

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Matthias Goebeler

**Komparative Analyse des Einflusses zielgerichteter
Therapeutika auf den immunologischen Phänotyp
im BRAF-V600-mutierten Melanom**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Wenzel Till Jonas

aus Würzburg

Würzburg, Oktober 2022

Referent: Professor Dr. med. Bastian Schilling

Korreferentin: Professor Dr. med. Stefanie Hahner

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 13.07.2023

Der Promovend ist Arzt

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Melanom: Epidemiologie und Ätiopathogenese	1
1.2	Diagnostik und Therapie des Melanoms	3
1.3	Der MAPK-Signalweg und zielgerichtete Therapie	5
1.4	Immunogenität des Melanoms und Immuntherapie	9
1.5	Aspekte des immunogenen Zelltodes	11
1.6	Fragestellung.....	13
2	Material und Methoden.....	14
2.1	Material.....	14
2.1.1	Geräte	14
2.1.2	Antikörper.....	15
2.1.3	Chemikalien	16
2.1.4	Verbrauchsmaterialien	18
2.1.5	Komplettsysteme.....	19
2.1.6	Software	19
2.1.7	Melanomzelllinien	19
2.1.8	Plasmide	19
2.1.9	Puffer und Lösungen.....	20
2.2	Methoden	24
2.2.1	Zellkultur.....	24
2.2.2	MTS-Assay.....	24
2.2.3	Durchflusszytometrie	27
2.2.3.1	Zellzyklusfärbung.....	27
2.2.3.2	MHC-I- und PD-L1-Färbung	28

2.2.3.3	Quinacrine-Färbung	29
2.2.3.4	Calreticulin-Färbung.....	29
2.2.3.5	ATF-Messung.....	30
2.2.4	Immunoblot	30
2.2.4.1	Proteinextraktion	30
2.2.4.2	Proteinbestimmung.....	31
2.2.4.3	Blot	31
2.2.5	Transduktion.....	33
2.2.6	Fluoreszenzmikroskopie	36
2.3	Statistische Analysen	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Inhibitortitration	37
3.1.1	Konzentrationsabhängiger Effekt der Inhibitoren auf die Viabilität des Melanoms im MTS-Assay	37
3.1.2	Zellzyklusarrest durch Inhibitorbehandlung.....	39
3.1.3	Einstellung in ihrer Wirkung vergleichbarer Inhibitorkonzentrationen ...	40
3.2	Abnahme der Phosphorylierung von ERK unter Inhibitorbehandlung.....	43
3.3	<i>In Vitro</i> -Aspekte der Immunogenität des Melanoms	44
3.3.1	Unterschiede in basaler MHC-I-Expression zwischen den Zelllinien.....	44
3.3.2	Steigerung der MHC-I-Expression unter IFN- γ - und Inhibitorbehandlung	45
3.3.3	Erhöhung der PD-L1-Expression unter IFN- γ und Verminderung unter Inhibitorbehandlung.....	48
3.3.4	Einfluss der Inhibitoren auf den zellulären ATP-Gehalt	50
3.3.5	Keine Ekto-Calreticulin-Expression unter Inhibitorbehandlung.....	52

3.3.5.1	Darstellung von Ekto-Calreticulin mithilfe des Calreticulin-Fluoreszenz-Fusionsproteins	52
3.3.5.2	Keine Ekto-Calreticulin-Expression unter Inhibitorbehandlung	54
3.3.5.3	Kein ER-Stress unter Inhibitorbehandlung.....	55
4	Diskussion.....	56
4.1	Einfluss der MHC-I-Expression auf die Immunogenität des Melanoms	57
4.2	Einfluss der PD-L1-Expression auf die Immunogenität des Melanoms	58
4.3	Immunogener Zelltod und Langzeitansprechen unter kombinierter MAPK-Inhibitortherapie.....	60
4.4	Wirkunterschiede zwischen den Inhibitorkombinationen	61
4.5	Auswirkungen auf potentielle Kombination mit Immuntherapie	63
5	Zusammenfassung der Ergebnisse: Kombinierte MAPK-Inhibitortherapie hat einen begrenzten Effekt auf die theoretische Immunogenität des Melanoms	66
6	Literaturverzeichnis.....	68

Appendix

I	Abbildungsverzeichnis
II	Tabellenverzeichnis
III	Abkürzungsverzeichnis
IV	Danksagung
V	Lebenslauf

1 Einleitung

1.1 Das Melanom: Epidemiologie und Ätiopathogenese

Das Melanom zählt zu den gefährlichsten Formen des Hautkrebses [1]. 2019 kam es zu etwa 3000 Todesfällen in Deutschland [1]. Die Anzahl an Neuerkrankungen in Deutschland stieg in den letzten Jahren an und betrug im Jahr 2018 etwa 21.000, was einem Anteil von 4,6 % an allen Krebsneuerkrankungen entspricht [1]. Männer und Frauen sind etwa gleich häufig betroffen [1]. Das Melanom kann prinzipiell in jedem Alter auftreten, jedoch steigt die Inzidenz mit dem Alter [1]. Frauen erkranken etwas früher als Männer, so liegt das mittlere Erkrankungsalter der Frauen bei 62 Jahren, das der Männer bei 68 Jahren [1].

Das Melanom kann klinisch basierend auf dem Ursprungsgewebe in Subtypen eingeteilt werden: das mit über 90 % am häufigsten vorkommende kutane Melanom sowie zwei seltenere Entitäten, das Schleimhaut- und das Uveamelanom [2, 3]. Ferner existiert die Variante des Melanoms mit unbekanntem Primarius [3]. Die vorliegende Arbeit fokussiert sich auf das kutane Melanom. Dieses kann klinisch-histologisch in weitere Subtypen untergliedert werden: das superfiziell spreitende Melanom, das Lentigo-maligna-Melanom, das noduläre Melanom und das akral-lentiginöse Melanom, wobei die genannte Reihenfolge der Häufigkeitsverteilung entspricht [3, 4]. Das noduläre und das akral-lentiginöse Melanom sind gefährlicher als die beiden anderen Entitäten, da sie sich vermehrt in fortgeschritteneren Stadien bei Diagnose manifestieren [3]. Die Lokalisationen variieren etwas zwischen den Geschlechtern, bei Männern tritt das Melanom häufig am Rücken, bei Frauen bevorzugt am Bein auf [5, 6].

Die Ursprungszelle des Melanoms ist der Melanozyt [7]. Er entstammt der Neuralleiste und ist in der unteren Epidermis lokalisiert [7, 8]. Seine Funktion ist die Produktion von Melanin, welches für die Hautpigmentierung verantwortlich ist [9]. Ein Melanozyt und eine variable Anzahl von bis zu 50 Keratinozyten bilden die „Epidermale Melanin-Einheit“ [10-12]. Der Melanozyt kommuniziert über dendritische Fortsätze mit den Kera-

tinozyten und beliefert sie mit Melanosomen [10]. Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass auch Langerhans-Zellen in diesem Konzept berücksichtigt werden müssen, sodass man von einer Keratinozyten-Langerhans-Melanozyten (KLM) Einheit spricht [10]. Diese Einheit schützt den Körper vor schädlichen Umwelteinflüssen: Der Keratinozyt bildet eine mechanische Barriere, die Langerhans-Zelle ein Immunschild und der Melanozyt eine biochemische Barriere zum Schutz gegen UV-Strahlung durch die Produktion von Melanin [10, 13, 14].

Hauptrisikofaktor für die Entstehung des Melanoms ist intensive intermittierende UV-Exposition, z.B. durch schwere Sonnenbrände [15-17]. Das Alter zum Zeitpunkt der Lichtexposition spielt lediglich eine untergeordnete Rolle, jedoch wird die Exposition in der Kindheit von einigen Autoren als besonders schädlich angesehen [16, 18, 19]. Chronische Lichtexposition hingegen ist eher ein Risikofaktor für die Entwicklung von epithelialen Hauttumoren [20]. In diesem Kontext konnte gezeigt werden, dass starke berufliche Sonnenexposition das Melanomrisiko gar senkt [16]. UV-Strahlung wird anhand ihrer Wellenlänge und Energie in UVA-, UVB- und UVC-Strahlung unterteilt, wobei UVA die geringste und UVC die höchste Energie aufweist [11, 17]. Die Ozonschicht absorbiert die UVC-Strahlung vollständig, sowie einen Teil der UVB-Strahlung [11, 21]. Insbesondere UVB-Bestrahlung führt zu DNA-Defekten, wie Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren und 6,4-Pyrimidon-Photoprodukten, deren fehlerhafte Reparatur Mutationen begünstigt [5, 17, 21-23]. UVA-Strahlung verursacht oxidative DNA-Schäden durch Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, die ebenfalls mutagen sein können [5, 21]. Im Regelfall werden diese Defekte durch Reparaturmechanismen – wie z.B. Nukleotidexzisionsreparatur – behoben [23, 24]. Die Fähigkeit zur Reparatur von DNA-Schäden nimmt im Alter ab, weshalb die Gesamtheit der DNA-Mutationen im Alter wiederum zunimmt [25]. Ferner geht mit dem Alter eine leichte chronische Inflammation einher, was auch als „*Inflammaging*“ bezeichnet wird und die Entstehung von Krebs begünstigt [26]. Die Inflammation ist gekennzeichnet durch proinflammatorische Zytokine und Marker, wie Interleukine (IL-1, IL-6), Tumor-Nekrosefaktor (TNF α) und CRP [26]. Das erklärt, weshalb das Melanom, wie oben erwähnt, eher den älteren Menschen betrifft.

Hautpigmentierung schützt vor DNA-Schäden durch UV-Exposition und beugt somit der Krebsentstehung vor [27, 28]. Demgegenüber ist das Melanomrisiko insbesondere bei rothaarigen und hellhäutigen Menschen, die bei wiederholter Sonnenexposition nicht bräunen, erhöht [19, 29]. Etwa 7 bis 15 % der Melanome weisen eine positive Familienanamnese auf, jedoch können die meisten dieser Fälle nicht als erbliches Melanom angesehen werden, sondern sind auf gemeinsame Sonnenexposition der Familienmitglieder zurückzuführen [30]. Knapp die Hälfte der familiären Melanome sind mit einer Keimbahnmutation von *CDKN2A* (Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2A) oder *CDK4* (Cyclin-dependent Kinase 4) assoziiert [30]. Familiäre Melanome können ferner im Rahmen von Erbkrankheiten entstehen [30]. Ein Beispiel ist die Erkrankung Xeroderma pigmentosum, die durch Defekte in der Nukleotidexzisionsreparatur charakterisiert ist [30, 31]. Neben der natürlichen UV-Exposition stellt artifizielle UV-Exposition, z.B. durch Solarien, einen eigenständigen Risikofaktor für die Melanomentstehung dar [11]. Das Melanomrisiko wird durch den Besuch von Solarien vor dem 35. Lebensjahr um 75 % erhöht [11].

Melanome können entweder *de novo* oder auf dem Boden eines melanozytären Nävus entstehen [13]. Die Mehrzahl der Melanome entsteht *de novo*, nur etwa 25 % entstehen aus Nävi [32]. Menschen mit vielen melanozytären Nävi haben ein erhöhtes Melanomrisiko [33]. Es sind zahlreiche Mutationen bekannt, die zur Entwicklung eines Melanoms führen können. Eine der bekanntesten Mutationen ist die BRAF-V600E-Mutation, auf die im Folgenden genauer eingegangen wird. Weitere Mutationen oder Genverluste betreffen beispielsweise die Gene *NRAS*, *NF1*, *RAC1*, *TERT*, *TP53*, *PTEN* oder *CDKN2A* [13, 15, 34]. Bereits gesunde Haut enthält häufig Mutationen, die auch in Tumoren anzutreffen sind [35]. In Kap. 1.4 sind die verschiedenen Stadien der Tumorentwicklung genauer dargestellt.

1.2 Diagnostik und Therapie des Melanoms

Diagnostik und Therapie des Melanoms in Deutschland erfolgen auf Grundlage der deutschen S3-Leitlinie „Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms“ [36]. Die meis-

ten Melanome können klinisch durch eine sorgfältige Inspektion des Integuments diagnostiziert werden [36, 37]. Hierbei kann die ABCDE-Regel hinzugezogen werden: A steht für Asymmetrie, B für unregelmäßige Begrenzung, C für Farbunregelmäßigkeit, D für Durchmesser und E für Evolution bzw. Erhabenheit [38-40]. Als diagnostische Hilfsmittel eignen sich in erster Linie ein Dermatoskop sowie andere neue technische Hilfsmittel [36]. Zur Diagnosesicherung wird eine Exzisionsbiopsie durchgeführt [41]. Aufgrund einer besseren Prognose des Melanoms in frühen Stadien ist eine rechtzeitige Diagnose und Resektion essentiell [42-46]. Hierzu wurde in Deutschland das Hautkrebscreening (HKS) etabliert [43, 44]. Bei gesicherter Diagnose wird grundsätzlich eine R0-Resektion angestrebt und es erfolgt ggf. eine Nachresektion mit Sicherheitsabstand, welcher in den Tumorstadien pT1 und pT2 1 cm, in den Stadien pT3 und pT4 2 cm beträgt [36]. In Abhängigkeit des Primärtumors folgen im Rahmen des *Stagings* eine angemessene Ausbreitungsdiagnostik [36, 46]. Dies ermöglicht eine Klassifikation des Melanoms.

Das Melanom wird gemäß der TMN-Klassifikation erfasst und nach UICC in Stadien eingeteilt. Der Primärtumor wird gemäß der Klassifikation von 2016 anhand der Tumordicke nach Breslow und dem Vorhandensein von Ulzerationen eingestuft, wobei die Tumordicke das Hauptkriterium darstellt [36, 45]. Beim Nodalstatus werden die Anzahl der befallenen Lymphknoten sowie das Vorhandensein von Intransit-, Satelliten- oder Mikrosatelliten-Metastasen erfasst [36]. Bei Fernmetastasen sind die Lokalisation in einem bestimmten Organsystem und der LDH-Wert von Bedeutung [36].

Während in frühen Stadien in kurativer Intention immer eine R0-Resektion fokussiert wird, ist die zentrale Säule der Therapie des fortgeschrittenen Melanoms die medikamentöse Systemtherapie [47-49]. Es stehen zwei Therapeutika-Gruppen zur Verfügung: zielgerichtete Therapie und Immuntherapie [36]. Diese neuen Medikamente stellen einen Durchbruch in der Melanomtherapie dar, da zuvor keine überzeugende Therapie des fortgeschrittenen Melanoms etabliert war [47, 50, 51]. Die genauen Mechanismen der zielgerichteten Therapie werden in den folgenden Kapiteln näher beleuchtet.

1.3 Der MAPK-Signalweg und zielgerichtete Therapie

Vemurafenib wurde 2011 von der FDA (U.S. Food and Drug Administration) als erster selektiver Inhibitor für mutiertes BRAF für die Therapie des metastasierten Melanoms zugelassen und revolutionierte die bis dahin sehr eingeschränkten Therapieoptionen des fortgeschrittenen Melanoms [47, 50]. Die Zulassung in der Europäischen Union erfolgte wenig später im Jahr 2012 durch die EMA (European Medicines Agency) [52]. In der Zulassungsstudie wurden 675 Patienten mit BRAF-V600E-mutiertem und zuvor unbehandeltem metastasierten Melanom in zwei Gruppen randomisiert: Die Kontrollgruppe wurde mit Decarbazin und die Experimentalgruppe mit Vemurafenib behandelt [47]. Die Studienpopulation, die Vemurafenib erhielt, zeigte nach sechs Monaten gegenüber der Kontrollgruppe eine um 63 % reduzierte Mortalität, was einen beachtlichen Erfolg darstellte [47].

Mit der Zulassung des MEK-Inhibitors Cobimetinib wurde eine Kombinationstherapie aus BRAF- und MEK-Inhibitor zur Behandlung des fortgeschrittenen Melanoms etabliert [53]. Unter der kombinierten MAPK-Inhibitortherapie konnte das progressionsfreie Überleben in der coBRIM-Studie, welche die Kombination aus Vemurafenib und Cobimetinib gegenüber einer Vemurafenib-Monotherapie untersuchte, deutlich von 6,2 auf 9,9 Monate verbessert werden [53]. Daher werden heute routinemäßig Kombinationsbehandlungen eingesetzt [36]. Klassische Kombinationen sind: Vemurafenib und Cobimetinib, Dabrafenib und Trametinib sowie Encorafenib und Binimetinib [54]. Die Wirkungsmechanismen werden im Folgenden erläutert.

BRAF ist eine Kinase der RAF-Familie und Teil des MAPK-Signalwegs, der wichtig für Zellwachstum, Proliferation, Überleben, Angiogenese und Invasion und somit für die Metastasierung ist [50, 55, 56]. Der MAPK-Signalweg besteht im Wesentlichen aus dem kleinen G-Protein RAS und drei MAP-Kinasen, RAF, MEK und ERK, die in phosphoryliertem Zustand aktiviert sind [50]. Die Signalkaskade beginnt mit der Bindung eines Liganden, z.B. einem Wachstumsfaktor, an eine Rezeptortyrosinkinase in der Zellmembran, was zur Bildung eines Dimers führt [50, 55, 56]. Infolgedessen wird RAS in seinen GTP-gebundenen Zustand überführt und aktiviert [55]. Dadurch wird RAF vom Zytosol zur Zellmembran transloziert und wird ebenfalls aktiviert [55]. RAF agiert nun als eine MAP-

Kinase und aktiviert MEK, das wiederum ERK aktiviert [56, 57]. ERK agiert nun zunächst im Zytoplasma und phosphoryliert zytoskelettale Proteine, die u.a. an Zelladhäsion und Zellmigration beteiligt sind [58]. ERK transloziert ebenfalls in den Zellkern und aktiviert dort durch Phosphorylierung diverser Transkriptionsfaktoren verschiedene Effektorgene, die zu Zellzyklus-Progression und somit zu oben beschriebenen Effekten, wie Zellproliferation und Überleben führen [58].

Im Melanom sind häufig Komponenten des MAPK-Signalweges mutiert [59-61]. Die BRAF-V600E-Mutation hat im Melanom beispielsweise eine Frequenz zwischen 35 und 59 % [59-61]. In dieser Mutation ist an Position 600 Valin durch Glutaminsäure ersetzt [60]. Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien tragen diese Mutation. Tritt eine aktivierende Mutation, wie z.B. die BRAF-V600E-Mutation auf, kommt es zur Überaktivierung von stromabwärts gelegenen Zielstrukturen [58]. Hier setzen die MAPK-Inhibitoren an: Sie blockieren die stromabwärts gelegene Aktivität, die durch die BRAF-V600E-Mutation konstitutiv hervorgerufen wird [62]. Die BRAF-Mutation ist bereits häufig in melanozytären Nävi anzutreffen und somit eine sehr frühe Mutation in der Melanomentwicklung [63].

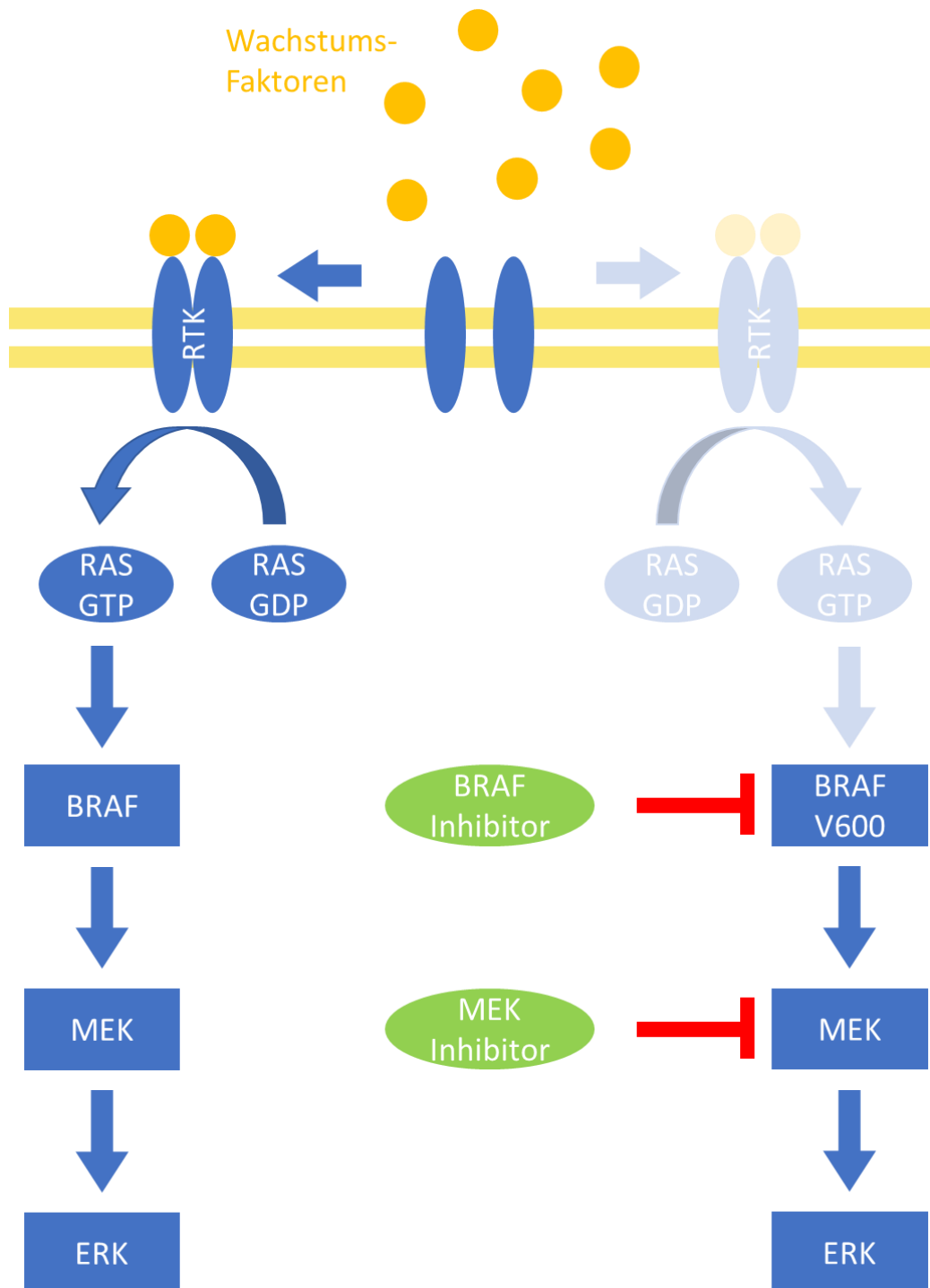


Abbildung 1: MAPK-Signalweg

Links: Physiologischer Zustand, durch Bindung eines Liganden (z.B. Wachstumsfaktor) wird intrazellulär eine Signalkaskade ausgelöst.

Rechts: Durch Mutationen, wie z.B. die BRAF-V600-Mutation, ist der Signalweg unabhängig von extrazellulären Wachstumsreizen konstitutiv aktiviert. Er kann jedoch durch BRAF- oder MEK-Inhibitoren wieder gehemmt werden.

