernizzi P, et al. Genomewide association study of severe Covid-19 with respiratory failure. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Oct 15 [zitiert 2025 Jan 12]; 383(16):1522-1534.
315. Machill AR. Hepatopathie bei COVID-19 in Abhängigkeit von Risikofaktoren [Internet]. 2021 [zitiert 2025 Jan 12].
316. Bromberger S, Schossleitner K, Ressler JM, et al. Off-targets of BRAF inhibitors disrupt endothelial signaling and vascular barrier function. *Life Sci Alliance* [Internet]. 5. Juni 2024 [zitiert am 10. Februar 2024];7(8):e202402671.
317. Auron PE, Webb AC. The structure and regulation of the human prointerleukin-1 beta gene. *Ann Inst Pasteur Immunol*. 1987;138(3):462-469.
318. Aguilera-Montilla N, Chamorro S, Nieto C, Sánchez-Cabo F, Dopazo A, Fernández-Salguero PM, et al. Aryl hydrocarbon receptor contributes to the MEK/ERK-dependent maintenance of the immature state of human dendritic cells. *Blood* [Internet]. 2013 Apr 11 [zitiert 2024 Feb 12];121(15):e1-e11.
319. Nakahara T, Moroi Y, Uchi H, Furue M. Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and Th1/Th2 engagement. *J Dermatol Sci* [Internet]. 2006 Apr [zitiert 2024 Feb 12];42(1):1-11.
320. Callahan MK, Masters G, Pratilas CA, Ariyan C, Katz J, Kitano S, et al. Paradoxical activation of T cells via augmented ERK signaling mediated by a RAF inhibitor. *Cancer Immunol Res* [Internet]. 2014 Jan 1 [zitiert 2024 Feb 12]; 2(1):70-79. Verfügbar über: <https://cancerimmunolres.aacrjournals.org/content/2/1/70>.
321. Vosganian GS, Bos R, Sherman LA. Immunologic effects of an orally available BRAFV600E inhibitor in BRAF wild-type murine models. *J Immunother* [Internet]. 2012 Jul [zitiert 2024 Feb 12];35(6): 473-477.
322. 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* [Internet]. 2010 Dec 12 [zitiert 2024 Feb 7]; 16(24):6040-6048.

323. Riegel K, Rajalingam K. The non-linearity of RAF-MEK signaling in dendritic cells. *Cell Cycle* [Internet]. 2020 Sep 16 [zitiert 2024 Feb 12]; 19(18):2249-2259.
324. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* [Internet]. 2013 Jul 25 [zitiert 2024 Feb 7]; 39(1):1-10. Verfügbar über: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23890059/>.
325. Bradley SD, Chen Z, Melendez B, Talukder A, Khalili JS, Rodriguez-Cruz T, et al. BRAFV600E co-opts a conserved MHC class I internalization pathway to diminish antigen presentation and CD8+ T-cell recognition of melanoma. *Cancer Immunol Res* [Internet]. 2015 Jun 1 [zitiert 2024 Feb 7]; 3(6):602-609.
326. Ho PC, Meeth KM, Tsui YC, Srivastava B, Bosenberg MW, Kaech SM. Immune-based antitumor effects of BRAF inhibitors rely on signaling by CD40L and IFN γ . *Cancer Res* [Internet]. 2014 Jun 15 [zitiert 2024 Feb 7]; 74(12): 3205-3217.
327. Kuske M, Westphal D, Wehner R, Schmitz M, Beissert S, Praetorius C, et al. Immunomodulatory effects of BRAF and MEK inhibitors: implications for melanoma therapy. *Pharmacol Res*. 2018 Oct 1;136:151-159.
328. Colegio OR, Chu NQ, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, Jairam V, u. a. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature* [Internet]. 25. September 2014 [zitiert 7. Februar 2024];513(7519):559–63. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25043024/>.
329. Hooijkaas AI, Gadiot J, Morrow M, Stewart R, Schumacher TN, Blank CU. Selective BRAF inhibition decreases tumor-resident lymphocyte frequencies in a mouse model of human melanoma. *Oncoimmunology* [Internet]. 2012 [zitiert am 7. Februar 2024];1(5):609–617.
330. Jeong SR, Kang M. Exploring Tumor–Immune Interactions in Co-Culture Models of T Cells and Tumor Organoids Derived from Patients. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 1. Oktober 2023 [zitiert am 26. Juli 2024];24(19):14609.
331. Goyeneche AA, Fonseca C, Abdouh M, Burnier J, Eller A, Santos C, et al. Uveal melanoma and peripheral blood mononuclear cells co-culture induced an immunosuppressive phenotype. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2024 Jun 17;65(7):2262.
332. Khalili JS, Liu S, Rodríguez-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* [Internet]. 2012 Oct 1 [zitiert 2025 Jan 11];18(19):5329-5339.

333. Flower L, Gray R, Pinkney J, Mohamed-Ali V. Stimulation of interleukin-6 release by interleukin-1 β from isolated human adipocytes. *Cytokine*. 2003 Jan 7;21(1):32-37.
334. Tipton DA, Pabst MJ, Dabbous MK. Interleukin-1 β - and tumor necrosis factor- α -independent monocyte stimulation of fibroblast collagenase activity. *J Cell Biochem*. 1990;44(4):253-264.
335. Flower L, Ahuja RH, Humphries SE, Mohamed-Ali V. Effects of sample handling on the stability of interleukin-6, tumour necrosis factor-alpha and leptin. *Cytokine* [Internet]. 2000 [zitiert 2024 Feb 5]; 12(11): 1712-1716.
336. Schuett H, Luchtefeld M, Grothusen C, Grote K, Schieffer B. How much is too much? Interleukin-6 and its signalling in atherosclerosis. *Thromb Haemost* [Internet]. 2009 Aug [zitiert 2023 Aug 12]; 102(2):215-222.
337. Murphy PG, Grondin J, Altares M, Richardson PM. Induction of interleukin-6 in axotomized sensory neurons. *The Journal of Neuroscience* [Internet]. 7. Juli 1995 [zitiert 23. Juli 2023];15(7):5130.
338. Conciatori F, Bazzichetto C, Azzurra Amoreo C, Sperduti I, Donzelli S, Diodoro MG, u. a. BRAF status modulates Interleukin-8 expression through a CHOP-dependent mechanism in colorectal cancer. [zitiert 13. August 2023].
339. Arozarena I, Wellbrock C. Overcoming resistance to BRAF inhibitors. *Ann Transl Med* [Internet]. 1. Oktober 2017 [zitiert 11. Januar 2025];5(19):1–12.
340. Arthur JSC, Ley SC. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat Rev Immunol* [Internet]. August 2013 [zitiert 11. Januar 2025];13(9):679–92.
341. Hu-Lieskovan S, Mok S, Homet Moreno B, Tsoi J, Robert L, Goedert L, u. a. Improved antitumor activity of immunotherapy with BRAF and MEK inhibitors in BRAF(V600E) melanoma. *Sci Transl Med* [Internet]. 18. März 2015 [zitiert 11. Januar 2025];7(279). Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25787767/>
342. Ciuffreda L, Del Bufalo D, Desideri M, Di Sanza C, Stoppacciaro A, Ricciardi MR, u. a. Growth-inhibitory and antiangiogenic activity of the MEK inhibitor PD0325901 in malignant melanoma with or without BRAF mutations. *Neoplasia* [Internet]. 2009 [zitiert 11. Januar 2025];11(8):720–31.

