

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

Off-Target-Effekte des BRAF-Inhibitors Dabrafenib in humanen Immunzellen

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

Vorgelegt von

Thomas Jung
aus Erlenbach a. Main

Mainz, 2021

Tag der Promotion:

12. Juli 2022

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	12
2. Literaturdiskussion.....	14
2.1 Genese und Biologie des malignen Melanoms.....	14
2.1.1 Entstehung des malignen Melanoms	14
2.1.2 Pathophysiologie des malignen Melanoms	15
2.2 Systemische Therapie des metastasierten malignen Melanoms.....	20
2.2.1 Immuntherapien.....	21
2.2.2 Zielgerichtete Therapien.....	22
2.3 Bekannte immunologische Off-Target Effekte von BRAF-Inhibitoren.....	26
2.3.1 Wirkung von BRAF-Inhibitoren auf T-Zellen und das Tumormikromilieu ..	26
2.3.2 Effekte von BRAF-Inhibitoren auf dendritische Zellen.....	29
3. Material und Methoden.....	32
3.1 Materialien.....	32
3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	32
3.1.2 Chemikalien, Reagenzien, Supplemente, Medien, Puffer und Kits	34
3.1.3 Antikörper	37
3.1.4 Primer	39
3.1.5 Software, elektronische Medien	40
3.2 Methoden	41
3.2.1 Aufarbeitung von Buffy Coats zur Gewinnung von PBMC (116).....	41
3.2.2 Inkubation der Zellen mit den zu testenden Agenzien.....	41
3.2.3 Cytometric Bead Array (CBA) (118)	42
3.2.4 Durchflusszytometrie	42
3.2.5 Lumineszenz-basierte Assays.....	43
3.2.6 Gewinnung der genomischen DNA (123).....	44
3.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	45
3.2.8 Aufreinigung der PCR-Produkte (124).....	45
3.2.9 Gelelektrophorese	46
4. Ergebnisse.....	47

4.1 Der Einfluss von Dabrafenib (DAB) auf die Zytokinproduktion von humanen Immunzellen.....	47
4.1.1 Der Einfluss von DAB auf die IL-1 β Produktion von PBMC	48
4.1.2 Der Einfluss von DAB auf die IL-1 β Produktion von Monozyten	49
4.1.3 Der Einfluss von DAB auf die Inflammasomaktivierung	51
4.1.4 Der Einfluss von DAB auf die Produktion anderer Zytokine von humanen Immunzellen	52
4.2 Untersuchung von funktional relevanten IL-1 β -Promoter-Einzelnukleotid-Polymorphismen	54
4.3 Die Effekte von DAB auf die Expression von Aktivierungs-Oberflächenmarkern von humanen Immunzellen	55
4.3.1 Die Effekte von DAB auf die Expression von Aktivierungs-Oberflächenmarkern von Monozyten	55
4.3.2 Die Effekte von DAB auf die Expression von Aktivierungs-Oberflächenmarkern von B-Zellen.....	57
4.3.3 Die Effekte von DAB auf die Expression von Aktivierungs-Oberflächenmarkern auf T-Zellen.....	58
5. Diskussion	60
5.1 Die Zytokinproduktion von humanen Immunzellen nach DAB-Gabe	60
5.1.1 Die Aktivierung des Inflammasoms und die Produktion von IL-1 β durch PBMC und Monozyten nach DAB-Applikation.....	60
5.1.2 Die Produktion von IL-6 und IL-8 durch humane Immunzellen nach DAB-Applikation	66
5.2 Funktional relevante IL-1 β -Promoter-Einzelnukleotid-Polymorphismen als mögliche Ursache für die spenderabhängige DAB-induzierte IL-1 β -Produktion....	69
5.3 Der Einfluss von DAB auf die Expression von Aktivierungs-Oberflächenmarkern auf PBMC	71
6. Zusammenfassung	76
7. Literaturverzeichnis	78
8. Anhang	94

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AKT	Proteinkinase B
APC	Antigenpräsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
BCL	BCL2 apoptosis regulator (BCL2 Apoptose Regulator)
BCL2L1	BCL2 like 1
BMDC	mouse bone marrow-derived DC (Murinen Knochenmark-abgeleitete dendritische Zellen)
BRAF	rapidly accelerated fibrosarcoma
BRAF ⁱ	BRAF-Inhibitor
CANTOS	Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcomes Study
CBA	Cytometric Bead Array
CD	Cluster of Differentiation (Unterscheidungsgruppen)
Cdk	Cyclinabhängige Kinase
CDKN2A	cyclin dependent kinase inhibitor 2A
CFSE	6-Carboxyfluorescein
COB	Cobimetinib
CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 (Zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4)
CXCL5	C-X-C-Motiv Chemokin 5
CXCL8	CXC-Motiv-Chemokin 8
CXCR2	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 2
DAB	Dabrafenib
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EGF	Epidermal Growth Factor (Epidermaler Wachstumsfaktor)
ERK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase 1
FAK	focal adhesion kinase (Fokale Adhäsions Kinase)
FCS	fetal calf serum (Fetales Kälberserum)
FDA	Federal Drug Administration (Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelbehörde der Vereinigten Staaten)

FGF2	Basic fibroblast growth factor 2 (Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2)
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor
HGFR	Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor
IFN	Interferon
IGFL1	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1
IL-1 β	Interleukin-1 β
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (Immunrezeptor Tyrosin-basiertes inhibitorisches Motiv)
KIT	KIT Protoonkogen, Rezeptor-Tyrosinkinase
MA	Massachusetts
MAPK	mitogen-activated protein kinase (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)
MC1R	Melanocortinrezeptor 1
MDA5	melanoma differentiation antigen 5
mDC	Myelide dendritische Zelle
MDSC	Myeloid-derived suppressor cells (Myeloide Suppressorzelle)
MEK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase
MFI	Mean fluorescence intensity
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
miRNA	microRNA; microRibonukleinsäure
MITF	Mikrophthalmie-assoziiertes Transkriptionsfaktor
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MO	Missouri
MODC	Monocyte derived dendritic cell (Monozyten abgeleitete dendritische Zellen)
MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NF1	Neurofibromin 1
NJ	New Jersey
NLRP3/NALP3	LRR and PYD domains-containing protein 3
NO	Stickstoffmonoxid

NRAS	neuroblastoma RAS viral oncogene homolog (NRAS Protoonkogen, GTPase)
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell (Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PD-1	Programmed cell death protein 1 (Programmiertes-Zelltod-Protein 1)
PD-L	Programmed cell death 1 ligand (Programmierter-Zelltod-Protein-1-Ligand)
pDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PDGF	Platelet-derived growth factor (Plättchen-abgeleiteter Wachstumsfaktor)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PolyI:C	Polyinosinic:polycytidylic acid
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
R848	Resiquimod
RAS	Rat sarcoma (RAS Protoonkogen)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinasen
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
Tab.	Tabelle
TAM	Tumor-associated macrophage (Tumorassoziierte Makrophagen)
TCR	T-cell receptor (T-Zell-Rezeptor)
TERT	Telomerase Reverse Transkriptase
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor β
TLR-3	Toll-like-Rezeptor 3
TNF	Tumornekrosefaktor
TP53	Tumorprotein p53
TRA	Trametinib
T _{Reg}	Regulatorische T-Zelle
TX	Texas
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VEM	Vemurafenib

WI	Wisconsin
Z-WEHD	Z-WEHD-FMK, caspase-1, caspase-5 and cathepsin B inhibitor

Tabellenverzeichnis

Tabelle (Tab.) 1 Liste der Geräte und Hersteller.	33
Tab. 2 Liste der Materialien und Hersteller.....	34
Tab. 3 Liste der Chemikalien und Hersteller.....	35
Tab. 4 Liste der Supplemente.....	36
Tab. 5 Liste der Medien.	36
Tab. 6 Liste der Puffer.	36
Tab. 7 Liste der Kits.....	37
Tab. 8 Liste der Antikörper.	38
Tab. 9 Liste der Primer.	40
Tab. 10 Liste der Software und der elektronischen Medien.	40
Tab. 11 Funktional relevante IL-1 β -Promoter-Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) sind nicht mit einer verstärkten IL-1 β -Produktion von PBMC nach DAB-Applikation assoziiert.....	54
Tab. Anhang (A)1 IL-1 β -Konzentrationen von PBMC (Spender 43 - 59) in pg/ml nach 22-stündiger Applikation von DMSO, R848 oder DAB (0,025 μ M - 2,5 μ M).....	94
Tab. A2 IL-1 β -Konzentrationen von Monozyten (Spender 54 - 59) in pg/ml nach 22-stündiger Applikation von DMSO, R848 oder DAB (0,025 μ M - 2,5 μ M).....	94
Tab. A3 IL-1 β -Konzentrationen von PBMC (Spender 80-87) in pg/ml nach 22-stündiger Inkubation mit DMSO, R848 oder DAB (0,05 μ M – 1,25 μ M).....	97
Tab. A4 IL-1 β -Konzentrationen von Monozyten (Spender 80-87) in pg/ml nach 22-stündiger Inkubation mit DMSO, R848 oder DAB (0,05 μ M – 1,25 μ M).....	97
Tab. A5 IL-6-Konzentrationen von PBMC (Spender 80-87) in pg/ml nach 22-stündiger Inkubation mit DMSO, R848 oder DAB (0,05 μ M – 1,25 μ M).....	97
Tab. A6 IL-6-Konzentrationen von Monozyten (Spender 80-87) in pg/ml nach 22-stündiger Inkubation mit DMSO, R848 oder DAB (0,05 μ M – 1,25 μ M).....	98
Tab. A7 IL-8-Konzentrationen von PBMC (Spender 80-87) in pg/ml nach 22-stündiger Inkubation mit DMSO, R848 oder DAB (0,05 μ M – 1,25 μ M).....	98
Tab. A8 IL-8-Konzentrationen von Monozyten (Spender 80-87) in pg/ml nach 22-stündiger Inkubation mit DMSO, R848 oder DAB (0,05 μ M – 1,25 μ M).....	98

Abbildungsverzeichnis

Abbildung (Abb.) 1 DAB verstärkt die IL-1 β Produktion in PBMC nur bei manchen Spendern.	48
Abb. 2 DAB verstärkt bei manchen Spender die IL-1 β Produktion.....	50
Abb. 3 DAB bewirkt eine Inflammasomaktivierung in Monozyten.	51
Abb. 4 DAB verstärkt die IL-6- und IL-8-Produktion bei manchen Spendern.	53
Abb. 5 DAB hat keinen Einfluss auf die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86, verringert jedoch die Expression von HLA-DR auf Monozyten.	56
Abb. 6 DAB hat keinen Einfluss auf die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 sowie des Oberflächenrezeptors HLA-DR auf B-Zellen.....	58
Abb. 7 DAB hat keinen Einfluss auf die Expression der Oberflächenmarker CD25 und CD69 auf CD4+- und CD8+-T-Zellen.	59
Abb. A1 DAB verstärkt die IL-1 β Produktion vor allem in PBMC.....	95
Abb. A2 DAB bewirkt eine Inflammasomaktivierung in PBMC, vor allem aber in Monozyten.	96
Abb. A3 Gelelektrophorese der PCR-Produkte, die durch PCR mit verschiedenen für die IL-1 β -Promoter-Region spezifischen Primer-Pärchen amplifiziert wurden.	99
Abb. A4 Gelelektrophorese der PCR-Produkte, die durch PCR mit mehreren für die IL-1 β -Promoter-Region (SNP-3737) spezifischen Primer-Pärchen amplifiziert wurden.	100
Abb. A5 DAB hat keinen Einfluss auf die Zahl der Monozyten, die die kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80, CD86 und HLA-DR exprimieren.....	101
Abb. A6 DAB hat keinen Einfluss auf die Anzahl von B-Zellen, die die kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80, CD86 und HLA-DR exprimieren.....	102
Abb. A7 DAB hat keinen Einfluss auf die Anzahl von T-Zellen, die CD25 und CD69 exprimieren.	103
Abb. A8 DAB-Applikation führt bei dicht ausgesäten Monozyten zur Aktivierung der Caspase-3 und Caspase-7.....	104
Abb. A9 Titrationskurve der Standardreihe des Cytometric Bead Array (CBA).....	105

1. Einleitung

Das maligne Melanom tritt mit steigender Inzidenz in westlichen Ländern auf und ist einer der aggressivsten Tumoren der Haut. Trotz größerer Anstrengungen in der Prävention von Melanomen, insbesondere durch die Einführung des Hautkrebsscreenings, hatten Patienten mit Fernmetastasen noch vor einigen Jahren schlechte Prognosen mit medianen Überlebensraten von lediglich sechs bis zehn Monaten. Im letzten Jahrzehnt konnten enorme Fortschritte in der Behandlung des metastasierten malignen Melanoms erzielt werden (1). Mit der Zulassung von Tyrosinkinase-Inhibitoren und Immuncheckpoint-Inhibitoren konnte die Prognose der betroffenen Patienten signifikant verbessert werden (2). Erstere sind Pharmaka, die gezielt den Mitogen-aktivierten Protein-Kinase-Signalweg (MAPK) in B-RAF Protoonkogen-mutierten (BRAFFV600) Tumoren hemmen, während die Immuncheckpoint-Inhibitoren im Stande sind, durch die Blockade von Zelloberflächen-Rezeptoren mit inhibitorischer Aktivität das Immunsystem des Patienten zu aktivieren (1). 40-50% der Melanompatienten weisen eine BRAFFV600-Mutation auf, die zu einer konstitutiven Aktivierung des für Proliferation, Apoptose und Migration zuständigen MAP-K-Signalwegs führt (3-5). Als therapeutische Option für die Behandlung des metastasierenden Melanoms wurden daher BRAF-Inhibitoren (BRAFi) wie beispielsweise Dabrafenib (DAB) (6) und Vemurafenib (VEM) (7) entwickelt, die in der Lage sind, das mutierte BRAFFV600E-Protein zu hemmen. Dies resultiert wiederum in der Inhibition der Mitogen-aktivierten Proteinkinase 1-Signalweiterleitung (ERK) und somit in der Induktion von Apoptose in Tumorzellen (8). Aufgrund von Resistenzentwicklungen des Tumors gegen die Wirkung der BRAF-Inhibitoren (9) wurde die Kombinationstherapie mit Mitogen-aktivierte Kinase Kinase-Inhibitoren (MEK) eingeführt, die dazu beiträgt, das Auftreten von Resistenzen zu verhindern oder zu verzögern. Diese Therapie ist daher einer Monotherapie mit BRAF-Inhibitoren überlegen (10, 11).

Neben der beabsichtigten Tumorzell-Apoptose sind weitere unerwartete Effekte durch die MAPK-Signalweg-Inhibitoren aufgetreten, deren Aufklärung zu einem tieferen Verständnis der Pathophysiologie beim malignen Melanom beitragen könnte. Diese Erkenntnisse könnten neue Möglichkeiten eröffnen, die Behandlung des Tumors zu verbessern (12). Beispielsweise wurde bei der histopathologischen Untersuchung von Gewebsbiopsien von Melanom-Patienten, die mit BRAF-Inhibitoren behandelt wurden, eine erhöhte Dichte tumorinfiltrierender Lymphozyten nachgewiesen (12). Zudem

konnten T-Zell-stimulierende Effekte *in vitro* und *in vivo* beobachtet werden, die sich möglicherweise auf eine paradoxe Aktivierung des ERK-Signalwegs zurückführen lassen (13). Murine Knochenmark-abgeleitete dendritische Zellen (BMDC) reagierten auf die Applikation von DAB sowohl mit einer Aufregulation kostimulatorischer Rezeptoren wie CD80 und CD86 als auch mit einer vermehrten Produktion des proinflammatorischen Zytokins Interleukin 1 β (IL-1 β), das in Verdacht steht, das Tumorwachstum zu begünstigen (14-16).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass BRAF-Inhibitoren zusätzlich zu ihrer vorgesehenen Wirkung tumorimmunologisch relevante Off-Target-Effekte zeigen.

Das Ziel der folgenden Arbeit ist es zu untersuchen, ob der BRAF-Inhibitor DAB auch zu einer Veränderung des Immunphänotyps an humanen Immunzellen führt. Insbesondere werden hierbei die Expression von Aktivierungs-Oberflächenmarkern und die Produktion proinflammatorischer Zytokine, vor allem die des Interleukin-1 β , im Fokus der Betrachtung liegen.

2. Literaturdiskussion

2.1 Genese und Biologie des malignen Melanoms

2.1.1 Entstehung des malignen Melanoms

Melanozyten stammen aus der Neuralleiste und sind vor allem im *Stratum basale* der Epidermis, in Haarfollikeln, entlang der Schleimhautoberflächen, in den Meningen und in der Choroidea des Auges zu finden (2, 17). Hautkeratinozyten und Melanozyten produzieren aufgrund UV-induzierter DNA-Schäden das Melanozyten-stimulierende Hormon (MSH), das an den Melanocortin-Rezeptor 1 (MC1R) der Melanozyten bindet und somit die Produktion und Freisetzung von Melanin bewirkt (18). Weitere DNA-Schädigungen durch die UV-Strahlung werden durch das Pigment Melanin verhindert, das in der Lage ist, UV-Strahlung zu streuen und zu absorbieren (18, 19).

Menschen mit chronisch sonnenexponierter Haut entwickeln meistens erst im höheren Alter (>55 Jahre) ein malignes Melanom. Zu den betroffenen Regionen zählen vor allem häufig bestrahlte Bereiche wie beispielsweise der Kopf, der Hals oder die Rückseite der Extremitäten. Charakteristisch für diese Tumoren ist eine mit der kumulativen UV-Strahlung assoziierte hohe Mutationslast. Das BRAF-Protoonkogen, das Neurofibromin 1 (NF1) und die NRAS Proto-Onkogen-Mutationen (NRAS) stellen die relevantesten genetischen Treiber für diese Art der Entstehung des Melanoms dar (20-22). Zudem bilden sie sich normalerweise aus *in situ* Melanomen oder dysplastischen Läsionen und nicht aus bereits vorhandenen Nävi (23).

Bei jüngeren Menschen (<55 Jahre) treten Melanome häufiger in weniger sonnenexponierten Regionen wie beispielsweise an den proximalen Extremitäten oder des Rumpfes auf und resultieren im Gegensatz zu den Melanomen, die ältere Menschen entwickeln, aus einer intermittierenden UV-Exposition. Hierbei weisen die Melanome normalerweise BRAFV600E-Mutationen bei gleichzeitig niedriger Mutationslast auf (20, 21).

In den letzten Jahren wurde herausgefunden, dass die Entstehung eines Melanoms aus präneoplastischen Läsionen nicht auf ein bestimmtes Muster zurückzuführen ist. Vielmehr können unterschiedliche Genmutationen verschiedene Vorläuferläsionen zu jedem Melanomsubtypen transformieren (23). Für die Entwicklung eines Melanoms ist eine alleinige BRAF-Mutation nicht ausreichend. Beispielsweise zeigen bis zu 80% der

benignen Nävi eine solche Mutation, bleiben jedoch aufgrund jahrzehntelanger Überwachung durch das Immunsystem indolent (23, 24). Trotzdem kann die UV-Strahlung das Auftreten zusätzlicher Mutationen, wie beispielsweise die des Promoters der Telomerase Reverse Transkriptase (TERT) oder Zyklinabhängiger Kinase-Inhibitor 2A (CDKN2A), bewirken und somit die maligne Transformation einleiten (2, 23).

2.1.2 Pathophysiologie des malignen Melanoms

2.1.2.1 Genetische Mutationen

Genetische Mutationen, die zur übermäßigen Expression von Proteinen führen, sind sowohl für die vermehrte Proliferation der Tumorzellen verantwortlich als auch für Veränderungen im Tumormikromilieu, die wiederum Tumorinvasion und -infiltration ermöglichen (2, 25-27).

Gene, die wichtige zelluläre Prozesse steuern, wie beispielsweise die Proliferation (BRAF, NRAS und NF1), das Wachstum und den Metabolismus (Phosphatase und Tensin Homolog (PTEN), KIT Protoonkogen (KIT)), die Apoptose (Tumorprotein P53 (TP53)), die Zellzykluskontrolle (CDKN2A9) und das Überleben der Zelle (TERT) weisen beim Melanom am häufigsten somatische Mutationen auf (28).

Zwei wichtige Signalwege sind hauptsächlich von diesen Mutationen betroffen. Einerseits die RAS/RAF/MEK/ERK-Signalkaskade, ein MAPK-Signalweg, andererseits der Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase B (PI3K/AKT)-Signalweg (29). Die MAPK-Signalwege resultieren in der Expression von Proteinen, die an der Proliferation, der Differenzierung und am Überleben der Zelle beteiligt sind und wird physiologisch beispielsweise durch die Bindung von Wachstumsfaktoren wie Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) an den entsprechenden EGF-Rezeptor aktiviert (30). Der PI3K-Weg reguliert verschiedene zelluläre Prozesse wie den Stoffwechsel, das Überleben, die Proliferation, die Apoptose, das Wachstum und die Migration der Zelle (31). Die übermäßige Aktivierung der beiden Signalwege spielt bei mehreren Krebsformen, insbesondere beim Melanom eine bedeutende Rolle (32).

Der häufigste beim Melanom abnormal aktivierte Signalweg ist der MAPK-Signalweg, der durch Fehlregulation des Zellzyklus und der Apoptose wesentlich an der Entstehung des Melanoms beteiligt ist (30, 33). Diesem liegt neben anderen Ursachen

in den meisten Fällen eine genetische Mutation im BRAF-Gen zu Grunde, wobei hierbei vor allem kutane Melanome, die durch intermittierende Sonnenexposition hervorgerufen werden, mit circa 60% betroffen sind (20). Mehr als 97% der BRAF-Mutationen befinden sich im Codon 600 des BRAF-Gens, bei der in den meisten Fällen (bis zu 90%) eine Transversion der Nukleinbase Thymin zu Adenin erfolgt, was wiederum zur Substitution von Valin (V) durch Glutaminsäure (E) an dieser Position führt (V600E). Weniger häufig sind Substitutionen von Valin durch Lysin (V600K) in circa 8-20% der Fälle, Arginin (V600R; 1%), Leucin (V600M; 0,3%) und Asparaginsäure (V600D; 0,1%) (34). Die anstelle der hydrophoben Aminosäure Valin vorhandene hydrophile Aminosäure Glutaminsäure bei der BRAFV600E-Mutation bewirkt eine konstitutive Aktivierung der katalytischen Domäne der BRAF-Serin/Threonin-Proteinkinase und damit eine 500-fach höhere Kinaseaktivität im Vergleich zur Wildtyp-BRAF-Kinase (35). Auch andere BRAF-Mutationen sind in der Lage über eine Destabilisierung der inaktiven katalytischen Domäne die BRAF-Aktivität bis zu 700-fach zu steigern (36).

Die nach der BRAF-Mutation relevanteste Ursache für einen hyperaktiven MAPK-Signalweg ist mit circa 20% die NRAS-Mutation, die typischerweise in über 80% der Fälle an der Aminosäure-Position 61 eine Punktmutation aufweist (37). Diese führt zu einer verringerten Guanosintriphosphat-bindendes Protein-ase-Aktivität (GTPase) und somit zur Aufrechterhaltung der GTP-gebunden Konformation des RAS-Proteins. Dadurch kann sowohl der MAPK- als auch der PI3K-Signalweg aufrechterhalten werden (38).

Normalerweise werden in malignen Melanomen entweder BRAF- oder NRAS-Mutationen gefunden. Jedoch gibt es Hinweise darauf, dass sich diese Mutationen nur auf der Ebene einzelner Zellen, nicht aber auf Tumorebene ausschließen (39).

Das am dritthäufigsten mutierte Gen beim malignen Melanom ist das Tumorsupressor-Gen NF1. Diese Mutation tritt gehäuft bei Patienten auf, die chronischer Sonnenstrahlung ausgesetzt sind, sowie bei älteren Patienten (40). Das NF1-Protein reguliert RAS, indem es aktives RAS-GTP in inaktives RAS-Guanosindiphosphat (GDP) umwandelt und dadurch den RAS-Signalweg inhibiert (41). Demnach ist der Funktionsverlust des NF1-Proteins mit einer RAS-Aktivierung assoziiert und verhindert, gemeinsam mit dem mutierten BRAF-Protein, durch Deregulierung des

PI3K- und des MAPK-Signalwegs die Onkogen-induzierte Zellseneszenz während der Melanomentstehung (42, 43).

Die Typ III Rezeptor-Tyrosinkinase KIT ist aufgrund ihrer Funktion bei der Regulation des Wachstums, der Migration, des Überlebens und der Differenzierung wichtig für die Entwicklung der Melanozyten in Wirbeltieren (44). KIT ist in der Lage nachgeschaltete Effektoren wie Src-Kinasen, die p85-Untereinheit der PI3-Kinase, Phospholipase-Cy und MAP-Kinasen zu aktivieren. Mutationen sind in ca. 30% der Fälle bei mukosalen, in 20% bei akralen Melanomen und in 20% bei Melanomen mit chronisch sonnengeschädigter Haut zu finden (45).

Neben den aufgeführten Mutationen, die als Treibermutationen bezeichnet werden, existieren zusätzliche Mutationen, die vor allem in späteren Stadien des Melanoms zu finden sind. Zu diesen gehören beispielsweise TERT, CDKN2A, PTEN und viele weitere (46). TERT-Mutationen können die Expression des TERT-Gens verstärken, indem sie neue Bindestellen für Transkriptionsfaktoren im Bereich des TERT-Genpromotors kreieren. Durch die nun erhöhte Menge an Telomerase-Reverse-Transkriptase (TERT) wird die Telomerase reaktiviert und das Limit der möglichen Zellteilung kann überschritten werden (47).

Eine biallelische Inaktivierung des CDKN2A-Gens tritt ausschließlich in invasiven Melanomen auf (46). Aus der Expression des CDKN2A-Gens resultiert normalerweise das Protein p16INK4A, das als Inhibitor der Cyclin-abhängigen-Kinase Cdk4 und Cdk6 fungiert und somit imstande ist, den Übergang der G1-Phase in die S-Phase zu regulieren (48).

Das PTEN-Protein wird als Tumorsuppressor eingestuft, das mit seiner Protein- und Lipidphosphatase-Aktivität eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus und bei der Inhibition der Zellinvasion spielen soll. Zum Beispiel dephosphoryliert PTEN 3-Phosphoinositid-Produkte der PI3K, wie PDK1 und Akt, und verhindert somit die Aktivität dieser Kinasen, die sonst für Überlebenssignale sorgen würden. In Melanomzelllinien wurde eine Mutationsrate von 30-40% ermittelt, wohingegen in primären Melanomen die Rate bei 10% lag (49). In 20% der menschlichen Melanome kann eine Kombination aus einer BRAF-Mutation und einer genomischen

Veränderung von PTEN nachgewiesen werden, die es ermöglicht, den MAPK- und den PI3K-Signalweg parallel zu aktivieren (50, 51).

Neben der Veränderung der Proliferation, des Wachstums, der Apoptose, der Zellzykluskontrolle und des Überlebens der Tumorzellen sind Mechanismen, die die Tumordinvasion und -infiltration fördern, von besonderer Bedeutung (25).

Es konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit zur Migration, Invasion und Metastasierung des Melanoms auf die Überexpression von diversen Proteasen, wie insbesondere Metalloproteasen zurückzuführen ist (52).

Matrix-Metalloproteasen (MMP) sind u.a. an der embryologischen Entwicklung und an der Wundheilung beteiligt, wobei sie Zell-Zell-Ablösungen und die Perforation der Basalmembran ermöglichen (53). Entscheidend für die Invasion und Ausbreitung des Tumors durch den Abbau von Komponenten der extrazellulären Matrix ist vor allem die MMP-9 (54). Die MMP9 Überexpression ist sowohl mit einer intragenen Methylierung des MMP9-Gens, als auch mit einer fehlerhaften Regulation durch miRNAs assoziiert (55, 56). Des Weiteren soll NF- κ B bei der Aktivierung von MMP9 und Osteopontin, einem im Tumormikromilieu exprimierten Protein, mitwirken und so die Entwicklung und das Fortschreiten des Melanoms begünstigen (57).

2.1.2.2 Modulation der Immunantwort und Tumormikromilieu

Nicht nur genetische Veränderungen, sondern auch Wechselwirkungen mit der Tumorumgebung, dem sogenannten Tumormikromilieu, und Modulationen der Immunantwort sind für die Entwicklung eines Tumors notwendig (58).

Immuncheckpoints sind essenziell zur Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz und zur Regulation der Dauer und des Ausmaßes von Immunreaktionen, mit dem Ziel, Gewebeschäden durch eine überschießende Immunantwort zu verhindern. Tumore sind imstande durch das Induzieren bestimmter Immuncheckpoints diesen Mechanismus der Immunresistenz zu imitieren, indem sie z.B. durch die Expression des PDL-1- und PDL-2-Proteins vor allem die T-Zell-Aktivität, aber auch die Aktivität von infiltrierenden B-Zellen und NK-Zellen im Tumorgewebe vermindern (59).

Weitere Möglichkeiten des Tumors die Immunantwort zu unterdrücken sind die Herunterregulation kostimulatorischer Moleküle, Tumor-assoziiertes Antigen, Haupthistokompatibilitätskomplex-Proteine (MHC-I) und von Liganden für NK-Zell-Rezeptoren sowie die Sekretion immunsuppressiver Faktoren wie Vaskulärer

endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF), Transformierender Wachstumsfaktor β (TGF- β), IL-10, Stickstoffmonoxid (NO) und von Prostaglandinen (60).

Der überaktive MAPK-Signalweg, der ein Angriffspunkt bei der Therapie des Melanoms ist (s. 2.2.2), ist nicht nur für die autonome Zellproliferation der Melanomzellen zuständig, sondern spielt auch bei BRAFV600E-mutierten Melanomen eine Rolle bei der Immunmodulation. So konnten der MEK-Inhibitor U0126 und die Inhibierung der BRAFV600E-Expression durch RNA-Interferenz die Produktion immunsuppressiver Faktoren wie IL-10, VEGF oder IL-6 durch Melanomzellen verringern. Die suppressiven Eigenschaften der Melanom-Zellkulturüberstände auf die Produktion immunsuppressiver Faktoren wie IL-12 und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) durch LPS-stimulierte dendritische Zellen waren nach der Transduktion von BRAFV600E-RNAi deutlich verringert (61).

Zusätzlich zu den direkten immunmodulatorischen Effekten der Tumorzellen, sind sie dazu fähig, Fibroblasten und Makrophagen im Tumormikromilieu so zu verändern, dass sie tumorfördernde Funktionen einnehmen. So unterstützen beispielsweise Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs) durch die Sekretion von Proteasen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren (z.B. EGF) das Wachstum, die Angiogenese und die Invasion des Tumors. Zudem werden Immunsupressorzellen, darunter vor allem Myeloiden Suppressorzellen (MDSCs) und Regulatorischen T-Zellen (T_{regs}) durch Zytokinachsen wie TGF- β und C-X-C-Motiv Chemokin 5 - CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 2 (CXCL5 - CXCR2) mobilisiert, die die Immunantwort durch verschiedene Mechanismen unterdrücken wie zum Beispiel durch die Inhibition der Antigenpräsentation von DC, der T- und B-Zell-Proliferation und der NK-Zell-Zytotoxizität (62).

Außerdem können tumorassoziierte Fibroblasten (CAFs), die durch von Tumorzellen und anderen Stromazellen sezernierten Faktoren wie TGF- β , EGF, Plättchen-abgeleiteter Wachstumsfaktor (PDGF), Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (FGF2) aktiviert werden, das Tumorwachstum durch die Sekretion von EGF, Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF), Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1 (IGFL1) und IGFL2 unterstützen sowie die Angiogenese durch die Produktion von VEGF fördern (63). Young et al. konnten zeigen, dass das Zusammenspiel von Tumorzellen, Makrophagen und Fibroblasten im Tumormikromilieu des Melanoms eine IL-1 Signalkaskade initiiert, die über ein CXCR2-stimulierendes Sekretom eine vermehrte

Expression von BCL2 Apoptose Regulator (BCL2) in Tumorzellen induziert und somit zum Überleben von Melanomzellen beiträgt (15).

In einer Studie von Khalili et al. (64) wurde sowohl die Rolle des BRAFV600E-mutierten Proteins bei der Modulation der Expression regulatorischer Gene beim malignen Melanom als auch die Induktion der Immunsuppression durch Tumor-assoziierte Fibroblasten untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die BRAFV600E-Expression zu einer Induktion der Transkription von IL-1 α und IL-1 β in Melanozyten führt. Der BRAF-Inhibitor VEM verminderte die Expression von IL-1 in Melanomzelllinien und in humanen Tumorbiopsien. Von Melanompatienten isolierte CAFs wurden mit IL-1 α/β behandelt und erhöhten daraufhin ihre Aktivität, die Proliferation und Funktion Melanomantigen-spezifischer zytotoxischer T-Zellen zu inhibieren. Diese Hemmung war auf die Hochregulation von IL-1 durch COX-2 und die vermehrte Expression der Programmierter-Zelltod-Protein-1-Liganden PD-L1 und PD-L2 zurückzuführen. Die Autoren vermuteten, dass die klinische Inhibition von IL-1 die Therapie von Patienten mit BRAF-Wildtyp-Tumoren verbessern könnte (64).

2.2 Systemische Therapie des metastasierten malignen Melanoms

Die Mehrheit der Patienten mit einem neu diagnostizierten malignen Melanom befindet sich im Frühstadium der Erkrankung und wird durch die Exzision der Läsion mit einem angemessenem Sicherheitsabstand behandelt, wobei sich dieser nach der Breslow-Tumordicke und nach dem potenziellen Befall eines Wächter-Lymphknotens richtet (65).