Eine häufige Nebenwirkung von BRAF-Inhibitoren ist die Bildung von Plattenepithelkarzinomen und Keratoakanthomen, die unter Vemurafenib-Behandlung in der Zulassungsstudie in 18 % auftraten [47]. Diese werden u.a. auf eine paradoxe Aktivierung von ERK, erhöhte CRAF-Aktivität in BRAF-Wildtyp-Keratinocyten und verminderte Apoptose von UV-geschädigten Keratinocyten zurückgeführt [64]. Diese unerwünschte Wirkung tritt unter Kombination mit einem MEK-Inhibitor seltener auf [53]. In der coBRIM-Studie wurde eine deutliche Abnahme der Inzidenz von Plattenepithelkarzinomen (2 % vs. 11 %) unter Kombinationstherapie gezeigt [53]. Jedoch traten unter der Kombinationstherapie andere Nebenwirkungen häufiger auf, sodass die Abbruchrate aufgrund schwerer Nebenwirkungen in beiden Studienpopulationen vergleichbar war (12 % in der Kontrollgruppe gegenüber 13 % in der Kombinationsgruppe) [53]. Ähnliche Ergebnisse lieferten die Trametinib- und Encorafenib-Zulassungsstudien [65, 66].

MAPK-Inhibitortherapie führt in der Regel zu keiner dauerhaften Tumorkontrolle im Melanom [53]. Ursächlich sind diverse Resistenzmechanismen wie Reaktivierung des MAPK-Signalweges, Aktivierung weiterer Signalwege, Tumormikromilieu, Autophagie und ER-Stress (endoplasmatischer Retikulum-Stress), miRNA-vermittelte Resistenz (MikroRNA) sowie die Selektion von resistenten Subpopulationen [67-72].

1.4 Immunogenität des Melanoms und Immuntherapie

Es wird angenommen, dass das Melanom aufgrund seiner hohen UV-bedingten Mutationsrate eine hohe Immunogenität aufweist [73]. Bereits in den 1990er Jahren wurden einige Melanom-assoziierte Antigene entdeckt, die von T-Lymphozyten erkannt werden [74]. Diese können in drei Hauptgruppen klassifiziert werden: Tumor-assoziierte-Testis-spezifische Antigene, melanozytäre Differenzierungs-Antigene sowie mutierte und überexprimierte Antigene [74]. Es existierte jedoch lange Zeit keine effektive Immuntherapie zur Behandlung des Melanoms. Der Durchbruch gelang 2011 mit der Zulassung von Ipilimumab, einem CTLA-4-Antikörper [51]. In der Zulassungsstudie verbesserte die Kombinationstherapie aus Ipilimumab und Dacarbazin das Gesamtüberleben von 9,1 auf 11,2 Monate gegenüber der Dacarbazin-Monotherapie [51].

Mit Nivolumab folgte ein weiterer Immuncheckpoint-Inhibitor, der gegen PD-1 gerichtet ist [48]. Die Zulassungsstudie von Nivolumab verlief positiv [48]. So wurde das mediane Gesamtüberleben für Nivolumab in der Phase-III-Studie nicht erreicht [48]. Nach einem Jahr betrug die Überlebensrate in der Nivolumab-Gruppe 72,9 % und in der Dacarbazin-Gruppe 42,1 % [48]. PD-1 ist ein Transmembranprotein der CD28-Familie, das auf B- und T-Lymphozyten sowie auf natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und myeloiden Zellen exprimiert wird [75]. Der PD-1-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der T-Zell-Toleranz [76]. Durch Bindung seines Liganden PD-L1 kann die Zytokinproduktion und die T-Zellproliferation inhibiert werden [75]. Diese Bremse des Immunsystems wird durch den Inhibitor entfernt [75].

Ein intaktes Immunsystem ist imstande, entartete Zellen zu eliminieren [73, 77, 78]. Jedoch ist es klinisch apparenten Tumoren gelungen, sich dem Immunsystem erfolgreich zu entziehen [73, 77, 78]. Die Immunantwort gegenüber dem Melanom kann in drei Phasen eingeteilt werden: Elimination, Immungleichgewicht und Immunevasion [73, 77, 78]. In der frühen Onkogenese kommt es zu Treibermutationen, wie beispielsweise BRAF-V600E, und zahlreichen Nebenmutationen, wodurch Neoantigene gebildet werden, die eine Erkennung durch das Immunsystem ermöglichen [73]. Der Tumor kann so in bestimmten Fällen eliminiert werden, bevor er klinisch apparent wird [73, 78]. Manchen Tumorzellen gelingt es, sich der Elimination durch das Immunsystem zu entziehen,

sodass sie in die nächste Phase, das Immungleichgewicht, eintreten. [73, 78]. Hier besteht zwischen dem Tumor und dem Immunsystem ein dynamisches Gleichgewicht [73]. Dieses dämmt das Tumorwachstum zwar ein, tötet den Tumor aber nicht vollständig ab [73]. In dieser Phase befindet sich der Tumor sozusagen in einem Schlaf, in dem er teils lebenslang persistieren kann. [78]. Sobald das Melanom klinisch sichtbar wird, hat es mit der Immunevasion die letzte Phase erreicht und sich der Kontrolle des Immunsystems entzogen [73, 78]. Der Tumor nutzt dabei Mechanismen, die zu Immuntoleranz führen oder die die toxischen Effekte desselben kompensieren [73, 78]. Auch in diesem Stadium ist die Prognose des Melanoms vom lokalen Immunstatus abhängig [73]. So ist eine höhere Rate an Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) mit einem verbesserten Überleben assoziiert [73].

Ein Beispiel für die Immunevasion des Melanoms ist die Herabregulation der MHC-I-Expression (*Major Histocompatibility Complex Klasse I*) [78, 79]. Die Präsentation von Antigenen im Kontext von MHC-Molekülen ist essentiell für die Erkennung durch den T-Zell-Rezeptor [80-82]. Es existieren zwei verschiedene humane MHC-Molekülklassen: MHC I und MHC II [80-83]. Diese präsentieren prozessierte Antigene, die von T-Zell-Rezeptoren erkannt werden [80, 81, 83]. Auf MHC I werden Antigene von zelleigenen Proteinen präsentiert, wohingegen auf MHC II auch exogene Peptide präsentiert werden [80, 83]. Antigene auf MHC I werden von CD8+ zytotoxischen T-Zellen erkannt, während solche auf MHC II von CD4+ T-Helferzellen erkannt werden [80, 83, 84].

MHC I wird von allen kernhaltigen Zellen, einschließlich Tumorzellen, exprimiert [85, 86]. Der MHC-I-Komplex wird im endoplasmatischen Retikulum (ER) zusammgebaut und besteht aus einer schweren Kette, der leichten Kette β_2 -Mikroglobulin und dem zu präsentierenden Peptid [86]. Die schwere Kette wird durch die Gene HLA-A, -B und -C kodiert [86]. Die MHC-I-Expression ist in vielen Tumoren herunterreguliert, wodurch sie sich einer effektiven T-Zell-Antwort entziehen [82, 87]. Es können dabei die drei folgenden Konstellationen auftreten: Verlust der MHC-I-Expression, Herunterregulation der MHC-I-Expression und Verlust eines Haplotyps [88, 89]. Zwar ist der Verlust der MHC-I-Expression durch Tumorzellen ein Stimulus für NK-Zellen, diese zu eliminieren, jedoch können sich viele Tumoren hiervon entziehen [85].

MHC II wird klassischerweise von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) exprimiert, jedoch besitzen auch einige Tumoren, darunter das Melanom, diese Fähigkeit [85, 86]. Tumorantigene können auf MHC II sowohl von der Tumorzelle selbst als auch von APCs präsentiert werden [83].

1.5 Aspekte des immunogenen Zelltodes

Im Organismus laufen permanent Regeneration und Zelltod ab, im Regelfall ohne begleitende Aktivierung des Immunsystems [90-93]. Bei der Beseitigung von Pathogenen oder Zellen, die mit Pathogenen befallen sind, ist hingegen eine Immunantwort erwünscht [94]. Wie in Kap. 1.4 erwähnt, kann das Immunsystem beispielsweise Tumorzellen beseitigen.

Es existieren diverse Formen des Zelltodes, z.B. Apoptose oder Nekrose [95]. In Tumoren ist die Apoptose herunterreguliert und somit die Gewebemöostase gestört [96]. Ziel von medikamentösen Tumortherapien ist die Beseitigung der malignen Zellen und damit die Wiederherstellung des Zelltodes [97, 98]. Zelltod in Tumorzellen kann immunogen oder nicht-immunogen verlaufen [97, 98]. Im Falle des immunogenen Zelltodes kommt es zur Freisetzung von *Damage-associated molecular Patterns* (DAMPs) durch die Tumorzellen, wodurch eine Immunreaktion hervorgerufen wird [97, 98]. Zentrale Mediatoren sind dabei dendritische Zellen, welche aus myeloiden Vorläuferzellen entstehen [99].

Der immunogene Zelltod läuft folgendermaßen ab: Durch Störung der Homöostase des endoplasmatischen Retikulums (ER), z.B. durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), kommt es zur Akkumulation von ungefalteten Proteinen im ER [100, 101]. Dies wird als ER-Stress bezeichnet [100, 101]. Zunächst führt die Aktivierung der ER-sessilen Kinase PERK zu einer Phosphorylierung des Translationsinitiationsfaktors eIF2 α [101, 102]. Es folgen eine partielle Aktivierung der Caspase-8, eine Spaltung des ER-Proteins BAP31 und eine Aktivierung von Bax und Bak [102]. Calreticulin, ein ER-Chaperon, wird schließlich durch SNARE-vermittelte Exozytose auf der Zellmembran exprimiert [102, 103]. Das auf der Zellmembran präsentierte Calreticulin wird auch als Ekto-Calreticulin bezeichnet [104].

Es wird über den CD91-Rezeptor von Antigen-präsentierenden Zellen erkannt und führt zur Phagozytose der Tumorzelle und ferner zur Zytokinproduktion, was wiederum T-Zellen stimuliert [98, 105]. Ekto-Calreticulin ist somit essentiell für den immunogenen Zelltod [104].

Neben Calreticulin werden von den Tumorzellen weitere DAMPs freigesetzt, z.B. ATP und HMGB1 [91, 92]. ATP-Freisetzung lockt myeloide Precursorzellen an und stimuliert deren Differenzierung in dendritische Zellen [99]. ATP bindet an die purinergen Rezeptoren P2Y2 und P2RX7 und bewirkt eine IL-1 β Sekretion [99, 106]. Dies ermöglicht eine Aktivierung von IL-17A produzierenden $\gamma\delta$ -T-Zellen und eine Akkumulation von CTLs im Tumor [99, 107]. HMGB1 bindet an den Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) auf dendritischen Zellen und bedingt dadurch die Prozessierung und Präsentation von Tumorantigenen, die gegenüber CTLs präsentiert werden [108]. IL-1 β aktiviert schließlich CTLs, sodass diese eine Immunantwort über IFN- γ auslösen [97, 109]. Dadurch können möglicherweise Tumorzellen abgetötet werden, die zuvor therapieresistent waren [97].

Nicht alle klassischen Chemotherapeutika lösen immunogenen Zelltod aus, obgleich alle zu Apoptose führen [91, 97]. Ob zielgerichtete Therapie immunogenen Zelltod auszulösen vermag, wird unter anderem in dieser Arbeit untersucht.

1.6 Fragestellung

Es ist unklar, ob sich eine kombinierte MAPK-Inhibitortherapie, bestehend aus BRAF- und MEK-Inhibitor, neben ihrer Wirkung auf die Proliferation im BRAF-V600E-mutierten Melanom auch auf die Immunogenität desselben auswirkt und ob sich die folgenden drei in der klinischen Routine eingesetzten Inhibitorkombinationen – Vemurafenib und Cobimetinib, Dabrafenib und Trametinib sowie Encorafenib und Binimetinib – in ihrer Wirkung auf die Immunogenität unterscheiden.

Derzeit werden klinische Studien durchgeführt, die zielgerichtete Therapie und Immuntherapie miteinander kombinieren. Wäre eine der Kombinationen aus BRAF- und MEK-Inhibitor den übrigen in ihrer Wirkung hinsichtlich der Immunogenität überlegen, könnte dies einen möglichen Vorteil bei einer Kombination mit einer Immuntherapie bedeuten. In dieser Arbeit wurde die Wirkung der Inhibitorkombinationen auf die MHC-I- und PD-L1-Expression sowie auf verschiedene Aspekte des immunogenen Zelltodes in Melanomzellen *in vitro* untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
Accu-Jet® Pro Pipettierhilfe	Brand
Amersham™ Imager 600	GE Healthcare Life Sciences
Cytoflex® LX	Beckman Coulter
DS 11 Spektrophotometer	De Novix
Eclipse® Ti	Nikon
Gefrierschrank, -80 °C	Thermo-Fisher
Heizblock	Stuart
Heracell™ VIOS 160i CO2 Inkubator	Thermo-Fisher
Heraeus™ Megafuge™ 16R	Thermo-Fisher
Heraeus™ Pico™ 17 Microcentrifuge	Thermo-Fisher
Infinite® M Nano (Photometer)	Tecan
Kühlschrank MediLine®	Liebherr
Magnetrührer	neo Lab
Microscope DM IL LED	Leica
Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electro-phoresis Cell	Bio-Rad
Multipette® M4	Eppendorf
pH 7110	inoLab
PowerPac™ HC High-Current Power Supply	Bio-Rad
Safe 2020 Sicherheitswerkbank	Thermo-Fisher
Schüttler	Edmund Bühler
Tiefkühlschrank MediLine®	Liebherr

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad
Vortex Genius 3®	IKA
Waage BP121 S	Sartorius

2.1.2 Antikörper

Tabelle 2: Antikörper Immunoblot

Antikörper Immunoblot	Verdünnung	Hersteller
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/ Tyr204) (D13.14.4E) XP® Rabbit mAb	1:2000	Cell Signaling
p44/42 MAPK (Erk1/2) Antibody	1:1000	Cell Signaling
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	1:1000	Cell Signaling
β-Actin Antibody	1:1000	Cell Signaling
Mouse anti Human HLA Class I Heavy Chain, HC10	1:200	Nordic MUBio

Tabelle 3: Antikörper Durchflusszytometrie

Antikörper Durchflusszytometrie	Verdünnung	Hersteller
anti-human HLA-ABC FITC-conjugated, W6/32	1:20	ImmunoTools
Mouse IgG2a Isotype control FITC-conjugated, X5563	1:20	ImmunoTools
Rabbit (DA1E) mAb IgG XP® Isotype Control (Alexa Fluor® 488 Conjugate)	1:50	Cell Signaling
Calreticulin (D3E6) XP® Rabbit mAb (Alexa Fluor® 488 Conjugate)	1:50	Cell Signaling
APC anti-human CD274 (B7-H1, PD-L1), 29E.2A3	1:20	BioLegend
APC Mouse IgG2b, κ Isotype Ctrl Antibody, MPC-11	1:20	BioLegend

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 4: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller/Lieferant
7AAD	BD Pharmingen
APS, 10 %	Sigma-Aldrich
Bortezomib	Cayman Chemical
Bromphenolblau	Merck
CaCl ₂ *2H ₂ O	Merck
CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)	Promega
Cobimetinib	Hycultec
cOmplete™	Roche
Dabrafenib	Hycultec
Deoxycholat	Carl Roth
destilliertes Wasser	Eigenproduktion
Dithiothreitol	Serva
DMSO	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich
EDTA	Sigma-Aldrich
Ethanol absolute	ChemSolute
FBS	Merck
Glukose	Sigma-Aldrich
Glycerol	Merck
Glycine	Sigma-Aldrich
H ₂ O ₂	Merck
Hepes	Sigma
Isopropanol	Sigma-Aldrich
KCl	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck

Chemikalie	Hersteller/Lieferant
LG818 (Encorafenib)	Hycultec
Luminol	Aldrich
Magermilchpulver	Carl Roth
MEK162 (Binimetinib)	Hycultec
Methanol	Sigma-Aldrich
MgSO ₄ *7H ₂ O	Merck
NaCl	Chemsolute
NP40	ThermoFischer
PageRuler™ vorgefärbte Proteinleiter	ThermoFischer
p-Coumaric	Sigma-Aldrich
PEI	Polysciences
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich
PhosStop™	Roche
Polybrene	EMD Millipore
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich
Quinacrine	Selleckchem
Recombinant Human IFN-γ	Reprotech
RNAse A	Thermo Scientific
Rotiphorese® Gel 40	Carl Roth
RPMI-1640 Medium	Sigma-Aldrich
SDS	PanReac AppliChem
TEMED	PanReac AppliChem
Trametinib	Hycultec
Tris	Carl Roth
Trypan Blue Solution	Sigma-Aldrich
Trypsin EDTA Solution	Sigma-Aldrich
Tween® 20	Sigma-Aldrich
Vemurafenib	Hycultec

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
Bechergläser 150, 250 ml	Schott
Blotting Papier	Hartenstein
Erlenmeyerkolben 250, 500 ml	Schott
Filter 0,45 µm	Sarstedt
Kamm, 15 Well	BioRad
Laborflaschen mit DIN-Gewinde 500, 1000, 2500 ml	Schott
Messzylinder 25, 50, 100, 500, 1000 ml	Schott
Micro tube 0,5 ml; 1,5 ml	Sarstedt
Mikrotiter Gefäße farblos; 1,2 ml	Biozym
MoliNea® Krankenunterlagen	Hartmann
Nitrocellulose Membran 0.45 µm	GE Healthcare
Parafilm®	Hartenstein
Peha-soft® nitrile white powderfree	Hartmann
Pipette, 5, 10, 25 ml	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen, 10, 100, 1000 µl	Sarstedt
Reaktionsgefäße 15, 50 ml	Greiner Bio-One
Spritze, 10 ml	BD
Terralin® liquid	Schülke
Well Plates: 6, 96	Greiner Bio-One
Zellkulturflasche T75, T125	Greiner Bio-One

2.1.5 Komplettsysteme

Tabelle 6: Komplettsysteme

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific

2.1.6 Software

Tabelle 7: Software

Bezeichnung	Hersteller
FlowJo®	BD
EndNote™ X9	Clarivate
InDesign®	Adobe
Microsoft Office® 2016, 2019	Microsoft
Photoshop®	Adobe
Prism	GraphPad

2.1.7 Melanomzelllinien

Tabelle 8: Melanomzelllinien

Zelllinien	BRAF-V600E-Status
UACC 257	mutiert
Malme 3M	mutiert
Sk-Mel 5	mutiert

2.1.8 Plasmide

Tabelle 9: Vektorsysteme

Plasmide	
ATF-Reporter	pSMALB-ATF 4.5rep
Calreticulin-Fluoreszenz-Fusionsprotein	piH-calreticulin mcherry

2.1.9 Puffer und Lösungen

Tabelle 10: Zellkulturmedium

Zellkulturmedium (CM)	
RPMI-1640 Medium	500 ml
FBS	50 ml
Penicillin-Streptomycin	5 ml

Tabelle 11: Trypsin/EDTA-Lösung

Trypsin/EDTA-Lösung	
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	450 ml
Trypsin EDTA Solution	50 ml

Tabelle 12: Krebs-Ringer-Lösung

Krebs-Ringer-Lösung, pH 7,4	
NaCl	125 mM
KCl	5 mM
MgSO ₄ *7H ₂ O	1 mM
KH ₂ PO ₄	0,7 mM
CaCl ₂ *2H ₂ O	2 mM
Glukose	6 mM
Hepes	25 mM

Tabelle 13: Durchflusszytometrie-Puffer

Durchflusszytometrie-Puffer	
FCS	0,10 %
PBS	

Tabelle 14: RIPA-Puffer

RIPA-Puffer	
NaCl	150 mM
NP40	1 %
Deoxycholate	0,5 %
SDS	0,1 %
TRIS-Cl pH 7,5	50 mM
EDTA	1 mM

Tabelle 15: TBS

4x TBS pH 7,6	
Tris	80 mM
NaCl	0,5 mM

Tabelle 16: Tris/SDS

4x Tris/SDS pH 6,8	
Tris	0,5 M
SDS	0,4 %
4x Tris/SDS pH 8,8	
Tris	1,5 M
SDS	0,4 %

Tabelle 17: SDS-Proben-Puffer

6x SDS-Proben-Puffer	
4x Tris/SDS, pH 6,8	70 %
Glycerol	30 %
SDS	0,35 M
Dithiothreitol	0,6 M
Bromphenol Blau	0,18 M

Tabelle 18: Running-Puffer

5x Running-Puffer	
Tris	125 mM
Glycine	1 M
SDS	0,5 %

Tabelle 19: TTBS

1x TTBS	
Tween® 20	0,1 %
4xTBS, pH 7,6	

Tabelle 20: Transfer-Puffer

Transfer-Puffer	
Tris	25 mM
Glycine	0,2 M
Methanol	20 %

Tabelle 21: Blocking-Puffer

Blocking-Puffer	
Magermilchpulver	5 %
1x TTBS	

Tabelle 22: ECL

ECL	
Lösung 1	
Tris 0,1 M pH 8,5	10 ml
Luminol 250 mM	100 µl
p-Coumaric 90 mM	44 µl
Lösung 2	
Tris 0,1 M pH 8,5	10 ml
H2O2 30 %	6 µl

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

In dieser Arbeit wurden folgende BRAF-V600E-mutierte Melanomzelllinien verwendet: Sk-Mel 5, UACC 257 und Malme 3M. Die Zelllinien wurden durch eine Short-tandem-repeat-Analyse (STR-Analyse) authentifiziert. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit einem Zellkulturmedium (CM) kultiviert. Bei einer Konfluenz von ca. 90 % wurden die Zellen *gesplittet*. Dazu wurde zunächst das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit Trypsin/EDTA-Lösung von der Unterlage abgelöst. Die Zellen wurden nun für weitere Versuche bereitgestellt bzw. ein Teil in einer neuen Zellkulturflasche kultiviert. Ferner wurden regelmäßig Zellen kryokonserviert.

2.2.2 MTS-Assay

Der MTS-Assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium) ist eine sensitive Methode zur Bestimmung der Viabilität von Zellen im Photometer [110]. In diesem Versuch wurde die Viabilität der Melanomzellen unter Inhibitorbehandlung untersucht. Es wurden jeweils ein BRAF- und ein MEK-Inhibitor gegeneinander getestet. Dazu wurden die folgenden in der klinischen Routine eingesetzten Kombinationen verwendet: Vemurafenib und Cobimetinib, Dabrafenib und Trametinib sowie Encorafenib und Binimetinib. Es wurden fünf Konzentrationen eines Inhibitors verwendet. Zusätzlich wurde jeweils eine DMSO-Kontrolle mitgeführt. Die Konzentrationen sind Tabelle 23 zu entnehmen.