8 Anhang

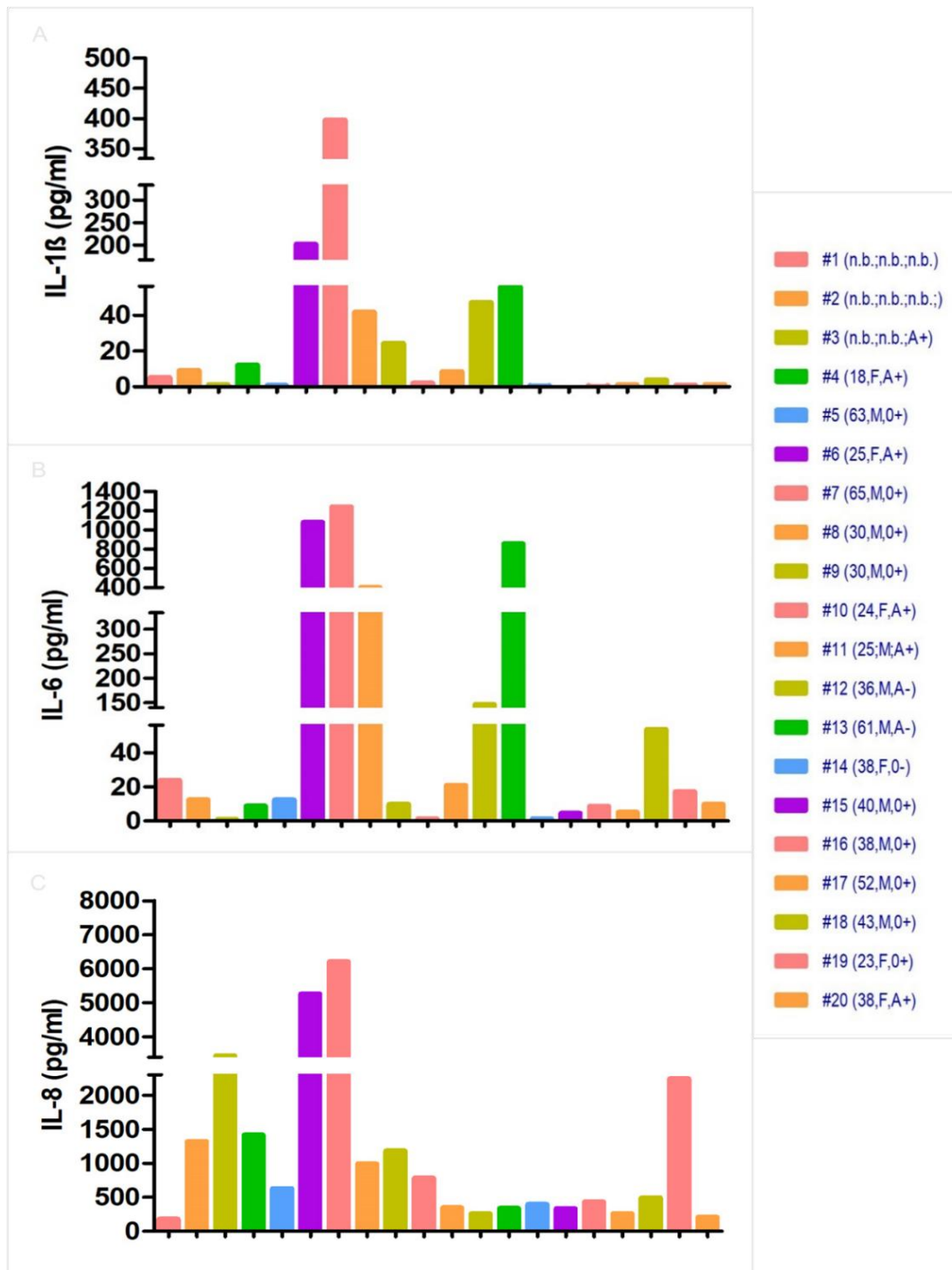


Abbildung 27: Basale Konzentration von Interleukin-(IL)-1 β -, IL-6- und IL-8 Sekretion von Peripheral blood mononuclear cells (PBMC). 2×10^6 /ml PBMC gesunder Spender wurden in 96 Well-Platten ausgesät (jeweils 50 μ l). Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden die Überstände abgenommen. Mittels Cytometric Bead Array (CBA) wurde die IL-1 β - (A), IL-6- (B) und IL-8-Produktion (C) bestimmt. Angegeben sind nach der Probandennummer (#) das Alter (Jahre), das Geschlecht (F/M) und die Blutgruppe der Spender. Als Negativkontrolle wurden PBMC mit Dimethylsulfoxid (DMSO) (1 %) behandelt. Das Diagramm zeigt die IL-1 β -Konzentrationen in pg/ml (eigene Abbildung).

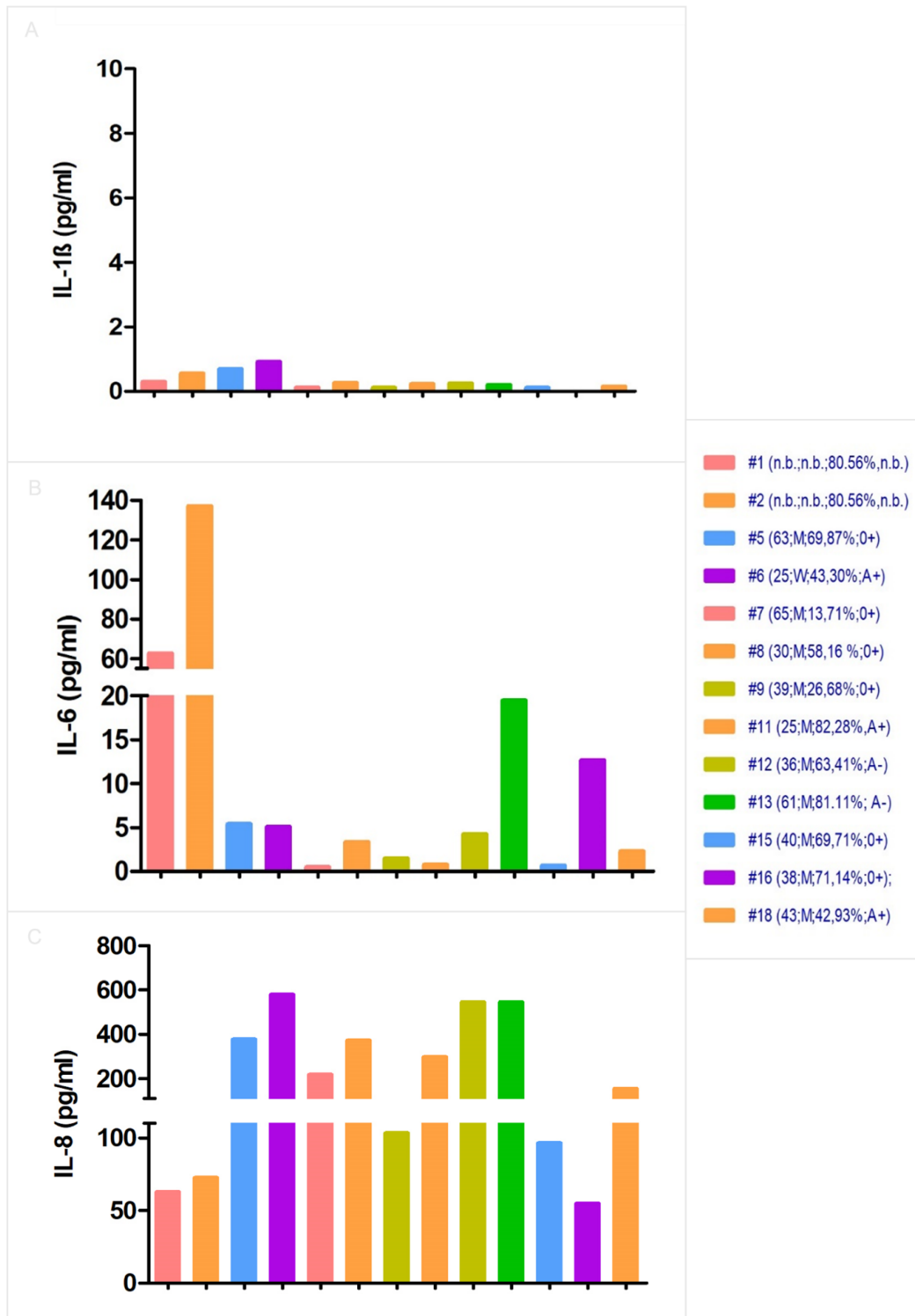


Abbildung 28: Basale Konzentration von Interleukin-(IL)-1 β -, IL-6- und IL-8 Sekretion von Monocyte derived dendritic cells (MO-DC). Von Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) Spendern wurden durch Plastikadhäsion Monozyten von den restlichen Zellen separiert und 6 d lang jeden zweiten Tag mit 11 μ l IL-4/ Granulocyte-colony-stimulating-factor (GM-CSF) (20 ng/ml) behandelt. Die gewonnenen MO-DC (2×10^6 Zellen/ml) wurden mit Dimethylsulfoxid (DMSO) (50 μ l) über Nacht behandelt (37 °C, 5 % CO₂). Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden die Überstände abgenommen. Mittels Cytometric Bead Array (CBA) wurde die IL-1 β - (A), IL-6- (B) und IL-8-Produktion (C) gemessen. Angegeben sind nach der Probandennummer (#) das Alter (Jahre), das Geschlecht (F/M) und der Anteil der CD14- CD1c+ Zellen (in %). Das Diagramm zeigt die IL-Konzentrationen in pg/ml (eigene Abbildung).