Nach der primären Behandlung erleiden etwa 20% der Patienten einen mit Metastasen einhergehenden Rückfall, bei dem die mittlere Überlebenszeit ohne Behandlung unter 12 Monate betragen würde. Bis zum Jahr 2011 war keine systemische Therapie verfügbar, die die Überlebensrate von Patienten mit metastasiertem Melanom überzeugend verbessern konnte (66).

Mit der Zulassung von zielgerichteten Therapien wie den BRAF- und MEK-Inhibitoren sowie der Weiterentwicklung der Immuntherapien hin zur Immuncheckpoint-Inhibition konnte das mittlere Gesamtüberleben dieser Patienten auf mindestens 2 Jahre erhöht werden (67).

2.2.1 Immuntherapien

In der Vergangenheit konnten Immuntherapien wie zum Beispiel die systemische Applikation von IL-2 erste Erfolge erzielen, jedoch waren sie aufgrund drastischer Nebenwirkungen nur bei relativ gesunden Patienten einsetzbar (68).

Ipilimumab, ein monoklonaler Antikörper gegen das Zytotoxische T-Lymphozyten-assoziierte Protein 4 (CTLA-4), war der erste Immuncheckpoint-Inhibitor, der bei der Behandlung des metastasierten malignen Melanoms das Gesamtüberleben erfolgreich steigern konnte (69).

Antigenspezifische T-Zellen werden durch die Interaktion mit antigenpräsentierenden Zellen (APC) aktiviert. Tumorantigene werden beispielsweise durch dendritische Zellen über den MHC-Komplex präsentiert, die wiederum an den T-Zell-Rezeptor (TCR) einer CD8⁺-T-Zelle binden (Signal 1). Daraufhin bedarf es kostimulatorischer Moleküle wie CD28 auf der T-Zelle, die mit den zugehörigen Liganden (CD80/86) der APC interagieren (Signal 2). Die vollständige Aktivierung der T-Zelle ist erst dann erreicht, wenn die von APCs generierten löslichen Mediatoren an den zugehörigen T-Zellrezeptor binden und so die T-Zell-Polarisierung forcieren (Signal 3) (70).

Das auf T-Zellen exprimierte CTLA-4 kann mit CD28 um die Ligandenbindung konkurrieren und somit als Antagonist der CD28-vermittelten Kostimulation dienen. Auf diese Weise kann CTLA-4 T-Zell-Antworten inhibieren (71). Dass CTLA-4 für die Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz verantwortlich ist, zeigt sich bei CTLA-4-defizienten Mäusen, die ohne Behandlung bereits nach drei bis vier Wochen Lebenszeit an überschießenden Autoimmunreaktionen wie zum Beispiel lymphoproliferativen Erkrankungen sterben (72).

Ipilimumab ist durch die Blockade von CTLA-4 in der Lage, die Toleranz von T-Zellen gegenüber Tumoren zu durchbrechen und somit eine effektive Antitumoraktivität (wieder-)herzustellen (73).

Im Dezember 2014 wurde Nivolumab als PD-1-Antikörper zur Behandlung des metastasierten malignen Melanoms in den Vereinigten Staaten von der FDA zugelassen (58).

Der Oberflächenrezeptor PD-1, der vor allem auf T-Zellen während ihrer Aktivierung exprimiert wird, ist hauptsächlich an der Hemmung der Signalübertragung von Immunantworten beteiligt und stellt somit einen Regulator des adaptiven

Immunsystems dar. (74, 75). Die Liganden des PD-1-Rezeptors sind der PD-L1 und PD-L2 (s. 2.1.2.2) und werden von APCs, wie beispielsweise Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen, aber auch von nicht-lymphatischen Geweben wie Tumoren unterschiedlich stark exprimiert (76, 77). Die Bindung der Liganden an den PD-1-Rezeptor bewirkt intrazelluläre Signale in der T-Zelle, die u.a. durch das Immunrezeptor-Tyrosin-basierte-inhibitorische-Motiv (ITIM) des PD-1-Rezeptorschwanzes vermittelt werden und letztendlich zu einer verringerten Zytokinproduktion (IL-2, Interferon- γ (IFN- γ), TNF- α), einem langsameren Fortschreiten des Zellzyklus und zu einer geringeren Expression antiapoptotischer Proteine wie BCL2L1 und von Transkriptionsfaktoren, die mit Effektorfunktionen assoziiert sind, führen (78).

Der PD-1-Rezeptor ist häufig im Rahmen einer chronischen Infektion oder einer Tumorerkrankung nicht nur auf konventionellen T-Zellen, sondern auch auf T_{regs}, B-Zellen, NK-Zellen und myeloischen Zellen stark exprimiert und resultiert deshalb in einer eingeschränkten Immunfunktion (75).

Nivolumab ist ein monoklonaler Antikörper, der mit hoher Affinität den PD-1-Rezeptor blockiert, dadurch die Bindung von PD-L1 und PD-L2 hemmt und somit die Antitumoraktivität des Immunsystems fördert (79). In einer randomisierten kontrollierten klinischen Studie konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Nivolumab im Vergleich zu Dacarbazin bei zuvor unbehandelten Patienten mit einem metastasierten Melanom ohne BRAF-Mutation zu einer signifikanten Verbesserung des Gesamtüberlebens und des progressionsfreien Überlebens führt (80).

2.2.2 Zielgerichtete Therapien

Patienten mit BRAF-mutiertem Melanom hatten vor der Zulassung von BRAF-Inhibitoren eine schlechtere Prognose als Melanom-Patienten mit dem Wildtyp-BRAF-Protein. Jedoch konnte diese Situation durch die Zulassung der BRAF-Inhibitoren VEM (2011) und DAB (2013) und der MEK-Inhibitoren Trametinib (TRA) (2013) und Cobimetinib (COB) (2015) zur Behandlung des metastasierten, BRAF-V600E-mutierten Melanoms verändert werden (81). Patienten mit BRAF-Mutation, die mit BRAF-Inhibitoren behandelt wurden, wiesen erstmals eine längere mittlere Überlebenszeit auf als BRAF-Wildtyp-Patienten (82).

Bei der alleinigen Gabe von BRAF-Inhibitoren traten ernsthafte Nebenwirkungen wie Plattenepithelkarzinome oder Keratoakanthome auf, die auf eine paradoxe Aktivierung des MAPK-Signalwegs zurückzuführen sind (83). Durch die Kombination des BRAF-Inhibitors DAB mit dem MEK-Inhibitor TRA konnte sowohl das Auftreten der Sekundärtumore reduziert werden als auch das progressionsfreie Überleben im Vergleich zur Monotherapie gesteigert werden (84). Andere Nebenwirkungen wie Hautausschläge und eine erhöhte Photosensitivität bei VEM sowie Pyrexie, Hyperkeratose und Kopfschmerzen bei DAB sind vermutlich auf Medikamenten-spezifische Off-Target Effekte zurückzuführen (85).

Ein weiterer Grund für die Etablierung der Kombinationstherapie, bestehend aus einem BRAF- und einem MEK-Inhibitor, war das Auftreten von Resistenzen und die damit einhergehende Tumorprogression (86).

Die meisten Tumorproben von Patienten, die BRAFi-Resistenzen aufwiesen, konnten die BRAF-Inhibition umgehen, indem MEK-Signale unabhängig vom Aktivierungszustand des BRAF-Proteins die Aktivierung von ERK wiederherstellten (87). Die Mechanismen, die dazu führen, den MAPK-Signalweg zu reaktivieren sind vielfältig. Beispielsweise können Melanome mit BRAFV600E-Mutation durch eine RAS-vermittelte Reaktivierung des MAPK-Signalwegs, wie zum Beispiel durch eine NRAS-Mutation oder durch den Verlust des Tumorsuppressors NF1, der BRAF-Inhibition entgehen (88, 89). Eine weitere Erklärung für die Entwicklung von Resistenzen ist, dass aufgrund des gestörten negativen Feedback-Mechanismus, der mit der BRAF-Blockade einhergeht, Rezeptortyrosinkinasen (RTK) und RAS aktiviert werden und diese wiederum den MAPK-Signalweg aktivieren. Zusätzlich bilden sich hierbei BRAF-Inhibitor-resistente RAF-Dimere, die zu einer Wiederherstellung der ERK-Aktivität führen (90, 91). Außerdem konnten weitere Resistenzmechanismen entdeckt werden, wie zum Beispiel die vermehrte Bildung von BRAF-Dimeren durch RAS-unabhängiges alternatives Spleißen oder die Mutation von MEK (92, 93).

Neben der von Tumorzellen autonom erlangten Resistenz gegen BRAF-Inhibitoren vermag auch das vorliegende Tumormikromilieu zur Resistenzbildung beizutragen. So kann beispielsweise die Stromazell-Sekretion von HGF und die darauffolgende Aktivierung des Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (HGFR) den MAPK- und den PI3K-Signalweg reaktivieren (94). Des Weiteren machen Hirata et al. (95) die paradoxe Aktivierung der Melanom-assoziierten Fibroblasten durch BRAF-Inhibitoren

sowie die vermehrte Matrixproduktion und das Remodeling dafür verantwortlich, dass verstärkte Integrin- β 1/FAK/Src-Signale zur ERK-Reaktivierung in den Tumorzellen führen (95).

Zudem können Tumor-assoziierte-Makrophagen durch die Sekretion von TNF- α und die durch NF- κ B-vermittelte Expression des Mikrophthalmie-assoziierten Transkriptionsfaktors (MITF) in Melanomzellen die Resistenzbildung gegen Inhibitoren des MAPK-Signalwegs fördern (96). Auch das in 2.1.2.2 beschriebene Zusammenspiel von Makrophagen, Fibroblasten und Tumorzellen in „inflammatorischen Nischen“, das auf der Sekretion von IL-1 β durch TAMs basiert, kann die Toleranz gegenüber BRAF-Inhibitoren sowie gegenüber der Kombinationstherapie mit BRAF und MEK-Inhibitoren vermitteln (15).

Die paradoxe Aktivierung des MAPK-Signalwegs durch BRAF-Inhibition in Makrophagen trägt auch zur vermehrten Produktion von VEGF bei, was wiederum den MAPK-Signalweg in Melanomzellen reaktiviert und so das Wachstum der Tumorzellen unterstützt. Das Blockieren der durch VEGF ausgelösten Signale kann die TAM-vermittelte Resistenz gegen die BRAF-Inhibitoren dementsprechend lindern (97).

Trotz der Einführung der Kombinationstherapie aus einem BRAF- und einem MEK-Inhibitor und dem damit einhergehenden verbesserten Therapieerfolg ist das Auftreten von Resistenzen aufgrund verstärkter oder kombinierter Mechanismen weiterhin zu beobachten. So führt beispielsweise eine BRAF-Ultraamplifikation zur Dimerisierung mit CRAF und zur Interaktion von mutierten MEK-Proteinen mit dem übermäßig exprimiertem BRAF, was folglich die Reaktivierung des MAPK-Signalwegs initiiert (98).

Dennoch sind die Kombinationstherapien der BRAF-Inhibitor-Monotherapie überlegen und werden daher als Standardtherapie in der Behandlung des metastasierten malignen Melanoms mit BRAFV600E Mutation eingesetzt (99). In einer randomisierten kontrollierten klinischen Studie wurde die Kombinationstherapie mit dem BRAF-Inhibitor VEM und dem MEK-Inhibitor COB mit der VEM-Monotherapie verglichen. Es wurde gezeigt, dass sich das progressionsfreie Überleben mit Hilfe der Kombinationstherapie signifikant verlängern ließ (10).

Eine weitere neue Kombination aus dem BRAF-Inhibitor Encorafenib (ENC) und dem MEK-Inhibitor Binimetinib erwies sich in der kürzlich veröffentlichten COLUMBUS-

Studie gegenüber einer Monotherapie mit ENC oder VEM als überlegen und stellt somit eine neue Option für die Therapie des BRAF-mutierten Melanoms dar (100). Derzeit sind viele weitere BRAF-Inhibitoren Gegenstand der präklinischen Forschung oder werden bereits in klinischen Studien untersucht. Während DAB, VEM und ENC zu den BRAF-Inhibitoren der zweiten Generation gehören und allesamt zu den α C-OUT-RAF-Inhibitoren zählen, besteht die Gruppe der BRAF-Inhibitoren der dritten Generation sowohl aus α C-OUT-RAF-Inhibitoren (z.B. PLX8394) als auch aus α C-IN-RAF-Inhibitoren (z.B. LY3009120). Neben den vorliegenden biochemischen Unterschieden wird erwartet, dass die α C-OUT-RAF-Inhibitoren der dritten Generation die therapeutische Breite der α C-OUT-RAF-Inhibitoren der zweiten Generation beibehalten, ohne jedoch durch die paradoxe ERK-Aktivierung in gesunden Zellen das Auftreten von Sekundärtumoren zu begünstigen (99, 101). Dennoch geht man davon aus, dass eine Resistenzbildung aufgrund der Bildung von RAF-Dimeren weiterhin möglich sein wird. Im Gegensatz dazu wird angenommen, dass die α C-IN-RAF-Inhibitoren der dritten Generation in der Lage sind, diese RAF-Dimere zu inhibieren, jedoch andere Resistenzmechanismen wie zum Beispiel neue BRAF-Mutationen auslösen könnten (99). Zudem wird damit gerechnet, dass die Effektivität der α C-IN-RAF-Inhibitoren durch ein geringes therapeutisches Fenster beschränkt sein wird, da sie auch in gesunden Zellen ERK-Signale hemmen. Zur Überwindung dieses Phänomens und der ERK-Reaktivierung durch Feedbackmechanismen soll die Kombination der α C-IN-RAF-Inhibitoren mit α C-OUT-RAF-Inhibitoren, sowie mit MEK- oder ERK-Inhibitoren Abhilfe schaffen und eine dauerhafte Hemmung von ERK gewährleisten (99, 102).

Nach den Erfolgen bei der Therapie des metastasierten malignen Melanoms mit Immuncheckpoint-Inhibitoren und der zielgerichteten Therapie mit BRAF- und MEK-Inhibitoren bei Vorliegen einer BRAFV600E-Mutation stieg das Interesse, die Möglichkeit einer Kombination dieser beiden Therapieformen zu erforschen (103). In einem BRAF(V600E)/Pten(-/-) syngenem Melanom-Transplantations-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Kombination eines Anti-PD-1- oder eines Anti-PD-L1-Antikörpers mit einem BRAF-Inhibitor die Aktivität tumorinfiltrierender Lymphozyten signifikant erhöht, das Tumorstadium verlangsamt und das Überleben signifikant verlängert (104). Außerdem konnte die Dreifach-Kombinationstherapie von DAB/TRA/Anti-PD-1-Antikörper in einem syngenem BRAFV600E-Melanom-Mausmodell durch eine verstärkte Melanom-Antigen- und MHC-Expression sowie der

Aufregulation Immunsystem-assoziiertes Gene zu einer verbesserten Antitumoraktivität beitragen (105).

Die Kombination des BRAF-Inhibitors VEM mit dem CTLA-4-Antikörper Ipilimumab wurde bereits 2013 in einer Phase-1-Studie bei Patienten mit BRAFV600-mutiertem, metastasiertem malignem Melanom getestet, die zuvor keine Therapie mit einem BRAF-/MEK-Inhibitor oder einem CTLA-4-Antikörper erhalten hatten. Diese Studie musste jedoch aufgrund drastischer Nebenwirkungen wie Lebertoxizität und Hautausschlägen abgebrochen werden (106).

Eine weitere Phase-1-Studie untersuchte die Sicherheit und Effektivität der Kombination aus DAB, TRA und dem PD-1-Inhibitor Pembrolizumab und zeigte ein gut kontrollierbares Toxizitätsprofil bei Patienten mit BRAF-mutiertem malignem Melanom (107).

Viele weitere klinische Studien, mit dem Ziel, ähnliche Medikamentenkombinationen auf Verträglichkeit und Wirksamkeit zu testen, werden derzeit durchgeführt.

Ob ein Patient mit BRAFV600E-mutiertem metastasiertem Melanom zuerst mit Inhibitoren des MAPK-Signalwegs oder Immuncheckpoint-Inhibitoren behandelt werden soll, ist bislang nicht vollständig geklärt. Die Kombination aus einem BRAF- und einem MEK-Inhibitor zeigte sich in den ersten sechs Monaten hinsichtlich der Ansprechrate gegenüber den Immuncheckpoint-Inhibitoren überlegen, während die Anwendung von Immuncheckpoint-Inhibitoren die Langzeitüberlebensdauer im Vergleich zu der MAPK-Inhibitor-Therapie wirksamer verlängerte (108).

2.3 Bekannte immunologische Off-Target Effekte von BRAF-Inhibitoren

2.3.1 Wirkung von BRAF-Inhibitoren auf T-Zellen und das Tumormikromilieu

BRAF-Inhibitoren zeigen nicht nur die oben beschriebenen On-Target Effekte gegen den Tumor, sondern weisen auch immunologisch relevante Off-Target Effekte auf, die im Folgenden beschrieben werden.

Wilmott et al. (12) untersuchten die Auswirkungen von DAB und VEM auf die Immunantwort an Tumorbiopsien von Patienten mit metastasiertem malignem Melanom. Nach der BRAF-Inhibitor-Therapie erhöhte sich die Zahl der CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten in den Tumorproben. Außerdem konnte eine Korrelation zwischen dem Grad der Tumorerinfiltration durch CD8⁺-Lymphozyten und Granzym B-exprimierenden Lymphozyten festgestellt werden. Zusätzlich war die höhere Anzahl

an CD8⁺-Lymphozyten mit einer geringeren TumorgroÙe sowie mit einer Zunahme von Tumornekrose assoziiert (12).

In einer ähnlichen Studie von Frederick et al. (109) wurde zusätzlich die Wirkung der BRAF- und MEK-Inhibitoren auf das Tumormikromilieu beleuchtet. Dabei wurden 35 Biopsien von 16 Patienten mit metastasiertem malignem Melanom vor (Tag 0) und nach (Tag 10-14) Behandlungsbeginn entnommen und auf Melanomantigene, T-Zellmarker und immunmodulatorische Zytokine untersucht. Die Behandlung bestand entweder aus der Gabe von VEM oder der kombinierten Gabe von DAB und TRA. Beide Behandlungsstrategien korrelierten mit einer erhöhten Expression von Melanom-Antigenen, einer Zunahme von CD8⁺-Lymphozyten und T-Zell-Zytotoxizitätsmarkern sowie einer Abnahme der immunsuppressiven Zytokine IL-6 und IL-8 im Tumorgewebe. Außerdem wurden während der Behandlung die inhibitorischen Rezeptoren TIM-3 und PD-1 auf den infiltrierenden T-Zellen verstärkt exprimiert. Bei der alleinigen Behandlung mit dem BRAF-Inhibitor VEM konnte zum Zeitpunkt der Tumorprogression eine Abnahme der Melanomantigen-Expression und der Infiltration mit CD8⁺-Lymphozyten beobachtet werden. Diese Effekte konnten jedoch durch die Kombination des BRAF-Inhibitors DAB und des MEK-Inhibitors TRA wieder aufgehoben werden. Die Autoren folgerten aus diesen Ergebnissen, dass die Behandlung mit BRAF-Inhibitoren zu einem für die Behandlung günstigeren Tumormikromilieu beiträgt (109).

Callahan et al. (13) untersuchten *in vitro* und *in vivo*, ob der BRAF-Inhibitor BMS908662 die Aktivierung von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen fördert. Sie konnten feststellen, dass sich die Aktivierung der T-Zellen abhängig von der BRAF-Inhibitor-Konzentration erhöht und dass dieser Effekt mit verstärkten ERK-Signalen korreliert, die auf einer paradoxen Aktivierung von ERK durch den BRAF-Inhibitor basieren. Konkret wurden Zellen der humanen Jurkat-T-Zell-Linie in Gegenwart verschiedener Konzentrationen des BRAF-Inhibitors BMS908662 in Gegenwart oder Abwesenheit stimulierender Antikörper (Anti-CD3 und Anti-CD28) inkubiert. Im Vergleich zu Zellen, die mit der Vehikelkontrolle behandelt wurden, zeigten die Zellen eine bis zu 3-fache Hochregulation von CD69 nach Inkubation mit BMS908662 bei einer Konzentration von 0,2 µM. Auch humane primäre *in vitro* aktivierte T-Zellen wiesen ein ähnliches Muster der dosisabhängigen Aktivierung auf. Des Weiteren wurde die Proliferation von

polyklonal aktivierten CD4⁺- (bis zu 25%) und CD8⁺- (bis zu 53%) T-Zellen durch den BRAF-Inhibitor erhöht.

Zudem wurde die Produktion von IFN- γ durch T-Zellen mittels intrazellulärer Zytokinfärbung analysiert. Hierbei wurden antigenspezifische T-Zellen verwendet, die mit MHC-Peptid-Komplexen stimuliert wurden. Die Produktion von IFN- γ war nach Inkubation mit BMS908662 bei einer Konzentration von 0,2 μ M im Vergleich zur Kontrolle um 35% erhöht.

Hohe Konzentrationen des BRAF-Inhibitors (z.B. 20 μ M) zeigten jedoch bei allen Untersuchungen abgeschwächte oder gegenteilige Effekte (13).

In der bereits oben angeführten Studie von Hu-Lieskovan et al. (105) (s. 2.2.2) wurde die Dreifachkombination von DAB, TRA und einem PD-1-Inhibitor getestet. Es wurde u.a. beobachtet, dass die alleinige Gabe von DAB die Anzahl von TAMs und T_{regs} erhöht, diese aber durch die Kombination mit TRA abnimmt (105).

Außerdem wurde von Schilling et al. (110) festgestellt, dass die Menge von MDSCs im Blut von Melanompatienten, die mit dem BRAF-Inhibitor VEM behandelt wurden, abnimmt. Die Autoren vermuten, dass VEM durch immunmodulatorische Effekte BRAF-mutierte Melanomzellen darin hemmen, MDSC-induzierende Faktoren, wie zum Beispiel IL-6, zu sezernieren (110). In einer weiteren Untersuchung von Schilling et al. (111) beobachtete die Arbeitsgruppe, dass VEM im Gegensatz zu DAB die Anzahl peripherer Lymphozyten vermindert und den Phänotyp und die Funktion von CD4⁺-T-Zellen verändert. So konnte eine Zunahme naiver CD4⁺-T-Zellen (CCR7⁺/CD45RA⁺) und eine Abnahme von Gedächtnis-CD4⁺-T-Zellen (CCR7⁺/CD45RA⁻) beobachtet werden. Außerdem war die Sekretion von IFN- γ und IL-9 durch CD4⁺-T-Zellen bei mit VEM behandelten Proben signifikant geringer als bei den Ursprungsproben (111).

Liu et al. (112) untersuchten die immunologischen Wirkungen von DAB und TRA *in vitro* an humanen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen von gesunden Spendern, an einer humanen Tumorzelllinie und *in vivo* an einem CT26-Mausmodell. Sie konnten zeigen, dass DAB die Intensität von pERK in humanen T-Zellen steigerte und die CD4⁺- und CD8⁺- T-Zellfunktion unverändert lies, während TRA die pERK-Spiegel senkte und zu einer teilweisen bzw. vorübergehenden Hemmung der T-Zell-Proliferation und zu einer Veränderung der Zytokinproduktion nach polyklonaler Stimulierung führte. Hierbei zeigten sich kaum Änderungen bei der Sekretion von IFN- γ , IL-5 und IL-10, eine

teilweise Hemmung der Produktion von IL-2, TNF- α und IL-8 und eine vermehrte Expression von IL-4. Die Effekte von TRA wurden durch die Zugabe von DAB teilweise abgeschwächt. DAB und TRA induzierten in BRAFV600E/K mutierten Tumorzellen die Expression von Apoptosemarkern sowie von HLA-Molekülen und verminderten die Produktion immunsuppressiver Faktoren wie PD-L1, IL-1, IL-8, NT5E und VEGFA. PD-L1 wurde vor allem nach der Resistenzbildung gegen den BRAF-Inhibitor *in vitro* hochreguliert (112).

2.3.2 Effekte von BRAF-Inhibitoren auf dendritische Zellen

Um den Einfluss von MEK- und BRAF-Inhibitoren auf die Funktion von DC zu prüfen, haben Ott et al. (113) humane Monozyten zu DC differenziert und mit Melanomzelllinien, die mit dem MEK-Inhibitor U0126 oder dem BRAF-Inhibitor VEM vorbehandelt wurden, ko-inkubiert. Durch PolyI:C gereifte DC, die mit Melanomzellen ko-kultiviert wurden, wiesen gegenüber der Kontrolle eine verminderte Zytokinproduktion und eine geringere Expression von kostimulatorischen Oberflächenmarkern auf. Diese Effekte wurden durch die MAPK-Blockade mit U0126 und/oder VEM bei der Kultur mit BRAFV600E-mutierten Melanomzelllinien aufgehoben. Zudem resultierte die alleinige Gabe von U0126 zu DC in einer ausgeprägten Hemmung der DC-Funktion, der Viabilität und der DC-Priming-Kapazität. VEM hingegen zeigte über weite Dosiskonzentrationenbereiche keinen Effekt auf die DC-Funktion. Die Autoren folgern aus den Ergebnissen, dass BRAFV600E-mutierte Melanomzellen die Funktion von DC unterdrücken, diese jedoch durch die Blockade des MAPK-Signalwegs wiederhergestellt werden kann (113).

Auch Tel et al. (114) untersuchten den Einfluss von VEM auf die Funktionsfähigkeit von DC. Dafür wurden aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) plasmazytoide DC (pDC) und myeloide DC (mDC) isoliert, die von gesunden Spendern oder von mit VEM behandelten Melanompatienten bereitgestellt wurden. Die Reifung der pDC, mDC und der aus Monozyten differenzierten DC erfolgte durch R848 in Kombination mit oder ohne VEM. Es zeigte sich, dass VEM die Reifung und die Zytokinproduktion von DC aus gesunden Spendern inhibiert und zu einer verringerten allogenen T-Zellproliferation führt. Dieser Effekt war jedoch nicht vorhanden, wenn primäre DC in der vollständigen PBMC-Fraktion stimuliert wurden und mit VEM inkubiert wurden. Die Funktionsfähigkeit der DC sowie die allogene Zellproliferation

der T-Zellen, die aus PBMC von mit VEM behandelten Patienten isoliert wurden, war ebenfalls nicht beeinträchtigt. Die Autoren vermuten, dass die Abwesenheit anderer Zelltypen in einer erhöhten Aufnahme von VEM in die DC resultiert und dadurch die oben beschriebenen Effekte induziert (114).

Eine weitere Studie, die den Effekt von BRAF- und MEK-Inhibitoren auf humane Immunzellen beleuchtet, wurde von Vella et al. (115) durchgeführt. Hierbei wurde die Wirkung von DAB und TRA jeweils allein oder in Kombination an isolierten humanen CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten sowie an Monozyten abgeleiteten dendritische Zellen (MODC) von gesunden Spendern analysiert. Die angewendeten Tests dienten der Prüfung der Viabilität, der Proliferation, der Zytokinproduktion und der antigenspezifischen Expansion. Die Auswirkungen auf den Phänotyp von MODC und auf die Antigen-Kreuz-Präsentation wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht. DAB beeinflusste die T-Zellen und MODC nicht, während TRA allein oder in Kombination mit DAB die T-Zellproliferation, die Zytokinproduktion und die antigenspezifische Expansion unterdrückte. Dennoch konnte keine verminderte Viabilität von CD4⁺- oder CD8⁺- T-Zellen nachgewiesen werden. Die Fähigkeit von MODC zur Kreuzpräsentation wurde nach kombinierter Gabe von DAB und TRA vermindert (115).

Hajek et al. (14) untersuchten Off-Target Effekte der BRAF-Inhibitoren VEM und DAB und von ihren zugehörigen MEK-Inhibitoren COB und TRA auf den Immunphänotyp muriner antigenpräsentierender Immunzellen. Es konnte gezeigt werden, dass die alleinige Gabe von DAB zu murinen Knochenmarks oder Milz-abgeleiteten DC zu einer erhöhten Expression kostimulatorischer Rezeptoren (CD80, CD86) und zu einer gesteigerten IL-1 β -Produktion führt. So konnte DAB neben der Verstärkung der IL-1 β -mRNA-Expression auch das Inflammasom über NLRC4 aktivieren. Zudem erhöhte in hohen Konzentrationen appliziertes DAB auch unabhängig von der am Inflammasom beteiligten Caspase-1, die IL-1 β -Produktion wahrscheinlich über die Aktivierung der Caspase-8. Die alleinige Gabe von TRA steigerte die MHCII-Expression und die Kombination von TRA mit DAB hatte keinen Einfluss auf die von DAB induzierte IL-1 β -Sekretion. Die Applikation von VEM alleine führte nicht zur Aktivierung der DC, resultierte jedoch bei Koapplikation von LPS in einer Erhöhung der IL-1 β -Produktion. Dennoch waren die IL-1 β -Konzentrationen, die durch VEM induziert wurden, verglichen mit DAB auf einem viel niedrigerem Niveau angesiedelt. Außerdem erhöhte

VEM die IL-1 β -mRNA-Expression und induzierte die Sekretion von IL-1 β über die Aktivierung des NLRC4/Caspase-1-Inflammasoms. Auch in dendritischen Zellen, die aus der Milz gewonnen wurden, führten beide BRAF-Inhibitoren zu einer Induktion von IL-1 β .

Neben der Untersuchung muriner DC wurden zusätzlich die Effekte von BRAF-Inhibitoren auf menschliche DC getestet. MODC, die ausgehend von Monozyten gesunder Spender differenziert wurden, zeigten bei der Applikation von VEM, im Gegensatz zu DAB, eine erhöhte Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86. Dennoch erhöhte DAB, ähnlich wie bei den murinen Knochenmark-abgeleiteten DC, die IL-1 β -mRNA-Expression sowie die Caspase-1-Aktivität nach 6 Stunden Inkubation moderat. In den Überständen der mit BRAF-Inhibitoren behandelten MODC konnte jedoch kein IL-1 β nachgewiesen werden. Aus PBMC isolierte primäre humane DC zeigten hingegen in den meisten Fällen eine erhöhte IL-1 β -Produktion nach der Applikation von DAB.

Die Autoren folgern aus diesen Ergebnissen, dass BRAF-Inhibitoren abhängig von der DC-Population und der Spezies bisher unbekannte immunmodulatorische Effekte in antigenpräsentierende Zellen auslösen (14).

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

3.1.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav V-150	System GmbH, Linden
Durchflusszytometer Attune® Nxt Flow Cytometer	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Eismaschine Ziegra	Intercontinentale Ziegra Eismaschine Beteiligungs-GmbH, Isernhagen
Electrophoresis Constant Power Supply ECPS 3000/150	Pharmacia AG, Uppsala, Schweden
Flockeneisbereiter flake-line	Wessamat Eismaschinenfabrik GmbH, Kaiserslautern
Heiz-Thermoschüttler MHR13	Hettich Benelux B.V., Geldermalsen, Niederlande
Hidex Sense Beta Plus	Hidex Oy, Turku, Finnland
Inkubator Avantgarde.Line CB220	Binder GmbH, Tuttlingen
Mechanischer Summenzähler	Baumer Ltd., Swindon, UK
Mikroskop Olympus CH-2	Olympus Europa SE & Co. KG., Hamburg
Mikroskop Olympus CK-2	Olympus Europa SE & Co. KG., Hamburg
NanoDrop™ 2000c Spektralphotometer	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Neubauerzählkammer	Lo-Labortechnik GmbH, Friedrichsdorf
Reagenzglasgestell	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Reagenzglasschüttler RS-2	IDL GmbH Nidderau
Sterilwerkbank LaminAir HB 2448	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Tischzentrifuge	VWR International GmbH, Darmstadt
Vortex-Mischer	VWR International GmbH, Darmstadt
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Gefrierschränke	
Economic	Robert Bosch GmbH, Stuttgart
Economic-froster	Robert Bosch GmbH, Stuttgart

HERA Freeze	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Labortiefkühlschrank	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, MA, USA
MediLine	Liebherr International AG, Bulle, Schweiz
Premium NoFrost	Liebherr International AG, Bulle, Schweiz
Kühlschränke	
MediLine	Liebherr International AG, Bulle, Schweiz
Premium	Liebherr International AG, Bulle, Schweiz
Pipetten	
0,5–10 µl	Eppendorf AG, Hamburg
10-100µl	Eppendorf AG, Hamburg
100-1000µl	Eppendorf AG, Hamburg
20-200µl	Starlab International GmbH, Hamburg
Multipette M4	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetus® 0,1-200 ml	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG, Eberstadt
S1 Pipettierhilfe	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, 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

Tabelle (Tab.) 1 Liste der Geräte und Hersteller.

3.1.1.2 Verbrauchsmaterialien

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
96-Well LUMITRAC 200	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Aluminiumfolie	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Attune® 1X Focusing Fluid	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Attune® 1X Shutdown Solution	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Attune® Wash Solution	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Cellstar® 24 Well Cell Culture Plate, sterile, with lid	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Cellstar® 6 Well Cell Culture Plate, sterile, with lid	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Cellstar® 96 Well Cell Culture Plate, sterile, with lid	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
EASYstrainer 70µm Filter für 50 ml Röhrchen	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Einweghandschuhe Vasco Nitril Blue M	B.Braun GmbH, Urbach
Eppendorf Combitips advanced 5ml	Eppendorf AG, Hamburg
Parafilm M®	Bemis Company Inc.
Petrischale Polystyrol 94/16 MM	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen TipOne® (10/200/1000 µl)	Starlab International GmbH, Hamburg
Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Röhrchen (15/50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipetten (5/10/25 ml)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich

Tab. 2 Liste der Materialien und Hersteller.