Tabelle 23: Inhibitorkonzentrationen

Inhibitor	Konzentrationen in nMol					
Vemurafenib	0	62,5	125	250	1000	4000
Cobimetinib	0	0,2	1	5	25	125
Dabrafenib	0	0,016	0,08	0,4	2	10
Trametinib	0	0,25	0,5	1	2	4
Encorafenib	0	1	5	25	125	625
Binimetinib	0	1	5	25	125	625

Die Zellen wurden zunächst kultiviert. Anschließend wurden jeweils 5.000 Zellen (bei UACC 257 6.000 Zellen) pro *Well* in 100 µl Medium ausgesät und 24 Stunden kultiviert, um später in einem adhären System zu arbeiten. Am Folgetag wurde zunächst auf einer Platte ein Nullwert am Photometer gemessen. Anschließend wurden die übrigen Zellen mit Inhibitoren behandelt. Hierzu wurden die Inhibitoren in CM/DMSO (1:250) verdünnt und jeweils 50 µl des einen Kombinationspartners sowie 50 µl des anderen Kombinationspartners in ein *Well* zu den Zellen vom Vortag gegeben. Es wurden Triplets gebildet, woraus später in der Auswertung ein Mittelwert berechnet wurde. Die mit Inhibitoren behandelten Melanomzellen wurden nun 72 Stunden kultiviert. Danach wurde in jedes *Well* 10 µl MTS Reagenz zugegeben und die Platte für 120 min inkubiert. Es konnte ein Farbumschlag beobachtet werden, der mit der Inhibitorkonzentration korrelierte. Dieser wurde im Photometer quantifiziert. Hierzu wurde die Extinktion im Photometer bei 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm gemessen. Die Daten wurden mithilfe der folgenden Formel des *National Cancer Instituts* ausgewertet (s. Kap. 3.1.1) [111].

$$\frac{T_i - T_z}{C - T_z} \cdot 100, \text{ wenn } T_i \geq T_z$$

$$\frac{T_i - T_z}{T_z} \cdot 100, \text{ wenn } T_i < T_z$$

C: Extinktion der DMSO-Kontrolle (Wachstumskontrolle)

T_z: Extinktion zum Zeitpunkt 0

T_i: Extinktion der mit Inhibitoren behandelten Zellen

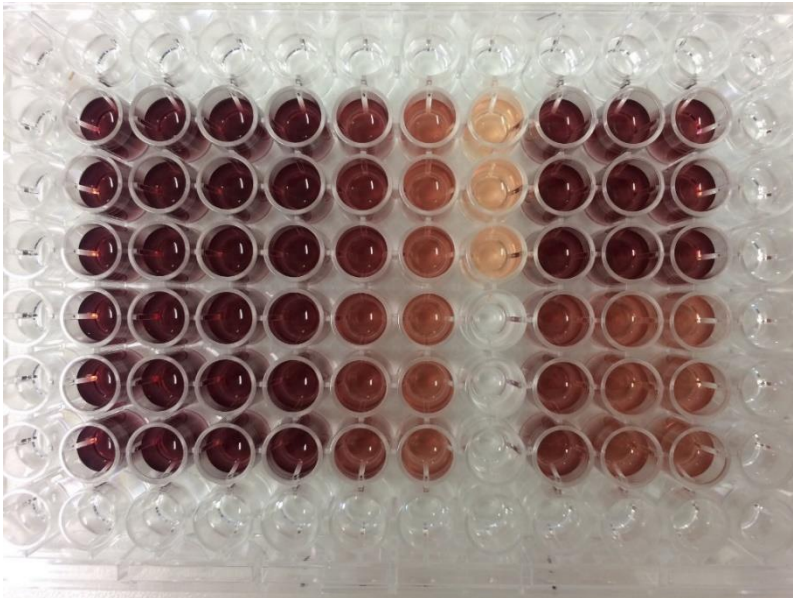


Abbildung 2: Farbumschlag durch MTS-Reaktion

Zu sehen ist der durch die MTS-Reaktion hervorgerufene Farbumschlag. Die Quantifizierung erfolgte im Photometer.

2.2.3 Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden mit einem CytoFLEX® LX Zytometer von Beckman Coulter durchgeführt. Bei Mehrfachfärbungen erfolgte eine Kompensation, um Störungen durch die spektrale Überlappung der verschiedenen Farbstoffe zu minimieren. Beim *Gating* wurden zunächst Zelltrümmer ausgeschlossen und anschließend nur lebende Zellen (7AAD negative Zellen) berücksichtigt. Die Auswertung erfolgte mit FlowJo®. Die einzelnen Experimente werden im Folgenden genauer beschrieben.

2.2.3.1 Zellzyklusfärbung

Das Prinzip der Zellzyklusfärbung besteht darin, dass sich der DNA-Gehalt der Zellen verändert, während sie den Zellzyklus durchlaufen [112]. Im Durchflusszytometer wird der DNA-Gehalt bestimmt, der somit Rückschlüsse auf die entsprechende Phase des Zellzyklus erlaubt [112].

Zunächst wurden die Zellen analog zum MTS-Assay für 72 Stunden mit Inhibitoren kultiviert, abgelöst und bei 1.500 U/min 5 min pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 250 µl PBS/ 1% FCS resuspendiert. Nun wurde auf dem *Vortex* tropfenweise eiskalter Ethanol zugegeben, um die Zellen in ihrer derzeitigen Zellzyklusphase zu fixieren. Die fixierten Zellen wurden mindestens eine Stunde bei +4 °C inkubiert. Anschließend wurden sie durch Zentrifugation bei 1.500 U/min pelletiert und in 218 µl einer Lösung aus PBS mit 1 % FCS + 0,1 mg/ml RNaseA + 0,1 mg/ml Propidiumiodid resuspendiert und 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellzyklusphasen der fixierten Zellen im Durchflusszytometer im FL2: B610-ECD Kanal bestimmt.

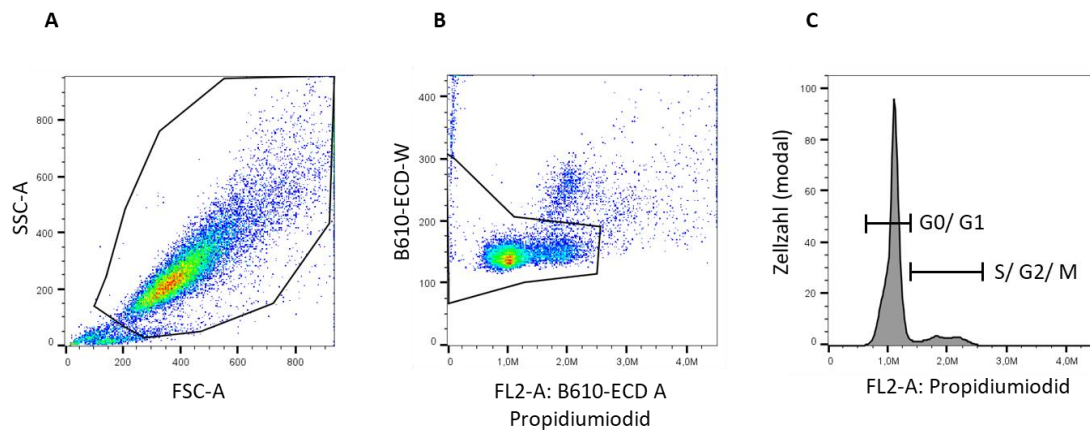


Abbildung 3: Gating-Strategie Zellzyklusfärbung

Dargestellt ist die *Gating*-Strategie der Zellzyklusfärbung. Zunächst wurden Zelltrümmer (A) und anschließend Dubletten (B) ausgeschlossen. Nun wurden die Zellen in den einzelnen Phasen quantifiziert (C).

2.2.3.2 MHC-I- und PD-L1-Färbung

Dieser Versuch wurde als Zweifachfärbung durchgeführt, d.h. die MHC-I- und PD-L1-Expression wurde in einer Messung untersucht. Die Zellen wurden zunächst routinemäßig kultiviert und 72 Stunden mit Inhibitoren behandelt. Zu jeder Probe wurden drei Ansätze erstellt: ungefärbte Zellen, eine Isotypenkontrolle und mit Antikörper gefärbte Zellen. Die Zellen wurden abgelöst und für jedes Proben-Röhrchen 250.000 Zellen bereitgestellt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und bei 1.500 U/min 5 min zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in 300 µl PBS/0,1 % FCS aufgenommen und jeweils 100 µl in ein Proben-Röhrchen pipettiert. Die Röhrchen wurden im Ständer bei 2.400 U/min 5 min zentrifugiert und abgegossen. Nun wurden die Zellen mit Antikörpern gefärbt. Die Antikörper wurden im Verhältnis 1:20 eingesetzt, das Gesamtfärbevolumen betrug 50 µl. Die Proben wurden mit dem Antikörper 30 min im Kühlschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 600 µl PBS/ FCS gewaschen, bei 2.400 U/min 5 min zentrifugiert und der Puffer abgegossen. Abschließend wurden die Zellen in 300 µl PBS/0,1 % FCS resuspendiert. Kurz vor der Messung wurden 2,5 µl 7AAD hinzugegeben. Die Messung im Durchflusszytometer erfolgte für MHC I im FL1: B525-FITC-Kanal, für PD-L1 im FL9: R660-APC-Kanal.

2.2.3.3 Quinacrine-Färbung

Mit Hilfe von Quinacrine kann der intrazelluläre ATP-Gehalt dargestellt werden [113, 114]. Quinacrine sendet ein Fluoreszenzsignal aus, welches im Durchflusszytometer gemessen werden kann [113].

Es wurden 1,6 Mio. Zellen kultiviert und 24 Stunden mit Inhibitoren behandelt. Die Zellen wurden abgelöst, 5 min auf 1.500 U/min pelletiert und in 600 µl PBS/0,1 % FCS aufgenommen. Pro Ansatz wurden zwei Röhrchen erstellt: eine ungefärbte Kontrolle und eine mit Quinacrine gefärbte Probe. Von den in PBS/0,1 % FCS aufgenommenen Zellen wurden 100 µl in jedes Röhrchen pipettiert. Die Röhrchen wurden bei 2.400 U/min 5 min zentrifugiert und abgegossen. Zur Färbung wurde die Quinacrine-Stammlösung in Krebs-Ringer-Lösung verdünnt. Die Färbung erfolgte mit einer Zielkonzentration von 1 µM Quinacrine. In jedes Röhrchen wurden 30 µl PBS/0,1 % FCS sowie 50 µl der Färbelösung mit Quinacrine hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte 30 min bei 37 °C im Inkubator. Anschließend wurden die Proben mit 600 µl PBS/0,1 % FCS gewaschen, 5 min bei 2.400 U/min zentrifugiert und abgegossen. Die Zellen wurden in 300 µl PBS/0,1% FCS aufgenommen. Kurz vor der Messung wurden 2,5 µl 7AAD hinzugegeben. Die Messung erfolgte im FL1: B525-FITC Kanal im Durchflusszytometer.

2.2.3.4 Calreticulin-Färbung

Es wurden analog zur Quinacrine-Färbung 1,6 Mio. Zellen kultiviert und einer 24-stündigen Inhibitorbehandlung unterzogen. Die Zellen wurden bei 1.500 U/min 5 min pelletiert, mit 600 µl PBS/0,1 % FCS aufgenommen und jeweils 100 µl in ein Probenröhrchen überführt. Pro Ansatz wurden drei Röhrchen erstellt: eine ungefärbte Kontrolle, eine Isotypenkontrolle und mit Calreticulin-Antikörper gefärbte Zellen. Die Röhrchen wurden bei 2.400 U/min 5 min zentrifugiert und abgegossen. Die Zellen wurden mit den jeweiligen Antikörpern gefärbt. Die Verdünnung betrug 1:50 in 50 µl Färbenvolumen. Der verwendete Antikörper war mit Alexa Fluor® 488 markiert. Nach 30 min Inkubation im Kühlschrank wurden die Röhrchen mit 600 µl PBS/ 0,1 % FCS gewaschen, bei 2.400 U/min zentrifugiert und abgegossen. Die Zellen wurden in 300 µl PBS/ 0,1 % FCS aufgenommen.

Kurz vor der Messung wurden 2,5 µl 7AAD in jedes Röhrchen hinzugegeben. Die Messung im Durchflusszytometer erfolgte im FL1: B525-FITC Kanal.

2.2.3.5 ATF-Messung

Die UACC 257 Zellen, die zuvor mit dem ATF-Reporter transduziert worden waren (s. Kap. 2.2.5), wurden zunächst routinemäßig kultiviert. Anschließend wurden sie 24 Stunden mit Inhibitoren behandelt. Da der Reporter bereits den Fluoreszenzfarbstoff GFP (grün fluoreszierendes Protein) enthält, war keine weitere Färbung erforderlich. Das Signal des ATF-Reporters wurde im Durchflusszytometer im FL1: B525-FITC Kanal gemessen.

2.2.4 Immunoblot

2.2.4.1 Proteinextraktion

Die Zellen wurden zunächst in *Six-Well-Platten* kultiviert und mit Inhibitoren behandelt. Dann wurde der Überstand entnommen und in Probenröhrchen überführt. Nun wurden die Zellen mit 3 ml PBS gewaschen und die Flüssigkeit ebenfalls in die Probenröhrchen pipettiert. Anschließend wurden sie mit 800 µl RIPA Puffer 20 min auf Eis inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Probenröhrchen mit Überstand und PBS bei 1500 U/min 5 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Pellet mit 200 µl RIPA Puffer resuspendiert und in das ursprüngliche *Well* zurückgeführt, um etwaige durch das Waschen gelöste Zellen zu behalten. Nachdem sich die Zellen vollständig gelöst hatten, wurde der gesamte Inhalt in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und eine Stunde auf Eis auf dem Schüttler lysiert. Dann wurden die Proben bei 13.000 U/min 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand mit den Proteinen wurde nun in vorgekühlte 500 µl Reaktionsgefäße à 100 µl aliquotiert und sofort auf -80 °C eingefroren.

2.2.4.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mit einem Komplettsset von Thermo Fisher (Pierce™ BCA Protein Assay Kit) durchgeführt. Gemäß Herstellerangabe wurde zunächst eine Standardkurve mit acht verschiedenen Konzentrationen Albumin-Standard von 25 µg/ml bis 2000 µg/ml sowie einer Kontrolle erstellt.

Zur Bestimmung des Proteingehalts der einzelnen Proben wurden zunächst 5 µl einer Probe in einer 96-Well-Platte vorgelegt. Jede Probe wurde mit einer Mischung aus Reagenz A und B im Verhältnis 1:50 versehen, kurz auf dem Schüttler vermischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 570 nm im Photometer gemessen. Mithilfe der zuvor bestimmten Standardkurve wurde die Proteinkonzentration der einzelnen Proben berechnet.

2.2.4.3 Blot

Zunächst wurden die Gele, bestehend aus einem Lade- (3,9 %) und einem Trenngel (10 %) gegossen [115].

Tabelle 24: Immunoblot-Gele

Gele, je 2 Stück		
	Trenngel, 10 %	Ladegel, 3,9 %
H ₂ O	2,7 ml	1,8 ml
Acrylamid, 40 %/ Bisacrylamid, 0,8 %	2,38 ml	273 µl
4x Tris/SDS, pH 8,8	1,82 ml	0,7 ml
APS, 10 %	70 µl	14 µl
TEMED	2,8 µl	1,4 µl

Es wurden in der Regel 10 µg Protein pro Probe verwendet. Im Falle von geringeren Proteinkonzentrationen wurde die Proteinmenge für alle Proben des Versuches reduziert, sodass stets gleiche Proteinmengen vorlagen. Zur Probenvorbereitung wurde das entsprechende Proteinvolumen mit 6xSDS-Ladepuffer versehen. Die Proben wurden mit dem *Vortex* durchmischt und 6 min im Heizblock auf 96 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben sofort auf Eis gestellt, kurz *gevortext*, bei 4 °C zentrifugiert und wieder kurz auf Eis gestellt.

Nun wurde die Elektrophoresekammer vorbereitet: Die Gele wurden eingespannt und die Kammer mit *Running-Puffer* aufgefüllt. Die Gele wurden mit Proben und Größenstandard beladen und die Elektrophorese bei konstanter Spannung von 130 V durchgeführt. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald sich das zu untersuchende Protein etwa in der Mitte des Gels befand.

Der Transfer wurde in einem halbtrockenen Verfahren durchgeführt. Gele und Membran wurden in *Transfer-Puffer* getränkt. Die Elektroden der Transferkammer wurden ebenfalls mit *Transfer-Puffer* benetzt. Nun wurden Membran und Gel zwischen jeweils zwei Blättern *Blotting-Papier* in die Transferkammer eingesetzt. Etwaige Luftblasen wurden entfernt. Bei 200 mA fand der Transfer 1 min/kDa statt.

Nach Abschluss des Transfers wurde die Membran eine Stunde in *Blocking-Puffer* auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Antikörper in der vom Hersteller vorgegebenen Verdünnung in *Blocking-Puffer* gelöst und die Membran damit gefärbt. Die Inkubation erfolgte entweder über Nacht bei 4 °C oder eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Antikörperlösung entfernt und die Membran jeweils dreimal 10 min mit TTBS auf dem Schüttler gewaschen. Nun wurde die Membran erneut 15 min in *Blocking-Puffer* inkubiert, dann mit Sekundäntikörper analog zum Primäntikörper gefärbt und anschließend in TTBS gewaschen.

Zur Entwicklung wurde die Membran 1 min in ECL inkubiert und anschließend im Entwickler belichtet.

2.2.5 Transduktion

Transduktion ermöglicht das Einbringen von genetischen Informationen in Zellen mit Hilfe von Viren [116]. Hier wurde diese Methode verwendet, um sog. Reporter in Zellen einzuschleusen. Zur Virusproduktion wurden HEK-293T-Zellen verwendet [117]. Dabei handelt sich um embryonale Nierenzellen [117]. Dieser Zwischenschritt, also die Übertragung freier DNA, wird als Transfektion bezeichnet [118].

Zunächst wurden HEK-293T-Zellen auf *Six-Well-Platten* ausgesät. Es wurde eine konfluente T75-Flasche für eine *Six-Well-Platte* verwendet. So konnte eine etwa 80-prozentige Konfluenz am Tag der Transfektion erzeugt werden. Die Zellen wurden über Nacht in RPMI/ 10 % FCS kultiviert.

a) Lentiviren 3. Generation

Tabelle 25: Lentiviren 3. Generation

DNA-Mix	
pSMALB-ATF 4.5rep	0,89 µg
p59	0,22 µg
p60	0,31 µg
p61	0,58 µg
150 mM NaCl	100 µl
PEI-Mix	
1x PEI	6 µl
150 mM NaCl	100 µl

Der DNA- und der PEI-Mix wurden jeweils 5 min bei Raumtemperatur gelöst, zusammengefügt und 15 min inkubiert. Nun wurde die fertige Transfektionsmischung auf die HEK-293T-Zellen aufgetropft. Da ab hier Viren produziert wurden, erfolgten die Arbeiten im S2-Labor.

b) Retroviren: PIH Calreticulin

Tabelle 26: Retroviren: PIH Calreticulin

Zielvektor/Helferplasmid	absolute DNA-Menge pro <i>Well</i>
PIH Calreticulin	1,33 µg
pHIT60	1,33 µg
pHIT456	1,33 µg

Der DNA-Gehalt der einzelnen Plasmide wurde im Spektrophotometer bestimmt und die berechneten Volumina zusammengefügt. Die Mischung wurde 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf die HEK-293T-Zellen aufgetropft. Ab diesem Schritt wurden die Arbeiten im S2-Labor durchgeführt.

Die Zellen beider Ansätze wurden nun einen Tag kultiviert. Am nächsten Tag wurden in jedes *Well* 3 ml CM vorsichtig hinzugegeben, sodass sich die HEK-293T-Zellen nicht ablösen. Außerdem wurden Zielzellen (UACC 257) auf einer *Six-Well-Platte* für die Infektion am nächsten Tag ausgesät.

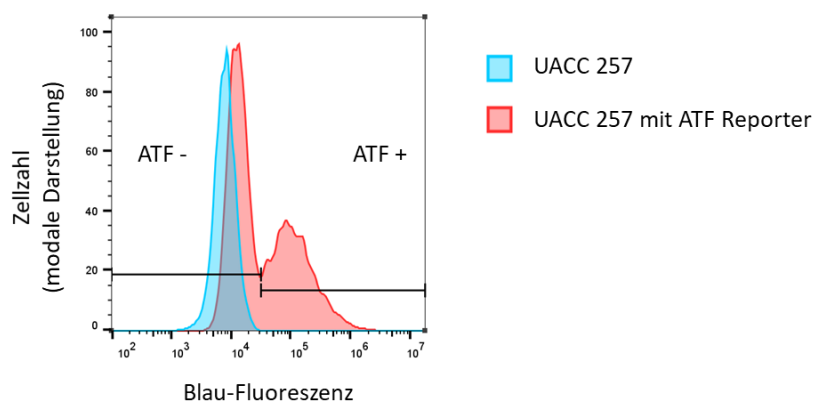
Am darauffolgenden Tag wurden die Viren geerntet und die UACC-257-Zellen damit infiziert. Zunächst wurde der Überstand mit den Viren von den HEK-293T-Zellen mit einer 10 ml Spritze abgenommen und mit einem 0,45 µm Filter filtriert. Zum Filtrat wurde 1 µg/ml Polybrene hinzugegeben und 5 ml der fertigen Lösung auf die UACC-257-Zellen gegeben.

Nach einer erneuten Inkubation über Nacht wurden die Zielzellen (UACC 257) gewaschen und mit neuem Medium versehen. Sie wurden nun routinemäßig kultiviert. Nach Heranwachsen einer ausreichenden Zellpopulation wurde das Ergebnis der Transduktion am Durchflusszytometer verifiziert. Die Ansprechrate auf die Transduktion verlief unterschiedlich (s. Abbildung 4): Während der ATF-Reporter Transduktionsraten von knapp 50 % erzielte, wurden weniger als 10 % der Zellen erfolgreich mit dem Calreticulin-Fluoreszenzfusionsprotein transduziert. Das Plasmid mit dem ATF-Reporter enthielt als Selektionsmarker eine konstitutiv exprimierte Blaufluoreszenz, auf die normiert

wurde. Daher wurden in den folgenden Experimenten nur Zellen berücksichtigt, die den Reporter exprimierten.

Das PIH-Calreticulin-Plasmid hingegen enthielt einen Selektionsmarker. Die Selektion erfolgte 7 Tage mit 400 µg/ml Hygromycin B in CM. Nach der Selektion wurde erneut eine Messung im Durchflusszytometer durchgeführt. Nun exprimierten alle verbliebenen Zellen das Plasmid. Die selektionierten Zellen wurden im Folgenden routinemäßig kultiviert und für weitere Experimente expandiert.

A



B

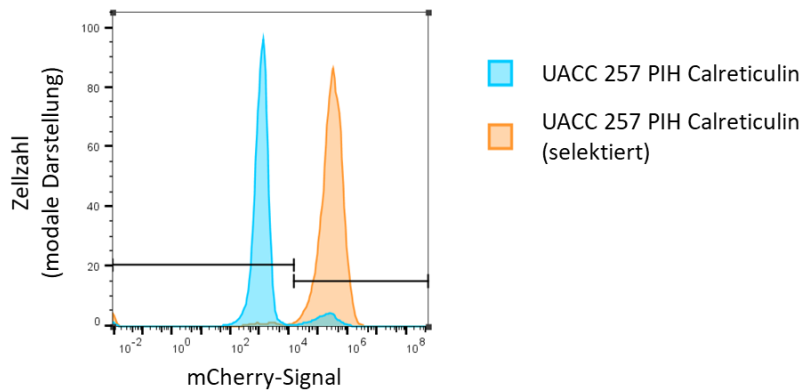


Abbildung 4: Transduktionsergebnis

A: UACC 257 Zellen, die erfolgreich mit dem ATF-Reporter transduziert wurden, emittieren konstitutiv eine Blau-Fluoreszenz.

B: Zunächst nahm nur eine kleine Faktion von UACC 257 das Calreticulin-Fluoreszenz-Fusionsprotein auf (rechte blaue Spitze). Diese Zellen wurden selektiert (orange).

2.2.6 Fluoreszenzmikroskopie

Die durch Transduktion generierten UACC 257 Zellen mit einem Calreticulin-Fluoreszenz-Fusionsprotein (kurz UACC-257-Calreticulin) wurden in *Chamber-Slides* (Kulturgefäß der Größe eines Objektträgers) ausgesät und bis zu einer Konfluenz von etwa 40 % kultiviert. Anschließend wurde das Medium durch ein mit Inhibitoren versetztes Medium ausgetauscht. Die Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop 72 Stunden inkubiert, wobei alle 10 min ein Foto im Cy3-Kanal gemacht wurde.