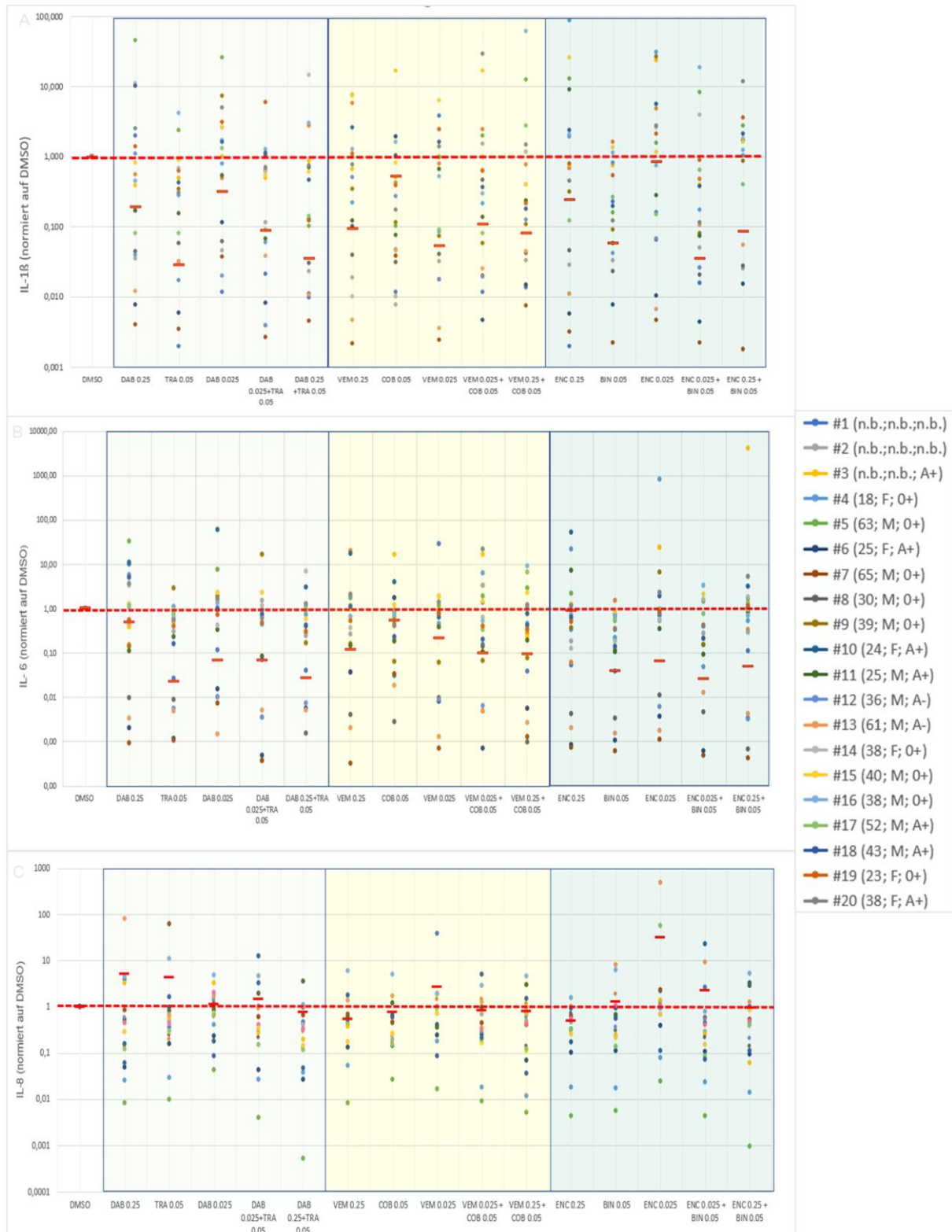


Abbildung 29: Einfluss von BRAFi und/oder MEKi auf die Interleukin-(IL)-1 β , IL-6 und IL-8 Sekretion von Peripheral blood mononuclear cells (PBMC). 2×10^6 /ml PBMC gesunder Spender wurden in 96 Well-Platten ausgesät (jeweils 50 μ l) und mit 1 μ g/ml R848 (50 μ l) über Nacht behandelt (37 $^{\circ}$ C, 5 % CO $_2$). Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden die Überstände abgenommen. Mittels Cytometric Bead Array (CBA) wurde die IL-1 β - (A), IL-6- (B) und IL-8-Produktion (C) gemessen. Angegeben sind nach der Probandennummer (#) das Alter (Jahre), das Geschlecht (F/M) und die Blutgruppe der Spender. Als Negativkontrolle wurden PBMC mit Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelt. Das Diagramm zeigt die IL-Konzentrationen normiert auf die Konzentration in der DMSO-Kontrolle (eigene Abbildung).

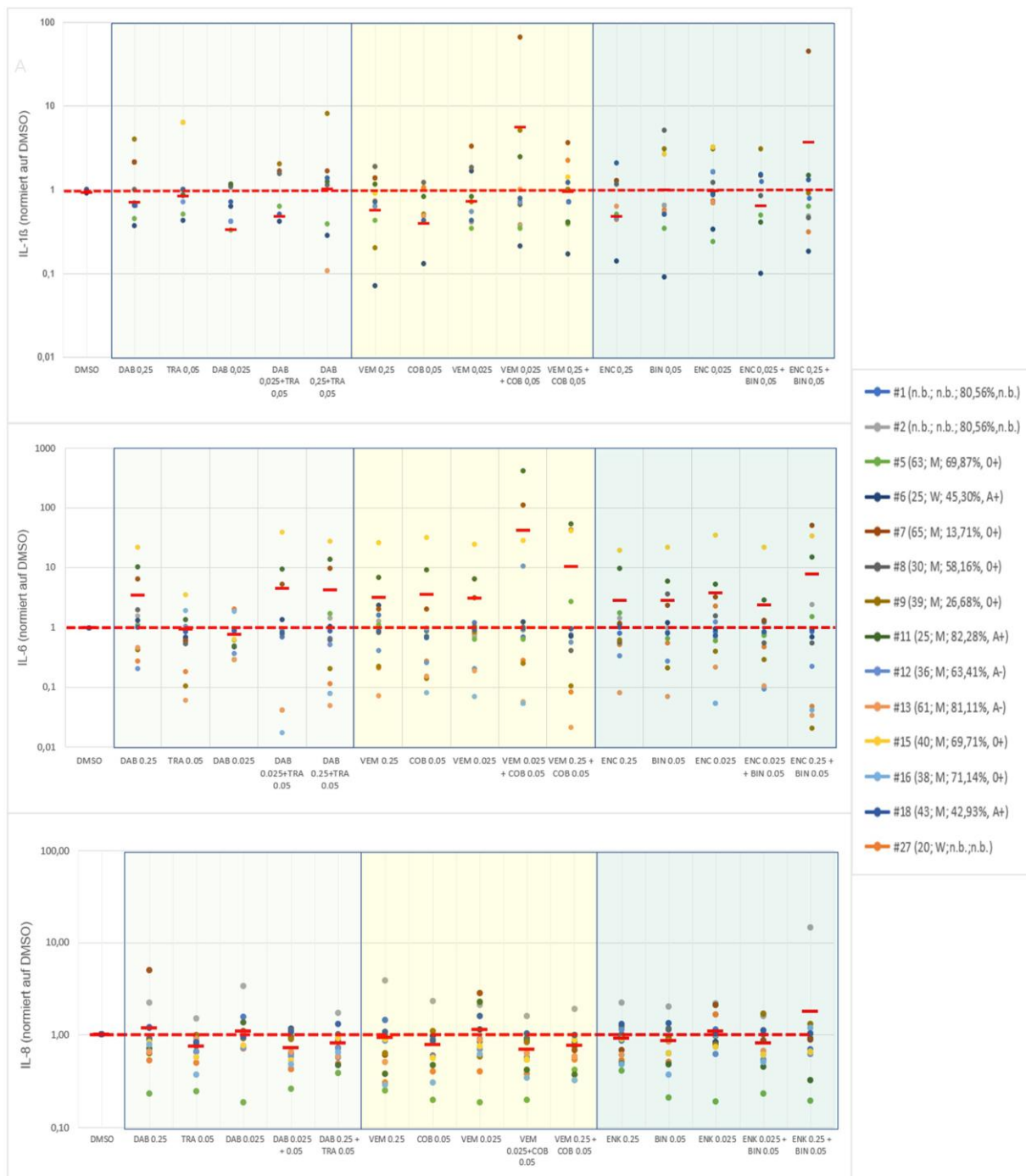


Abbildung 30: Einfluss von BRAFi und/oder MEKi auf die Interleukin-(IL)-1 β -, IL-6- und IL-8-Sekretion in Monocyte derived dendritic cells (MO-DC). Von den Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) Spendern wurden durch Plastikadhäsion Monozyten von den restlichen Zellen separiert und 6 d lang jeden zweiten Tag mit 11 μ l IL-4/ Granulocyte-colony-stimulating-factor (GM-CSF)(20 ng/ml) behandelt. Die gewonnenen MO-DC (2 x 10⁶ Zellen/ml) wurden mit 1 μ g/ml R848 (50 μ l) über Nacht behandelt (37 °C, 5 % CO₂). Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden die Überstände abgenommen. Mittels Cytometric Bead Array (CBA) wurde die IL-1 β - (A), IL-6- (B) und IL-8-Produktion (C) gemessen. Angegeben sind nach der Probandennummer (#) das Alter (Jahre), das Geschlecht (F/M) und der Anteil der CD14- CD1c+ Zellen (in %). Als Negativkontrolle wurden PBMC mit Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelt. Das Diagramm zeigt die IL-Konzentrationen normiert auf die Konzentration in der DMSO-Kontrolle (eigene Abbildung).

Spender BRAFi	Spender													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
DAB 0.25 µM	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
VEM 0.25 µM	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ENC 0.25 µM	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-

Spender BRAFi	Spender													
	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	
DAB 0.25 µM	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
VEM 0.25 µM	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	
ENC 0.25 µM	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	

Tabelle 12: Interleukin-(IL)-1 β Responsivität der Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) der Spender 1– 27 gegenüber den BRAFi Dabrafenib (DAB), Vemurafenib (VEM) und Encorafenib ENC, jeweils 0.25 µM.
 + Responder mit einer IL-1 β -Konzentration $\geq 1,5$ x Dimethylsulfoxid-(DMSO)-Kontrollwert nach BRAFi-Inkubation;
 - Non-Responder mit einer IL-1 β -Konzentration $< 1,5$ x DMSO-Kontrollwert nach BRAFi-Inkubation. BRAFi = v-rat fibrosarcoma (Raf) murine sarcoma viral oncogene homolog B Inhibitoren.

Spender BRAFi	Spender													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
DAB 0.25 µM	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
VEM 0.25 µM	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
ENC 0.25 µM	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-

Spender BRAFi	Spender													
	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	
DAB 0.25 µM	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	
VEM 0.25 µM	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	
ENC 0.25 µM	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	

Tabelle 13: Interleukin-(IL)-6 Responsivität der Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) der Spender 1– 27 gegenüber den BRAFi Dabrafenib (DAB), Vemurafenib (VEM) und Encorafenib (ENC, jeweils 0.25 µM).
 + Responder mit einer IL-1 β -Konzentration $\geq 1,5$ x Dimethylsulfoxid-(DMSO)-Kontrollwert nach BRAFi-Inkubation;
 - Non-Responder mit einer IL-1 β -Konzentration $< 1,5$ x DMSO-Kontrollwert nach BRAFi-Inkubation. BRAFi = v-rat fibrosarcoma (Raf) murine sarcoma viral oncogene homolog B Inhibitoren

Spender BRAFi	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
DAB 0.25 µM	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
VEM 0.25 µM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
ENC 0.25 µM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Spender BRAFi	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
DAB 0.25 µM	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
VEM 0.25 µM	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
ENC 0.25 µM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 14: Interleukin-(IL)-8 Responsivität der Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) der Spender 1–27 gegenüber den BRAFi Dabrafenib (DAB), Vemurafenib (VEM) und Encorafenib (ENC, jeweils 0.25 µM).
 + Responder mit einer IL-1β-Konzentration $\geq 1,5$ x Dimethylsulfoxid-(DMSO)-Kontrollwert nach BRAFi-Inkubation;
 - Non-Responder mit einer IL-1β-Konzentration $< 1,5$ x DMSO-Kontrollwert nach BRAFi-Inkubation. BRAFi = v-rat fibrosarcoma (Raf) murine sarcoma viral oncogene homolog B Inhibitoren.

