

Aus der  
Universitäts-Hautklinik Tübingen  
Sektion Dermatologische Onkologie

**T-Zell-Reaktivität gegen Melanozyten-Differenzierungs-  
Antigene in Wächterlymphknoten von Melanom-Patienten**

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

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

**vorgelegt von  
Thomä, Sophie Christine Patricia**

**2026**

Dekanin: Professorin Dr. S. Y. Brucker

1. Berichterstatter: Professor Dr. L. Flatz
2. Berichterstatter: Professorin Dr. E. M. Grischke

Tag der Disputation: 28.07.2026

# Inhaltsverzeichnis

|                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildungsverzeichnis                                                                                                                  | 3  |
| Tabellenverzeichnis                                                                                                                    | 5  |
| Abkürzungsverzeichnis                                                                                                                  | 6  |
| 1 Einleitung                                                                                                                           | 9  |
| 1.1 Das maligne Melanom                                                                                                                | 9  |
| 1.1.1 Epidemiologie                                                                                                                    | 9  |
| 1.1.2 Risikofaktoren                                                                                                                   | 10 |
| 1.1.3 Einteilung                                                                                                                       | 10 |
| 1.1.4 Diagnostik                                                                                                                       | 12 |
| 1.1.5 Therapie                                                                                                                         | 17 |
| 1.2 Tumorimmunantwort beim malignen Melanom                                                                                            | 20 |
| 1.2.1 Tumorantigene und immune- related adverse events                                                                                 | 20 |
| 1.2.2 Melanozyten- Differenzierungs- Antigene                                                                                          | 22 |
| 1.2.3 Wechselbeziehung von Tumor und Immunsystem                                                                                       | 25 |
| 1.3 Zusammenfassung und Studienziel                                                                                                    | 26 |
| 2 Material und Methoden                                                                                                                | 28 |
| 2.1 Probenmaterial                                                                                                                     | 28 |
| 2.1.1 Ethikstatement                                                                                                                   | 28 |
| 2.1.2 Herkunft der Proben                                                                                                              | 28 |
| 2.2 Gemeinsame Methodik für beide Versuchsteile                                                                                        | 29 |
| 2.2.1 Materialien und Reagenzien                                                                                                       | 29 |
| 2.2.2 Aufarbeitung der Wächterlymphknoten                                                                                              | 30 |
| 2.2.3 Kryokonservierung der Zellsuspension                                                                                             | 31 |
| 2.3 Versuchsteil I: Einfluss des Aufarbeitungszeitpunkts und der Kryokonservierung auf das immunzelluläre Milieu im Wächterlymphknoten | 32 |
| 2.3.1 Material und Reagenzien                                                                                                          | 32 |
| 2.3.2 Vorgehen                                                                                                                         | 33 |

|       |                                                                                                         |    |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.4   | Versuchsteil II: In- vitro T- Zellstimulation mit Melanozyten-Differenzierungsantigenen                 | 36 |
| 2.4.1 | Material und Reagenzien                                                                                 | 36 |
| 2.4.2 | Vorbereitung                                                                                            | 37 |
| 2.4.3 | Vorgehen                                                                                                | 38 |
| 2.5   | Durchflusszytometrie                                                                                    | 39 |
| 2.5.1 | Prinzip der Durchflusszytometrie                                                                        | 39 |
| 2.5.2 | Gating                                                                                                  | 40 |
| 2.6   | Statistische Auswertung                                                                                 | 44 |
| 3     | Ergebnisse                                                                                              | 45 |
| 3.1   | Studienkollektiv                                                                                        | 45 |
| 3.1.1 | Patienten                                                                                               | 45 |
| 3.1.2 | Primärtumor                                                                                             | 46 |
| 3.1.3 | Eigenschaften der Wächterlymphknoten                                                                    | 48 |
| 3.2   | Versuchsteil I: Durchflusszytometrische Untersuchung des immunzellulären Milieus der Wächterlymphknoten | 49 |
| 3.2.1 | Workflow                                                                                                | 49 |
| 3.2.2 | Einfluss des Zeitabstands zwischen OP und Aufarbeitung der WLK                                          | 50 |
| 3.2.3 | Einfluss der Kryokonservierung                                                                          | 55 |
| 3.3   | In- vitro T- Zellstimulation mit Melanozyten- Differenzierungsantigenen                                 | 59 |
| 3.3.1 | Workflow                                                                                                | 59 |
| 3.3.2 | T- Zell- Aktivierungsmarker nach Stimulation mit MDAs                                                   | 60 |
| 3.3.3 | Einfluss des Lymphknotenstatus auf die T- Zell- Reaktivität gegen MDAs                                  | 67 |
| 4     | Diskussion                                                                                              | 69 |
| 4.1   | Zusammenfassung                                                                                         | 69 |
| 4.2   | Diskussion der Ergebnisse                                                                               | 70 |
| 4.2.1 | Einfluss des Zeitabstands zwischen OP und Aufarbeitung der WLK                                          | 70 |
| 4.2.2 | Einfluss der Kryokonservierung                                                                          | 70 |
| 4.2.3 | T- Zell- Stimulationen mit MDAs                                                                         | 71 |

|       |                                |     |
|-------|--------------------------------|-----|
| 4.3   | Limitationen                   | 76  |
| 4.3.1 | Patientenkollektiv             | 76  |
| 4.3.2 | Auswahl der Wächterlymphknoten | 77  |
| 4.3.3 | Kryokonservierung              | 77  |
| 4.3.4 | Fehlende HLA- Typisierung      | 77  |
| 4.3.5 | Geringe Fallzahl               | 78  |
| 5     | Zusammenfassung                | 79  |
| 6     | Literaturverzeichnis           | 81  |
| 7     | Erklärung zum Eigenanteil      | 100 |
| 8     | Danksagung                     | 101 |