2.3 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen zur Signifikanzberechnung wurden mit GraphPad Prism (Version 6.07) durchgeführt. Es wurde routinemäßig ein One way Anova Test mit multiple Comparisons, Korrektur für multiple Comparisons (Tukey Test) und Geisser-Greenhouse Correction durchgeführt. Im Falle von lediglich zwei zu vergleichenden Parametern wurde ein gepaarter parametrischer T-Test verwendet. Statistisch signifikante Ergebnisse ($p < 0,05$) sind in den folgenden Kapiteln jeweils gesondert als solche gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Inhibitortitration

Die drei verwendeten Kombinationen aus BRAF- und MEK-Inhibitoren wirken bei gleicher Konzentration verschieden auf die Viabilität von Melanomzellen. Da in dieser Arbeit Differenzen zwischen den Inhibitoren hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Immunogenität des Melanoms untersucht wurden, sollte ausgeschlossen werden, dass dieser Effekt durch unterschiedlich starke Wirkungen der Inhibitoren hervorgerufen wird. Daher wurde zweistufig vorgegangen. Zunächst wurde eine Inhibitortitration mittels MTS-Assay vorgenommen (s. Kap. 3.1.1) und in einem weiteren Schritt Zellzyklusanalysen durchgeführt (s. Kap. 3.1.2). Die Kombination zweier Methoden sollte die Genauigkeit verbessern.

3.1.1 Konzentrationsabhängiger Effekt der Inhibitoren auf die Viabilität des Melanoms im MTS-Assay

Im MTS-Assay konnte eine konzentrationsabhängige Wirkung der Inhibitoren auf die Viabilität der Melanomzellen gezeigt werden. Weiterhin unterscheiden sich die Zelllinien in ihrer Sensitivität gegenüber den Inhibitoren: Malme 3M ist am sensitivsten, UACC 257 ist intermediär sensitiv und Sk-Mel 5 ist am wenigsten sensitiv. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt.

In den Folgeversuchen wurden u.a. Oberflächenantigene untersucht, was nur zuverlässig auf lebenden Zellen möglich ist. Es wurden daher Inhibitorkonzentrationen ausgewählt, unter denen die Proliferation eingeschränkt wird, jedoch nur begrenzt Zelltod stattfindet. Mit einigen vielversprechenden Konzentrationen wurden im Folgenden Zellzyklusanalysen durchgeführt (s. Kap. 3.1.2).

UACC 257		Binimetinib (nM)					
		0	1	5	25	125	625
Encorafenib (nM)	0	100	94,3	92,6	83,6	47,5	11,6
	1	96,6	87,8	78,7	63,9	23,4	6,5
	5	65,9	64,3	56,6	27,7	9,6	4,8
	25	21,8	20,9	15,1	9,0	6,7	5,5
	125	12,5	10,6	9,4	5,3	3,5	2,6
	625	5,7	5,0	5,1	1,1	0,1	-1,1

Sk-Mel 5		Binimetinib (nM)					
		0	1	5	25	125	625
Encorafenib (nM)	0	100	99,4	96,6	86,1	65,1	38,3
	1	92,8	91,5	80,0	66,4	47,0	36,9
	5	75,4	67,7	66,8	45,9	35,5	24,0
	25	64,5	56,4	47,3	42,9	34,2	30,5
	125	45,1	42,8	36,8	32,5	26,4	26,8
	625	24,0	24,3	19,8	17,8	12,2	10,5

Malme 3M		Binimetinib (nM)					
		0	1	5	25	125	625
Encorafenib (nM)	0	100	87,6	69,7	-10,7	-55,1	-72,1
	1	31,7	26,8	0,2	-45,1	-67,4	-76,8
	5	-37,6	-43,5	-55,9	-65,0	-72,8	-80,0
	25	-64,5	-68,8	-71,5	-75,8	-77,5	-80,2
	125	-76,7	-76,2	-76,6	-79,3	-81,1	-83,2
	625	-87,0	-86,5	-88,0	-87,8	-89,0	-90,7

Abbildung 5: Reduktion der Viabilität der Melanomzellen durch Inhibitortherapie

Es ist jeweils beispielhaft die Viabilität unter der Kombinationstherapie aus Encorafenib und Binimetinib dargestellt. In den farbig hervorgehobenen Feldern ist die Viabilität der Zellen nach der Kombinationsbehandlung mit den Inhibitoren prozentual dargestellt. 100 % bedeutet, dass die Zellen ungehindert, wie in der DMSO-Kontrolle, proliferierten. Werte zwischen 100 und 0 bedeuten eine verminderte Proliferation. Negative Werte bedeuten stattgehabten Zelltod. Der Anschaulichkeit halber sind die Werte mit einem Farbverlauf als *heat map* dargestellt. Malme 3M reagierte am sensitivsten auf die Behandlung.

3.1.2 Zellzyklusarrest durch Inhibitorbehandlung

In der Zellzyklusanalyse konnte die in Kap. 3.1.1 beschriebene Sensitivitätsreihenfolge der Zelllinien reproduziert werden. Malme 3M zeigte eine massive Verminderung der S-G2-M-Population, also einen fast vollständigen Zellzyklusarrest. UACC 257 zeigte eine leichte Erniedrigung und in Sk-Mel 5 blieb die Population unverändert bzw. kam es gar zu einer leichten Erhöhung dieser Fraktion (quantitative Darstellung, s. Abbildung 8).

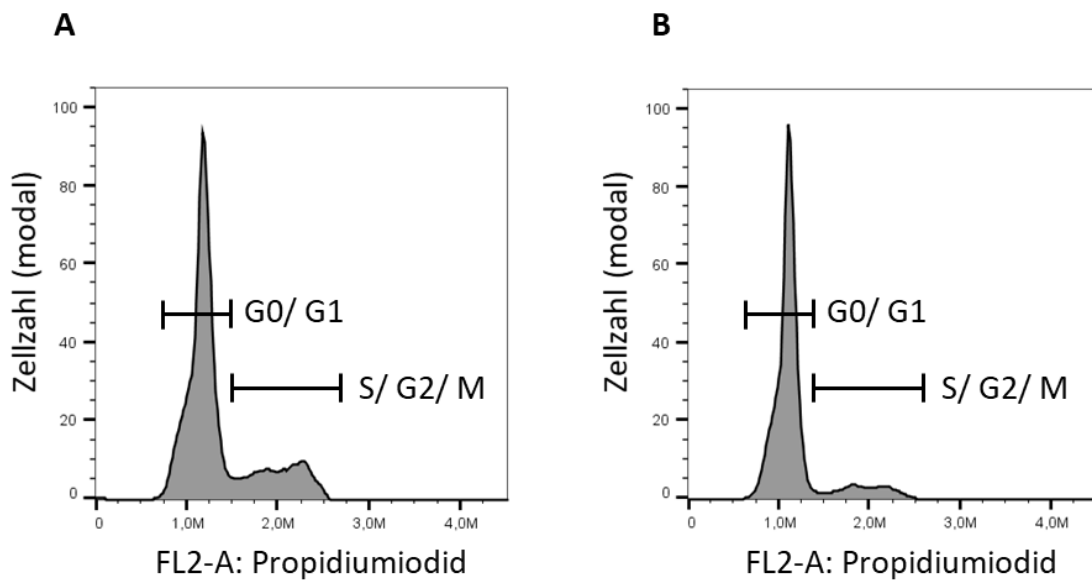


Abbildung 6: Zellzyklusarrest unter Inhibitorbehandlung

Repräsentative Histogramme der mit Inhibitoren behandelten Zellen. Unter Behandlung mit Encorafenib und Binimetinib (B) kommt es zu einer deutlichen Abnahme der S-G2-M-Population gegenüber der unbehandelten Kontrolle (A) in Malme-3M-Zellen.

3.1.3 Einstellung in ihrer Wirkung vergleichbarer Inhibitorkonzentrationen

Durch Kombination der Ergebnisse von MTS-Assay und Zellzyklusanalysen wurden folgende, in ihrer Wirkung ähnliche Inhibitorkonzentrationen eingestellt: Vemurafenib 125 nM und Cobimetinib 1nM (VC); Dabrafenib 2 nM und Trametinib 1nM (DT); Encorafenib 1nM und Binimetinib 5 nM (EB). Zwischen diesen Inhibitorkombinationen lagen weder im MTS-Assay, noch in den Zellzyklusanalysen statistisch signifikante Unterschiede vor. Darüber hinaus wurde eine weitere, höhere Konzentration in den folgenden Experimenten – soweit möglich – mitgeführt. Somit konnte auch der Konzentrationseinfluss der Inhibitoren auf die verschiedenen immunologischen Endpunkte untersucht werden. Die höhere Konzentration lautete: Encorafenib 25 nM und Binimetinib 25 nM (Enco+ und Bini+ bzw. E+B+). Die Inhibitorkombinationen in ihren jeweiligen Konzentrationen werden im Folgenden als Inhibitoren bezeichnet.

Abbildung 7 stellt die Viabilität der Zellen unter den festgelegten Inhibitorkonzentrationen dar. Bei UACC 257 und Sk-Mel 5 führte die Inhibitorbehandlung zu einer vergleichbaren Änderung der Viabilität. Lediglich Malme 3M reagierte unterschiedlich auf die Inhibitorbehandlung, was auf die hohe Sensitivität dieser Zelllinie gegenüber den Inhibitoren zurückzuführen ist (weiteres hierzu s. Kap. 4). Die Kombination aus Dabrafenib und Trametinib scheint eine gegenüber den anderen Kombinationen geringfügig stärkere Verminderung der Viabilität hervorzurufen. In den Zellzyklusanalysen hingegen (Abbildung 8) zeigten die Kombinationen aus Vemurafenib und Cobimetinib bzw. Dabrafenib und Trametinib eine nahezu identische Wirkung. Dort zeigten Encorafenib und Binimetinib eine geringfügig schwächere Wirkung als die anderen Inhibitoren. In Malme 3M waren die Schwankungen zwischen den Inhibitoren deutlich geringer als beim MTS-Assay. Das deutet darauf hin, dass die Inhibitorbehandlung den Zellzyklus hier bereits maximal supprimiert.

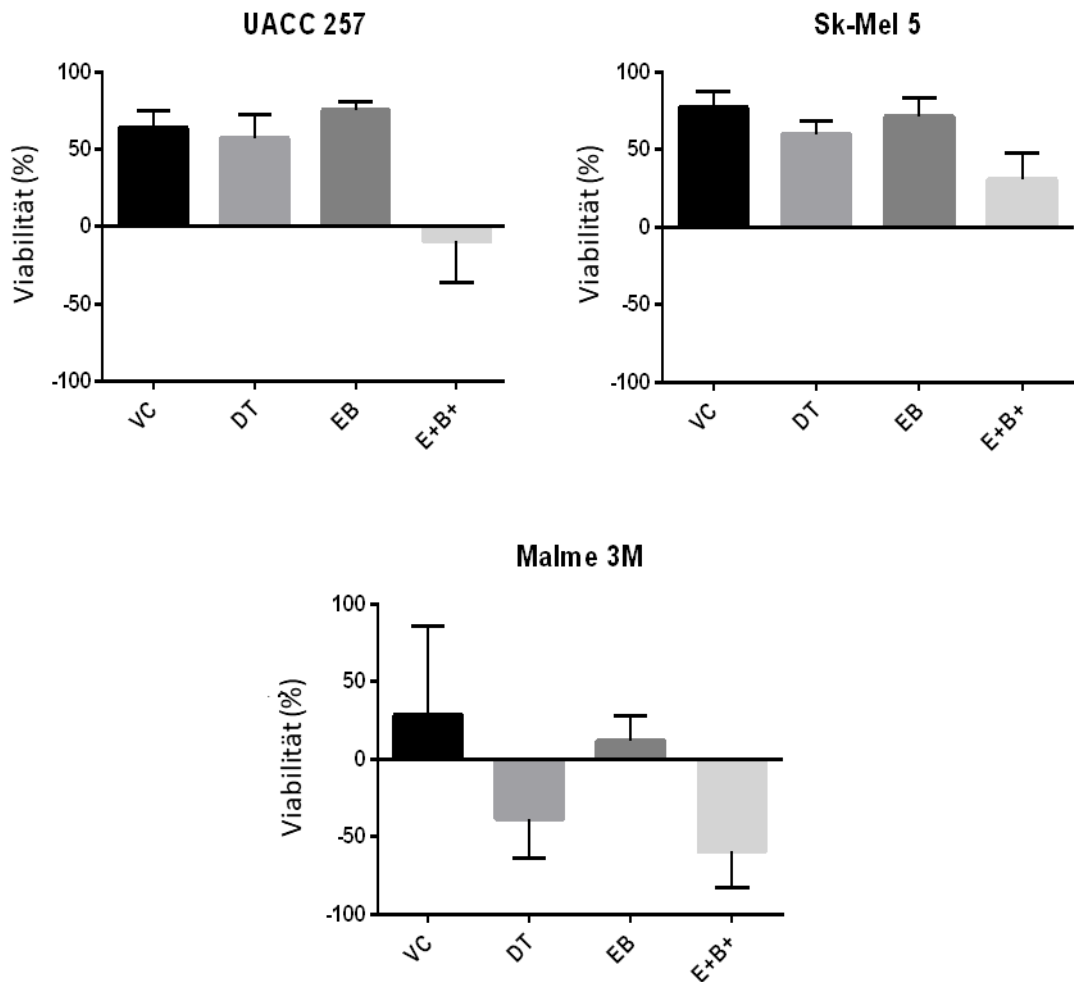


Abbildung 7: Einstellung vergleichbarer Inhibitorkonzentrationen im MTS-Assay

Auf der y-Achse ist jeweils die Viabilität in % aufgetragen. Die Kontrolle hat eine Viabilität von 100 %. Es handelt sich um Mittelwerte zweier Messungen mit Standardabweichung. Dargestellt ist die Viabilität der Zellen unter der Inhibitorkonzentration, die für die weiteren Experimente festgelegt wurde (Konzentrationen, s. Kap. 3.1.3).

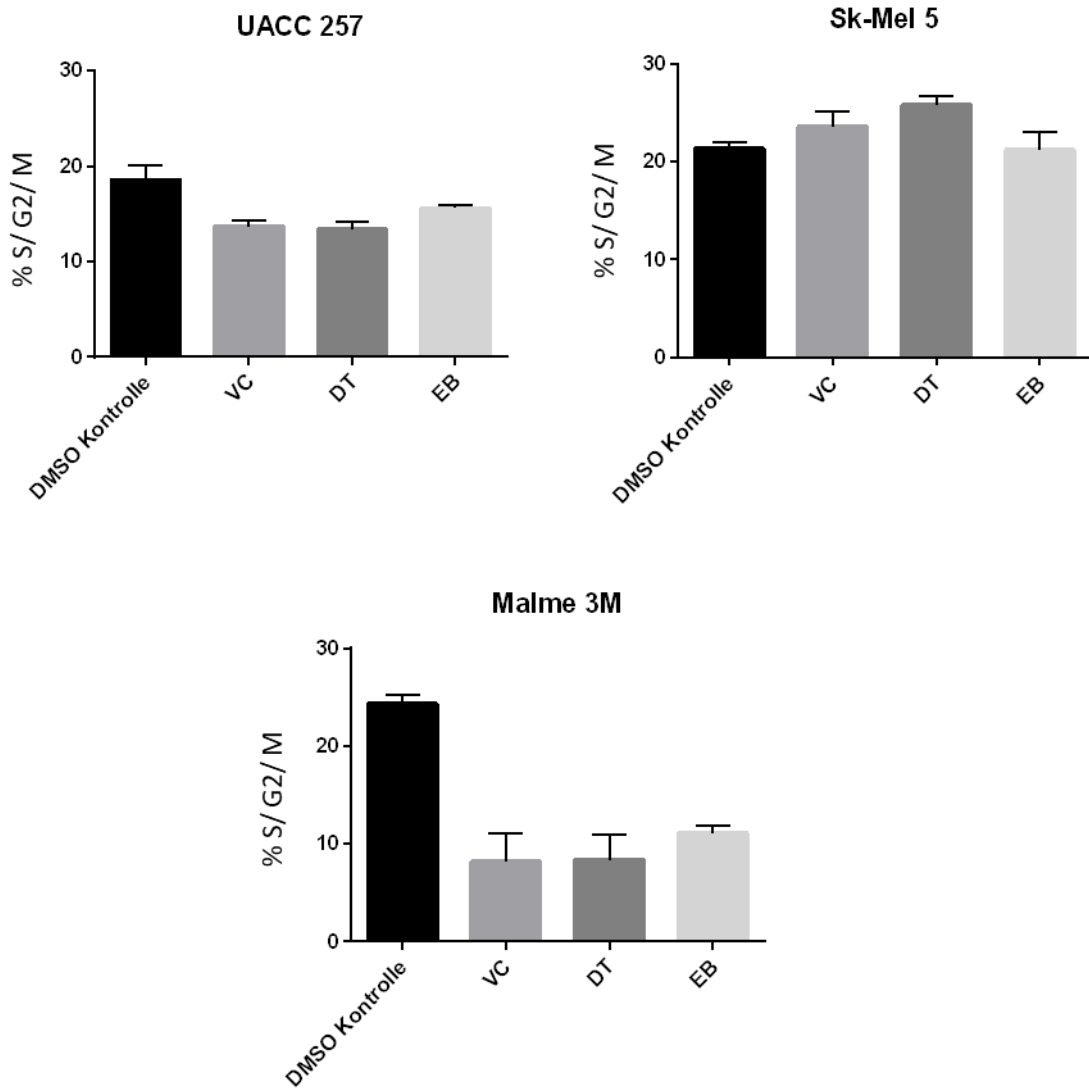


Abbildung 8: Einstellung vergleichbarer Inhibitorkonzentrationen in der Zellzyklus-Analyse

Dargestellt ist jeweils der prozentuale Anteil der Zellen, die sich in der S-, G2- und M-Phase befinden, an der Gesamtheit der Zellen im aktiven Zellzyklus. Die sub-G1-Fraktion ist nicht berücksichtigt. Es handelt sich um die Mittelwerte zweier Messungen mit Standardabweichung (Inhibitorkonzentrationen, s. Kap. 3.1.3).

3.2 Abnahme der Phosphorylierung von ERK unter Inhibitorbehandlung

Um den Einfluss der Inhibitoren auf den MAP-Kinase-Signalweg zu untersuchen, wurde ein Immunoblot mit ERK und phosphoryliertem TEY-Motiv (Thr-Glu-Tyr) von ERK (pERK; Phosphorylierungsstellen ERK1: Thr202 und Tyr204; Phosphorylierungsstellen ERK2: Thr185 und Tyr187) durchgeführt (Abbildung 9) [119]. Die Zellen reagierten auf die Inhibitorbehandlung mit einer Abnahme der Phosphorylierung von ERK, die unterschiedlich stark ausfiel. Es konnte erneut die Sensitivitätsreihenfolge der Zelllinien der vorausgegangenen Versuche (s. Kap. 3.1.1 und 3.1.2) reproduziert werden. Malme 3M zeigte eine sehr starke Reduktion der Phosphorylierung von ERK und UACC 257 eine mittlere Reaktion, wobei die mit Encorafenib und Binimetinib behandelten Zellen etwas höhere Phosphorylierungslevel von ERK als die Zellen mit den beiden anderen Inhibitorkombinationen aufwiesen. Sk-Mel 5 zeigte lediglich unter der Behandlung mit Dabrafenib und Trametinib sowie unter Encorafenib und Binimetinib eine leichte Abnahme der Phosphorylierung von ERK.

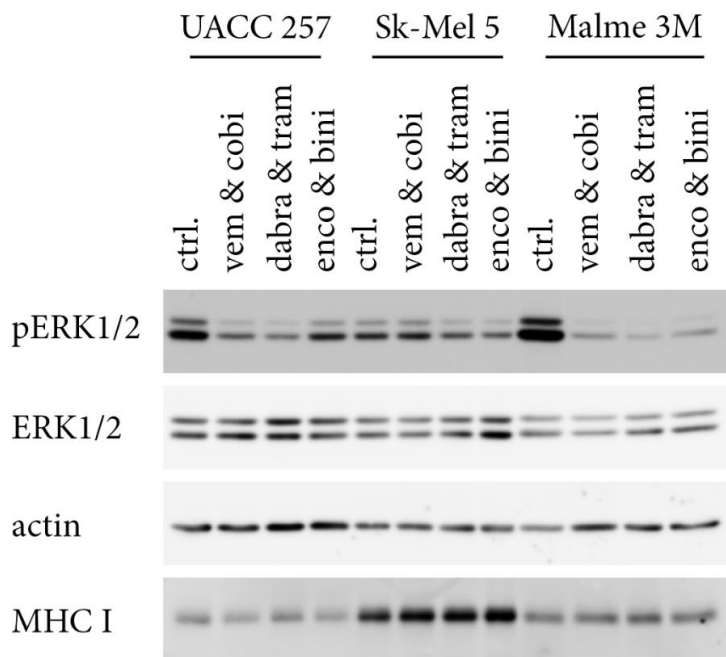


Abbildung 9: Immunoblot ERK, pERK und MHC I

Die Behandlungszeit der Zellen mit Inhibitoren betrug 24 Stunden. Bei jeder Zelllinie wurde eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt. Als Ladekontrolle wurde hier β -Actin verwendet. n=1.

3.3 *In Vitro*-Aspekte der Immunogenität des Melanoms

3.3.1 Unterschiede in basaler MHC-I-Expression zwischen den Zelllinien

Als Einstieg in die immunologischen Untersuchungen wurde in einem Immunoblot die Gesamtexpression von MHC I bestimmt. Die Zellen wurden hierfür 24 (Abbildung 9) und 72 (Abbildung 10) Stunden mit Inhibitoren behandelt. Die Zelllinien wiesen eine unterschiedliche basale MHC-I-Expression auf. Während Malme 3M und UACC 257 eine ähnliche basale Expression zeigten, war diese bei SK-Mel 5 deutlich höher. Wesentliche Unterschiede zwischen der Kontrolle und den mit Inhibitoren behandelten Zellen konnten nicht ermittelt werden. Um die MHC-I-Expression genauer zu untersuchen, wurde im Folgenden eine Durchflusszytometrie-Färbung mit MHC I durchgeführt.

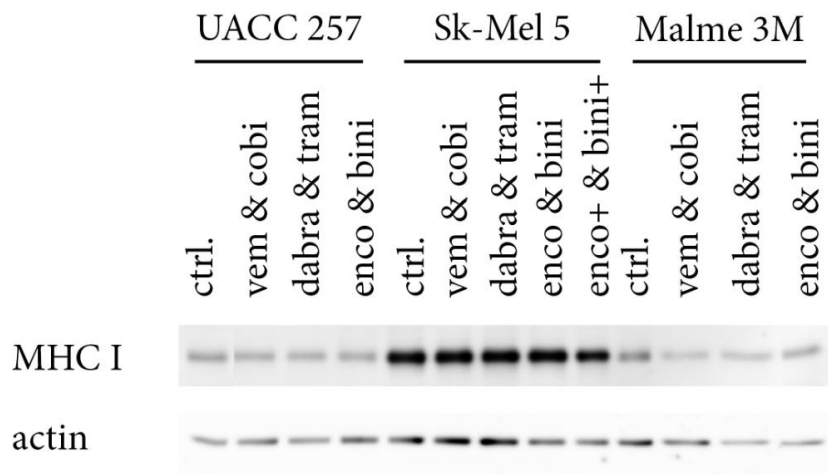


Abbildung 10: MHC I nach 72-stündiger Inhibitorbehandlung

Die Zellen wurden 72 Stunden mit Inhibitoren behandelt. Als Ladekontrolle fungierte Actin. Bei Sk-Mel 5 wurde zusätzlich die höhere Inhibitorkonzentration aus Encorafenib und Binimetinib mitgeführt (n=1).

