

Aus der  
Universitäts-Hautklinik Tübingen  
Sektion Dermatologische Onkologie

**Frequenz Melanozytendifferenzierungsantigen-  
spezifischer T-Zellen im Sentinel-Lymphknoten bei  
malignem Melanom**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Venohr, Mara Sophie**

**2025**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler  
1.Berichterstatter: Professor Dr. L. Flatz  
2.Berichterstatter: Professor Dr. C. Schürch

Tag der Disputation: 01.04.2025

## Inhaltsverzeichnis

<b>Frequenz Melanozytendifferenzierungsantigen-spezifischer T-Zellen im Sentinel-Lymphknoten bei malignem Melanom .....</b>	<b>1</b>
<i>vorgelegt von</i> .....	1
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>6</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>8</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>9</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>11</b>
1.1. <i>Das maligne Melanom</i> .....	11
1.1.1. Krankheitsstadien .....	11
1.1.2. Diagnostik .....	12
1.1.3. Sentinel Lymphknoten .....	13
1.1.4. Therapiemöglichkeiten .....	15
1.2. <i>Tumorinfiltrierende Lymphozyten</i> .....	17
1.2.1. CD8+ Tumorinfiltrierende T-Lymphozyten .....	18
1.2.2. CD4+ Tumorinfiltrierende T-Lymphozyten .....	18
1.3. <i>Melanozyten Differenzierungsantigene</i> .....	19
1.3.1. Glykoprotein 100 .....	19
1.3.2. Melan A .....	20
1.3.3. Tyrosinase .....	20
1.3.4. Dopachrom-Tautomerase .....	21
1.4. <i>Zielsetzung</i> .....	21
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>23</b>
2.1. <i>Material</i> .....	23
2.1.1. Allgemeine Verbrauchsmaterialien .....	23
2.1.2. Peptidpools .....	24
2.1.3. Antikörper .....	25

2.1.4.	Zusammensetzung IVS Nährmediums.....	26
2.1.5.	Zusammensetzung des FACS- Puffers.....	26
2.2.	<i>Methoden</i> .....	26
2.2.1.	Probengewinnung .....	26
2.2.2.	Isolation peripherer mononukleärer Blutzellen.....	27
2.2.3.	Gewinnung von Serum.....	28
2.2.4.	In vitro T-Zell Stimulation .....	28
2.2.5.	Phänotypisierung mittels Durchflusszytometrie .....	31
2.2.6.	Gating Strategie der Durchflusszytometrie.....	31
2.2.7.	Tumordicke und Ulzeration .....	32
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>33</b>
3.1.	<i>Ergebnisse der Durchflusszytometrie</i> .....	35
3.1.1.	Häufigkeit der Melanozytendifferenzierungsantigene.....	35
3.1.2.	Status des Sentinel Lymphknotens .....	38
3.1.3.	Tumordicke und Ulzeration .....	41
3.2.	<i>Viabilität der Zellen</i> .....	44
3.3.	<i>Anzahl CD4/CD8+ T-Lymphozyten in Lymphknoten und PBMCs</i> .....	45
3.4.	<i>Verhältnis CD3+CD45RA+/CD3+CD45RA- T-Lymphozyten in Lymphknoten und PBMCs</i> .....	46
3.5.	<i>Unterschiedliche Lokalisation der Lymphknoten</i> .....	47
3.6.	<i>Unterschiede in Lymphknoten desselben Patienten</i> .....	51
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>52</b>
4.1.	<i>Frequenz melanozytendifferenzierungsantigen spezifischer T-Zellen im Sentinel Lymphknoten und PBMCs</i> .....	53
4.2.	<i>Status des Sentinel Lymphknotens</i> .....	55
4.3.	<i>Korrelation mit Tumordicke und Ulzeration</i> .....	56
4.4.	<i>Viabilität der Zellen</i> .....	57
4.5.	<i>Gemessene Zellzahlen</i> .....	58

4.5.1. Verhältnis CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten.....	58
4.5.2. Verhältnis CD3+ CD45RA+ und CD3+ CD45RA- T-Lymphozyten	59
4.6. <i>Unterschiede der axillären und inguinalen Sentinel Lymphknoten</i> .....	59
4.7. <i>Mehrere Lymphknoten des gleichen Patienten</i> .....	60
4.8. <i>Limitationen</i> .....	61
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>62</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>63</b>
<b>7. Erklärung zum Eigenanteil</b> .....	<b>72</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>73</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ALM	Akrolentiginöses Melanom
APC	Antigenpräsentierende Zellen
BSA	Bovines Serumalbumin
CEF	CMV, EBV, Influenzavirus
CMV	Cytomegalievirus
CTLA4	Zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein 4
DCC	Disseminierte Tumorzellen
DCT	Dopachrom-Tautomerase
DMM	Desmoplastisches Melanom
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
Gp 100	Glykoprotein 100
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HMB-45	Human Melanoma Black-45
ICI	Immunchekpoint-Inhibitoren
INF- $\alpha$	Interferon-alpha
INF- $\gamma$	Interferon-gamma
IT	Immuntherapie
IVS	In-vitro-Stimulation
LDI	Lymphknoten-Disaggregations-Immunzytologie
LK	Lymphknoten
LMM	Lentigo maligna Melanom
MART	Melanoma antigen recognized by T-cells
MDA	Melanozytendifferenzierungsantigen
MHC	Major histocompatibility complex
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NAN3	Natriumazid
NM	Noduläres Melanom

P/S	Penicillin/Streptomycin
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PD1/PDL1	Programmed cell death protein 1/Programmed death ligand 1
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
SLN	Sentinel Lymphknoten
SLNE	Sentinel-Lymphonodektomie
SSM	Superfiziell spreitendes Melanom
TIL	Tumordinfiltrierende Lymphozyten
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TRM	resident-memory T-Zellen
TRP	Tyrosinase-related protein
TT	Zielgerichtete Therapie

## Tabellenverzeichnis

<u>Tabelle 1: T-Klassifikation des Primärtumors beim malignen Melanom (AJCC 2016/UICC 2016)(Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020)</u> .....	11
<u>Tabelle 2: Empfehlung Sicherheitsabstand(Garbe et al., 2008)</u> .....	15
<u>Tabelle 3: Allgemein verwendete Materialien</u> .....	23
<u>Tabelle 4: Proteinspannende Peptidools von GenScript</u> .....	24
<u>Tabelle 5: Antikörper für Durchflusszytometrie</u> .....	25
<u>Tabelle 6: Bestandteile des IVS Nährmediums</u> .....	26

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beispiel Gating Strategie LK 97-1-23 Medium; von links oben nach rechts unten: Alle Lymphozyten → Einzelne Zellen → Lebende Zellen → Nicht-naive T-Zellen → CD8+ und CD4+ Zellen → CD40 Ligand +/- Zellen → INF $\gamma$ /TNF $\alpha$ produzierende CD4+ Zellen → INF $\gamma$ /TNF $\alpha$ CD8+ Zellen .....	32
Abbildung 2: Zustandekommen der ausgewerteten Probenanzahl.....	34
Abbildung 3: Patienten-/Lymphknotenkriterien .....	34
Abbildung 4: oben links: Beispiel Reaktion von CD4+ T-Zellen der PBMCs von LK 137 auf Melan A; rechts: Beispiel Reaktion von CD4+ T-Zellen des LK 148 auf Tyrosinase; unten: Beispiel Reaktion von CD4+ T-Zellen der PBMCs von LK 96 auf gp100, Melan A und Tyrosinase .....	36
Abbildung 5: Negativkontrollen mit Stimulation nur durch das Medium von L137 PBMCs, L148-1 und L96 PBMCs aus Abbildung 4 zum Ausschluss einer Spontansekretion .....	36
Abbildung 6: links Beispiel Reaktion CD8+ T-Zellen der PBMCs von LK 100 auf Melan A; rechts Beispiel Reaktion von CD8+ T-Zellen des LK 99 auf Tyrosinase .....	37
Abbildung 7: links: CD4 + Inf $\gamma$ +/CD45RA- T-Zellen nach T-Zellstimulation mit proteinspannenden Peptidpools von gp100, Melan A, Tyrosinase, TRP-2 und CEF in Prozent. Rechts: Positivität des SNL für Tumorzellen und Tumordicke in T-Stadien.....	39
Abbildung 8: links: CD8 + Inf $\gamma$ +/CD45RA- T-Zellen nach T-Zellstimulation mit proteinspannenden Peptidpools von gp100, Melan A, Tyrosinase, TRP-2 und CEF in Prozent. Rechts: Positivität des SNL für Tumorzellen und Tumordicke in T-Stadien.....	40
Abbildung 9: Zuordnung der jeweiligen T-Stadien zu den SLN in Prozent .....	41
Abbildung 10: Statistischer Vergleich der Reaktionen auf MDAs in LK von T1-T4 Tumoren der CD4+ T-Zellen .....	42
Abbildung 11: Statistischer Vergleich der Reaktionen auf MDAs in LK von T1-T4 Tumoren der CD8+ T-Zellen .....	43

Abbildung 12: Durchschnittliche Viabilität der LK Zellen (links) und der PBMCs (rechts) in Prozent.....	44
Abbildung 13: Vergleich durchschnittliche Anzahl CD4+/CD8+/CD45RA- T-Lymphozyten in den SLN nach T-Zellstimulation mit proteinspannenden Peptidpools .....	45
Abbildung 14: Vergleich durchschnittliche Anzahl der CD4+/CD8+/CD45RA- T-Lymphozyten in den PBMCs nach T-Zellstimulation mit proteinspannenden Peptidpools .....	46
Abbildung 15: durchschnittlicher Anteil CD3+CD45RA- T-Zellen in LK und PBMCs in Prozent im Verhältnis zu den CD3+CD45RA+ T-Zellen.....	47
Abbildung 16: Statistischer Vergleich der CEF-Kontrolle in LK der Leiste und Axilla CD4+ T-Zellen .....	49
Abbildung 17: Statistischer Vergleich der CEF-Kontrolle in LK der Leiste und Axilla CD8+ T-Zellen .....	49
Abbildung 18: Statistischer Vergleich der Reaktionen auf mindestens ein MDA in LK der Leiste und Axilla CD4+ T-Zellen.....	50
Abbildung 19: Statistischer Vergleich der Reaktionen auf mindestens ein MDA in LK der Leiste und Axilla CD8+ T-Zellen.....	50
Abbildung 20: Beispiel LK 64-1 und 64-2 vom gleichen Patienten; links keine Aktivierung durch TRP-2, rechts Aktivierung der CD4+ T-Zellen durch TRP-2.	51

## 1. Einleitung

### 1.1. Das maligne Melanom

Das maligne Melanom ist mit einer Inzidenz von fast 23.000 im Jahr 2018 in Deutschland, prognostisch weiter steigend, ein häufiger von Melanozyten ausgehender Tumor (Erdmann et al., 2021). Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Frauen bei 62 und bei Männern bei 68 Jahren (Erdmann et al., 2021). Im Jahr 2019 starben in Deutschland etwa 3.000 Menschen an den Folgen eines malignen Melanoms (Erdmann et al., 2021).

#### 1.1.1. Krankheitsstadien

Die Klassifizierung des malignen Melanoms erfolgt nach der international gültigen TNM-Klassifikation. Hierbei werden die Tumorausdehnung (T), der Lymphknotenbefall (N) und die Metastasierung (M) miteinbezogen, ebenso wie die Tumordicke nach Breslow und die Ulzeration des Tumors. Die richtige Stadieneinteilung ist sowohl für die Diagnostik als auch für die Wahl einer geeigneten Therapie unerlässlich.

Tabelle 1: T-Klassifikation des Primärtumors beim malignen Melanom (AJCC 2016/UICC 2016)(Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020)

Stadium	Tumordicke	Ulzeration
<b>1</b>	≤ 1,0 mm	unbekannt
<b>1a</b>	< 0,8 mm	ohne
<b>1b</b>	<0,8 mm 0,8-1,0 mm	mit mit/ohne
<b>2</b>	>1,0 – 2,0 mm	unbekannt
<b>a</b>		ohne

<b>b</b>		mit
<b>3</b>	>2,0 – 4,0 mm	unbekannt
<b>a</b>		ohne
<b>b</b>		mit
<b>4</b>	>4,0 mm	unbekannt
<b>a</b>		ohne
<b>b</b>		mit

## **1.1.2. Diagnostik**

### **1.1.2.1. Allgemeine Diagnostik**

Die Diagnose des malignen Melanoms wird, nach Eigen- und Familienanamnese, durch die Auflichtmikroskopie und eine Biopsie bzw. Exzision des auffälligen Gewebes gestellt (Krampe-Scheidler and Forscher, 2021).

### **1.1.2.2. Weiterführende Diagnostik**

Ab 1,0 mm Tumordicke oder bei einem ulzerierten Tumor sollten aufgrund eines erhöhten Metastasierungsrisiko zusätzliche diagnostische Maßnahmen, wie eine Lymphknotenultraschalluntersuchung, die Bestimmung des Tumormarkers S100B (Ugurel, 2005) im Blut und eine Sentinel Lymphknoten (SLN) Biopsie durchgeführt werden (Hauswirth, 2016).

### **1.1.3. Sentinel Lymphknoten**

Der SLN ist der erste Lymphknoten (LK) im Lymphabflussgebiet eines Tumors, den Tumorzellen beim Vorgang der Metastasierung passieren (Kimmig, 2016). Der Befall des SLN mit Tumorzellen erwies sich als wichtiger prognostischer Faktor in Bezug auf das Rezidivrisiko und das Gesamtüberleben der Patienten (Jansen et al., 2000). Auch für die weitere Therapieplanung ist eine schnelle Abklärung des SNL Status essenziell (Ulmer and Kofler, 2019). Ab einer Tumordicke von 1,0 mm gilt die allgemeine Empfehlung zur Sentinel-Lymphonodektomie (SLNE) (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020). Dafür wird der SLN mittels eines radioaktiv markierten Technetium Kolloids ( $^{99m}\text{Tc}$ ) ausfindig gemacht, durch den Farbstoff Patentblau wird er sichtbar und kann so operativ entfernt werden (Kimmig, 2016). Im Anschluss folgen unterschiedliche Untersuchungen des SLN.

#### **1.1.3.1. Histopathologie**

Der SLN wird auf das Vorhandensein von Tumorzellen untersucht. Eine reine Betrachtung von histologischen, mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Schnitten, wäre aufgrund der hohen Anzahl an Schnitten, die begutachtet werden müssten, um auch okkulte Metastasen zu entdecken, im klinischen Alltag nicht praktikabel (van Diest, 1999, van Diest et al., 1999). Deshalb werden meist verschiedene Verfahren kombiniert. Die histologischen Schnitte werden zusätzlich immunhistochemisch mittels Human Melanoma Black-45 (HMB-45), Antikörpern gegen das S100 Protein oder auch gegen Melan A angefärbt (Cochran, 2000). Das S100 Protein wird von Melanom Zellen, aber auch von anderen Zellen im Lymphknoten exprimiert (Starz, 2002, van Diest et al., 1999). Gp100 und Melan A sind zwar spezifischere Marker, allerdings werden sie nicht von allen Melanom Zellen exprimiert (Starz, 2002, van Diest et al., 1999, Rimoldi et al., 2003). Die Kombination der histologischen Untersuchung mit verschiedenen immunhistochemischen Färbungen erhöht die Wahrscheinlichkeit

auch Mikrometastasen nicht zu übersehen (Cochran, 2000). Ein weiteres Verfahren ist die molekulare Analyse der SLN mittels Tyrosinase Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR). Es wurde erkannt, dass die Anwendung der RT-PCR die Prädiktion eines Rezidivs und des Gesamtüberlebens durchaus verbessern kann (Shivers et al., 1998). Dabei können Melanom Zellen und Nävuszellen nachgewiesen, aber nicht voneinander differenziert werden, weswegen auch diese Methode nur in Kombination mit weiteren verwendet wird (Rimoldi et al., 2003, Starz et al., 2003).

### **1.1.3.2. Lymphknoten-Disaggregations-Immunzytologie**

Die Lymphknoten-Disaggregations-Immunzytologie (LDI) oder auch quantitative Immunzytologie ist ein Verfahren, bei dem die Anzahl disseminierter Tumorzellen (DCC) pro 1 Millionen Lymphknotenzellen bestimmt wird (Ulmer et al., 2014). Dafür wird die Hälfte eines SLN so mechanisch disaggregiert, dass eine Einzelzellsuspension entsteht (Ulmer et al., 2014). Es folgt eine Färbung mit Antikörpern gegen gp100 und Melan A, wodurch Melanom Zellen unter dem Mikroskop detektiert werden können (Ulmer et al., 2014). Wenn möglich werden  $2 \times 10^6$  Zellen pro LK untersucht (Ulmer et al., 2014). Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der DCC mit der Prognose des Überlebens der Patienten zusammenhängt (Ulmer et al., 2014). Schon das Auffinden von 3 oder weniger DCCs pro Millionen Lymphknotenzellen reicht aus, um das Risiko in den nächsten 5 Jahren an einem Melanom zu versterben um 6% zu erhöhen (Ulmer et al., 2014). In einer Studie wurde diese Methode zum Ausfindigmachen von Tumorzellen im Vergleich zur Diagnostik nur mittels HE und immunhistochemisch gefärbten Schnitten bewertet (Ulmer et al., 2022). In 24 Prozent der SLN konnten Melanom Zellen durch die LDI entdeckt werden, wohingegen dies durch die rein pathologische Begutachtung nur bei 12 Prozent gelang (Ulmer et al., 2022). In einigen Fällen, in denen nur die LDI Tumorzellen nachweisen konnte, änderte sich dadurch der SNL Status von negativ zu positiv (Ulmer et al., 2022). Das

verdeutlicht, dass die LDI eine durchaus wichtige Methode in der Diagnostik von Melanom SLN darstellt.

#### 1.1.4. Therapiemöglichkeiten

Die chirurgische Resektion mit einem definierten Sicherheitsabstand ist der Goldstandard in der Melanom Therapie (Krieter et al., 2019).