## Abbildungsverzeichnis

|                                                                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 1: Workflow für Versuchsteil I .....                                                                                                                              | 34 |
| Abbildung 2: Gating- Strategie für Versuchsteil I am Beispiel eines WLK .....                                                                                               | 41 |
| Abbildung 3: Gating- Strategie für Versuchsteil II am Beispiel eines WLK nach Stimulation mit dem CEF- Pool .....                                                           | 43 |
| Abbildung 4: Altersverteilung des Patientenkollektivs .....                                                                                                                 | 45 |
| Abbildung 5: Prozentualer Anteil verschiedener Melanom- Subtypen im Patientenkollektiv .....                                                                                | 46 |
| Abbildung 6: Tumordicke des Primarius im Patientenkollektiv dargestellt als Boxplot .....                                                                                   | 47 |
| Abbildung 7: Prozentuale Verteilung des Nodalstatus der WLK im Patientenkollektiv .....                                                                                     | 48 |
| Abbildung 8: Flussdiagramm der Probenselektion für Versuchsteil I.....                                                                                                      | 49 |
| Abbildung 9: Lymphozytenzahl in den Zellsuspensionen nach Aufarbeitung der WLK am OP- Tag vs. am Folgetag in Boxplot- Darstellung.....                                      | 50 |
| Abbildung 10: Anteil vitaler Zellen an der Lymphozyten- Population nach Aufarbeitung der WLK am OP- Tag vs. am Folgetag in Boxplot- Darstellung ..                          | 51 |
| Abbildung 11: Anteil der CD19+- B- und CD3+- T- Lymphozyten an der Gesamtlymphozytenzahl bei Aufarbeitung der WLK am OP- Tag bzw. am Folgetag in Boxplot- Darstellung ..... | 52 |
| Abbildung 13: Beispiel für Bestimmung der T- Zell- Subpopulationen aus den CD3+ T- Zellen.....                                                                              | 53 |
| Abbildung 14: Anteil der CD4+- & CD8+- Zellen an den CD3+- positiven Lymphozyten bei Aufarbeitung am OP- Tag bzw. am Folgetag in Boxplot- Darstellung .....                 | 54 |
| Abbildung 15: Anteil vitaler Zellen in den Zellsuspensionen eines WLK vor und nach Kryokonservierung in einer SSC-A versus APC Dotplot- Darstellung.....                    | 55 |
| Abbildung 16: Anteil vitaler Zellen in fünf aufgearbeiteten WLK vor und nach Kryokonservierung .....                                                                        | 56 |
| Abbildung 17: Anteil der CD19+- & CD3+- Lymphozyten an der Gesamt-Lymphozytenpopulation in den Zellsuspensionen vor und nach Kryokonservierung .....                        | 57 |

|                                                                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 18: Anteil der CD4+- & CD8+- T- Lymphozyten an der Gesamt- T- Lymphozytenzahl in den Zellsuspensionen vor und nach Kryokonservierung .                 | 58 |
| Abbildung 19: Flussdiagramm der Probenselektion für die T- Zell- Stimulationen..                                                                                 | 59 |
| Abbildung 20: Intrazelluläre INF $\gamma$ - und TNF $\alpha$ - Expression in CD8+- Lymphozyten aus einem exemplarischen WLK nach Stimulation.....                | 61 |
| Abbildung 21: Tabellarische Darstellung der INF $\gamma$ - und TNF $\alpha$ - Expression in den CD3+- CD8+- Lymphozyten nach T- Zell- Stimulation mit MDAs. .... | 62 |
| Abbildung 22: Intrazelluläre INF $\gamma$ - und TNF $\alpha$ - Expression in CD4+- Lymphozyten aus einem exemplarischen WLK nach Stimulation.....                | 64 |
| Abbildung 23: Tabellarische Darstellung der INF $\gamma$ - und TNF $\alpha$ - Expression in den CD3+- CD4+- Lymphozyten nach T- Zell- Stimulation mit MDAs. .... | 65 |
| Abbildung 24: Logarithmische Boxplot- Darstellung des Anteils CD40L+- Zellen an den CD4+- Zellen [%] nach Stimulation mit den Peptidpools. ....                  | 67 |

## Tabellenverzeichnis

|                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabelle 1: Liste der für die LDI und Kryokonservierung der Lymphknoten verwendeten Geräte .....                                                  | 29 |
| Tabelle 2: Liste der für die LDI und Kryokonservierung der Lymphknoten verwendeten Verbrauchsmaterialien .....                                   | 29 |
| Tabelle 3: Liste der für die LDI und Kryokonservierung der Lymphknoten verwendeten Reagenzien und Chemikalien .....                              | 30 |
| Tabelle 4: Liste der für Versuchsteil I verwendeten Geräte .....                                                                                 | 32 |
| Tabelle 5: Liste der für Versuchsteil I verwendeten Verbrauchsmaterialien .....                                                                  | 32 |
| Tabelle 6: Liste der für Versuchsteil I verwendeten Chemikalien .....                                                                            | 32 |
| Tabelle 7: Liste der für Versuchsteil I verwendeten FACS- Antikörper .....                                                                       | 33 |
| Tabelle 8: Liste der für Versuchsteil I verwendeten Software .....                                                                               | 33 |
| Tabelle 9: Liste der für Versuchsteil II verwendeten Geräte .....                                                                                | 36 |
| Tabelle 10: Liste der für Versuchsteil II verwendeten Verbrauchsmaterialien ..                                                                   | 36 |
| Tabelle 11: Liste der für Versuchsteil II verwendeten Chemikalien und Reagenzien .....                                                           | 37 |
| Tabelle 12: Liste der für Versuchsteil II verwendeten FACS- Antikörper und Farbstoffe .....                                                      | 37 |
| Tabelle 13: Liste der für Versuchsteil II verwendeten Peptidpools .....                                                                          | 37 |
| Tabelle 14: Verteilung von Ulzerationen nach T- Stadium im Patientenkollektiv .....                                                              | 47 |
| Tabelle 15: Lymphozytenzahl in den Zellsuspensionen nach Aufarbeitung der WLK am OP- Tag vs. am Folgetag .....                                   | 50 |
| Tabelle 16: Anteil vitaler Zellen an der Lymphozyten- Population nach Aufarbeitung der WLK am OP- Tag vs. am Folgetag .....                      | 51 |
| Tabelle 17: Anteil der CD19+- B- und CD3+- T- Lymphozyten an der Gesamtlymphozytenzahl bei Aufarbeitung der WLK am OP- Tag vs. am Folgetag ..... | 53 |
| Tabelle 18: Anteil der CD4+- und CD8+- Zellen an den CD3+- Lymphozyten bei Aufarbeitung am OP- Tag vs. am Folgetag .....                         | 55 |
| Tabelle 19: Kreuztabelle CD8+- Reaktivität gegen MDAs * Nodalstatus .....                                                                        | 68 |
| Tabelle 20: Kreuztabelle CD4+- Reaktivität gegen MDAs * Nodalstatus .....                                                                        | 68 |