Spender BRAFi	1	2	5	6	7	8	9	11	12	13	15	16	18	27
DAB 0.25 µM	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
VEM 0.25 µM	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
ENC 0.25 µM	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-

Tabelle 15: Interleukin-(IL)-6 Responsivität der aus Monocyte derived dendritic cells (MO-DC) der Spender 1–27 gegenüber den BRAFi Dabrafenib (DAB), Vemurafenib (VEM) und Encorafenib (ENC, jeweils 0.25 µM).
 + Responder mit einer IL-6-Konzentration $\geq 1,5$ x Dimethylsulfoxid-(DMSO)-Kontrollwert nach BRAFi-Inkubation;
 - Non-Responder mit einer IL-6-Konzentration $< 1,5$ x DMSO-Kontrollwert nach BRAFi-Inkubation. BRAFi = v-rat fibrosarcoma (Raf) murine sarcoma viral oncogene homolog B Inhibitoren.

Spender BRAFi	Spender													
	1	2	5	6	7	8	9	11	12	13	15	16	18	27
DAB 0.25 µM	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VEM 0.25 µM	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ENC 0.25 µM	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 16: Interleukin-(IL)-8 Responsivität der aus Monocyte derived dendritic cells (MO-DC) der Spender 1– 27 gegenüber den BRAFi Dabrafenib (DAB), Vemurafenib (VEM) und Encorafenib (ENC, jeweils 0.25 µM). + Responder mit einer IL-6-Konzentration $\geq 1,5 \times$ Dimethylsulfoxid-(DMSO)-Kontrollwert nach BRAFi-Inkubation; - Non-Responder mit einer IL-6-Konzentration $< 1,5 \times$ DMSO-Kontrollwert nach BRAFi-Inkubation. BRAFi = v-rat fibrosarcoma (Raf) murine sarcoma viral oncogene homolog B Inhibitoren

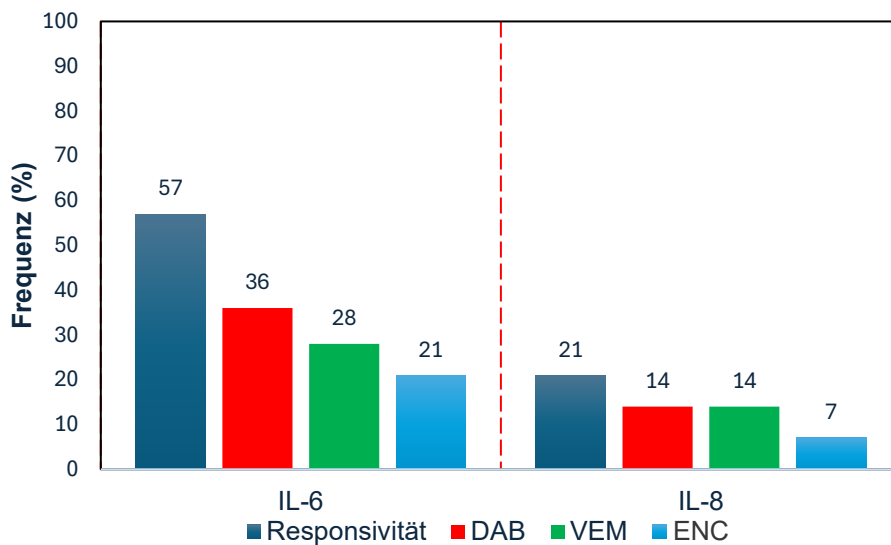
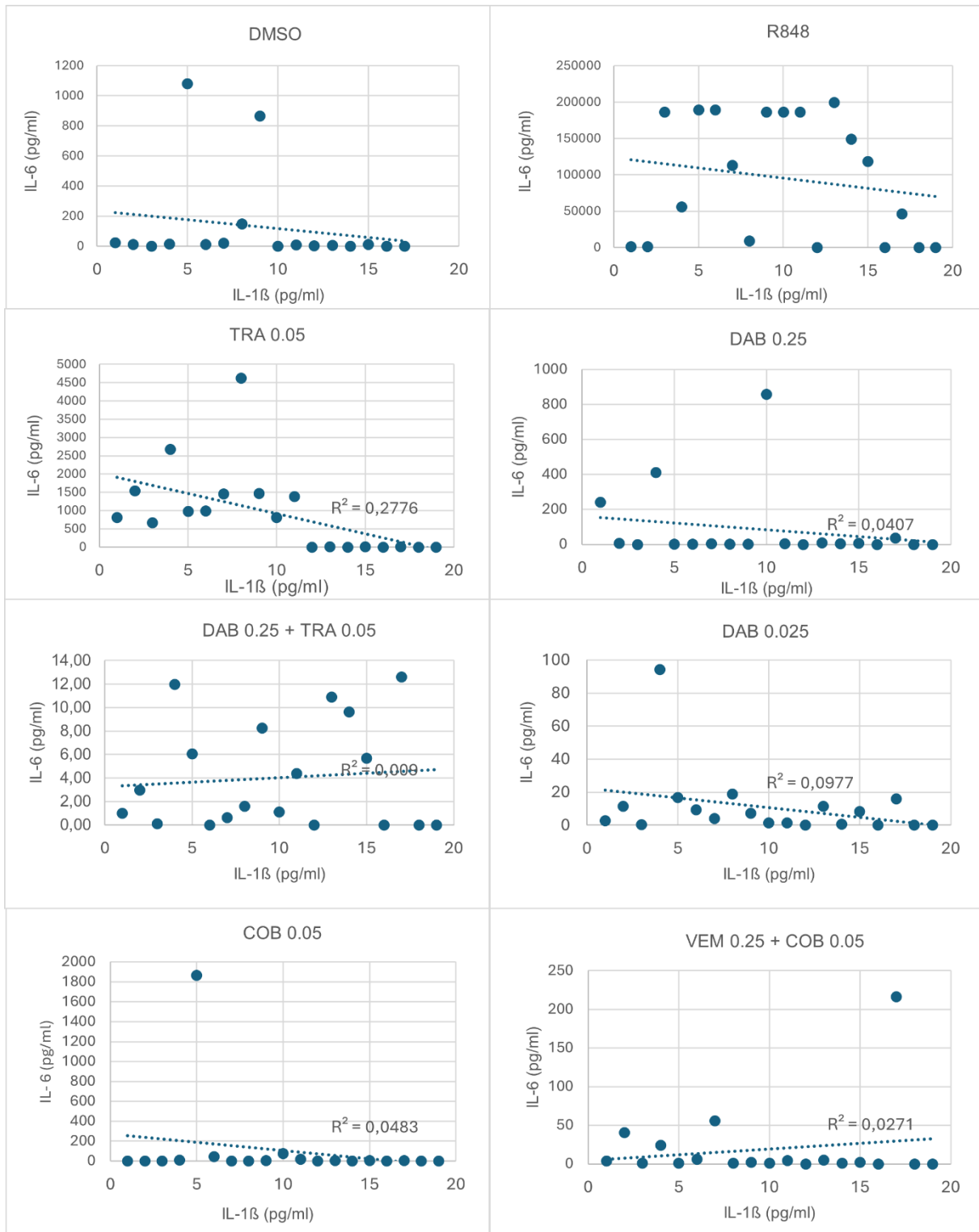


Abbildung 31: Mittlere Frequenz der Responsivität von monocyte-derived dendritic cells (MO-DCs) auf eine Behandlung mit BRAF-Inhibitoren (BRAFi) hinsichtlich der Produktion von Interleukin-(IL)-6 und IL-8. PBMCs wurden mit Dabrafenib (DAB), Vemurafenib (VEM) oder Encorafenib (ENC) (jeweils 0,25 µM) behandelt. Angegeben ist die durchschnittliche Frequenz (%) der Spender, deren MO-DCs eine erhöhte Sekretion von IL-6 oder IL-8 zeigten. Die IL-1 β -Sekretion lag unterhalb der Nachweisgrenze. BRAFi bezeichnet Inhibitoren des v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B (BRAF).