Tabelle 2: Empfehlung Sicherheitsabstand (Garbe et al., 2008)

<b>Tumordicke nach Breslow</b>	<b>Sicherheitsabstand</b>
<b>In situ</b>	0,5 cm
<b>Bis 2mm</b>	1 cm
<b>&gt;2 mm</b>	2 cm

Im Tumorstadium II wurde bis vor kurzem zusätzlich zur operativen Resektion noch eine adjuvante Therapie mit Interferon alpha (INF- $\alpha$ ) durchgeführt (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020). Allerdings erwies sich eine Therapie mit INF- $\alpha$  nur bei ulzerierten Tumoren als sinnvoll (Ives et al., 2017). Systemische Chemotherapeutika wie beispielsweise Dacarbazin scheinen nahezu keinen Vorteil für das Gesamtüberleben zu bieten (Wilson and Schuchter, 2016). Gerade deshalb sind die neuen Therapieoptionen, die in den letzten Jahren in der Behandlung des Melanoms aufkamen, ein wichtiger Fortschritt. Bisher konnte vor allem Patienten mit Tumorstadium III/IV darüber hinaus eine adjuvante zielgerichtete Therapie (targeted therapy TT) oder Immuntherapie (IT) empfohlen werden (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020). Seit Juni 2022 ist der Immuncheckpointinhibitor (ICI) Pembrolizumab sogar schon ab Tumorstadium II zugelassen (Schroeder, 2022). Eine TT mit BRAF- oder MEK-Inhibitoren kann für Patienten mit einer BRAF V600 Mutation eine Option sein (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020). Sie hemmen den durch die Mutation aktivierten MAPK-

Signalweg, welcher unter anderem zu unkontrollierter Zellproliferation führt (Olszanski, 2014). Dabrafenib konnte das progressionsfreie Überleben für Patienten signifikant verlängern (Hauschild et al., 2012). Auch Vemurafenib zeigte ein höheres Gesamtüberleben der Patienten im Vergleich zu einer Therapie mit Dacarbazin (Chapman et al., 2017). Es werden in der Regel Kombinationen verschiedener BRAF-/MEK-Inhibitoren angewendet (Tétu et al., 2020). Ebenso wird der Einsatz von diesen bereits in der neoadjuvanten Situation in einigen Studien untersucht (Tétu et al., 2020). Allerdings sind nur ca. 50% der kutanen Melanome Träger einer solchen Mutation, wodurch diese Therapieform auch nur für einen Teil der Patienten in Frage kommt (Tétu et al., 2020). Eine weitere wichtige Säule in der Melanom Behandlung stellen Immuntherapien dar. Vor allem die ICI, wie Zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein (CTLA)-4-Inhibitoren oder programmed cell death protein 1/programmed death ligand 1-Inhibitoren (PD1/PDL1), spielen inzwischen, nicht nur beim Melanom, eine sehr große Rolle (Robert, 2020). Seit 2011 wird Ipilimumab, ein monoklonaler Antikörper gegen das Protein CTLA-4, therapeutisch genutzt (Robert, 2020). Es ist erwiesen, dass Ipilimumab sowohl bei unbehandelten als auch bei bereits vorbehandelten Patienten das Gesamtüberleben signifikant verbessern kann (Robert et al., 2011, Hodi et al., 2010). Danach drängten die monoklonalen Antikörper gegen PD1, wie Pembrolizumab und Nivolumab, und gegen PDL1, wie beispielsweise Atezolizumab, auf den Markt (Robert, 2020). Eine Phase III Studie konnte zeigen, dass eine Behandlung mit Pembrolizumab im Vergleich zu Ipilimumab ein verlängertes progressionsfreies und Gesamtüberleben, bei gleichzeitig geringerem Auftreten schwerer Nebenwirkungen, aufwies (Robert et al., 2015). Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch eine Studie, in der die Patienten Nivolumab, Ipilimumab oder eine Kombination aus beiden erhielten. Bei dieser überlebten die Patienten, deren Therapie Nivolumab beinhaltete, insgesamt länger (Larkin et al., 2019). Allerdings bringen diese neuen Therapien auch unerwünschte Wirkungen mit sich, die sich von den klassischen Nebenwirkungen von Zytostatika Therapien unterscheiden. Bei den Patienten kann es unter anderem zu Entzündungen der Haut, Kolitis, Pneumonitis, Schilddrüsenfunktionsstörungen und noch vielen weiteren Phänomenen, die

vermutlich mit der Überaktivierung des Immunsystems durch die ICI zusammenhängen, kommen (Boutros et al., 2016). Da diese Nebenwirkungen teilweise sehr gravierend sein können, wird bereits in einigen Studien nach möglichen Biomarkern geforscht, die voraussagen sollen, welche Patientengruppe am wahrscheinlichsten ohne erwartete schwere Nebenwirkungen von einer IT mit ICI profitieren können (Nuñez et al., 2023). Eine weitere Therapieoption sind die Peptidvakzinierungen. Es wurde bereits eine Impfung mit dendritischen Zellen, die zuvor mit melanomspezifischen Peptiden beladen wurden, untersucht (Nestle et al., 1998). Dabei konnte bei einigen Patienten eine antigenspezifische Immunantwort nachgewiesen werden (Nestle et al., 1998). Anstelle von dendritischen Zellen wurde auch schon eine Vakzinierung mit viralen Vektoren, die mit dem Antigen Glykoprotein100 (gp100) beladen waren, getestet und konnte im Mausmodell eine spezifische T-Zell Antwort auslösen (Ring et al., 2020). Für die Nutzung derartiger Therapien ist es aber unerlässlich, genau zu wissen, der Kontakt zu welchen Antigenen es ermöglicht, gegen das Melanom gerichtete Immunantworten zu erzeugen.

## **1.2. Tumorinfiltrierende Lymphozyten**

Schon vor einiger Zeit fiel auf, dass Melanom Patienten häufig eine Vitiligo entwickeln. Mehrere Studien wiesen darauf hin nach, dass diese Patientengruppe ein verlangsamtes Tumorwachstum zeigte, im Vergleich zu der, die keine Vitiligo bekam (Nordlund et al., 1983, Bystryn et al., 1987). Daraufhin nahm man an, dass die Hypopigmentierung das Ergebnis einer Immunantwort sei, die auch für die Zerstörung von Melanom Tumorzellen verantwortlich sei und somit das Tumorwachstum verlangsamen könne (Bystryn et al., 1987). Das Vorhandensein von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) stellte sich als prognostisch günstiger Faktor heraus (Morrison et al., 2022). Außerdem wurde ein Zusammenhang zwischen Melanomen, die ein größeres T-Zellinfiltrat aufwiesen, und einer erhöhten PDL-1-Expression entdeckt, was auf ein besseres Ansprechen auf eine Therapie mit ICI schließen lässt (Kluger et al., 2015, Puig-Saus et al., 2023). Vor allem CD8+ zytotoxische TILs, die in der Lage sind

Tumorantigene zu erkennen und durch das Ausschütten zytotoxischer Granula, Interferon-gamma oder Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) Tumorzellen zu zerstören, können häufig in Melanomen gefunden werden (Braathen et al., 2000). Aber auch CD4+ T-Zellen, regulatorische T-Zellen, B-Zellen und natürliche Killerzellen sind Populationen der TILs (Tietze, 2022). Eine Arbeitsgruppe untersuchte bereits die Zusammensetzung der T-Zellpopulationen in Blut und Gewebe aus Barrierestellen des Immunsystems, wie beispielsweise Haut, Lunge, Jejunum, Lymphknoten und weiteren lymphatischen Organen (Poon et al., 2023). Dabei stellte sich heraus, dass sich durchaus Unterschiede zwischen zirkulierenden T-Zellen aus beispielsweise Blut und T-Zellen, die sich in Geweben aufhielten, finden ließen (Poon et al., 2023). Es wird sich zeigen, ob in dieser Arbeit ebenfalls Unterschiede in Zellen aus SLN und Blut nachgewiesen werden können.

### **1.2.1. CD8+ Tumorinfiltrierende T-Lymphozyten**

Über 90 Prozent der primären und metastasierten Melanome exprimieren laut einer Studie Humane Leukozyten Antigen(HLA)-I-Klasse Antigene (Taramelli et al., 1986). Unter Experten herrscht bisher allerdings noch kein Konsens darüber, ob eine Infiltration mit CD8+ T-Zellen für Patienten einen Überlebensvorteil bietet. Einige Untersuchungen zeigten, dass deren Präsenz durchaus prognostisch günstig ist (Maibach et al., 2020, Piras et al., 2005), wohingegen andere Ergebnisse dies nicht bestätigen konnten (Jensen et al., 2012). Um so wichtiger ist es, die Auswirkungen dieser Zellpopulation noch genauer zu beobachten.

### **1.2.2. CD4+ Tumorinfiltrierende T-Lymphozyten**

CD4+ T-Zellen erkennen Antigene, die ihnen von Major histocompatibility complex (MHC)-II exprimierenden antigenpräsentierenden Zellen (APC) präsentiert werden. Es ist erwiesen, dass sich auf etwa der Hälfte der Melanome

HLA-II-Klasse Antigene finden lassen (Taramelli et al., 1986). Auch die Rolle von CD4+ T-Zellen in Melanomen wird noch kontrovers diskutiert. In einer Studie stellte sich die Präsenz von diesen in SNL, in denen Tumorzellen nachgewiesen wurden, als prognostisch günstig heraus (Kakavand et al., 2015). Ähnliche Beobachtungen zeigten auch aktuellere Studien, in denen CD4+ T-Zellen fähig waren, durch Aktivierung immunologischer Prozesse, Tumorzellen zu bekämpfen (Kruse et al., 2023, Bawden et al., 2024). Im Gegensatz dazu fanden andere Untersuchungen keinen Zusammenhang von CD4+ T-Zellen und einem längeren Gesamtüberleben (Erdag et al., 2012). Eine genauere Betrachtung dieser Zellen ist folglich nötig, um ihren spezifischen Stellenwert in der Tumorbekämpfung besser zu verstehen.

### **1.3. Melanozyten Differenzierungsantigene**

Seit langer Zeit ist bekannt, dass Melanome immunogene Tumore sind und es bestimmte Antigene gibt, die von Melanom Zellen exprimiert und von T-Zellen des eigenen Immunsystems erkannt werden können (Becker, 2006, Haen et al., 2020). Um diese tumorassoziierten Antigene als therapeutisches Ziel sinnvoller nutzen zu können, muss genauer hinterfragt werden, welche Antigene als spezifische Ziele von Immuntherapien in Frage kommen.

#### **1.3.1. Glykoprotein 100**

Das Glykoprotein 100 (gp100) ist ein Transmembranprotein, das unter anderem an der Melanogenese und der Reifung von Melanosomen beteiligt ist (Kawakami and Rosenberg, 1997). Es wird von den meisten Melanom Zellen exprimiert und gehört damit zu den tumorspezifischen Antigenen des Melanoms (Kawakami and Rosenberg, 1997). Der Antikörper HMB-45 gegen das Antigen gp100 spielt bereits in der Diagnostik des Melanoms eine große Rolle (Burg et al., 1997). Es ist bekannt, dass gp100 von TIL erkannt werden kann (Bakker et al., 1994). Damit wird es zu einem möglichen Ziel neuer Immuntherapien. Es existiert bereits der

bispezifische T cell engager Tebentafusp, der sich gegen das immunodominante HLA-A02:01 präsentierte gp100 Epitop richtet und beim Aderhautmelanom Anwendung findet (Martinez-Perez et al., 2021). Tebentafusp kann allerdings nur an Zellen binden, die ein Epitop von gp100 mittels eines spezifischen HLA-Komplexes, nämlich HLA-A02:01, präsentieren (Martinez-Perez et al., 2021). Um den möglichen therapeutischen Nutzen von gp100 noch besser zu verstehen, sollte genauer untersucht werden, von welchen Zellen und wie häufig es an verschiedenen Lokalisationen erkannt wird.

### **1.3.2. Melan A**

Ein weiteres Melanozytendifferenzierungsantigen, das von T-Zellen erkannt werden kann, ist Melan A, auch bekannt als Melanoma antigen recognized by T-cells (MART)-1 (Busam and Jungbluth, 1999). Auch Antikörper gegen Melan A werden in der immunhistochemischen Diagnostik für die Identifikation von Melanom Zellen genutzt und sind sogar sensitiver als HMB-45 (Busam and Jungbluth, 1999). Es konnte bereits gezeigt werden, dass es in Patienten, die eine Vakzinierung mit Melan A Antigen beladenen dendritischen Zellen erhielten, zu einer Immunantwort in Form von INF- $\gamma$  produzierenden reaktiven T-Zellen im Blut kam (Terheyden et al., 2003). Es gilt zu überprüfen, ob auch in SLN Melan A reaktive T-Zellen gefunden werden können.

### **1.3.3. Tyrosinase**

Auch die Tyrosinase ist ein Enzym, das an der Synthese von Melanin beteiligt ist. In einer Studie wurde nahegelegt, dass das Vorhandensein von Tyrosinase messenger-RNA (mRNA) in peripherem Blut von Melanom Patienten mit dem Tumorstadium korrelieren könnte und mittels RT-PCR nachgewiesen werden kann (Stevens et al., 1996). Da weitere Untersuchungen aber zeigten, dass Tyrosinase mRNA nur in unter 50% der Patienten mit Melanom im Blut

nachgewiesen werden konnte, ist es essenziell zu überprüfen, ob Tyrosinase an anderen Lokalisationen, wie beispielsweise in den SNL, als Nachweis für zirkulierende Melanom Zellen dienen kann (Farthmann et al., 1998).

#### **1.3.4. Dopachrom-Tautomerase**

Die Dopachrom-Tautomerase (DCT) oder auch Tyrosinase-related-Protein 2 (TRP-2) ist ebenfalls ein Enzym der Melanogenese. TRP-2 stellte sich als weiteres Antigen dar, das von TIL erkannt werden kann (Wang et al., 1996). Es ist bekannt, dass TRP-2 sowohl auf Melanozyten der normalen Haut als auch auf Melanom Zellen exprimiert werden kann, allerdings seltener als andere MDA (Avogadri et al., 2016). In einer Studie konnte bereits in Mäusen mit Melanomen, die eine Peptidvakzinierung mit TRP-2 erhielten, eine Immunantwort in Form von erhöhter IFN- $\gamma$  Produktion von T-Zellen gezeigt werden (Vasievich et al., 2012). Die Relevanz von TRP-2 als Therapieoption bei Menschen, sollte durch weitere Studien näher untersucht werden.

#### **1.4. Zielsetzung**

In der folgenden Arbeit wurde die Immunmodulation in SLN von Melanom Patienten untersucht. Dabei sollte die Frequenz von Melanozytendifferenzierungsantigen-spezifischen T-Lymphozyten im SNL bestimmt werden. Außerdem galt es herauszufinden, ob eines der MDAs gp100, Melan A, Tyrosinase und TRP-2 besonders häufig eine Immunantwort auslösen konnte. Im Weiteren sollten die Ergebnisse der Zellen aus den SLN mit PBMCs der Patienten verglichen werden. Ebenso wurden weitere Faktoren, wie beispielsweise die Tumordicke und Ulzeration, der LK-Status oder die Viabilität der Zellen betrachtet, um mögliche Zusammenhänge offenzulegen. Da SLN von verschiedenen Lokalisationen zur Verfügung standen, sollten auch diese bezüglich ihres Reaktionsverhaltens miteinander verglichen werden. Bei

Patienten, von denen mehr als ein LK zur Verfügung stand, wurde untersucht, ob die LK ähnliche oder unterschiedliche Reaktionsmuster zeigten.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten allgemeinen Materialien wurden in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Allgemein verwendete Materialien

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalognummer</b>
<b>RPMI 1640</b>	Sigma-Aldrich	R8758
<b>Penicillin/ Streptomycin</b>	Gibco	15140-122
<b>Nicht-essenzielle Aminosäuren</b>	Sigma-Aldrich	M7145
<b>Natriumpyruvat</b>	Lonza	BE-13-115E
<b>Kanamycin</b>	Gibco	15160-054
<b>2<math>\beta</math>-Mercaptoethanol</b>	Gibco	31350-010
<b>Humanserum</b>	Biowest	S4190
<b>Interleukin-2 (Proleukin)</b>	Novartis	768050810125
<b>24-Well Platte</b>	Sarstedt	83.3922500
<b>96-Well Platte</b>	Corning Costar	3799
<b>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)</b>	Sigma-Aldrich	D8537
<b>Brefeldin A</b>	Sigma-Aldrich	B7651

<b>Cyto-Fast Fix/Perm Solution</b>	BioLegend	750000133
<b>Cyto-Fast Perm/Wash Solution 10X</b>	BioLegend	750000135
<b>EDTA</b>	Carl Roth GmbH	CN06.2
<b>Natriumazid</b>	Carl Roth GmbH	K305.1
<b>BSA</b>	Sigma-Aldrich	A7906-100G
<b>Pancoll human</b>	Pan Biotech	P04-60500
<b>Trypan Blue Stain (0,4%)</b>	Gibco	15250-061
<b>CryoStor CS10</b>	Stemcell Technologies	07930

### 2.1.2. Peptidpools

In Tabelle 4 sind die zur T-Zell Stimulation verwendeten proteinspannenden Peptidpools aufgeführt. GenScript hat aus der kanonischen Proteinsequenz 15mere mit 11 Aminosäure Überlappungen hergestellt. Die Peptidpoolröhrchen wurden je mit 2 ml In-vitro-Stimulations (IVS)-Medium aufgelöst und anschließend auf 5 ml IVS-Medium aufgefüllt und eingefroren.

Tabelle 4: Proteinspannende Peptidpools von GenScript

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Gp 100</b>	GenScript
<b>Melan A</b>	GenScript
<b>Tyrosinase</b>	GenScript

<b>TRP-2</b>	GenScript
<b>CEF-Pool</b>	GenScript

### 2.1.3. Antikörper

Die Antikörper, die für die durchflusszytometrische Phänotypisierung notwendigen Färbungen, genutzt wurden, sind Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5: Antikörper für Durchflusszytometrie

<b>Name</b>	<b>Klonalität</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalognummer</b>
<b>PerCP anti-human CD8</b>	Monoklonal	Maus	BioLegend	344708
<b>PE/Cyanine7 anti-human CD4</b>	Monoklonal	Maus	BioLegend	317414
<b>APC/Cyanine7 anti-human CD3</b>	Monoklonal	Maus	BioLegend	317342
<b>FITC anti-human CD154</b>	Monoklonal	Maus	BioLegend	310804
<b>Brilliant Violet 421 anti-human CD45RA</b>	Monoklonal	Maus	BioLegend	304130
<b>APC anti-human TNF- <math>\alpha</math></b>	Monoklonal	Maus	BioLegend	502912
<b>Human IFN- <math>\gamma</math> R-PE Conjugate</b>	Monoklonal	Maus	Invitrogen	MHCIFG04

<b>Zombie Aqua Fixable Viability Kit</b>	Keine	-	BioLegend	423101
--	-------	---	-----------	--------

#### 2.1.4. Zusammensetzung IVS Nährmediums

Tabelle 6: Bestandteile des IVS Nährmediums

<b>Name</b>	<b>Menge für 1 Flasche RPMI</b>
<b>RPMI 1640</b>	500 ml
<b>Penicillin/Streptomycin</b>	5 ml
<b>Natriumpyruvat</b>	5 ml
<b>Nicht-essenzielle Aminosäuren</b>	5 ml
<b>Kanamycin</b>	5 ml
<b>2-beta-Mercaptoethanol</b>	0,5 ml
<b>Humanserum</b>	40 ml

#### 2.1.5. Zusammensetzung des FACS- Puffers

Zur Herstellung des Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)-Puffers wurde Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) mit 2mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 0,1% Natriumazid (NaN<sub>3</sub>) und 1% bovines Serumalbumin (BSA) versetzt.

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Probengewinnung

In das Projekt eingeschlossen wurden alle Patienten mit einem Melanom, die im Zeitraum von 03/2023 bis 08/2023 in der Universitätshautklinik Tübingen eine Sentinellymphonodektomie erhielten und ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie erteilten. Die Lymphknoten wurden nach Entnahme zunächst im Labor der quantitativen Immunzytologie der Hautklinik, wie vorher bereits beschrieben, von medizinisch-technischen Laborassistent: innen verarbeitet. Die danach noch verbliebene Zellsuspension diente Forschungszwecken, sofern sie noch mehr als 2,5 Millionen Zellen enthielt. Im Weiteren erfolgte bei den Patienten eine venöse Blutentnahme von sechs großen EDTA-Röhrchen (9 ml) und zwei Serum-Monovetten (7,5 ml). Diese war jedoch nicht bei allen Patienten möglich, da Patienten manchmal schon frühzeitig entlassen wurden oder die Blutentnahme ablehnten.

### **2.2.2. Isolation peripherer mononukleärer Blutzellen**

Die Isolation der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) aus Patientenblut erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Zuerst wurden je 21 ml Blut auf 50 ml mit PBS aufgefüllt und invertiert. Davon wurden vorsichtig je 25 ml auf 15 ml des Separationsmediums Pancoll geschichtet. Im Anschluss wurden die Proben 40 Minuten mit 900 g bei niedrigster Bremsstufe und 4°C zentrifugiert. Die durch die Zentrifugation entstandene Schicht mononukleärer Zellen wurde abpipettiert und erneut mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 900 g, 4°C und höchster Bremsstufe, wurde der Überstand abgekippt und das am Boden verbleibende Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert. 10 µl dieser Zellsuspension wurden erst in 90 µl PBS, dann in 90 µl Trypanblau überführt und anschließend auf eine Neubauer Zählkammer aufgetragen. Es erfolgte eine Ermittlung der Zellzahl unter dem Mikroskop. Im Weiteren wurden von der Zellsuspension 5 Millionen Zellen abpipettiert. Beide Proben wurden wieder mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und für 5 Minuten (900g, 4°C) zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstands wurde das Zellpellet mit den 5 Millionen Zellen in 12 ml Nährmedium resuspendiert und auf einer 24-Well Platte ausgesät. Das

zweite Zellpellet wurde in Cryostor CS10 Medium resuspendiert. Dafür wurde pro 10 Millionen Zellen 1 ml Kryokonservierungsmedium verwendet. Die Zellen wurden in Kryoröhrchen pipettiert und zunächst für 10 Minuten in den Kühlschrank gestellt, bevor sie bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren wurden. Bei einem Teil der Proben wurden noch 10 Millionen Zellen als Zellpellet eingefroren. Die PBMCs wurden einmal in der Woche für die endgültige Lagerung in einen  $-150^{\circ}\text{C}$  Gefrierschrank gebracht.

### **2.2.3. Gewinnung von Serum**

Die zwei Serumröhrchen mit je 7,5 ml Blut wurden bei 900 g und  $4^{\circ}\text{C}$  mit niedrigster Bremsstufe für 40 Minuten zentrifugiert. Danach konnten je 2 ml Serum abpipettiert werden und in 2 Kryoröhrchen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren werden.