## Abkürzungsverzeichnis

|              |                                      |
|--------------|--------------------------------------|
| AJCC         | American Joint Committee on Cancer   |
| ALM          | Akrolentiginöses Melanom             |
| AMM          | Amelanotisches Melanom               |
| APC          | Antigen- präsentierende Zelle        |
| BSA          | Bovines Serumalbumin                 |
| CLND         | komplettierende Lymphknotendisektion |
| CSS          | kumulative Sonnenschädigung          |
| CT           | Computertomographie                  |
| CTL          | zytotoxische T- Zellen               |
| DCCD         | disseminated cancer cell density     |
| DCT          | Dopachrom-Tautomerase                |
| DHICA        | 5,6-Dihydroxyindol-2-carbonsäure     |
| DNA          | Desoxyribonukleinsäure               |
| FACS         | Fluorescence-Activated Cell Sorting  |
| FCS          | Fetales Kälberserum                  |
| Gp100        | Glykopeptid 100                      |
| HBSS         | Hanks' Balanced Salt Solution        |
| HLA          | Humanes Leukozytenantigen            |
| ICI          | Immuncheckpoint- Inhibition          |
| IL           | Interleukin                          |
| INF $\gamma$ | Interferon gamma                     |
| irAE         | immune- related adverse event        |

|              |                                              |
|--------------|----------------------------------------------|
| IVS          | In- vitro Stimulation                        |
| LDI          | Lymphozyten- Disaggregations- Immunzytologie |
| LMM          | Lentigo- maligna- Melanom                    |
| MAPK         | Mitogen-aktivierte Proteinkinase             |
| MDA          | Melanozyten- Differenzierungs- Antigen       |
| MHC          | Major Histocompatibility Complex             |
| mRNA         | messenger ribonucleic acid                   |
| MRT          | Magnetresonanztomographie                    |
| NaCl         | Natriumchlorid                               |
| NK- Zellen   | Natürliche Killerzellen                      |
| PBMC         | Periphere mononukleäre Blutzelle             |
| PBS          | Phosphate Buffered Saline                    |
| PCR          | Polymerase- Kettenreaktion                   |
| PET          | Positronenemissionstomographie               |
| SDD          | sequenzielle digitale Dermatoskopie          |
| SPECT        | Single Photon Emission Computed Tomography   |
| SSM          | Superfiziell spreitendes Melanom             |
| TAA          | Tumor- assoziiertes Antigen                  |
| Tc           | Technetium                                   |
| TIL          | Tumor- infiltrierender Lymphozyt             |
| TNF $\alpha$ | Tumornekrosefaktor alpha                     |
| TRP2         | Tyrosinase- related peptide 2                |
| TSA          | Tumor- spezifisches Antigen                  |

|     |                      |
|-----|----------------------|
| TZR | T- Zell- Rezeptor    |
| TZS | T- Zell- Stimulation |
| WLK | Wächterlymphknoten   |

# 1 Einleitung

## 1.1 Das maligne Melanom

Das maligne Melanom ist ein von den Melanozyten ausgehender, bösartiger Tumor. Melanozyten sind Zellen neuroektodermalen Ursprungs, deren Vorläufer während der Embryonalentwicklung aus der Neuralleiste in die Haut migrieren. Als ausdifferenzierte Melanozyten bilden sie dort das pigmentgebende Melanin. Weitere Melanozytenpopulationen finden sich u.a. in den Schleimhäuten, der Uvea und im zentralen Nervensystem, sodass neben einer kutanen Lokalisation eines Melanoms auch mukosale und okuläre Formen auftreten (Ali et al., 2013).

### 1.1.1 Epidemiologie

Das Melanom ist nach dem Basalzellkarzinom und dem Plattenepithelkarzinom die dritthäufigste maligne Hauttumorentität. Weltweit sind 2020 rund 325.000 Menschen am Melanom erkrankt und 57.000 Menschen an der Erkrankung verstorben (Sung et al., 2021).

Die Inzidenzen unterscheiden sich im internationalen Vergleich. Die höchste Inzidenz weist Australien auf (rund 37 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner innerhalb eines Jahres). In großen Teilen Asiens und Afrikas ist das Melanom hingegen eine Seltenheit (<1 Neuerkrankung pro 100.000 Einwohner innerhalb eines Jahres). Diese Diskrepanz kann vor allem auf unterschiedliche klimatische Bedingungen und genetisch festgelegte Hauttypen zurückgeführt werden (Ferlay et al., 2021).

In Deutschland hat sich die Inzidenz des Melanoms zwischen 1970 und 2015 verfünffacht. Insbesondere die Einführung des gesetzlichen Hautkrebsscreenings 2008 führte zu einem sprunghaften Anstieg der Neuerkrankungsraten. Die Mortalität ist hingegen durch Früherkennung und neue Therapieformen annähernd gleichgeblieben (Robert Koch-Institut, 2016).

Langfristig werden sich die Inzidenzen vermutlich stabilisieren. Durch Bevölkerungswachstum und –alterung wird die Prävalenz jedoch weiterhin

steigen und das Melanom eine hochrelevante Erkrankung bleiben (Whiteman et al., 2016).

### **1.1.2 Risikofaktoren**

Wichtigster exogener Risikofaktor ist die UV- Exposition der Haut (Robert Koch-Institut, 2016). Etwa 90% der kutanen Melanome in Deutschland sind auf den Einfluss von UV- Strahlen zurückzuführen (Keim et al., 2021). Sowohl eine chronische UV- Exposition, die Nutzung von Sonnenbänken als auch schwere Sonnenbrände sind hierbei relevant. Die Hauttypen I und II sind besonders suszeptibel für UV- induzierte DNA- Schäden (Olsen et al., 2010).

Wichtige endogene Risikofaktoren sind eine hohe Anzahl melanozytärer Nävi oder deren atypische Konfiguration (Gandini et al., 2005). Wurde in der Vorgeschichte ein Melanom oder ein anderer nicht- melanozytärer Hautkrebs diagnostiziert, ist das Melanomrisiko deutlich erhöht (Wheless et al., 2010; Van Der Leest et al., 2015). Dauerhaft immunsupprimierte Patienten haben ein zwei- bis dreifach erhöhtes Risiko zu erkranken (Robbins et al., 2015). Ebenfalls steigert eine positive Familienanamnese das Erkrankungsrisiko. In diesen familiären Melanomen scheinen Veränderungen in Genen wie p16 für die Erkrankung zu prädisponieren (Hussussian et al., 1994; Soura et al., 2016).