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

3.1.2.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
2-Propanol ROTIPURAN® ≥99,8 %, p.a., ACS, ISO	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
3%ige Essigsäure mit Methylenblau	Stemcell Technologies Inc., Vacouver, CAN
AbC™ Total Antibody Compensation Bead Kit	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Honeywell Riedel-de Haën AG, Seelze
Ampuwa Spüllösung 1000 ml	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg vor der Höhe

Aqua dest.	B.Braun GmbH, Urbach
Dabrafenib	Selleck Chemicals LLC, Houston, TX, USA
Deoxynucleotide (dNTP) Solution Mix	New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO) Hybri-Max®	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG., Karlsruhe
Ethanol 70%	Selbst angesetzt
Ethanol 99,8%	Carl Roth GmbH & Co. KG., Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Fixable Viability Dye eFlour™ 506	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Gel Loading Dye, Blue	New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA
GelRed® Nucleic Acid Gel Stain	RPE Biotum LLC, Noyabrskaya, Russland
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Honeywell Riedel-de Haën AG, Seelze
Lipopolysaccharid (LPS)	Calbiochem GmbH, Bad Soden am Taunus
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA, Darmstadt
Resiquimod (R848)	Selleck Chemicals LLC, Houston, TX, USA
Terralin Liquid	Schülke und Mayr GmbH, Norderstedt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Trypanblau Lösung 0,4%	Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, USA
Trypsin – EDTA Solution 1x	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Vemurafenib	Selleck Chemicals LLC, Houston, TX, USA

Tab. 3 Liste der Chemikalien und Hersteller.

3.1.2.2 Supplemente

Supplement	Hersteller
L-Glutamin	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA

Recombinanter humaner Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
β -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Tab. 4 Liste der Supplemente.

3.1.2.3 Medien

Medium	Hersteller
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, München
Gibco RPMI Medium 1640 + L-Glutamine	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA
PBMC-Medium (RPMI, 1% β -Mercaptoethanol, 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin)	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA

Tab. 5 Liste der Medien.

3.1.2.4 Puffer

Puffer	Hersteller
Accutase® Enzyme Cell Detachment Medium	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Density Gradient Media Histopaque®-1077 (Ficoll-Hypaque)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, USA
FACS-Fixierlösung (PBS, 0,7 % PFA)	Selbst angesetzt
FACS-Puffer (DPBS, 2% FCS)	Selbst angesetzt
Gey'scher Lysepuffer (100 μ M EDTA, 10 mM KHCO ₃ , 155 mM NH ₄ Cl, H ₂ O)	Selbst angesetzt
GoTaq® Flexi Puffer	Promega Corp. Madison, WI, USA
RLT Lyse Puffer	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
TAE-Puffer (TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan) 40 mM, Essigsäure 20mM, EDTA 1mM)	Selbst angesetzt

Tab. 6 Liste der Puffer.

3.1.2.5 Kits

Kits	Hersteller
Blood & Cell Culture DNA Mini Kit	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay	Promega Corp. Madison, WI, USA

Caspase-Glo® 3/7 Assay	Promega Corp. Madison, WI, USA
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega Corp. Madison, WI, USA
GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase	Promega Corp. Madison, WI, USA
Human IFN- γ Flex Set	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Human IL-10 Flex Set	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Human IL-12 Flex Set	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Human IL-17 Flex Set	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Human IL-1 α Flex Set	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, 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
Human TNF- α Flex Set	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande

Tab. 7 Liste der Kits.

3.1.3 Antikörper

Antikörper	Fluorophor	Klon	Isotyp	Konzentration	Hersteller
Anti-human CD123	Super Bright 436	6H6	Mouse IgG1	1 μ l/Test	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Anti-human CD14	PE-Cyanine7	61D3	Mouse IgG1	1 μ l/Test	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Anti-human CD141	PE-Cyanine7	JAA17	Mouse IgG2a	1 μ l/Test	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Anti-human CD19	Super Bright 436	HIB19	Mouse IgG1	2,5 μ l/Test	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, MA, USA

Anti-human CD1c	APC	L161	Mouse IgG1	1 µl/Test	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Anti-human CD25	APC	BC96	Mouse IgG1	2,5 µl/Test	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Anti-human CD3	eFlour™ 450	SK7	Mouse IgG1	2,5 µl/Test	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Anti-human CD4	FITC	RPA-T4	Mouse IgG1	2,5 µl/Test	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Anti-human CD40	Super Bright 702	5C3	Mouse IgG1	2,5 µl/Test	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Anti-human CD56	PE-Cyanine7	CMSSB	Mouse IgG1	2,5 µl/Test	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Anti-human CD69	Super Bright 600	FN50	Mouse IgG1	2,5 µl/Test	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Anti-human CD80	PerCP-eFluor™ 710	2D10.4	Mouse IgG1	1 µl/Test	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Anti-human CD86	Super Bright 600	IT2.2	Mouse IgG2b	2,5 µl/Test	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Anti-human CD8a	PE	OKT8	Mouse IgG2a	2,5 µl/Test	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Anti-human HLA-ABC	FITC	W6/32	Mouse IgG2a	2,5 µl/Test	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Anti-human HLA-DR	APC-eFluor® 780	LN3	Mouse IgG2b	2,5 µl/Test	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, MA, USA

Tab. 8 Liste der Antikörper.

3.1.4 Primer

Oligoname	Sequenz (5'→3')	Hersteller
bhat-31-s	AGAAGCTTCCACCAATACTC (20)	Eurofins Scientific SE, Luxemburg
bhat-31-as	AGCACCTAGTTGTAAGGAAG (20)	Eurofins Scientific SE, Luxemburg
bhat-511-s	TGGCATTGATCTGGTTCATC (20)	Eurofins Scientific SE, Luxemburg
bhat-511-as	GTTTAGGAATCTTCCCCTT (20)	Eurofins Scientific SE, Luxemburg
Yin-1464-s	AAATCAGAAGGCTGCTTGGGA (20)	Eurofins Scientific SE, Luxemburg
Yin-1464-as	ATGGGTGAATGGGAATTTGA (20)	Eurofins Scientific SE, Luxemburg
Yin-511-s	TGGCTAGGGTAACAGCACCT (20)	Eurofins Scientific SE, Luxemburg
Yin-511-as	GGGTACAATGAAGGGCCAAT (20)	Eurofins Scientific SE, Luxemburg
Yin-31-s	CCCTTCCATGAACCAGAGAA (20)	Eurofins Scientific SE, Luxemburg
Yin-31-as	GCTGAAGAGAATCCCAGAGC (20)	Eurofins Scientific SE, Luxemburg
Gordon-3737-s	CTAAGCCCTCCTTGTTCTAGACCA (24)	Eurofins Scientific SE, Luxemburg
Gordon-3737-as	CTCTTGGATCCAGGTTCTCAGATT (24)	Eurofins Scientific SE, Luxemburg
Gordon-511-s	TTGAGGGTGTGGGTCTCTACCT (22)	Eurofins Scientific SE, Luxemburg
Gordon-511-as	AGGAGCCTGAACCCTGCATAC (21)	Eurofins Scientific SE, Luxemburg
Wex-1464-s	CCCTCGTGTCTCAAATACTTGC (22)	Eurofins Scientific SE, Luxemburg
Wex-1464-as	GCACAGTGCCTGGCATGTAC (20)	Eurofins Scientific SE, Luxemburg
Wex-3737-s	GCCCTCCTTGTTCTAGACCAGGGA (24)	Eurofins Scientific SE, Luxemburg
Wex-3737-as	ATCGCTTCCACTTCTTTATGGCATC (26)	Eurofins Scientific SE, Luxemburg
hil1-3737-s1	CCTTTCCCTTCTGCTTCTGG (20)	Eurofins Scientific SE, Luxemburg

hil1-3737-as1	ACAACTCCGACATCAGGGAA (20)	Eurofins Scientific SE, Luxemburg
hil1-3737-s2	TCTCTCCTTTCCCTTCTGCT (20)	Eurofins Scientific SE, Luxemburg
hil1-3737-as2	CCTCTGTTTGTGGTCCCCT (19)	Eurofins Scientific SE, Luxemburg
hil-3737-s3	CTCCAATGGGCTTCTTCTCC (20)	Eurofins Scientific SE, Luxemburg
hil-3737-as3	GGTCCCCTCTCTTATACCCAC (21)	Eurofins Scientific SE, Luxemburg

Tab. 9 Liste der Primer.

3.1.5 Software, elektronische Medien

Software	Firma
Attune® NxT Flow Cytometer Software	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA
FCAP-Array™	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
FCS-Filter™	Soft Flow, Inc., Ungarn
GraphPad Prism 5	GraphPadSoftware Inc., San Diego, CA, USA
Microsoft Office 2019	Microsoft Corp, Redmond, WA, USA

Tab. 10 Liste der Software und der elektronischen Medien.

3.2 Methoden

3.2.1 Aufarbeitung von Buffy Coats zur Gewinnung von PBMC (116)

Buffy Coats werden in einem 50 ml Röhrchen vorsichtig auf 20 ml Ficoll-Hypaque geschichtet und ohne Bremse zentrifugiert (20°C, 40 min, 400xg). Hierbei entstehen drei Schichten, wobei die obere das Plasma, die mittlere die PBMC und die untere Schicht die Erythrozyten darstellt. Das Plasma wird vorsichtig aspiriert und in 15 ml Röhrchen gef llt, während die PBMC auf dem Ficoll-Hypaque verbleibt. Danach wird das gewonnene Plasma zwecks Hitzeinaktivierung 30 Minuten lang im Wasserbad bei 56°C inkubiert. Währenddessen wird die mononukleäre Zellschicht mit einer serologischen Pipette abgesaugt und in ein neues 50 ml Röhrchen gef llt. Anschließend wird dieses Röhrchen mit DPBS aufgefüllt, zentrifugiert (4°C, 10 min, 450xg) und der Überstand vom Zellpellet abgenommen. Zur Entfernung von Blutplättchen und restlichem Ficoll-Hypaque werden die PBMC noch zwei Mal mit 50 ml 4°C kaltem DPBS auf 50 ml aufgefüllt, zentrifugiert (4°C, 5 min, 350xg) und der Überstand verworfen. Nach den ersten beiden Waschschr tten wird jeweils 1 ml Gey'scher Lyse-Puffer für eine Minute zu den PBMC gegeben, um die restlichen Erythrozyten zu lysieren. Das nach 30 Minuten Inkubation denaturierte Plasma wird ebenfalls zentrifugiert (20°C, 5 min, 750xg) und das gewonnene Serum bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Die PBMC werden nach dem letztem Waschschr tt mit PBMC-Medium auf 50 ml aufgefüllt und 2 ml autologes Serum hinzugefügt. Daraufhin werden 10 µl der Zellsuspension mit Trypanblau-Lösung 1:10 verdünnt, in eine Neubauz hlkammer gegeben und die Zellkonzentration mit Hilfe des Mikroskops bestimmt. Je nach Versuch werden im Folgenden die PBMC durch Verdünnung mit PBMC-Medium auf die benötigte Zellkonzentration eingestellt.

3.2.2 Inkubation der Zellen mit den zu testenden Agenzien

Eine Millionen PBMC (10^7 /ml je 100 µl) werden in eine 96-Well Platte vorgelegt und 1 µl des zu testenden Agens zu der jeweiligen Vertiefung gegeben. Alternativ werden eine Millionen PBMC (10^7 /ml je 100 µl) in eine 96-Well Platte appliziert und für 1,5 h bei 37°C (5% CO₂) inkubiert, sodass sich die Monozyten aufgrund ihrer Eigenschaft der Plastikadhärenz auf dem Boden der Vertiefung absetzen (117). Der Überstand, in dem sich die nicht-adhärenten Zellen befinden (v.a. T-Zellen, B-Zellen, DC), wird verworfen oder in eine neue 96-Well Platte übertragen. Der Monozyten-Rasen wird im

Anschluss mit 100µl PBMC-Medium aufgefüllt (117). Danach werden die verschiedenen Zellkultur-Ansätze mit 1 µl des zu testenden Agens versetzt und für 22 h bei 37°C (5% CO₂) im Brutschrank inkubiert. Anschließend werden die 96-Well Platten dem Brutschrank entnommen und zentrifugiert (4°C, 10 min, 400xg). Die Überstände werden auf eine neue 96-Well-Platte übertragen, beschriftet und bei -20°C eingefroren. Die verbleibenden Zellen werden mit 200 µl RLT Lyse Puffer lysiert und die Lysate ebenfalls bei -20°C gelagert.

3.2.3 Cytometric Bead Array (CBA) (118)

Für die Durchführung des CBA werden das „Human Soluble Protein Master Buffer Kit“ und die „Human Flex Sets“ von BD verwendet. Zunächst werden die Standards und die Proben für die Zytokinanalyse vorbereitet. In 0,5 ml Rörchen wird für die zu testenden Zytokine eine Standardreihe angesetzt. Hierbei beträgt die höchste Standardkonzentration 2500 pg/ml und die niedrigste 0 pg/ml. Daraufhin wird ein Bead-Master-Mix angesetzt, bei dem pro Ansatz (Standardreihe und Proben) 0,2 µl der Beads, die für jeweils ein Zytokin spezifisch sind, mit 10 µl des „capture bead diluent“ gemischt werden. Zusätzlich wird pro Ansatz ein zweiter Master Mix mit jeweils 0,2 µl des PE-Nachweisreagenz und 10 µl des detection reagent diluent hergestellt. In jedes 5 ml Rundbodenrörchen werden 10 µl des Bead-Master-Mix vorgelegt und mit jeweils 10 µl der Standardreihe oder der zu analysierenden Proben gemischt und die Ansätze eine Stunde lang bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Daraufhin werden 10 µl des PE-Master-Mix zu den Rörchen gegeben und erneut bei Raumtemperatur für eine Stunde im Dunkeln inkubiert. Danach werden die Rörchen mit 1 ml DPBS versetzt und zentrifugiert (4°C, 10 min, 300xg). Die Rörchen werden dekantiert und es werden 500 µl DPBS hinzugefügt. Die Beads können nun mit einem Vortex-Mischer resuspendiert und mit dem Durchflusszytometer Attune® Nxt gemessen werden.

3.2.4 Durchflusszytometrie

500 µl der Zellsuspension werden in ein 5ml Rundbodenrörchen gegeben, mit 1 ml DPBS versetzt und zentrifugiert (20°C, 10 min, 300xg). Daraufhin werden die Rörchen dekantiert und fluoreszenzmarkierte Antikörper hinzugefügt. Im Folgenden werden die Zellen 25 Minuten lang bei 4°C im Dunkeln. Dann werden die Rörchen

mit 500 µl DPBS versetzt und zentrifugiert (20°C, 10 min, 300xg). Schließlich werden die Zellen mit FACS-Fixierlösung (PBS, 0,7% PFA) fixiert. Die Messungen werden mit dem Durchflusszytometer Attune® Nxt durchgeführt und mit der Attune® NxT Flow Cytometer Software ausgewertet.

3.2.5 Lumineszenz-basierte Assays

3.2.5.1 Caspase-Glo® Inflammasome Assay (119, 120)

Zunächst werden der Caspase-Glo® 1 Puffer und das Z-WEHD-Substrat auf Raumtemperatur temperiert. Dann wird das Z-WEHD-Substrat mit dem Caspase-Glo® 1 Puffer rekonstituiert und mehrmals invertiert. Der MG-132-Inhibitor und der Ac-YVAD-CHO-Inhibitor werden bei Raumtemperatur aufgetaut und 60 µl des MG-132-Inhibitors zu 10 ml gelöstem Z-WEHD-Substrat gegeben und gemischt, um gebrauchsfertiges Caspase-Glo® 1-Reagenz zu erhalten. Danach wird zur Herstellung des Caspase-Glo® 1 YVAD-CHO-Reagenz die Hälfte (5 ml) des Caspase-Glo® 1-Reagenz in ein neues Röhrchen übertragen, mit 5 µl des Ac-YVAD-CHO-Inhibitors versetzt und gemischt. Die Zellen, die 5 h im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) mit dem zu testenden Agens inkubierten, werden entnommen und 5 Minuten lang bei Raumtemperatur gehalten. Dann werden 100 µl des Caspase-Glo® 1-Reagenz zu den Ansätzen der weißen 96-Well-Platte gegeben, die nur Medium, unbehandelte Zellen und die behandelten Zellen enthalten. Im nächsten Schritt werden zur anderen Hälfte der Ansätze 100 µl des Caspase-Glo® 1 YVAD-CHO-Reagenz appliziert, die Platte mit einem Deckel verschlossen, der Inhalt der Vertiefungen 30 Sekunden lang vorsichtig mit dem Thermoschüttler bei 300 U/min gemischt und eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wird das Lumineszenzsignal mit dem Mikroplattenleser Hidex Sense Beta Plus gemessen.

3.2.5.2 Caspase-Glo® 3/7 Assay (121)

Der Caspase-Glo® 3/7-Puffer und das lyophilisierte Caspase-Glo® 3/7 Substrat werden auf Raumtemperatur eingestellt und anschließend vermischt, um das Caspase-Glo® 3/7 Reagenz zu erhalten. Die weiße 96-Well Platte wird aus dem Brutschrank entnommen und auf Raumtemperatur äquilibriert. Daraufhin werden 100 µl des Caspase-Glo® 3/7-Reagenz zu jeder Vertiefung der 96-Well Platte, die behandelte Zellen, unbehandelte Zellen oder nur Kulturmedium enthält, appliziert.

Anschließend wird der Inhalt der Vertiefungen 30 Sekunden lang vorsichtig mit dem Thermoschüttler bei 300 U/min gemischt und eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Im Folgenden wird das Lumineszenzsignal der Proben mit dem Mikroplattenleser Hidex Sense Beta Plus gemessen.

3.2.5.3 Caspase-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (122)

Zunächst werden der CellTiter-Glo®-Puffer und das CellTiter-Glo®-Substrat auf Raumtemperatur äquilibriert und im Anschluss vermischt, um das CellTiter-Glo® Reagenz zu erhalten. Die weiße 96-Well Platte, die die zu analysierenden Ansätze enthält, wird aus dem Brutschrank entnommen und 30 Minuten lang bei Raumtemperatur gelagert. Daraufhin werden 100 µl des CellTiter-Glo® Reagenz in jede Vertiefung der Platte gegeben. Dann wird der Inhalt der Platte zwei Minuten lang auf dem Thermoschüttler bei 300 U/min gemischt und zehn Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wird das Lumineszenzsignal mit dem Mikroplattenleser Hidex Sense Beta Plus gemessen.

3.2.6 Gewinnung der genomischen DNA (123)

Zur Isolierung genomischer DNA wird das Blood & Cell Culture DNA Mini Kit von QIAGEN verwendet. Zu 1 ml der PBMC-Suspension (10^7 Zellen/ml) werden 1 ml eiskalter C1-Puffer und 3 ml destilliertes Wasser hinzugefügt. Die Suspension wird durch mehrfaches Umdrehen des Röhrchens gemischt. Anschließend wird das Röhrchen zehn Minuten lang auf Eis inkubiert und zentrifugiert (4°C, 15 min, 1300xg) und anschließend der Überstand verworfen. Im nächsten Schritt werden 0,25 ml eiskalter C1-Puffer und 0,75 ml eiskaltes, destilliertes Wasser hinzugegeben und das Pellet wird mit dem Vortex-Mischer resuspendiert. Daraufhin wird das Röhrchen erneut zentrifugiert (4°C, 15 min, 1300xg) und der Überstand verworfen. Nach diesem Schritt kann das Röhrchen bei -20°C zwischengelagert werden.

Im Folgenden wird 1 ml G2-Puffer in das Röhrchen appliziert und die Zellkerne werden mit dem Vortex-Mischer 30 Sekunden lang resuspendiert. Dann wird die Suspension mit 25 µl QIAGEN Protease versetzt und 60 Minuten lang bei 50°C inkubiert. Eine QIAGEN Genomic-Tip 20/G-Säule wird mit 1 ml QBT-Puffer äquilibriert. Nun wird das Röhrchen mit dem Vortex-Mischer 10 Sekunden lang bei maximaler Geschwindigkeit resuspendiert und der Inhalt auf die Säule appliziert. Nachdem die Probe durch das

Genomic-Tip gelaufen ist, wird es mit 2 x 1 ml QC-Puffer gewaschen. Die genomische DNA wird durch das Hinzufügen von 50°C warmem QF-Puffer aus dem Genomic-Tip herausgespült. Daraufhin wird die genomische DNA mit 1,4 ml Isopropanol versetzt, auf zwei neue 2 ml Röhrchen aufgeteilt, gemischt und zentrifugiert (4°C, 20 min, 15000xg). Dann wird der Überstand entfernt und das DNA-Pellet mit 500 µl kaltem 70%igem Ethanol gewaschen. Der Inhalt der beiden Röhrchen wird wieder zusammengeführt, kurz mit dem Vortex-Mischer resuspendiert und zentrifugiert (4°C, 15 min, 15000xg). Anschließend wird der Überstand vorsichtig entfernt und das DANN-Pellet 10 Minuten lang an der Luft getrocknet. Nun wird 0,1 ml destilliertes Wasser zum DNA-Pellet gegeben und eine Stunde lang bei 55°C mit dem Thermoschüttler gemischt. Zuletzt wird der DNA-Gehalt mit dem NanoDrop™ 2000c Spektralphotometer bestimmt.

3.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Pro Ansatz wird 43 µl eines Master-Mix verwendet, der aus 1 µl dNTP (10 nM), 10 µl GoTaq® Flexi Puffer, 5 µl MgCl₂-Lösung (25 mM), 0,25 µl GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase und 26,75 µl destilliertem Wasser besteht. Diesem Master-Mix wird pro Ansatz 2,5 µl des Vorwärtsprimers (10 pmol/µl), 2,5 µl des Rückwärtsprimers (10 pmol/µl) und 40 ng der zu amplifizierenden DNA hinzugefügt. Danach werden die PCR-Röhrchen kurz an der Tischzentrifuge zentrifugiert, in den Thermozykler gestellt und die PCR gestartet (s. Abb. A3 u. 4).

3.2.8 Aufreinigung der PCR-Produkte (124)

250 µl PB-Puffer werden zu 50 µl des PCR-Produkts hinzugefügt und gemischt. Dann wird eine QIAquick-Säule in ein 2 ml Röhrchen platziert. Um die DNA zu binden, wird das PCR-Puffer-Gemisch auf eine QIAquick-Säule appliziert und diese zentrifugiert (20°C, 60 s, 17900xg). Der Durchfluss wird verworfen und die QIAquick-Säule in das gleiche Röhrchen gesetzt. Daraufhin wird 0,75 ml PE-Puffer zur QIAquick-Säule gegeben und das Röhrchen zentrifugiert (20°C, 60 s, 17900xg). Der Durchfluss wird wiederum verworfen und die QIAquick-Säule in das gleiche Röhrchen platziert. Das Röhrchen mit der QIAquick-Säule wird nun noch einmal zentrifugiert (20°C, 60 s, 17900xg). Dann wird die QIAquick-Säule in ein sauberes 1,5 ml Röhrchen gesetzt, 50 µl destilliertes Wasser auf das Zentrum der QIAquick Membran gegeben und

zentrifugiert (20°C, 60 s, 17900xg). Anschließend wird der DNA-Gehalt mit dem NanoDrop™ 2000c Spektralphotometer gemessen. Das aufgereinigte PCR Produkt kann nun zur DNA-Sequenzierung an die Firma StarSEQ geschickt werden.

3.2.9 Gelelektrophorese

In einem Erlenmeyerkolben werden 1,8 g Agarose mit 180 ml TAE-Puffer gemischt und in der Mikrowelle solange erhitzt, bis sich die Agarose vollständig löst. Dann wird die Lösung auf 50°C abgekühlt und 18 µl GelRed® hinzugefügt. Das Gel wird in die Gelkammer gegossen und 20 Minuten lang im Kühlschrank gelagert, sodass das Gel fest wird.

Anschließend wird das Gel in die Laufkammer gelegt und mit TAE-Puffer bedeckt. Daraufhin werden 5 µl der DNA-Leiter und 20 µl der DNA-Proben, die mit jeweils 4 µl Loading Dye vermischt wurden, in die Geltaschen pipettiert und die Elektrophorese gestartet (80V, 80 min).

4. Ergebnisse

Wie bereits oben beschrieben, ist das Ziel der Arbeit, immunologische Off-Target Effekte des BRAF-Inhibitors DAB an humanen Immunzellen zu untersuchen. In dieser Arbeit wird geprüft, ob DAB die Produktion proinflammatorischer Zytokine induziert und ob DAB die Expression von Aktivierungs-Oberflächenmarkern auf diesen Zellen verändert. Außerdem soll untersucht werden, welche Immunzellpopulationen maßgeblich für die Produktion der Zytokine verantwortlich sind und ob hierfür bekannte funktional relevante Polymorphismen verantwortlich sind.

4.1 Der Einfluss von Dabrafenib (DAB) auf die Zytokinproduktion von humanen Immunzellen

Zunächst werden die Ergebnisse der Experimente dargestellt, die den Einfluss von DAB auf die Zytokinproduktion von humanen Immunzellen untersuchen. Dabei wird der Schwerpunkt auf die Untersuchung der Produktion von IL-1 β durch PBMC und Monozyten sowie auf die mögliche Aktivierung des Inflammasoms bei diesen Zellpopulationen gesetzt. Anschließend wird auch der Einfluss von DAB auf die Produktion anderer Zytokine durch humane Immunzellen beleuchtet. Im Folgenden werden PBMC solcher Spender als „Responder“ bezeichnet, die DAB-abhängig IL-1 β aufregulieren.

4.1.1 Der Einfluss von DAB auf die IL-1 β Produktion von PBMC

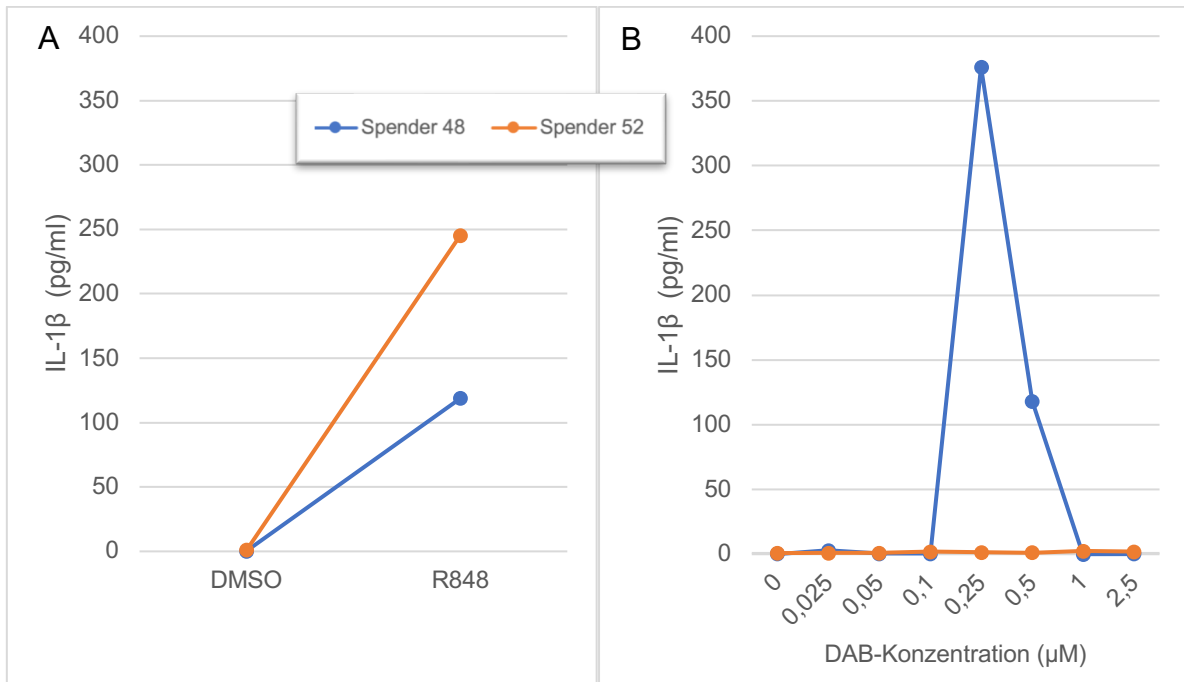


Abbildung (Abb.) 1 DAB verstärkt die IL-1 β Produktion in PBMC nur bei manchen Spendern. 10^6 PBMC (10^7 /ml je 100 μ l) unterschiedlicher Spender wurden mit DAB in verschiedenen Konzentrationen (0,025 μ M – 2,5 μ M) behandelt und inkubiert (37°C, 5% CO₂). Dimethylsulfoxid (DMSO) (1%) diente als Lösungsmittelkontrolle, R848 als Positivkontrolle (A). Nach 22 h wurden die Überstände abgenommen und die IL-1 β -Konzentration durch einen CBA bestimmt. Das Diagramm zeigt die IL-1 β -Produktion in pg/ml (B) von zwei Spendern (insgesamt wurde die IL-1 β -Produktion durch DAB an PBMC von 17 Spendern getestet).

DAB stimuliert konzentrationsabhängig bei 7 von 17 Spendern die IL-1 β -Produktion von PBMC gesunder Spender (s. Tab. A1). Abbildung (Abb.) 1 zeigt repräsentativ einen Responder (Spender 48) und einen Non-Responder (Spender 52). PBMC des Responders reagierten auf eine DAB-Applikation (0,25 μ M u. 0,5 μ M) mit einer verstärkten IL-1 β -Sekretion, während PBMC des Non-Responders in ihrer IL-1 β -Produktion unbeeinflusst blieben. Vier der sieben Responder wiesen erhöhte IL-1 β -Level bei einer DAB-Konzentration von 0,25 μ M auf, jeweils zwei bei einer DAB-Konzentration von 0,05 μ M bzw. 2,5 μ M und einer 0,5 μ M.

4.1.2 Der Einfluss von DAB auf die IL-1 β Produktion von Monozyten

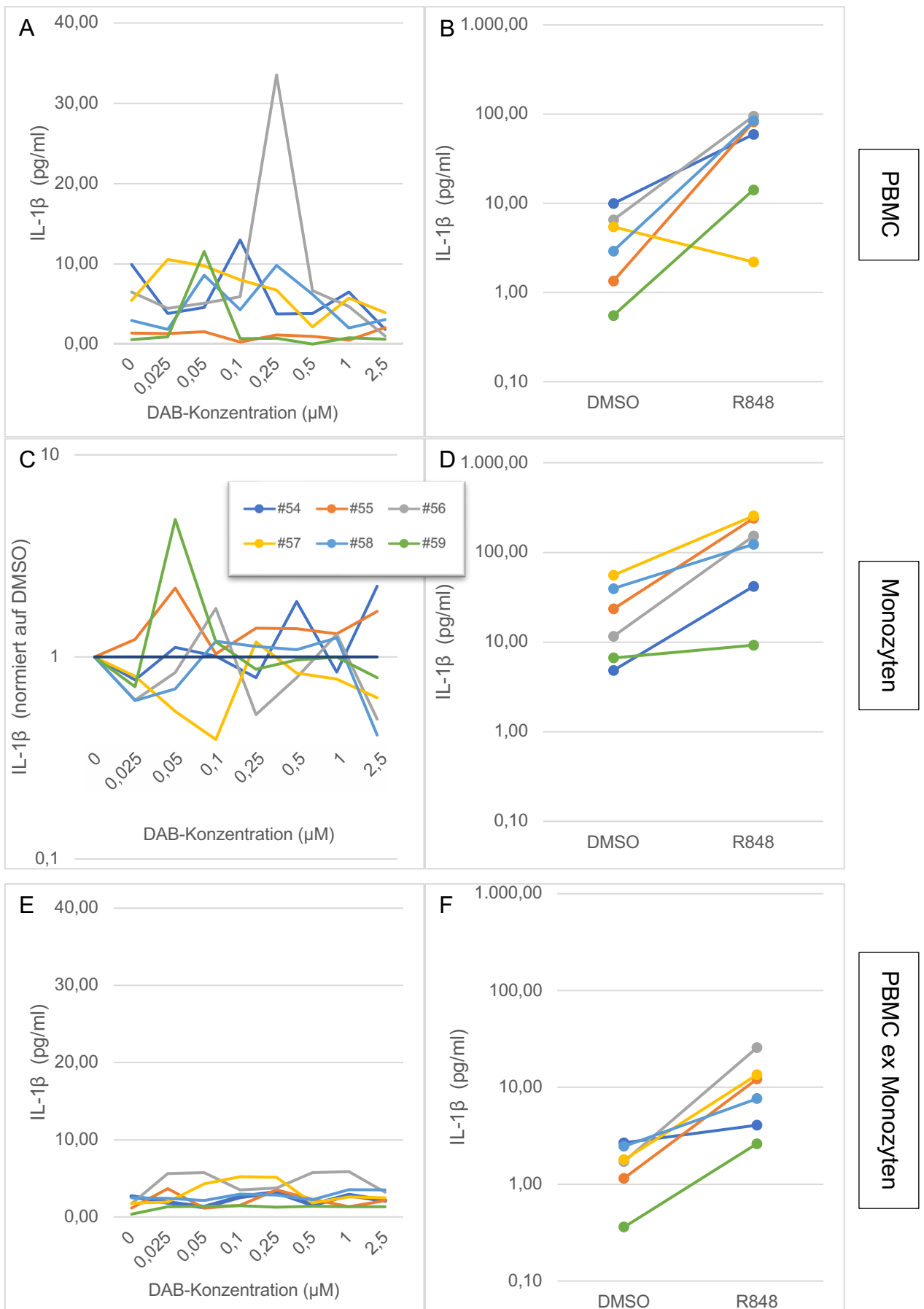


Abb. 2 DAB verstärkt bei manchen Spendern die IL-1 β Produktion. 10^6 PBMC (10^7 /ml je 100 μ l) unterschiedlicher Spender wurden in Vertiefungen einer 96-Well Platte ausgesät und mit DAB in verschiedenen Konzentrationen (0,025 μ M - 2,5 μ M) behandelt (A). Parallel wurden durch 1,5-stündige Plastikadhärenz Monozyten von der non-monozytären Fraktion getrennt und jeweils mit DAB in verschiedenen Konzentrationen (0,025 μ M - 2,5 μ M) inkubiert (37°C, 5% CO₂) (C, E). DMSO (1%) diente als Lösungsmittelkontrolle, R848 als Positivkontrolle (B, D, F). Nach 22 h wurden die Überstände abgenommen und die IL-1 β -Konzentration durch einen CBA bestimmt. Die Diagramme (A, B, D, E, F) zeigen die IL-1 β -Produktion in pg/ml, das Diagramm C die IL-1 β -Level normiert auf die IL-1 β -Level der Kontrolle (s. Tab. A2).