### **2.2.4. In vitro T-Zell Stimulation**

Sowohl mit den Zellen des Sentinel Lymphknotens als auch mit den PBMCs wurde eine T-Zell Stimulation nach einem etablierten Protokoll durchgeführt (Berner et al., 2019). Die Zellsuspension aus dem Lymphknoten wurde am Tag der Probengewinnung zunächst auf 50 ml mit PBS aufgefüllt und für 10 Minuten bei 900 g zentrifugiert. Das nach Abkippen des Überstandes verbleibende Zellpellet wurde in 12 ml Nähmedium resuspendiert und auf einer 24 Well Platte ausgesät. Mit den PBMCs wurde wie zuvor beschrieben vorgegangen. Die Zellen wurden während der gesamten Zeit bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Es wurden, falls die Suspension sehr zellreich war, 12 Millionen Zellen ausgesät, 10 Millionen Zellen als Zellpellet bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren und alle weiteren Zellen in Cryostor CS10 (10 Millionen Zellen pro ml) erst bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren und letztendlich bei  $-150^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **2.2.4.1. Tag 1 – Stimulation**

Am nächsten Tag erfolgte die Stimulation mit vier proteinspannenden Peptidpools (Glykoprotein 100, Melan A, Tyrosinase und TRP-2). Als Positivkontrolle diente ein CEF-Pool (CMV, EBV, Influenza) und als Negativkontrolle das Nährmedium. Für die Stimulation wurde aus jedem Well 1 ml entfernt, ohne dabei die am Boden des Wells befindliche Zellschicht zu berühren, und wieder 1ml der Peptidpools, die zuvor in Nährmedium gelöst wurden, hinzugefügt.

#### **2.2.4.2. Tag 2-9 – Wechsel des IVS-Mediums**

Es erfolgte über 10 Tage eine Expansion der reaktiven T-Zellen mittels Interleukin-2 (IL-2). Dafür fand alle 2 Tage ein Wechsel des IVS-Mediums statt. Es wurde 1 ml pro Well abpipettiert und erneut 1ml Medium, mit 0,3 µl IL-2 versetzt, hinzugefügt.

#### **2.2.4.3. Tag 10 – Restimulation**

An Tag 10 wurde die Restimulation durchgeführt. Dafür wurde eine frische Flasche RPMI 1640 mit 5 ml Penicillin/Streptomycin (P/S) genutzt. Die Zellen wurden aus den Wells entfernt und in 15 ml Falcon Tubes transferiert. Im Anschluss erfolgte eine Waschung mit je 5 ml RPMI+ 1% P/S und eine Inkubation in 5 ml RPMI+1% P/S für 20 Minuten bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Danach wurde für 5 Minuten bei 500 g und 4°C zentrifugiert, der Überstand so entfernt, dass maximal 300 µl verblieben und dieses Volumen in eine 96 Well Platte pipettiert. Nach erneuter Zentrifugation (500 g, 4°C, 5 min) und Abschütten des Überstandes, was im Weiteren bei jeder Zentrifugation geschah, wurden 100 µl der Peptidpools in IVS-Medium gelöst hinzugegeben. Außerdem wurde Brefeldin A in einer Konzentration von 0,4 µl pro 100 µl IVS-Medium verdünnt und davon 100 µl pro

Well zugefügt. Im Folgenden wurden die Zellen für 5 h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Als Nächstes wurde, nach einer Waschung mit 150 µl PBS und Zentrifugation (500g, 4°C, 5 min), eine Viabilitätsfärbung mittels Zombie Aqua™, von welchem 1µl in 999 µl PBS gegeben wurde, durchgeführt, worauf sich eine Inkubation für 30 Minuten bei 4°C anschloss. Dann wurden 150 µl FACS-Puffer (PBS+2mM EDTA+0,1% NaN<sub>3</sub>+1% BSA) pro Well hinzugegeben, gefolgt von einer weiteren Zentrifugation (500 g, 4°C, 5 min).

#### **2.2.4.4. Oberflächenfärbung**

Für die Oberflächenfärbung wurden die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörper CD3-APC/Cy7, CD4-PE/Cy7, CD8-PerCP und CD40L-FITC im Verhältnis 1:100 und CD45RA-BV421 im Verhältnis 1:400 in FACS-Puffer resuspendiert. Davon wurden 50 µl pro Well hinzugefügt und die Zellen für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Es folgte eine Waschung mit 150 µl FACS-Puffer mit anschließender Zentrifugation (500 g, 4°C, 5 min).

#### **2.2.4.5. Permeabilisation**

Der nächste Schritt war die Fixierung der Zellen. Dafür wurden je 100 µl einer Fixierungslösung hinzugegeben. Nach 20 Minuten Inkubation bei 4°C im Kühlschrank folgte eine Zentrifugation (500 g, 4°C, 5 min). Für den Perm-Puffer wurden 100 µl Cyto-Fast Perm/Wash Solution 10X auf 1 ml vollentsalztes Wasser aufgefüllt. Die Zellen wurden mit je 150 µl dieses Puffers gewaschen und zentrifugiert (500 g, 4°C, 5 min).

#### **2.2.4.6. Intrazelluläre Färbung**

Für die intrazelluläre Färbung wurden die Antikörper IFN- $\gamma$ -PE und TNF- $\alpha$ -APC im Verhältnis 1:100 in Perm Puffer resuspendiert. Davon wurden 50 µl pro Well

hinzugefügt und die Platte für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Danach erfolgten 3 Zentrifugationen (500 g, 4°C, 5 min) und dazwischen jeweils eine Waschung, mit 150 µl Perm-Puffer und mit 150 µl FACS-Puffer. Die Zellen wurden als Letztes in 150 µl FACS-Puffer resuspendiert und bis zum nächsten Tag bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

### **2.2.5. Phänotypisierung mittels Durchflusszytometrie**

Am Tag nach der Restimulation erfolgte die Phänotypisierung der Zellen mittels Durchflusszytometrie. Dafür wurde das Durchflusszytometer Cytex® Aurora verwendet.

### **2.2.6. Gating Strategie der Durchflusszytometrie**

Für das Gating wurden jeweils die Proben, die nur mit Medium stimuliert wurden, herangezogen. Zuerst wurden durch Betrachtung des Forwards und Sidewards Scatters die Lymphozyten gated, woraufhin aus dieser Population noch die Zellen, die nicht einzeln durch das Durchflusszytometer flossen, ausgeschlossen wurden. Als Nächstes wurden die durch Zombie Aqua™ gefärbten toten Zellen aussortiert. Aus den lebenden Zellen wurden dann die Zellen, die CD3 positiv und CD45RA negativ waren, als nicht-naive T-Zellen ermittelt. Im Anschluss wurden diese in CD4 und CD8 positive T-Zellen eingeteilt. Von beiden dieser Populationen wurden nun die Zellen betrachtet, die TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$  ausgeschüttet haben. Zusätzlich wurde bei den CD4+ T-Zellen noch in CD40-Ligand positive und negative T-Zellen unterschieden. Es wurde sich vor allem auf INF- $\gamma$ +CD45RA- und INF- $\gamma$ +TNF $\alpha$ +CD45RA- Zellen als Nachweis einer stattgefundenen Immunantwort fokussiert. Dabei wurde eine Reaktion als positiv gewertet, sobald bei  $\geq 1$  Prozent dieser T-Zellen eine Sekretion erfolgte. Im weiteren Verlauf stellt sich auch der Anteil der naiven T-Zellen als interessant heraus, weswegen ein weiteres Gate für CD3+CD45RA+ Zellen gesetzt wurde.

Diese Zellen wurden dann, wie für die CD3+CD45RA- T-Zellen bereits beschrieben, weiter aufgeteilt. Da sich jedes Well etwas in den Werten für naive und nicht-naive T-Zellen unterschied, wurde jeweils der durchschnittliche Anteil für einen LK beziehungsweise eine PBMC Probe berechnet und zur Auswertung herangezogen.

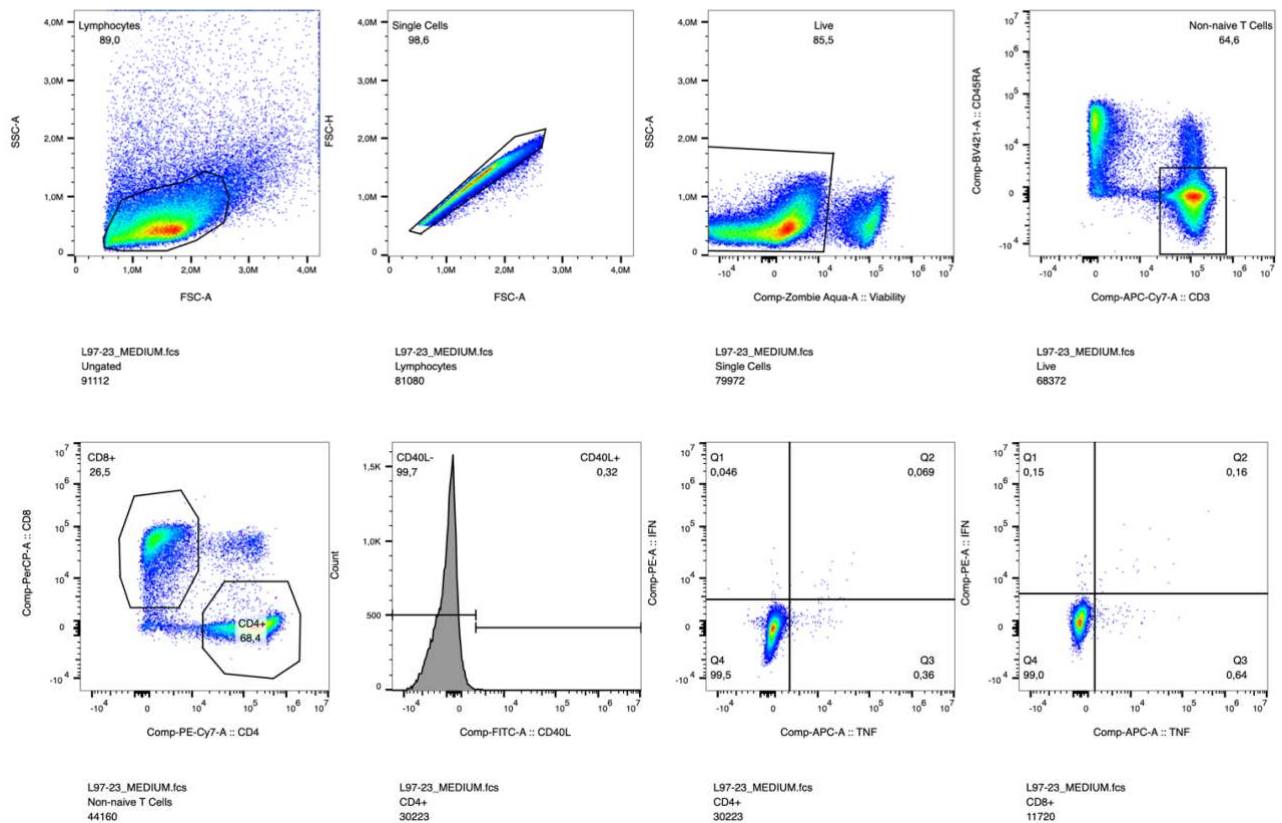


Abbildung 1: Beispiel Gating Strategie LK 97-1-23 Medium; von links oben nach rechts unten: Alle Lymphozyten → Einzelne Zellen → Lebende Zellen → Nicht- naive T-Zellen → CD8+ und CD4+ Zellen → CD40 Ligand +/- Zellen → INF $\gamma$ /TNF $\alpha$  produzierende CD4+ Zellen → INF $\gamma$ /TNF $\alpha$  CD8+ Zellen

## 2.2.7. Tumordicke und Ulzeration

Im Weiteren wurde auch die Tumordicke der Melanome miteinbezogen. Gemäß der AJCC 2016 wurden die Tumore den Tumorstadien 1-4 zugeordnet (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020). Es wurde ebenfalls erfasst, ob eine Ulzeration des Tumors vorlag oder nicht.

### 3. Ergebnisse

Im Zeitraum von März bis August 2023 wurden in der Universitätsklinik Tübingen von 40 Melanom Patienten Zellproben aus SNL gesammelt und ausgewertet. Bei 28 (70%) dieser Patienten konnte zusätzlich eine venöse Blutentnahme mit nachfolgender Isolation von PBMCs und Serum erfolgen. Wie aus Abbildung 2 ersichtlich ist, konnte nicht bei allen der insgesamt 63 gesammelten LK auch eine T-Zell Stimulation durchgeführt werden. Von 8 LK (12,7%) gab es nur Proben mit < 2,5 Mio Zellen. Von diesen wurden keine Zellkulturen angelegt. Im Zeitraum vom 12.04.2023 bis 21.04.2023 mussten 8 (12,7%) kultivierte Proben aufgrund eines präanalytischen Problems verworfen werden. Im Rahmen der Lymphknotenpräparation kam es dabei zu einer Pilzkontamination dieser Proben, so dass sie nicht mehr zur Stimulation verwendet werden konnten. 1 Lymphknoten (1,6%) musste nachträglich aus der Wertung entfernt werden, da sich die ursprüngliche Diagnose eines Melanoms zu der eines Plattenepithel Karzinoms änderte und der Patient somit nicht mehr für diese Studie geeignet war. Ein weiterer Lymphknoten (1,6%) floss aufgrund von einer sehr geringen Zellzahl nicht in die Auswertung ein, da die Ergebnisse der Stimulation dadurch nicht als repräsentativ anzusehen sind, sodass von diesem Patienten nur die PBMCs betrachtet wurden. So wurde letztendlich bei 45 LK Proben (71,4%) und 28 PBMC Proben eine T-Zell Stimulation durchgeführt und ausgewertet. In Abbildung 3 wurden die verschiedenen Patienten-/Lymphknotenkriterien aufgetragen. Dafür wurden Alter, Geschlecht, Tumorart, Ulzeration, Tumordicke, BRAF-Status und die Ergebnisse der LDI und Pathologie hinsichtlich des Befalls der SLN von Tumorzellen ermittelt.

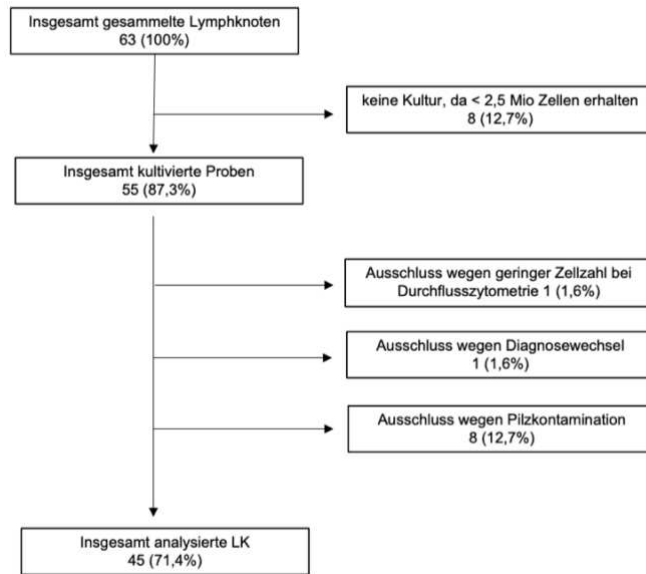


Abbildung 2: Zustandekommen der ausgewerteten Probenanzahl

Kriterium	Anzahl
<b>mittleres Alter- Jahre (Spanne)</b>	61,3 (26-86)
<b>Geschlecht (%)</b>	
w	14 (35)
m	26 (65)
<b>Tumorart (%)</b>	
SSM	24 (60)
ALM	3 (7,5)
NM	6 (15)
LMM	0 (0)
DMM	2 (5)
andere	4 (10)
unbekannt	1 (2,5)
<b>Ulzeration (%)</b>	
ja	9 (22,5)
nein	31 (77,5)
<b>Tumordicke</b>	
T1	4 (10)
T2	20 (50)
T3	11 (27,5)
T4	5 (12,5)
<b>BRAF-Status</b>	
mutiert	5 (11,1)
Wildtyp	5 (11,1)
unbekannt	35 (77,8)
<b>LK Patho (%)</b>	
pos	1 (2,2)
neg	44 (97,8)
<b>LK LDI (%)</b>	
pos	5 (11)
neg	40 (89)

Abbildung 3: Patienten-/Lymphknotenkriterien

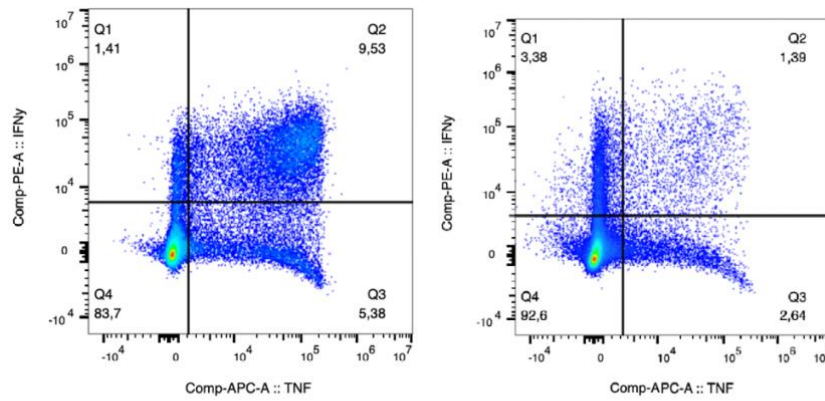
### **3.1. Ergebnisse der Durchflusszytometrie**

#### **3.1.1. Häufigkeit der Melanozytendifferenzierungsantigene**

In der Durchflusszytometrie wurde das Auftreten einer Immunantwort auf eine zehntägige T-Zellstimulation mit porteinspannenden Peptidpools von den Melanozytendifferenzierungsantigenen gp100, Melan A, Tyrosinase und TRP-2, sowie einem CEF-Pool als Positivkontrolle, gemessen. In den Abbildungen 7 und 8 sind die Ergebnisse der Stimulationen jeweils für CD4+ und CD8+ T-Zellen dargestellt. Außerdem wurde für jeden LK auch die Tumordicke des Melanoms und der Befall des LK mit Tumorzellen miteinbezogen.

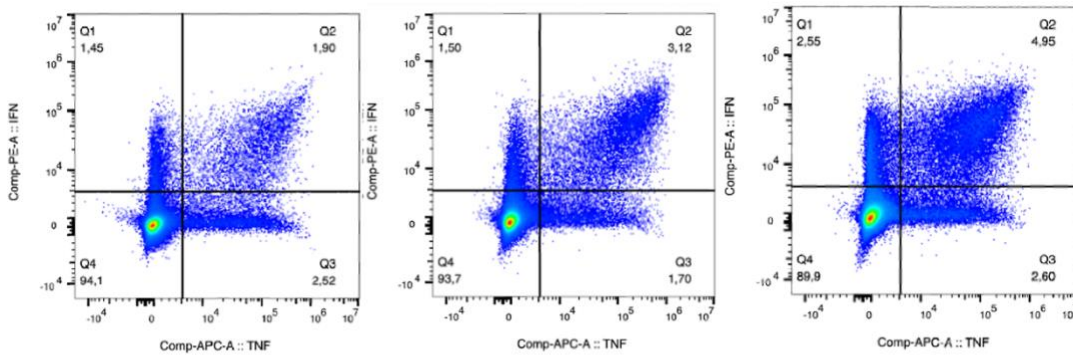
##### **3.1.1.1. CD4+ T-Lymphozyten**

Bei den CD4+ Zellen rief die Positivkontrolle mittels CEF-Pool bei 71,4% der PBMCs und bei 22,2 % der LK eine Reaktion hervor. Das MDA, auf das die meisten CD4+ T-Zellen der PBMCs (57,1%) und der LK Zellen (8,9 %) reagierten, war TRP-2. Die Tyrosinase erzeugte bei 50% der PBMCs und bei 6,7 % der LK eine Immunantwort. Bei 46,4% der mit gp100 stimulierten PBMCs und bei 2,2 % der SNL produzierten >1% der Zellen  $INF\gamma$ . Durch eine Stimulation mit Melan A konnte lediglich bei 28,6% der PBMCs eine Reaktion nachgewiesen werden. Keiner der CD4+ T-Zellen der SNL reagierte auf Melan A. Die CD4+ T-Zellen zeigten im Vergleich zu den CD8+ insgesamt häufiger eine Immunreaktion. Dabei waren insbesondere die PBMCs der Patienten deutlich reaktiver, als die Zellen aus den SNL. Es fiel außerdem auf, dass bei 53,6% der PBMCs eine Reaktion auf mehrere Antigene gemessen werden konnte. Bei den Zellen der LK war dies nur bei 4,4% der Fall. Ein Zusammenhang zwischen den Aktivierungen durch MDAs im SLN und in den PBMCs konnte nicht erkannt werden.