3.3.2 Steigerung der MHC-I-Expression unter IFN- γ - und Inhibitorbehandlung

Zur Semiquantifizierung der Oberflächenexpression von MHC-I-Molekülen wurde eine Durchflusszytometrie-Färbung durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden mit IFN- γ behandelte Zellen verwendet [120].

Unter IFN- γ Behandlung (24 h, 200 U/ml) konnte ein deutlicher Anstieg der MHC-I-Expression verzeichnet werden (s. Abbildung 11). Auf den mit Inhibitoren behandelten Zellen (72 h) nahm die MHC-I-Expression ebenfalls zu, verglichen mit der Interferonbehandlung jedoch etwas schwächer ausgeprägt. Die Kombination aus Vemurafenib und Cobimetinib führte zu einer etwas stärkeren Erhöhung der MHC-I-Expression als die übrigen Inhibitoren.

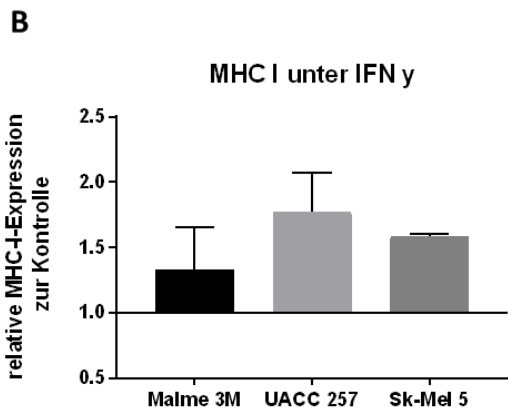
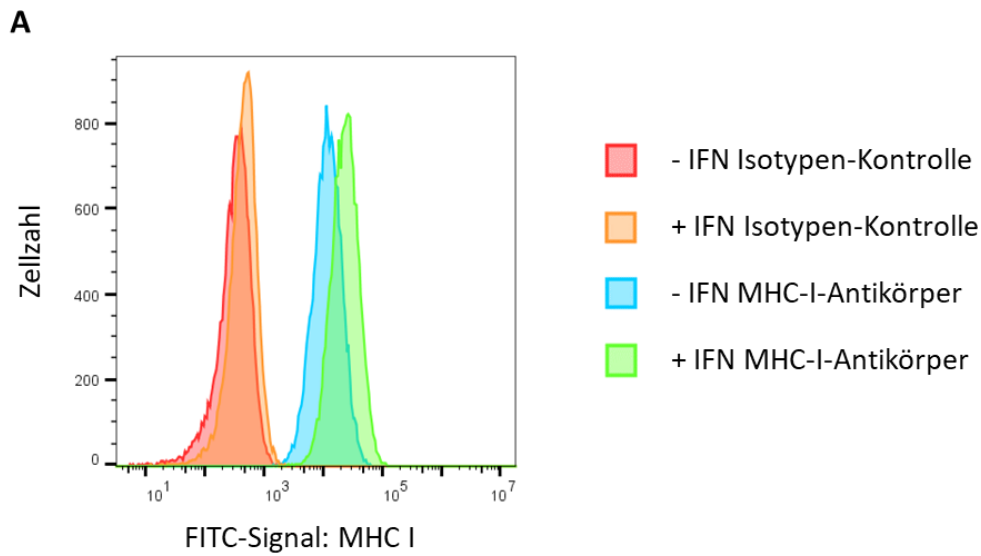


Abbildung 11: Steigerung der MHC-I-Expression unter IFN- γ -Behandlung

Die Zellen wurden 24 h mit 200 U/ml IFN- γ behandelt.

A: Repräsentative Histogramme der mit IFN- γ behandelten Zellen. Während die unbehandelte Isotypenkontrolle (rot) und die mit IFN behandelte Isotypenkontrolle (orange) fast gleichauf liegen, zeigen die behandelten, mit MHC-I-Antikörper gefärbten Zellen (grün) einen deutlichen Anstieg im FITC-Signal gegenüber den unbehandelten (blau).

B: Mittelwerte aus zwei Messungen mit Standardabweichung. Auf der y-Achse ist die Veränderung des geometrischen Mittelwerts von MHC I abzüglich der Isotypenkontrolle gegenüber der unbehandelten Kontrolle dargestellt.

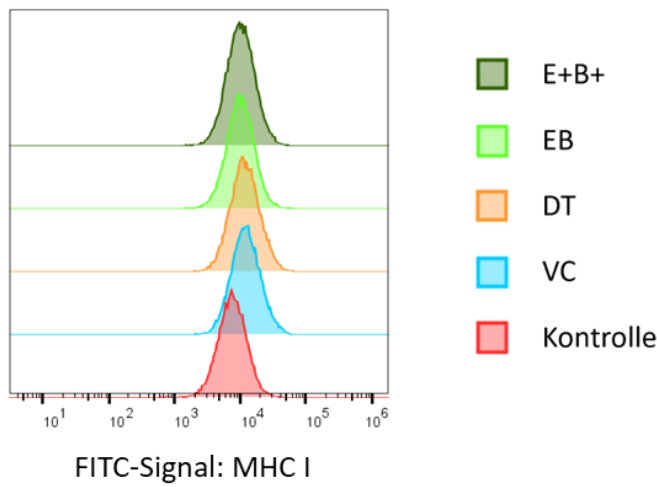
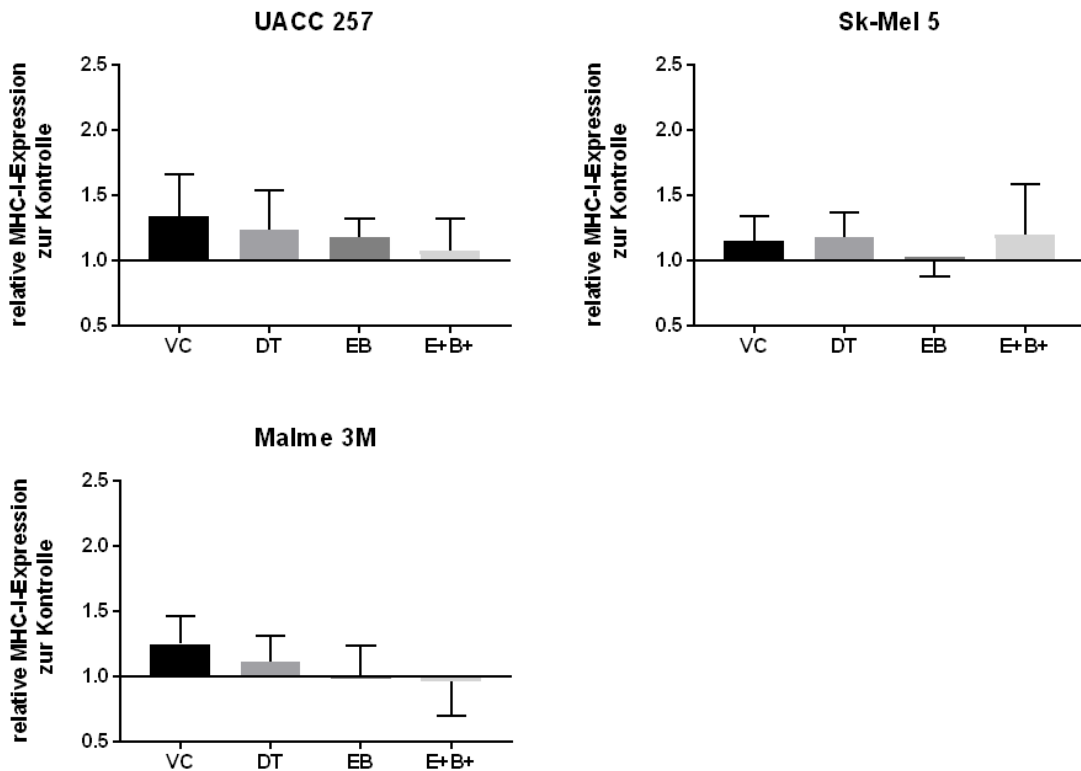
A**B**

Abbildung 12: Steigerung der MHC-I-Expression unter 72 h Inhibitorbehandlung

A: Repräsentative Histogramme der mit Inhibitoren behandelten Zellen. Die mit Inhibitoren behandelten Zellen (Zeile 1-4) zeigen einen Anstieg des FITC-Signals im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Zeile 5).

B: Mittelwerte aus drei Messungen mit Standardabweichung. Auf der y-Achse ist die Veränderung des geometrischen Mittelwerts von MHC I abzüglich der Isotypenkontrolle gegenüber der unbehandelten Kontrolle dargestellt.

3.3.3 Erhöhung der PD-L1-Expression unter IFN- γ und Verminderung unter Inhibitorbehandlung

Die Durchflusszytometrie-Färbung von PD-L1 wurde als Kombinationsfärbung zusammen mit der MHC-I-Färbung durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden hier ebenfalls 24 Stunden mit IFN- γ behandelte Zellen (200 U/ml) verwendet. Unter IFN- γ -Behandlung zeigten Malme 3M und UACC 257 einen deutlichen Anstieg der PD-L1-Expression und Sk-Mel 5 eine leichte Erhöhung. Die Veränderungen bei den mit Inhibitoren behandelten Zellen fielen geringer aus. Hier verhielten sich Malme 3M und UACC 257 erneut ähnlich und zeigten eine Verminderung der PD-L1-Expression. Lediglich auf Sk-Mel 5 kam es zu einer Erhöhung der PD-L1-Expression.

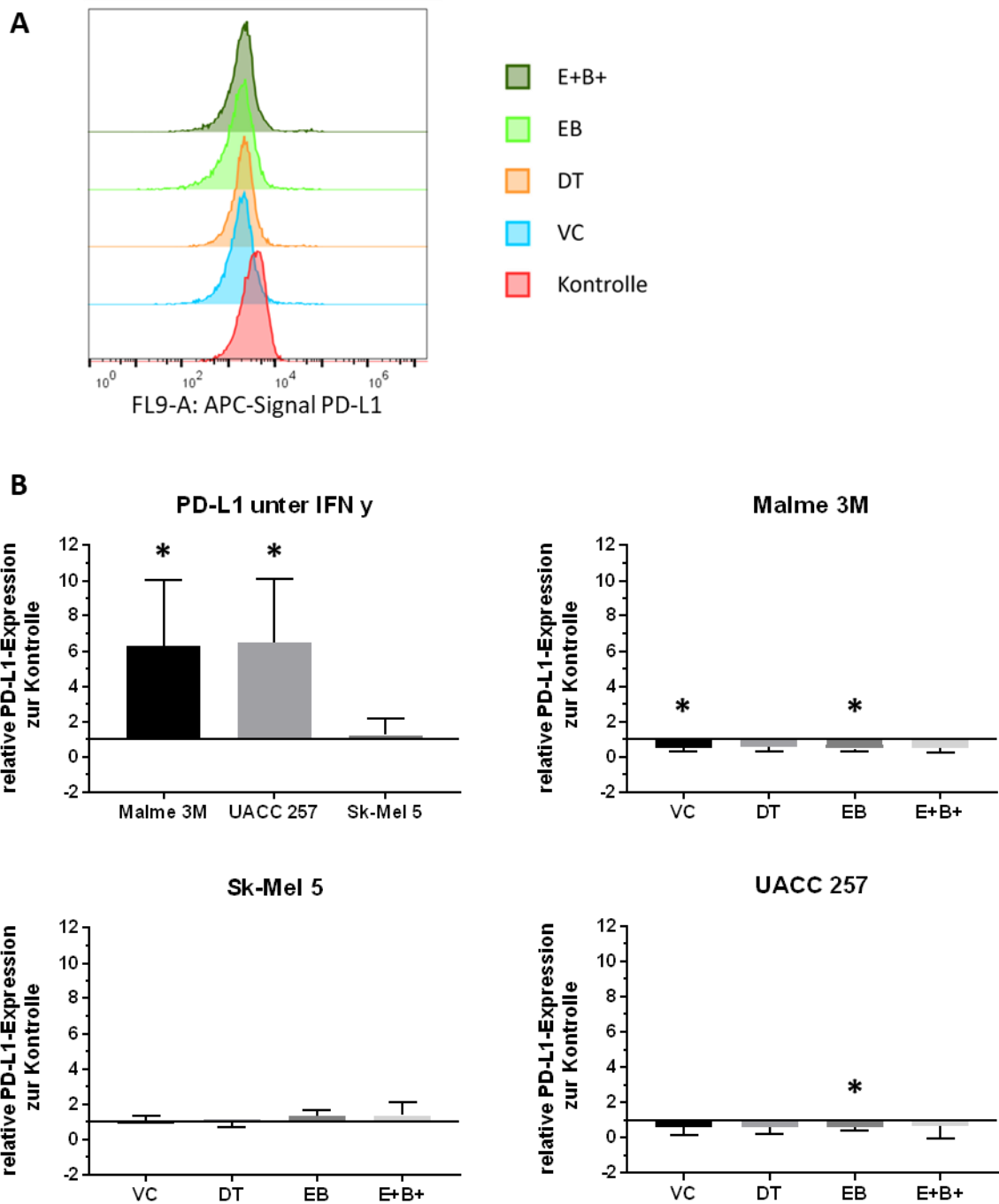


Abbildung 13: Erhöhung der PD-L1-Expression unter IFN- γ und Verminderung unter Inhibitoren

A: repräsentatives Histogramm der PD-L1-Expression auf mit Inhibitoren behandelten Malme 3M Zellen

B: Auf der y-Achse ist die Veränderung des geometrischen Mittelwerts von PD-L1 abzüglich der Isotypenkontrolle gegenüber der unbehandelten Kontrolle dargestellt. (*: statistisch signifikant, $p < 0,05$)

PD-L1 unter 24 h 200 U/ml IFN- γ . Mittelwerte aus zwei Messungen mit Standardabweichung.

PD-L1 unter 72 h Inhibitorbehandlung. Mittelwerte aus drei Messungen mit Standardabweichung.

3.3.4 Einfluss der Inhibitoren auf den zellulären ATP-Gehalt

Mithilfe der Quinacrine-Färbung konnte der ATP-Gehalt der Zellen analysiert werden. Als Positivkontrolle wurde das immunogenen Zelltod vermittelnde Bortezomib, ein Proteasom-Inhibitor, verwendet [97]. Ferner wurde in diesem Experiment zusätzlich die Melanomzelllinie A375 verwendet. Unter Bortezomib reduzierte sich in Sk-Mel 5 und A375 der Quinacrine-Gehalt deutlich. Während die Inhibitorbehandlung in UACC 257 und Sk-Mel 5 eine leichte Verminderung von Quinacrine bedingte, kam es bei Malme 3M und A375 zu einer Erhöhung.

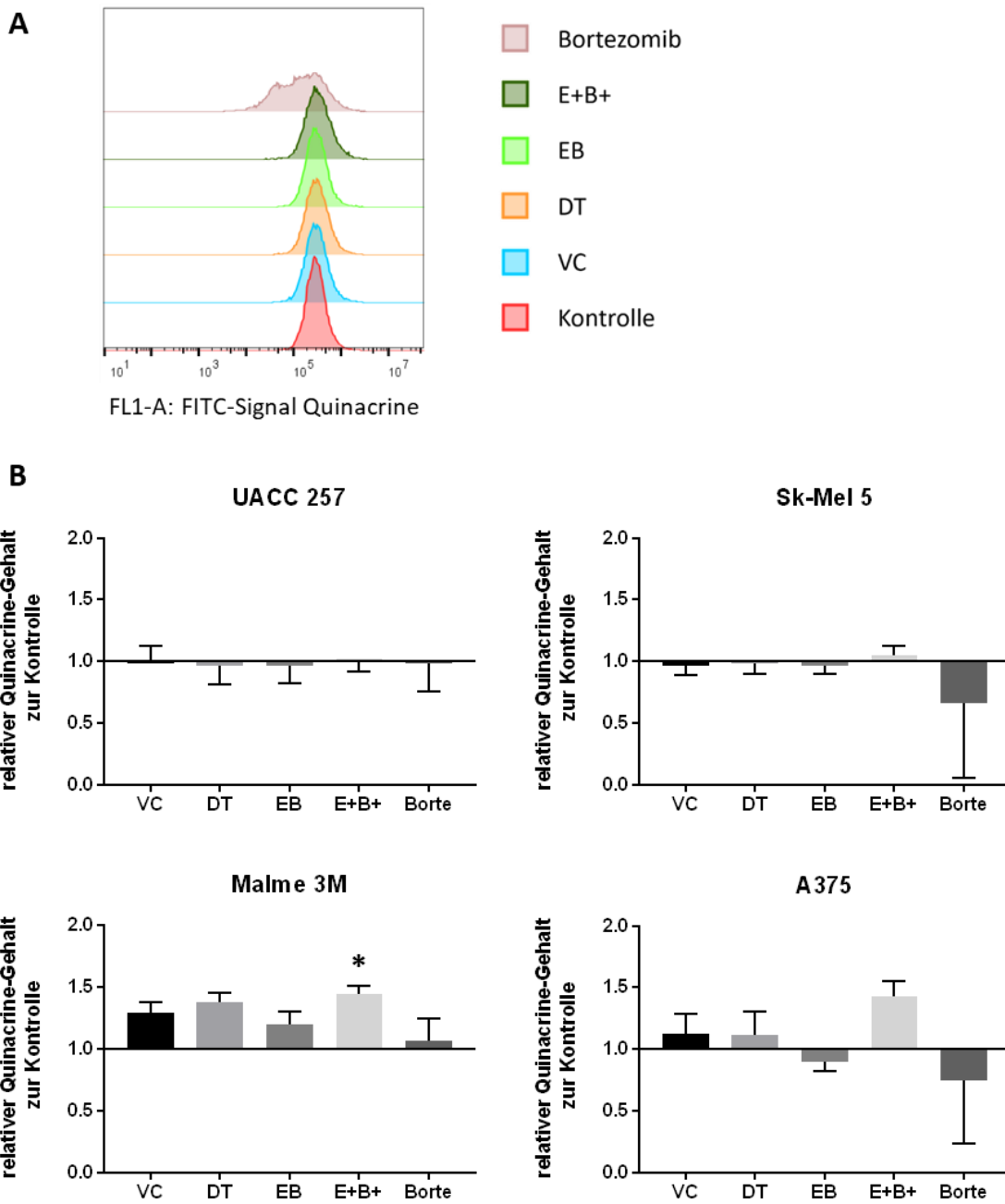


Abbildung 14: Quinacrine-Färbung

Die Zellen wurden 24 h mit Inhibitoren behandelt.

A: Quinacrine-Färbung mit Sk-Mel 5, repräsentative Histogramme der mit Inhibitoren behandelten Zellen. Die Behandlung mit Bortezomib (Zeile 1) führt zu einer Abnahme des FITC-Signals. Zwischen Inhibitorbehandlung (Zeile 2-5) und der Kontrolle (Zeile 6) sind keine wesentlichen Unterschiede sichtbar.

B: Mittelwerte aus drei Messungen mit Standardabweichung. Auf der y-Achse ist die Veränderung des geometrischen Mittelwerts von Quinacrine abzüglich der ungefärbten Kontrolle gegenüber der unbehandelten Kontrolle dargestellt. (*: statistisch signifikant, $p < 0,05$)

3.3.5 Keine Ekto-Calreticulin-Expression unter Inhibitorbehandlung

Ekto-Calreticulin ist Calreticulin, welches auf der Zelloberfläche präsentiert wird [104]. Dies ist wichtig für die Vermittlung des immunogenen Zelltodes [104]. Als Positivkontrolle wurde hier erneut Bortezomib verwendet. Bortezomib-Behandlung führt zu Ekto-Calreticulin-Expression [121].

3.3.5.1 Darstellung von Ekto-Calreticulin mithilfe des Calreticulin-Fluoreszenz-Fusionsproteins

Die Zellen mit dem Calreticulin-Fluoreszenz-Fusionsprotein wurden nach Zugabe der Inhibitoren 72 Stunden unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Insbesondere nach etwa 24 Stunden konnte auf den mit Bortezomib behandelten Zellen die Präsentation von Ekto-Calreticulin beobachtet werden, während in den übrigen Zellen unter Inhibitorbehandlung keine derartigen Effekte auftraten. Die mit Bortezomib behandelten Zellen exprimierten Ekto-Calreticulin nur für eine kurze Zeit und gingen danach im Regelfall in den Zelltod. In Abbildung 15 sind beispielhaft Zellen zu den Zeitpunkten $t = 0$ h und $t = 24$ h dargestellt.

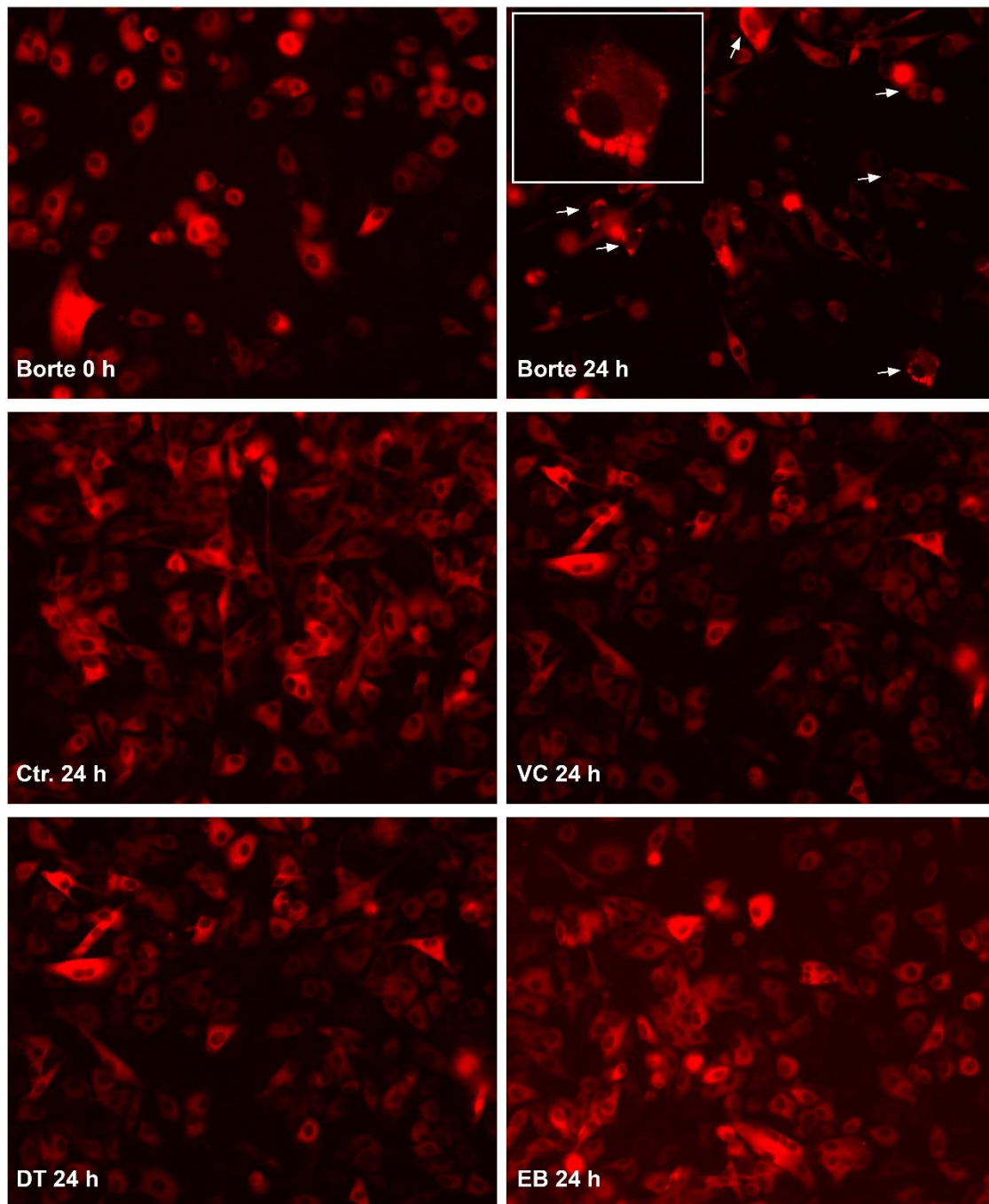


Abbildung 15: Ekto-Calreticulin-Expression

Fotos von UACC-257-Zellen, transduziert mit Calreticulin-Fluoreszenz-Fusionsprotein.