Neben der verstärkten IL-1 β Produktion in PBMC nach DAB-Applikation (Abb. 2A), ist auch in isolierten Monozyten eine IL-1 β -Induktion durch DAB zu beobachten (Abb. 2C). Monozyten, die durch Plastikadhärenz von der non-monozytären Fraktion getrennt wurden und 22 Stunden lang mit DAB inkubiert wurden, wiesen deutlich höhere IL-1 β -Level auf als die korrespondierende PBMC-Population (s. Tab. A2). Gleichzeitig war das Zytokin auch bei der Behandlung von Monozyten mit dem TLR7/8-Liganden Resiquimod (R848) im Vergleich zu entsprechend behandelten PBMC erhöht (Abb. 2D). Im Gegensatz dazu hatte die Applikation von DAB keinen Einfluss auf die IL-1 β Produktion der non-monozytären Fraktion (Abb. 2E). Zudem waren die IL-1 β -Spiegel verglichen mit denen der PBMC und Monozyten nach der Inkubation mit R848 deutlich geringer (Abb. 2F).

4.1.3 Der Einfluss von DAB auf die Inflammasomaktivierung

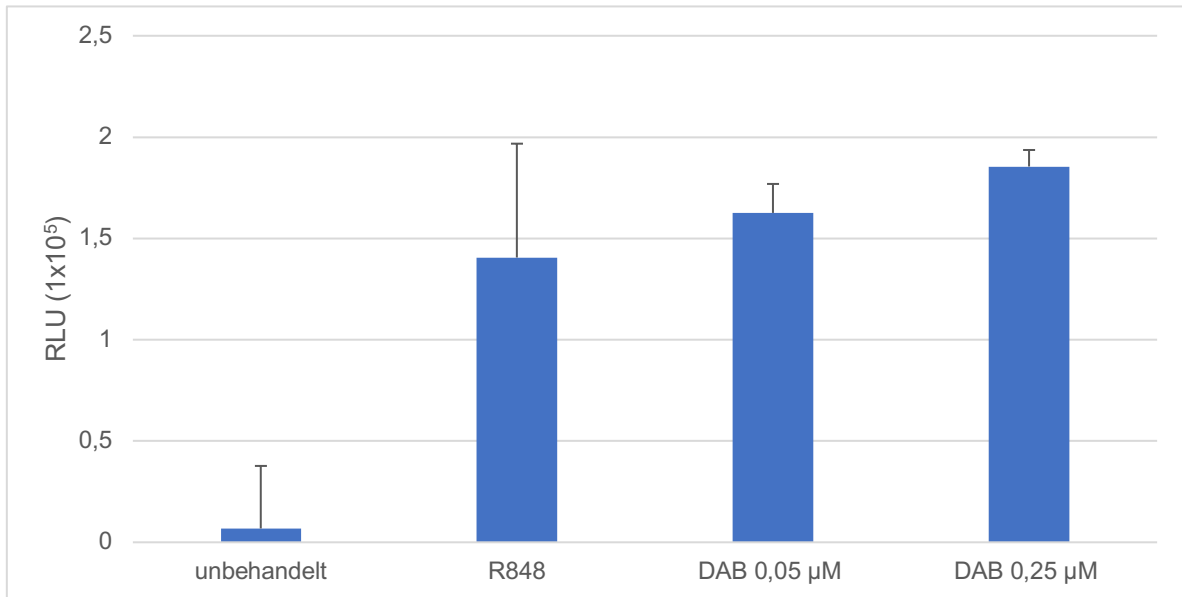


Abb. 3 DAB bewirkt eine Inflammasomaktivierung in Monozyten. 10⁶ PBMC (10⁷/ml je 100 µl) unterschiedlicher Spender wurden in Vertiefungen einer weißen 96-Well Platte ausgesät, nach 1,5 Stunden Inkubation (37°C, 5% CO₂) die non-adhärenente, non-monozytäre Fraktion entfernt und die verbliebenen Monozyten mit DAB in verschiedenen Konzentrationen (0,05 µM und 0,25 µM) behandelt. R848 (50 ng/ml) diente als Positivkontrolle. Nach 5 h Inkubation (37°C, 5% CO₂) wurde die Inflammasom-Aktivität durch den Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay bestimmt. Das Diagramm zeigt die Caspase-1-Aktivität in Relativen-Lumineszenz-Einheiten (RLU). Die Daten repräsentieren jeweils die Mittelwerte ± Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten.

Die Produktion von IL-1β und IL-18 wird im Gegensatz zu anderen proinflammatorischen Zytokinen auf zwei Ebenen reguliert. Einerseits bedarf es der IL-1β-Genexpression, andererseits der posttranslationalen Umsetzung durch das aktivierte Inflammasom. Das Inflammasom ist ein Multiproteinkomplex, der die Aktivierung der Caspase-1 reguliert. Diese wiederum kann das Vorläuferprotein pro-IL-1β in das aktive IL-1β umsetzen (125). Mit DAB behandelte Monozyten wiesen gegenüber der unbehandelten Kontrolle deutlich erhöhte Level der aktivierten Caspase-1 auf (Abb. 3). Das Ausmaß der Inflammasomaktivierung durch DAB ist auf einem ähnlichen Niveau wie die Inflammasomaktivierung durch R848 (50 ng/ml). Auch in PBMC ließ sich nach DAB-Applikation eine erhöhte Aktivität der Caspase-1 nachweisen, wobei diese verglichen mit der Caspase-1-Aktivität in den Monozyten deutlich geringer ausfiel (s. Abb. A2).

4.1.4 Der Einfluss von DAB auf die Produktion anderer Zytokine von humanen Immunzellen

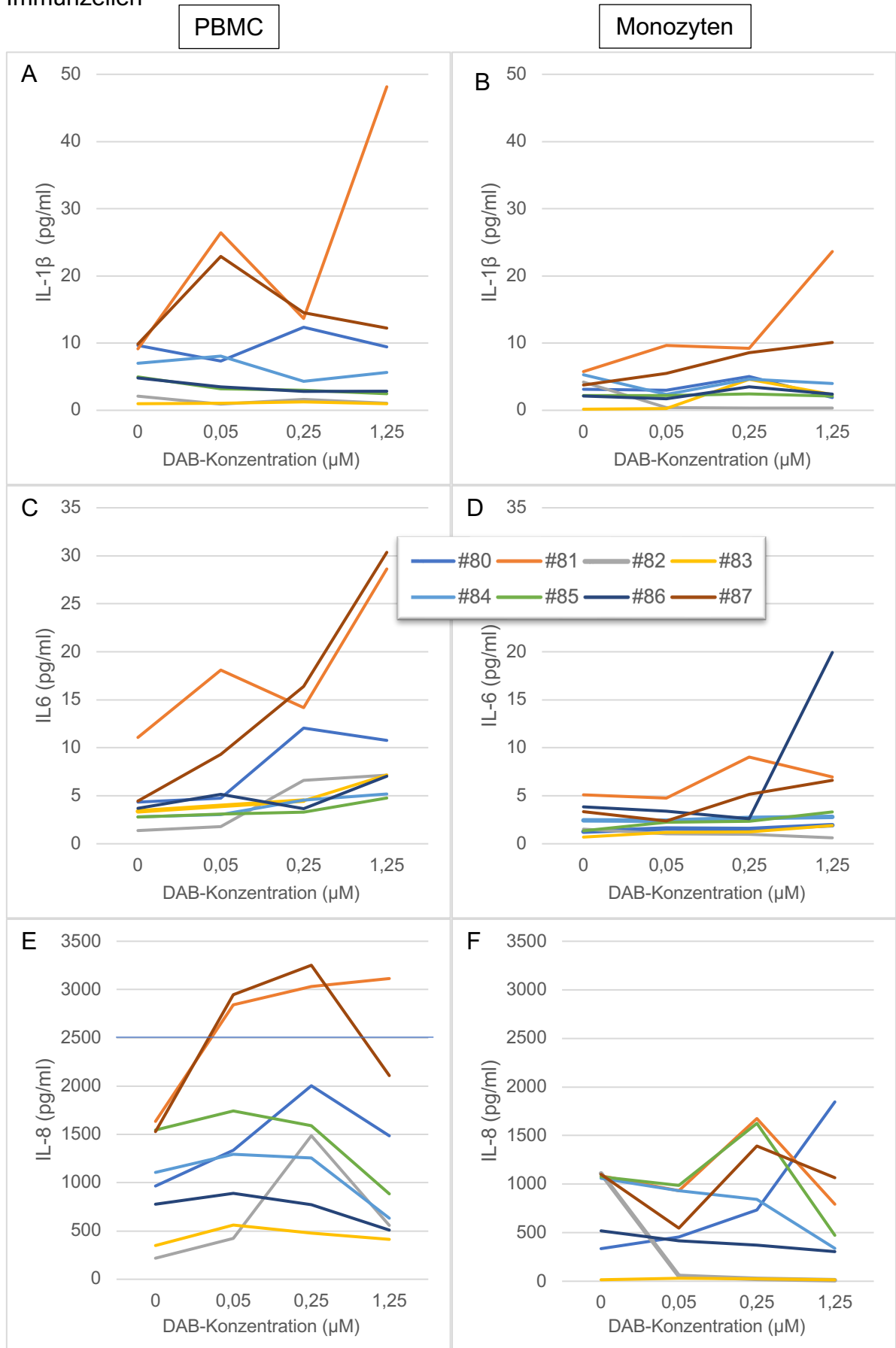


Abb. 4 DAB verstärkt die IL-6- und IL-8-Produktion bei manchen Spendern. 10^6 PBMC (10^7 /ml je 100 μ l) unterschiedlicher Spender wurden in Vertiefungen einer 96-Well Platte ausgesät und mit DAB in verschiedenen Konzentrationen (0,05 μ M - 1,25 μ M) behandelt. Parallel wurden durch 1,5-stündige Plastikadhärenz Monozyten von der non-monozytären Fraktion getrennt und jeweils mit DAB in verschiedenen Konzentrationen (0,05 μ M – 1,25 μ M) inkubiert (37°C, 5% CO₂) (D, F). DMSO (1%) diente als Lösungsmittelkontrolle, R848 als Positivkontrolle (s. Tab. A3-8). Nach 22 h wurden die Überstände abgenommen und die IL-1 β -, IL-6- und IL-8-Konzentration durch einen CBA bestimmt. Die Diagramme zeigen die IL-1 β -Produktion (A, B), die IL-6 Produktion (C, D) und die IL-8-Produktion (E, F) von PBMC und Monozyten in pg/ml. Bei den Proben handelte es sich um Triplikate (Mittelwerte \pm Standardfehler s. Tab. A3-8)

Um den Einfluss von DAB auf die Produktion anderer Zytokine zu prüfen, wurden PBMC und durch Plastikadhärenz isolierte Monozyten 22 Stunden lang mit DAB inkubiert und die Konzentration von IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ und TNF- α in den Überständen bestimmt. Während nach DAB-Applikation generell keine erhöhten IL-1 α -, IL-10-, IFN- γ - und TNF- α -Level nachzuweisen waren, zeigten vor allem die PBMC der IL-1 β -responsiven Spender (Spender 81 und 87; s. Abb. 4A) eine verstärkte Produktion von IL-6 und IL-8 gegenüber der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle (Abb. 4C u. 4E). Die IL-8-Level lagen bei diesen Spendern sogar über der höchsten Konzentration der Standardreihe von 2500 pg/ml (Abb. 4E u. s. Tab. A7). Auch PBMC von Spender 80 und 82, die nach DAB-Applikation, verglichen mit DMSO, kaum IL-1 β produzierten (Abb. 4A u. 4B), zeigten erhöhte IL-8-Spiegel. Gleichzeitig reagierten PBMC des Spenders 80 mit einer moderat verstärkten IL-6-Produktion (Abb. 4C). Des Weiteren steigert DAB die IL-8-Produktion in Monozyten der Spender 80, 81 und 85, wohingegen Monozyten des Spenders 87 nur mit einer leichten Erhöhung von IL-8 reagierten (Abb. 4F).

Im Gegensatz zu der teilweise verstärkten Sekretion von IL-8 durch Monozyten, war die Produktion von IL-6 durch Monozyten gegenüber der Lösungsmittelkontrolle kaum verändert (Abb. 4D). Die Konzentration von IL-1 β , IL-6 und IL-8 in Monozyten-Überständen nach DAB-Applikation war im Vergleich zu den resultierenden Zytokinkonzentrationen der korrespondierenden PBMC insgesamt deutlich verringert (s. 5.1.1).

4.2 Untersuchung von funktional relevanten IL-1 β -Promoter-Einzelnukleotid-Polymorphismen

Verschiedene allelische Ausprägungen von funktional relevanten IL-1 β -Promoter-Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) in IL-1 β -Promoter-Regionen können zu unterschiedlichen transkriptionsregulierenden Funktionen führen. Dies resultiert zum Beispiel in einer gesteigerten oder verminderten IL-1 β -Transkription und teilweise unterschiedlichen IL-1 β -Protein-Levels (126). Um herauszufinden, ob diese funktional relevanten SNPs bei der verstärkten IL-1 β -Produktion von humanen PBMC nach DAB-Applikation eine Rolle spielen, wurde von insgesamt acht Spendern die genomische DNA gewonnen und die relevanten Promoter-Regionen mittels PCR amplifiziert und sequenziert (Tab. 11).

	#44	#45	#47	#48	#49	#50	#52	#53
SNP (bhat-31-s) T/C TTTTGAAAG C TATAAAAACAGCGAGGGAG	T	T	T	T	T	T	T	x
SNP (bhat-511-s) C/T AGAGAGCT C CGAGGCAGAGAAC	C	C	C	C	C	C	C	x
SNP (Yin-1464-s) G/C CACTCCCT G GATAATGCAGAGCGAG	G	G	G	C	G	G	C	G
SNP (hil1-3737-s2) C/T GGGAGGAGAATGGAAT G TCCCTTGGACTCT	C	T	C	C	C	C	C	T
Responder (+/-)	-	-	+	+	+	+	-	-

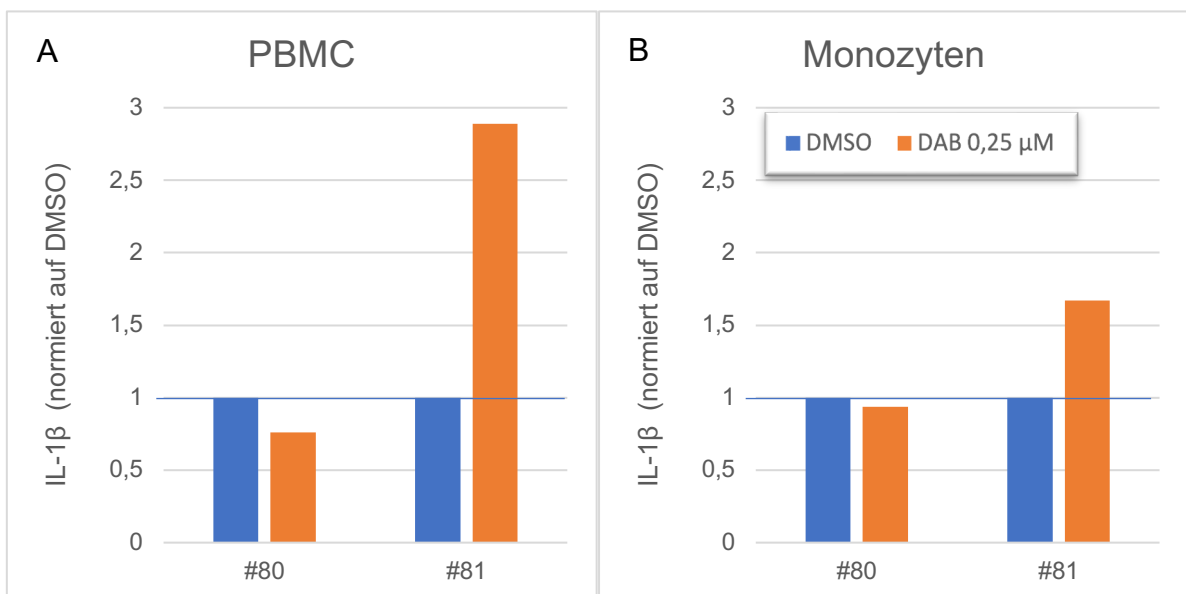
Tab. 11 Funktional relevante IL-1 β -Promoter-(SNPs) sind nicht mit einer verstärkten IL-1 β -Produktion von PBMC nach DAB-Applikation assoziiert. Genomische DNA von insgesamt acht Spendern wurde aus PBMC gewonnen. IL-1 β -Promoter-Regionen, die funktional relevante SNPs aufweisen, wurden mit den entsprechenden Primer-Pärchen mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Die Tab. fasst die Sequenzierergebnisse von acht Spendern (davon vier IL-1 β -responsiv) für vier verschiedene SNPs in der IL-1 β -Promoter-Region zusammen. Die SNP-Sequenz ist unter dem Primernamen angegeben. Die vom SNPs betroffene Nukleinbase ist gelb markiert und kann durch eine andere Nukleinbase, die hinter dem Primernamen angegeben ist, ersetzt sein.

Die Funktionsfähigkeit der Primer wurde mittels Gelelektrophorese getestet (s. Abb. A3 u. 4). Die Hälfte der getesteten Spender waren IL-1 β -Responder (vgl. Tab. A11). Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen eines bestimmten SNP in der IL-1 β -Promoterregion und der IL1 β -Responsivität von PBMC auf DAB festgestellt werden. Beispielsweise wiesen alle vier Responder bei der SNP-Sequenz, die Primer 6 flankiert, die Base Cytosin auf, jedoch ist diese Base auch bei zwei von vier Non-Respondern (Spender 44 und Spender 52) vorhanden.

4.3 Die Effekte von DAB auf die Expression von Aktivierungs-Oberflächenmarkern von humanen Immunzellen

Neben der Analyse der Zytokinproduktion durch humane Immunzellen nach DAB-Applikation wurde die Expression von Aktivierungs-Oberflächenmarkern auf humanen Monozyten, B-Zellen und T-Zellen nach einer PBMC-Inkubation mit DAB geprüft. Hierzu wurden PBMC von Spendern, die in Parallelansätzen auf die Zytokinproduktion nach DAB-Gabe mittels CBA getestet wurden (s 4.1.4), 22 h lang mit DAB (0,25 μ M) inkubiert, Oberflächenmoleküle von Monozyten, B-Zellen und T-Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und deren Expression mit dem Durchflusszytometer bestimmt.

4.3.1 Die Effekte von DAB auf die Expression von Aktivierungs- Oberflächenmarkern von Monozyten



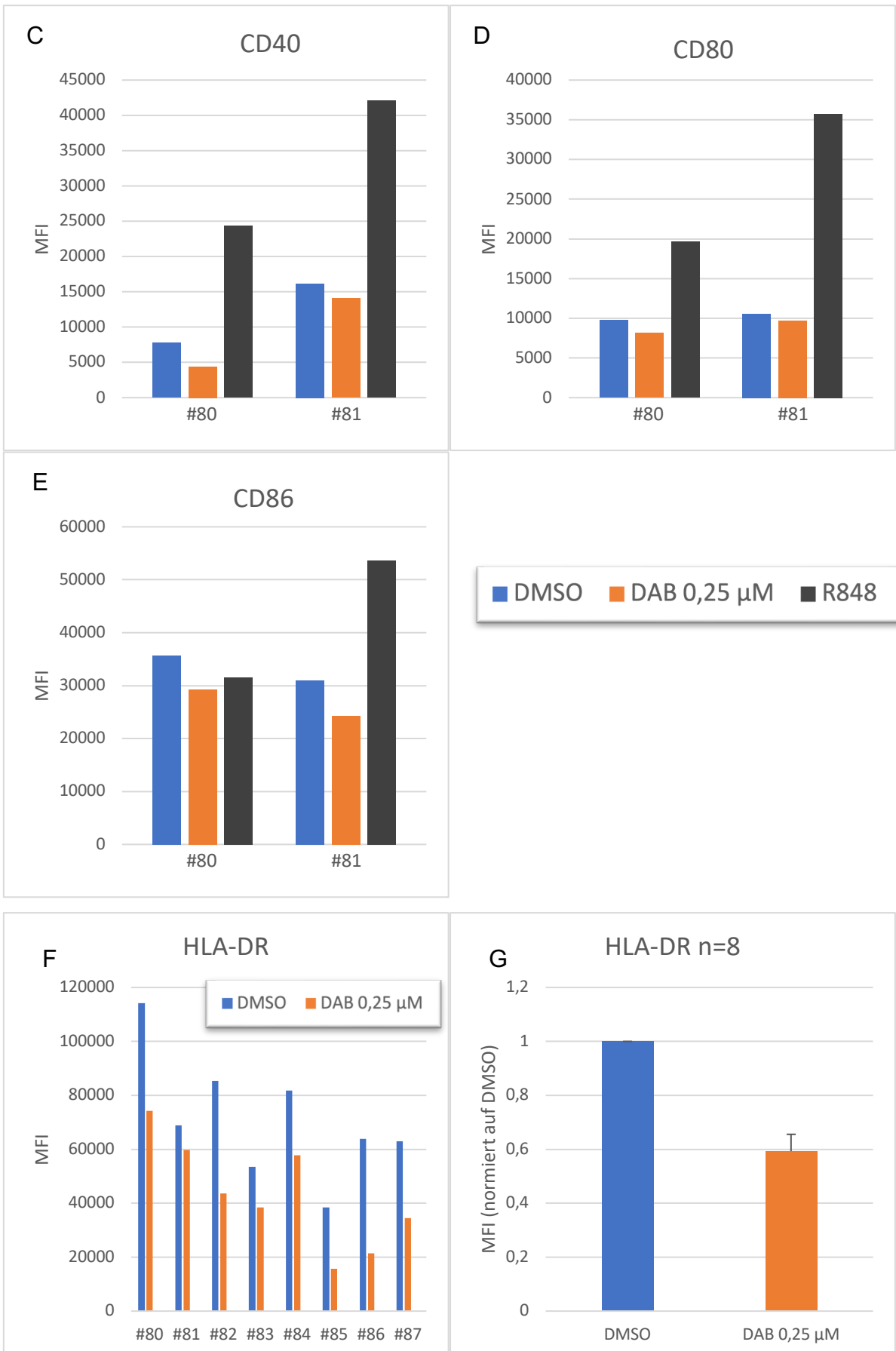


Abb. 5 DAB hat keinen Einfluss auf die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86, verringert jedoch die Expression von HLA-DR auf Monozyten.

4x10⁶ PBMC (500 µl) unterschiedlicher Spender, u.a. von Spender #80 als repräsentativem Non-Responder und Spender #81 als repräsentativem Responder (IL-1β-Level normiert auf die Kontrolle A, B), wurden in ein steriles 5 ml Rundbodenröhrchen gegeben und mit DAB (0,25 µM) inkubiert (37°C, 5% CO₂). DMSO (1%) diente als Lösungsmittelkontrolle, R848 (2 µg/ml) als Positivkontrolle. Nach 22 h wurde die Expression von CD40 (C), CD80 (D), CD86 (E) und HLA-DR (F, G) mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Daten zeigen die durchschnittliche Fluoreszenz-Intensität (MFI) des entsprechenden Oberflächenmarkers auf lebenden HLA-ABC⁺/CD14⁺-Monozyten. Die Daten von Teilabbildung G repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von acht unabhängigen Experimenten.

Spender 80 wird im Folgenden als ein repräsentativer Non-Responder und Spender 81 als ein repräsentativer Responder betrachtet (Abb. 5A u. 5B). Insgesamt wurden acht Spender getestet.

Eine Behandlung mit R848 erhöhte die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 von HLA-ABC⁺/CD14⁺-Monozyten des Responders (Spender 81) sowie die Expression von CD40 und CD80 des Non-Responders (Spender 80) (Abb. 5C, 5D). Die Expression von CD86 wurde durch R848 bei Spender 80 nicht beeinflusst (Abb. 5E).

Im Gegensatz zu der weitgehenden Aufregulation der getesteten Oberflächenmarker durch R848 zeigte die DAB-Applikation sowohl bei Respondern als auch bei Non-Respondern keinen Einfluss (Abb. 5C, 5D u. 5E). Eine Ausnahme bildet die Herunterregulation von HLA-DR nach Inkubation mit DAB (Abb. 5 F). Die Expression von HLA-DR auf Monozyten wurde durch DAB im Mittel um ca. 40% gesenkt, wobei keine unterschiedlichen Tendenzen zwischen Respondern (Spender 81 und 87) und Non-Respondern (Spender 80, 82, 83, 84, 85, 86) festgestellt wurden (Abb. 5G, s. 5.3).

4.3.2 Die Effekte von DAB auf die Expression von Aktivierungs- Oberflächenmarkern von B-Zellen

Ähnlich wie Monozyten reagierten B-Zellen auf die Applikation des Stimulus R848 mit einer Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86, während DAB keinen Einfluss auf die Expression dieser Oberflächenmoleküle zeigte (Abb. 6A, 6B u. 6C).

Zudem erhöhte R848 außer bei Spender 80 die Expression von HLA-DR auf B-Zellen, wohingegen die 22-stündige DAB-Applikation keine Veränderung bezüglich der HLA-DR-Expression auf B-Zellen im Vergleich zur Kontrolle (DMSO) bewirkte (Abb. 6D).

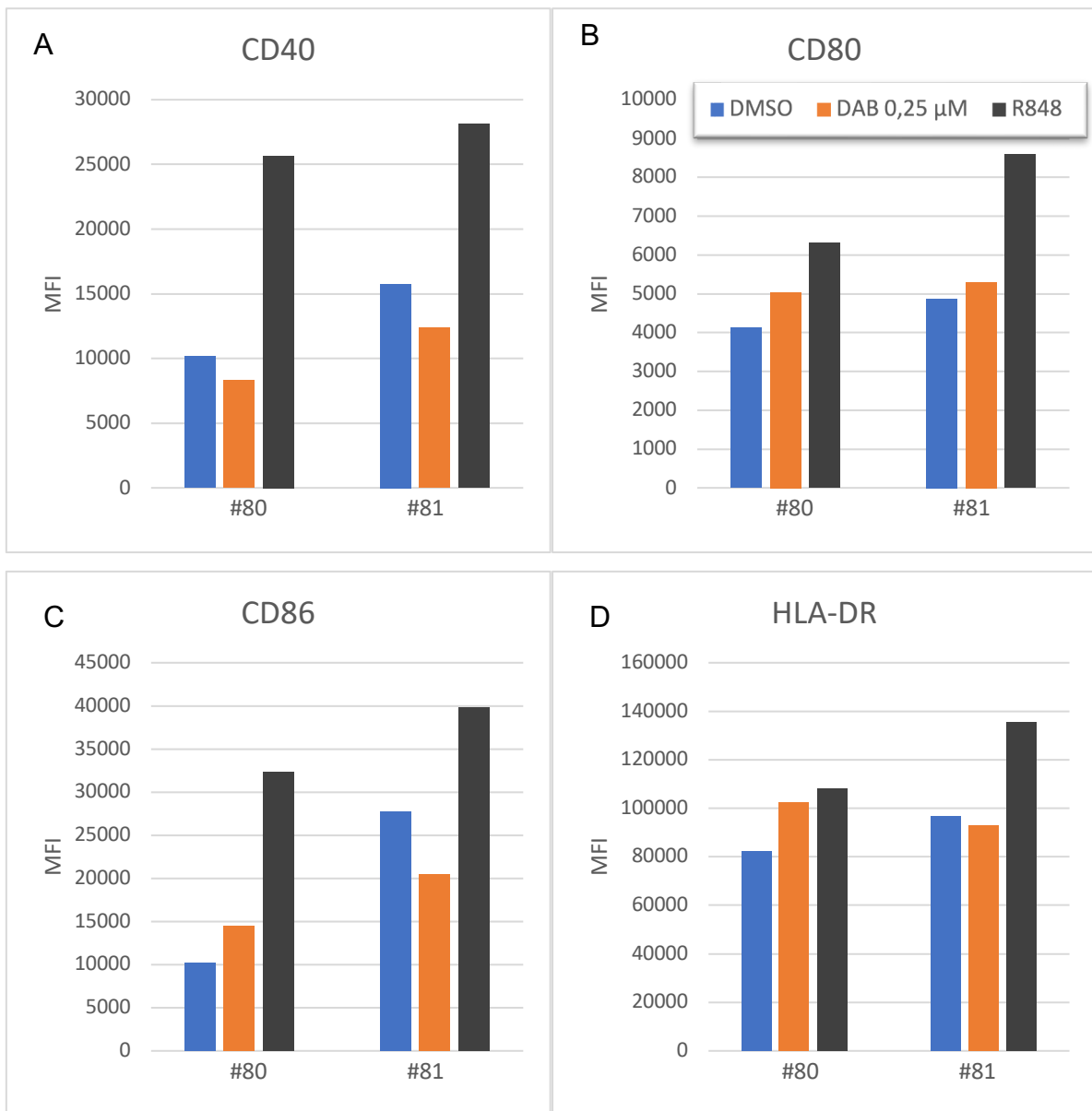


Abb. 6 DAB hat keinen Einfluss auf die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 sowie des Oberflächenrezeptors HLA-DR auf B-Zellen. 4×10^6 (500 µl) PBMC unterschiedlicher Spender, u.a. von Spender 80 als Non-Responder und Spender 81 als Responder wurden in ein steriles 5 ml Rundbodenröhrchen gegeben und mit DAB 0,25 µM inkubiert (37°C, 5% CO₂). DMSO (1%) diente als Lösungsmittelkontrolle, R848 (2 µg/ml) als Positivkontrolle. Nach 22 h wurde die Expression von CD40 (A), CD80 (B), CD86 (C) und HLA-DR (D) mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Daten zeigen die durchschnittliche Fluoreszenz-Intensität (MFI) des entsprechenden Oberflächenmarkers auf lebenden HLA-ABC⁺/CD19⁺-B-Zellen.

4.3.3 Die Effekte von DAB auf die Expression von Aktivierungs- Oberflächenmarkern auf T-Zellen

CD3⁺/CD56⁻/CD4⁺-T-Zellen und CD3⁺/CD56⁻/CD8⁺-T-Zellen reagierten auf die Applikation von R848 mit einer Hochregulation der Aktivierungs-Oberflächenmarkers CD25, wobei diese Erhöhung bei Spender 80 moderater ausfiel als bei Spender 81 (Abb. 7A u. 7C). Auf die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 hatte R848 jedoch

keinen Einfluss (Abb. 7B u. 7D). DAB war nicht in der Lage die Expression von CD25 und CD69 bei CD4⁺- und bei CD8⁺-T-Zellen zu beeinflussen (Abb. 7). CD4⁺-T-Zellen von Spender 81 wiesen nach DAB-Applikation eine leicht verminderte Expression von CD69 gegenüber der Lösungsmittelkontrolle auf (Abb. 7B).