### **1.1.3 Einteilung**

Auf Basis des klinischen und histologischen Bildes entstand um das Jahr 1970 das Clark-McGovern- Klassifikationssystem. Das System wird nach wie vor in Leitlinien und Lehrbüchern verwendet. Hierbei werden vier Subtypen des malignen Melanoms unterschieden. Sie variieren hinsichtlich des Erscheinungsbildes, des mittleren Erkrankungsalters, der Metastasierungsneigung, der Lokalisation und der Prognose (McGovern, 1971; Mihm et al., 1971; Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF, 2020).

Das superfiziell spreitende Melanom (SSM) ist die häufigste Form des Melanoms (ca. 65%). Meist tritt es im mittleren Erwachsenenalter auf und manifestiert sich stammnah. In ca. 30% lässt sich anamnestisch die Entstehung aus einem vorbestehenden Nävus nachvollziehen. Makroskopisch zeigt sich das SSM als

unscharf begrenzte Makula oder Plaque mit einer ungleichmäßigen braunschwarzen Färbung. Mit fortschreitender Erkrankungsdauer können sich zudem Ulzerationen und Noduli ausbilden. Das SSM breitet sich zunächst langsam horizontal aus, weshalb es meist in einem frühen Stadium entdeckt wird. Die Prognose ist daher vergleichsweise günstig (Roesch and Berking, 2018; Kempf et al., 2020).

Etwa 15% der Melanome sind noduläre Melanome. Im Gegensatz zum SSM wächst diese Form früh invasiv und hat daher im Vergleich zu den anderen Subtypen die schlechteste Prognose. Oft findet sich das noduläre Melanom im Rumpf- und Kopf- Hals- Bereich. Neben der knotigen Struktur sind Ulzerationen und die Neigung zu Kontaktblutungen für diesen Subtyp charakteristisch (Roesch and Berking, 2018; Kempf et al., 2020).

Dem Lentigo- maligna- Melanom (LMM) können ca. 15% der Melanome zugeordnet werden. Es entwickelt sich über Jahre auf einer Lentigo maligna an den lichtexponierten Arealen der Haut und gilt als Melanom des älteren Patienten. Makroskopisch manifestiert sich das LMM als braun gescheckte Makula. Die umliegende Haut weist oft UV- induzierte Schäden wie aktinische Elastosen auf (Roesch and Berking, 2018; Kempf et al., 2020).

Ein seltener Subtyp (ca. 5%) ist das akrolentiginöse Melanom (ALM). Zwar wächst das ALM eher langsam, doch aufgrund der Lokalisation an Hand- und Fußinnenflächen wird es oft erst im Spätstadium diagnostiziert. Auch eine subunguale Manifestation mit Ulzerationen, Kontaktblutungen und Nagelverlust ist möglich. Differentialdiagnostisch ist das subunguale ALM von einer subungualen Hämorrhagie abzugrenzen. Eine Beteiligung des Nagelfalzes kann hierbei wegweisend sein (Hutchinson- Zeichen) (Roesch and Berking, 2018; Kempf et al., 2020).

Auf Basis der Einteilung nach Clark und McGovern und unter Einbeziehung neuer Erkenntnisse über die molekularen Entstehungsmechanismen von Melanomen entwickelte die Weltgesundheitsorganisation ein neues Klassifikationssystem. Hier werden neun verschiedene Subtypen beschrieben, die nach solarer und nicht- solarer Genese eingeteilt werden. Bei den UV- induzierten Melanomen

erfolgt zusätzlich eine Unterteilung anhand der kumulativen Sonnenschädigung der umgebenden Haut (Elder et al., 2020).

#### **1.1.4 Diagnostik**

##### **1.1.4.1 Klinische Diagnose**

Der Verdacht auf ein Melanom entsteht in der Regel aufgrund einer auffälligen Hautläsion. Zur groben Einschätzung kann die ABCDE- Regel hilfreich sein. Hierbei werden Asymmetrien, Begrenzung, Colorit, Durchmesser und Erhabenheit beurteilt. In der Anamnese sollten Auffälligkeiten und Veränderungen hinsichtlich dieser Kriterien erfragt werden (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF, 2020).

Bei der körperlichen Untersuchung soll die Inspektion des gesamten Integuments inklusive der Schleimhäute erfolgen. Die Dermatoskopie durch geschultes Personal kann die diagnostische Genauigkeit erhöhen (Dinnes et al., 2018; Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF, 2020).

Zusätzliche Bildgebungsverfahren werden zunehmend eingesetzt. Die Ganzkörperfotografie eignet sich v.a. für Risikopatienten (z.B. hohe Anzahl atypischer Nävi). Im Rahmen der sequentiellen digitalen Dermatoskopie (SDD) können Aufnahmen von Hautläsionen aufgenommen, gespeichert und analysiert werden. Läsionen, die die Malignitätskriterien primär nicht erfüllen, können mithilfe der SDD in ihrer Dynamik beobachtet werden (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF, 2020).

##### **1.1.4.2 Primärexzision und histopathologisches Staging**

Jede malignitätsverdächtige Hautläsion soll, wenn möglich, im Kompletten und mit Sicherheitsabstand exzidiert werden. Ist die vollständige Exzision aufgrund einer ungünstigen Lokalisation (z.B. flächige Ausbreitung im Gesicht) nicht möglich, so kann eine Teilexzision oder Biopsie angewandt werden (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF, 2020).

Die histopathologische Begutachtung ist der Goldstandard in der Melanomdiagnostik. Immunhistochemie und molekulargenetische Verfahren können ergänzend eingesetzt werden (Long et al., 2023). Das American Joint

Committee on Cancer (AJCC) definiert die Tumordicke nach Breslow und das Vorhandensein von Ulzerationen als Stagingkriterien (Gershenwald et al., 2017). Der Zusammenhang zwischen Invasionstiefe des Primärtumors und den Überlebensraten von Melanompatienten wurde 1970 von Alexander Breslow beschrieben (Breslow, 1970) und gilt bis heute als einer der wichtigsten prognostischen Faktoren. Die Tumordicke nach Breslow wird von der Oberseite des Stratum granulosum bis zur tiefst gelegenen Melanomzelle gemessen und in 0,1 mm Schritten angegeben. Anhand der Grenzwerte  $\leq 1$  mm,  $\leq 2$  mm,  $\leq 4$  mm und  $>4$  mm kann der Tumor einer T- Klasse zugeordnet werden. Ob Ulzerationen vorhanden sind, wird mit dem Zusatz „a“ (keine Ulzerationen) oder „b“ (Ulzerationen vorhanden) angegeben. Die Mitoserate wird in der AJCC-Klassifikation nicht mehr als Kriterium für die T- Klassifikation verwendet, bleibt aber ein wichtiger prognostischer Faktor (Gershenwald et al., 2017; Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF, 2020).