L137-23-PBMCs\_MELANA.fcs  
CD4+  
123776

L148-1-23\_TYROSINASE.fcs  
CD4+  
136137

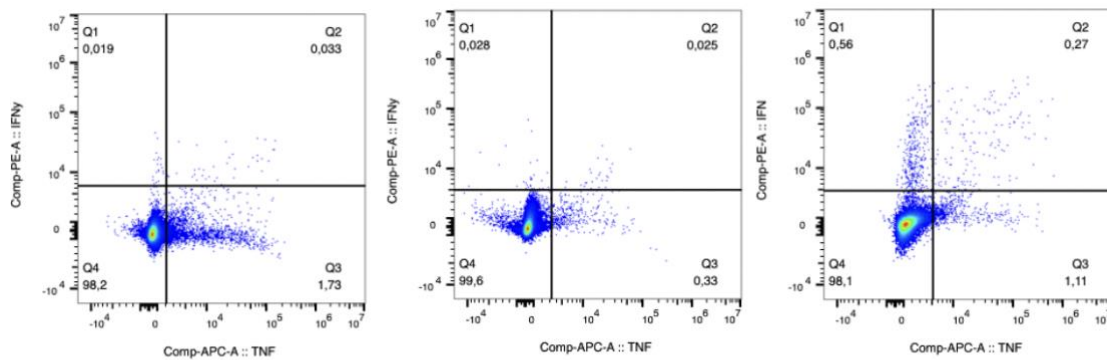


L96-23-PBMCs\_GP100.fcs  
CD4+  
234700

L96-23-PBMCs\_MELANA.fcs  
CD4+  
295446

L96-23-PBMCs\_TYROSINASE.fcs  
CD4+  
308389

Abbildung 4: oben links: Beispiel Reaktion von CD4+ T-Zellen der PBMCs von LK 137 auf Melan A; rechts: Beispiel Reaktion von CD4+ T-Zellen des LK 148 auf Tyrosinase; unten: Beispiel Reaktion von CD4+ T-Zellen der PBMCs von LK 96 auf gp100, Melan A und Tyrosinase



L137-23-PBMCs\_MEDIUM.fcs  
CD4+  
115957

L148-1-23\_MEDIUM.fcs  
CD4+  
110538

L96-23-PBMCs\_MEDIUM.fcs  
CD4+  
58489

Abbildung 5: Negativkontrollen mit Stimulation nur durch das Medium von L137 PBMCs, L148-1 und L96 PBMCs aus Abbildung 4 zum Ausschluss einer Spontansekretion

### 3.1.1.2. CD8+ T-Lymphozyten

Von den CD8+ T-Zellen der PBMCs reagierten 85,7% und der SNL 57,8% auf die Positivkontrolle durch Stimulation mit dem CEF-Pool, wobei die Reaktionen meist deutlicher waren, als die bei den CD4+ Zellen. 28,6% der PBMCs wurden durch gp100 und 25% durch TRP-2 aktiviert, gefolgt von 14,3% durch Melan A und 10,7% durch Tyrosinase. Die Zellen der SLN wurden zu 8,9% durch gp100, zu 6,7% durch TRP-2 und zu jeweils 2,2% durch Tyrosinase und durch Melan A zur  $\text{INF}\gamma$ -Produktion angeregt. Auch wenn die Anzahl an gemessenen Immunreaktionen auf eine Stimulation mit MDAs bei den CD4+ T-Zellen insgesamt höher war, zeigte sich bei alleiniger Betrachtung der SLN eine ähnliche Häufigkeit. Auch bei den CD8+ T-Lymphozyten zeichnete sich bei den PBMCs in mehr Fällen eine Immunreaktion ab, als bei den LK Zellen. Eine Aktivierung durch mehrere MDAs wurde lediglich bei 17,9% der PBMCs erreicht. Auch bei den CD8+ T-Zellen stellte sich kein Zusammenhang zwischen den Reaktionen im SLN und in den PBMCs heraus.

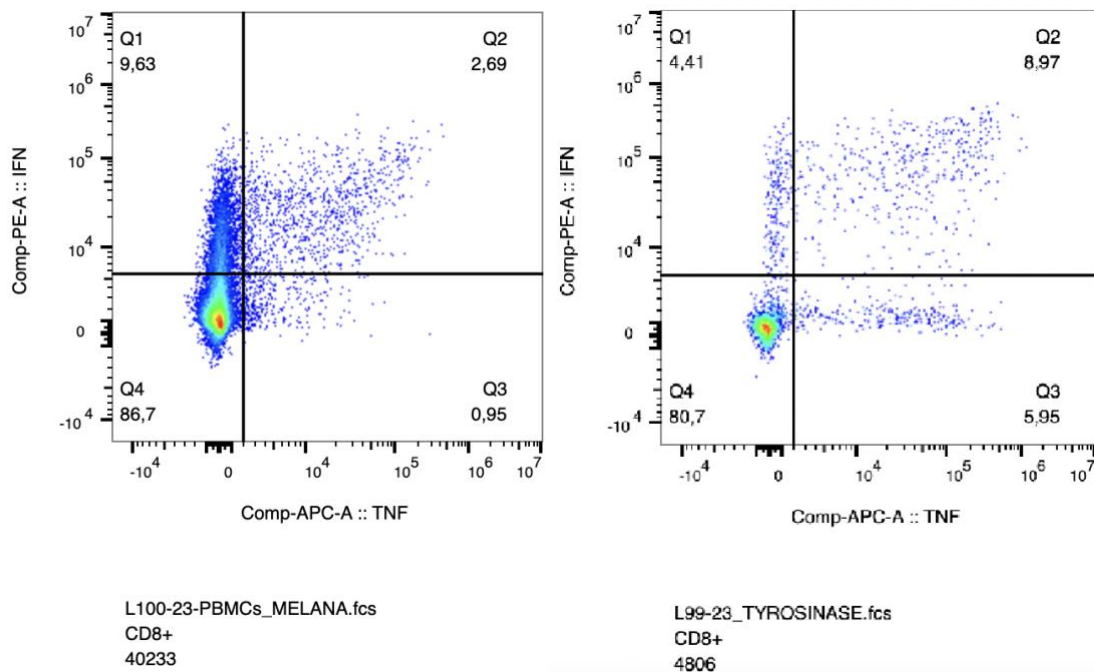


Abbildung 6: links Beispiel Reaktion CD8+ T-Zellen der PBMCs von LK 100 auf Melan A; rechts Beispiel Reaktion von CD8+ T-Zellen des LK 99 auf Tyrosinase

### **3.1.2. Status des Sentinel Lymphknotens**

Bei jedem Patienten wurde durch Betrachtung der Ergebnisse der LDI und der pathologischen Untersuchung der SNL überprüft, ob in diesen Tumorzellen des Melanoms gefunden werden konnten oder nicht. Unter den eingeschlossenen SLN befanden sich, wie auch in den Abbildungen 7 und 8 erkenntlich, 5 (11,1%), die sich als von Tumorzellen befallen herausstellten. Bei den übrigen 40 LK (88,9%) konnte kein Melanom eindeutig nachgewiesen werden. Bei keinem dieser positiven SLN konnte eine Aktivierung durch die Stimulation mit den MDAs hervorgerufen werden. Von drei (60%) der Patienten mit positivem LK Status konnten PBMCs gewonnen werden. In allen drei Proben reagierten die CD4+ T-Zellen auf Tyrosinase und in zwei Fällen auf TRP-2. Die CD8+ T-Zellen zeigten sich nur in einem Fall durch Tyrosinase aktivierbar.

CD4+	CEF	gp100	Melan A	Tyrosinase	TRP-2	LK Status	Tumordicke
L61							
L61 PBMC							
L62-1							
L62-2							
L62-4							
L62 PBMC							
L64-1							
L64-2							
L92							
L92 PBMC							
L96							
L96 PBMC							
L97							
L98							
L98 PBMC							
L99							
L100							
L100 PBMC							
L104							
L104 PBMC							
L105							
L105 PBMC							
L106							
L106 PBMC							
L113							
L113 PBMC							
L116							
L117							
L117 PBMC							
L119							
L120							
L120 PBMC							
L124							
L124 PBMC							
L131-1							
L131-2							
L132-1							
L132-2							
L132 PBMC							
L137							
L137 PBMC							
L138-1							
L138-2							
L138 PBMC							
L139							
L139 PBMC							
L141							
L142							
L142 PBMC							
L143							
L143 PBMC							
L148							
L149							
L149 PBMC							
L151							
L151 PBMC							
L154							
L158							
L158 PBMC							
L160							
L164							
L167							
L167 PBMC							
L172							
L172 PBMC							
L179 PBMC							
L182							
L182 PBMC							
L183							
L183 PBMC							
L188							
L188 PBMC							
L191							

% IFN+	
	>20
	10
	5
	2,5
	1
Tumordicke	
	T1
	T2
	T3
	T4
LK Status	
	negativ
	positiv

Abbildung 7: links: CD4 + Inf $\gamma$  +/CD45RA- T-Zellen nach T-Zellstimulation mit proteinspannenden Peptidpools von gp100, Melan A, Tyrosinase, TRP-2 und CEF in Prozent. Rechts: Positivität des SNL für Tumorzellen und Tumordicke in T-Stadien



### 3.1.3. Tumordicke und Ulzeration

In den Abbildungen 7 und 8 wurde zudem die Tumordicke dargestellt. Außerdem wurde erfasst, ob eine Ulzeration des Tumors vorlag oder nicht. Bei 10 LK (22,2%) war der Primärtumor ulzeriert, bei 35 LK (77,8%) lag bei dem Melanom keine Ulzeration vor. Abbildung 9 zeigt, zu welchen Tumorstadien die Primärtumore der SLN zugeordnet wurden. 6 SLN stammten von Patienten mit T1 Tumoren, 23 SLN von T2 Tumoren, 12 SLN von T3 Tumoren und 4 SLN von T4 Tumorpatienten.

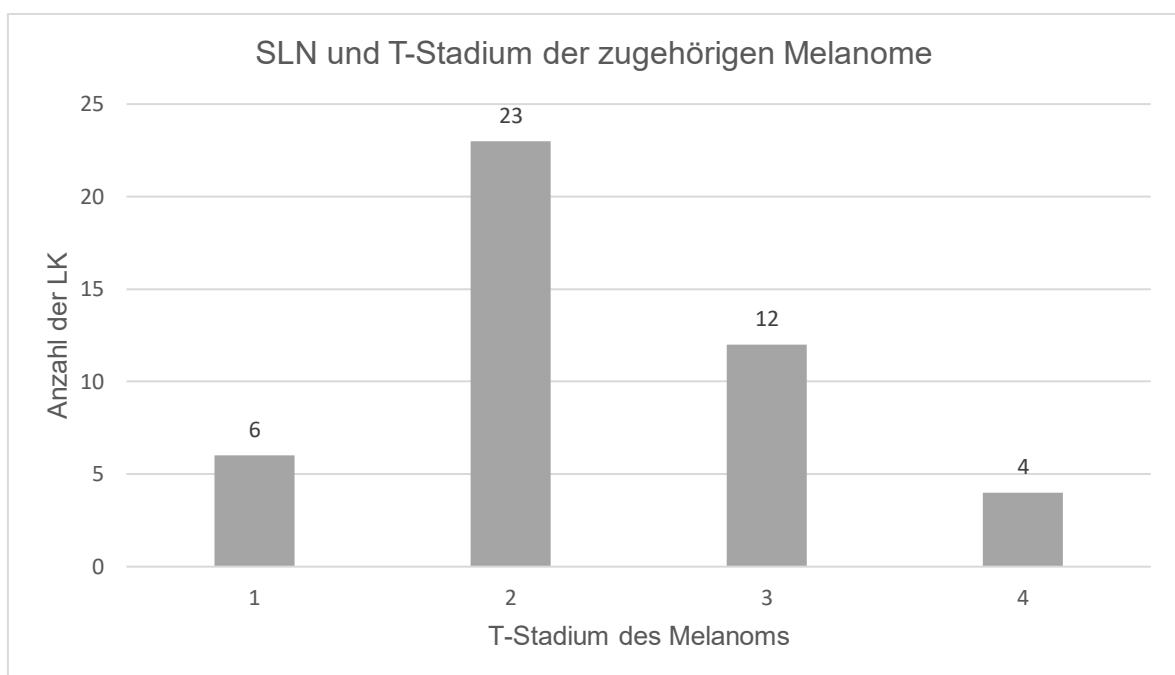


Abbildung 9: Zuordnung der jeweiligen T-Stadien zu den SLN in Prozent

Es gab 6 (75%) Reaktionen der CD4+ T-Zellen auf ein MDA, die CEF Kontrolle ausgenommen, die in LK passierten, die zu einem Tumor mit T-Stadium 2 zugeordnet wurden. Stadium 1 und 4 folgten mit je 12,5 % der gemessenen Reaktionen. Im exakten Test nach Fisher ergibt dies einen p-Wert von 0,238 und somit keinen signifikanten Unterschied zwischen den Reaktionen und den verschiedenen Tumorstadien. Auch bei den zugehörigen CD4+ T-Zellen der PBMCs konnten die meisten Immunreaktionen, nämlich 24 (47,1%), in SLN von Tumoren des T-Stadium 2, gefolgt von Stadium 3 (31,4%), beobachtet werden.

Bei den CD8+ T-Zellen aus den LK wurden die meisten Aktivierungen (55,6%) in solchen von T1 Tumoren gemessen, ansonsten zeigte sich eine ausgeglichene prozentuale Verteilung der Reaktionen (22,2% in LK von T3 und je 11,1 % in LK von T2 und T4). Im exakten Test nach Fisher zeigte sich im T1 Stadium eine höhere Anzahl an Reaktionen, als statistisch zu erwarten war. Mit einem Signifikanzniveau von 0,003 ist dieses Ergebnis statistisch signifikant. Allerdings kann aufgrund der geringen Probenanzahl und der unterschiedlichen Häufigkeit der T-Stadien keine statistisch signifikante Korrelation nachgewiesen werden. 81% der Immunantworten bei den CD8+ PBMCs fanden sich in den Stadien 2 und 3, 14,3% in Stadium 4 und 4,8% in T1 LK. Lediglich 1 SLN (10%) eines Patienten mit ulzeriertem Tumor zeigte eine Immunreaktion der CD8+ T-Lymphozyten auf eine Stimulation mit gp100.

**Reaktion \* Tumorstadium Kreuztabelle**

		Tumorstadium				Gesamt
		T1	T2	T3	T4	
Reaktion nein	Anzahl	23	86	48	15	172
	Erwartete Anzahl	22,9	87,9	45,9	15,3	172,0
	% der Gesamtzahl	12,8%	47,8%	26,7%	8,3%	95,6%
ja	Anzahl	1	6	0	1	8
	Erwartete Anzahl	1,1	4,1	2,1	,7	8,0
	% der Gesamtzahl	0,6%	3,3%	0,0%	0,6%	4,4%
Gesamt	Anzahl	24	92	48	16	180
	Erwartete Anzahl	24,0	92,0	48,0	16,0	180,0
	% der Gesamtzahl	13,3%	51,1%	26,7%	8,9%	100,0%

**Chi-Quadrat-Tests**

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Sig. (zweiseitig)	Exakte Sig. (einseitig)	Punkt-Wahrscheinlichkeit
Pearson-Chi-Quadrat	3,295 <sup>a</sup>	3	,348	,320		
Likelihood-Quotient	5,300	3	,151	,185		
Exakter Test nach Fisher-Freeman-Halton	3,704			,238		
Zusammenhang linear-mit-linear	,438 <sup>b</sup>	1	,508	,657	,337	,148
Anzahl der gültigen Fälle	180					

a. 4 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist ,71.

b. Die standardisierte Statistik ist -,662.

Abbildung 10: Statistischer Vergleich der Reaktionen auf MDAs in LK von T1-T4 Tumoren der CD4+ T-Zellen

### Reaktion \* Tumorstadium Kreuztabelle

		Tumorstadium				Gesamt
		T1	T2	T3	T4	
Reaktion nein	Anzahl	19	91	46	15	171
	Erwartete Anzahl	22,8	87,4	45,6	15,2	171,0
	% der Gesamtzahl	10,6%	50,6%	25,6%	8,3%	95,0%
ja	Anzahl	5	1	2	1	9
	Erwartete Anzahl	1,2	4,6	2,4	,8	9,0
	% der Gesamtzahl	2,8%	0,6%	1,1%	0,6%	5,0%
Gesamt	Anzahl	24	92	48	16	180
	Erwartete Anzahl	24,0	92,0	48,0	16,0	180,0
	% der Gesamtzahl	13,3%	51,1%	26,7%	8,9%	100,0%

### Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Sig. (zweiseitig)	Exakte Sig. (einseitig)	Punkt-Wahrscheinlichkeit
Pearson-Chi-Quadrat	15,755 <sup>a</sup>	3	,001	,003		
Likelihood-Quotient	11,760	3	,008	,007		
Exakter Test nach Fisher-Freeman-Halton	11,980			,003		
Zusammenhang linear-mit-linear	2,549 <sup>b</sup>	1	,110	,141	,079	,048
Anzahl der gültigen Fälle	180					

a. 4 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist ,80.

b. Die standardisierte Statistik ist -1,597.

Abbildung 11: Statistischer Vergleich der Reaktionen auf MDAs in LK von T1-T4 Tumoren der CD8+ T-Zellen

### 3.2. Viabilität der Zellen

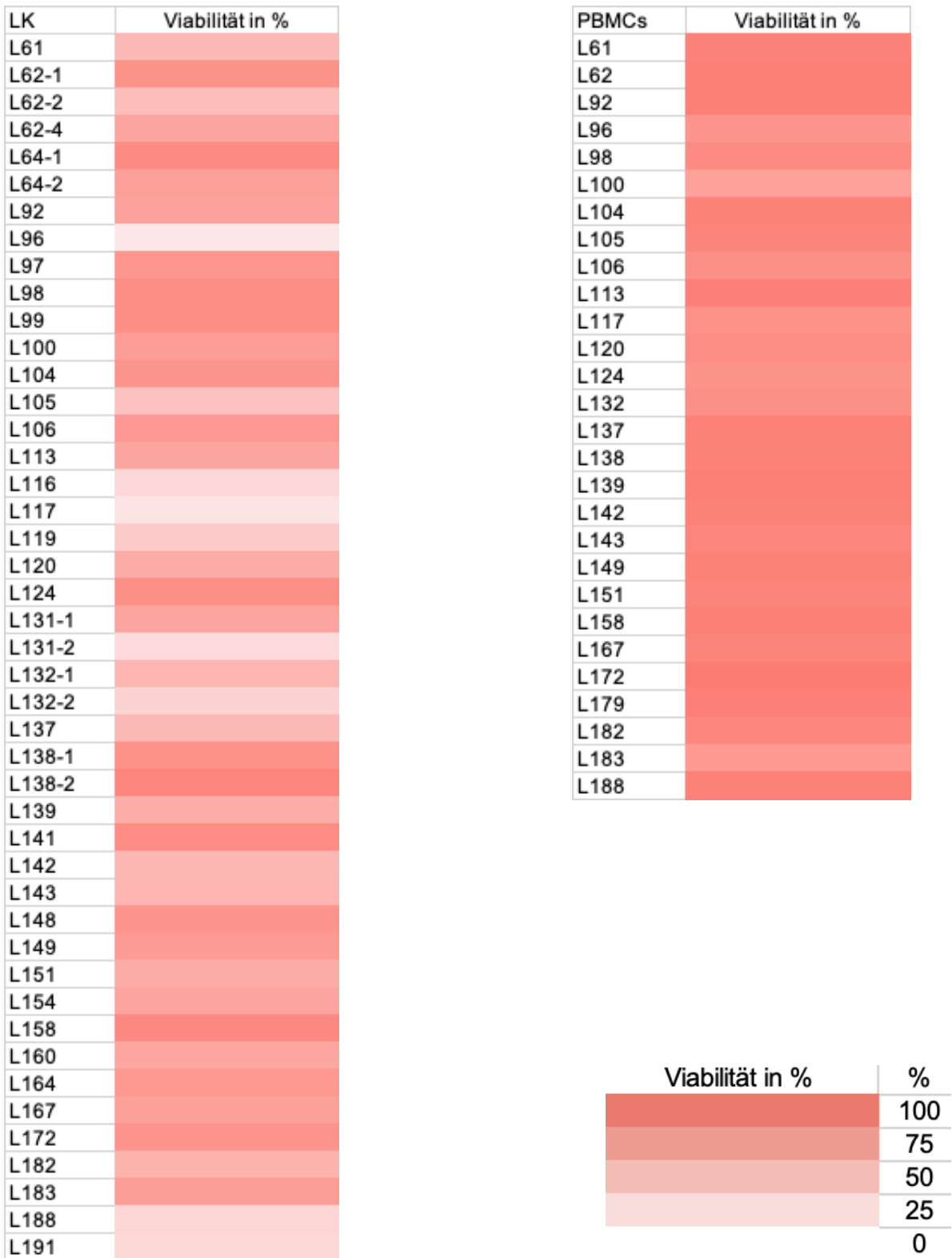


Abbildung 12: Durchschnittliche Viabilität der LK Zellen (links) und der PBMCs (rechts) in Prozent

Die Abbildung 12 zeigt, dass sich die Viabilität zwischen den LK-Zellen und den PBMCs teilweise deutlich unterschied, wobei sich bei den PBMCs in den meisten Fällen eine höhere Viabilität abzeichnete. Bei alleiniger Betrachtung der Zellen aus den SLN fiel auf, dass die Anzahl der nach zehntägiger Stimulation noch lebenden Zellen sehr variabel war. Da selbst unter den mit den verschiedenen Peptidpools stimulierten Zellen innerhalb eines LK Unterschiede in der Anzahl der lebenden Zellen aufgewiesen wurden, wurde für jeden LK die durchschnittliche Viabilität berechnet und in Abbildung 12 dargestellt. Es wird ebenfalls deutlich, dass auch in verschiedenen LK des gleichen Patienten, wie in Abbildung 12 beispielsweise LK 62-1, 62-2 und 62-4, eine variable Anzahl an lebenden und toten Zellen befinden kann. Die PBMCs, für die auch eine durchschnittliche Viabilität berechnet wurde, variierten in dieser Hinsicht insgesamt viel weniger, was in Abbildung 12 ebenfalls deutlich wird.