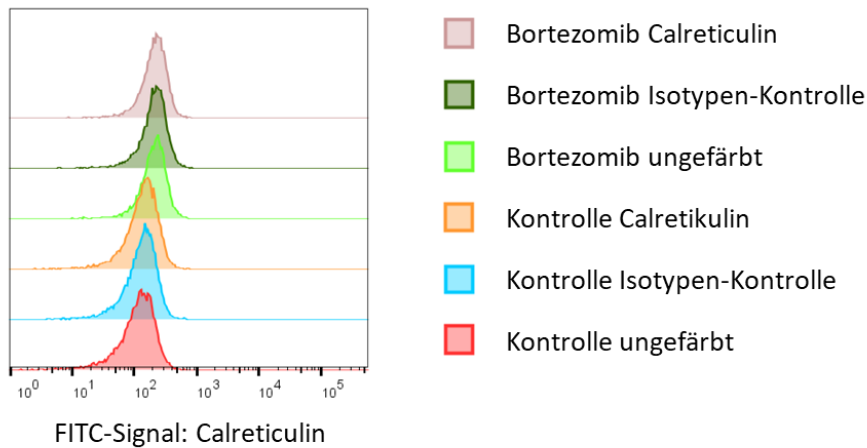
Obere Zeile: Mit Bortezomib behandelte Zellen zum Zeitpunkt 0 h bzw. 24 h. Zellen, die Ekto-Calreticulin exprimieren, sind mit Pfeilen markiert. Eine Zelle ist exemplarisch vergrößert.

Weitere Zeilen: Kontrolle bzw. mit Inhibitoren behandelte Zellen nach 24 h; keine Ekto-Calreticulin-Expression.

3.3.5.2 Keine Ekto-Calreticulin-Expression unter Inhibitorbehandlung

Um quantitative Rückschlüsse auf die Ekto-Calreticulin-Expression zu ziehen, wurde eine Durchflusszytometrie-Färbung für Calreticulin durchgeführt. Auch hier wurde als zusätzliche Zelllinie A375 verwendet. Unter Inhibitorbehandlung konnte keine Erhöhung der Calreticulin-Expression gezeigt werden.

A



B

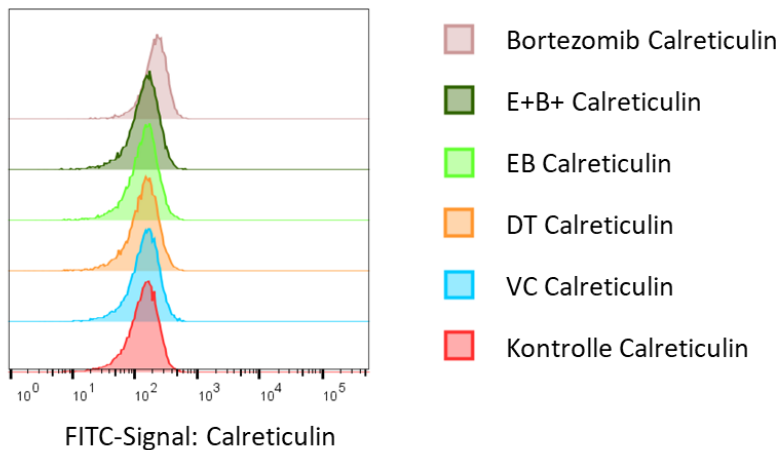


Abbildung 16: Calreticulin unter 24 h Inhibitorbehandlung

A: Repräsentative Histogramme der mit Bortezomib behandelten Zellen (UACC 257). Zellen, die mit Bortezomib behandelt wurden, haben unabhängig von der Färbung ein höheres FITC-Signal als die Kontrolle.

B: Repräsentative Histogramme der mit Inhibitoren behandelten Zellen (UACC 257). Zwischen den mit Inhibitoren behandelten Zellen und der Kontrolle zeigen sich keine Unterschiede im FITC-Signal. Lediglich die mit Bortezomib behandelten Zellen haben ein etwas höheres Signal, welches aber dem in A gezeigten Grundlevel entspricht.

3.3.5.3 Kein ER-Stress unter Inhibitorbehandlung

Die mit dem ATF-Reporter transduzierten Zellen wurden nach 24-stündiger Inhibitorbehandlung auf eine ATF-Expression untersucht. Wie in Abbildung 17 zu sehen ist, führte Bortezomib zu deutlichem ER-Stress. Unter Inhibitorbehandlung konnten allenfalls minimale Effekte gezeigt werden. Aufgrund des deutlichen Signalunterschieds zwischen Bortezomib und den mit Inhibitoren behandelten Zellen ist anzunehmen, dass die Inhibitorbehandlung zu keinem ER-Stress führt.

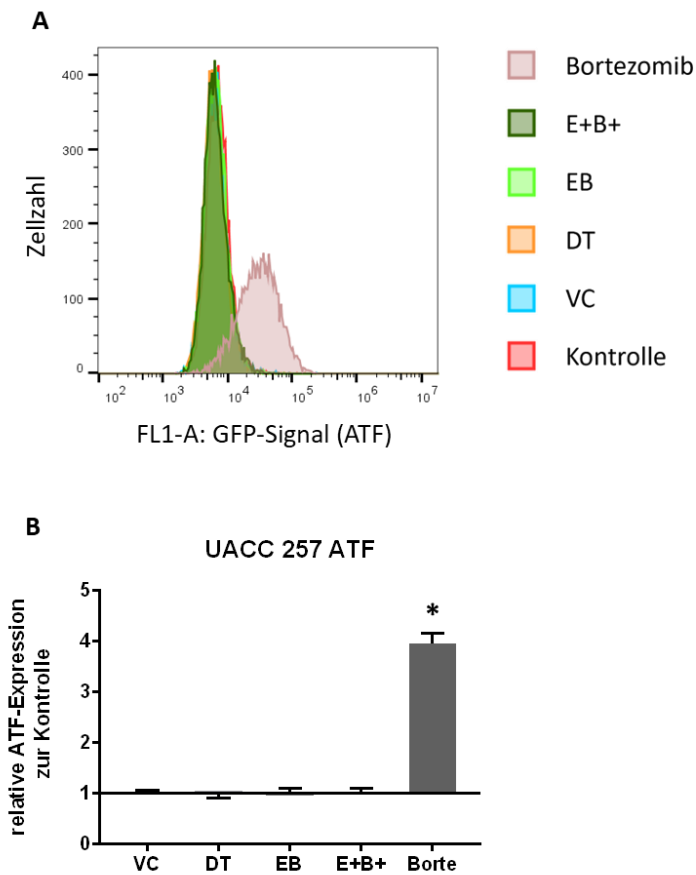


Abbildung 17: UACC-257-Zellen mit ATF-Reporter unter Inhibitorbehandlung

Die Zellen wurden 24 h mit Inhibitoren behandelt.

A: Repräsentative Histogramme der mit Inhibitoren behandelten Zellen. Während zwischen unbehandelten Kontrolle und mit Inhibitoren behandelten Zellen keine Unterschiede im Signal zu erkennen sind (linke, sich überlagernde Spitzen), zeigt die Positivkontrolle mit Bortezomib einen deutlichen Anstieg des Signals (rechte Spitze).

B: Mittelwerte aus zwei Messungen mit Standardabweichung. Auf der y-Achse ist die Veränderung des geometrischen Mittelwerts von ATF gegenüber der unbehandelten Kontrolle dargestellt. (*: statistisch signifikant, $p < 0,05$)

4 Diskussion

Die Einführung der zielgerichteten Therapie stellte einen erheblichen Fortschritt in der Therapie des Melanoms dar. In den letzten Jahren wurde zudem mit der Immuntherapie eine weitere neue Therapiesäule zur Behandlung des fortgeschrittenen Melanoms etabliert. Aktuell stellt sich aufgrund der Vielzahl der verfügbaren Therapien für die behandelnden Ärzte die Frage: Was ist die beste Behandlungsstrategie für den Patienten? Ferner stellt sich die Frage, welche Therapie sich langfristig durchsetzen wird: zielgerichtete Therapie, Immuntherapie oder gar eine Kombination aus beiden? Die deutsche S3-Leitlinie gibt darauf noch keine eindeutige Antwort. Dort heißt es: „Bei BRAF-V600-Mutation soll eine Therapie mit einem BRAF-Inhibitor in Kombination mit einem MEK-Inhibitor oder eine Checkpoint-Inhibitor-Therapie (PD-1 Monotherapie oder PD-1 + CTLA-4 Antikörpertherapie) durchgeführt werden. Aktuell liegen keine Daten zur besten sequentiellen Therapie von BRAF/MEK-Inhibitoren und Checkpoint-Inhibitoren vor.“ [36]. Rezente Arbeiten legen jedoch nahe, dass Immuntherapie als Erstlinientherapie des fortgeschrittenen Melanoms zu bevorzugen ist [122, 123]. Die wegweisende Frage auf Seiten der zielgerichteten Therapie lautet: Blockiert diese Therapieform im Melanom lediglich den MAPK-Signalweg, der unter dem herrschenden Selektionsdruck umgangen werden kann oder führt sie zu immunologischen Veränderungen, die eine eigenständige Wirkkomponente darstellen? Um sich dieser Frage zu nähern, werden die folgenden Aspekte diskutiert:

Wie wirken sich die Veränderungen der Oberflächenmoleküle MHC I und PD-L1 auf die Immunogenität aus? Welche Bedeutung hat der immunogene Zelltod für ein Langzeitansprechen unter der Therapie? Bestehen Unterschiede in der Wirkung der MAPK-Inhibitorkombinationen? Wie sind die Ergebnisse dieser Arbeit im Kontext einer Kombinationstherapie aus zielgerichteter Therapie und Immuntherapie zu werten?

4.1 Einfluss der MHC-I-Expression auf die Immunogenität des Melanoms

Die Herabregulation der MHC-I-Expression kann die Immunevasion des Melanoms begünstigen [78, 79]. Die in dieser Arbeit beobachtete Erhöhung der MHC-I-Expression unter kombinierter MAPK-Inhibitorbehandlung ist mit der Literatur konsistent. So konnten auch andere Arbeitsgruppen, wie Liu et al., 2015, ebenfalls eine Erhöhung der MHC-I-Expression unter kombinierter MAPK-Inhibitortherapie *in vitro* nachweisen [124]. Dies ist z.T. mit den Beobachtungen von Frederick et al., 2013, vereinbar [125]. Auch sie zeigten einen Anstieg der MHC-I-Expression, welcher zwar nicht signifikant wurde, allerdings etwa in der Größenordnung des in dieser Arbeit beobachteten Anstiegs lag [125]. Sie wiesen zudem in Tumorpräparaten unter zielgerichteter Therapie vermehrt Tumor-infiltrierende CD8+ T-Lymphozyten nach [125]. Jedoch zeigten sie auch einen Anstieg der PD-L1-Expression, was in Kap. 4.2 diskutiert wird [125]. Houdt et al., 2008, zeigten ebenfalls, dass Melanome mit hoher MHC-I-Expression vermehrt Tumor-infiltrierende Lymphozyten aufweisen und dass Patienten, deren Melanome eine intakte MHC-I-Expression besitzen, ein verbessertes progressionsfreies Überleben aufweisen [126]. Daher ist anzunehmen, dass sich eine Erhöhung der MHC-I-Expression durch kombinierte MAPK-Inhibitortherapie, wie sie in dieser Arbeit gezeigt wurde, positiv auf das Überleben von Melanompatienten auswirkt.

Bradley et al., 2015, untersuchten Mechanismen der MHC-I-Expression im Kontext der BRAF-Mutation [127]. Es wurde gezeigt, dass der BRAF Status eines Melanoms Auswirkungen auf die MHC-I-Expression hat [127]. Sie konstatierten eine vermehrte Expression von MHC I unter kombinierter MAPK-Inhibitortherapie im BRAF-V600E-mutierten Melanom [127]. Ferner zeigten sie, dass durch Überexpression von BRAF-V600E in Melanozyten die MHC-I-Expression stark verringert wird [127]. Dies geschieht durch eine Internalisierung von MHC I [127]. Insofern revidiert mutmaßlich die kombinierte MAPK-Inhibitortherapie den Effekt der BRAF-Mutation auf die MHC-I-Expression [127]. Garrido und Paco et al., 2012, zeigten in diesem Kontext, dass die Reaktivierung eines MHC-I-Haplotyps zu dauerhafter Tumorkontrolle im Mausmodell führt, wohingegen bei Zelllinien, in denen keine MHC-I-Reaktivierung durchgeführt wurde, Tumorstadium beobachtet wurde [128]. In der Zelllinie mit MHC-I-Reaktivierung kam es *in vitro* zu einem

Zellzyklusarrest gegenüber den anderen Zelllinien [128]. Ferner führte eine verminderte MHC-I-Expression zu erhöhten Invasions- und Migrationsraten *in vitro* [128]. Daher folgerten sie, dass MHC-I-Moleküle eine Rolle als Tumorsuppressorgene im Melanom spielen [128]. Im Kontext der in Kap. 1.4 beschriebenen drei Stufen der Tumorummunogenität – Elimination, Immungleichgewicht und Immunevasion – bedeutet dies, dass die in dieser Arbeit gezeigte Erhöhung der MHC-I-Expression unter kombinierter MAPK-Inhibitortherapie das Melanom möglicherweise wieder in ein früheres Stadium der Tumorummunogenität überführt, in dem es vom Immunsystem besser bekämpft werden kann [73, 77, 78].

4.2 Einfluss der PD-L1-Expression auf die Immunogenität des Melanoms

Die PD-L1-Expression wird durch diverse proinflammatorische Zytokine, wie IFN- γ , TNF α , IL-4 und IL-10 induziert [129]. Das Potential der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien PD-L1 zu exprimieren, wurde eingangs mit dem potentesten Stimulanz, IFN- γ , überprüft [129]. UACC 257 und Malme 3M reagierten mit einer massiven Zunahme der Expression um jeweils etwa 530 %, Sk-Mel 5 mit einer mäßigen Steigerung um 23 %. Unter kombinierter MAPK-Inhibitorbehandlung zeigte sich hingegen eine Abnahme der PD-L1-Expression.

Eine Verminderung der PD-L1-Expression unter Inhibitoren des MAPK Signalweges konnten Yamamoto et al., 2009, im anaplastischen großzelligen Lymphom und im Hodgkin Lymphom beobachten [130]. Zudem zeigten sie eine erhöhte PD-L1-Expression bei Aktivierung von ERK, sodass auf eine Abhängigkeit der PD-L1-Expression vom ERK-Signalweg in obigen Tumoren gefolgert wurde [130]. Dieser Regulationsmechanismus könnte möglicherweise auch für das Melanom gelten. In den Arbeiten von Lui et al., 2015, und Jiang et al., 2013, wurde ebenfalls analog zu der hier vorliegenden Arbeit gezeigt, dass es unter kombinierter MAPK-Inhibitortherapie zu einer Verminderung der PD-L1-Expression kommt [124, 131]. Ferner zeigten Lui et al., 2015, dass Klone, die gegenüber BRAF Inhibitoren resistent sind, eine erhöhte PD-L1-Expression aufweisen

[124]. Daraus schlossen sie, dass der MAPK-Signalweg zumindest einen Teil des Regulationsmechanismus der PD-L1-Expression darstellt [124]. Sie schlugen ferner die PD-L1-Expression als einen Marker für das Ansprechen auf eine kombinierte MAPK-Inhibitortherapie vor [124]. Eine Regulation von PD-L1 über den MAPK-Signalweg konnte auch in anderen Tumoren gezeigt werden: Ma et al., 2019, zeigten, dass die PD-L1-Expression im Nierenkarzinom über EGFR und ERK1/2 reguliert wird [132]. Eine Aktivierung des Signalweges führte zu einer erhöhten PD-L1-Expression [132]. Ma et al., 2019, zeigten ebenfalls eine Regulation von PD-L1 über ERK1/2 im nichtkleinzelligen Lungenkarzinom [133].

Bereits vor der Einführung der modernen Immuntherapie wurde der Einfluss der PD-L1-Expression kontrovers in der Literatur diskutiert. Je nach Studie war sie entweder mit einer schlechteren oder gleichbleibenden Prognose assoziiert [75, 134, 135]. Hino et al., 2010, zeigten, dass Melanome mit hoher PD-L1-Expression eine höhere vertikale Tumordicke aufweisen als solche mit einer niedrigen Expression [134]. Außerdem hatten Melanompatienten, deren Tumorproben eine hohe PD-L1-Expression aufwiesen, eine schlechtere Gesamtüberlebensrate [134]. Gadiot et al., 2011, hingegen fanden keine signifikante Korrelation zwischen der PD-L1-Expression und dem Therapieerfolg im Melanom [135]. Ähnliche Ergebnisse zeigten Obeid et al., 2016 [75]. Sie konnten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der PD-L1-Expression auf Melanomzellen und dem Gesamtüberleben feststellen [75].

PD-L1-Expression führt ferner zu einer gesteigerten Apoptoserate von T-Zellen [136]. Insofern kann unter Berücksichtigung obiger Quellen die PD-L1-Expression als immunsuppressiv betrachtet werden, sodass die in dieser Arbeit gezeigte Verminderung derselben unter kombinierter MAPK-Inhibitortherapie einen Überlebensvorteil für Melanompatienten darstellen könnte, da die Immunsuppression aufgrund der verminderten PD-L1-Expression reduziert würde. Demgegenüber ist eine hohe PD-L1-Expression vor Beginn einer Immuntherapie vorteilhaft [137]. Daud et al., 2016, untersuchten in ihrer Arbeit Patienten der KEYNOTE-001-Studie, einer Phase-Ib-Studie mit dem PD-1-Antikörper Pembrolizumab, auf einen Zusammenhang zwischen PD-L1-Expression, Therapieansprechen und Gesamtüberleben [137]. Sie klassifizierten die PD-L1-Expression mittels

des MEL Scores von 0-5, wobei ein Wert von größer bzw. gleich 2 als PD-L1-positiv gewertet wurde [137]. Tumoren mit einer hohen PD-L1-Expression sprachen deutlich besser auf die Therapie an als solche mit einer niedrigen Expression: Bei einem MEL Score von 4 betrug die objektive Ansprechrates (ORR) 57 %, bei einem Score von 0 nur 8 % [137]. Ebenfalls wiesen Patienten mit einer hohen PD-L1-Expression bessere neun-monatige progressionsfreie Überlebensraten (PFS) und zwölf-monatige Gesamtüberlebensraten (OS) auf [137]. Allerdings können auch Patienten mit PD-L1-negativen Melanomen dauerhaft von einer Immuntherapie profitieren [137]. In diesem Kontext kommt neben der PD-L1-Expression präexistenten intratumoralen CD8+ T-Zellen eine entscheidende Relevanz zu, die bei Applikation von PD-1-Inhibitoren den Tumor bekämpfen können, wie Tume et al., 2014, zeigten [138].

Die Auswirkungen aus diesen Beobachtungen auf eine mögliche Kombination von zielgerichteter Therapie mit Immuntherapie werden im Kap. 4.5 weiter diskutiert.

4.3 Immunogener Zelltod und Langzeitansprechen unter kombinierter MAPK-Inhibitortherapie

Kroemer, 2013, postuliert, dass immunogener Zelltod zu Langzeitansprechen unter einer antitumoralen Therapie führt [97]. Dies konnte unter kombinierter zielgerichteter Therapie im Regelfall nicht beobachtet werden [139, 140]. So beträgt die Fünf-Jahres-Überlebensrate unter Dabrafenib und Trametinib in einer gemeinsamen Analyse der COMBI-d- und COMBI-v-Studie 34 % und das progressionsfreie Überleben nach fünf Jahren 19 % [140]. Damit ist vereinbar, dass in dieser Arbeit keine Aspekte des immunogenen Zelltodes, wie ER-Stress oder Ekto-Calreticulin-Expression, unter Inhibitorbehandlung beobachtet werden konnten. Es wird angenommen, dass Ekto-Calreticulin-Expression, ATP-Sekretion, ER-Stress und Freisetzung von HMGB1 gute Vorhersagen über das Potential von Medikamenten treffen, immunogenen Zelltod auszulösen [97, 104]. Daher legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass unter kombinierter zielgerichteter Therapie kein immunogener Zelltod auftritt. Unter kombinierter MAPK-Inhibitorbehandlung kam es weder zu einer Ekto-Calreticulin-Expression noch zu einer ATF-Expression oder

nennenswerter ATP-Sekretion. Dies sollte jedoch durch weitere Analysen mit anderen Zelllinien und Inhibitorkonzentrationen bestätigt werden. Das Nichtvorhandensein des immunogenen Zelltodes könnte ein Grund für die eher kurzen Ansprechdauern unter zielgerichteter Therapie sein.

Zellen, die nicht-immunogenen Zelltod durchlaufen, können sich antiinflammatorisch auf ihre Umgebung auswirken [93]. So wird die Sekretion von antiinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin 10 (IL-10) begünstigt und die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, beispielsweise Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α), Interleukin 1 und 12 (IL-1; IL-12), vermindert [93]. Dies könnte im Kontext der zielgerichteten Therapie dazu führen, dass Tumorzellen, die sich in der Nachbarschaft von apoptotischen Zellen befinden und eine gewisse Resistenz gegenüber MAPK-Inhibitoren aufweisen, einen zusätzlichen Schutz durch die lokale Immunsuppression erfahren. Aus diesen Zellpopulationen könnten sich durch weitere Anpassungen dauerhaft therapieresistente Zellen entwickeln, die in der Folgezeit expandieren.

In Subgruppen konnte jedoch unter kombinierter zielgerichteter Therapie ein gutes Langzeitüberleben gezeigt werden [140, 141]. Im Falle eines vollständigen Ansprechens auf Dabrafenib und Trametinib betrug die Fünf-Jahres-Überlebensrate beachtliche 71 % [140]. Insbesondere Patienten mit niedrigen LDH-Spiegeln profitierten von der Therapie [140]. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch unter Vemurafenib und Cobimetinib von Lewis, et al., 2019, gezeigt werden [141]. Möglicherweise weisen die Tumoren mit komplettem Ansprechen eine geringere genetische Heterogenität und somit keine präexistenten resistenten Subklone auf. Hier sind weitere Untersuchungen gefragt, um erfolgsversprechende Patienten für eine zielgerichtete Therapie bereits frühzeitig zu selektieren.

4.4 Wirkunterschiede zwischen den Inhibitor kombinationen

Die Inhibitor titration stellt einen der wesentlichen Schritte dieser Arbeit dar, da sich alle späteren vergleichenden Untersuchungen zwischen den Inhibitor kombinationen

Vemurafenib und Cobimetinib, Dabrafenib und Trametinib sowie Encorafenib und Binimetinib auf diesen Schritt stützen. Insbesondere der MTS-Assay reagierte sehr empfindlich auf minimale Veränderungen. Da es sich um ein biologisches System handelt, ist es nicht möglich, in ihrer Wirkung absolut identische Inhibitorkonzentrationen einzustellen. Die berechnete Viabilität war abhängig von der Ausgangszellzahl in den einzelnen *Wells* und deren Wachstum während der Inkubationsphase. Ferner wird sie von der zugegebenen Inhibitorkonzentration, der Menge an MTS-Reagenz und der Inkubationszeit mit MTS-Reagenz beeinflusst. Um Störungen bzgl. der Inhibitorkonzentration zu minimieren, wurden zu Beginn große Mengen Inhibitoren geordert, verdünnt und aliquotiert. Darauf konnte in allen folgenden Experimenten zurückgegriffen werden. Ferner wurde durch die Kombination zweier Analysen, der Viabilität der Zellen im MTS-Assay und der Zellzyklusanalyse, die Genauigkeit und Objektivität verbessert.