#### 1.1.4.3 Initiale Ausbreitungsdiagnostik

Die Ausbreitungsdiagnostik beinhaltet in jedem Stadium eine Ganzkörperuntersuchung, sowie eine Palpation der Lymphknoten und Lymphabflusswege. Zusätzlich kann der Spiegel des Tumormarkers S100B erhoben werden (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF, 2020). Zwar ist der prognostische Wert von S100B strittig, jedoch eignet er sich insbesondere in den Stadien III und IV als Verlaufsparemeter (Frauchiger et al., 2019). Aufgrund der geringen Invasivität der Untersuchung wird die Bestimmung des S100B- Werts in den deutschen Leitlinien, insbesondere in späten Stadien, empfohlen (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF, 2020).

Die Sonographie der regionalen Lymphknoten ermöglicht eine genauere Differenzierung als die Palpation (Bafounta et al., 2004). Allerdings variiert die Sensitivität je nach Tumorstadium, sodass unter Abwägung des Nutzen- Risiko- Verhältnisses die Sonographie der Lymphknoten ab Stadium IB empfohlen wird (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF, 2020). Im Frühstadium kann die periphere Perfusion des Lymphknotens auf einen malignen Befall hinweisend sein. Mit Progress der Metastasierung nimmt der Lymphknoten

zunehmend eine ballonierte Form an und fällt durch einen Verlust des zentralen Echos auf (Voit et al., 2010). Mithilfe der Lymphknotensonographie können makroskopische Metastasen dargestellt werden. Um bereits einzelne disseminierte Melanomzellen in den Lymphknoten (Mikrometastasen) zu detektieren, eignet sich die Wächterlymphknotenbiopsie (siehe 1.1.4.4).

Ergänzende bildgebende Diagnostik (Ganzkörper-CT/ -MRT oder PET/CT exklusive Kopf, sowie eine Schädel- MRT) wird ab Stadium IIC empfohlen (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF, 2020).

#### 1.1.4.4 Wächterlymphknotenbiopsie

##### 1.1.4.4.1 Indikation der Wächterlymphknotenbiopsie

Lymphknoten, die sich im unmittelbaren Drainagegebiet des Primärtumors befinden, werden als Wächterlymphknoten (WLK) bezeichnet. Die WLK sind der wahrscheinlichste Ort der primären lymphogenen Metastasierung.

Morton et al. beschrieben 1992 den kombinierten Einsatz von Lymphszintigraphie und WLK- Biopsie, um die Lymphabflusswege zu kartieren, WLK zu lokalisieren und enthaltene Mikrometastasen in klinisch okkulten Lymphknoten zu detektieren. Eine komplettierende Lymphadenektomie konnte so gezielt bei Patienten mit befallenen Lymphknoten eingesetzt werden und eine Übertherapie bei Patienten ohne lymphogene Metastasierung vermieden werden (Morton, 1992).

Lymphszintigraphie und WLK- Biopsie haben heute einen festen Stellenwert im diagnostischen Vorgehen. In der S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms (Stand 2018) wird eine WLK- Biopsie ab einer Tumordicke nach Breslow von  $\geq 1\text{mm}$  empfohlen. Bei Risikokonstellationen wie Ulzerationen, einer hohen Mitoserate oder einem geringen Erkrankungsalter ( $<40$  Jahre) soll die WLKB auch bei einer geringeren Tumordicke ( $0,75\text{-}1\text{ mm}$ ) durchgeführt werden (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF, 2020).

#### 1.1.4.4.2 Detektion der Wächterlymphknoten

Präoperativ werden WLK mittels Lymphszintigraphie lokalisiert. Hierfür erfolgt eine intradermale Injektion von Tc-99m-markierten Nanokolloid nahe der Exzisionsstelle des Primärtumors. Über die Lymphabflusswege gelangt dieses in die WLK und reichert sich dort an. Durch eine SPECT wird die Position der WLK bildgebend dargestellt werden. Abhängig vom Protokoll wird die operative Exzision einige Stunden oder einen Tag nach der Lymphszintigraphie durchgeführt. Die Detektion der WLK im Patientensitus erfolgt durch den kombinierten Einsatz einer Gammasonde und manueller Palpation. Zusätzlich kann zu Beginn der Operation ein lymphgängiger Farbstoff wie Isosulfanblau in die Exzisionsstelle injiziert werden. Dies ermöglicht die farbliche Unterscheidung vom umliegenden Gewebe (Gershenwald et al., 1998; Morton et al., 2005; Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF, 2020).

#### 1.1.4.4.3 Aufarbeitung der Wächterlymphknoten

Der Status der WLK hat einen maßgeblichen Einfluss auf die Prognose und ist ein wichtiger Parameter im Staging. Bereits das Vorhandensein einer einzelnen Tumorzelle bewirkt eine Heraufstufung in das Stadium III der AJCC-Klassifikation (Gershenwald et al., 2017). Eine möglichst präzise Detektion von Mikrometastasen ist daher essenziell. In den meisten Kliniken erfolgt nach der Dissektion der WLK die Aufarbeitung mit Fixation des Gewebes, Paraffineinbettung und Anfertigung von Schnitten. Diese werden histopathologisch mit Hämatoxylin- Eosin und immunhistochemisch mit Melanozyten- spezifischen Antikörpern eingefärbt (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF, 2020).

Die histopathologische Aufarbeitung hat den Nachteil, dass sich die Metastase zur Detektion genau in der examinierten, zweidimensionalen Schnittebene befinden muss. Oft sind die Metastasen jedoch nicht gleichmäßig im Lymphknoten verteilt, sondern in Zellclustern vorliegend. Die Detektionsrate ist daher stark abhängig von der Anzahl der examinierten Schnitte (van Diest, 1999). Im klinischen Alltag ist eine Kompromisslösung aus praktischer und finanzieller

Machbarkeit und einer ausreichenden Zahl examinierter Schnitte notwendig (Mellemgaard et al., 2023).