### 3.3. Anzahl CD4/CD8+ T-Lymphozyten in Lymphknoten und PBMCs

In den Abbildungen 13 und 14 wurde die durchschnittliche Anzahl der CD4+/CD8+ T-Zellen dargestellt.

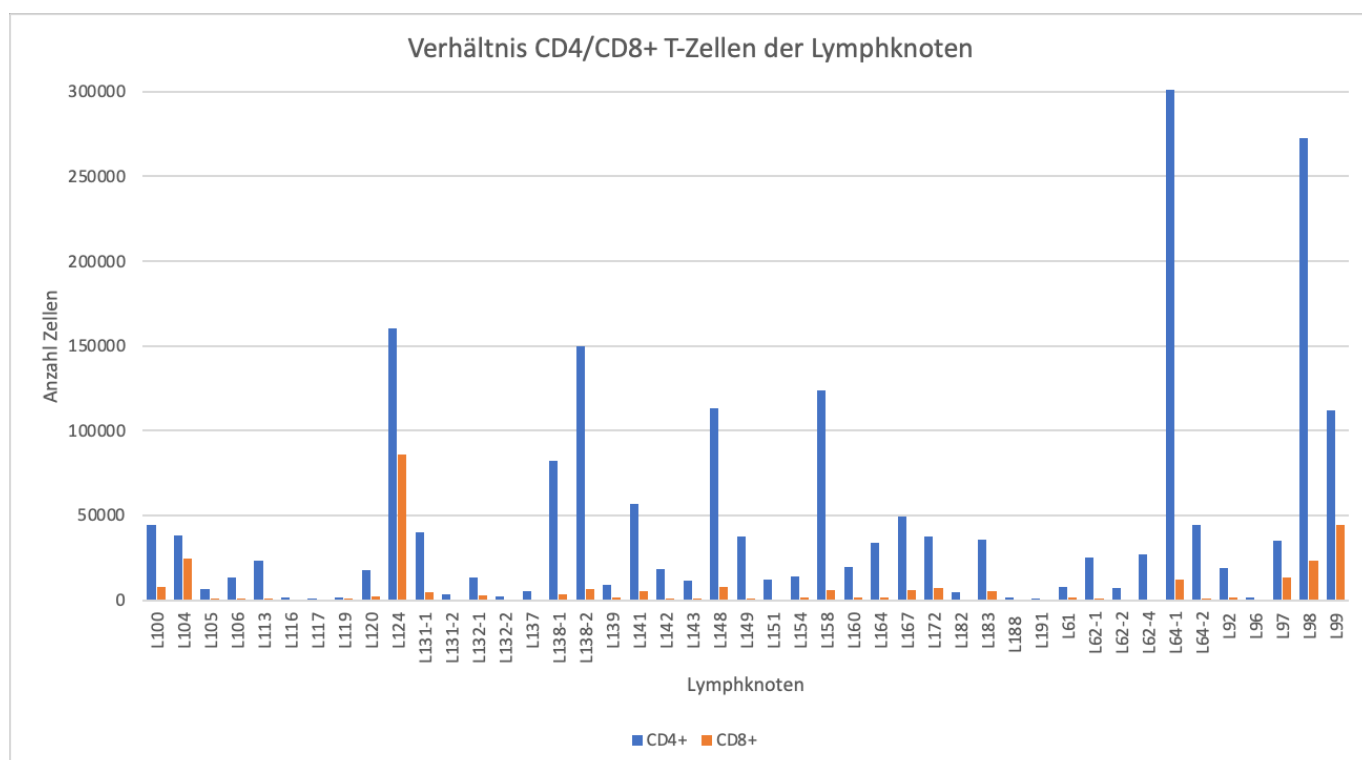


Abbildung 13: Vergleich durchschnittliche Anzahl CD4+/CD8+/CD45RA- T-Lymphozyten in den SLN nach T-Zellstimulation mit proteinspannenden Peptidpools

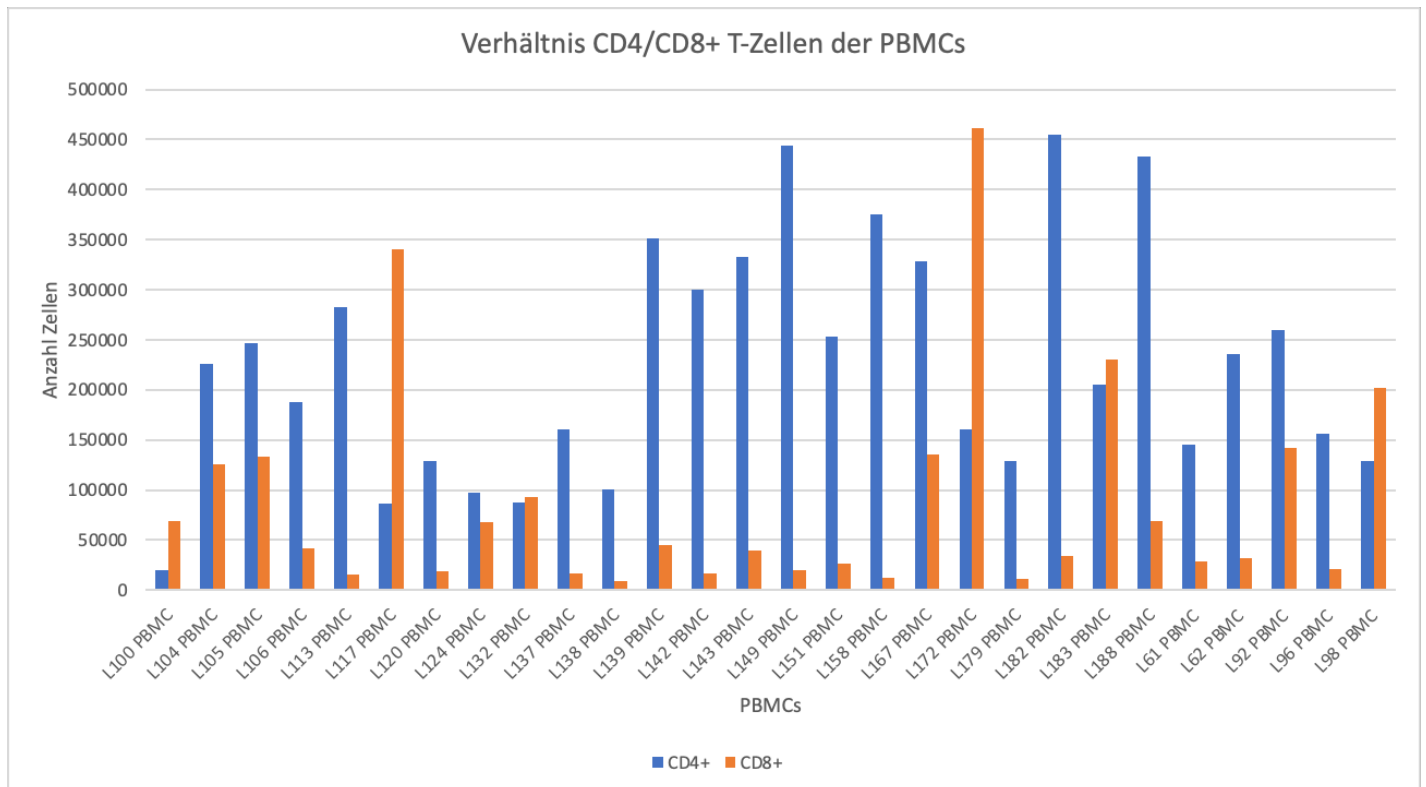


Abbildung 14: Vergleich durchschnittliche Anzahl der CD4+/CD8+/CD45RA- T-Lymphozyten in den PBMCs nach T-Zellstimulation mit proteinspannenden Peptidpools

Dabei fiel auf, dass sich sowohl in den LK, als auch in den PBMC Proben, nach 10-tägiger T-Zellstimulation mit den MDAs in den meisten Fällen deutlich mehr CD4+ T-Lymphozyten befanden. Insbesondere unter den SLN variierte die Anzahl an CD4+ und CD8+ T-Zellen stark, wobei die der CD4+ in allen LK größer war. Bei den PBMCs enthielten 78,6% der Proben mehr CD4+ T-Lymphozyten und bei 21,4% überwog der Anteil der CD8+ T-Zellen.

### 3.4. Verhältnis CD3+CD45RA+/CD3+CD45RA- T-Lymphozyten in Lymphknoten und PBMCs

Die Abbildung 15 zeigt den durchschnittlichen prozentualen Anteil der CD3+CD45RA- T-Zellen im Verhältnis zu den CD3+CD45RA+ T-Zellen in den Lymphknoten und den PBMCs in. Dabei zeichnete sich, insbesondere unter den PBMCs, mit Werten zwischen 78% und 99% durchschnittlich ein höherer Anteil an nicht-naiven T-Zellen ab. Auch in den betrachteten LK Proben fanden sich

mehr nicht-naive als naive T-Zellen, wobei sich mit Werten von 50% bis 95% eine etwas weitere Verteilung zeigte, als bei den PBMCs. Bei den Patienten, von denen mehrere LK ausgewertet wurden, war das Verhältnis der verglichenen Zelltypen stets sehr ähnlich in den jeweiligen LK.

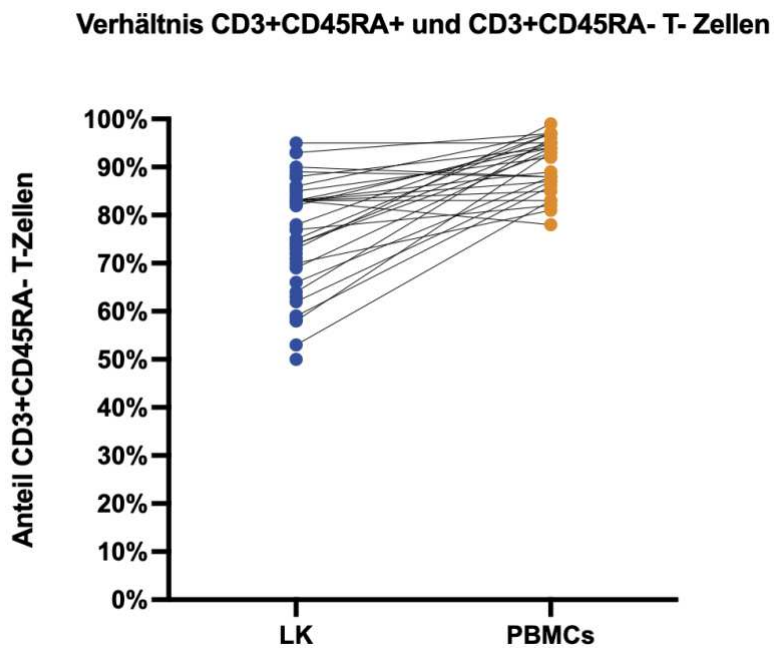


Abbildung 15: durchschnittlicher Anteil CD3+CD45RA- T-Zellen in LK und PBMCs in Prozent im Verhältnis zu den CD3+CD45RA+ T-Zellen

### 3.5. Unterschiedliche Lokalisation der Lymphknoten

Unter den in die Studie eingeschlossenen Lymphknoten befanden sich 27 axilläre LK (60 %) und 18 LK (40%), die den Patienten aus der Leiste entnommen wurden. Es sollte überprüft werden, ob sich die Zellen in den verschiedenen lokalisierten LK bezüglich ihres Reaktionsverhaltens unterscheiden. Dabei wurde erst die CEF Kontrolle alleine und dann auch die Reaktion der Zellen eines LKs auf mindestens eines der MDAs, außer der Positivkontrolle, mit denen stimuliert wurde, betrachtet. Ein Vergleich der Aktivierungen in den LK durch die CEF Kontrolle zeigt, dass diese in den axillären LK bei den CD4+ T-Zellen bei

17,8% und den CD8+ T-Zellen bei 37,8% erfolgreich war. In den Leistenlymphknoten reagierten nur 4,4% der LK mit einer  $\text{INF}\gamma$  Produktion der CD4+ und 20% der LK mit einer  $\text{INF}\gamma$  Produktion der CD8+ T-Zellen. Im statistischen Vergleich mittels exaktem Test nach Fisher ergaben sich für die CD4+ ein p-Wert von 0,272 und für die CD8+ von 0,539. Bei einem Signifikanzniveau von 0,05 sind somit bei der CEF Kontrolle keine signifikanten Unterschiede für die Aktivierung in axillären und Leisten-LK zu beobachten. Um die Aktivierungen durch die MDAs an den verschiedenen Lokalisationen genauer zu untersuchen, wurde ebenfalls ein exakter Test nach Fisher durchgeführt. Mit p-Werten von 1,000 bei den CD4+ T-zellen und 0,215 bei den CD8+ T-Zellen konnten bei einem Signifikanzniveau von 0,05 ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den LK aus der Axilla und der Leiste nachgewiesen werden. Die Ergebnisse wurden auch in den Abbildungen 16-19 dargestellt.

## CD4+ T-Lymphozyten

CEF \* LK Kreuztabelle

		LK			
		Le	Ax	Gesamt	
CEF	nein	Anzahl	16	19	35
		Erwartete Anzahl	14,0	21,0	35,0
		% der Gesamtzahl	35,6%	42,2%	77,8%
	ja	Anzahl	2	8	10
		Erwartete Anzahl	4,0	6,0	10,0
		% der Gesamtzahl	4,4%	17,8%	22,2%
Gesamt		Anzahl	18	27	45
		Erwartete Anzahl	18,0	27,0	45,0
		% der Gesamtzahl	40,0%	60,0%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Sig. (zweiseitig)	Exakte Sig. (einseitig)	Punkt-Wahrscheinlichkeit
Pearson-Chi-Quadrat	2,143 <sup>a</sup>	1	,143	,272	,136	
Kontinuitätskorrektur <sup>b</sup>	1,205	1	,272			
Likelihood-Quotient	2,300	1	,129	,170	,136	
Exakter Test nach Fisher				,272	,136	
Zusammenhang linear-mit-linear	2,095 <sup>c</sup>	1	,148	,272	,136	,106
Anzahl der gültigen Fälle	45					

- a. 1 Zellen (25,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 4,00.  
 b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet  
 c. Die standardisierte Statistik ist 1,447.

Abbildung 16: Statistischer Vergleich der CEF-Kontrolle in LK der Leiste und Axilla

## CD8+ T-Lymphozyten

CEF \* LK Kreuztabelle

		LK			
		Le	Ax	Gesamt	
CEF	nein	Anzahl	9	10	19
		Erwartete Anzahl	7,6	11,4	19,0
		% der Gesamtzahl	20,0%	22,2%	42,2%
	ja	Anzahl	9	17	26
		Erwartete Anzahl	10,4	15,6	26,0
		% der Gesamtzahl	20,0%	37,8%	57,8%
Gesamt		Anzahl	18	27	45
		Erwartete Anzahl	18,0	27,0	45,0
		% der Gesamtzahl	40,0%	60,0%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Sig. (zweiseitig)	Exakte Sig. (einseitig)	Punkt-Wahrscheinlichkeit
Pearson-Chi-Quadrat	,744 <sup>a</sup>	1	,388	,539	,289	
Kontinuitätskorrektur <sup>b</sup>	,307	1	,579			
Likelihood-Quotient	,742	1	,389	,539	,289	
Exakter Test nach Fisher				,539	,289	
Zusammenhang linear-mit-linear	,727 <sup>c</sup>	1	,394	,539	,289	,168
Anzahl der gültigen Fälle	45					

- a. 0 Zellen (0,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 7,60.  
 b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet  
 c. Die standardisierte Statistik ist ,853.

Abbildung 17: Statistischer Vergleich der CEF-Kontrolle in LK der Leiste und Axilla CD8+ T-Zellen

## CD4+ T-Lymphozyten

**Reaktion \* LK Kreuztabelle**

		LK		Gesamt
		Le	Ax	
Reaktion nein	Anzahl	16	23	39
	Erwartete Anzahl	15,6	23,4	39,0
	% der Gesamtzahl	35,6%	51,1%	86,7%
ja	Anzahl	2	4	6
	Erwartete Anzahl	2,4	3,6	6,0
	% der Gesamtzahl	4,4%	8,9%	13,3%
Gesamt	Anzahl	18	27	45
	Erwartete Anzahl	18,0	27,0	45,0
	% der Gesamtzahl	40,0%	60,0%	100,0%

**Chi-Quadrat-Tests**

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Sig. (zweiseitig)	Exakte Sig. (einseitig)	Punkt-Wahrscheinlichkeit
Pearson-Chi-Quadrat	,128 <sup>a</sup>	1	,720	1,000	,544	
Kontinuitätskorrektur <sup>b</sup>	,000	1	1,000			
Likelihood-Quotient	,131	1	,718	1,000	,544	
Exakter Test nach Fisher				1,000	,544	
Zusammenhang linear-mit-linear	,125 <sup>c</sup>	1	,723	1,000	,544	,330
Anzahl der gültigen Fälle	45					

a. 2 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 2,40.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

c. Die standardisierte Statistik ist ,354.

Abbildung 18: Statistischer Vergleich der Reaktionen auf mindestens ein MDA in LK der Leiste und Axilla CD4+ T-Zellen

## CD8+ T-Lymphozyten

**Reaktion \* LK Kreuztabelle**

		LK		Gesamt
		Le	Ax	
Reaktion nein	Anzahl	17	21	38
	Erwartete Anzahl	15,2	22,8	38,0
	% der Gesamtzahl	37,8%	46,7%	84,4%
ja	Anzahl	1	6	7
	Erwartete Anzahl	2,8	4,2	7,0
	% der Gesamtzahl	2,2%	13,3%	15,6%
Gesamt	Anzahl	18	27	45
	Erwartete Anzahl	18,0	27,0	45,0
	% der Gesamtzahl	40,0%	60,0%	100,0%

**Chi-Quadrat-Tests**

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)	Exakte Sig. (zweiseitig)	Exakte Sig. (einseitig)	Punkt-Wahrscheinlichkeit
Pearson-Chi-Quadrat	2,284 <sup>a</sup>	1	,131	,215	,137	
Kontinuitätskorrektur <sup>b</sup>	1,191	1	,275			
Likelihood-Quotient	2,572	1	,109	,215	,137	
Exakter Test nach Fisher				,215	,137	
Zusammenhang linear-mit-linear	2,233 <sup>c</sup>	1	,135	,215	,137	,117
Anzahl der gültigen Fälle	45					

a. 2 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 2,80.

b. Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet

c. Die standardisierte Statistik ist 1,494.

Abbildung 19: Statistischer Vergleich der Reaktionen auf mindestens ein MDA in LK der Leiste und Axilla CD8+ T-Zellen

### 3.6. Unterschiede in Lymphknoten desselben Patienten

In 5 Fällen wurden bei einem Patienten mehr als ein LK entfernt und anschließend stimuliert. Bei 4 Patienten gibt es Ergebnisse von 2 und bei einem sogar von 3 LK. Keine der zusammengehörigen LK zeigten Reaktionen auf die gleichen MDAs.