Es wurden Inhibitorkonzentrationen verwendet, die die Viabilität der Melanomzellen einschränken, worunter jedoch nur begrenzt Zelltod auftritt. Somit konnten bei den weiteren Experimenten Veränderungen von Immunogenitätsparametern auf lebenden Zellen untersucht werden. In der Klinik werden jedoch Konzentrationen eingesetzt, die zu Zelltod führen. Es ist möglich, dass sich immunologische Effekte unter höheren Inhibitorkonzentrationen anders darstellen. Um auch diesen Aspekt zu berücksichtigen, wurde nach Möglichkeit eine weitere, höhere Inhibitorkonzentration in den Experimenten verwendet.

Auf molekularer Ebene konnte in dieser Arbeit kein Wirkunterschied festgestellt werden: So führten alle drei Inhibitorkombinationen zu einer gleichstarken und deutlichen Verminderung der Phosphorylierung von ERK, zumindest in der sensitiven Melanomzelllinie Malme 3M. Bei UACC 257 und Sk-Mel 5 kam es zu geringfügigen Unterschieden zwischen den Inhibitorkombinationen, dies könnte jedoch durch minimale Schwankungen in einem Bereich der submaximalen Inhibition hervorgerufen worden sein.

In der klinischen Anwendung haben die Inhibitoren vergleichbare Wirkungen [142]. In ihrer Meta-Analyse zeigten Consoli et al., 2019, dass sich die in dieser Arbeit untersuchten Kombinationen – Vemurafenib und Cobimetinib, Dabrafenib und Trametinib sowie

Encorafenib und Binimetinib – nicht signifikant im Gesamtüberleben (OS), im progressionsfreien Überleben (PFS) und in der Gesamtansprechrate (ORR) unterscheiden [142]. Dazu analysierten sie jeweils die Phase-III-Zulassungsstudien der jeweiligen Medikamente [142]. Wie bereits im Kap. 4.3 beschrieben, ist auch das Langzeitüberleben unter den Inhibitorkombinationen vergleichbar. So beträgt die Drei-Jahres-Überlebensrate unter Encorafenib und Binimetinib 47 % und unter Dabrafenib und Trametinib 44 % [140, 143]. Insofern ist es nachvollziehbar, dass in dieser Arbeit keine Unterschiede in der Immunogenität der drei Inhibitorkombinationen beobachtet werden konnten. Allerdings fehlen zurzeit klinische Studien, die die einzelnen Kombinationen direkt miteinander vergleichen.

4.5 Auswirkungen auf potentielle Kombination mit Immuntherapie

Sade-Feldman et al., 2017, untersuchten zwei unabhängige Kohorten, die beide mit Immuncheckpoint-Inhibitoren behandelt wurden: die eine mit anti-CTLA-4, die andere mit anti-PD-1 [144]. Auf der Suche nach Prädiktoren für ein Langzeitansprechen unter Immuntherapie bzw. zur Resistenzentwicklung gegenüber derselben untersuchten sie Defekte in β_2 -Mikroglobulin (β_2 M), einer wichtigen Komponente der MHC-I-Antigenpräsentation, die Teil des Peptidladekomplexes ist und deren Funktionsverlust oder Fehlen zu einem Verlust der MHC-I-Expression führen kann (siehe hierzu auch Kap. 1.4) [89, 144, 145]. Sie demonstrierten, dass Defekte in β_2 M signifikant bei Nichtansprechen auf eine anti-CTLA-4-Therapie erhöht und mit schlechterem Überleben assoziiert sind [144]. Insbesondere war der Verlust der β_2 M-Heterozygotie signifikant in Nicht-Ansprechern um etwa das Dreifache (28,9 % vs. 11,1 %) erhöht [144]. Ähnliche Ergebnisse lieferte die Analyse der zweiten Kohorte, die mit anti-PD-1 behandelt wurde: Der Verlust der β_2 M-Heterozygotie korrelierte signifikant mit einem schlechteren Gesamtüberleben [144]. Insofern könnte der in dieser Arbeit gezeigte Anstieg der MHC-I-Expression unter kombinierter MAPK-Inhibitortherapie zu einem besseren und verlängerten Ansprechen unter Immuntherapie führen.

Inzwischen liegen die Ergebnisse der COMBI-i-Studie vor [146]. Die Phase-III-Studie kombiniert zielgerichtete Therapie und Immuntherapie [146]. Dabei wurden der anti-PD-1-Antikörper Spartalizumab sowie Dabrafenib und Trametinib gegenüber einer kombinierten zielgerichteten Therapie aus Dabrafenib und Trametinib getestet [146, 147]. Die Studie verlief negativ, es konnte keine statistisch signifikante Verbesserung des progressionsfreien Überlebens (PFS) gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen werden [146]. Das PFS betrug unter der Tripple-Therapie 16,2 Monate, in der Kontrollgruppe 12 Monate [146]. In einer weiteren Studie, der IMspire150-Studie, wurde der PD-L1-Inhibitor Atezolizumab zusammen mit Vemurafenib und Cobimetinib appliziert, die Kontrollgruppe erhielt Vemurafenib und Cobimetinib [148]. Hier konnte das PFS von 10,6 auf 15,1 Monate verbessert werden [148]. Dies stellt jedoch keinen wesentlichen Fortschritt zu den bereits etablierten Therapien dar: So betrug das PFS in der COLUMBUS-Studie unter Encorafenib und Binimetinib 14,9 Monate [143]. Es bleibt abzuwarten, wie sich die Fünf-Jahres-Überlebensraten in der COMBI-i- und IMspire150-Studie entwickeln werden. Weiterhin ist fraglich, ob sich diese oder andere Kombinationstherapien in der klinischen Anwendung durchsetzen werden. Der etwaige Überlebensvorteil gegenüber den derzeit etablierten Therapien müsste auch in Relation zu den Nebenwirkungen und den erhöhten Therapiekosten gesetzt werden.

Wie in Kap. 4.4 beschrieben, wurden in dieser Arbeit Inhibitorkonzentrationen verwendet, unter denen nur begrenzt Zelltod auftritt. Dennoch konnte bereits hier eine Erhöhung von MHC I beobachtet werden. Insofern ist es möglich, dass bei einer Kombination aus zielgerichteter Therapie und Immuntherapie bereits eine geringe Dosis der zielgerichteten Therapie ausreicht, um die Immuntherapie damit zu *boostern*. Somit ließe sich möglicherweise ein besseres Wirkungs-Nebenwirkungsverhältnis erzielen.

Unter kombinierter Immuntherapie mit Nivolumab und Ipilimumab bzw. unter Nivolumab Monotherapie korreliert eine höhere PD-L1-Expression zwar mit einem besseren Überleben, allerdings konnte sich die PD-L1-Expression bislang nicht als alleiniger prognostischer Marker für ein Therapieansprechen etablieren [149-151]. Aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten Verminderung von PD-L1 ist es möglich, dass die Immuntherapie bei einer Kombination mit zielgerichteter Therapie nicht mehr ihr gesamtes Potential

entfalten könnte. Allerdings ist auch denkbar, dass für den Therapieerfolg der Immuntherapie eher die Ausgangslevel an PD-L1 relevant sind und dass es letztlich gleichgültig ist, ob PD-L1 durch einen Antikörper geblockt oder dessen Expression durch zielgerichtete Therapie reduziert wird. Zur abschließenden Klärung dieser Problemstellung und der Frage nach der potentiellen *Boosterung* einer Immuntherapie durch zielgerichtete Therapie bedarf es weiterer klinischer Studien. Anders als obige Studien, die von einer kombinierten zielgerichteten Therapie als Kontrolle ausgingen, sollten diese Studien eine kombinierte Immuntherapie als Basistherapie einsetzen, die mit einem zielgerichteten Therapeutikum oder Placebo kombiniert wird.

Neben einer simultanen Kombinationstherapie aus zielgerichteter Therapie und Immuntherapie kommt zur Therapie des fortgeschrittenen Melanoms auch eine sequentielle Therapie in Betracht, was derzeit im Rahmen von klinischen Studien, wie beispielsweise der SECOMBIT-Studie, untersucht wird [152]. Dabei handelt es sich um eine Phase-II-Studie, bestehend aus drei Therapie-Gruppen [152]. Als kombinierte zielgerichtete Therapie wurden Encorafenib und Binimetinib, als kombinierte Immuntherapie Ipilimumab und Nivolumab verwendet [152]. In Gruppe A wurde mit einer kombinierten zielgerichteten Therapie begonnen und bei Krankheitsprogress auf die Kombination aus Ipilimumab und Nivolumab umgestellt [152]. In Gruppe B wurde in umgekehrter Reihenfolge, also zuerst Immuntherapie und dann zielgerichtete Therapie, verfahren [152]. In Gruppe C wurde acht Wochen zielgerichtete Therapie appliziert, dann auf Immuntherapie umgestellt und bei Krankheitsprogress wieder zurück auf zielgerichtete Therapie gewechselt [152]. Derzeit liegen die 3-Jahres-Überlebensraten in den Gruppen B (63%) und C (60%) höher als in A (53%) [152]. Es bleibt abzuwarten, ob sich letztlich durch die initiale Applikation der zielgerichteten Therapie in Gruppe C ein Vorteil gegenüber Gruppe B ergibt [152]. Neben dem Therapieregime der SECOMBIT-Studie gibt es zahlreiche weitere Möglichkeiten einer sequentiellen Therapie. Hier sind weitere klinische Studien gefragt. Ein besonderes Augenmerk sollte bei der simultanen und sequentiellen Kombinationstherapie auf die Subgruppenanalysen gerichtet werden. So ließen sich möglicherweise Indikatoren für ein Therapieansprechen finden, womit eine personalisierte Therapie des fortgeschrittenen Melanoms etabliert werden könnte.

5 Zusammenfassung der Ergebnisse: Kombinierte MAPK-Inhibitortherapie hat einen begrenzten Effekt auf die theoretische Immunogenität des Melanoms

Die Einführung von zielgerichteter Therapie und Immuntherapie hat die Behandlungsmöglichkeiten des Melanoms revolutioniert. Jedoch profitieren viele Patienten nicht langfristig von diesen Therapien. Derzeit werden klinische Studien durchgeführt, die zielgerichtete Therapie und Immuntherapie miteinander kombinieren.

In dieser Arbeit wurden *in vitro* Untersuchungen an den drei BRAF-V600E-mutierten Melanomzelllinien UACC 257, Malme 3M und Sk-Mel 5 unter kombinierter MAPK-Inhibitortherapie durchgeführt. Es wurden die aus der klinischen Routine bekannten Kombinationen aus BRAF- und MEK-Inhibitor – Vemurafenib und Cobimetinib, Dabrafenib und Trametinib sowie Encorafenib und Binimetinib – verwendet. Es wurde untersucht, ob obige zielgerichtete Therapeutika einen Effekt auf immunologische Marker im Melanom haben und ob sich eine der Kombinationen in ihrer Wirkung signifikant von den übrigen unterscheidet.

Mittels MTS-Assay und Zellzyklusanalysen konnte eine konzentrationsabhängige Wirkung der Inhibitoren gezeigt und in ihrer Wirkung vergleichbare Inhibitorkonzentrationen eingestellt werden. Unter kombinierter MAPK-Inhibitortherapie zeigte sich ein begrenzter Effekt auf die theoretische Immunogenität des Melanoms. So konnte eine erhöhte MHC-I-Expression (+14 %) und eine verminderte PD-L1-Expression (-24 %) gezeigt werden. Die gewählten Dosen an Inhibitoren induzierten keinen ER-Stress. Ebenso konnte keine Ekto-Calreticulin-Expression auf lebenden Zellen nachgewiesen werden. Zwischen den drei Inhibitorkombinationen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Die in dieser Arbeit gezeigten begrenzten immunologischen Effekte unter kombinierter MAPK-Inhibitortherapie legen nahe, dass eine Kombination mit Immuntherapie in Teilen synergistisch wirken könnte. Hier sind die Ergebnisse weiterer Studien abzuwarten, die

zielgerichtete und Immuntherapie miteinander kombinieren, um ein tiefgreifenderes Verständnis bzgl. etwaiger Synergien zu generieren. Da zwischen den Inhibitorkombinationen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Immunogenität des Melanoms gefunden wurden, ist anzunehmen, dass sie sich grundsätzlich alle gleichermaßen für eine Kombination mit einer Immuntherapie eignen. Die gezeigte MHC-I-Erhöhung trat bereits bei geringen Inhibitorkonzentrationen auf. Möglicherweise genügt bei einer Kombination mit Immuntherapie bereits eine niedrige Dosis der zielgerichteten Therapie, um die Immuntherapie zu *boostern*. Um die Frage nach einer möglichen Kombinationstherapie fortwährend zu analysieren, sollten zusätzliche Aspekte der Immunogenität unter kombinierter MAPK-Inhibitorthherapie untersucht und die Inhibitortitration zum Vergleich der zielgerichteten Therapeutika weiter präzisiert werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), *Krebs in Deutschland für 2017/2018*. 2021(13. Ausgabe).
2. Ali, Z., N. Yousaf, and J. Larkin, *Melanoma epidemiology, biology and prognosis*. EJC Suppl, 2013. **11**(2): S. 81-91.
3. Chang, A.E., L.H. Karnell, and H.R. Menck, *The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: a summary of 84,836 cases from the past decade*. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. Cancer, 1998. **83**(8): S. 1664-78.
4. McGovern, V.J., et al., *The classification of malignant melanoma and its histologic reporting*. Cancer, 1973. **32**(6): S. 1446-57.
5. Gilchrest, B.A., et al., *The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation*. N Engl J Med, 1999. **340**(17): S. 1341-8.
6. Osterlind, A., K. Hou-Jensen, and O. Møller Jensen, *Incidence of cutaneous malignant melanoma in Denmark 1978-1982. Anatomic site distribution, histologic types, and comparison with non-melanoma skin cancer*. Br J Cancer, 1988. **58**(3): S. 385-91.
7. Davis, L.E., S.C. Shalin, and A.J. Tackett, *Current state of melanoma diagnosis and treatment*. Cancer Biol Ther, 2019. **20**(11): S. 1366-1379.
8. Agar, N. and A.R. Young, *Melanogenesis: a photoprotective response to DNA damage?* Mutat Res, 2005. **571**(1-2): S. 121-32.
9. Lin, J.Y. and D.E. Fisher, *Melanocyte biology and skin pigmentation*. Nature, 2007. **445**(7130): S. 843-50.
10. Nordlund, J.J., *The melanocyte and the epidermal melanin unit: an expanded concept*. Dermatol Clin, 2007. **25**(3): S. 271-81, vii.
11. D'Orazio, J., et al., *UV radiation and the skin*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(6): S. 12222-48.
12. Fitzpatrick, T.B. and A.S. Breathnach, *THE EPIDERMAL MELANIN UNIT SYSTEM*. Dermatol Wochenschr, 1963. **147**: S. 481-9.
13. Bastian, B.C., *The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia*. Annu Rev Pathol, 2014. **9**: S. 239-71.
14. Mohania, D., et al., *Ultraviolet Radiations: Skin Defense-Damage Mechanism*. Adv Exp Med Biol, 2017. **996**: S. 71-87.
15. Leonardi, G.C., et al., *Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review)*. Int J Oncol, 2018. **52**(4): S. 1071-1080.
16. Elwood, J.M. and J. Jopson, *Melanoma and sun exposure: an overview of published studies*. Int J Cancer, 1997. **73**(2): S. 198-203.
17. Abdel-Malek, Z.A., A.L. Kadekaro, and V.B. Swope, *Stepping up melanocytes to the challenge of UV exposure*. Pigment Cell Melanoma Res, 2010. **23**(2): S. 171-86.
18. Gandini, S., et al., *Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure*. Eur J Cancer, 2005. **41**(1): S. 45-60.

19. Lea, C.S., et al., *Ambient UVB and melanoma risk in the United States: a case-control analysis*. *Ann Epidemiol*, 2007. **17**(6): S. 447-53.
20. Milon, A., et al., *Estimating the contribution of occupational solar ultraviolet exposure to skin cancer*. *Br J Dermatol*, 2014. **170**(1): S. 157-64.
21. Brenner, M. and V.J. Hearing, *The protective role of melanin against UV damage in human skin*. *Photochem Photobiol*, 2008. **84**(3): S. 539-49.
22. Freeman, S.E., et al., *Wavelength dependence of pyrimidine dimer formation in DNA of human skin irradiated in situ with ultraviolet light*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(14): S. 5605-9.
23. Sancar, A., et al., *Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints*. *Annu Rev Biochem*, 2004. **73**: S. 39-85.
24. Li, C., et al., *Polymorphisms in the DNA repair genes XPC, XPD, and XPG and risk of cutaneous melanoma: a case-control analysis*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006. **15**(12): S. 2526-32.
25. Moriwaki, S., et al., *The effect of donor age on the processing of UV-damaged DNA by cultured human cells: reduced DNA repair capacity and increased DNA mutability*. *Mutat Res*, 1996. **364**(2): S. 117-23.
26. Leonardi, G.C., et al., *Ageing: from inflammation to cancer*. *Immun Ageing*, 2018. **15**: S. 1.
27. Coelho, S.G., et al., *Short- and long-term effects of UV radiation on the pigmentation of human skin*. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 2009. **14**(1): S. 32-5.
28. Dasgupta, A. and M. Katdare, *Ultraviolet Radiation-Induced Cytogenetic Damage in White, Hispanic and Black Skin Melanocytes: A Risk for Cutaneous Melanoma*. *Cancers (Basel)*, 2015. **7**(3): S. 1586-604.
29. Marrett, L.D., et al., *Use of host factors to identify people at high risk for cutaneous malignant melanoma*. *Cmaj*, 1992. **147**(4): S. 445-53.
30. Soura, E., et al., *Hereditary melanoma: Update on syndromes and management: Genetics of familial atypical multiple mole melanoma syndrome*. *J Am Acad Dermatol*, 2016. **74**(3): S. 395-407; quiz 408-10.
31. Cleaver, J.E., *Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair*. *Nat Rev Cancer*, 2005. **5**(7): S. 564-73.
32. Bevona, C., et al., *Cutaneous melanomas associated with nevi*. *Arch Dermatol*, 2003. **139**(12): S. 1620-4; discussion 1624.
33. Rastrelli, M., et al., *Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification*. *In Vivo*, 2014. **28**(6): S. 1005-11.
34. Krauthammer, M., et al., *Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma*. *Nat Genet*, 2012. **44**(9): S. 1006-14.
35. Martincorena, I., et al., *Tumor evolution. High burden and pervasive positive selection of somatic mutations in normal human skin*. *Science*, 2015. **348**(6237): S. 880-6.
36. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft; Deutsche Krebshilfe; AWMF). *Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms, Langversion 3.1, 2018, AWMF Registernummer: 032/024OL*. 2018 08.11.2019]; Available from: <https://www.leitlinienprogramm->

[onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Melanom/Melanom_Version_3/LL_Melanom_Kurzversion_3.1.pdf](https://www.onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Melanom/Melanom_Version_3/LL_Melanom_Kurzversion_3.1.pdf).

37. Thompson, J.F., R.A. Scolyer, and R.F. Kefford, *Cutaneous melanoma*. Lancet, 2005. **365**(9460): S. 687-701.
38. Friedman, R.J., D.S. Rigel, and A.W. Kopf, *Early detection of malignant melanoma: the role of physician examination and self-examination of the skin*. CA Cancer J Clin, 1985. **35**(3): S. 130-51.
39. Papachristou, I. and N. Bosanquet, *Improving the prevention and diagnosis of melanoma on a national scale: A comparative study of performance in the United Kingdom and Australia*. J Public Health Policy, 2020. **41**(1): S. 28-38.
40. Abbasi, N.R., et al., *Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria*. Jama, 2004. **292**(22): S. 2771-6.
41. Tadiparthi, S., S. Panchani, and A. Iqbal, *Biopsy for malignant melanoma--are we following the guidelines?* Ann R Coll Surg Engl, 2008. **90**(4): S. 322-5.
42. Breitbart, E.W., et al., *Systematic skin cancer screening in Northern Germany*. J Am Acad Dermatol, 2012. **66**(2): S. 201-11.
43. Hubner, J., et al., *[Skin cancer screening in Germany: review after ten years]*. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2018. **61**(12): S. 1536-1543.
44. Brunssen, A., et al., *Impact of skin cancer screening and secondary prevention campaigns on skin cancer incidence and mortality: A systematic review*. J Am Acad Dermatol, 2017. **76**(1): S. 129-139.e10.
45. Breslow, A., *Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma*. Ann Surg, 1970. **172**(5): S. 902-8.
46. Mohammadpour, A., et al., *Melanoma: Where we are and where we go*. J Cell Physiol, 2019. **234**(4): S. 3307-3320.
47. Chapman, P.B., et al., *Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation*. N Engl J Med, 2011. **364**(26): S. 2507-16.
48. Robert, C., et al., *Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation*. N Engl J Med, 2015. **372**(4): S. 320-30.
49. Lee, C., et al., *Historical review of melanoma treatment and outcomes*. Clin Dermatol, 2013. **31**(2): S. 141-7.
50. McCain, J., *The MAPK (ERK) Pathway: Investigational Combinations for the Treatment Of BRAF-Mutated Metastatic Melanoma*. P t, 2013. **38**(2): S. 96-108.
51. Robert, C., et al., *Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma*. N Engl J Med, 2011. **364**(26): S. 2517-26.
52. European Medicines Agency. *Zelboraf (Vemurafenib) Übersicht über Zelboraf und Begründung für die Zulassung*. 2012 [19.11.2019]; Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/zelboraf-epar-summary-public_de.pdf.
53. Larkin, J., et al., *Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma*. N Engl J Med, 2014. **371**(20): S. 1867-76.
54. Hamid, O., et al., *Efficacy, Safety, and Tolerability of Approved Combination BRAF and MEK Inhibitor Regimens for BRAF-Mutant Melanoma*. Cancers (Basel), 2019. **11**(11).