Eine Homogenisierung des WLK umgeht dieses Problem und erhöht die Wahrscheinlichkeit, Metastasen zu detektieren. Ein Ansatz ist der Nachweis von Transkripten Melanozyten- spezifischer Antigene wie Melan A oder Tyrosinase durch Realtime- PCR. Diese Methode ist sehr sensitiv, hat allerdings den Nachteil, dass nur die Anzahl der Transkripte und nicht die Anzahl der Tumorzellen im WLK erfasst wird. Zudem kann nicht zwischen malignen und benignen melanozytären Zellen unterschieden werden, weshalb diese Methode eine geringe Spezifität aufweist (Abrahamsen et al., 2005).

Die Lymphozyten- Disaggregations- Immunzytologie (LDI) zielt ebenfalls auf die Homogenisierung des WLK ab. Der Lymphknoten wird hierfür zunächst entlang der Longitudinalachse halbiert. Eine Hälfte wird fixiert und histopathologisch aufgearbeitet. Die andere Hälfte wird im Rahmen eines standardisierten Verfahrens mechanisch disaggregiert und so in eine Einzelzellsuspension überführt. Mittels Dichtegradienten- Zentrifugation werden die Tumorzellen angereichert. Die Zellsuspension wird anschließend auf beschichtete Objektträger pipettiert und mit HMB-45 und Anti- Melan-A- Antikörpern immunzytologisch angefärbt. Anhand definierter Kriterien wie HMB-45-Positivität, Granularität und Größe wird die Anzahl der disseminierten Tumorzellen bestimmt. Sie wird durch die disseminated cancer cells density (DCCD), die Anzahl der Tumorzellen pro Millionen Lymphozyten, angegeben. Durch die Homogenisierung des Lymphknotens ermöglicht die LDI höhere Detektionsraten als die standardmäßige histopathologische Aufarbeitung. Zugleich bleiben die Zellen bei der LDI im Gegensatz zur Realtime- PCR erhalten, sodass die Bestimmung der DCCD und eine Sequenzierung des Genoms einzelner Tumorzellen möglich ist, woraus Rückschlüsse auf das Patienten- Outcome gezogen werden können (Ulmer et al., 2014, 2005)

### **1.1.5 Therapie**

#### **1.1.5.1 Operative Verfahren**

Durch die Exzision des Primärtumors mit Sicherheitsabstand sollen lokale Rezidive vermieden werden. Der Sicherheitsabstand wird abhängig von der Tumordicke nach Breslow festgelegt. Bei einer Tumordicke von unter 2 mm (T1-T2) wird in der deutschen Leitlinie ein Resektionsabstand von 1 cm empfohlen. Melanome mit mindestens 2 mm Dicke (T3-T4) sollen mit einem Sicherheitsabstand von 2 cm reseziert werden (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF, 2020). Eine weitere Vergrößerung des Resektionsabstands auf 4 cm scheint keine weitere Verbesserung des Melanom-spezifischen Überlebens zu bewirken (Utjés et al., 2019). Der optimale Resektionsabstand ist nicht unumstritten. Einerseits muss er ausreichend groß sein, um Rezidive zu vermeiden, andererseits steigt mit dem Resektionsradius auch das Risiko operationsbedingter Komplikationen. Ob sich eine Verringerung des Resektionsabstands von 2 cm auf einen 1cm auf das Gesamtüberleben von Patienten mit Stadium II Melanomen auswirkt, wird aktuell in der MelMarT-II Studie untersucht (NCT: 03860883) (Rossi et al., 2022).

Hinsichtlich der Resektionstiefe gibt es wenig aktuelle Literatur. Üblich ist die Resektion bis auf die Faszie. Eine Resektionstiefe, ab der die Rezidiv-Wahrscheinlichkeit signifikant sinkt, ist jedoch nicht definiert (Grotz et al., 2011). Sowohl Resektionsabstand als auch -tiefe können bei einer besonderen Lokalisation oder großflächigen Melanomen individuell angepasst werden.

#### **1.1.5.2 Lymphadenektomie**

Die Lymphadenektomie zielt darauf ab, durch die radikale Entfernung der lokoregionären Lymphknoten Tumornester zu entfernen und das Risiko einer Fernmetastasierung zu minimieren. Eine elektive Lymphadenektomie bei unauffälligen Lymphknotenstatus, um einer Metastasierung frühzeitig entgegenzuwirken, führt nicht zu einem signifikanten Überlebensvorteil, sodass eine prophylaktische Lymphadenektomie nicht empfohlen wird. Liegen hingegen klinisch manifeste Lymphknotenmetastasen ohne Fernmetastasen vor, so ist eine therapeutische Lymphadenektomie indiziert (Lens et al., 2002; Deutsche

Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF, 2020). Durch die WLK- Biopsie ist die Detektion von Mikrometastasen in klinisch unauffälligen Lymphknoten möglich. Diese Metastasen werden als okkulte Lymphknotenmetastasen bezeichnet. Ob eine komplettierende Lymphknotendissektion (CLND) im Falle einer okkulten Metastasierung notwendig ist, ist strittig. Okkulte Lymphknotenmetastasen wurden in der Vergangenheit wie klinische manifeste Lymphknotenmetastasen durch eine unmittelbare CLND behandelt. In randomisierten Studien konnte jedoch kein Überlebensvorteil durch eine unmittelbare CLND bei okkulter Metastasierung im Vergleich zu einem beobachtenden Vorgehen mit regelmäßigen sonographischen Kontrollen festgestellt werden (Faries et al., 2017; Leiter et al., 2019). Aktuell werden daher verschiedene Scores herangezogen, um die Wahrscheinlichkeit weiterer Lymphknotenmetastasen abschätzen zu können. Entscheidend sind hierbei Faktoren wie das Vorliegen einer Kapselinfiltration, die Größe der Metastase und Risikokonstellationen beim Primarius (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF, 2020).

#### 1.1.5.3 Medikamentöse Therapie

Im lokalisierten Stadium ist das Melanom durch eine operative Therapie meist gut beherrschbar und mit hohen Überlebensraten einhergehend. Im metastasierten Stadium war die Prognose hingegen auch unter kombinierten Einsatz von operativen Verfahren und Chemotherapie lange sehr ungünstig. Der Einsatz neuer zielgerichteter Therapien führte zu einem deutlichen Abfall der Mortalität. In Abgrenzung zur Chemotherapie wirkt „targeted therapy“ gezielt auf bestimmte biologische Eigenschaften eines Tumors. Immuncheckpoint-Inhibitoren (ICI) und BRAF- & MEK- Inhibitoren sind heute fest in die Behandlung des fortgeschrittenen Melanoms etabliert (Berk-Krauss et al., 2020).