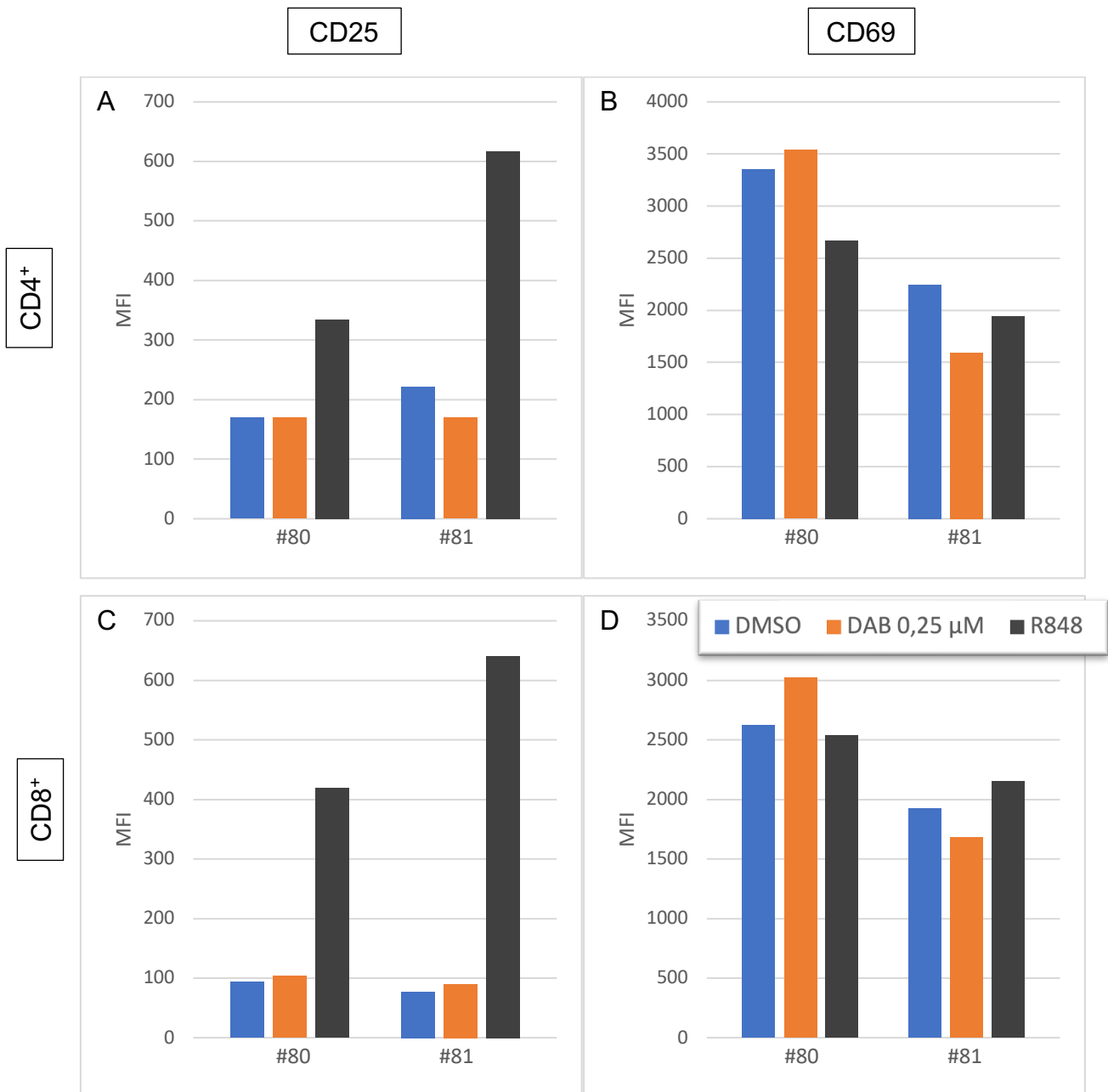


Abb. 7 DAB hat keinen Einfluss auf die Expression der Oberflächenmarker CD25 und CD69 auf CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen. 4x10⁶ (500 µl) PBMC unterschiedlicher Spender, u.a. von Spender 80 als Non-Responder und Spender 81 als Responder wurden in ein steriles 5 ml Rundbodenröhrchen gegeben und mit DAB 0,25 µM inkubiert (37°C, 5% CO₂). DMSO (1%) diente als Lösungsmittelkontrolle, R848 (2 µg/ml) als Positivkontrolle. Nach 22 h wurde die Expression von CD25 (A, C) und CD69 (B, D) mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Daten zeigen die durchschnittliche Fluoreszenz-Intensität (MFI) des entsprechenden Oberflächenmarkers auf lebenden CD3⁺/CD56⁺/CD4⁺-T-Zellen (A,B) und lebenden CD3⁺/CD56⁺/CD8⁺-T-Zellen (C, D)

5. Diskussion

5.1 Die Zytokinproduktion von humanen Immunzellen nach DAB-Gabe

Erreger und physikalische oder chemische Belastungen können akute Entzündungen auslösen. Die Entzündungsreaktion sorgt dafür, dass die Quelle des Gewebeschadens beseitigt wird und die Homöostase wiederhergestellt wird. So wird beispielsweise im Falle einer pathogen-induzierten Entzündung die immunologische Pathogenabwehr initiiert. Durch eine chronische Entzündung können jedoch zelluläre Ereignisse ausgelöst werden, die eine maligne Transformation und Karzinogenese fördern. Entzündungsmediatoren wie TNF- α , IL-6, TGF- β und IL-10 sind sowohl an der Entstehung als auch am Fortschreiten von Krebserkrankungen beteiligt (127). Im Hinblick auf das Zusammenspiel von Entzündungsmediatoren und malignen Prozessen scheint die Veränderung der Zytokinproduktion im Tumormikromilieu und in Immunzellen durch anti-Tumor-Medikamente von hoher Relevanz.

5.1.1 Die Aktivierung des Inflammasoms und die Produktion von IL-1 β durch PBMC und Monozyten nach DAB-Applikation

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass DAB bei sieben von 17 Spendern die IL-1 β -Produktion konzentrationsabhängig stimuliert (s. Tab. A1). Dies stimmt weitgehend mit den Ergebnissen von Hajek et al. (14) überein, bei denen einige Proben von primären humanen DC, die aus PBMC isoliert wurden, nach der Behandlung mit DAB erhöhte IL-1 β -Spiegel aufwiesen. Hingegen konnte bei allen Proben die Steigerung der IL-1 β -Produktion durch BRAF-Inhibitoren sowohl bei unstimulierten als auch bei stimulierten murinen BMDC festgestellt werden (14). Dies könnte damit zusammenhängen, dass es sich bei den Mäusen um nahezu reinerbige Nachkommen einer Inzuchtlinie handelt, während die humanen Immunzellen aus dem Leukozytenfilm (Buffy-Coats) verschiedener, anonymer Blutspender gewonnen wurden. Neben der genetischen Variabilität der Spender, die für das unterschiedliche Ansprechen auf die Behandlung mit BRAF-Inhibitoren verantwortlich sein könnte, ist eine speziesabhängige unterschiedliche Reaktion auf die BRAF-Inhibition denkbar. Beispielsweise können Inflammasom-Antworten auf Pathogene bei Maus-Makrophagen NLRP3-abhängig und α -Hämolyisin-abhängig sein, während das gleiche Pathogen bei menschlichen Makrophagen eine NLRP3-unabhängige und α -Hämolyisin-abhängige Reaktion auslöst (128).

Monozyten, die mittels Plastikadhärenz aus PBMC isoliert wurden, reagierten in den meisten Fällen, ebenso wie die entsprechenden PBMC, auf eine DAB-Behandlung mit einer verstärkten IL-1 β -Produktion (vgl. Tab. A1-4). Hajek et al. (14) zeigten, dass murine milzabgeleitete LPS-stimulierte Monozyten und Makrophagen nur eine gering erhöhte intrazelluläre IL-1 β -Expression nach BRAF-Inhibitor-Gabe aufwiesen. Zudem konnte kein IL-1 β in Überständen von mit BRAF-Inhibitor behandelten humanen MODC festgestellt werden, wohingegen bei entsprechend behandelten aus PBMC isolierten DC eine Erhöhung der IL-1 β -Konzentrationen nachgewiesen wurde. Dass primäre humane Monozyten im Gegensatz zu humanen MODC mit einer IL-1 β Produktion reagierten, könnte darin begründet sein, dass durch die Reifung der Monozyten mit IL-4, GM-CSF, IL-6, IL-1 β , PGE₂ und TNF- α zu MODC der Stoffwechsel und die Genexpression der Zellen so verändert werden, dass der molekulare Angriffspunkt, der den Off-Target-Effekt des BRAF-Inhibitors vermittelt, verändert wird oder nicht mehr exprimiert wird. Die Komponenten des Inflammasoms stellen mögliche molekulare Angriffspunkte dar, die für die Initiierung der IL-1 β -Produktion durch DAB verantwortlich sein könnten (s. 5.1.2).

Eine weitere Erklärung für die Induktion von IL-1 β durch DAB könnte die paradoxe ERK-Aktivierung in BRAFV600-Wildtyp-Zellen liefern. BRAF-Inhibitoren können die Transaktivierung von BRAF-Dimeren unterstützen und dadurch den MAPK-Signalweg aktivieren (129). Unter anderem wird dieser Prozess für das Auftreten von Sekundärtumoren wie Plattenepithelkarzinomen und Keratoakanthomen verantwortlich gemacht (130). Einen weiteren Hinweis für das generelle Auftreten dieses Phänomens in einer Vielzahl von Zelltypen lieferte die Beobachtung einer beschleunigt fortschreitenden RAS-mutierten Leukämie. Die rasche Progredienz wurde auf die paradoxe ERK-Aktivierung durch den BRAF-Inhibitor VEM zurückgeführt (131).

Die Aktivierung der ERK-Kaskade in Immunzellen durch einen BRAF-Inhibitor könnte zu einer vermehrten Expression des inflammatorischen Zytokins IL-1 β führen. Ein Indiz hierfür ist die Hemmung der durch VEM vermittelten IL-1 β -Induktion durch die Koapplikation des MEK-Inhibitors COB in LPS-stimulierten BMDC (14). Ein ähnlicher Mechanismus wurde im Jahr 2000 von Kurosawa et al. beschrieben, bei dem Bufalin, ein spezifischer Inhibitor der Na⁺/K⁺-ATPase, c-fos und inflammatorische Zytokine wie IL-1 β und TNF- α in THP-1-Zellen induzierte. Die Vorbehandlung der Zellen mit dem MAPKK-, MEK-1- und MEK-2-Inhibitor PD-98059 führte zu einer Hemmung der

Genexpression von c-fos und IL-1 β . Dies könnte darauf hindeuten, dass die ERK-Kinase-Kaskade die Induktion von inflammatorischen Zytokinen vermittelt (132). Gegen diesen Erklärungsansatz spricht wiederum, dass der MEK-Inhibitor TRA den IL-1 β -induzierenden Effekt von DAB in LPS-stimulierten BMDC nicht abschwächen konnte (14).

Neben der Frage nach dem möglichen Mechanismus der IL-1 β -Induktion durch DAB in humanen Immunzellen gilt es herauszufinden, welche Zellpopulationen maßgeblich an der IL-1 β -Produktion beteiligt sind. Um eine grobe Unterscheidung zwischen der IL-1 β -Sekretion in den verschiedenen PBMC-Zelltypen zu treffen, wurden Monozyten mittels Plastikadhärenz von T-Zellen, B-Zellen und DC getrennt und beide Ansätze mit DAB inkubiert (s. 4.1.2). Dabei zeigte sich, dass die Monozyten viel stärker auf die Behandlung mit DAB ansprechen als die Non-Monozyten (Abb. 2). Zudem überstiegen die IL-1 β -Spiegel in den Überständen der Monozyten die IL-1 β -Level der mit DAB behandelten PBMC. Dieses Phänomen könnte damit erklärt werden, dass Monozyten in der Abwesenheit anderer PBMC den BRAF-Inhibitor DAB zu einem größeren Anteil aufnehmen und deshalb die Ausprägung der IL-1 β -induzierenden Effekte stärker ausgeprägt waren. Eine ähnliche Beobachtung machten Tel et al.: Die Autoren zeigten, dass der BRAF-Inhibitor VEM die Reifung und die Zytokinproduktion von stark aufgereinigten nDC gesunder Spender inhibiert. Dieser Effekt war jedoch nicht zu beobachten, wenn die gesamte PBMC-Fraktion mit VEM behandelt wurde (114).

Wenn DAB bei der Abwesenheit anderer PBMC zu einem größeren Anteil von Monozyten aufgenommen werden würde, könnte man jedoch davon ausgehen, dass bei einem Responder die gesamten PBMC bei höheren DAB-Konzentrationen als bei den aufgereinigten Monozyten maximale IL-1 β -Level aufweisen. Da dies nicht der Fall ist, sollte man diesen Erklärungsansatz kritisch betrachten (s. Tab. A1 und 2). Alternativ wäre denkbar, dass IL-1 β vorrangig von Monozyten produziert wird, jedoch von allen PBMC-Populationen aufgenommen wird. Dies hätte zur Folge, dass bei der Abwesenheit der restlichen Zellpopulationen die Reduktion des von Monozyten produzierten IL-1 β durch diese Zellen ausbleibt und somit die Diskrepanz zwischen den niedrigeren IL-1 β -Konzentrationen im Überstand aller PBMC und den höheren IL-1 β -Konzentrationen im Überstand der aufgereinigten Monozyten bedingt.

In der zweiten Versuchsreihe, die u.a. die IL-1 β -Produktion von Monozyten und PBMC nach DAB-Applikation vergleichen sollte, wurde die Methodik dahingehend geändert, dass statt des alleinigen Abnehmens des Überstandes nach Plastikadhärenz der

Monozyten nun zwei Waschschriffe durchgeführt wurden. Diese Änderung könnte dafür verantwortlich sein, dass die Ergebnisse der vorherigen Versuchsreihe nicht mehr reproduzierbar waren. Die Monozyten reagierten nun auf die Applikation von R848 und DAB mit einer weniger stark ausgeprägten IL-1 β -Produktion (vgl. Abb. 2 u. Tab. A1 u. A2 mit Abb. A1 u. Tab. A3 u. A4). Möglicherweise wurden durch die Einführung der Waschschriffe mehr Monozyten von der Polystyrol-Oberfläche entfernt, was eine geringere IL-1 β -Sekretion in den Überstand zur Folge hatte.

Das Zytokin IL-1 β ist als ein zentraler Mediator bei der Initiierung der angeborenen und der erworbenen Immunantwort bekannt, der an der Beseitigung von akuten Entzündungen beteiligt ist (133). Zudem wurden für IL-1 anti-apoptische und stimulatorische Effekte auf DC nachgewiesen (134). Darüber hinaus spielt das proinflammatorische Zytokin IL-1 eine Rolle bei der Verstärkung der Th1- und Th-17 vermittelten Immunantwort gegen Tumore (135, 136). Andererseits kann durchgängig erhöhtes IL-1 β bei chronischen Entzündungen die Entstehung und die Ausbreitung von Tumoren durch verschiedene Mechanismen, wie zum Beispiel durch eine vermehrte Tumorangiogenese, fördern (137, 138).

Die *in vitro* beobachtete IL-1 β -Induktion durch DAB in PBMC, insbesondere in Monozyten, könnte, sofern *in vivo* ebenfalls vorhanden, die Immunantwort, das Tumorwachstum und die Metastasierung beeinflussen. Hierbei könnte die Unterscheidung zwischen der IL-1 β -Produktion und -Wirkung im Tumormikromilieu von der in den PBMC beobachteten IL-1 β -Induktion und der damit potenziell einhergehenden systemischen Wirkung bei der Interpretation der Ergebnisse entscheidend sein:

In experimentellen Tumormodellen und bei Krebspatienten wurde eine Korrelation zwischen erhöhten IL-1 β -Spiegeln und der Karzinogenese, der Invasivität des Tumors und einer schlechten Prognose festgestellt (137). Progrediente maligne Melanome wiesen eine verstärkte IL-1 β -Produktion auf, insbesondere durch das vermehrte Vorhandensein von pro-IL-1 β und einer erhöhten Caspase-1-Aktivität (139). Umgekehrt wurde das Wachstum von malignen Melanomen mit IL-1 β -produzierenden Tumorzellen durch die Inhibition des IL-1-Signalwegs durch IL-1-Rezeptor-blockierende Antikörper eingeschränkt (140). Des Weiteren kann IL-1 β zur Tumorresistenz beitragen, indem es die Akkumulation von T-Zell suppressierenden MDSC fördert (141).

In der Hälfte der mit BRAF-Inhibitoren behandelten Patienten konnten Young et al. eine erhöhte IL-1 β -mRNA-Expression in Melanom-Biopsien nachweisen (15). Die Autoren führten die verstärkte IL-1 β -Expression auf Tumor-assoziierte Makrophagen zurück, die während der Behandlung mit VEM oder einer Kombination von DAB und TRA den Tumor vermehrt infiltrieren (96). Durch die Wechselwirkung der Tumor-assoziierten Makrophagen mit Fibroblasten und Melanomzellen kommt es in der Folge zu einer raschen Toleranzentwicklung gegenüber MAPK-Inhibitoren (s. 2.1.2.2). Eine ähnliche Beobachtung machten Hugo et al., die die Entwicklung der MAPK-Inhibitor-Resistenz auf hochdynamische und wiederkehrende nicht-genomische Veränderungen und einer sich verändernden intratumoralen Immunität zurückführten (142).

Die Feststellung von Young et al., dass ungefähr die Hälfte der mit BRAF-Inhibitor behandelten Patienten eine erhöhte IL-1 β -mRNA-Expression aufweisen, geht mit der Beobachtung einher, dass nur ein Teil der PBMC bzw. Monozyten von gesunden Spendern *in vitro* nach DAB-Applikation verstärkt IL-1 β produzierten (s. Tab. A1). Diese Feststellung bestätigt die Annahme, dass mit DAB behandelten Patienten in IL-1 β -Responder und IL-1 β -Non-Responder eingeteilt werden können. Darüber hinaus scheint die Auffassung der Autoren, dass vor allem Tumor-assoziierte Makrophagen für die Produktion von IL-1 β im Tumormikromilieu verantwortlich sind, plausibel, denn die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass die Vorläuferzellen der Makrophagen, die Monozyten, neben humanen primären DC (14), eine relevante IL-1 β -produzierende Fraktion in den PBMC darstellen (s. 4.1.2). Um dies weiter zu verifizieren, könnten durch Plastikadhärenz isolierte Monozyten mit M-CSF und IL-4 zu M2-artigen-Makrophagen differenziert werden, die dann als ein *in vitro* Modell für Tumor-assoziierte Makrophagen auf eine mögliche DAB-induzierte IL-1 β -Produktion getestet werden könnten. Würde sich bestätigen, dass DAB *in vitro* die IL-1 β -Sekretion in M2-artigen Makrophagen fördert, wäre dies ein weiterer Hinweis für den Einfluss dieses Off-Target-Effekts auf die Entwicklung von Resistenzen gegen BRAF-Inhibitoren und einer damit einhergehenden verminderten Antitumorantwort.

Obwohl im Tumormikromilieu vorhandenes IL-1 β das Tumorwachstum zu fördern scheint und die BRAF-Inhibitor-Therapie die IL-1 β -Expression in manchen Patienten steigert (15), sollte der Einfluss von IL-1 β auf die Entwicklung tumor-suppressiver Immunzell-Funktionen nicht außer Acht gelassen werden. Adenosintriphosphat (ATP), das durch sterbende Tumorzellen freigesetzt wird, bindet an den P2RX7-Rezeptor auf

DC, der im Folgenden das NLRP3-abhängige Inflammasom aktiviert und so die Sekretion von IL-1 β ermöglicht. In Abwesenheit eines funktionellen IL-1-Rezeptors, bei einem NLRP3^{-/-}- oder bei einem Casp-1^{-/-}-Mausmodell versagte das Priming von IFN- γ -produzierenden CD8⁺-T-Zellen durch DC, welches aufgrund absterbender Tumorzellen initiiert werden würde (136). Dementsprechend erwies sich die Chemotherapie bei diesen Mausmodellen als ineffizient, was darauf hindeutet, dass das NLRP3-Inflammasom die angeborene und adaptive Immunreaktion gegen absterbende Tumorzellen verknüpft (136). Die Inflammasom-Aktivierung führt also zusammen mit anderen Signalen, die von den sterbenden Tumorzellen ausgehen, zur Reifung von DC und zur Freisetzung von IL-1 β . Durch das Binden des IL-1R1 lockt IL-1 β $\gamma\delta$ -T-Zellen zum Tumor, welche daraufhin IL-17 produzieren. Dies führt zur Rekrutierung von IFN- γ -produzierenden CD8⁺-T-Zellen und zur Lyse von Tumorzellen (143). Damit einhergehend wurde festgestellt, dass die Blockade von IL-1 β /IL-1R- oder IL-17A/IL-17R α -Signalen die therapeutische Wirkung von Doxorubicin aufhebt (144). Diese Beobachtungen könnten den hinsichtlich der Tumorantwort zunächst als ungünstig angenommenen IL-1 β -induzierenden Effekt der BRAF-Inhibitoren relativieren, da das zusätzlich vorhandene IL-1 β die auf immunogenen Zelltod basierende Immunantwort gegen den Tumor verstärken könnte (145). Dies wäre vor allem dann relevant, wenn der Off-Target-Effekt der BRAF-Inhibitoren nicht nur auf die im Tumormikromilieu vorhandenen Immunzellen beschränkt ist. Gegen diese Überlegung spricht wiederum, dass Hong et al. bis auf einen leichten Anstieg von TNF- α im Serum keinen nachweisbaren Einfluss einer DAB-Therapie auf die Serum-Zytokinspiegel, die Anzahl peripherer Blutzellen, den Anteil bestimmter Leukozyten-Untergruppen oder auf CD4⁺- und CD8⁺-T-Zell-Gedächtnisantworten nachweisen konnten. Untersucht wurden 13 Patienten mit BRAF-mutiertem Melanom (146).

Diese Argumentation wird jedoch von den Ergebnissen der im Jahr 2017 veröffentlichten CANTOS-Studie abgeschwächt, die zeigten, dass die Behandlung von Patienten mit dem Anti-IL-1 β -Antikörper Canakinumab die Inzidenz von Lungenkrebs signifikant senkte und die Überlebenszeit von Tumorpatienten erhöhte (16). Diese Studie unterstreicht nicht zuletzt die Notwendigkeit, die tumorfördernden Effekte von IL-1 β weiter zu eruieren und die potenzielle Überlegenheit einer kombinierten Pharmakotherapie aus BRAF-/MEK-Inhibitoren und IL-1 β -Antagonisten gegenüber BRAF (\pm MEK-Inhibitoren) in Tumormausmodellen zu untersuchen.

5.1.2 Die Produktion von IL-6 und IL-8 durch humane Immunzellen nach DAB-Applikation

Die Antitumoreffekte, die durch BRAF- und/oder MEK-Inhibitoren erreicht werden, werden weitestgehend auf die direkte Wirkung der Pharmaka auf Melanomzellen zurückgeführt. Die MAPK-Inhibitoren sind in der Lage, in den Tumorzellen Apoptose zu induzieren (147). In BRAFV600E-mutierten Melanomen trägt die Aktivierung des MAPK-Signalwegs durch die Sekretion immunsuppressiver Zytokine wie IL-10, IL-6 und VEGF zur Immunevasion bei (61). Potenzielle Off-Target Effekte des BRAF-Inhibitors DAB, welche die Produktion immunsuppressiver Zytokine in humanen Immunzellen beeinflussen, könnten daher für die Modulation der antitumoralen Immunantwort relevant sein.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass DAB die Produktion von IL-6 und IL-8 in PBMC von vorzugsweise denjenigen Spendern steigerte, deren Überstände gleichzeitig erhöhte IL-1 β -Spiegel aufwiesen (s. 4.1.4).

Dem Zytokin IL-6 wird u.a. zugeschrieben, an der Entstehung und am Fortschreiten von Krebserkrankungen beteiligt zu sein (148). Damit übereinstimmend waren die IL-6-Serumkonzentrationen bei 13 verschiedenen Krebsarten, insbesondere beim malignen Melanom, aber auch bei anderen bösartigen Tumoren wie Lungenkrebs, Brustkrebs und Darmkrebs, erhöht. Darüber hinaus scheinen die IL-6-Konzentrationen mit dem Tumorstadium, der Prognose, der Tumorgröße und dem Fortschreiten der Erkrankung bei vielen Krebsarten, u.a. beim malignen Melanom, assoziiert zu sein (149). Durch Versuche mit einem Tumormausmodell konnte beispielsweise festgestellt werden, dass eine IL-6-abhängige Aktivierung von Stat3/Socs3 für das Fortschreiten intraepitheliale Pankreasneoplasien und für die Entwicklung des Pankreas-Adenokarzinoms erforderlich ist (150). Als primäre IL-6-Quellen im Tumormikromilieu wurden neben den Tumorzellen auch TAM, MDSC, CD4⁺-T-Zellen und Fibroblasten ausgemacht. Die Anwesenheit von IL-6 im Tumormikromilieu kann sich sowohl direkt auf die Tumorzellen auswirken (Förderung der Zellproliferation, des Überlebens und der Metastasierung), als auch indirekt über die Manifestierung immunsuppressiver Effekte, die durch MDC, TAM und tolerogene DC vermittelt werden (148).

Ob DAB die Produktion von IL-6 in PBMC durch direkte Effekte fördert oder durch indirekte Effekte über die Wirkung des vermehrt vorhandenen IL-1 β , ist auf Grundlage der durchgeführten Versuche nicht zu beantworten. Für eine IL-1 β -abhängige IL-6-

Induktion würde sprechen, dass die PBMC der Spender, die auf die DAB-Applikation mit einer vermehrten IL-1 β -Produktion reagierten, gleichzeitig erhöhte IL-6-Level im Überstand aufwiesen (Abb. 4). Damit übereinstimmend beschrieben Schuett et al., dass die IL-6-Genexpression in Monozyten und Makrophagen durch Zytokine wie IL-1 und TNF- α , sowie durch PDGF und Interferone induziert wird (151).

Um eine mögliche IL-1 β -abhängige IL-6-Induktion zu beweisen, könnte man PBMC vor DAB-Applikation mit anti-IL-1 β -Antikörpern inkubieren und daraufhin die IL-6-Konzentrationen bestimmen.

IL-8, auch als CXC-Motiv-Chemokin 8 (CXCL8) bekannt, ist ein Chemokin, das als multifunktionales Zytokin Tumorphilisation, -invasion und -migration auf autokrine und parakrine Weise moduliert. Es konnte gezeigt werden, dass IL-8 und seine Rezeptoren CXC-Chemokinrezeptor 1 (CXCR1) und CXC-Chemokinrezeptor 2 (CXCR2) an der Initiierung und Entwicklung verschiedener Krebsarten wie Brustkrebs, Prostatakrebs, Lungenkrebs, Darmkrebs und des malignen Melanoms beteiligt sind (152). CXCR1/2 sowie IL-8 sind in unterschiedlichen Tumoren überexprimiert und deren Expressionsniveau korreliert mit dem Tumorstadium und dem Differenzierungsgrad des Tumors (153). IL-8 dämpft die Immunantwort gegen den Tumor, indem es die Infiltration Neutrophiler Granulozyten und MDSC in das Tumormikromilieu fördert (154). Außerdem begünstigt IL-8 die Vaskularisation des Tumors, aktiviert MMP-2 und verstärkt die Anoikis-Resistenz, verhindert also eine Form des programmierten Zelltodes (155, 156). In Tumor-Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass das Auftreten spontaner Lungenmetastasen bei Tieren mit CXCR-2-Knockdown-Mammakarzinomen verringert wird, die Wirkung der Chemotherapie verbessert wird und die Angiogenese gehemmt wird (157). CXCR2-Knockoutmäuse, denen ein Lewis-Lungenkarzinom implantiert wurde, zeigten ein signifikant geringeres Tumorstadium, eine deutliche Verringerung spontaner Metastasen und eine verminderte Gefäßdichte (158).

Obwohl DAB die Produktion von IL-6 und IL-8 durch humane Immunzellen *in vitro* zu fördern scheint, muss beachtet werden, dass Melanom-Biopsien von mit BRAF-Inhibitoren behandelten Patienten weniger immunsuppressive Zytokine wie IL-6 und IL-8 aufweisen (109). Außerdem konnten Schilling et al. bei *in vitro*-Versuchen beobachten, dass der BRAF-Inhibitor VEM Melanomzellen daran hindert, moMDSC induzierende Zytokine wie IL-6 zu sezernieren (110). Hierbei gilt es jedoch noch genau

zu untersuchen, ob im Tumormikromilieu die Wirkung von VEM auf Melanomzellen und myeloide Zellen unterschiedlich ist und wie diese Zellpopulationen hinsichtlich der Zytokinproduktion und Elimination in Anwesenheit von VEM wechselwirken.

Darüber hinaus könnte die Kombinationstherapie mit einem MEK-Inhibitor die Produktion von IL-6 unterdrücken. So konnte in LPS-stimulierten humanen PBMC gezeigt werden, dass der MEK-Inhibitor TRA die Produktion von TNF- α und IL-6 blockiert (159). Dies relativiert die Relevanz der DAB-induzierten IL-6- und IL-8-Produktion in humanen Immunzellen insofern, als *in vivo* die Wirkungen der BRAF-Inhibitoren, die ein günstigeres Tumormikromilieu fördern, zu überwiegen scheinen.

5.2 Funktional relevante IL-1 β -Promoter-Einzelnukleotid-Polymorphismen als mögliche Ursache für die spenderabhängige DAB-induzierte IL-1 β -Produktion

Pyrexie ist die häufigste Nebenwirkung bei der Behandlung mit DAB und tritt ohne die Kombination mit dem MEK-Inhibitor TRA bei 25-35% der Patienten auf (160). Da in der vorliegenden Arbeit in Überständen von PBMC, die mit DAB behandelt wurden, bei sieben von 17 Spendern (ca. 41%) eine IL-1 β -Induktion gemessen wird und IL-1 β ein Fieber-auslösendes Zytokin ist (161), liegt die Vermutung nahe, dass funktional relevante Polymorphismen für diese interindividuellen Unterschiede verantwortlich sein könnten. Hierbei kommen Polymorphismen im IL-1 β -Genlocus (162) oder in Komponenten des Inflammasoms in Frage (163).

In dieser Arbeit wurde geprüft, ob unterschiedliche allelische Ausprägungen von SNPs in IL-1 β -Promoter-Regionen mit der DAB-induzierten IL-1 β -Produktion assoziiert sind (s. 4.2). Hierbei konnte jedoch kein Zusammenhang festgestellt werden (s. Tab. 1). Kulkarni et al. führten eine genomweite Genotypisierung von 1006 mit DAB behandelten Melanom-Patienten durch, um eine potenzielle Assoziation zwischen SNPs oder HLA-Allelen und der durch DAB ausgelösten unerwünschten Pyrexie aufzuklären. Die Genotypisierung ermöglichte die Analyse von sechs Millionen SNPs und 150 HLA-Allelen. Es wurde keine Assoziation zwischen häufig vorkommenden SNPs oder HLA-Allelen und dem Auftreten von DAB-induzierter Pyrexie gefunden (160).

Zukünftig könnten zur Aufklärung des IL-1 β -induzierenden Mechanismus des BRAF-Inhibitors DAB die verschiedenen Ebenen der IL-1 β -Produktion auf interindividuelle Unterschiede geprüft werden. So könnten sich IL-1 β -Responder und IL-1 β -Non-Responder auf der Ebene der Genexpression durch andere, noch nicht untersuchte Polymorphismen, wie z.B. an Exon-/Intron-Grenzen, unterscheiden. Darüber hinaus könnten Non-Responder Variationen in der posttranskriptionellen IL-1 β -Regulation oder auf der Inflammasomebene aufweisen.

Die Identifikation eines bestimmten Polymorphismus könnte dabei helfen, die Therapie von Melanom-Patienten zu verbessern. So könnte der Patient vor der geplanten DAB-Therapie auf diesen Polymorphismus geprüft werden und somit Therapieunterbrechungen aufgrund von DAB-induzierter Pyrexie verhindert werden. Falls Melanom-Patienten unabhängig von der möglichen IL-1 β -Induktion Pyrexie entwickeln, könnte die Genomanalyse dennoch Hinweise dafür liefern, bei welchen

Patienten mit einer vermehrten IL-1 β -Produktion zu rechnen ist. Falls sich die vermehrte IL-1 β -Produktion in humanen Immunzellen durch den Off-Target-Effekt von DAB als ein tumorfördernder Faktor herausstellt, würde es diese Methode ermöglichen, die Effektivität der geplanten DAB-Therapie abzuschätzen und gegebenenfalls die Therapie mit einem anderen BRAF-Inhibitor, der keine IL-1 β -induzierenden Effekte aufweist, begründen.

5.3 Der Einfluss von DAB auf die Expression von Aktivierungs-Oberflächenmarkern auf PBMC

Um zu prüfen, ob DAB den Aktivitätszustand von humanen Immunzellen beeinflusst, wurde die Expression von aktivierungsabhängig aufregulierten Oberflächenmarkern in verschiedenen Zellpopulationen (Monozyten, B-Zellen, T-Zellen) nach DAB-Inkubation gemessen (s. 4.3). In der vorliegenden Arbeit konnte keine Veränderungen der Oberflächenmarker-Expression durch DAB festgestellt werden. Eine Ausnahme bildete die Herunterregulation von HLA-DR auf Monozyten, die im Mittel ungefähr 40% betrug (acht Spender getestet; s. Abb. 5). Ob dieses Ergebnis wirklich auf einen Einfluss von DAB über den IL-1 β -induzierenden Effekt zurückzuführen ist, erscheint bei Betrachtung der anderen überwiegend negativen Ergebnisse fraglich. Möglich wäre neben dem IL-1 β -induzierenden Effekt ein weiterer unbekannter Mechanismus, der auf die HLA-DR-Expression bzw. Translokation wirkt. Hinzu kommt, dass auch bei der Messung der HLA-DR-Expression auf mit R848 behandelten Monozyten eine gegenüber der Kontrolle verminderte mittlere Fluoreszenzintensität bestimmt wurde (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren blieb der Anteil der mit DAB-inkubierten Monozyten, der HLA-DR exprimiert, unverändert (s. Abb. A5). Bei Betrachtung der FACS-Plots fällt zudem auf, dass die Monozytenpopulation bei Spender 81, im Gegensatz zu Spender 80, nicht vollständig abgebildet ist (Abb. A5). Dies erweckt den Anschein, dass die vorgenommenen Laser- und Kompensationseinstellungen aufgrund interindividueller Unterschiede nicht bei der FACS-Messung aller Spenderzellen angewendet werden können. Für zukünftige FACS-Messungen sollten die Einstellungen so verändert werden, dass die gesamten Zellpopulationen aller Spender detektiert werden können. Falls dies nicht möglich ist, sollte erwogen werden, einen fluoreszenzmarkierten CD14-Antikörper mit einem für die Analyse besser geeigneten Fluorophor zu verwenden.