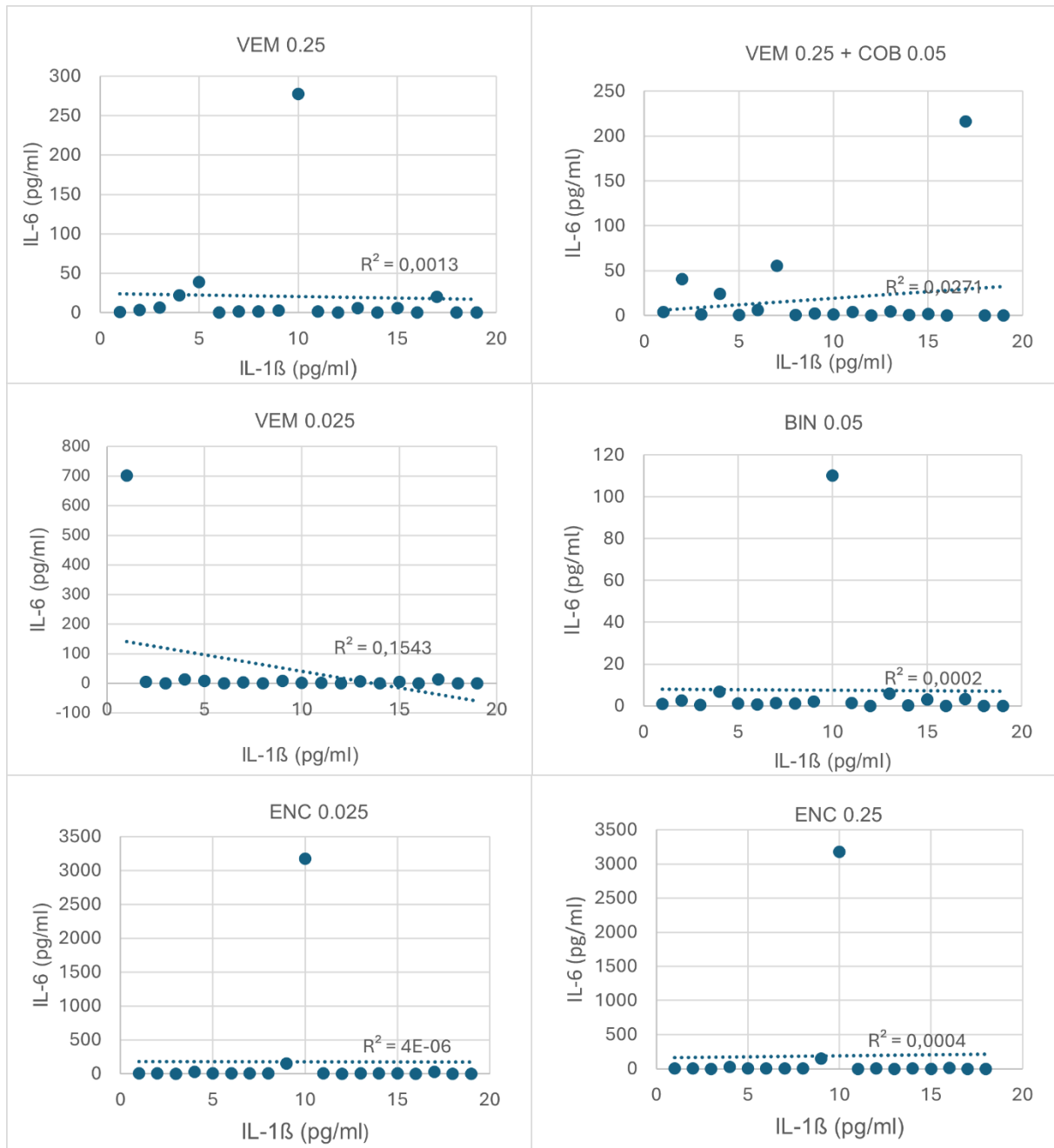
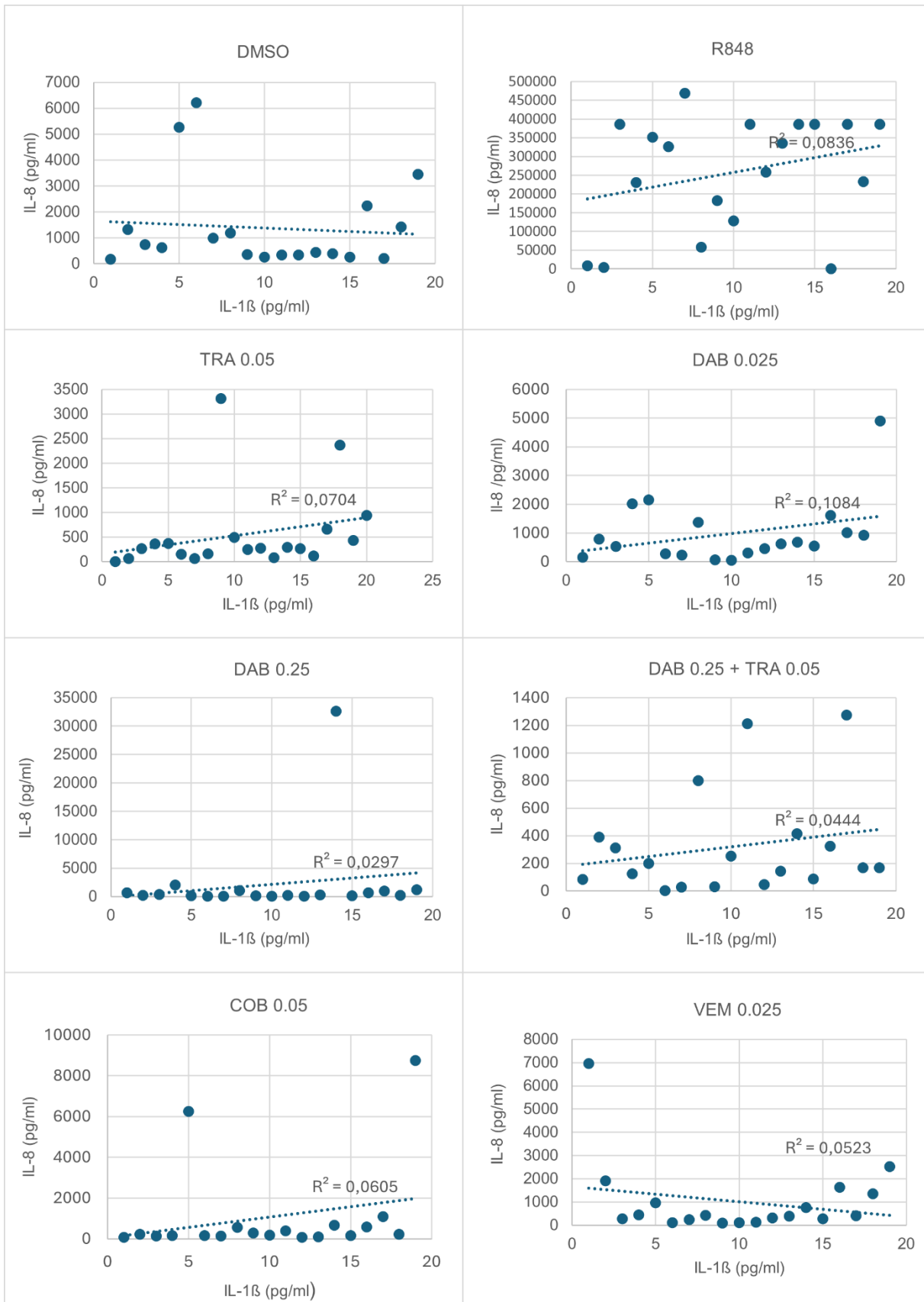


Abbildung 32: Beziehung zwischen der Konzentration von Interleukin-(IL)-1 β (x-Achse) und Interleukin-(IL)-6 (y-Achse) in humanen PBMCs nach Behandlung mit Dabrafenib (DAB), Trametinib (TRA) bzw. DAB + TRA; Vemurafenib (VEM), Binimetinib (BIN) bzw. VEM + BIN; sowie Encorafenib (ENC), Cobimetinib (COB) bzw. ENC + COB. Dimethylsulfoxid (DMSO, 1 %) diente als Lösungsmittelkontrolle, R848 als Positivkontrolle. Es konnte keine Korrelation zwischen der IL-1 β - und IL-6-Sekretion festgestellt werden.



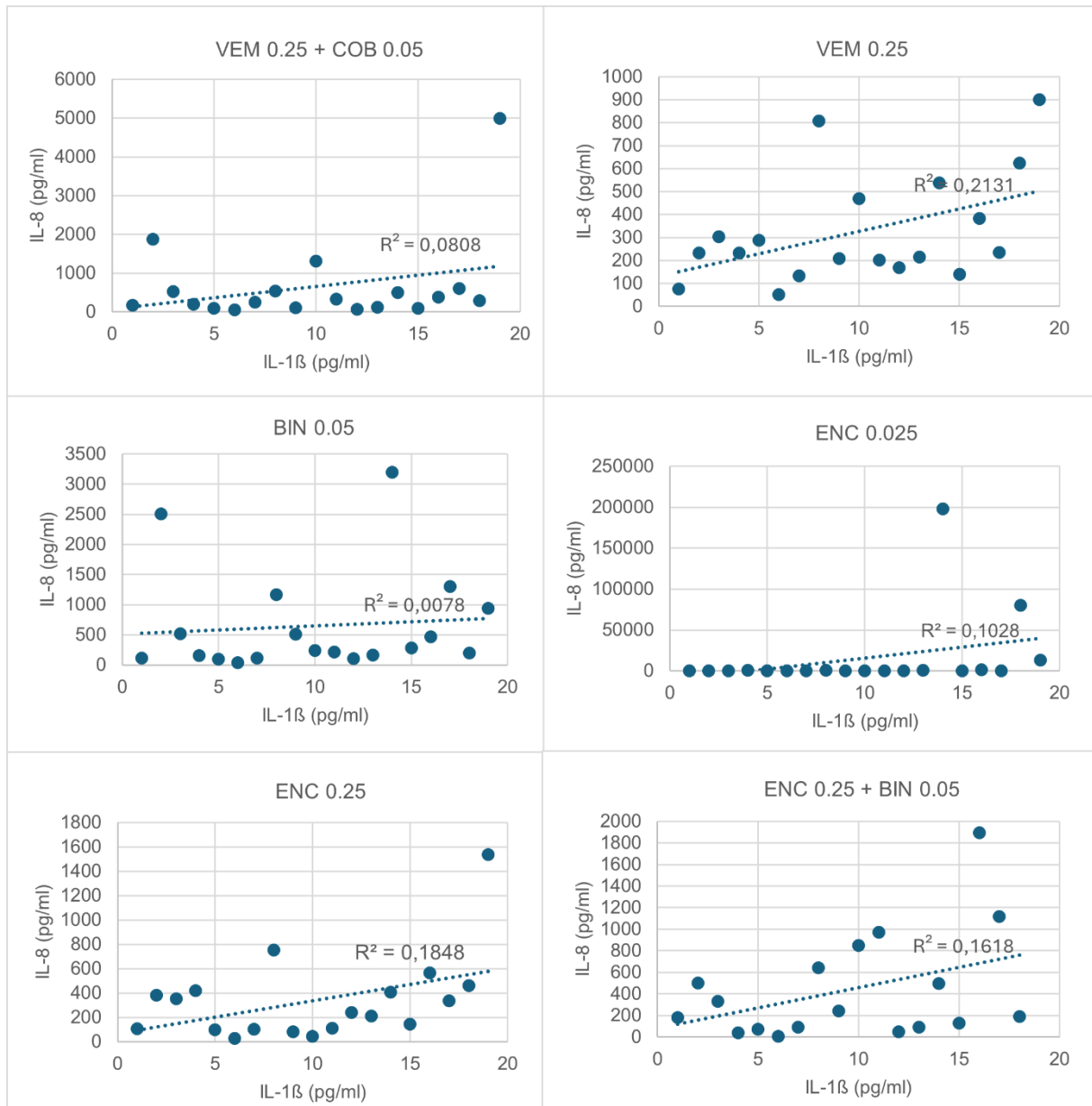
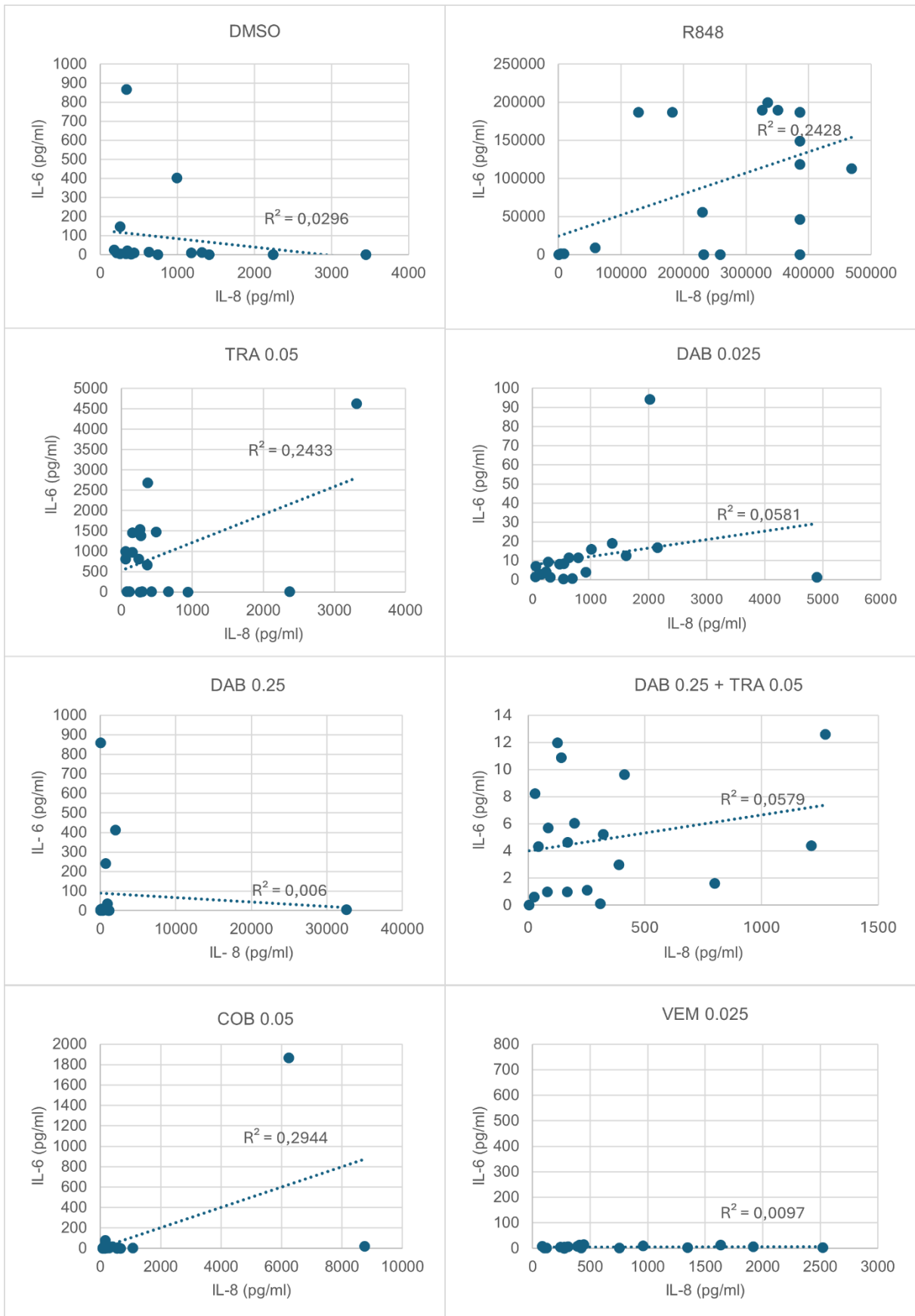