Etwa 40% der Melanome tragen eine Mutation im BRAF- Onkogen. Am häufigsten ist die BRAF- V600E- Mutation mit einem Austausch der Aminosäure Valin gegen Glutaminsäure, seltener ist der Austausch durch andere Aminosäuren, beispielsweise Valin gegen Lysin bei der BRAF- V600K- Mutation. Es entsteht eine daueraktive Form des BRAF- Onkogens, einem wichtigen

Bestandteil der MAPK (Mitogen aktivierte Proteinkinasen) - Signalkaskade, welche unter anderem die Zellteilung und Differenzierung reguliert. BRAF-Mutationen können so einen ständigen Proliferationsreiz auslösen (Long et al., 2011). Der Einsatz von BRAF- und MEK- Inhibitoren ermöglicht es, gezielt in diese molekulare Signalkaskade einzugreifen. Eine Kombination eines BRAF- mit einem MEK- Inhibitoren scheint der Monotherapie überlegen zu sein (Long et al., 2014). Die Kombinationstherapie kann bei Stadium III Patienten mit BRAF-V600- Mutation unter Berücksichtigung des individuellen Patientenprofils als gleichwertige Alternative zur Immuncheckpoint- Inhibition (ICI) erwogen werden (Bloem et al., 2025).

Eine weitere Form der zielgerichteten Therapie, die die Behandlung des Melanoms revolutioniert hat, ist die Immuncheckpoint- Inhibition. Mittels ICI kann den Immun- Escape- Mechanismen entgegengewirkt und eine intrinsische Immunaktivität gegen den Tumor erzielt werden (Farrow et al., 2020). Der Anti-CTLA-4- Antikörper Ipilimumab war der erste ICI, mit dem ein Überlebensvorteil gegenüber einem Placebo erzielt werden konnte (Eggermont et al., 2015). Aufgrund ihres geringeren Nebenwirkungsprofils und des verlängerten rezidivfreien Überlebens gegenüber Ipilimumab werden PD-1- Inhibitoren heute im klinischen Setting bevorzugt verwendet (Robert et al., 2019). Der Vorteil einer Kombination eines PD- 1- Inhibitoren mit einer geringen Dosis Ipilimumab ist umstritten. Im Rahmen der CheckMate 915 Studie wurden Patienten in Stadium IIIB-D und Stadium IV mit Nivolumab & niedrig dosierten Ipilimumab, Nivolumab & Placebo oder zwei Placebos behandelt. In der Gruppe Nivolumab & Ipilimumab traten mehr als doppelt so viele schwere therapieassoziierte Nebenwirkungen auf. Eine Reduktion des rezidivfreien Überlebens im Vergleich zu einer Monotherapie mit Nivolumab konnte nicht erzielt werden (Weber et al., 2023). Zu einem anderen Ergebnis kam die IMMUNED Studie, in deren Rahmen Patienten im Stadium IV nach vollständiger Resektion sichtbarer Erkrankungszeichen adjuvant mit einer Nivolumab- Monotherapie, einer Nivolumab- Ipilimumab- Kombinationstherapie oder einem Placebo behandelt wurden. Beide Therapieregime wiesen gegenüber dem Placebo einen signifikanten Vorteil im progressionsfreien Überleben auf. Eine Verlängerung des Gesamtüberlebens

gegen das Placebo konnte nur durch die Nivolumab- Ipilimumab-Kombinationstherapie erzielt werden, nicht jedoch durch die Nivolumab-Monotherapie. Allerdings traten auch in dieser Studie die meisten schweren therapieassoziierten Nebenwirkungen unter Kombinationstherapie auf (Livingstone et al., 2022). In der deutschen Leitlinie wird aktuell empfohlen, den Patienten in Stadium III und IV eine alleinige adjuvante PD-1- Inhibitor- Therapie anzubieten (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF, 2020) .

Einen Paradigmenwechsel in der Therapie des Melanoms könnte der neoadjuvante Einsatz von ICI bedeuten. Die SWOG S1801 Studie ergab ein längeres ereignisfreies Überleben für Patienten in Stadium III bei neoadjuvant-adjuvanten Einsatz von Pembrolizumab gegenüber der adjuvanten Therapie mit Pembrolizumab (Patel et al., 2023). In der NADINA Studie konnte ein signifikanter Überlebensvorteil durch eine neoadjuvante Kombinationstherapie mit Nivolumab plus Ipilimumab mit anschließender Operation gegenüber einer primären Operation mit adjuvanter Nivolumab- Therapie erzielt werden (Blank et al., 2024).

## **1.2 Tumorimmunantwort beim malignen Melanom**

### ***1.2.1 Tumorantigene und immune- related adverse events***

Tumore, die durch kumulative DNA- Schäden entstehen, weisen eine hohe Mutationslast auf. Eine hohe Mutationslast führt zu einer hohen Zahl in Struktur und Expression veränderter Proteine. Werden diese als Antigene auf den HLA-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert, kann das Immunsystem diese Zellen als maligne identifizieren und gezielt bekämpfen. Die Antigene können zwei verschiedenen Kategorien zugeordnet werden: Den Tumor- spezifischen Antigenen (TSAs) und den Tumor- assoziierten Antigen (TAAs) (Haen et al., 2020).

TSAs werden nur auf den HLA- Molekülen entarteter Zellen präsentiert, jedoch nicht auf gesundem Gewebe. Die Aminosäuresequenz kann dabei verändert sein oder dem Wildtyp entsprechen. Veränderte Aminosäuresequenzen (Neoantigene) entstehen im Rahmen von Mutationen im Exom oder durch alternatives Splicing. Ihre Proteinstruktur weicht von der Struktur in gesunden somatischen Zellen ab. Von den Neoantigenen werden Wildtyp- TSAs