Ähnlich wie bei den Ergebnissen dieser Arbeit konnten Wilmott et al. (12), Boni et al. (164) und Kono et al. (165) keinen Einfluss von BRAF-Inhibitoren auf die Immunzellfunktion von T-Zellen feststellen. Es wird jedoch vermutet, dass die Erkennung der Melanomzellen durch Immunzellen während der BRAF-Inhibitor-Behandlung u.a. durch eine verstärkte Melanom-Antigenexpression erleichtert wird. Dies verstärkt die Th- und zytotoxische T-Zellantwort, welche durch die vermehrte Infiltration von T-Zellen im Tumorgewebe widerspiegelt wird. Demnach könnte das

zahlreiche Vorhandensein der Lymphozyten auf den vermehrten Zelltod von Melanomzellen zurückzuführen sein, der durch die BRAF-Inhibition induziert wird (12). Die damit einhergehende erhöhte Expression von Melanom-Antigenen auf Melanomzellen kann die Antigen-Erkennung der zytotoxischen T-Lymphozyten verbessern, ohne dass die Immunzellfunktion beeinflusst wird (164). Im Gegensatz zu Wilmott et al. (12) zeigten Hooijkaas et al. (166) in einem C57BL/6J Tyr::CreER^{T2}PTEN^{F-/-}BRAF^{F-/V600E/+} induzierbaren transgenen Melanom-Modell, dass die Behandlung mit dem BRAF-Inhibitor PLX4720, einem Vorgänger von VEM, die Häufigkeit von T-Zellen, NK-Zellen, MDSC und Makrophagen im Tumor verringert. Konträr dazu war die Häufigkeit der Immunzellpopulationen in BRAF-Wildtyp-Tumoren von PLX4720-behandelten und schein-behandelten Mäusen vergleichbar hoch. Daraus folgern die Autoren, dass die verminderte Anzahl von Immunzellen in Tumoren bei der Behandlung mit PLX4720 nicht auf einen Off-Target-Effekt des BRAF-Inhibitors zurückzuführen ist, sondern mit der Hemmung von BRAFV600E-mutierten Melanomzellen zusammenhängt. Dass die Anzahl der Immunzellen sich unter BRAF-Inhibitor-Therapie im Tumor des o.g. Mausmodell verringert, während die Anzahl der Immunzellen in Tumorbiopsien zunimmt, erklären die Autoren damit, dass Wilmott et al. die Melanombiopsien nur aufgrund des Vorhandenseins einer BRAF-Mutation auswählten, jedoch nicht weiter identifizierten, ob es sich dabei beispielsweise um PTEN-defiziente Tumoren handelte. Eine PTEN-Defizienz könnte hierbei für die geringer ausgeprägte Zunahme von CD8⁺ und CD4⁺-T-Zellen in einzelnen humanen Tumorbiopsien verantwortlich gewesen sein (12, 166).

Insgesamt geben diese Untersuchungen keinen Hinweis darauf, dass die getesteten BRAF-Inhibitoren direkte immunologische Off-Target-Effekte aufweisen, welche die Anzahl von Immunzellen im Tumormilieu beeinflussen, sondern vielmehr, dass die BRAF-Inhibitor-vermittelte Induktion des Tumorzelltods und die verstärkte Expression von Melanom-Antigenen sekundär immunologische Veränderungen im Tumormilieu bewirken.

Frederick et al. beobachteten bei Tumorbiopsien von praktisch allen Patienten einen Anstieg des Immuninfiltrats, obwohl das Ansprechen auf die Behandlung unterschiedlich war (s. 2.3.1). Die Autoren stellten sich deshalb ebenfalls die Frage, ob die erhöhte T-Zell-Infiltration direkt mit der MAPK-Inhibition oder sekundär mit der vermehrten Tumornekrose zusammenhängt. Da die während der Tumorprogression abgenommene T-Zell-Infiltration durch eine MEK-Inhibition wiederhergestellt werden

konnte, vermuten die Autoren, dass die erhöhte T-Zellinfiltration auf der Hemmung des MAPK-Signalwegs beruht (109). In dieser Studie konnte beispielsweise eine signifikante Steigerung der Expression von T-Zell-Zytotoxizitätsmarkern wie Perforin und Granzym B beobachtet werden. Diese Interpretation und die Ergebnisse der Veröffentlichung von Callahan et al. (13), in der eine paradoxe pERK-abhängige T-Zell Aktivierung *in vitro* und *in vivo* durch den BRAF-Inhibitor BMS908662 gezeigt werden konnte (s. 2.3.1), sind konträr zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, in der kein Einfluss des BRAF-Inhibitors DAB auf die Expression von Aktivierungs-Oberflächenmarkern auf T-Zellen festgestellt wurde. Zu beachten ist jedoch, dass sich die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit auf unstimulierte T-Zellen beschränkten, während Callahan et al. (13) stimulierte T-Zellen verwendeten (s.u.). Außerdem ist zu berücksichtigen, dass die mit BMS908662 behandelten Zellen bei höheren BRAF-Inhibitor-Konzentrationen niedrigere pERK-Spiegel aufwiesen (13). Dies wirft die Frage auf, ob der Konzentrationsbereich der BRAF-Inhibitoren *in vivo* erreicht oder sogar überschritten wird, welcher für die paradoxe ERK-Aktivierung und der damit einhergehenden T-Zell-Aktivierung notwendig ist. Um die Relevanz der *in vitro* Untersuchungen zu prüfen, sollten die Konzentrationsspiegel der zu testenden BRAF-Inhibitoren in Tumorbiopsien bestimmt werden. Dies könnte dann einen Anhaltspunkt für die *in vitro* zu testenden Konzentrationsbereiche geben. So kritisierten Tel et al. (114) die Versuche anderer Arbeitsgruppen, die die Toxizität von VEM in relativ niedrigen Konzentrationen (0,5 – 5 µg/ml) auf Immunzellen prüften. Bei der Testung von VEM-Konzentrationen, die bei behandelten Patienten vorherrschen (60 µg/ml), beobachteten Tel et al. dagegen eine hohe Toxizität auf pDC und mDC. Als die Serum-Level in den Versuchen erhöht wurden, konnte diese Toxizität jedoch aufgehoben werden. Dies geht damit einher, dass VEM im Blut proteingebunden ist und die Konzentration von freiem VEM somit verringert ist. Dieses Beispiel zeigt die Komplexität bei dem Versuch, physiologische Bedingungen bei *in vitro* Experimenten abzubilden (114) und die Notwendigkeit, die *in vitro* beobachteten Phänomene *in vivo* zu überprüfen. So testeten Callahan et al. ebenso, ob systemisch verabreichte Dosen von BMS908662 in Milz-abgeleiteten T-Zellen ebenfalls erhöhte pERK-Spiegel bewirken und zur T-Zell-Signalübertragung beitragen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die CD8⁺-T-Zellen der behandelten Mäuse bei der Stimulation *ex vivo* empfindlicher waren, einen erhöhten pERK-Spiegel aufwiesen und dieser mit der antigenspezifischen Expansion von T-Zellen *in vivo* korrelierte (13).

Eine ähnliche Beobachtung machten Koya et al., die eine durch VEM vermittelte paradoxe Aktivierung des MAPK-Signalwegs mit erhöhten pERK-Spiegeln und eine damit einhergehende erhöhte zytotoxische Aktivität und intratumorale Zytokinsekretion in adoptiv übertragenen T-Zellen feststellten (167).

Die Tatsache, dass die von Callahan et al. beobachtete, durch BMS908662 induzierte Hyperaktivierung der ERK-Signalübertragung durch Zugabe des MEK-Inhibitors PD325901 vollständig aufgehoben werden konnte (13), stellt die Relevanz der ERK-Hyperaktivierung und der damit potenziell einhergehenden verstärkten T-Zell-Antitumoraktivität in Frage, da bei der aktuellen Pharmakotherapie des BRAFV600E-mutierten Melanom in den meisten Fällen ein BRAF-Inhibitor mit einem MEK-Inhibitor kombiniert wird (s. 2.2.2). Hingegen könnte für die potenzielle Kombination eines BRAF-Inhibitors mit einem Immuncheckpoint-Inhibitor ohne die zusätzliche Gabe eines MEK-Inhibitors die paradoxe ERK-Aktivierung wiederum eine Rolle spielen. In zukünftigen *in vivo* Studien sollte daher zumindest eine Vergleichsgruppe die Kombinationstherapie aus einem BRAF- und einem MEK-Inhibitor erhalten, um den potenziellen Effekt einer ERK-Aktivierung auf die Antitumorantwort zu analysieren.

Schilling et al. sehen die paradoxe Aktivierung des ERK-Signalwegs als eine mögliche Erklärung für die Verminderung der Anzahl peripherer Lymphozyten und die Veränderung des Phänotyps und der Funktion von CD4⁺-T-Zellen, die während der Therapie mit VEM nachgewiesen wurde (111) (s. 2.3.1). Diese Veränderungen konnten jedoch nicht bei der Behandlung mit DAB festgestellt werden. Auch Hong et al. konnten keinen Einfluss von DAB auf die Anteile von Leukozyten-Untergruppen oder CD4⁺- und CD8⁺-T-Zell-Gedächtnisantworten aufzeigen (146). Dies gibt einen Hinweis darauf, dass nicht alle BRAF-Inhibitoren die gleiche Wirkung bezüglich einer paradoxen ERK-Aktivierung aufweisen könnten. Zudem könnten diese Unterschiede zwischen den BRAF-Inhibitoren erklären, dass in der vorliegenden Arbeit keine erhöhte Expression von Aktivierungs-Oberflächenmarkern auf T-Zellen, B-Zellen und Monozyten nach DAB-Inkubation detektiert wurde, jedoch die Inkubation dieser Zellen mit einem anderen BRAF-Inhibitor zu einer Stimulierung führen könnte. Ähnliche Ergebnisse lieferten Untersuchungen von Hajek et al., die keinen stimulatorischen Effekt von DAB auf humane MODC zeigen konnten, während VEM die Expression kostimulatorischer Moleküle auf humanen MODC aufregulierte (14) (s. 2.3.2). Des Weiteren beobachteten Vella et al. ebenfalls keinen Einfluss von DAB auf T-Lymphozyten oder MODC, während TRA alleine oder in Kombination mit DAB die T-Lymphozytenproliferation, die Zytokinproduktion und die antigen-spezifische

Expansion unterdrückte (115). Dies rechtfertigt erneut, in Folgeversuchen die Kombinationstherapie mit einem BRAF-Inhibitor und einem MEK-Inhibitor zu prüfen (s.o.).

Eine weitere Erklärung dafür, dass in der vorliegenden Arbeit kein Einfluss von DAB auf die Expression von Aktivierungs-Oberflächenmarkern von T-Zellen nachweisbar war, könnte in der unterschiedlichen Methodik begründet sein. So wurden in den Untersuchungen von Callahan et al. T-Zellen *in vitro* mit Anti-CD3- und Anti-CD28-Antikörpern stimuliert, welche den T-Zell-Rezeptor und das kostimulatorische Molekül CD28 binden (13). Dahingegen wurde in den Versuchen der vorliegenden Arbeit auf eine Stimulierung der T-Zellen verzichtet. Um eine Vergleichbarkeit zwischen diesen verschiedenen Versuchen herzustellen, sollte erwogen werden, ob bei der Prüfung der T-Zellaktivierung ebenfalls eine Vorstimulation durchgeführt werden sollte.

Nicht zu missachten ist, dass DAB die Expression von MHCII und der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf murinen splenischen APC und BMDC steigerte (14). Diese Diskrepanz zwischen dem humanen und murinen System könnte wiederum auf speziesabhängige Unterschiede zurückzuführen sein (vgl. 5.1.1), die dafür verantwortlich sind, dass DAB nur im murinen System stimulatorisch auf diese Immunzellen wirkt. Einen weiteren Hinweis für die Wichtigkeit speziesspezifischer Effekte liefert eine Untersuchung von Vosgian et al. Während VEM auf humane T-Zellen stimulatorisch wirkt (111, 167), konnten die Autoren in einem murinen BRAF WT-Modell und einem BRAF WT Insulinom-Modell keinen signifikanten Effekt von VEM auf die CD4⁺- und CD8⁺-T-Zell-Zytokinproduktion oder auf eine T-Zell vermittelte Antitumor-Reaktion zeigen (168).

6. Zusammenfassung

Das maligne Melanom ist einer der aggressivsten Tumoren der Haut mit einer steigenden Inzidenz in westlichen Ländern. Die Zulassung von Tyrosinkinase-Inhibitoren und Immuncheckpoint-Inhibitoren führte zu einer signifikanten Verbesserung der Prognose bei betroffenen Patienten. Tyrosinkinase-Inhibitoren umfassen u.a. BRAF-Inhibitoren und MEK-Inhibitoren, die in erster Linie zur Therapie von BRAFV600E-mutierten Tumoren eingesetzt werden. Das BRAFV600E-Protein ist in ungefähr 40% aller Melanome mutiert und führt dann in der Rolle eines Onkogens zu einer anhaltenden Aktivierung des für Proliferation, Apoptose und Migration zuständigen MAPK-Signalwegs. Neben den tumorsuppressiven Effekten der BRAF-Inhibitoren, die auf die verminderte ERK-Aktivität in Tumorzellen zurückzuführen ist, konnten immunmodulierende Effekte wie z.B. vermehrte T-Zell-Infiltrate in Melanombiopsien, T-Zell-stimulierende Effekte *in vitro* und in Mausmodellen, Veränderungen des Immunphänotyps und der Zytokinproduktion von murinen APC sowie das Immunsystem betreffende Nebenwirkungen wie Fieber und Ausschläge in Melanom-Patienten beobachtet werden. In dieser Arbeit wurden immunologische Off-Target-Effekte des BRAF-Inhibitors DAB auf humane Immunzellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass DAB die IL-1 β -Produktion in PBMC und Monozyten gesunder Blutspender in etwas weniger als der Hälfte der Fälle verstärkt. Die Monozyten scheinen hierbei die relevante Immunzellpopulation zu sein, die auf DAB-Behandlung mit einer verstärkten IL-1 β -Sekretion reagierten. Zudem führte die Applikation von DAB in humanen Monozyten zu einer vermehrten Caspase-1-Aktivität, was auf die Aktivierung des Inflammasoms schließen lässt. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass DAB vorrangig in IL-1 β -sezernierenden PBMC die Produktion der immunsuppressiven Zytokine IL-6 und IL-8 steigert. Funktional relevante IL-1 β -Promoter-SNPs scheinen nicht mit der DAB-induzierten IL-1 β -Produktion assoziiert zu sein. Des Weiteren konnten keine relevanten modulierenden Effekte des BRAF-Inhibitors DAB auf die Oberflächenmarker-Expression von humanen B-Zellen, T-Zellen und Monozyten nachgewiesen werden. Alles in allem liefert diese Arbeit Hinweise darauf, dass der BRAF-Inhibitor DAB auch in humanen Immunzellen immunologische Off-Target-Effekte zeigt und dabei die Population der Monozyten eine vorrangige Stellung einnimmt. In zukünftigen Studien sollte die Relevanz der BRAF-Inhibitor vermittelten Off-Target Effekte mit Hilfe von Tumormausmodellen und

humanen Melanombiopsien überprüft werden, wobei weitere BRAF-Inhibitoren sowie deren Kombination mit MEK-Inhibitoren Gegenstand der Untersuchung sein sollten.

7. Literaturverzeichnis

1. Franklin C, Livingstone E, Roesch A, Schilling B, Schadendorf D. Immunotherapy in melanoma: Recent advances and future directions. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 2017;43(3):604-11.
2. Leonardi GC, Falzone L, Salemi R, Zanghi A, Spandidos DA, McCubrey JA, et al. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). *International journal of oncology*. 2018;52(4):1071-80.
3. Colombino M, Capone M, Lissia A, Cossu A, Rubino C, De Giorgi V, et al. BRAF/NRAS mutation frequencies among primary tumors and metastases in patients with melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(20):2522-9.
4. Liu W, Kelly JW, Trivett M, Murray WK, Dowling JP, Wolfe R, et al. Distinct Clinical and Pathological Features Are Associated with the BRAF V600E Mutation in Primary Melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*. 2007;127(4):900-5.
5. Karasarides M, Chioleches A, Hayward R, Niculescu-Duvaz D, Scanlon I, Friedlos F, et al. B-RAF is a therapeutic target in melanoma. *Oncogene*. 2004;23(37):6292-8.
6. Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, Jouary T, Gutzmer R, Millward M, et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*. 2012;380(9839):358-65.
7. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *The New England journal of medicine*. 2011;364(26):2507-16.
8. Luke JJ, Hodi FS. Ipilimumab, vemurafenib, dabrafenib, and trametinib: synergistic competitors in the clinical management of BRAF mutant malignant melanoma. *The oncologist*. 2013;18(6):717-25.
9. Manzano JL, Layos L, Buges C, de Los Llanos Gil M, Vila L, Martinez-Balibrea E, et al. Resistant mechanisms to BRAF inhibitors in melanoma. *Annals of translational medicine*. 2016;4(12):237.

10. Larkin J, Ascierto PA, Dreno B, Atkinson V, Liskay G, Maio M, et al. Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *The New England journal of medicine*. 2014;371(20):1867-76.
11. Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, Larkin J, et al. Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*. 2015;386(9992):444-51.
12. 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. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(5):1386-94.
13. 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 immunology research*. 2014;2(1):70-9.
14. Hajek E, Krebs F, Bent R, Haas K, Bast A, Steinmetz I, et al. BRAF inhibitors stimulate inflammasome activation and interleukin 1 beta production in dendritic cells. *Oncotarget*. 2018;9(47):28294-308.
15. Young HL, Rowling EJ, Bugatti M, Giurisato E, Luheshi N, Arozarena I, et al. An adaptive signaling network in melanoma inflammatory niches confers tolerance to MAPK signaling inhibition. *The Journal of experimental medicine*. 2017;214(6):1691-710.
16. Ridker PM, MacFadyen JG, Thuren T, Everett BM, Libby P, Glynn RJ. Effect of interleukin-1beta inhibition with canakinumab on incident lung cancer in patients with atherosclerosis: exploratory results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet (London, England)*. 2017;390(10105):1833-42.
17. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European journal of dermatology : EJD*. 2002;12(4):390-9; quiz 400-1.
18. Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*. 2007;445(7130):843-50.
19. Kaidbey KH, Agin PP, Sayre RM, Kligman AM. Photoprotection by melanin--a comparison of black and Caucasian skin. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1979;1(3):249-60.

20. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *The New England journal of medicine*. 2005;353(20):2135-47.
21. Bastian BC. The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annual review of pathology*. 2014;9:239-71.
22. Candido S, Rapisarda V, Marconi A, Malaponte G, Bevelacqua V, Gangemi P, et al. Analysis of the B-RafV600E mutation in cutaneous melanoma patients with occupational sun exposure. *Oncology reports*. 2014;31(3):1079-82.
23. Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanomas. *Nature reviews Cancer*. 2016;16(6):345-58.
24. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nature genetics*. 2003;33(1):19-20.
25. Moro N, Mauch C, Zigrino P. Metalloproteinases in melanoma. *Eur J Cell Biol*. 2014;93(1-2):23-9.
26. Sandri S, Faiao-Flores F, Tiago M, Pennacchi PC, Massaro RR, Alves-Fernandes DK, et al. Vemurafenib resistance increases melanoma invasiveness and modulates the tumor microenvironment by MMP-2 upregulation. *Pharmacological research*. 2016;111:523-33.
27. Guarneri C, Bevelacqua V, Polesel J, Falzone L, Cannavò PS, Spandidos DA, et al. NF- κ B inhibition is associated with OPN/MMP-9 downregulation in cutaneous melanoma. *Oncology reports*. 2017;37(2):737-46.
28. Krauthammer M, Kong Y, Ha BH, Evans P, Bacchiocchi A, McCusker JP, et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nature genetics*. 2012;44(9):1006-14.
29. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Montalto G, Cervello M, et al. Mutations and deregulation of Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascades which alter therapy response. *Oncotarget*. 2012;3(9):954-87.
30. Wellbrock C, Karasarides M, Marais R. The RAF proteins take centre stage. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2004;5(11):875-85.
31. Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annual review of pathology*. 2009;4:127-50.
32. Palmieri G, Ombra M, Colombino M, Casula M, Sini M, Manca A, et al. Multiple Molecular Pathways in Melanomagenesis: Characterization of Therapeutic Targets. *Frontiers in oncology*. 2015;5:183-.

33. Cohen C, Zavala-Pompa A, Sequeira JH, Shoji M, Sexton DG, Cotsonis G, et al. Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2002;8(12):3728-33.
34. 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. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2018;31(1):24-38.
35. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*. 2004;116(6):855-67.
36. Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer cell*. 2004;6(4):313-9.
37. Muñoz-Couselo E, Adelantado EZ, Ortiz C, García JS, Perez-Garcia J. NRAS-mutant melanoma: current challenges and future prospect. *OncoTargets and therapy*. 2017;10:3941-7.
38. Fedorenko IV, Gibney GT, Smalley KSM. NRAS mutant melanoma: biological behavior and future strategies for therapeutic management. *Oncogene*. 2013;32(25):3009-18.
39. Sensi M, Nicolini G, Petti C, Bersani I, Lozupone F, Molla A, et al. Mutually exclusive NRASQ61R and BRAFV600E mutations at the single-cell level in the same human melanoma. *Oncogene*. 2006;25(24):3357-64.
40. Krauthammer M, Kong Y, Bacchicocchi A, Evans P, Pornputtpong N, Wu C, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations in NF1 and RASopathy genes in sun-exposed melanomas. *Nature genetics*. 2015;47(9):996-1002.
41. Kiuru M, Busam KJ. The NF1 gene in tumor syndromes and melanoma. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2017;97(2):146-57.
42. Nissan MH, Pratilas CA, Jones AM, Ramirez R, Won H, Liu C, et al. Loss of NF1 in cutaneous melanoma is associated with RAS activation and MEK dependence. *Cancer research*. 2014;74(8):2340-50.
43. Maertens O, Johnson B, Hollstein P, Frederick DT, Cooper ZA, Messiaen L, et al. Elucidating distinct roles for NF1 in melanomagenesis. *Cancer discovery*. 2013;3(3):338-49.

44. Wehrle-Haller B. The role of Kit-ligand in melanocyte development and epidermal homeostasis. *Pigment cell research*. 2003;16(3):287-96.
45. Slipicevic A, Herlyn M. KIT in melanoma: many shades of gray. *The Journal of investigative dermatology*. 2015;135(2):337-8.
46. Shain AH, Yeh I, Kovalyshyn I, Sriharan A, Talevich E, Gagnon A, et al. The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. *The New England journal of medicine*. 2015;373(20):1926-36.
47. Hugdahl E, Kalvenes MB, Mannelqvist M, Ladstein RG, Akslen LA. Prognostic impact and concordance of TERT promoter mutation and protein expression in matched primary and metastatic cutaneous melanoma. *British journal of cancer*. 2018;118(1):98-105.
48. Orlow I, Begg CB, Cotignola J, Roy P, Hummer AJ, Clas BA, et al. CDKN2A Germline Mutations in Individuals with Cutaneous Malignant Melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*. 2007;127(5):1234-43.
49. Aguisa-Touré A-H, Li GJC, Sciences ML. Genetic alterations of PTEN in human melanoma. 2012;69(9):1475-91.
50. Dankort D, Curley DP, Cartlidge RA, Nelson B, Karnezis AN, Damsky WE, Jr., et al. Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nature genetics*. 2009;41(5):544-52.
51. Tsao H, Goel V, Wu H, Yang G, Haluska FG. Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol*. 2004;122(2):337-41.
52. Hofmann UB, Westphal JR, Van Muijen GN, Ruitter DJ. Matrix metalloproteinases in human melanoma. *J Invest Dermatol*. 2000;115(3):337-44.
53. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular research*. 2006;69(3):562-73.
54. Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2011;3(12).
55. Falzone L, Salemi R, Travali S, Scalisi A, McCubrey JA, Candido S, et al. MMP-9 overexpression is associated with intragenic hypermethylation of MMP9 gene in melanoma. *Aging*. 2016;8(5):933-44.
56. Yang L, Song X, Zhu J, Li M, Ji Y, Wu F, et al. Tumor suppressor microRNA-34a inhibits cell migration and invasion by targeting MMP-2/MMP-9/FNDC3B

- in esophageal squamous cell carcinoma. *International journal of oncology*. 2017;51(1):378-88.
57. Guarneri C, Bevelacqua V, Polesel J, Falzone L, Cannavo PS, Spandidos DA, et al. NF κ B inhibition is associated with OPN/MMP9 downregulation in cutaneous melanoma. *Oncology reports*. 2017;37(2):737-46.
 58. Schadendorf D, Fisher DE, Garbe C, Gershenwald JE, Grob J-J, Halpern A, et al. Melanoma. *Nature Reviews Disease Primers*. 2015;1:15003.
 59. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*. 2012;12:252.
 60. Umansky V, Sevko A. Melanoma-induced immunosuppression and its neutralization. *Seminars in Cancer Biology*. 2012;22(4):319-26.
 61. Sumimoto H, Imabayashi F, Iwata T, Kawakami Y. The BRAF-MAPK signaling pathway is essential for cancer-immune evasion in human melanoma cells. *The Journal of experimental medicine*. 2006;203(7):1651-6.
 62. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature medicine*. 2013;19(11):1423-37.
 63. Tao L, Huang G, Song H, Chen Y, Chen L. Cancer associated fibroblasts: An essential role in the tumor microenvironment. *Oncology letters*. 2017;14(3):2611-20.
 64. Khalili JS, Liu S, Rodriguez-Cruz TG, Whittington M, Wardell S, Liu C, et al. Oncogenic BRAF(V600E) promotes stromal cell-mediated immunosuppression via induction of interleukin-1 in melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(19):5329-40.
 65. Ross MI, Gershenwald JE. Evidence-based treatment of early-stage melanoma. *Journal of surgical oncology*. 2011;104(4):341-53.
 66. Corrie P, Hategan M, Fife K, Parkinson C. Management of melanoma. *British medical bulletin*. 2014;111(1):149-62.
 67. Luke JJ, Flaherty KT, Ribas A, Long GV. Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2017;14:463.
 68. Maverakis E, Cornelius LA, Bowen GM, Phan T, Patel FB, Fitzmaurice S, et al. Metastatic melanoma - a review of current and future treatment options. *Acta dermato-venereologica*. 2015;95(5):516-24.

69. Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(17):1974-82.
70. Gutmacher I, Becher B. APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(5):1119-27.
71. Rowshanravan B, Halliday N, Sansom DM. CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood*. 2018;131(1):58-67.
72. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*. 1995;3(5):541-7.
73. Chikuma S. CTLA-4, an Essential Immune-Checkpoint for T-Cell Activation. *Current topics in microbiology and immunology*. 2017;410:99-126.
74. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*. 1999;11(2):141-51.
75. Sharpe AH, Pauken KE. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nature Reviews Immunology*. 2017;18:153.
76. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature immunology*. 2001;2(3):261-8.
77. Cho J, Ahn S, Yoo KH, Kim JH, Choi SH, Jang KT, et al. Treatment outcome of PD-1 immune checkpoint inhibitor in Asian metastatic melanoma patients: correlative analysis with PD-L1 immunohistochemistry. *Investigational new drugs*. 2016;34(6):677-84.
78. Seidel JA, Otsuka A, Kabashima K. Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations. *Frontiers in oncology*. 2018;8:86-.
79. Domingues B, Lopes JM, Soares P, Pópulo H. Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets and therapy*. 2018;7:35-49.
80. Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *The New England journal of medicine*. 2015;372(4):320-30.

81. Holderfield M, Deuker MM, McCormick F, McMahon M. Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond. *Nature Reviews Cancer*. 2014;14:455.
82. Long GV, Menzies AM, Nagrial AM, Haydu LE, Hamilton AL, Mann GJ, et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(10):1239-46.
83. Su F, Viros A, Milagre C, Trunzer K, Bollag G, Spleiss O, et al. RAS mutations in cutaneous squamous-cell carcinomas in patients treated with BRAF inhibitors. *The New England journal of medicine*. 2012;366(3):207-15.
84. Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, Larkin J, et al. Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma. *The New England journal of medicine*. 2014;371(20):1877-88.
85. Welsh SJ, Corrie PG. Management of BRAF and MEK inhibitor toxicities in patients with metastatic melanoma. *Therapeutic advances in medical oncology*. 2015;7(2):122-36.
86. Arozarena I, Wellbrock C. Overcoming resistance to BRAF inhibitors. *Annals of translational medicine*. 2017;5(19):387-.
87. Van Allen EM, Wagle N, Sucker A, Treacy DJ, Johannessen CM, Goetz EM, et al. The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. *Cancer discovery*. 2014;4(1):94-109.
88. 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):973-7.
89. Gibney GT, Smalley KSM. An unholy alliance: cooperation between BRAF and NF1 in melanoma development and BRAF inhibitor resistance. *Cancer discovery*. 2013;3(3):260-3.
90. Lito P, Pratilas CA, Joseph EW, Tadi M, Halilovic E, Zubrowski M, et al. Relief of profound feedback inhibition of mitogenic signaling by RAF inhibitors attenuates their activity in BRAFV600E melanomas. *Cancer cell*. 2012;22(5):668-82.
91. Corcoran RB, Ebi H, Turke AB, Coffee EM, Nishino M, Cogdill AP, et al. EGFR-mediated re-activation of MAPK signaling contributes to insensitivity of BRAF mutant colorectal cancers to RAF inhibition with vemurafenib. *Cancer discovery*. 2012;2(3):227-35.

92. Poulikakos PI, Persaud Y, Janakiraman M, Kong X, Ng C, Moriceau G, et al. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature*. 2011;480(7377):387-90.
93. Emery CM, Vijayendran KG, Zipser MC, Sawyer AM, Niu L, Kim JJ, et al. MEK1 mutations confer resistance to MEK and B-RAF inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(48):20411-6.
94. Straussman R, Morikawa T, Shee K, Barzily-Rokni M, Qian ZR, Du J, et al. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature*. 2012;487(7408):500-4.
95. Hirata E, Girotti MR, Viros A, Hooper S, Spencer-Dene B, Matsuda M, et al. Intravital imaging reveals how BRAF inhibition generates drug-tolerant microenvironments with high integrin beta1/FAK signaling. *Cancer cell*. 2015;27(4):574-88.
96. 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 TNFalpha. *Cancer discovery*. 2014;4(10):1214-29.
97. Wang T, Xiao M, Ge Y, Krepler C, Belser E, Lopez-Coral A, et al. BRAF Inhibition Stimulates Melanoma-Associated Macrophages to Drive Tumor Growth. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2015;21(7):1652-64.
98. Moriceau G, Hugo W, Hong A, Shi H, Kong X, Yu CC, et al. Tunable-combinatorial mechanisms of acquired resistance limit the efficacy of BRAF/MEK cotargeting but result in melanoma drug addiction. *Cancer cell*. 2015;27(2):240-56.
99. Karoulia Z, Gavathiotis E, Poulikakos PI. New perspectives for targeting RAF kinase in human cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2017;17:676.
100. Dummer R, Ascierto PA, Gogas HJ, Arance A, Mandala M, Liskay G, et al. Encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib in patients with BRAF-mutant melanoma (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2018;19(5):603-15.
101. 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):583-6.