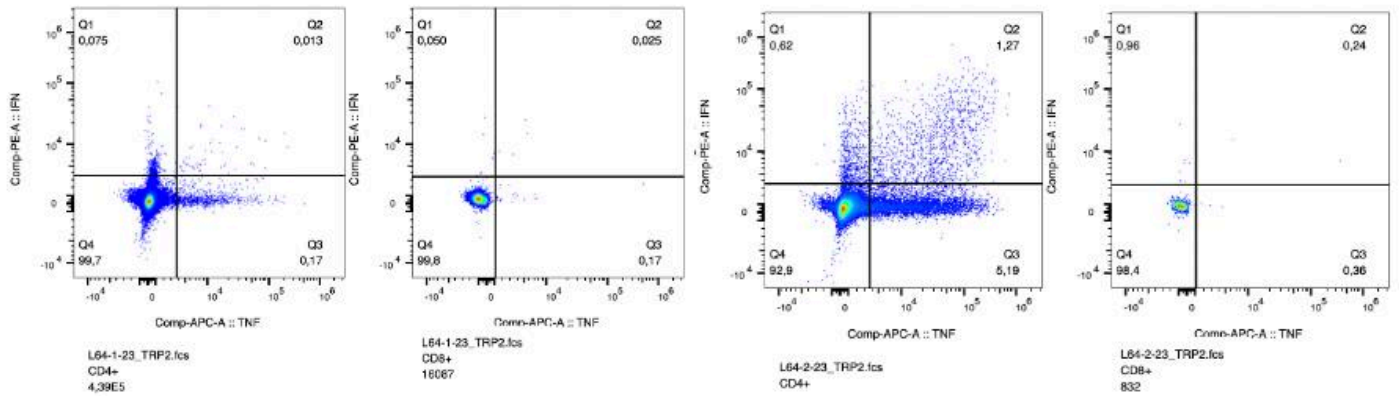


Abbildung 20: Beispiel LK 64-1 und 64-2 vom gleichen Patienten; links keine Aktivierung durch TRP-2, rechts Aktivierung der CD4+ T-Zellen durch TRP-2

#### 4. Diskussion

Die durchgeführte Studie zeigte, dass sich prinzipiell durch eine T-Zell Stimulation mit den MDAs gp100, Melan A, Tyrosinase und TRP-2 in Zellen aus SLN von Melanom Patienten und den dazugehörigen PBMCs Immunreaktionen nachweisen lassen. Dies bestätigt die in der Literatur bereits häufig beschriebene Annahme, dass Melanom Zellen Antigene präsentieren, die von den T-Lymphozyten des Immunsystems erkannt werden können (Haen et al., 2020). Eine Studie deutete zudem an, dass sich in Barrierestellen des Immunsystems, wie beispielsweise in LK, sogenannte resident-memory T-Zellen (TRM) aufhalten, die eine Rolle bei der Immunantwort spielen (Poon et al., 2023). Auch unsere Ergebnisse zeigen, dass sich T-Zellen, die Antigene wiedererkennen können, in SLN von Melanom Patienten befinden. Es wäre sehr interessant diese Zellen näher zu untersuchen und zu überprüfen, ob es sich hierbei um solche TRM handelt. Dies könnte man zum Beispiel durch eine durchflusszytometrische Phänotypisierung herausfinden. Denn TRM in menschlichen LK exprimieren in vielen Fällen den Oberflächenmarker CD69 und sind CD103 negativ (Szabo et al., 2019). Die Positivkontrolle in Form eines CEF Pools funktionierte häufiger bei den Proben der PBMCs und insbesondere bei den CD8+ T-Lymphozyten fand eine erhöhte  $INF\gamma$ -Produktion statt. Vor allem die Aktivierung der CD8+ zytotoxischen T-Zellen spielt bekanntlich im Rahmen einer Virusinfektion eine große Rolle (Schuster and Kreth, 2019). Der Hauptgrund für die geringere Stimulation der CD4+ T-Zellen ist allerdings, dass der CEF Pool nur Peptide mit HLA-Oberflächenmolekülen mit den HLA-A- und HLA-B-Antigenen enthält. Diese codieren HLA-Klasse I Zelloberflächenrezeptoren und gehören somit zu den Peptiden, die von CD8+ T-Lymphozyten erkannt werden. Somit war die häufigere Aktivierung der CD8+ T-Zellen zu erwarten. Es gab auch Proben, bei denen weder die SLN Zellen, noch die PBMCs auf die Stimulation mit CEF reagierten. Eine mögliche Ursache dafür könnte sein, dass der CEF Peptidpool, von dem immer einige Röhrchen vorrätig mit IVS-Medium gelöst wurden, manchmal nicht richtig funktionierte. Es wäre theoretisch auch denkbar, dass der Patient tatsächlich noch keinen Kontakt mit dem Cytomegalievirus (CMV), dem Epstein-

Barr-Virus (EBV) oder Influenza hatte und deswegen keine T-Zellen aktiviert werden konnten. Die Seroprävalenz von CMV in der deutschen Bevölkerung beträgt aber 57% und die von EBV bei Erwachsenen > 90% (Lachmann et al., 2018, Walther et al., 2005). Mit Influenza infizieren sich in Deutschland pro Erkrankungswelle 5-20% der Bevölkerung (Bruder, 2021). Aufgrund dieser hohen Seroprävalenzen ist es eher unwahrscheinlich, dass noch nie Kontakt zu einem dieser Erreger bestand. Außerdem konnte in manchen Proben eine Aktivierung des Mediums gemessen werden, zu dem eigentlich keine Antigene hinzugefügt wurden. Auch hierfür gibt es einige denkbare Ursachen. Da die Wells der 24-Well Platten sehr dicht nebeneinander liegen, kann es trotz erhöhter Vorsicht beim Bewegen der Platten und Pipettieren passieren, dass Tröpfchen eines anderen Wells in das mit Medium gelangen und so eine Aktivierung auslösen. Eine  $INF\gamma$ -Produktion in der Negativkontrolle könnte auch durch andere Antigene, die im Blut oder den LK der Patienten zu dem Zeitpunkt vorhanden waren und nichts mit dem Melanom zu tun hatten, hervorgerufen worden sein. Da das Medium während des Gatings immer als Referenz genommen wurde, sollten aber auch die Ergebnisse in den Proben mit leicht aktivem Medium als auswertbar angesehen werden.

#### **4.1. Frequenz melanozytendifferenzierungsantigen spezifischer T-Zellen im Sentinel Lymphknoten und PBMCs**

Das MDA, das bei den CD4+ T-Zellen der SLN am häufigsten eine Immunantwort auslöste, war TRP-2, dicht gefolgt von der Tyrosinase. Die CD8+ T-Zellen wurden vor allem durch die Stimulation mit gp100 und TRP-2 aktiviert. Bei den PBMCs riefen vor allem TRP-2, Tyrosinase und gp100 eine Reaktion der CD4+ T-Zellen und gp100 und TRP-2 eine Reaktion der CD8+ T-Zellen hervor. Insgesamt waren die Immunreaktionen seltener, als vorher erwartet. Da die MDAs in der Literatur als, von einer Mehrheit der Melanome exprimiert, beschrieben werden, nahmen wir an, häufiger Immunreaktionen der T-Zellen zu messen (Benlalam et al., 2001). Vor allem gp100 und Melan A wird nachgesagt, von den meisten Melanom Zelllinien exprimiert zu werden (Kawakami and

Rosenberg, 1997). Daher war es irritierend, dass insbesondere auf eine Stimulation mit Melan A nur wenige Proben reagierten. Die bisher veröffentlichten Ergebnisse bezüglich der Tyrosinase beziehen sich oft auf Messungen aus dem Blut. Dabei wird beschrieben, dass bei unter 50% der Patienten Tyrosinase mRNA gefunden werden konnte (Farthmann et al., 1998). In unserer Studie konnte bei den CD4+ T-Zellen der PBMCs in 50% der Fälle eine Aktivierung durch die Tyrosinase beobachtet werden, was somit zu den bisherigen Erkenntnissen passt. Interessanterweise wurde TRP-2 bisher als nicht so häufig vorkommendes MDA bezeichnet (Avogadri et al., 2016). Bei unseren Beobachtungen stellte es sich aber sowohl in den SLN, als auch in den PBMCs als das MDA heraus, auf das die meisten Proben mit einer INF $\gamma$ -Produktion reagierten. Um noch aussagekräftigere Ergebnisse bezüglich der Frequenz der verschiedenen MDAs zu erhalten, ist es sinnvoll, mehr SLN zu analysieren. Insgesamt zeigten sich die CD4+ T-Lymphozyten reaktiver, als die CD8+ T-Lymphozyten. Außerdem ließen sich die PBMCs deutlich häufiger aktivieren, als die Zellen der SLN. Es wurde bereits davon berichtet, dass sich TRM, die sich in ortsspezifischen Geweben aufhalten, von zirkulierenden memory T-Zellen unterscheiden (Poon et al., 2023). Dabei sollen die im Blut zirkulierenden memory T-Zellen disseminierter und differenzierter sein, als die gewebespezifischen TRM (Poon et al., 2023). Vielleicht ist die häufiger gemessene Aktivierung durch MDAs in den PBMCs darauf zurückzuführen, dass die zirkulierenden Zellen im Blut aufgrund ihrer höheren Expansion mit größerer Wahrscheinlichkeit auf Antigene des Tumors treffen, als die T-Zellen, die nur in den LK bleiben. Auch unsere Beobachtung, dass die PBMCs in einigen Fällen auf mehr als ein MDA mit einer INF $\gamma$ -Produktion reagierten, könnte zu der Annahme passen, dass die zirkulierenden T-Zellen weiter im Körper verbreitet sind und damit vielleicht auch auf mehrere verschiedenen Antigene treffen können. Eine Immunantwort auf mehr als ein MDA konnte sowohl bei Fällen der PBMCs, als auch bei SLN beobachtet werden. Möglicherweise fand in diesen Fällen eine Epitop Ausweitung statt, was bedeutet, dass T-Zellen im Verlauf mehrere Epitope eines Antigens oder sogar anderer Antigene erkennen können, was auch bei Autoimmunerkrankungen eine große Rolle spielt (Vanderlugt and

Miller, 1996). Der Mechanismus wurde auch schon bei Melanom Patienten, die eine Peptidvakzinierung erhielten, beobachtet (Hu et al., 2021).

#### **4.2. Status des Sentinel Lymphknotens**

In keinem der SLN, in denen Tumorzellen gefunden werden konnten, reagierten die T-Lymphozyten auf die Stimulation mit den MDAs. Bezüglich des SLN Status wären verschiedene Szenarien denkbar. Zunächst könnte es sein, dass ein Melanom mit seinen Antigenen keine Immunreaktion der T-Lymphozyten auslösen konnte und auch noch keine Tumorzellen über das Lymphsystem verbreitet wurden, was zu einem negativen SLN Status und keiner Reaktion auf die MDAs in den SLN führte. Ebenso möglich wäre es, dass das Melanom zwar keine T-Zellantwort hervorrufen konnte, aber im SLN Tumorzellen zu finden sind. Dadurch ergäbe sich ein positiver SLN Status, aber keine Reaktionen auf die Stimulation mit den MDAs. Eine weitere Option wäre die Situation, dass das Melanom durch seine MDAs bei den T-Lymphozyten eine Immunreaktion bewirkt. Vor allem die CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen können daraufhin erwiesenermaßen die Tumorzellen im Primärtumor und gegebenenfalls auch Tumorzellen im SLN zerstören (Braathen et al., 2000). Dadurch kommt es zu einem negativen SLN Status, obwohl durch die T-Zellstimulation mit den MDAs T-Zellen aktiviert werden konnten. Noch eine Alternative wäre, dass der Tumor eine T-Zellantwort erzeugt, aber trotzdem Tumorzellen im SLN nachgewiesen werden können. Möglicherweise konnten in diesen Fällen zwar Antigene erkannt, aber keine adäquate Tumorbekämpfung durch T-Zellen ausgeführt werden. Dafür spricht auch, dass sich in manchen PBMC Proben, die zu Patienten mit befallenem SLN gehörten, eine Reaktion auf die Stimulation mit Tyrosinase und TRP-2 hervorrufen ließ. Das bedeutet, dass T-Zellen im Blut vorhanden waren, die schon Kontakt mit diesen, vermutlich von den Melanom Zellen exprimierten Antigenen, hatten. Dabei handelte es sich allerdings größtenteils um CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten, denen zwar auch eine direkt antitumoröse Wirkung zugesprochen wird (Tietze, 2022), aber die größere Rolle in der direkten Tumortoxizität spielen vermutlich die CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Puig-Saus et al., 2023). Das könnte eine Erklärung

dafür sein, warum die SLN trotz Immunreaktion nicht frei von Tumorzellen waren. Es wurde auch schon von LK-Metastasen berichtet, die mittels tumor-intrinsischem INF Programm, die Kolonisation der LK mit Tumorzellen fördern (Reticker-Flynn et al., 2022). Sie entwickeln auch Mechanismen, um der T-Zell vermittelten Zytotoxizität zu entgehen, wie beispielsweise die Induktion von antigenspezifischen regulatorischen T-Zellen (Reticker-Flynn et al., 2022). Dies könnte ebenfalls eine Rolle gespielt haben. Um die Immunmodulation in den SLN noch besser zu verstehen, sollten noch mehr SLN unter Einbezug des SLN Status untersucht werden. Es wäre auch interessant weiter zu verfolgen, welche der oben aufgeführten Fälle eher ein Rezidiv bekommen oder eher zu einer Metastasierung neigen. Auch dies sollte in weiteren Studien beobachtet werden, um die Prognose des Patienten besser und früher vorhersagen zu können.

### **4.3. Korrelation mit Tumordicke und Ulzeration**

Die Tumordicke ist ein wichtiger prognostischer Marker für den Befall des SLN mit Tumorzellen (Haddad et al., 1999). Davon ausgehend liegt nahe, dass auch die Wahrscheinlichkeit, in SLN MDA spezifische T-Zellen zu finden, positiv mit der Tumordicke des Primärtumors korreliert. Bei den SLN waren in T2 die meisten Reaktionen der CD4+ T-Zellen auf ein MDA und in T1 der CD8+ T-Zellen. Im Vergleich dazu zeigten sich bei den PBMCs die meisten Aktivierungen in Proben von T2 und T3 Patienten. Da unter den Proben aber eine sehr ungleiche Verteilung, mit vielen Proben von T2/T3 Melanomen und nur wenig von T1/T4 Stadien, bestand, kann aufgrund dieser Ergebnisse keine Korrelation zwischen Tumordicke und der Anzahl MDA spezifischer T-Zellen in SLN und PBMCs nachgewiesen werden. Lediglich ein Patient mit ulzeriertem Primärtumor zeigte eine Reaktion auf ein MDA, sodass auch diesbezüglich mit den vorliegenden Daten keine valide Aussage über eine Korrelation getroffen werden kann. Es ist notwendig, die Korrelation mit der Tumordicke in weiteren Untersuchungen zu überprüfen. Denn daraus und aus der Kenntnis der Immunreaktionen der MDA spezifischen T-Zellen ergeben sich neue Informationen bezüglich möglicher Therapien. Dazu zählen beispielsweise

Peptidvakzinierungen mit MDAs, die eine Aktivierung und Expansion von antigenspezifischen zytotoxischen T-zellen auslösen sollen und schon seit einiger Zeit erforscht werden (Jäeger et al., 1996). Auch die Therapie des adoptiven T-Zell-Transfers, bei dem antigenspezifische TILs verabreicht werden, wurde bereits diskutiert (Wu et al., 2012). Zur Weiterentwicklung dieser Therapien ist ebenfalls ein besseres Verständnis der Immunreaktionen auf MDAs erforderlich.

#### **4.4. Viabilität der Zellen**

Wie bereits beschrieben, stellten sich große Schwankungen der Viabilität der untersuchten Zellen heraus. Dabei zeigten sich Unterschiede zwischen LK und PBMCs, aber auch zwischen den einzelnen LK. Die durchschnittlich höhere Anzahl an lebenden Zellen in den Proben der PBMCs, lässt sich durch den Zeitpunkt der Aussaat erklären. Die PBMCs wurden unmittelbar nach der venösen Blutentnahme isoliert und in IVS-Nährmedium ausgesät, sodass hier kein großer Zellverlust zu erwarten war. Die SLN kamen erst am Tag nach der operativen Entfernung in die LDI, wo sie zunächst bearbeitet wurden. Danach wurden die übrigen Zellen direkt abgeholt und in Nährmedium ausgesät. Obwohl die LK nach Entnahme stets in geeignetem Medium gelagert wurden, sind durch die zeitliche Verzögerung und auch durch den mechanischen Prozess der Disaggregation, der während der LDI durchlaufen wurde, Verluste an lebenden Zellen unvermeidlich. Die teilweise deutlichen Unterschiede, die bei einem Vergleich der einzelnen SLN untereinander, auffielen, lassen sich dadurch allerdings nicht vollständig erklären. Die Quantifikation der Zellzahl erfolgte im Rahmen der Routineaufarbeitung der LK in der LDI. Dort wird die Zellzahl automatisiert mittels eines Zellzählers (Countess™ von Invitrogen) durchgeführt, teilweise nach Verdünnung durch die technischen Assistentinnen. Damit verbundene Messungenauigkeiten können eine weitere Fehlerquelle sein. Daraus lässt sich schließen, dass Schwankungen der gesamten Zellzahl in den einzelnen Proben möglich sind, die sich dann auch auf die Anzahl an lebenden Zellen auswirken könnten. Bei weiteren Untersuchungen sollte darauf geachtet

werden, zeitliche Verzögerungen so kurz wie möglich zu halten, um eine hohe Viabilität der Zellen zu generieren.

#### **4.5. Gemessene Zellzahlen**

##### **4.5.1. Verhältnis CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten**

Eine frühere Untersuchung zeigte, dass sich die Gesamtzahl der T-Zellen in SLN, bei melanozytärem Befall, reduziert (Berger, 2015). Bei Betrachtung der Verteilung der T-Zellen stellte sich in unserer Studie heraus, dass die Anzahl der CD4+ T-Zellen in allen LK und in den meisten PBMCs höher war, als die der CD8+ T-Zellen, was einer physiologischen Verteilung dieser Zellpopulationen entspricht. In der Literatur wurde ebenfalls beschrieben, dass sich die Verteilung der CD4+ und CD8+ T-Zellen in SLN auch bei melanozytärem Befall nicht ändert (Berger, 2015). Dazu passen die Ergebnisse, die hier in den SLN gemessen wurden. Auch in den SLN, die sich als von Tumorzellen eines Melanoms befallen herausstellten, war die Verteilung der CD4+ und CD8+ T-Zellen nicht verändert. Bei den PBMCs waren die 6 Fälle, die ein umgekehrtes Verhältnis, also mehr CD8+ T-Zellen, aufwiesen, mit einer Ausnahme aller Proben, in denen eine Aktivierung durch mindestens eines der, zur Stimulation verwendeten, MDAs stattfand. Es handelte sich dabei in 5 dieser Fälle um eine gemessene Reaktion der CD4+ T-Zellen und nur in einem Fall auch um eine gemessene Reaktion der CD8+ T-Zellen. Es wäre eher zu erwarten gewesen, dass eine hohe Anzahl an CD8+ T-Zellen in Proben auftritt, in denen diese Zellen ein MDA erkannt und deshalb stark expandiert haben. Da in den Fällen aber vor allem eine Reaktion der CD4+ auf ein MDA gemessen wurden, wäre es denkbar, dass die CD4+ T-Zellen ein Antigen erkannt und daraufhin vermehrt auch CD8+ aktiviert haben. Das könnte die höhere Anzahl dieser Zellpopulation erklären. Das Vorhandensein von CD8+ TIL wird als prognostisch günstiger Faktor angesehen (Piras et al., 2005, Morrison et al., 2022). Daher wäre es sicherlich interessant, in weiteren Studien zu untersuchen, ob die Patienten, die besonders hohe Zellzahlen an CD8+ T-Zellen in LK und PBMCs allgemein und vor allem auch

die, die mehr CD8+ als CD4+ T-Zellen in den PBMCs hatten, ein besseres Gesamtüberleben aufweisen.