Abbildung 33: Beziehung zwischen der Konzentration von Interleukin-(IL)-1 β (x-Achse) und Interleukin-(IL)-8 (y-Achse) in humanen PBMCs nach Behandlung mit Dabrafenib (DAB), Trametinib (TRA) bzw. DAB + TRA; Vemurafenib (VEM), Binimetinib (BIN) bzw. VEM + BIN; sowie Encorafenib (ENC), Cobimetinib (COB) bzw. ENC + COB. Dimethylsulfoxid (DMSO, 1 %) diente als Lösungsmittelkontrolle, R848 als Positivkontrolle. Es konnte keine Korrelation zwischen der IL-8- und IL-1 β -Sekretion festgestellt werden.



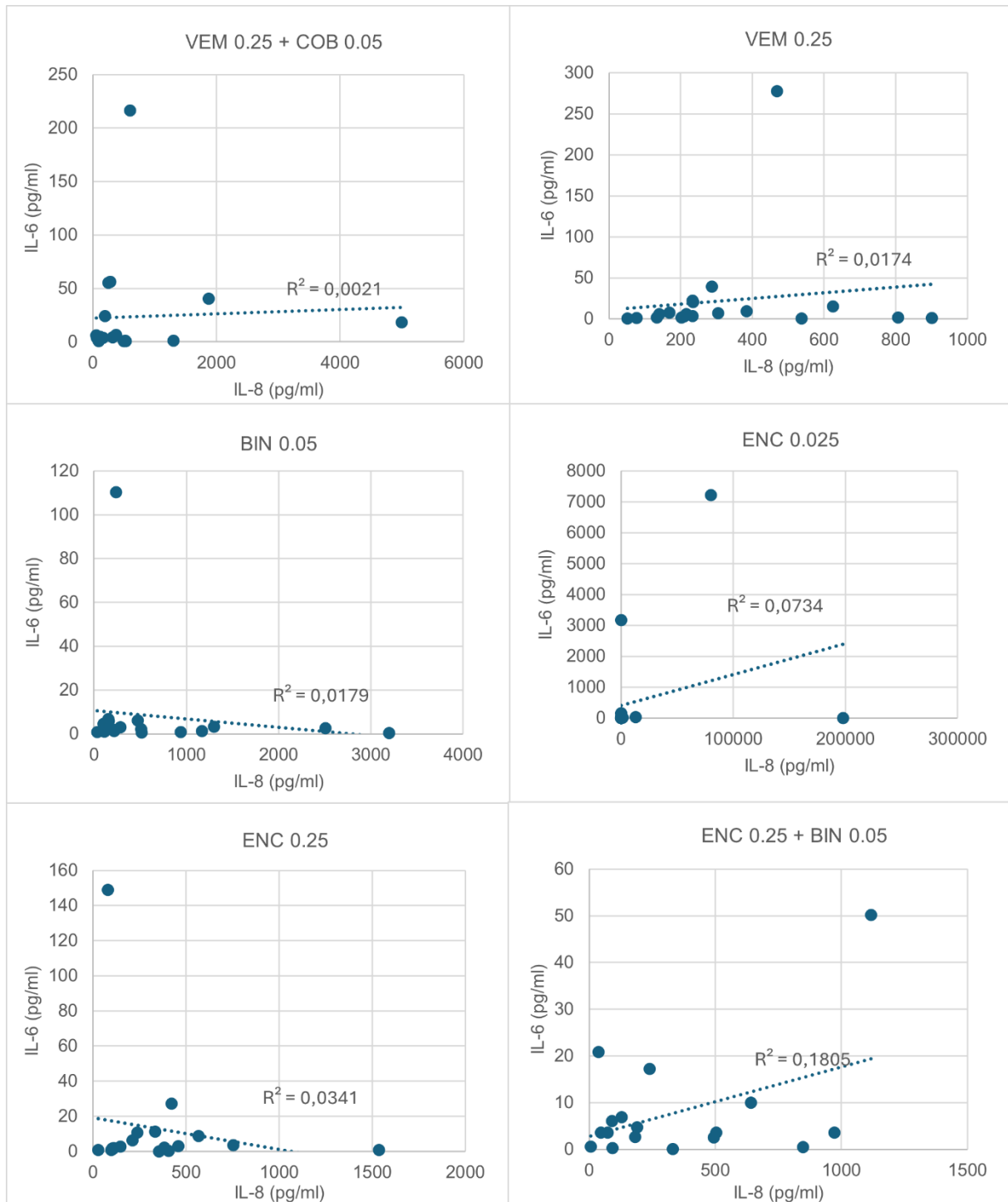


Abbildung 34: Beziehung zwischen der Konzentration von Interleukin-(IL)-8 (x-Achse) und Interleukin-(IL)-6 (y-Achse) in humanen PBMCs nach Behandlung mit Dabrafenib (DAB), Trametinib (TRA) bzw. DAB + TRA; Vemurafenib (VEM), Binimetinib (BIN) bzw. VEM + BIN; sowie Encorafenib (ENC), Cobimetinib (COB) bzw. ENC + COB. Dimethylsulfoxid (DMSO, 1‰) diente als Lösungsmittelkontrolle, R848 als Positivkontrolle. Es konnte keine Korrelation zwischen der IL-8- und IL-6-Sekretion festgestellt werden.