102. Carlino MS, Todd JR, Gowrishankar K, Mijatov B, Pupo GM, Fung C, et al. Differential activity of MEK and ERK inhibitors in BRAF inhibitor resistant melanoma. *Molecular oncology*. 2014;8(3):544-54.
103. Yan Y, Kumar AB, Finnes H, Markovic SN, Park S, Dronca RS, et al. Combining Immune Checkpoint Inhibitors With Conventional Cancer Therapy. *Frontiers in immunology*. 2018;9:1739-.
104. Cooper ZA, Juneja VR, Sage PT, Frederick DT, Piris A, Mitra D, et al. Response to BRAF inhibition in melanoma is enhanced when combined with immune checkpoint blockade. *Cancer immunology research*. 2014;2(7):643-54.
105. Hu-Lieskovan S, Mok S, Homet Moreno B, Tsoi J, Robert L, Goedert L, et al. Improved antitumor activity of immunotherapy with BRAF and MEK inhibitors in BRAF(V600E) melanoma. *Science translational medicine*. 2015;7(279):279ra41.
106. Ribas A, Hodi FS, Callahan M, Konto C, Wolchok J. Hepatotoxicity with combination of vemurafenib and ipilimumab. *The New England journal of medicine*. 2013;368(14):1365-6.
107. Ribas A, Hodi FS, Lawrence DP, Atkinson V, Starodub A, Carlino MS, et al. Pembrolizumab (pembro) in combination with dabrafenib (D) and trametinib (T) for BRAF-mutant advanced melanoma: Phase 1 KEYNOTE-022 study. *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(15_suppl):3014-.
108. Ugurel S, Rohmel J, Ascierto PA, Flaherty KT, Grob JJ, Hauschild A, et al. Survival of patients with advanced metastatic melanoma: the impact of novel therapies-update 2017. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2017;83:247-57.
109. 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. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013;19(5):1225-31.
110. Schilling B, Paschen A. Immunological consequences of selective BRAF inhibitors in malignant melanoma: Neutralization of myeloid-derived suppressor cells. *Oncoimmunology*. 2013;2(8):e25218.
111. Schilling B, Sonderrmann W, Zhao F, Griewank KG, Livingstone E, Sucker A, et al. Differential influence of vemurafenib and dabrafenib on patients'

- lymphocytes despite similar clinical efficacy in melanoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2014;25(3):747-53.
112. 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. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2015;21(7):1639-51.
 113. Ott PA, Henry T, Baranda SJ, Frleta D, Manches O, Bogunovic D, et al. Inhibition of both BRAF and MEK in BRAF(V600E) mutant melanoma restores compromised dendritic cell (DC) function while having differential direct effects on DC properties. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2013;62(4):811-22.
 114. Tel J, Koornstra R, de Haas N, van Deutekom V, Westdorp H, Boudewijns S, et al. Preclinical exploration of combining plasmacytoid and myeloid dendritic cell vaccination with BRAF inhibition. *Journal of translational medicine*. 2016;14:88.
 115. 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 immunology research*. 2014;2(4):351-60.
 116. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Introduction. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation Supplementum*. 1968;97:7.
 117. Leb L, Crusberg T, Fortier N, Michael Snyder L. Evaluation of methods using adherence to substrate and density gradient for the isolation of human monocytes. *Journal of Immunological Methods*. 1983;58(3):309-21.
 118. Biosciences B. BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Soluble Protein Master Buffer Kit Instruction Manual. <http://wwwbdbiosciences.com/ds/pm/others/23-13480pdf> aufgerufen am 21/03/2019.
 119. O'Brien M, Moehring D, Muñoz-Planillo R, Núñez G, Callaway J, Ting J, et al. A bioluminescent caspase-1 activity assay rapidly monitors inflammasome activation in cells. *Journal of Immunological Methods*. 2017;447:1-13.

120. Promega. Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay Technical Manual.
<https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/tm456-caspaseglo-1-inflammasome-assay-protocolpdf?la=en>
aufgerufen am 21/03/2019.
121. Promega. Caspase-Glo® 3/7 Assay Technical Bulletin.
<https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/caspase-glo-3-7-assay-protocolpdf> aufgerufen am 21/03/2019.
122. Promega. CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay.
<https://ch.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-glo-luminescent-cell-viability-assay-protocolpdf> aufgerufen am 21/03/2019.
123. QIAGEN. QIAGEN Genomic DNA Handbook.
<https://www.qiagen.com/be/resources/resourcedetail?id=d2b85b26-16dd-4259-a3a7-a08cbd2a08a3&lang=en> aufgerufen am 21/03/2019.
124. QIAGEN. QIAquick Spin Handbook.
<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=95f10677-aa29-453d-a222-0e19f01ebe17&lang=en> aufgerufen am 22/03/2019.
125. Sahoo M, Ceballos-Olvera I, del Barrio L, Re F. Role of the inflammasome, IL-1beta, and IL-18 in bacterial infections. *TheScientificWorldJournal*. 2011;11:2037-50.
126. Chen H, Wilkins LM, Aziz N, Cannings C, Wyllie DH, Bingle C, et al. Single nucleotide polymorphisms in the human interleukin-1B gene affect transcription according to haplotype context. *Human molecular genetics*. 2006;15(4):519-29.
127. Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *Journal of immunology research*. 2014;2014:149185-.
128. Schaale K, Peters KM, Murthy AM, Fritzsche AK, Phan MD, Totsika M, et al. Strain- and host species-specific inflammasome activation, IL-1beta release, and cell death in macrophages infected with uropathogenic *Escherichia coli*. *Mucosal immunology*. 2016;9(1):124-36.
129. Tse A, Verkhivker GM. Exploring Molecular Mechanisms of Paradoxical Activation in the BRAF Kinase Dimers: Atomistic Simulations of Conformational Dynamics and Modeling of Allosteric Communication Networks and Signaling Pathways. *PloS one*. 2016;11(11):e0166583.

130. Robert C, Arnault JP, Mateus C. RAF inhibition and induction of cutaneous squamous cell carcinoma. *Current opinion in oncology*. 2011;23(2):177-82.
131. Callahan MK, Rampal R, Harding JJ, Klimek VM, Chung YR, Merghoub T, et al. Progression of RAS-mutant leukemia during RAF inhibitor treatment. *The New England journal of medicine*. 2012;367(24):2316-21.
132. Kurosawa M, Numazawa S, Tani Y, Yoshida T. ERK signaling mediates the induction of inflammatory cytokines by bufalin in human monocytic cells. *American journal of physiology Cell physiology*. 2000;278(3):C500-8.
133. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*. 2013;39(6):1003-18.
134. Grabbe S, Bruvers S, Granstein RD. Effects of immunomodulatory cytokines on the presentation of tumor-associated antigens by epidermal Langerhans cells. *J Invest Dermatol*. 1992;99(5):66s-8s.
135. Haabeth OAW, Lorvik KB, Yagita H, Bogen B, Corthay A. Interleukin-1 is required for cancer eradication mediated by tumor-specific Th1 cells. *Oncoimmunology*. 2015;5(1):e1039763-e.
136. Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, Ma Y, Ortiz C, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nature medicine*. 2009;15(10):1170-8.
137. Bent R, Moll L, Grabbe S, Bros M. Interleukin-1 Beta-A Friend or Foe in Malignancies? *International journal of molecular sciences*. 2018;19(8):2155.
138. Carmi Y, Dotan S, Rider P, Kaplanov I, White MR, Baron R, et al. The role of IL-1beta in the early tumor cell-induced angiogenic response. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2013;190(7):3500-9.
139. Okamoto M, Liu W, Luo Y, Tanaka A, Cai X, Norris DA, et al. Constitutively active inflammasome in human melanoma cells mediating autoinflammation via caspase-1 processing and secretion of interleukin-1beta. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(9):6477-88.
140. Qin Y, Ekmekcioglu S, Liu P, Duncan LM, Lizee G, Poindexter N, et al. Constitutive aberrant endogenous interleukin-1 facilitates inflammation and growth in human melanoma. *Molecular cancer research : MCR*. 2011;9(11):1537-50.
141. Elkabets M, Ribeiro VS, Dinarello CA, Ostrand-Rosenberg S, Di Santo JP, Apte RN, et al. IL-1beta regulates a novel myeloid-derived suppressor cell

- subset that impairs NK cell development and function. *European journal of immunology*. 2010;40(12):3347-57.
142. Hugo W, Shi H, Sun L, Piva M, Song C, Kong X, et al. Non-genomic and Immune Evolution of Melanoma Acquiring MAPKi Resistance. *Cell*. 2015;162(6):1271-85.
 143. Zitvogel L, Kepp O, Galluzzi L, Kroemer G. Inflammasomes in carcinogenesis and anticancer immune responses. *Nature immunology*. 2012;13(4):343-51.
 144. Mattarollo SR, Loi S, Duret H, Ma Y, Zitvogel L, Smyth MJ. Pivotal role of innate and adaptive immunity in anthracycline chemotherapy of established tumors. *Cancer research*. 2011;71(14):4809-20.
 145. Nakae S, Asano M, Horai R, Iwakura Y. Interleukin-1 beta, but not interleukin-1 alpha, is required for T-cell-dependent antibody production. *Immunology*. 2001;104(4):402-9.
 146. Hong DS, Vence L, Falchook G, Radvanyi LG, Liu C, Goodman V, et al. BRAF(V600) inhibitor GSK2118436 targeted inhibition of mutant BRAF in cancer patients does not impair overall immune competency. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(8):2326-35.
 147. Panka DJ, Atkins MB, Mier JW. Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway in the treatment of malignant melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(7 Pt 2):2371s-5s.
 148. Fisher DT, Appenheimer MM, Evans SS. The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment. *Seminars in immunology*. 2014;26(1):38-47.
 149. Lippitz BE. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *The Lancet Oncology*. 2013;14(6):e218-e28.
 150. Lesina M, Kurkowski MU, Ludes K, Rose-John S, Treiber M, Kloppel G, et al. Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer. *Cancer cell*. 2011;19(4):456-69.
 151. Schuett H, Luchtefeld M, Grothusen C, Grote K, Schieffer B. How much is too much? Interleukin-6 and its signalling in atherosclerosis. *Thromb Haemost*. 2009;102(08):215-22.
 152. Liu Q, Li A, Tian Y, Wu JD, Liu Y, Li T, et al. The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2016;31:61-71.

153. Ha H, Debnath B, Neamati N. Role of the CXCL8-CXCR1/2 Axis in Cancer and Inflammatory Diseases. *Theranostics*. 2017;7(6):1543-88.
154. Alfaro C, Sanmamed MF, Rodríguez-Ruiz ME, Teijeira Á, Oñate C, González Á, et al. Interleukin-8 in cancer pathogenesis, treatment and follow-up. *Cancer Treatment Reviews*. 2017;60:24-31.
155. Luca M, Huang S, Gershenwald JE, Singh RK, Reich R, Bar-Eli M. Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis. *The American journal of pathology*. 1997;151(4):1105-13.
156. Uen WC, Hsieh CH, Tseng TT, Jiang SS, Tseng JC, Lee SC. Anchorage independency promoted tumor malignancy of melanoma cells under reattachment through elevated interleukin-8 and CXC chemokine receptor 1 expression. *Melanoma research*. 2015;25(1):35-46.
157. Sharma B, Nawandar DM, Nannuru KC, Varney ML, Singh RK. Targeting CXCR2 enhances chemotherapeutic response, inhibits mammary tumor growth, angiogenesis, and lung metastasis. *Molecular cancer therapeutics*. 2013;12(5):799-808.
158. Keane MP, Belperio JA, Xue YY, Burdick MD, Strieter RM. Depletion of CXCR2 inhibits tumor growth and angiogenesis in a murine model of lung cancer. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2004;172(5):2853-60.
159. Yamaguchi T, Kakefuda R, Tanimoto A, Watanabe Y, Tajima N. Suppressive effect of an orally active MEK1/2 inhibitor in two different animal models for rheumatoid arthritis: a comparison with leflunomide. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2012;61(5):445-54.
160. Kulkarni D, Song K, Briley L, King K, Dabrowski C, Mookerjee B, et al. Pyrexia in dabrafenib-treated melanoma patients is not associated with common genetic variation or HLA polymorphisms. *Pharmacogenomics*. 2016;17(5):459-62.
161. Endres S, van der Meer JW, Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis of fever. *European journal of clinical investigation*. 1987;17(6):469-74.
162. Bhat IA, Naykoo NA, Qasim I, Ganie FA, Yousuf Q, Bhat BA, et al. Association of interleukin 1 beta (IL-1beta) polymorphism with mRNA expression and risk of non small cell lung cancer. *Meta gene*. 2014;2:123-33.

163. Man SM, Kanneganti TD. Regulation of inflammasome activation. *Immunological reviews*. 2015;265(1):6-21.
164. Boni A, Cogdill AP, Dang P, Udayakumar D, Njauw CN, Sloss CM, et al. Selective BRAFV600E inhibition enhances T-cell recognition of melanoma without affecting lymphocyte function. *Cancer research*. 2010;70(13):5213-9.
165. Kono M, Dunn IS, Durda PJ, Butera D, Rose LB, Haggerty TJ, et al. Role of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in the regulation of human melanocytic antigen expression. *Molecular cancer research : MCR*. 2006;4(10):779-92.
166. Hooijkaas A, Gadiot J, Morrow M, Stewart R, Schumacher T, Blank CU. Selective BRAF inhibition decreases tumor-resident lymphocyte frequencies in a mouse model of human melanoma. *Oncoimmunology*. 2012;1(5):609-17.
167. Koya RC, Mok S, Otte N, Blacketer KJ, Comin-Anduix B, Tumei PC, et al. BRAF inhibitor vemurafenib improves the antitumor activity of adoptive cell immunotherapy. *Cancer research*. 2012;72(16):3928-37.
168. Vosganian GS, Bos R, Sherman LA. Immunologic effects of an orally available BRAFV600E inhibitor in BRAF wild-type murine models. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md : 1997)*. 2012;35(6):473-7.
169. Yin Y, Liu Y, Pan X, Chen R, Li P, Wu HJ, et al. Interleukin-1beta Promoter Polymorphism Enhances the Risk of Sleep Disturbance in Alzheimer's Disease. *PLoS one*. 2016;11(3):e0149945.
170. Gordon A, Kiss-Toth E, Stockley I, Eastell R, Wilkinson JM. Polymorphisms in the interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-6 genes affect risk of osteolysis in patients with total hip arthroplasty. *Arthritis and rheumatism*. 2008;58(10):3157-65.
171. Wex T, Leodolter A, Bornschein J, Kuester D, Kahne T, Kropf S, et al. Interleukin 1 beta (IL1B) gene polymorphisms are not associated with gastric carcinogenesis in Germany. *Anticancer research*. 2010;30(2):505-11.

8. Anhang

Spender	IL-1 β (pg/ml)								
	DMSO	R848	DAB 0,025 μ M	DAB 0,05 μ M	DAB 0,1 μ M	DAB 0,25 μ M	DAB 0,5 μ M	DAB 1,0 μ M	DAB 2,5 μ M
43	87,45*	21167,75	7,25	4,68	10,68	3,39	2,32	1,27	0,68
44	1,26	31474,61	1,97	3,58	2,91	2,16	1,22	1,17	2,82
45	1,01	84,86	1,95	1,11	0,56	0,38	1,31	0,38	0,41
46	1,22	253,76	1,5	1067,67*	2,22	0,92	0,97	0,57	0,57
47	3,16	399,74	8,7	4,66	3,73	0,94	4,18	1,02	23,43
48	0,32	118,78	2,94	0,53	0,51	376,3	118,23	0,04	0,15
49	0,08	15,49	0,5	0,15	9,78	42,56	7,71	0,08	0,69
50	0,8	5,2*	1,57	18,6	68,13	408,92	1,5	1,7	28,12
51	8,48	264,2	3,2	1,47	3,35	1,11	1,74	0,57	0,43
52	0,89	245,4	0,9	1,08	1,97	1,47	1,16	2,55	1,84
53	1,14	73,18	1,93	3,84	2,89	0,91	0,57	0,57	0,75
54	9,91	59,27	3,78	4,58	12,97	3,76	3,78	6,48	1,83
55	1,34	81,48	1,31	1,54	0,25	1,11	0,96	0,48	2,05
56	6,51	94,68	4,44	5,1	5,92	33,53	6,67	4,7	1,01
57	5,45	2,2*	10,54	9,75	8	6,72	2,14	5,71	3,93
58	2,92	83,43	1,83	8,6	4,25	9,8	6,18	2	3,08
59	0,55	14,14*	0,87	11,53	0,66	0,74	0	0,76	0,61

Tab. A1 IL-1 β -Konzentrationen von PBMC (Spender 43 - 59) in pg/ml nach 22-stündiger Applikation von DMSO, R848 oder DAB (0,025 μ M - 2,5 μ M). *Wert nicht berücksichtigt. Die gelb unterlegten Zeilen markieren die Spender, die nach DAB-Applikation eine erhöhte IL-1 β -Konzentration aufweisen (Responder)

Spender	IL-1 β (pg/ml)								
	DMSO	R848	DAB 0,025 μ M	DAB 0,05 μ M	DAB 0,1 μ M	DAB 0,25 μ M	DAB 0,5 μ M	DAB 1,0 μ M	DAB 2,5 μ M
54	4,81	41,68	3,7	5,36	4,84	3,8	9,06	4,04	10,77
55	23,33	238,76	28,52	51,12	24,21	32,42	32,15	30,32	39,2
56	11,54	151,55	7,07	9,65	20,06	5,99	9,1	14,92	5,68
57	55,53	254,44	44,44	29,91	21,67	65,89	46,34	43,17	34,94
58	39,5	122,7	24,02	27,4	47,15	44,47	42,79	49,06	16,2
59	6,64	9,22*	4,73	31,81	7,88	5,76	6,43	6,63	5,24

Tab. A2 IL-1 β -Konzentrationen von Monozyten (Spender 54 - 59) in pg/ml nach 22-stündiger Applikation von DMSO, R848 oder DAB (0,025 μ M - 2,5 μ M). *Wert nicht berücksichtigt. Die gelb unterlegten Zeilen markieren die Spender, die nach DAB-Applikation eine erhöhte IL-1 β -Konzentration aufweisen (Responder)

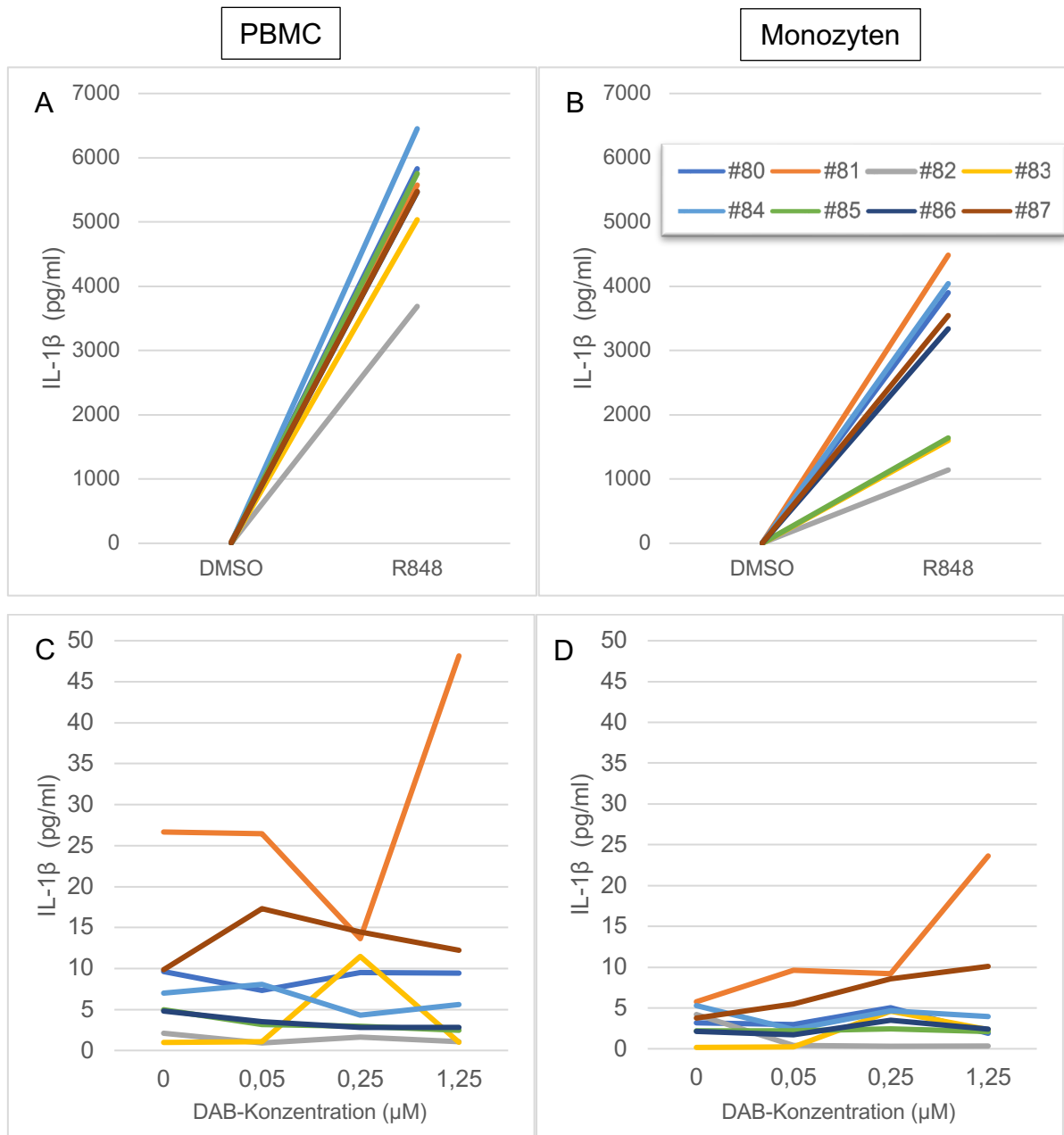


Abb. A1 DAB verstärkt die IL-1 β Produktion vor allem in PBMC. 10^6 PBMC (100 μ l) unterschiedlicher Spender wurden in Vertiefungen einer 96-Well Platte ausgesät und mit DAB in verschiedenen Konzentrationen (0,05 μ M - 1,25 μ M) behandelt (C). Parallel wurden durch 1,5-stündige Plastikadhärenz Monozyten von der non-monozytären Fraktion getrennt, zweimal gewaschen und mit DAB in verschiedenen Konzentrationen (0,05 μ M - 1,25 μ M) inkubiert (37°C, 5% CO₂) (D). DMSO (1%) diente als Lösungsmittelkontrolle, R848 als Positivkontrolle (A, B). Nach 22 h wurden die Überstände abgenommen und die IL-1 β -Konzentration durch einen CBA bestimmt. Die Diagramme zeigen die IL-1 β -Produktion in pg/ml. Bei den Proben handelte es sich um Triplikate (Mittelwerte \pm Standardfehler s. Tab. A3-8)

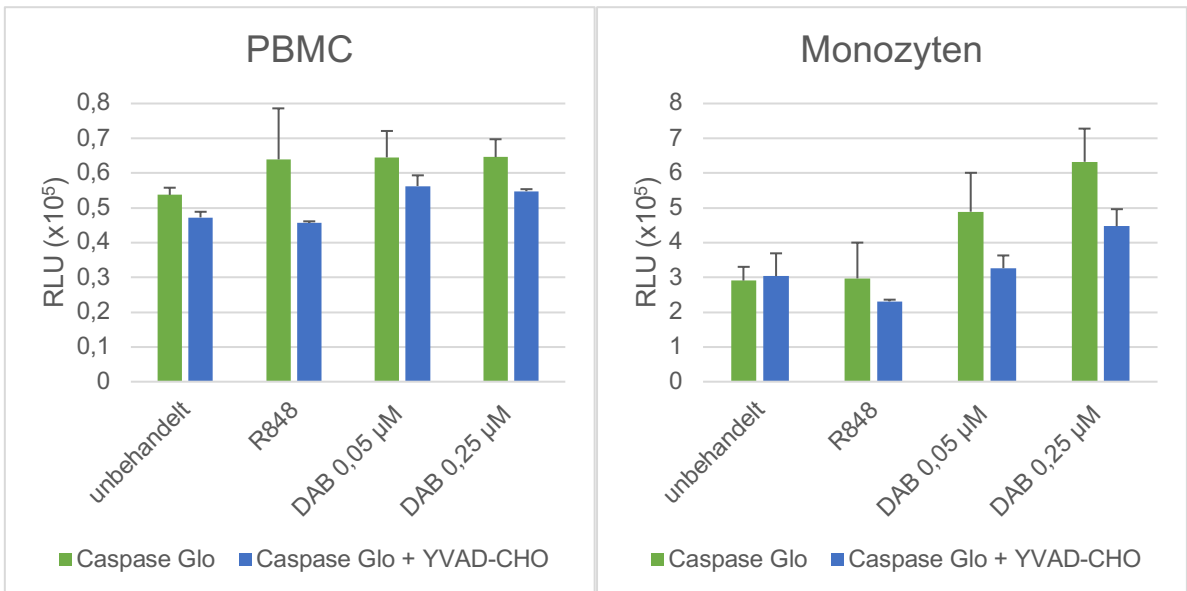


Abb. A2 DAB bewirkt eine Inflammasomaktivierung in PBMC, vor allem aber in Monozyten. 10^6 PBMC (10^7 /ml je $100 \mu\text{l}$) unterschiedlicher Spender wurden in Vertiefungen einer weißen 96-Well Platte ausgesät und mit DAB in verschiedenen Konzentrationen ($0,05 \mu\text{M}$ und $0,25 \mu\text{M}$) behandelt. Parallel wurden durch 1,5-stündige Plastikadhärenz Monozyten von der non-monozytären Fraktion getrennt, zweimal gewaschen und mit DAB in verschiedenen Konzentrationen ($0,05 \mu\text{M}$ und $0,25 \mu\text{M}$) inkubiert (37°C , $5\% \text{CO}_2$). R848 (50ng/ml) diente als Positivkontrolle. Nach 5 h Inkubation (37°C , $5\% \text{CO}_2$) wurde die Inflammasom-Aktivität durch den Caspase-Glo® 1 Inflammasome Assay bestimmt. Das Diagramm zeigt das Lumineszenzsignal in Relativen-Lumineszenz-Einheiten (RLU). Die grüne Säule stellt die mit dem Caspase-Glo-Reagenz behandelte Probe dar, wohingegen die blaue Säule den Wert der mit dem Caspase-Glo-Reagenz und Caspase-1-Inhibitor (YVAD-CHO) behandelte Probe zeigt. Die Daten repräsentieren jeweils die Mittelwerte \pm Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten.

Spender	IL-1 β (pg/ml)				
	DMSO	R848	DAB 0,05 μ M	DAB 0,25 μ M	DAB 1,25 μ M
80	9,63 \pm 1,06	5829,35 \pm 226,84	7,33 \pm 1,10	12,36 \pm 2,95	9,42 \pm 0,97
81	9,15 \pm 0,28*	5575,07 \pm 131,71	26,43 \pm 6,24	13,64 \pm 0,79	48,15 \pm 24,79*
82	2,10 \pm 1,44	3687,19 \pm 320,50	0,92 \pm 0,19	1,60 \pm 0,16	1,05 \pm 0,11
83	0,98 \pm 0,49	5035,54 \pm 155,59	1,07 \pm 0,09	1,25 \pm 0,34*	1,01 \pm 0,21
84	6,97 \pm 2,26	6451,46 \pm 215,88	8,07 \pm 1,80	4,31 \pm 0,90	5,60 \pm 1,49
85	4,97 \pm 0,45	5754,31 \pm 152,19	3,17 \pm 0,46	2,96 \pm 0,37	2,47 \pm 0,34
86	4,81 \pm 0,87	5465,91 \pm 182,72	3,52 \pm 0,89	2,81 \pm 0,69	2,84 \pm 0,12
87	9,86 \pm 2,82	5475,21 \pm 251,87	22,90 \pm 8,68*	14,49 \pm 2,82	12,20 \pm 0,99

Tab. A3 IL-1 β -Konzentrationen von PBMC (Spender 80-87) in pg/ml nach 22-stündiger Inkubation mit DMSO, R848 oder DAB (0,05 μ M – 1,25 μ M). *Mittelwert und Standardabweichung aus zwei Werten statt Mittelwert und Standardfehler aus drei Werten berechnet. Die gelb unterlegten Zeilen markieren die Spender, die nach DAB-Applikation eine erhöhte IL-1 β -Konzentration aufweisen (Responder)

Spender	IL-1 β (pg/ml)				
	DMSO	R848	DAB 0,05 μ M	DAB 0,25 μ M	DAB 1,25 μ M
80	3,14 \pm 0,87	3900,73 \pm 286,93	2,95 \pm 0,04	5,03 \pm 0,79	1,90 \pm 0,22
81	5,76 \pm 3,04*	4484,27 \pm 271,89	9,63 \pm 3,12	9,22 \pm 3,89	23,63 \pm 3,76
82	4,20 \pm 1,97	1141,52 \pm 134,49	0,41 \pm 0,21	0,34 \pm 0,17	0,34 \pm 0,17
83	0,16 \pm 0,20	1600,73 \pm 103,52	0,23 \pm 0,23	4,61 \pm 4,23	2,35 \pm 2,35
84	5,29 \pm 1,58	4041,09 \pm 270,34	2,37 \pm 0,36	4,64 \pm 0,80	3,97 \pm 0,36
85	2,20 \pm 1,36	1640,06 \pm 193,02	2,17 \pm 0,24	2,44 \pm 0,21	2,11 \pm 0,42
86	2,15 \pm 0,12	3338,48 \pm 175,34	1,72 \pm 0,60	3,50 \pm 1,26	2,41 \pm 0,55
87	3,76 \pm 0,38	3544,62 \pm 267,99	5,48 \pm 1,70	8,56 \pm 3,07	10,10 \pm 2,60

Tab. A4 IL-1 β -Konzentrationen von Monozyten (Spender 80-87) in pg/ml nach 22-stündiger Inkubation mit DMSO, R848 oder DAB (0,05 μ M – 1,25 μ M). *Mittelwert und Standardabweichung aus zwei Werten statt Mittelwert und Standardfehler aus drei Werten berechnet. Die gelb unterlegten Zeilen markieren die Spender, die nach DAB-Applikation eine erhöhte IL-1 β -Konzentration aufweisen (Responder)

Spender	IL-6 (pg/ml)				
	DMSO	R848	DAB 0,05 μ M	DAB 0,25 μ M	DAB 1,25 μ M
80	4,34 \pm 0,66	17417,94 \pm 165,89	4,74 \pm 0,81	12,05 \pm 3,94	10,76 \pm 1,75
81	11,08 \pm 3,47*	14654,34 \pm 308,09	18,10 \pm 3,58	14,19 \pm 1,21	28,63**
82	1,38 \pm 0,33*	15672,65 \pm 71,18	1,80 \pm 0,24	6,61 \pm 2,19	7,15 \pm 3,40
83	3,38 \pm 0,93	16105,36 \pm 280,89	3,93 \pm 0,58	4,49 \pm 0,20*	7,17 \pm 0,35
84	2,81 \pm 0,20	18019,98 \pm 395,87	3,04 \pm 0,33	4,56 \pm 0,33	5,19 \pm 0,55
85	2,78 \pm 0,37	16592,91 \pm 327,93	3,11 \pm 0,23	3,27 \pm 0,59	4,77 \pm 0,19
86	3,69 \pm 0,18	13651,95 \pm 187,40	5,17 \pm 1,98	3,66 \pm 0,63	7,04 \pm 0,69
87	4,45 \pm 0,32	13951,34 \pm 670,34	9,29 \pm 1,27	16,38 \pm 5,71	30,36 \pm 7,51

Tab. A5 IL-6-Konzentrationen von PBMC (Spender 80-87) in pg/ml nach 22-stündiger Inkubation mit DMSO, R848 oder DAB (0,05 μ M – 1,25 μ M). *Mittelwert und Standardabweichung aus zwei Werten statt Mittelwert und Standardfehler aus drei Werten berechnet. ** nur ein Wert berücksichtigt. Die orangefarben unterlegten Zeilen markieren die Spender, die nach DAB-Applikation eine erhöhte IL-6-Konzentration aufweisen.

Spender	IL-6 (pg/ml)				
	DMSO	R848	DAB 0,05 µM	DAB 0,25 µM	DAB 1,25 µM
80	1,26 ± 0,01	15867,92 ± 386,38	1,59 ± 0,07	1,53 ± 0,16	1,94 ± 0,13
81	5,09 ± 2,47*	15561,78 ± 816,99	4,76 ± 1,02	9,03 ± 1,87	6,97 ± 1,27
82	1,52**	14823,09 ± 517,11	1,03 ± 0,17	0,97 ± 0,14	0,62 ± 0,15
83	0,70 ± 0,09	15841,33 ± 146,03	1,17 ± 0,04	1,26 ± 0,37*	1,90 ± 0,56
84	2,44 ± 0,36	17374,4 ± 39,92	2,40 ± 0,26	2,68 ± 0,18	2,80 ± 0,18
85	1,35 ± 0,14	16084,40 ± 700,57	2,23 ± 0,34	2,36 ± 0,43	3,32 ± 1,57
86	3,84 ± 0,05	16307,29 ± 393,11	3,39 ± 0,49	2,61 ± 0,01*	19,93 ± 12,65
87	3,32 ± 0,35	16566,47 ± 254,55	2,37 ± 0,02	5,13 ± 0,37	6,61 ± 0,34

Tab. A6 IL-6-Konzentrationen von Monozyten (Spender 80-87) in pg/ml nach 22-stündiger Inkubation mit DMSO, R848 oder DAB (0,05 µM – 1,25 µM). *Mittelwert und Standardabweichung aus zwei Werten statt Mittelwert und Standardfehler aus drei Werten berechnet. ** nur ein Wert berücksichtigt

Spender	IL-8 (pg/ml)				
	DMSO	R848	DAB 0,05 µM	DAB 0,25 µM	DAB 1,25 µM
80	965,28 ± 49,13	2174,98 ± 31,30	1335,39 ± 176,96	2003,82 ± 430,98	1486,45 ± 70,59
81	1634,47 ± 180,86*	2023,89 ± 89,35	2841,13 ± 7,84*	3032,15 ± 329,26	3113,95 ± 816,55*
82	217,88 ± 42,77*	2657,83 ± 274,48	425,49 ± 88,49	1486,47 ± 310,95*	559,42 ± 167,75
83	349,12 ± 74,59	2844,62 ± 25,55	561,27 ± 53,02	477,15 ± 245,34*	410,84 ± 19,75
84	1104,14 ± 133,94	2133,98 ± 146,89	1294,28 ± 83,66	1254,69 ± 95,25	632,16 ± 87,88
85	1544,18 ± 180,14	2588,71 ± 12,46	1742,87 ± 159,19	1589,14 ± 82,02	884,23 ± 56,99
86	779,13 ± 44,49	1705,79 ± 62,97	889,61 ± 118,14	774,14 ± 83,08	509,16 ± 53,62
87	1528,59 ± 190,98	1548,47 ± 80,56	2944,59 ± 36,26	3251,90 ± 132,94	2106,38 ± 237,35

Tab. A7 IL-8-Konzentrationen von PBMC (Spender 80-87) in pg/ml nach 22-stündiger Inkubation mit DMSO, R848 oder DAB (0,05 µM – 1,25 µM). *Mittelwert und Standardabweichung aus zwei Werten statt Mittelwert und Standardfehler aus drei Werten berechnet. Die grün unterlegten Zeilen markieren die Spender, die nach DAB-Applikation eine erhöhte IL-8-Konzentration aufweisen.