#### **4.5.2. Verhältnis CD3+ CD45RA+ und CD3+ CD45RA- T-Lymphozyten**

Nicht nur das Verhältnis von CD4+ und CD8+ T-Zellen ist von Interesse, sondern auch das Verhältnis von naiven (CD3+CD45RA+) und nicht naiven (CD3+CD45RA-) T-Lymphozyten. In einigen bisherigen Untersuchungen stellte sich in SLN, die von Tumorzellen befallen waren, eine Zunahme der naiven T-Zellen bei Abnahme der Gesamtzahl der T-Zellen dar (Mortarini et al., 2003, Berger, 2015). Des Weiteren beschreibt eine Studie, dass viele der zirkulierenden Melan-A spezifische T-Zellen einen naiven (CD45RA+) Phänotyp aufweisen (Romero et al., 2007). Es wäre daher denkbar, dass sich in den Proben, die eine hohe Anzahl an naiven T-Zellen enthielten, auch Melan A spezifische T-Zellen befanden. Dies könnte auch eine Erklärung dafür sein, dass in unseren Ergebnissen verhältnismäßig wenig Reaktionen auf Melan A gemessen wurden. Bei unseren Messungen zeigte sich bei jedem der 5 SLN, die nachweislich von Tumorzellen befallen waren, eine Anzahl nicht-naiver T-Zellen, die die der naiven T-Zellen deutlich überstieg. Da es aber nur 5 dieser positiven SLN gab, kann mit den Daten keine valide Aussage bezüglich einer Steigerung der naiven T-Zellzahl getroffen werden. Wenn man sich aber die Zahlen des prozentualen Verhältnisses der naiven und nicht-naiven T-Zellen der SLN im Vergleich zu den PBMCs vor Augen hält, fällt durchaus auf, dass in den SLN ein durchschnittlich höherer prozentualer Anteil der naiven T-Zellen zu finden ist. Um noch aussagekräftigere Ergebnisse zu erhalten, sollten noch mehr SLN auf ihr Verhältnis an naiven und nicht-naiven T-Zellen untersucht werden. Vor allem für SLN, die von Tumorzellen befallen sind, wäre das sehr interessant.

#### **4.6. Unterschiede der axillären und inguinalen Sentinel Lymphknoten**

Bezüglich der, an unterschiedlichen Lokalisationen entnommenen, SLN konnte, zumindest für die CEF Kontrolle, eine etwas höhere Anzahl an Aktivierungen in den axillären LK, als in den Leisten LK beobachtet werden. Die CD4+ T-Zellen der axillären LK reagierten in 17,8% und die CD8+ in 37,8% der Fälle. In den Leisten LK ließen sich 4,4% der CD4+ und 20% der CD8+ T-Zellen mittels CEF aktivieren. Dies könnte eventuell daran liegen, dass zumindest EBV und Influenza, Viren sind, die vor allem den Nasen-Rachen-Raum als Eintrittspforte nutzen. Es liegt nahe, dass die axillären LK, schon wegen ihrer Lokalisation, eher in Kontakt mit diesen Erregern kommen und die T-Zellen dort so auch häufiger auf den CEF Pool mit einer  $INF\gamma$  Produktion reagieren. Dass Erreger von CMV, EBV und Influenza aber trotzdem auch von T-Lymphozyten in Leisten LK erkannt werden, zeigen unsere Ergebnisse ebenfalls. Bezüglich der MDAs ergab sich kein Unterschied.

#### **4.7. Mehrere Lymphknoten des gleichen Patienten**

Wenn mehrere LK eines Patienten zur Verfügung standen, waren diese stets LK der gleichen Lokalisation. Aufgrund der möglichen Ausbreitung von Tumorzellen über das Lymphsystem lag die Vermutung nahe, dass in den LK, die einem Patienten entfernt wurden, auch ein ähnliches Muster an Immunreaktionen zu finden sei. Unsere Ergebnisse zeigten allerdings, dass bei keinem dieser Patienten LK durch die gleichen MDAs aktiviert wurden. Als Erklärung dafür wäre denkbar, dass die Tumorzellen des Melanoms sich noch nicht so weit ausgebreitet hatten, dass alle der entfernten LK bereits in Kontakt mit diesen kommen konnten und sich deswegen dort keine MDA spezifischen T-Zellen finden ließen. Des Weiteren wurde beschrieben, dass jedes Gewebe sehr unterschiedliche, spezifische T-Zellen enthält und jeder drainierende LK deshalb auch eine Mischung dieser T-Lymphozyten enthalten kann, was zu unterschiedlichen Immunreaktionen führen kann (Ataide et al., 2022). Außerdem muss bedacht werden, dass es nur von 5 Patienten Ergebnisse mehrerer LK gab, was natürlich eine zu kleine Stichprobengröße ist, um eine valide Aussage zu

tätigen. Die Ergebnisse sollten bei einer größeren Patientengruppe und weiteren LK überprüft werden.

#### **4.8. Limitationen**

In dieser Studie wurde die Immunmodulation in SLN von Melanom Patienten untersucht. Im Zeitraum von März-August 2023 konnten insgesamt 45 LK ausgewertet werden. Wie schon zuvor beschrieben, wäre eine größere Anzahl an LK nötig, um die Ergebnisse generalisieren zu können. Es sollte bei jedem Patienten zusätzlich eine venöse Blutentnahme erfolgen. Da dies von einigen Patienten abgelehnt wurde oder Patienten bereits frühzeitig entlassen worden waren, konnte dies nur bei 70% der Fälle durchgeführt werden. In weiteren Studien sollte versucht werden, bei mehr Patienten PBMCs zum Vergleich mit den SLN Zellen zu gewinnen. Die Zeit von der Information der LDI, dass eine Probe zur Verfügung stand, bis zur Aussaat der Zellen war nicht immer völlig identisch. Je länger sich diese Zeitspanne gestaltet, desto geringer ist die Viabilität der Zellen. Deshalb sollte die Verzögerung so gering wie möglich gehalten werden. Eine weitere Einschränkung stellt die geringe Anzahl an SLN, die von Tumorzellen befallen waren, dar. Dies waren lediglich 5 Fälle, was zu wenig ist, um allgemein gültige Aussagen über das Verhalten von MDA spezifischen T-Zellen in positiven SLN zu treffen. Dasselbe trifft auf Angaben zum Verhalten von mehreren LK eines Patienten zu. Auch hier lässt die geringe Anzahl an verfügbaren Proben nur Vermutungen zu. Weitere Untersuchungen mit einer größeren Probenzahl wären auch bezüglich der Reaktionsmuster der MDAs in SLN und PBMCs nötig, um genauere Aussagen treffen zu können. Außerdem kann man mit den aktuellen Daten noch keine Erkenntnisse im Hinblick auf das Gesamtüberleben und das Risiko für Rezidive oder eine Metastasierung ziehen. Die Fälle sollten in weiteren Studien zu einem späteren Zeitpunkt erneut betrachtet werden, um besser zu verstehen, welche Konsequenzen das Vorkommen von MDA spezifischen T-Zellen in SLN und PBMCs für die Patienten haben.

## 5. Zusammenfassung

Das maligne Melanom ist ein häufiger von Melanozyten ausgehender Tumor der Haut. In den letzten Jahren gab es bereits große Fortschritte in der Melanomtherapie. So drängen vor allem Immuntherapeutika immer mehr auf den Markt. Infolgedessen ist es wichtiger denn je, die Zusammenhänge zwischen Melanom und Immunsystem noch besser zu verstehen. In dieser Studie wurde die Immunmodulation in SLN untersucht. Dafür wurde die Häufigkeit von MDA spezifischen T-Zellen in SLN und in PBMCs von Melanom Patienten gemessen und verglichen. Es wurden außerdem Faktoren wie beispielsweise die Tumordicke und der LK Status miteinbezogen. Die Zellen wurden im Rahmen einer T-Zellstimulation mit den MDAs gp100, Melan A, Tyrosinase und TRP-2 stimuliert. Die aktivierten T-Zellen wurden mittels IL-2 zur Expansion angeregt. Nach 10 Tagen erfolgte eine durchflusszytometrische Phänotypisierung der Zellen. Es konnten MDA spezifische T-Zellantworten in SLN und PBMCs nachgewiesen werden, am häufigsten auf eine Stimulation mit TRP-2 und gp100. Die PBMCs zeigten sich insgesamt reaktiver als die T-Zellen der SLN. Sowohl die Reaktionsmuster von CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten als auch von mehreren SLN desselben Patienten wiesen einige Unterschiede auf. Unsere Ergebnisse bestätigen, dass sowohl in SLN als auch in PBMCs Immunmodulation stattfindet, die sich aber teilweise unterschiedlich darstellt. Um herauszufinden, welche MDAs in Zukunft als therapeutische Möglichkeit genutzt werden können, sollte deren Interaktion mit dem Immunsystem und insbesondere den T-Zellen weiter erforscht werden.

## 6. Literaturverzeichnis

- ATAIDE, M. A., KNÖPPER, K., CRUZ DE CASAS, P., UGUR, M., EICKHOFF, S., ZOU, M., SHAIKH, H., TRIVEDI, A., GRAFEN, A., YANG, T., PRINZ, I., OHLSEN, K., GOMEZ DE AGÜERO, M., BEILHACK, A., HUEHN, J., GAYA, M., SALIBA, A. E., GASTEIGER, G. & KASTENMÜLLER, W. 2022. Lymphatic migration of unconventional T cells promotes site-specific immunity in distinct lymph nodes. *Immunity*, 55, 1813-1828.e9.
- AVOGADRI, F., GNJATIC, S., TASSELLO, J., FROSINA, D., HANSON, N., LAUDENBACH, M., RITTER, E., MERGHOUB, T., BUSAM, K. J. & JUNGBLUTH, A. A. 2016. Protein Expression Analysis of Melanocyte Differentiation Antigen TRP-2. *Am J Dermatopathol*, 38, 201-7.
- BAKKER, A. B., SCHREURS, M. W., DE BOER, A. J., KAWAKAMI, Y., ROSENBERG, S. A., ADEMA, G. J. & FIGDOR, C. G. 1994. Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes. *J Exp Med*, 179, 1005-9.
- BAWDEN, E. G., WAGNER, T., SCHRÖDER, J., EFFERN, M., HINZE, D., NEWLAND, L., ATTRILL, G. H., LEE, A. R., ENGEL, S., FREESTONE, D., DE LIMA MOREIRA, M., GRESSIER, E., MCBAIN, N., BACHEM, A., HAQUE, A., DONG, R., FERGUSON, A. L., EDWARDS, J. J., FERGUSON, P. M., SCOLYER, R. A., WILMOTT, J. S., JEWELL, C. M., BROOKS, A. G., GYORKI, D. E., PALENDIRA, U., BEDOUI, S., WAITHMAN, J., HOCHHEISER, K., HÖLZEL, M. & GEBHARDT, T. 2024. CD4<sup>+</sup> T cell immunity against cutaneous melanoma encompasses multifaceted MHC II-dependent responses. *Science Immunology*, 9, eadi9517.
- BECKER, J. C., GEORGII, S., BRÖCKER, E.-B. 2006. *Immunsystem und Melanom* [Online]. Available: <https://www.onkodin.de/e2/e55749/e55750/e56086/#top> [Accessed 12.06.2023].
- BENLALAM, H., LABARRIÈRE, N., LINARD, B., DERRÉ, L., DIEZ, E., PANDOLFINO, M. C., BONNEVILLE, M. & JOTEREAU, F. 2001. Comprehensive analysis of the frequency of recognition of melanoma-associated antigen (MAA) by CD8 melanoma infiltrating lymphocytes (TIL): implications for immunotherapy. *Eur J Immunol*, 31, 2007-15.
- BERGER, M. 2015. *Charakterisierung der Lymphozytenpopulation im Wächterlymphknoten bei Patienten mit malignem Melanom*. Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- BERNER, F., BOMZE, D., DIEM, S., ALI, O. H., FÄSSLER, M., RING, S., NIEDERER, R., ACKERMANN, C. J., BAUMGAERTNER, P., PIKOR, N., CRUZ, C. G., VAN DE VEEN, W., AKDIS, M., NIKOLAEV, S., LÄUBLI, H., ZIPPELIUS, A., HARTMANN, F., CHENG, H. W., HÖNGER, G., RECHER, M., GOLDMAN, J., COZZIO, A., FRÜH, M., NEEFJES, J., DRIESSEN, C., LUDEWIG, B., HEGAZY, A. N., JOCHUM, W., SPEISER, D. E. & FLATZ, L. 2019. Association of Checkpoint Inhibitor-Induced Toxic Effects With Shared Cancer and Tissue Antigens in Non-Small Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol*, 5, 1043-1047.

- BOUTROS, C., TARHINI, A., ROUTIER, E., LAMBOTTE, O., LADURIE, F. L., CARBONNEL, F., IZZEDDINE, H., MARABELLE, A., CHAMPIAT, S., BERDELOU, A., LANOY, E., TEXIER, M., LIBENCIUC, C., EGGERMONT, A. M., SORIA, J. C., MATEUS, C. & ROBERT, C. 2016. Safety profiles of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies alone and in combination. *Nat Rev Clin Oncol*, 13, 473-86.
- BRAATHEN, L. R., HUNGER, R. E. & BRAND, C. U. 2000. [Immunotherapy in malignant melanoma]. *Zentralbl Chir*, 125, 806-9.
- BRUDER, D. 2021. Influenza – Prävalenz, Bedeutung und Implikationen für die Prävention und Gesundheitsförderung. In: TIEMANN, M. & MOHOKUM, M. (eds.) *Prävention und Gesundheitsförderung*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- BURG, G. N., NESTLE, F. & DUMMER, R. 1997. Neue Erkenntnisse zum malignen Melanom. *Dtsch Arztebl International*, 94, A-1191.
- BUSAM, K. J. & JUNGBLUTH, A. A. 1999. Melan-A, a new melanocytic differentiation marker. *Adv Anat Pathol*, 6, 12-8.
- BYSTRYN, J. C., RIGEL, D., FRIEDMAN, R. J. & KOPF, A. 1987. Prognostic significance of hypopigmentation in malignant melanoma. *Arch Dermatol*, 123, 1053-5.
- CHAPMAN, P. B., ROBERT, C., LARKIN, J., HAANEN, J. B., RIBAS, A., HOGG, D., HAMID, O., ASCIERTO, P. A., TESTORI, A., LORIGAN, P. C., DUMMER, R., SOSMAN, J. A., FLAHERTY, K. T., CHANG, I., COLEMAN, S., CARO, I., HAUSCHILD, A. & MCARTHUR, G. A. 2017. Vemurafenib in patients with BRAFV600 mutation-positive metastatic melanoma: final overall survival results of the randomized BRIM-3 study. *Ann Oncol*, 28, 2581-2587.
- COCHRAN, A. J. 2000. The pathologist's role in sentinel lymph node evaluation. *Semin Nucl Med*, 30, 11-7.
- ERDAG, G., SCHAEFER, J. T., SMOLKIN, M. E., DEACON, D. H., SHEA, S. M., DENGEL, L. T., PATTERSON, J. W. & SLINGLUFF, C. L., JR 2012. Immunotype and Immunohistologic Characteristics of Tumor-Infiltrating Immune Cells Are Associated with Clinical Outcome in Metastatic Melanoma. *Cancer Research*, 72, 1070-1080.
- ERDMANN, F., SPIX, C., KATALINIC, A., CHRIST, M., FOLKERTS, J., HANSMANN, J., KRANZHÖFER, K., KUNZ, B., MANEGOLD, K., PENZKOFER, A., TREML, K., VOLLMER, G., WEG-REMERS, S., BARNES, B., BUTTMANN-SCHWEIGER, N., DAHM, S., FIEBIG, J., FRANKE, M., GURUNG-SCHÖNFELD, I., HABERLAND, J., IMHOFF, M., KRAYWINKEL, K., STARKER, A., VON BERENBERG-GOSSLER, P. & WIENECKE, A. 2021. Krebs in Deutschland für 2017/2018. Robert Koch-Institut.
- FARTHMAN, B., EBERLE, J., KRASAGAKIS, K., GSTÖTTNER, M., WANG, N., BISSON, S. & ORFANOS, C. E. 1998. RT-PCR for tyrosinase-mRNA-positive cells in peripheral blood: evaluation strategy and correlation with known prognostic markers in 123 melanoma patients. *J Invest Dermatol*, 110, 263-7.

- GARBE, C., TERHEYDEN, P., KEILHOLZ, U., K<sup>^</sup>LBL, O. & HAUSCHILD, A. 2008. Therapie des Melanoms. *Dtsch Arztebl International*, 105, 845-851.
- HADDAD, F. F., STALL, A., MESSINA, J., BROBEIL, A., RAMNATH, E., GLASS, L. F., CRUSE, C. W., BERMAN, C. G. & REINTGEN, D. S. 1999. The progression of melanoma nodal metastasis is dependent on tumor thickness of the primary lesion. *Ann Surg Oncol*, 6, 144-9.
- HAEN, S. P., LÖFFLER, M. W., RAMMENSEE, H. G. & BROSSART, P. 2020. Towards new horizons: characterization, classification and implications of the tumour antigenic repertoire. *Nat Rev Clin Oncol*, 17, 595-610.
- HAUSCHILD, A., GROB, J. J., DEMIDOV, L. V., JOUARY, T., GUTZMER, R., MILLWARD, M., RUTKOWSKI, P., BLANK, C. U., MILLER, W. H., JR., KAEMPGEN, E., MARTÍN-ALGARRA, S., KARASZEWSKA, B., MAUCH, C., CHIARION-SILENI, V., MARTIN, A. M., SWANN, S., HANEY, P., MIRAKHUR, B., GUCKERT, M. E., GOODMAN, V. & CHAPMAN, P. B. 2012. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet*, 380, 358-65.
- HAUSWIRTH, U. 2016. Malignes Melanom. In: MOLL, I. (ed.) *Duale Reihe Dermatologie*. 8. vollständig überarbeitete Auflage ed.: Georg Thieme Verlag KG.
- HODI, F. S., O'DAY, S. J., MCDERMOTT, D. F., WEBER, R. W., SOSMAN, J. A., HAANEN, J. B., GONZALEZ, R., ROBERT, C., SCHADENDORF, D., HASSEL, J. C., AKERLEY, W., VAN DEN EERTWEGH, A. J., LUTZKY, J., LORIGAN, P., VAUBEL, J. M., LINETTE, G. P., HOGG, D., OTTENSMEIER, C. H., LEBBÉ, C., PESCHEL, C., QUIRT, I., CLARK, J. I., WOLCHOK, J. D., WEBER, J. S., TIAN, J., YELLIN, M. J., NICHOL, G. M., HOOS, A. & URBA, W. J. 2010. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 363, 711-23.
- HU, Z., LEET, D. E., ALLESØE, R. L., OLIVEIRA, G., LI, S., LUOMA, A. M., LIU, J., FORMAN, J., HUANG, T., IORGULESCU, J. B., HOLDEN, R., SARKIZOVA, S., GOHIL, S. H., REDD, R. A., SUN, J., ELAGINA, L., GIOBBIE-HURDER, A., ZHANG, W., PETER, L., CIANTRA, Z., RODIG, S., OLIVE, O., SHETTY, K., PYRDOL, J., UDUMAN, M., LEE, P. C., BACHIREDDY, P., BUCHBINDER, E. I., YOON, C. H., NEUBERG, D., PENTELUTE, B. L., HACOEN, N., LIVAK, K. J., SHUKLA, S. A., OLSEN, L. R., BAROUCH, D. H., WUCHERPFENNIG, K. W., FRITSCH, E. F., KESKIN, D. B., WU, C. J. & OTT, P. A. 2021. Personal neoantigen vaccines induce persistent memory T cell responses and epitope spreading in patients with melanoma. *Nat Med*, 27, 515-525.
- IVES, N. J., SUCIU, S., EGGERMONT, A. M. M., KIRKWOOD, J., LORIGAN, P., MARKOVIC, S. N., GARBE, C. & WHEATLEY, K. 2017. Adjuvant interferon- $\alpha$  for the treatment of high-risk melanoma: An individual patient data meta-analysis. *Eur J Cancer*, 82, 171-183.
- JÄEGER, E., BERNHARD, H., ROMERO, P., RINGHOFFER, M., ARAND, M., KARBACH, J., ILSEMANN, C., HAGEDORN, M. & KNUTH, A. 1996. Generation of cytotoxic T-cell responses with synthetic melanoma-associated