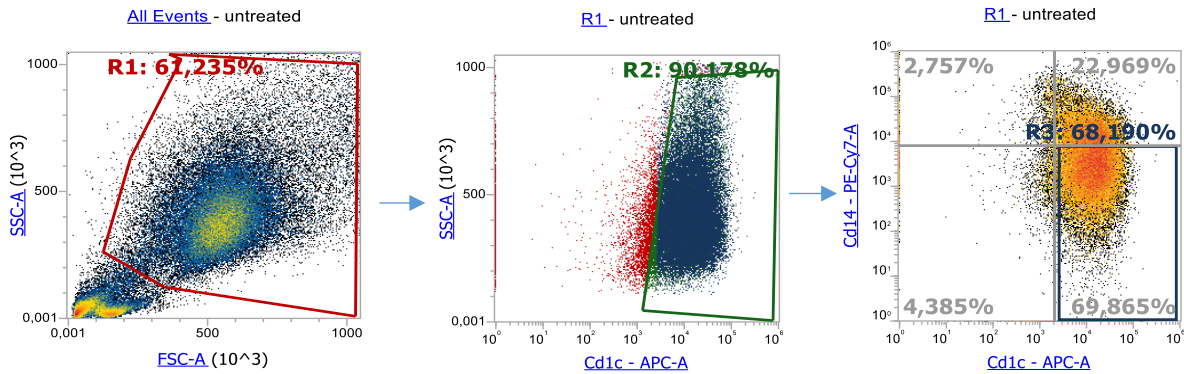
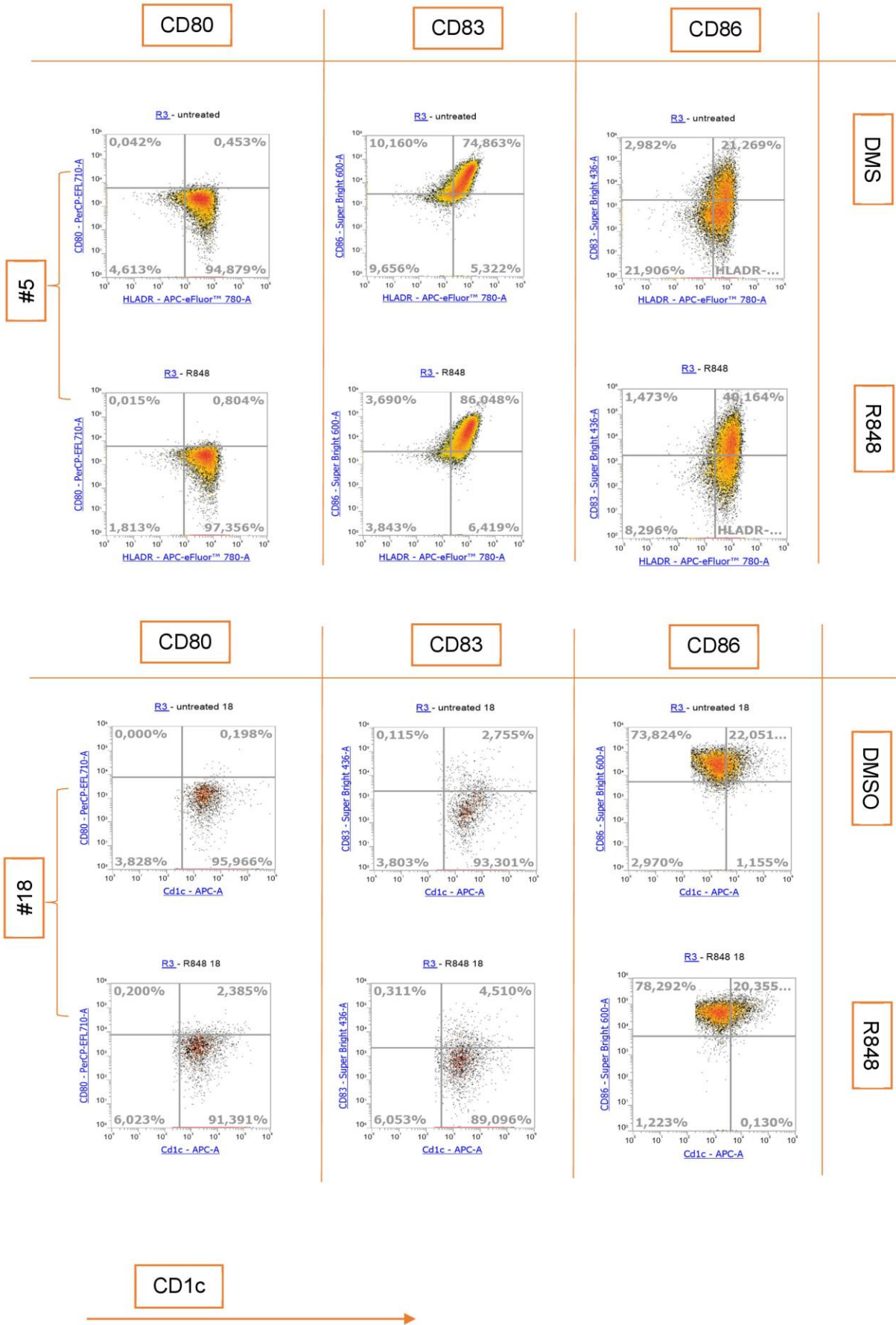


Abbildung 35: Gating-Strategie zur Charakterisierung dendritischer Zellen. Zunächst werden lebende Zellen und Singlets durch das Auftragen von FSC-H auf FSC-A herausgefiltert (nicht dargestellt). Anschließend erfolgt die Auswahl der Lymphozyten basierend auf FSC-A und SSC-A. Vitalität und Identifikation dendritischer Zellen erfolgen über die Expression der Marker CD14 und CD1c. Dargestellt ist eine nicht-stimulierte Zellprobe. FSC-A = *Forward Scatter Area*; SSC-A = *Side Scatter Area*.

Das Gating stellt einen entscheidenden Schritt in der Auswertung dar, um die Analyse gezielt auf bestimmte Zellsubpopulationen zu fokussieren und unerwünschte Ereignisse wie tote Zellen oder Zellaggregate auszuschließen. Ziel der hier verwendeten Gating-Strategie war es, vitale dendritische Zellen zu identifizieren und herauszufiltern.

Im ersten Schritt wird ein Gate (R1) um die lebenden Zellen gelegt, wobei Zellaggregate ausgeschlossen werden. Dies erfolgt durch das Auftragen der *Forward Scatter Area* (FSC-A) gegen die *Side Scatter Area* (SSC-A), wodurch anhand von Größe und Granularität die typische Lymphozytenpopulation abgegrenzt werden kann.

Im zweiten Schritt werden im folgenden Dotplot die vitalen Zellen weiter differenziert, indem ein Gate auf CD1c-positive Zellen gesetzt wird. Zur genaueren Definition der dendritischen Zellpopulation werden anschließend die CD1c-positiven und gleichzeitig CD14-negativen Zellen selektiert (R3). Die resultierende Population wird schließlich auf die Expression von Reifungs- oder Aktivierungsmarkern untersucht.