Spender	IL-8 (pg/ml)				
	DMSO	R848	DAB 0,05 µM	DAB 0,25 µM	DAB 1,25 µM
80	335,59 ± 3,76	10526,33 ± 1848,89	458,47 ± 40,15	731,88 ± 96,56	1846,44 ± 98,95
81	1087,52 ± 290,67*	11164,18 ± 973,70*	930,585 ± 97,91*	1675,00 ± 272,44	793,08 ± 44,62
82	1110,44 ± 622,11*	12306,60 ± 700,84	54,915 ± 17,64*	25,89 ± 4,16	10,70 ± 1,17
83	15,53 ± 1,66	12524,70 ± 307,70	30,77 ± 8,69	26,20 ± 19,63*	17,02 ± 3,22*
84	1059,61 ± 86,53	2543,86 ± 108,41	929,65 ± 61,64	841,38 ± 189,67	338,42 ± 20,26
85	1073,65 ± 73,11	5091,5 ± 570,34	986,48 ± 202,71	1625,49 ± 82,06	472,82 ± 88,54
86	519,04 ± 53,00	3760,23 ± 322,99	415,81 ± 51,87	373,57 ± 156,28*	305,09 ± 90,08
87	1101,37 ± 119,90	4231,17 ± 267,99	546,88 ± 118,44	1392,22 ± 291,09*	1063,55 ± 288,00

Tab. A8 IL-8-Konzentrationen von Monozyten (Spender 80-87) in pg/ml nach 22-stündiger Inkubation mit DMSO, R848 oder DAB (0,05 µM – 1,25 µM). *Mittelwert und Standardabweichung aus zwei Werten statt Mittelwert und Standardfehler aus drei Werten berechnet. Die grün unterlegten Zeilen markieren die Spender, die nach DAB-Applikation eine erhöhte IL-8-Konzentration aufweisen.

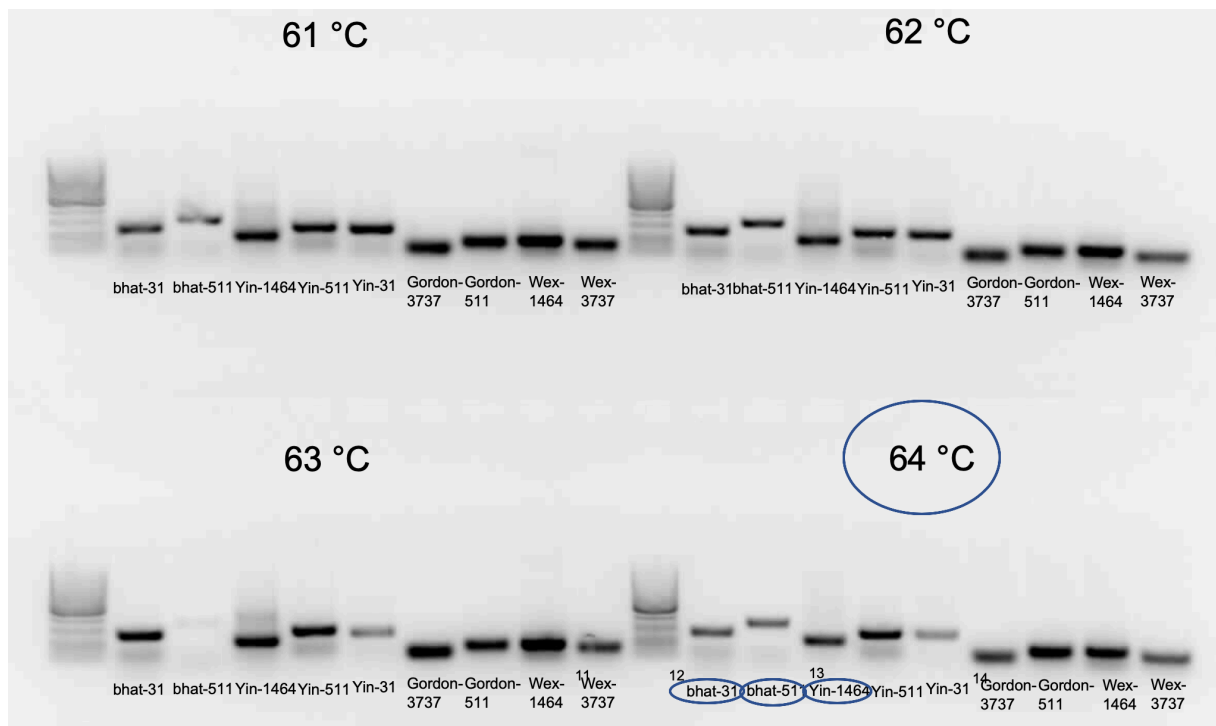


Abb. A3 Gelelektrophorese der PCR-Produkte, die durch PCR mit verschiedenen für die IL-1 β -Promoter-Region spezifischen Primer-Pärchen amplifiziert wurden. 20 μ l der PCR-Produkte, die durch PCR von aus PBMC gewonnener DNA mit verschiedenen für die IL-1 β -Promoter-Region-spezifischen Primer erhalten wurden (Annealing-Temperaturen: 61°C – 64°C), wurden mit 4 μ l Ladepuffer vermischt, in die Agarose-Geltaschen pipettiert und mittels Elektrophorese aufgetrennt (120V, 30min). Die amplifizierten Promoter-Regionen enthalten jeweils funktional relevante SNPs (126).

Die amplifizierte DNA, die nach der PCR mit den Primer-Pärchen 1 (bhat-31 (162)), Primer-Pärchen 2 (bhat-511 (162)) und Primer-Pärchen 3 (Yin-1464 (169)) resultierte, zeigt sich in der Gelelektrophorese als spezifisches Produkt bei einer Annealing-Temperatur von 64°C, während die Primer-Pärchen für die IL-1 β -Promoterregion, die SNP-3737 enthalten (Gordon-3737 (170) u. Wex-3737 (171)), bei allen Annealing-Temperaturen unspezifische Produkte liefern (Abb. A3).

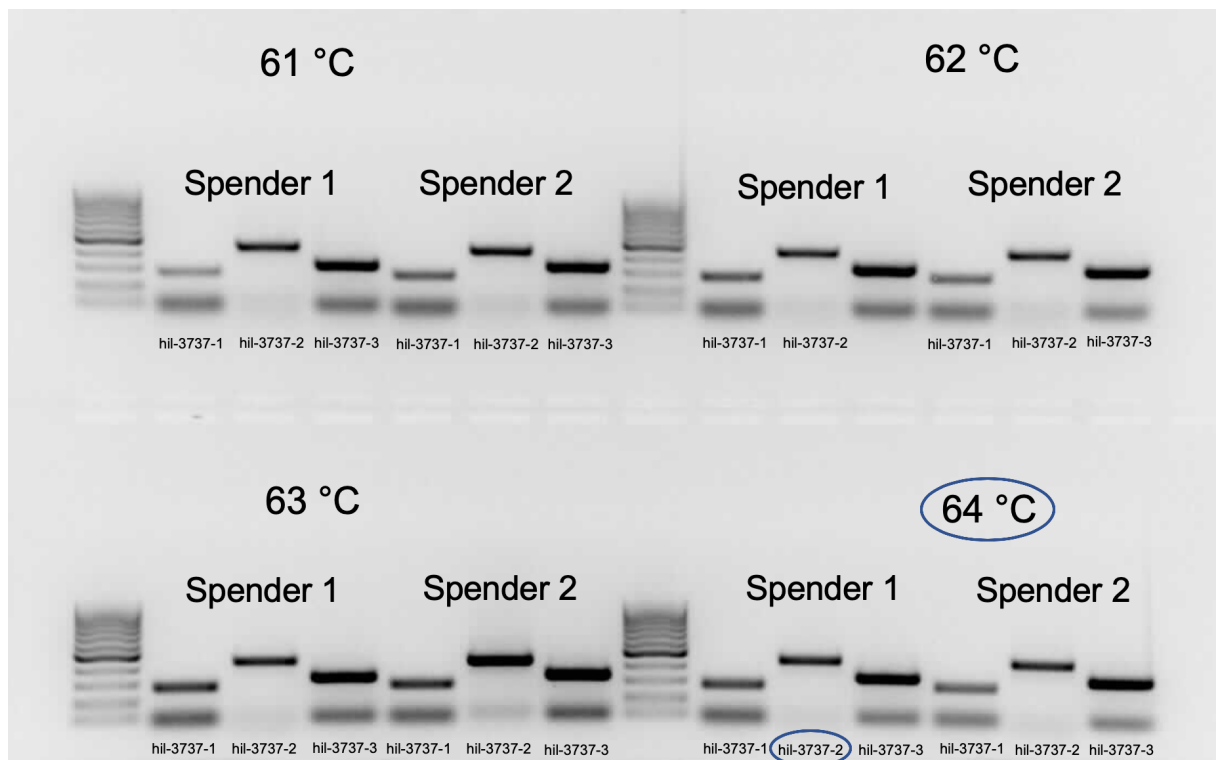


Abb. A4 Gelelektrophorese der PCR-Produkte, die durch PCR mit mehreren für die IL-1 β -Promoter-Region (SNP-3737) spezifischen Primer-Pärchen amplifiziert wurden. 20 μ l der PCR-Produkte, die durch PCR von aus PBMC gewonnener DNA mit verschiedenen für die IL-1 β -Promoter-Region-spezifischen Primer-Pärchen (SNP-3737) erhalten wurden (Annealing-Temperaturen: 61 $^{\circ}$ C - 64 $^{\circ}$ C), wurden mit 4 μ l Loading Dye vermischt, in die Agarose-Geltaschen pipettiert und mittels Elektrophorese aufgetrennt (80V, 80min). Die amplifizierenden Promoter-Regionen enthalten jeweils den funktional relevanten SNP-3737 (126).

Da die PCR mit den aus der Literatur bezogenen Primer-Pärchen Gordon-3737 (170) u. Wex-3737 (171) zu unspezifischen PCR-Produkten führte (s. Abb. A3), wurde die PCR mit selbst designten Primer-Pärchen (hil-3737-1, hil-3737-2 u. hil-3737-3) wiederholt. Das Ergebnis der Gelelektrophorese zeigt, dass die PCR mit Primer-Pärchen hil-3737-2 bei beiden Spendern zu spezifischen PCR-Produkten bei allen getesteten Annealing-Temperaturen führt (Abb. A4). Analog zu der ausgewählten Annealing-Temperatur für die PCR der vorher getesteten Primer wurden im Folgenden die PCR mit den Primer-Pärchen hil-3737-2 auch bei einer Annealing-Temperatur von 64 $^{\circ}$ C durchgeführt.

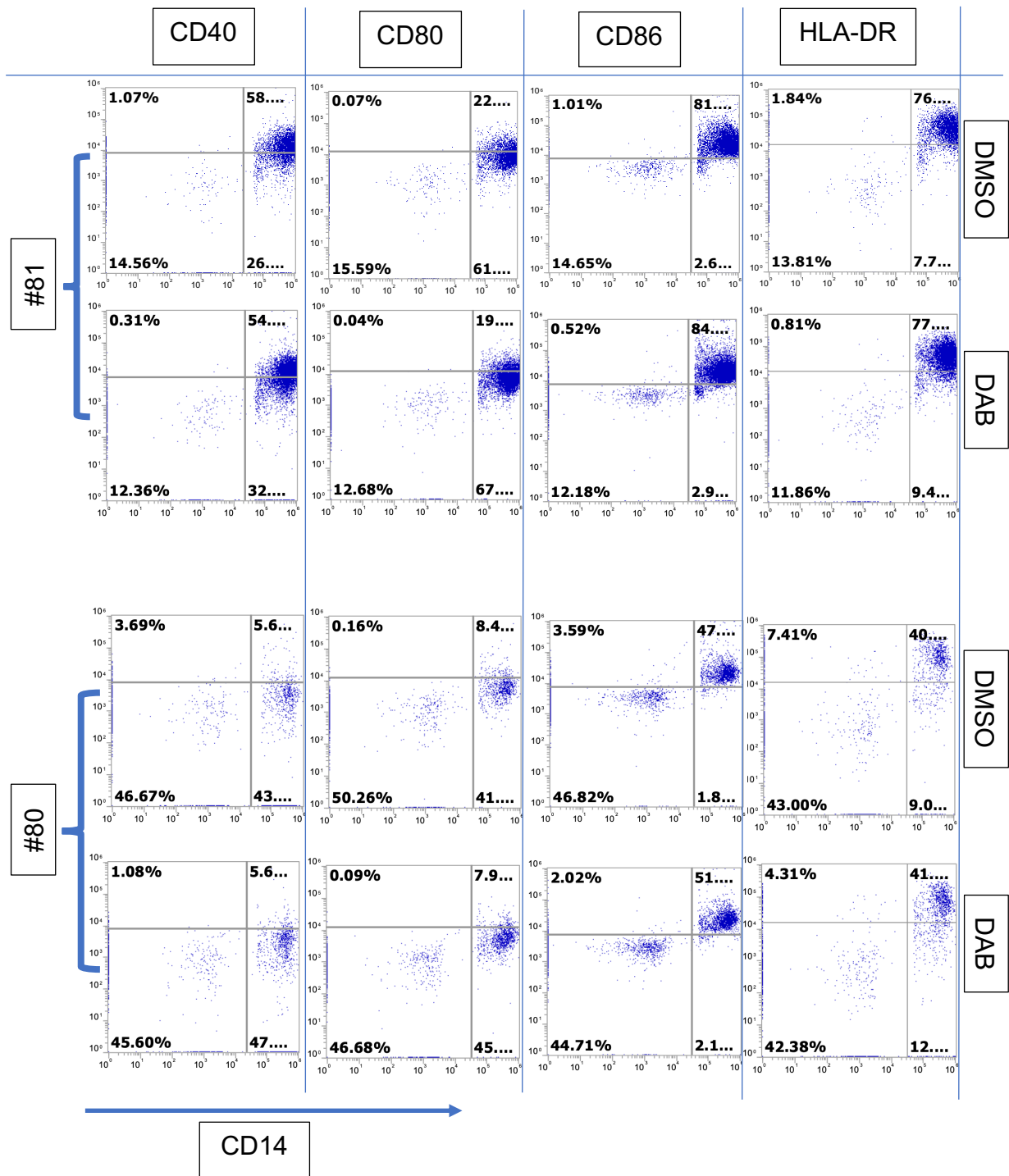


Abb. A5 DAB hat keinen Einfluss auf die Zahl der Monozyten, die die kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80, CD86 und HLA-DR exprimieren. 4×10^6 PBMC (500 μ l) unterschiedlicher Spender, u.a. von Spender 80 als repräsentativer Non-Responder und Spender 81 als repräsentativer Responder, wurden in ein steriles 5 ml Rundbodenröhrchen gegeben und mit DAB (0,25 μ M) inkubiert (37°C, 5% CO₂). DMSO (1%) diente als Lösungsmittelkontrolle, R848 (50 ng/ml) als Positivkontrolle. Nach 22 h wurde der Anteil der lebenden HLA-ABC⁺/CD14⁺-Monozyten, die CD40, CD80, CD86 und HLA-DR exprimieren, mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Graphiken zeigen die entsprechenden FACS-Plots. Die Daten sind repräsentativ für insgesamt acht getestete Spender.

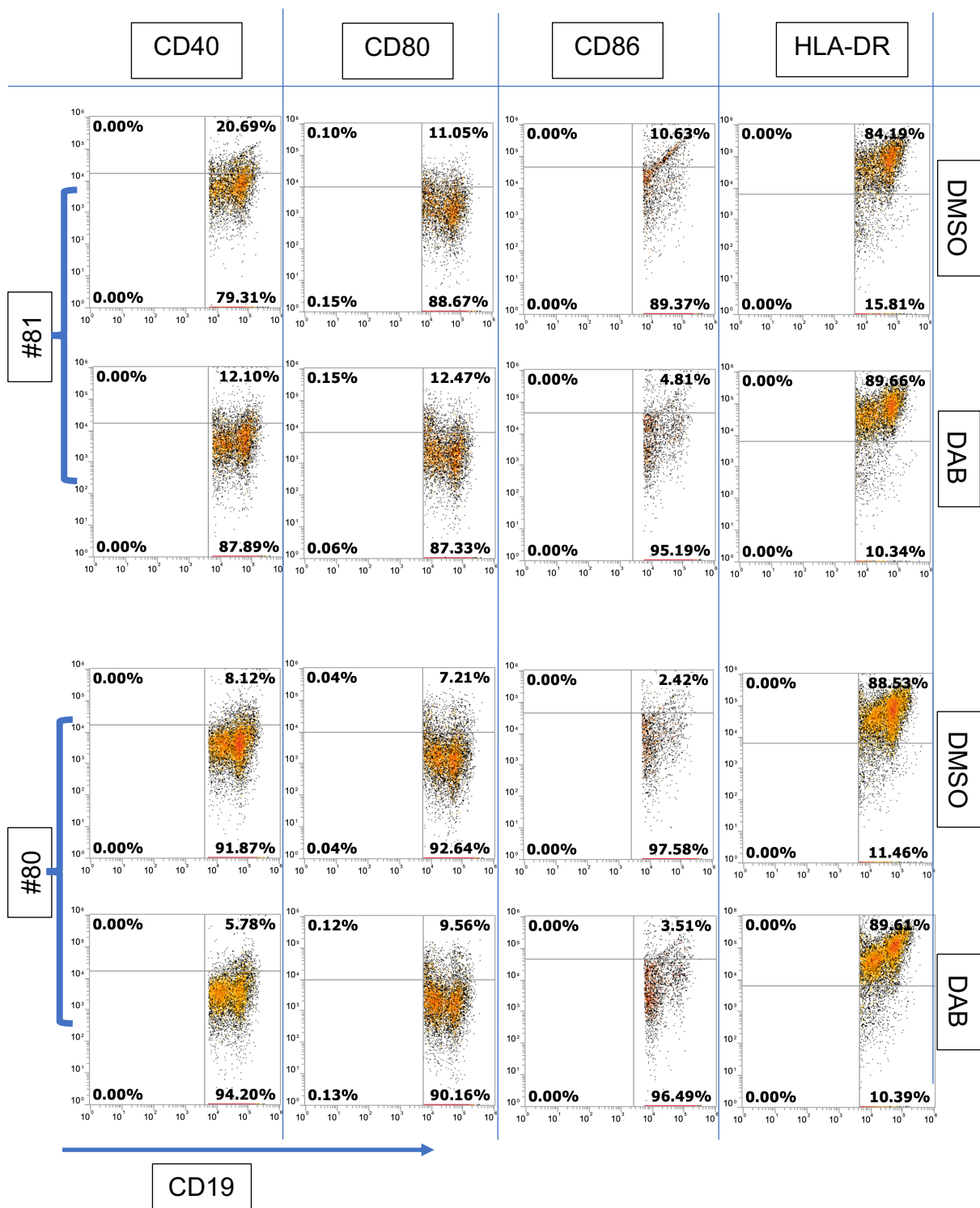


Abb. A6 DAB hat keinen Einfluss auf die Anzahl von B-Zellen, die die kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80, CD86 und HLA-DR exprimieren. 4×10^6 PBMC (500 μ l) unterschiedlicher Spender, u.a. von Spender 80 als repräsentativer Non-Responder und Spender 81 als repräsentativer Responder, wurden in ein steriles 5 ml Rundbodenröhrchen gegeben und mit DAB (0,25 μ M) inkubiert (37°C, 5% CO₂). DMSO (1%) diente als Lösungsmittelkontrolle, R848 (50 ng/ml) als Positivkontrolle. Nach 22 h wurde der Anteil der lebenden HLA-ABC⁺/CD19⁺-B-Zellen, die CD40, CD80, CD86 und HLA-DR exprimieren, mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Graphiken zeigen die entsprechenden FACS-Plots. Die Daten sind repräsentativ für insgesamt acht getestete Spender.

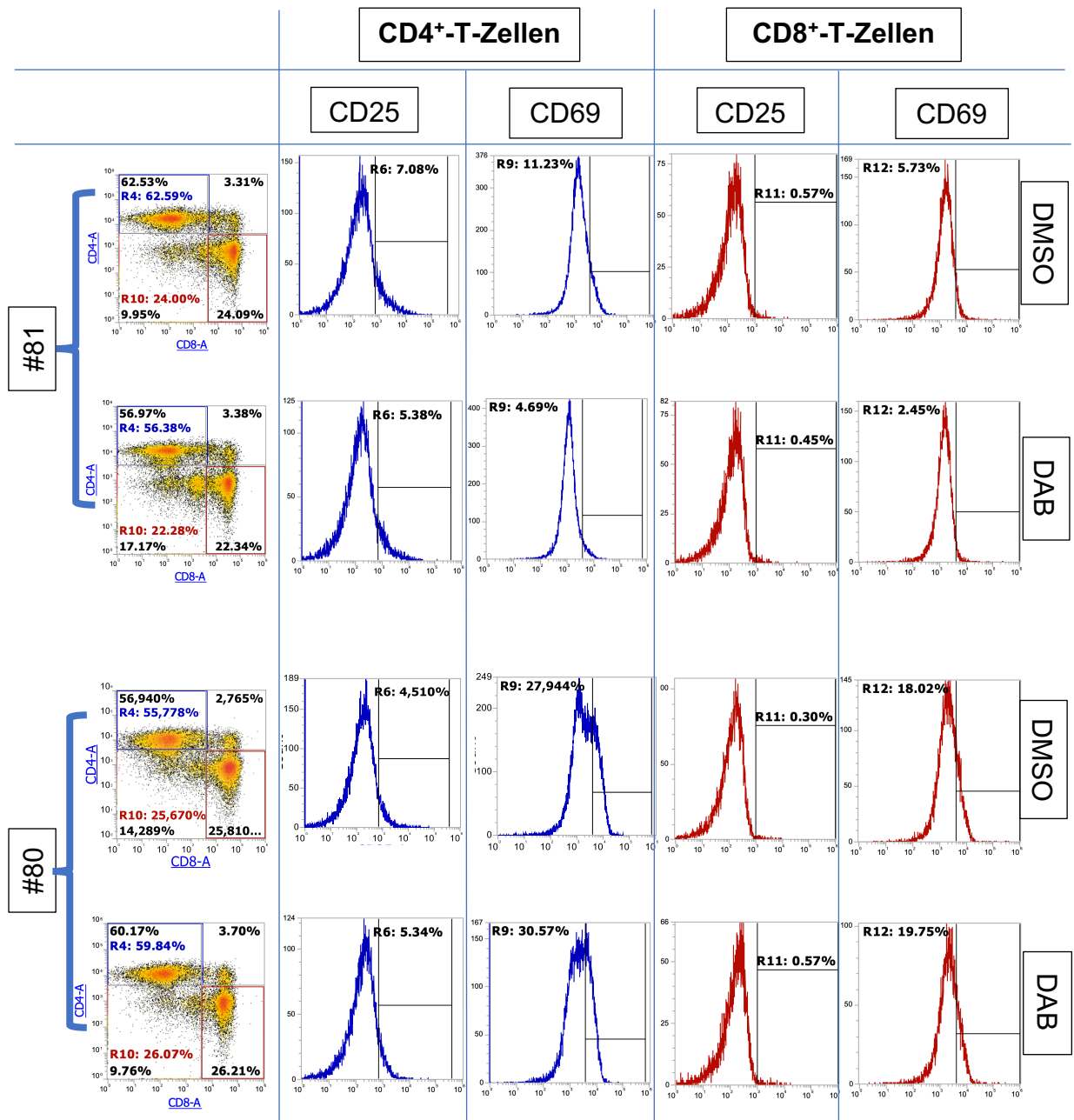


Abb. A7 DAB hat keinen Einfluss auf die Anzahl von T-Zellen, die CD25 und CD69 exprimieren. 4×10^6 PBMC (500 μ l) unterschiedlicher Spender, u.a. von Spender 80 als repräsentativer Non-Responder und Spender 81 als repräsentativer Responder, wurden in ein steriles 5 ml Rundbodenröhrchen gegeben und mit DAB (0,25 μ M) inkubiert (37°C, 5% CO₂). DMSO (1%) diente als Lösungsmittelkontrolle, R848 (50 ng/ml) als Positivkontrolle. Nach 22 h wurde der Anteil der lebenden CD3⁺/CD56⁻/CD4⁺- und CD3⁺/CD56⁻/CD8⁺-T-Zellen, die CD25 und CD69 exprimieren, mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Graphiken zeigen die entsprechenden FACS-Plots. Die Daten sind repräsentativ für insgesamt acht getestete Spender.

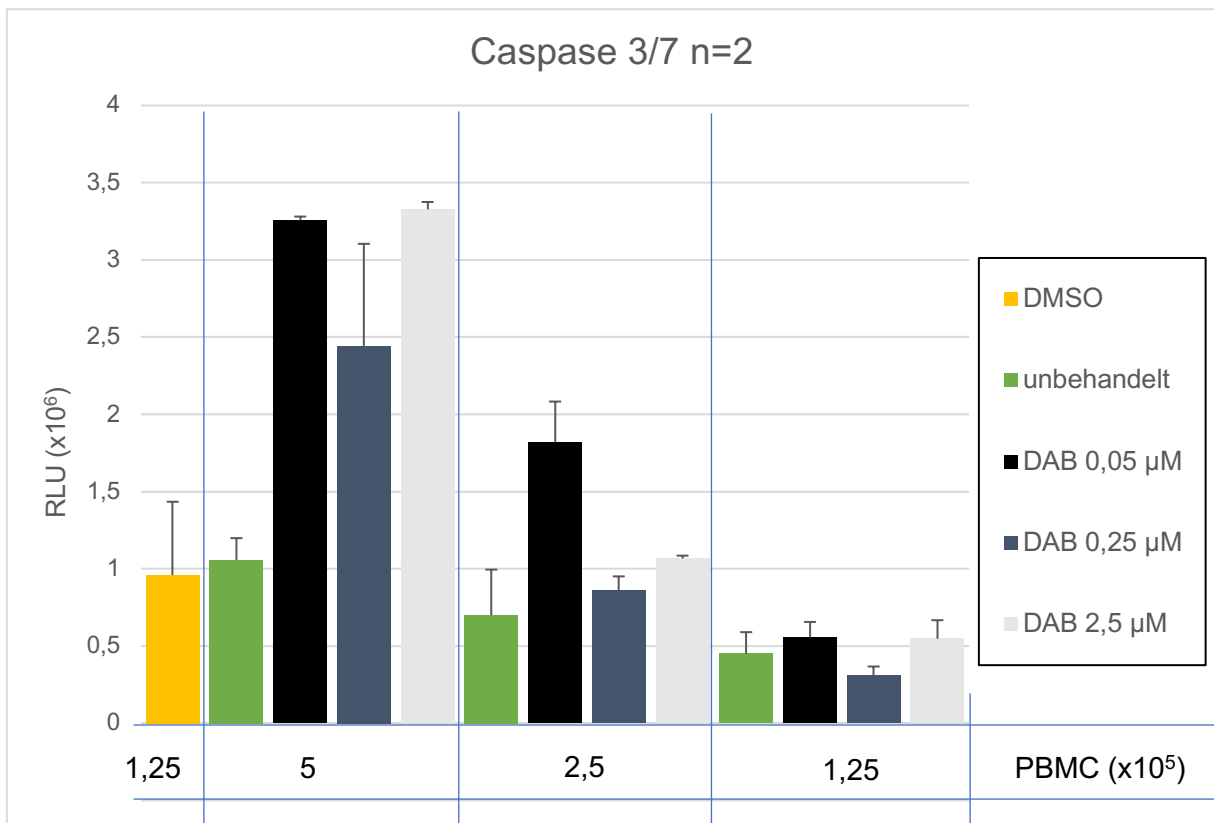


Abb. A8 DAB-Applikation führt bei dicht ausgesäten Monozyten zur Aktivierung der Caspase-3 und Caspase-7. PBMC (100 μl) von zwei Spendern wurden in Vertiefungen einer weißen 96-Well Platte ausgesät, nach 1,5 Stunden Inkubation (37°C, 5% CO_2) die non-adhärenente, non-monozytäre Fraktion entfernt und die verbliebenen Monozyten nach zwei Waschschrinen mit DAB in verschiedenen Konzentrationen (0,05 μM , 0,25 μM und 2,5 μM) behandelt. DMSO diente als Positivkontrolle. Nach 5 h Inkubation (37°C, 5% CO_2) wurde die Caspase-3/7-Aktivität durch den Caspase-Glo® 3/7-Assay bestimmt. Das Diagramm zeigt die Caspase-3/7-Aktivität in Relativen-Lumineszenz-Einheiten (RLU). Die Daten repräsentieren jeweils die Mittelwerte \pm Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten.

Um den Effekt von DAB auf die Apoptose von Monozyten zu untersuchen, wurden 10^6 PBMC ausgesät, in einer Verdünnungsreihe jeweils im Verhältnis 1:2 verdünnt (5×10^5 , $2,5 \times 10^5$ u. $1,25 \times 10^5$) und die monozytäre Fraktion durch Plastikadhärenz isoliert. Nach fünf-stündiger Inkubation der Zellen mit DAB wurde die Aktivität der Caspase-3 und Caspase-7 gemessen. Es zeigt sich, dass DAB vor allem bei einer hohen Zelldichte (5×10^5 ausgesäte PBMC) die Apoptose-assoziierten Proteine aktiviert. Bei niedrigeren Zelldichten nimmt der Effekt von DAB auf die Aktivierung der Caspase-3 und Caspase-7 ab ($2,5 \times 10^5$ und $1,25 \times 10^5$ ausgesäte PBMC), während die DAB-Konzentration keinen Einfluss auf ihre Aktivität zu haben scheint (Abb. A8).

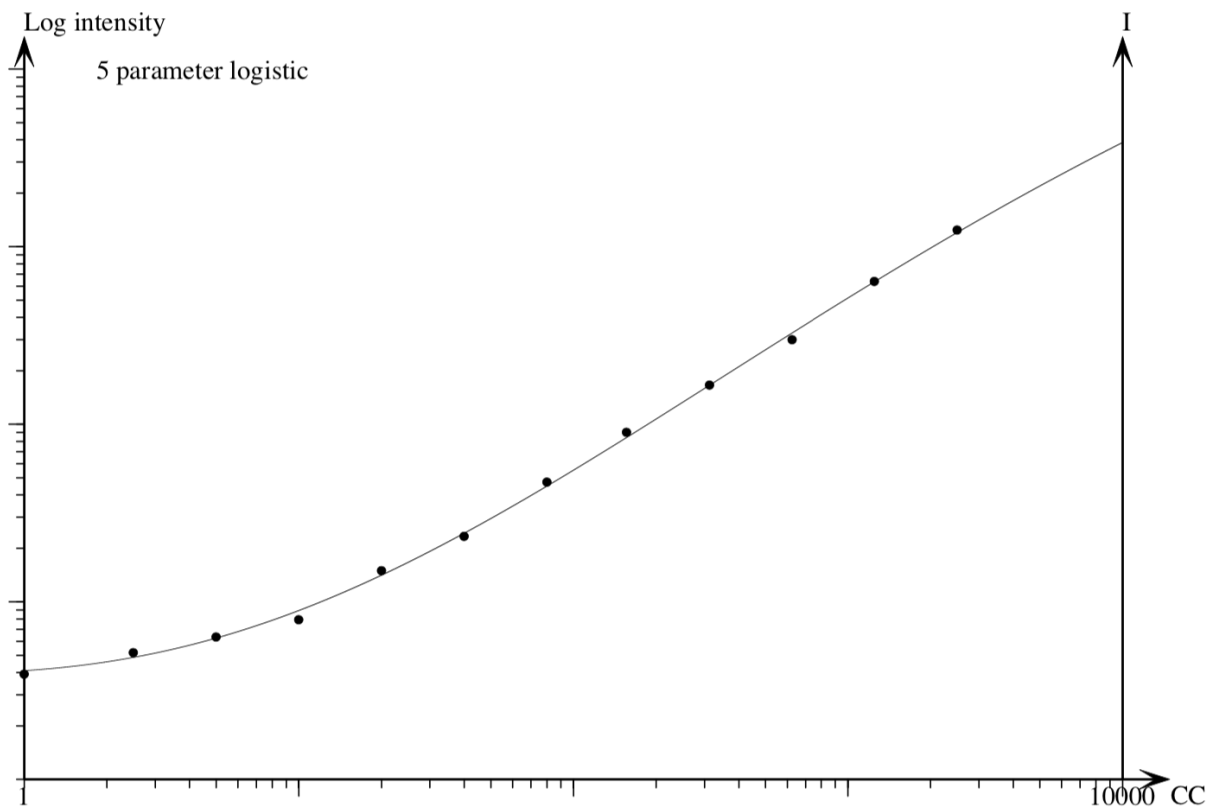


Abb. A9 Titrationskurve der Standardreihe des Cytometric Bead Array (CBA). Das Zytokin IL-1 β wurde ausgehend von der Ausgangskonzentration 2500 pg/ml in einer Verdünnungsreihe bis zur Konzentration von 2,5 pg/ml in Assay Diluent im Verhältnis 1:2 verdünnt. Für die letzte Standardprobe wurde nur Assaydiluent verwendet (Zytokinkonzentration: 0 pg/ml). Daraufhin wurden die Zytokinkonzentrationen durch einen CBA bestimmt.