- peptides in vivo: implications for tumor vaccines with melanoma-associated antigens. *Int J Cancer*, 66, 162-9.
- JANSEN, L., NIEWEG, O. E., PETERSE, J. L., HOEFNAGEL, C. A., OLMOS, R. A. & KROON, B. B. 2000. Reliability of sentinel lymph node biopsy for staging melanoma. *Br J Surg*, 87, 484-9.
- JENSEN, T. O., SCHMIDT, H., MØLLER, H. J., DONSKOV, F., HØYER, M., SJOEGREN, P., CHRISTENSEN, I. J. & STEINICHE, T. 2012. Intratumoral neutrophils and plasmacytoid dendritic cells indicate poor prognosis and are associated with pSTAT3 expression in AJCC stage I/II melanoma. *Cancer*, 118, 2476-2485.
- KAKAVAND, H., VILAIN, R. E., WILMOTT, J. S., BURKE, H., YEARLEY, J. H., THOMPSON, J. F., HERSEY, P., LONG, G. V. & SCOLYER, R. A. 2015. Tumor PD-L1 expression, immune cell correlates and PD-1+ lymphocytes in sentinel lymph node melanoma metastases. *Modern Pathology*, 28, 1535-1544.
- KAWAKAMI, Y. & ROSENBERG, S. A. 1997. Immunobiology of human melanoma antigens MART-1 and gp100 and their use for immuno-gene therapy. *Int Rev Immunol*, 14, 173-92.
- KIMMIG, W. 2016. Exstirpation des Sentinel-Lymphknotens. In: MOLL, I. (ed.) *Duale Reihe Dermatologie*. 8. vollständig überarbeitete Auflage ed.: Georg Thieme Verlag KG.
- KLUGER, H. M., ZITO, C. R., BARR, M. L., BAINE, M. K., CHIANG, V. L. S., SZNOL, M., RIMM, D. L., CHEN, L. & JILAVEANU, L. B. 2015. Characterization of PD-L1 Expression and Associated T-cell Infiltrates in Metastatic Melanoma Samples from Variable Anatomic Sites. *Clinical Cancer Research*, 21, 3052-3060.
- KRAMPE-SCHEIDLER, A. & FORSCHNER, A. 2021. *Malignes Melanom-schwarzer Hautkrebs* [Online]. Onko Internetportal, Deutsche Krebsgesellschaft. Available: <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/hautkrebs/malignes-melanom-schwarzer-hautkrebs.html> [Accessed 16.06.2023].
- KRIETER, M., SCHULTZ, E. & DEBUS, D. 2019. Das maligne Melanom. *MMW - Fortschritte der Medizin*, 161, 42-50.
- KRUSE, B., BUZZAI, A. C., SHRIDHAR, N., BRAUN, A. D., GELLERT, S., KNAUTH, K., POZNIAK, J., PETERS, J., DITTMANN, P., MENGONI, M., VAN DER SLUIS, T. C., HÖHN, S., ANTORANZ, A., KRONE, A., FU, Y., YU, D., ESSAND, M., GEFFERS, R., MOUGIAKAKOS, D., KAHLFUS, S., KASHKAR, H., GAFFAL, E., BOSISIO, F. M., BECHTER, O., RAMBOW, F., MARINE, J.-C., KASTENMÜLLER, W., MÜLLER, A. J. & TÜTING, T. 2023. CD4+ T cell-induced inflammatory cell death controls immune-evasive tumours. *Nature*, 618, 1033-1040.
- LACHMANN, R., LOENENBACH, A., WATERBOER, T., BRENNER, N., PAWLITA, M., MICHEL, A., THAMM, M., POETHKO-MÜLLER, C., WICHMANN, O. & WIESE-

- POSSELT, M. 2018. Cytomegalovirus (CMV) seroprevalence in the adult population of Germany. *PLoS One*, 13, e0200267.
- LARKIN, J., CHIARION-SILENI, V., GONZALEZ, R., GROB, J.-J., RUTKOWSKI, P., LAO, C. D., COWEY, C. L., SCHADENDORF, D., WAGSTAFF, J., DUMMER, R., FERRUCCI, P. F., SMYLIE, M., HOGG, D., HILL, A., MÁRQUEZ-RODAS, I., HAANEN, J., GUIDOBONI, M., MAIO, M., SCHÖFFSKI, P., CARLINO, M. S., LEBBÉ, C., MCARTHUR, G., ASCIERTO, P. A., DANIELS, G. A., LONG, G. V., BASTHOLT, L., RIZZO, J. I., BALOGH, A., MOSHYK, A., HODI, F. S. & WOLCHOK, J. D. 2019. Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *New England Journal of Medicine*, 381, 1535-1546.
- LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE (DEUTSCHE KREBSGESELLSCHAFT, D. K., AWMF). 2020. *Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms* [Online]. Available: [https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user\\_upload/Downloads/Leitlinien/Melanom/Melanom\\_Version\\_3/LL\\_Melanom\\_Kurzversion\\_3.3.pdf](https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Melanom/Melanom_Version_3/LL_Melanom_Kurzversion_3.3.pdf) [Accessed 02.10.2023].
- MAIBACH, F., SADOZAI, H., SEYED JAFARI, S. M., HUNGER, R. E. & SCHENK, M. 2020. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Their Prognostic Value in Cutaneous Melanoma. *Frontiers in Immunology*, 11.
- MARTINEZ-PEREZ, D., VIÑAL, D., SOLARES, I., ESPINOSA, E. & FELIU, J. 2021. Gp-100 as a Novel Therapeutic Target in Uveal Melanoma. *Cancers (Basel)*, 13.
- MORRISON, S. L., HAN, G., ELENWA, F., VETTO, J. T., FOWLER, G., LEONG, S. P., KASHANI-SABET, M., POCKAJ, B. A., KOSIOREK, H. E., ZAGER, J. S., SONDAK, V. K., MESSINA, J. L., MOZZILLO, N., SCHNEEBAUM, S. & HAN, D. 2022. Is the presence of tumor-infiltrating lymphocytes predictive of outcomes in patients with melanoma? *Cancer*, 128, 1418-1428.
- MORTARINI, R., PIRIS, A., MAURICHI, A., MOLLA, A., BERSANI, I., BONO, A., BARTOLI, C., SANTINAMI, M., LOMBARDO, C., RAVAGNANI, F., CASCINELLI, N., PARMIANI, G. & ANICHINI, A. 2003. Lack of Terminally Differentiated Tumor-specific CD8+ T Cells at Tumor Site in Spite of Antitumor Immunity to Self-Antigens in Human Metastatic Melanoma1. *Cancer Research*, 63, 2535-2545.
- NESTLE, F. O., ALIJAGIC, S., GILLIET, M., SUN, Y., GRABBE, S., DUMMER, R., BURG, G. & SCHADENDORF, D. 1998. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med*, 4, 328-32.
- NORDLUND, J. J., KIRKWOOD, J. M., FORGET, B. M., MILTON, G., ALBERT, D. M. & LERNER, A. B. 1983. Vitiligo in patients with metastatic melanoma: a good prognostic sign. *J Am Acad Dermatol*, 9, 689-96.
- NUÑEZ, N. G., BERNER, F., FRIEBEL, E., UNGER, S., WYSS, N., GOMEZ, J. M., PURDE, M. T., NIEDERER, R., PORSCH, M., LICHTENSTEIGER, C., KRAMER, R., ERDMANN, M., SCHMITT, C., HEINZERLING, L., ABDOU, M. T., KARBACH, J., SCHADENDORF, D., ZIMMER, L., UGUREL, S., KLÜMPER, N., HÖLZEL, M., POWER, L., KREUTMAIR, S., CAPONE, M., MADONNA, G.,

- CEVHERTAS, L., HEIDER, A., AMARAL, T., HASAN ALI, O., BOMZE, D., DIMITRIOU, F., DIEM, S., ASCIERTO, P. A., DUMMER, R., JÄGER, E., DRIESSEN, C., LEVESQUE, M. P., VAN DE VEEN, W., JOERGER, M., FRÜH, M., BECHER, B. & FLATZ, L. 2023. Immune signatures predict development of autoimmune toxicity in patients with cancer treated with immune checkpoint inhibitors. *Med*, 4, 113-129.e7.
- OLSZANSKI, A. J. 2014. Current and future roles of targeted therapy and immunotherapy in advanced melanoma. *J Manag Care Spec Pharm*, 20, 346-56.
- PIRAS, F., COLOMBARI, R., MINERBA, L., MURTAS, D., FLORIS, C., MAXIA, C., CORBU, A., PERRA, M. T. & SIRIGU, P. 2005. The predictive value of CD8, CD4, CD68, and human leukocyte antigen-D-related cells in the prognosis of cutaneous malignant melanoma with vertical growth phase. *Cancer*, 104, 1246-54.
- POON, M. M. L., CARON, D. P., WANG, Z., WELLS, S. B., CHEN, D., MENG, W., SZABO, P. A., LAM, N., KUBOTA, M., MATSUMOTO, R., RAHMAN, A., LUNING PRAK, E. T., SHEN, Y., SIMS, P. A. & FARBER, D. L. 2023. Tissue adaptation and clonal segregation of human memory T cells in barrier sites. *Nature Immunology*, 24, 309-319.
- PUIG-SAUS, C., SENNINO, B., PENG, S., WANG, C. L., PAN, Z., YUEN, B., PURANDARE, B., AN, D., QUACH, B. B., NGUYEN, D., XIA, H., JILANI, S., SHAO, K., MCHUGH, C., GREER, J., PEABODY, P., NAYAK, S., HOOVER, J., SAID, S., JACOBY, K., DALMAS, O., FOY, S. P., CONROY, A., YI, M. C., SHIEH, C., LU, W., HEERINGA, K., MA, Y., CHIZARI, S., PILLING, M. J., TING, M., TUNUGUNTLA, R., SANDOVAL, S., MOOT, R., HUNTER, T., ZHAO, S., SACO, J. D., PEREZ-GARCILAZO, I., MEDINA, E., VEGA-CRESPO, A., BASELGA-CARRETERO, I., ABRIL-RODRIGUEZ, G., CHERRY, G., WONG, D. J., HUNDAL, J., CHMIELOWSKI, B., SPEISER, D. E., BETHUNE, M. T., BAO, X. R., GROS, A., GRIFFITH, O. L., GRIFFITH, M., HEATH, J. R., FRANZUSOFF, A., MANDL, S. J. & RIBAS, A. 2023. Neoantigen-targeted CD8+ T cell responses with PD-1 blockade therapy. *Nature*, 615, 697-704.
- RETICKER-FLYNN, N. E., ZHANG, W., BELK, J. A., BASTO, P. A., ESCALANTE, N. K., PILAROWSKI, G. O. W., BEJNOOD, A., MARTINS, M. M., KENKEL, J. A., LINDE, I. L., BAGCHI, S., YUAN, R., CHANG, S., SPITZER, M. H., CARMİ, Y., CHENG, J., TOLENTINO, L. L., CHOI, O., WU, N., KONG, C. S., GENTLES, A. J., SUNWOO, J. B., SATPATHY, A. T., PLEVITIS, S. K. & ENGLEMAN, E. G. 2022. Lymph node colonization induces tumor-immune tolerance to promote distant metastasis. *Cell*, 185, 1924-1942.e23.
- RIMOLDI, D., LEMOINE, R., KURT, A. M., SALVI, S., BERSSET, M., MATTER, M., ROCHE, B., CEROTTINI, J. P., GUGGISBERG, D., KRISCHER, J., BRAUN, R., WILLI, J. P., ANTONESCU, C., SLOSMAN, D., LEJEUNE, F. J. & LIÉNARD, D. 2003. Detection of micrometastases in sentinel lymph nodes from melanoma patients: direct comparison of multimarker molecular and immunopathological methods. *Melanoma Res*, 13, 511-20.

- RING, S. S., KRÓLIK, M., HARTMANN, F., SCHMIDT, E., ALI, O. H., LUDEWIG, B., KOCHANEK, S. & FLATZ, L. 2020. Heterologous Prime Boost Vaccination Induces Protective Melanoma-Specific CD8(+) T Cell Responses. *Mol Ther Oncolytics*, 19, 179-187.
- ROBERT, C. 2020. A decade of immune-checkpoint inhibitors in cancer therapy. *Nat Commun*, 11, 3801.
- ROBERT, C., SCHACHTER, J., LONG, G. V., ARANCE, A., GROB, J. J., MORTIER, L., DAUD, A., CARLINO, M. S., MCNEIL, C., LOTEM, M., LARKIN, J., LORIGAN, P., NEYNS, B., BLANK, C. U., HAMID, O., MATEUS, C., SHAPIRA-FROMMER, R., KOSH, M., ZHOU, H., IBRAHIM, N., EBBINGHAUS, S. & RIBAS, A. 2015. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*, 372, 2521-32.
- ROBERT, C., THOMAS, L., BONDARENKO, I., O'DAY, S., WEBER, J., GARBE, C., LEBBE, C., BAURAIN, J. F., TESTORI, A., GROB, J. J., DAVIDSON, N., RICHARDS, J., MAIO, M., HAUSCHILD, A., MILLER, W. H., JR., GASCON, P., LOTEM, M., HARMANKAYA, K., IBRAHIM, R., FRANCIS, S., CHEN, T. T., HUMPHREY, R., HOOS, A. & WOLCHOK, J. D. 2011. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 364, 2517-26.
- ROMERO, P., ZIPPELIUS, A., KURTH, I., PITTET, M. J., TOUVREY, C., IANCU, E. M., CORTHESEY, P., DEVEVRE, E., SPEISER, D. E. & RUFER, N. 2007. Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8+ T lymphocytes. *J Immunol*, 178, 4112-9.
- SCHROEDER, I. 2022. Pembrolizumab zur adjuvanten Therapie im Stadium II zugelassen. *InFo Hämatologie + Onkologie*, 25, 58-58.
- SCHUSTER, V. & KRETH, H. W. 2019. Virusinfektionen. In: SPEER, C. P., GAHR, M. & DÖTSCH, J. (eds.) *Pädiatrie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- SHIVERS, S. C., WANG, X., LI, W., JOSEPH, E., MESSINA, J., GLASS, L. F., DECONTI, R., CRUSE, C. W., BERMAN, C., FENSKE, N. A., LYMAN, G. H. & REINTGEN, D. S. 1998. Molecular staging of malignant melanoma: correlation with clinical outcome. *Jama*, 280, 1410-5.
- STARZ, H., COCHRAN, A.J., BALDA, B.-R. 2002. Die Sentinel-Lymphonodektomie aus histopathologischer Sicht. *Akt Dermatol*, 28, 273-278.
- STARZ, H., HAAS, C. J., SCHULZ, G.-M. & BALDA, B.-R. 2003. Tyrosinase RT-PCR as a Supplement to Histology for Detecting Melanoma and Nevus Cells in Paraffin Sections of Sentinel Lymph Nodes. *Modern Pathology*, 16, 920-929.
- STEVENS, G. L., SCHEER, W. D. & LEVINE, E. A. 1996. Detection of tyrosinase mRNA from the blood of melanoma patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 5, 293-6.
- SZABO, P. A., MIRON, M. & FARBER, D. L. 2019. Location, location, location: Tissue resident memory T cells in mice and humans. *Sci Immunol*, 4.

- TARAMELLI, D., FOSSATI, G., MAZZOCCHI, A., DELIA, D., FERRONE, S. & PARMIANI, G. 1986. Classes I and II HLA and melanoma-associated antigen expression and modulation on melanoma cells isolated from primary and metastatic lesions. *Cancer Res*, 46, 433-9.
- TERHEYDEN, P., SCHRAMA, D., PEDERSEN, L. Ø., ANDERSEN, M. H., KÄMPGEN, E., THOR STRATEN, P. & BECKER, J. C. 2003. Longitudinal Analysis of MART-1/HLA-A2-Reactive T Cells Over the Course of Melanoma Progression. *Scandinavian Journal of Immunology*, 58, 566-571.
- TÉTU, P., BAROUDJIAN, B. & LEBBE, C. 2020. Targeting BRAF and MEK inhibitors in melanoma in the metastatic, neoadjuvant and adjuvant setting. *Curr Opin Oncol*, 32, 85-90.
- TIETZE, J. K. 2022. [Tumor-infiltrating natural killer and T cells in melanoma]. *Dermatologie (Heidelb)*, 73, 929-936.
- UGUREL, S. 2005. [Serum markers for melanoma]. *Hautarzt*, 56, 173-84; 185-6.
- ULMER, A., DIETZ, K., HODAK, I., POLZER, B., SCHEITLER, S., YILDIZ, M., CZYZ, Z., LEHNERT, P., FEHM, T., HAFNER, C., SCHANZ, S., RÖCKEN, M., GARBE, C., BREUNINGER, H., FIERLBECK, G. & KLEIN, C. A. 2014. Quantitative measurement of melanoma spread in sentinel lymph nodes and survival. *PLoS Med*, 11, e1001604.
- ULMER, A. & KOFLER, L. 2019. [Sentinel node biopsy and lymph node dissection in the era of new systemic therapies for malignant melanoma]. *Hautarzt*, 70, 864-869.
- ULMER, A., PFEFFERLE, V., WALTER, V., GRANAI, M., KEIM, U., FEND, F., SULYOK, M. & BÖSMÜLLER, H. 2022. Reporting of melanoma cell densities in the sentinel node refines outcome prediction. *Eur J Cancer*, 174, 121-130.
- VAN DIEST, P. J. 1999. Histopathological workup of sentinel lymph nodes: how much is enough? *J Clin Pathol*, 52, 871-3.
- VAN DIEST, P. J., PETERSE, H. L., BORGSTEIN, P. J., HOEKSTRA, O. & MEIJER, C. J. 1999. Pathological investigation of sentinel lymph nodes. *Eur J Nucl Med*, 26, S43-9.
- VANDERLUGT, C. J. & MILLER, S. D. 1996. Epitope spreading. *Curr Opin Immunol*, 8, 831-6.
- VASIEVICH, E. A., RAMISHETTI, S., ZHANG, Y. & HUANG, L. 2012. Trp2 Peptide Vaccine Adjuvanted with (R)-DOTAP Inhibits Tumor Growth in an Advanced Melanoma Model. *Molecular Pharmaceutics*, 9, 261-268.
- WALTHER, L. E., ILGNER, J., OEHME, A., SCHMIDT, P., SELLHAUS, B., GUDZIOL, H., BELEITES, E. & WESTHOFEN, M. 2005. Die infektiöse Mononukleose. *HNO*, 53, 383-394.

WANG, R. F., APPELLA, E., KAWAKAMI, Y., KANG, X. & ROSENBERG, S. A. 1996. Identification of TRP-2 as a human tumor antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*, 184, 2207-16.

WILSON, M. A. & SCHUCHTER, L. M. 2016. Chemotherapy for Melanoma. *Cancer Treat Res*, 167, 209-29.

WU, R., FORGET, M. A., CHACON, J., BERNATCHEZ, C., HAYMAKER, C., CHEN, J. Q., HWU, P. & RADVANYI, L. G. 2012. Adoptive T-cell therapy using autologous tumor-infiltrating lymphocytes for metastatic melanoma: current status and future outlook. *Cancer J*, 18, 160-75.

## **7. Erklärung zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde in der Universitätshautklinik Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. Lukas Flatz durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Lukas Flatz und Dr. Vincent Walter. Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr. Vincent Walter von mir eigenständig durchgeführt. Die in vitro T-Zell Stimulation erfolgte mittels etablierten Protokolls (Berner et al., 2019). Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Anleitung durch Dr. Vincent Walter durch mich. Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

## **Danksagung**

Als erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Lukas Flatz für die Annahme als Doktorandin, die Aufnahme in seine Arbeitsgemeinschaft und die stets sehr gute und intensive Betreuung während meines Projektes bedanken. Besonderen Dank auch dafür, dass ich die Möglichkeit hatte, die großartige Zusammenarbeit mit den Kollegen aus St. Gallen im Rahmen eines Besuchs persönlich zu erfahren. Mein herzlicher Dank geht an Dr. Vincent Walter, der mich geduldig an die Arbeit im Labor heranführte, bei allen Problemen und Schwierigkeiten stets zur Stelle war und jederzeit für Fragen zur Verfügung stand. Ich bin sehr froh, über diese zuverlässige Betreuung. Mein Dank gilt außerdem der gesamten AG Flatz, die mich sehr gut aufnahmen und sich immer hilfsbereit und unterstützend zeigten. Des Weiteren danke ich Herr Prof. Dr. Martin Röcken, dass ich meine Arbeit an der Universitätshautklinik Tübingen durchführen durfte. Ein großer Dank geht auch an Frau Prof. Dr. Anja Ulmer, die mir die Zellen der SLN zu Verfügung stellte. Ich möchte mich ebenfalls bei den freundlichen Mitarbeiterinnen der LDI der Hautklinik Tübingen bedanken, die mich jeden Tag zuverlässig informierten, wenn Proben für meine Arbeit bereit waren. Ein großer Dank geht an meine Familie, insbesondere meine Eltern, die mich immer unterstützen und mir mein Medizinstudium ermöglichen. Danke an alle Familienmitglieder und Freunde, die sich, gerade in Zeiten, in denen es etwas an Motivation mangelte, meine Beschwerden stets anhörten und mich immer wieder neu aufbauten und motivierten.