55. Cheng, Y., G. Zhang, and G. Li, *Targeting MAPK pathway in melanoma therapy*. *Cancer Metastasis Rev*, 2013. **32**(3-4): S. 567-84.
56. Savoia, P., et al., *Targeting the ERK Signaling Pathway in Melanoma*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(6).
57. Santarpia, L., S.M. Lippman, and A.K. El-Naggar, *Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy*. *Expert Opin Ther Targets*, 2012. **16**(1): S. 103-19.
58. Burotto, M., et al., *The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective*. *Cancer*, 2014. **120**(22): S. 3446-56.
59. Bruno, W., et al., *Heterogeneity and frequency of BRAF mutations in primary melanoma: Comparison between molecular methods and immunohistochemistry*. *Oncotarget*, 2017. **8**(5): S. 8069-8082.
60. Ruiz-Garcia, E., et al., *Frequency of BRAF V600E Mutation in the Mexican Population of Patients With Metastatic Melanoma*. *J Glob Oncol*, 2018. **4**: S. 1-5.
61. Spathis, A., et al., *BRAF Mutation Status in Primary, Recurrent, and Metastatic Malignant Melanoma and Its Relation to Histopathological Parameters*. *Dermatol Pract Concept*, 2019. **9**(1): S. 54-62.
62. Yang, H., et al., *RG7204 (PLX4032), a selective BRAFV600E inhibitor, displays potent antitumor activity in preclinical melanoma models*. *Cancer Res*, 2010. **70**(13): S. 5518-27.
63. Pollock, P.M., et al., *High frequency of BRAF mutations in nevi*. *Nat Genet*, 2003. **33**(1): S. 19-20.
64. Vin, H., et al., *Sorafenib suppresses JNK-dependent apoptosis through inhibition of ZAK*. *Mol Cancer Ther*, 2014. **13**(1): S. 221-9.
65. Long, G.V., et al., *Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma*. *N Engl J Med*, 2014. **371**(20): S. 1877-88.
66. Dummer, R., et al., *Encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib in patients with BRAF-mutant melanoma (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial*. *Lancet Oncol*, 2018. **19**(5): S. 603-615.
67. Kozar, I., et al., *Many ways to resistance: How melanoma cells evade targeted therapies*. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2019. **1871**(2): S. 313-322.
68. Pritchard, A.L. and N.K. Hayward, *Molecular pathways: mitogen-activated protein kinase pathway mutations and drug resistance*. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(9): S. 2301-9.
69. Moriceau, G., 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): S. 240-56.
70. Martin, S., et al., *An autophagy-driven pathway of ATP secretion supports the aggressive phenotype of BRAF(V600E) inhibitor-resistant metastatic melanoma cells*. *Autophagy*, 2017. **13**(9): S. 1512-1527.
71. Fattore, L., et al., *Reprogramming miRNAs global expression orchestrates development of drug resistance in BRAF mutated melanoma*. *Cell Death Differ*, 2019. **26**(7): S. 1267-1282.

72. Diaz-Martinez, M., et al., *miR-204-5p and miR-211-5p Contribute to BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma*. *Cancer Res*, 2018. **78**(4): S. 1017-1030.
73. Ko, J.S., *The Immunology of Melanoma*. *Clin Lab Med*, 2017. **37**(3): S. 449-471.
74. Kirkin, A.F., K. Dzhandzhugazyan, and J. Zeuthen, *The immunogenic properties of melanoma-associated antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes*. *Exp Clin Immunogenet*, 1998. **15**(1): S. 19-32.
75. Obeid, J.M., et al., *PD-L1, PD-L2 and PD-1 expression in metastatic melanoma: Correlation with tumor-infiltrating immune cells and clinical outcome*. *Oncoimmunology*, 2016. **5**(11): S. e1235107.
76. Park, J.J., et al., *B7-H1/CD80 interaction is required for the induction and maintenance of peripheral T-cell tolerance*. *Blood*, 2010. **116**(8): S. 1291-8.
77. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting*. *Immunity*, 2004. **21**(2): S. 137-48.
78. Schreiber, R.D., L.J. Old, and M.J. Smyth, *Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion*. *Science*, 2011. **331**(6024): S. 1565-70.
79. Seliger, B., et al., *Immune escape of melanoma: first evidence of structural alterations in two distinct components of the MHC class I antigen processing pathway*. *Cancer Res*, 2001. **61**(24): S. 8647-50.
80. Brodsky, F.M. and L.E. Guagliardi, *The cell biology of antigen processing and presentation*. *Annu Rev Immunol*, 1991. **9**: S. 707-44.
81. Townsend, A. and H. Bodmer, *Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes*. *Annu Rev Immunol*, 1989. **7**: S. 601-24.
82. Seliger, B., et al., *HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells*. *Semin Cancer Biol*, 2002. **12**(1): S. 3-13.
83. Seliger, B., M.J. Maeurer, and S. Ferrone, *Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth*. *Immunol Today*, 2000. **21**(9): S. 455-64.
84. Pieters, J., *MHC class II restricted antigen presentation*. *Curr Opin Immunol*, 1997. **9**(1): S. 89-96.
85. Axelrod, M.L., et al., *Biological Consequences of MHC-II Expression by Tumor Cells in Cancer*. *Clin Cancer Res*, 2019. **25**(8): S. 2392-2402.
86. Neefjes, J., et al., *Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation*. *Nat Rev Immunol*, 2011. **11**(12): S. 823-36.
87. Garrido, F., et al., *Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours*. *Immunol Today*, 1997. **18**(2): S. 89-95.
88. Ferrone, S. and F.M. Marincola, *Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance*. *Immunol Today*, 1995. **16**(10): S. 487-94.
89. Campoli, M. and S. Ferrone, *HLA antigen changes in malignant cells: epigenetic mechanisms and biologic significance*. *Oncogene*, 2008. **27**(45): S. 5869-85.
90. Reed, J.C., *Drug insight: cancer therapy strategies based on restoration of endogenous cell death mechanisms*. *Nat Clin Pract Oncol*, 2006. **3**(7): S. 388-98.
91. Green, D.R., et al., *Immunogenic and tolerogenic cell death*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(5): S. 353-63.

92. Vandenabeele, P., et al., *Immunogenic Apoptotic Cell Death and Anticancer Immunity*. Adv Exp Med Biol, 2016. **930**: S. 133-49.
93. Voll, R.E., et al., *Immunosuppressive effects of apoptotic cells*. Nature, 1997. **390**(6658): S. 350-1.
94. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system*. Science, 2002. **296**(5566): S. 298-300.
95. Galluzzi, L., et al., *Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012*. Cell Death Differ, 2012. **19**(1): S. 107-20.
96. Green, D.R. and G.I. Evan, *A matter of life and death*. Cancer Cell, 2002. **1**(1): S. 19-30.
97. Kroemer, G., et al., *Immunogenic cell death in cancer therapy*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: S. 51-72.
98. Pitt, J.M., G. Kroemer, and L. Zitvogel, *Immunogenic and Non-immunogenic Cell Death in the Tumor Microenvironment*. Adv Exp Med Biol, 2017. **1036**: S. 65-79.
99. Ma, Y., et al., *Anticancer chemotherapy-induced intratumoral recruitment and differentiation of antigen-presenting cells*. Immunity, 2013. **38**(4): S. 729-41.
100. Krysko, D.V., et al., *Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(12): S. 860-75.
101. Hotamisligil, G.S., *Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease*. Cell, 2010. **140**(6): S. 900-17.
102. Panaretakis, T., et al., *Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death*. Embo j, 2009. **28**(5): S. 578-90.
103. Galluzzi, L., et al., *The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs*. Nat Rev Drug Discov, 2012. **11**(3): S. 215-33.
104. Giglio, P., et al., *Ecto-Calreticulin is essential for an efficient immunogenic cell death stimulation in mouse melanoma*. Genes Immun, 2019. **20**(6): S. 509-513.
105. Gardai, S.J., et al., *Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte*. Cell, 2005. **123**(2): S. 321-34.
106. Ma, Y., et al., *CCL2/CCR2-dependent recruitment of functional antigen-presenting cells into tumors upon chemotherapy*. Cancer Res, 2014. **74**(2): S. 436-45.
107. Ma, Y., et al., *Contribution of IL-17-producing gamma delta T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy*. J Exp Med, 2011. **208**(3): S. 491-503.
108. Apetoh, L., et al., *Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy*. Nat Med, 2007. **13**(9): S. 1050-9.
109. Ghiringhelli, F., et al., *Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors*. Nat Med, 2009. **15**(10): S. 1170-8.
110. Khabar, K.S., et al., *MTS interferon assay: a simplified cellular dehydrogenase assay for interferon activity using a water-soluble tetrazolium salt*. J Interferon Cytokine Res, 1996. **16**(1): S. 31-3.

111. National Cancer Institute. *NCI-60 Screening Methodology*. 2015 [cited 2020 15.03.]; Available from: https://dtp.cancer.gov/discovery_development/nci-60/methodology.htm.
112. Darzynkiewicz, Z., H. Crissman, and J.W. Jacobberger, *Cytometry of the cell cycle: cycling through history*. *Cytometry A*, 2004. **58**(1): S. 21-32.
113. Martins, I., et al., *Molecular mechanisms of ATP secretion during immunogenic cell death*. *Cell Death Differ*, 2014. **21**(1): S. 79-91.
114. Pangrsic, T., et al., *Exocytotic release of ATP from cultured astrocytes*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(39): S. 28749-58.
115. Bass, J.J., et al., *An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research*. *Scand J Med Sci Sports*, 2017. **27**(1): S. 4-25.
116. Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg. *Kompaktlexikon der Biologie; Transduktion*. 21.06.2021]; Available from: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/transduktion/11971>.
117. Hu, J., et al., *Human Embryonic Kidney 293 Cells: A Vehicle for Biopharmaceutical Manufacturing, Structural Biology, and Electrophysiology*. *Cells Tissues Organs*, 2018. **205**(1): S. 1-8.
118. Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg. *Kompaktlexikon der Biologie; Transfektion*. 21.06.2021]; Available from: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/transfektion/11972>.
119. Lewis, T.S., P.S. Shapiro, and N.G. Ahn, *Signal transduction through MAP kinase cascades*. *Adv Cancer Res*, 1998. **74**: S. 49-139.
120. Seliger, B. and K. Pfizenmaier, *Post-transcriptional downregulation of MHC class I expression in oncogene-transformed cells is reverted by IFN-gamma and TNF-alpha*. *J Immunogenet*, 1989. **16**(4-5): S. 315-20.
121. Cirone, M., et al., *Primary effusion lymphoma cell death induced by bortezomib and AG 490 activates dendritic cells through CD91*. *PLoS One*, 2012. **7**(3): S. e31732.
122. Atkins, M.B., et al., *Real-world treatment patterns and overall survival in BRAF-mutant melanoma patients treated with immunotherapy or targeted therapy*. *Future Oncol*, 2022. **18**(18): S. 2233-2245.
123. Pavlick, A.C., et al., *First-line immunotherapy versus targeted therapy in patients with BRAF-mutant advanced melanoma: a real-world analysis*. *Future Oncol*, 2021. **17**(6): S. 689-699.
124. Liu, L., et al., *The BRAF and MEK Inhibitors Dabrafenib and Trametinib: Effects on Immune Function and in Combination with Immunomodulatory Antibodies Targeting PD-1, PD-L1, and CTLA-4*. *Clin Cancer Res*, 2015. **21**(7): S. 1639-51.
125. Frederick, D.T., et al., *BRAF inhibition is associated with enhanced melanoma antigen expression and a more favorable tumor microenvironment in patients with metastatic melanoma*. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(5): S. 1225-31.
126. van Houdt, I.S., et al., *Favorable outcome in clinically stage II melanoma patients is associated with the presence of activated tumor infiltrating T-lymphocytes and preserved MHC class I antigen expression*. *Int J Cancer*, 2008. **123**(3): S. 609-15.

127. Bradley, S.D., et al., *BRAFV600E Co-opts a Conserved MHC Class I Internalization Pathway to Diminish Antigen Presentation and CD8+ T-cell Recognition of Melanoma*. *Cancer Immunol Res*, 2015. **3**(6): S. 602-9.
128. Garrido, C., et al., *MHC class I molecules act as tumor suppressor genes regulating the cell cycle gene expression, invasion and intrinsic tumorigenicity of melanoma cells*. *Carcinogenesis*, 2012. **33**(3): S. 687-93.
129. Wongchenko, M.J., et al., *Association of programmed death ligand-1 (PD-L1) expression with treatment outcomes in patients with BRAF mutation-positive melanoma treated with vemurafenib or cobimetinib combined with vemurafenib*. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2018. **31**(4): S. 516-522.
130. Yamamoto, R., et al., *B7-H1 expression is regulated by MEK/ERK signaling pathway in anaplastic large cell lymphoma and Hodgkin lymphoma*. *Cancer Sci*, 2009. **100**(11): S. 2093-100.
131. Jiang, X., et al., *The activation of MAPK in melanoma cells resistant to BRAF inhibition promotes PD-L1 expression that is reversible by MEK and PI3K inhibition*. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(3): S. 598-609.
132. Ma, G., et al., *Glutamine Deprivation Induces PD-L1 Expression via Activation of EGFR/ERK/c-Jun Signaling in Renal Cancer*. *Mol Cancer Res*, 2019.
133. Ma, L., et al., *PD-L1 Expression and Its Regulation in Lung Adenocarcinoma with ALK Translocation*. *Interdiscip Sci*, 2019. **11**(2): S. 266-272.
134. Hino, R., et al., *Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma*. *Cancer*, 2010. **116**(7): S. 1757-66.
135. Gadiot, J., et al., *Overall survival and PD-L1 expression in metastasized malignant melanoma*. *Cancer*, 2011. **117**(10): S. 2192-201.
136. Dong, H., et al., *Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion*. *Nat Med*, 2002. **8**(8): S. 793-800.
137. Daud, A.I., et al., *Programmed Death-Ligand 1 Expression and Response to the Anti-Programmed Death 1 Antibody Pembrolizumab in Melanoma*. *J Clin Oncol*, 2016. **34**(34): S. 4102-4109.
138. Tumeh, P.C., et al., *PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance*. *Nature*, 2014. **515**(7528): S. 568-71.
139. Ascierto, P.A., et al., *Cobimetinib combined with vemurafenib in advanced BRAF(V600)-mutant melanoma (coBRIM): updated efficacy results from a randomised, double-blind, phase 3 trial*. *Lancet Oncol*, 2016. **17**(9): S. 1248-60.
140. Robert, C., et al., *Five-Year Outcomes with Dabrafenib plus Trametinib in Metastatic Melanoma*. *N Engl J Med*, 2019. **381**(7): S. 626-636.
141. Lewis, K.D., et al., *Impact of depth of response on survival in patients treated with cobimetinib +/- vemurafenib: pooled analysis of BRIM-2, BRIM-3, BRIM-7 and coBRIM*. *Br J Cancer*, 2019. **121**(7): S. 522-528.
142. Consoli, F., et al., *Network indirect comparison of 3 BRAF + MEK inhibitors for the treatment of advanced BRAF mutated melanoma*. *Clin Transl Oncol*, 2019.
143. Ascierto, P.A., et al., *Update on tolerability and overall survival in COLUMBUS: landmark analysis of a randomised phase 3 trial of encorafenib plus binimetinib vs vemurafenib or encorafenib in patients with BRAF V600-mutant melanoma*. *Eur J Cancer*, 2020. **126**: S. 33-44.

144. Sade-Feldman, M., et al., *Resistance to checkpoint blockade therapy through inactivation of antigen presentation*. Nat Commun, 2017. **8**(1): S. 1136.
145. Hulpke, S. and R. Tampe, *The MHC I loading complex: a multitasking machinery in adaptive immunity*. Trends Biochem Sci, 2013. **38**(8): S. 412-20.
146. Nathan, P., et al., *LBA43 - Spartalizumab plus dabrafenib and trametinib (Sparta-DabTram) in patients (pts) with previously untreated BRAF V600-mutant unresectable or metastatic melanoma: Results from the randomized part 3 of the phase III COMBI-i trial*. ESMO Virtual Congress 2020, 2020.
147. Dummer, R., et al., *Combined PD-1, BRAF and MEK inhibition in advanced BRAF-mutant melanoma: safety run-in and biomarker cohorts of COMBI-i*. Nat Med, 2020. **26**(10): S. 1557-1563.
148. Gutzmer, R., et al., *Atezolizumab, vemurafenib, and cobimetinib as first-line treatment for unresectable advanced BRAF(V600) mutation-positive melanoma (IMspire150): primary analysis of the randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial*. Lancet, 2020. **395**(10240): S. 1835-1844.
149. Larkin, J., et al., *Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma*. N Engl J Med, 2019. **381**(16): S. 1535-1546.
150. Wolchok, J.D., et al., *Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma*. N Engl J Med, 2017. **377**(14): S. 1345-1356.
151. Kluger, H.M., et al., *PD-L1 Studies Across Tumor Types, Its Differential Expression and Predictive Value in Patients Treated with Immune Checkpoint Inhibitors*. Clin Cancer Res, 2017. **23**(15): S. 4270-4279.
152. Ascierto, P.A., et al., *Phase II study SECOMBIT (sequential combo immuno and target therapy study): A subgroup analysis with a longer follow-up*. Journal of Clinical Oncology, 2022. **40**(16_suppl): S. 9535-9535.

Appendix

I Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: MAPK-Signalweg	7
Abbildung 2: Farbumschlag durch MTS-Reaktion	26
Abbildung 3: Gating-Strategie Zellzyklusfärbung	28
Abbildung 4: Transduktionsergebnis	35
Abbildung 5: Reduktion der Viabilität der Melanomzellen durch Inhibitortherapie	38
Abbildung 6: Zellzyklusarrest unter Inhibitorbehandlung	39
Abbildung 7: Einstellung vergleichbarer Inhibitorkonzentrationen im MTS-Assay	41
Abbildung 8: Einstellung vergleichbarer Inhibitorkonzentrationen in der Zellzyklus-Analyse	42
Abbildung 9: Immunoblot ERK, pERK und MHC I	43
Abbildung 10: MHC I nach 72-stündiger Inhibitorbehandlung	44
Abbildung 11: Steigerung der MHC-I-Expression unter IFN- γ -Behandlung	46
Abbildung 12: Steigerung der MHC-I-Expression unter 72 h Inhibitorbehandlung	47
Abbildung 13: Erhöhung der PD-L1-Expression unter IFN- γ und Verminderung unter Inhibitoren	49
Abbildung 14: Quinacrine-Färbung	51
Abbildung 15: Ekto-Calreticulin-Expression	53
Abbildung 16: Calreticulin unter 24 h Inhibitorbehandlung	54
Abbildung 17: UACC-257-Zellen mit ATF-Reporter unter Inhibitorbehandlung	55

II Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	14
Tabelle 2: Antikörper Immunoblot	15
Tabelle 3: Antikörper Durchflusszytometrie	15
Tabelle 4: Chemikalien	16
Tabelle 5: Verbrauchsmaterial	18
Tabelle 6: Komplettsysteme	19
Tabelle 7: Software	19
Tabelle 8: Melanomzelllinien	19
Tabelle 9: Vektorsysteme	19
Tabelle 10: Zellkulturmedium.....	20
Tabelle 11: Trypsin/EDTA-Lösung.....	20
Tabelle 12: Krebs-Ringer-Lösung	20
Tabelle 13: Durchflusszytometrie-Puffer	20
Tabelle 14: RIPA-Puffer.....	21
Tabelle 15: TBS	21
Tabelle 16: Tris/SDS.....	21
Tabelle 17: SDS-Proben-Puffer	22
Tabelle 18: Running-Puffer	22
Tabelle 19: TTBS.....	22
Tabelle 20: Transfer-Puffer.....	22
Tabelle 21: Blocking-Puffer.....	23
Tabelle 22: ECL.....	23
Tabelle 23: Inhibitorkonzentrationen.....	25
Tabelle 24: Immunoblot-Gele.....	31
Tabelle 25: Lentiviren 3. Generation	33
Tabelle 26: Retroviren: PIH Calreticulin	34

III

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
7AAD	7-Amino-Actinomycin D
A	Ampere
Abb.	Abbildung
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ATF	Activating Transcription Factor
ATP	Adenosintriphosphat
BAK	Bcl-2 homologous antagonist Killer
BAP31	B cell Receptor-associated Protein 31
BAX	Bcl-2-associated X
Bini	Binimetinib
BRAF	B-Raf
bzgl.	bezüglich
CD	Cluster of Differentiation
CDK 4	Cyclin-dependent Kinase 4
CDKN2A	Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2A
CM	Komplett-Medium (Zellkulturmedium)
Cobi	Cobimetinib
CRP	C-reaktives Protein
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
CTLA-4	cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen 4
Dabra	Dabrafenib
DAMP	Damage-associated molecular Patterns
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinacid (-Säure)

DT	Kombination aus Dabrafenib und Trametinib
EB	Kombination aus Encorafenib und Binimetinib
ECL	Enhanced chemiluminescent
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
eIF2 α	eukaryotic translational Initiation Factor 2 α
EMA	European Medicines Agency
Enco	Encorafenib
Eppi	kleines Reaktionsgefäß mit Deckel
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular signal-regulated Kinase
ER-Stress	endoplasmatischer Retikulum-Stress
FCS	Fetales Kälberserum
FDA	U.S. Food and Drug Administration
G0-Phase	Gap-Phase 0
G1-Phase	Gap-Phase 1
G2-Phase	Gap-Phase 2
GFP	green fluorescent Protein
ggf.	gegebenenfalls
Glu, E	Glutamin
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HMGB1	High-mobility-group box 1
i.d.R.	in der Regel
IFN γ	Interferon γ
IL	Interleukin
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
KLM-Einheit	Keratinozyten-Langerhans-Melanozyten-Einheit

MAPK, auch MAP-Kinase	Mitogen-activated Protein Kinase
MEK	Mitogen-activated ERK Kinase
mg	Milligramm
MHC I	Major Histocompatibility Complex I
MHC II	Major Histocompatibility Complex II
ml	Milliliter
M-Phase	Mitose-Phase
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
NF1	Neurofibromin 1
nM	Nanomol
NRAS	N-Ras
OS	Gesamtüberlebensrate
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PD 1	Programmed Death 1 Rezeptor
PDL1	Programmed Death Ligand 1
pERK	Phospho-ERK
PERK	PKR-like eukaryotic Initiation Factor 2a Kinase
PFS	progressionsfreies Überleben
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
RAC1	Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate 1
RAS	G-Protein Ras
RNA	Ribonucleinacid (-Säure)
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive Factor Attachment Protein Receptor
sog.	sogenannt

S-Phase	Synthesephase
STR	short-tandem-Repeat
TERT	Telomerase reverse Transcriptase
Thr, T	Threonin
TLR	Toll-like-Receptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TP 53	Tumor Protein 53
Tram	Trametinib
TTBS	Tris-Buffered Saline + Tween
Tyr, Y	Tyrosin
U/ min	Umdrehungen pro Minute
U/ ml	Units (dt. Einheiten) pro Milliliter
UV-A	Ultraviolette Strahlung A
UV-B	Ultraviolette Strahlung B
UV-C	Ultraviolette Strahlung C
V	Volt
VC	Kombination aus Vemurafenib und Cobimetinib
Vemu	Vemurafenib
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
β_2 M	β_2 -Mikroglobulin

Danksagung

Ich bedanke mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Bastian Schilling. Vielen Dank für Deine exzellente Betreuung während des gesamten Projekts, Deine konstruktiven Tipps und dass Du es mir ermöglicht hast, meine Doktorarbeit in Deinem Labor anzufertigen. Ebenso bedanke ich mich bei Dr. David Schrama. Danke, dass Du mich im Labor betreut und unterstützt hast.

Ich bedanke mich beim gesamten Team der AG Schilling und des TBFL, insbesondere bei Claudia Siedel, Marion Berthold, Dr. Roland Houben und Dr. Sonja Hesbacher.

Ich bedanke mich bei meinen Eltern Bernd und Dr. Christina Jonas sowie bei meinem Bruder Simon. Danke für Eure Liebe und dass ihr mich während meines gesamten Studiums unterstützt habt.

Ich bedanke mich bei Dr. Alexander Thiem. Danke, dass Du den Kontakt zu Prof. Schilling hergestellt hast.

Ich bedanke mich recht herzlich bei der Firma Pierre Fabre, die mein Forschungsprojekt finanziell gefördert hat. Ebenso bedanke ich mich bei der Hanns-Seidel-Stiftung, die mich während meines Studiums aus Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung gefördert hat.

Ich bedanke mich bei meinem Mitbewohner Simon und meinen Freunden, insbesondere bei Friedi, Daniel, Merle, Philipp, Marni, Quirin, Martin und Hannes. Danke für die wundervolle Zeit, die wir während meines Studiums gemeinsam in Würzburg verbracht haben.