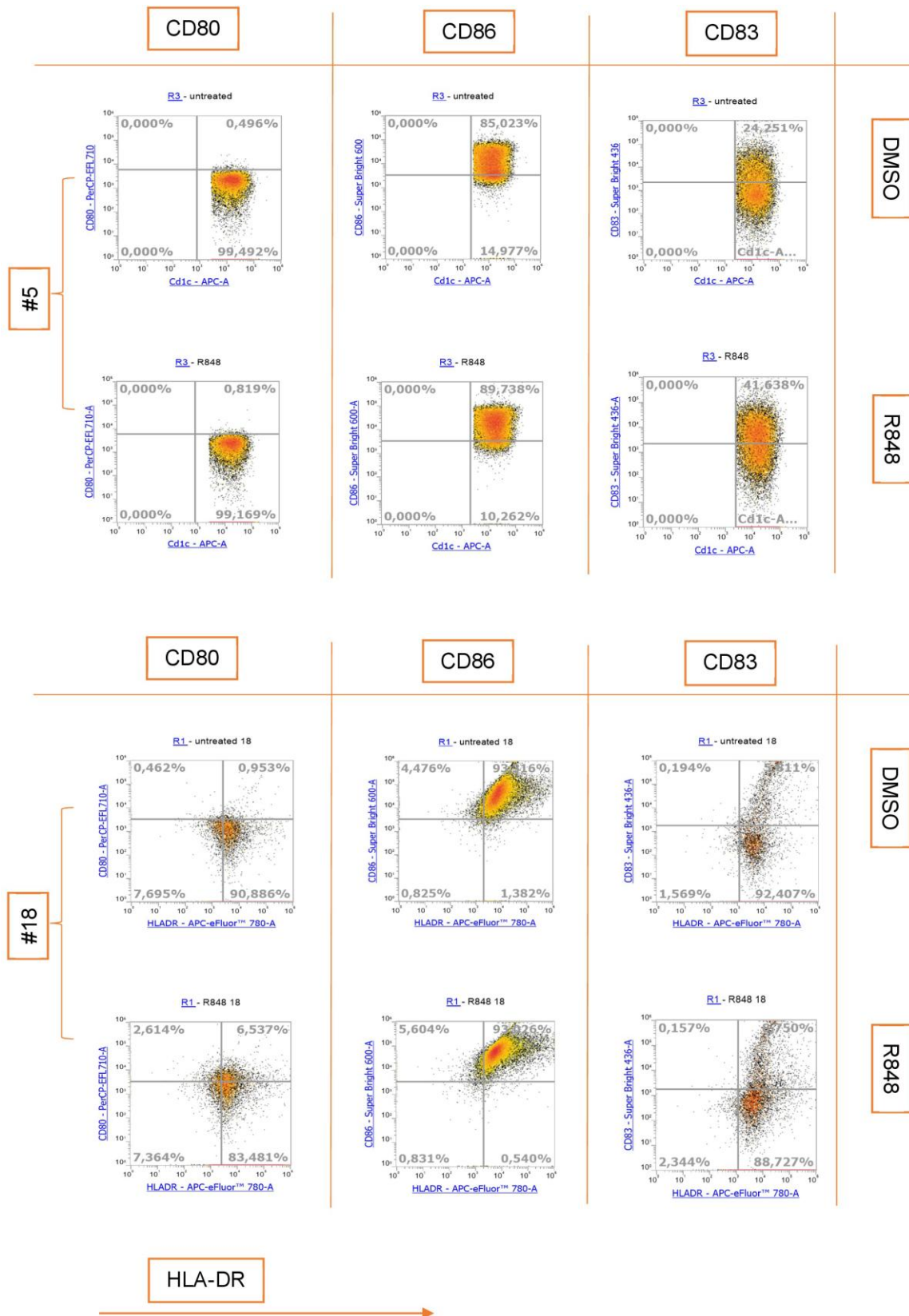
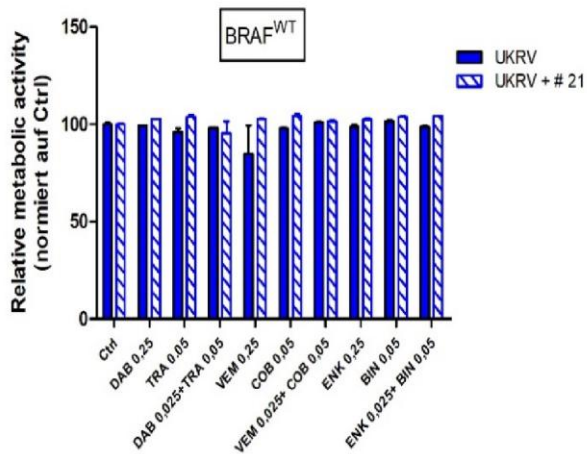
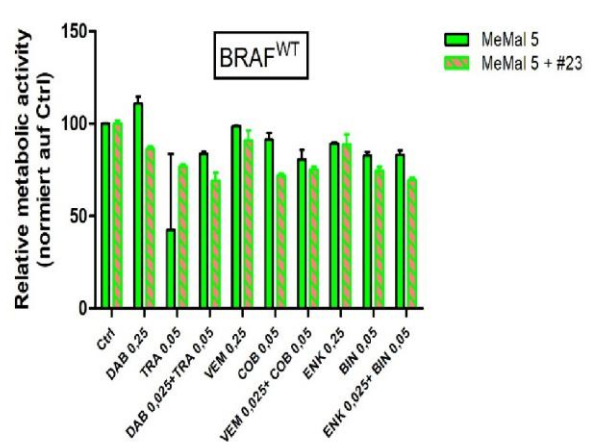
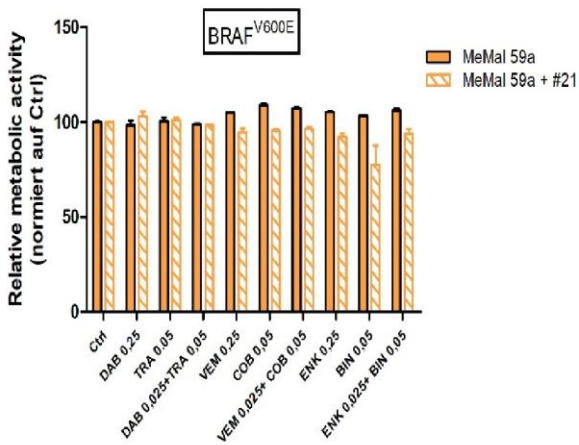
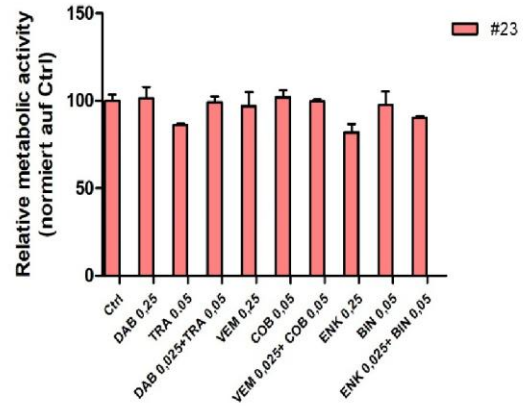
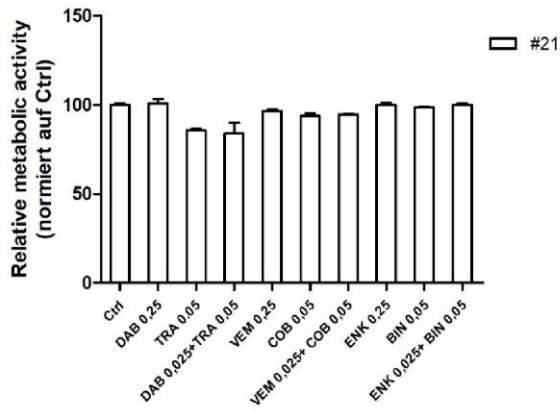


Abbildung 36: Wirkung von R848 auf die Oberflächenexpression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD83 der MO-DC. 2×10^6 Zellen/ml MO-DC von 14 verschiedenen Spendern wurden für 24 h bei 37°C in sterile 5 ml Rundbodenröhrchen mit R848 (50 ng/ml), das als positive Kontrolle diente, und DMSO als Lösungsmittelkontrolle (1%) inkubiert. Anschließend wurde der Anteil der vitalen CD14/CD1c⁺ MO-DC, die CD80, CD83, CD86 und HLA-DR exprimierten, durchflusszytometrisch gemessen. Mithilfe des von ihnen exprimierten Oberflächenmoleküls CD1c wurden die MO-DC aus der DC-Population abgegrenzt. Spender 5 und 18 sind repräsentativ für die insgesamt 14 getesteten Spender.



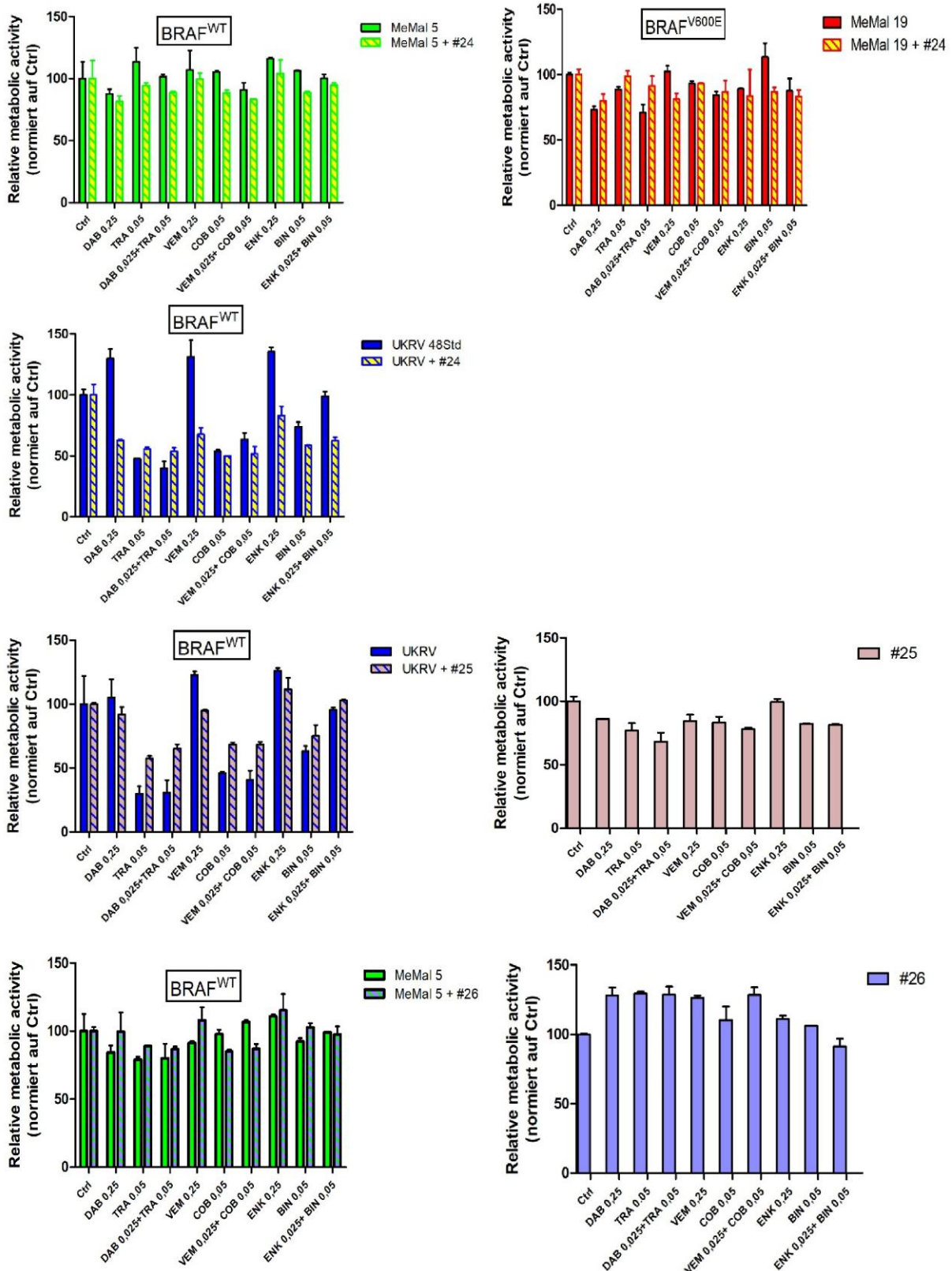


Abbildung 37: Einfluss von BRAFi und/oder MEKi auf die Zellviabilität von BRAF-Wildtyp- und BRAF-V600E-Melanomzellen. Dargestellt ist der Effekt von BRAFi/MEKi auf die Zellviabilität der Zelllinien UKRV und MeMal5 (BRAF-Wildtyp-Melanomzellen) sowie MeMal19 und MeMal59a (BRAF-V600E-Melanomzellen) in Monokultur, auf periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) (Mittelwerte der Spender #21: 42 J, M, 0+; #23: 39 J, W, 0+; #24: 19 J, W, 0+; #25: 64 J, M, A+; #26: 29 J, M, 0+) sowie auf PBMC/Melanomzell-Kokulturen. Getestet wurden die Kombinationen: Dabrafenib (DAB), Trametinib (TRA) bzw. DAB + TRA; Vemurafenib (VEM), Binimetinib (BIN) bzw. VEM + BIN; sowie Encorafenib (ENC), Cobimetinib (COB) bzw. ENC + COB. Das Diagramm zeigt die relative metabolische Aktivität der einzelnen Ansätze, normiert auf die jeweilige Kontrollgruppe (Ctrl = 100 %). Dargestellt sind die Mittelwerte der Duplikate ± Standardabweichung.

9 Danksagung

10 Lebenslauf