unterschieden. Sie basieren auf der abnormen Expression von Antigenen, die auf gesunden Zellen kaum oder nicht exprimiert werden. Das Immunsystem ist diesen Antigenen im gesunden Zustand nicht ausgesetzt, sodass keine Ausbildung von Immuntoleranzmechanismen erfolgt. Aufgrund ihrer ausgeprägten Immunogenität sind Wildtyp- TSAs, insbesondere die Gruppe der Cancer- Testis- Antigene, in den vergangenen Jahren als Zielstruktur verschiedener Immuntherapien in den Fokus gerückt. Die Wildtyp- TSAs werden in manchen Klassifikationen auch den TAAs zugeordnet, da sie auch auf wenigen „gesunden“ Zellen wie beispielsweise auf Keimzellen exprimiert werden und damit nicht absolut tumorspezifisch sind. Um sie jedoch von den TAAs abzugrenzen, denen das Immunsystem in deutlich höheren Maßen ausgesetzt ist, wird hier die Zuteilung zu den TSAs übernommen. Eine Form zwischen Neoantigenen und Wildtyp- TSAs sind TSAs, die durch posttranslationale Modifikationen entstehen. Ihre Proteinstruktur entspricht der Wildtyp- Sequenz. Durch geringe Veränderungen der Proteineigenschaften, wie beispielsweise durch Anlagerung geladener Moleküle, werden diese Antigene jedoch trotzdem vom Immunsystem als verändert erkannt (Haen et al., 2020).

Zusammengefasst können maligne Zellen durch TSAs als fremd erkannt werden, was TSAs zu vielversprechenden Zielstrukturen für Immuntherapien macht. Insbesondere Neoantigene sind jedoch interindividuell verschieden, sodass darauf abzielende Immuntherapien für jeden Patienten individualisiert hergestellt werden müssen. Ob ein TSA ausreichend immunogen ist, um eine suffiziente Tumorimmunantwort hervorzurufen, ist zudem schwer vorhersagbar. Cancer- Testis- Antigene gelten als vielversprechende Zielstrukturen immuntherapeutischer Ansätze, da sie Tumorspezifität, eine hohe Immunogenität und eine geteilte Expression in vielen Patienten und Tumoren verbinden (Haen et al., 2020).

Im Gegensatz zu den TSAs finden sich TAAs sowohl auf Tumorzellen als auch auf gesundem Gewebe. In der Regel werden sie jedoch auf Tumorzellen stark überexprimiert. Einerseits ermöglicht die Überexpression eine relativ gezielte Erkennung durch das Immunsystem, andererseits können bei einer hohen Dichte präsentierter TAAs Immuntoleranzmechanismen induziert werden (Wolchinsky et

al., 2014). Werden diese Toleranzmechanismen im Rahmen einer ICI- Therapie durchbrochen, so kann es zu immunvermittelten Nebenwirkungen kommen (immune- related adverse events (irAEs)). Sie treten meist in den ersten Behandlungswochen auf, können sich aber auch Monate nach Einstellung der Behandlung manifestieren. Häufig betroffen sind Haut, Lunge, Gastrointestinaltrakt und endokrine Organe (Nuñez et al., 2023). Verschiedene Publikationen deuten auf eine Assoziation zwischen einem Therapieansprechen auf ICIs und dem Auftreten von irAEs hin. Dies spricht dafür, dass geteilte Antigene auf Tumorgewebe und auf von irAEs betroffenen Organen als T- Zell- Epitope dienen und entsprechende Immunantworten auslösen (Eggermont et al., 2020; Hussaini et al., 2021; Maher et al., 2019). Für eine Therapie, die sich gegen TAAs richtet, gilt es daher Antigene zu identifizieren, deren Expression sich auf wenige Zelltypen beschränkt, um weitreichende irAEs zu vermeiden. Andererseits müssen sie ausreichend immunogen sein, um eine wirksame T- Zell- Immunantwort zu induzieren. TAAs, die diese Kriterien erfüllen, sind vielversprechende Kandidaten für Tumorstimmung, ggf. in Kombination mit anderen immunstimulierenden Therapien wie ICI. Nach dem Off- the- shelf Prinzip könnte eine entsprechende Therapie individuell für den Patienten kombiniert werden. Im Gegensatz zu Therapien, die auf Neoantigenen basieren, müsste jedoch kein für jeden Patienten individuelles Molekül entwickelt werden (Haen et al., 2020; Hollingsworth and Jansen, 2019). Entsprechende Risiken und Kosten könnten so reduziert werden.

### **1.2.2 Melanozyten- Differenzierungs- Antigene**

Vitiligo ist eine Erkrankung, die sich durch flächige Depigmentierungen der Haut manifestiert. Ursächlich ist eine Autoimmunreaktion gegen Melanozyten. Bereits 1969 wurde eine Assoziation zwischen Melanomen und Vitiligo- ähnlichen Hautreaktionen beschrieben (Balabanov et al., 1969). Bald wurde die Bedeutung dieser Hautreaktionen als positiver prognostischer Faktor beim Melanom erkannt (Koh et al., 1983; Quaglino et al., 2010). Mit dem Aufkommen immunvermittelter Therapien wurden irAEs in Form von Vitiligo- ähnlichen Hautreaktionen beobachtet (Yee et al., 2000).

Palermo und Kollegen konnten im Blut von Vitiligo- Patienten eine hohe Zahl zytotoxischer T- Zellen (CTLs) nachweisen, die spezifisch für Melanozyten-Differenzierungs- Antigene (MDA) sind (Palermo et al., 2001). In gesunden Melanozyten sind MDAs Proteine des Melanin- Stoffwechsels. Wichtige MDAs sind Melan- A, Tyrosinase, Glykopeptid 100 (gp100) und tyrosinase- related- peptide 2 (TRP2). Auf Melanom- Zellen werden sie oft überexprimiert und zählen zu den TAAs.

#### 1.2.2.1 Glykopeptid 100

Das Glykopeptid 100 (gp100) ist an der Formierung von Melanosomen beteiligt. Vor allem in den frühen Stadien der Melanosomenreifung wird gp100 exprimiert, in ruhenden Melanozyten findet dagegen kaum gp100 Expression statt. Mit dem Antikörper HMB-45 kann gp100 immunhistochemisch angefärbt werden, sodass Zellen melanozytären Ursprungs von anderem Gewebe mittels HMB-45 unterschieden werden können (De Vries et al., 2001).

Seit 2022 ist das Fusionsprotein Tebentafusp für die Behandlung des metastasierten, uvealen Melanoms bei HLA A\*02:01- positiven Patienten zugelassen. Es besteht aus einem Antikörper gegen gp100 und einem anti- CD3- Effektor und induziert so bispezifisch eine T- Zell- Aktivität gegen den Tumor. Gegenüber Vergleichstherapien für uveale Melanome im metastasierten Stadium konnte durch Tebentafusp eine Verlängerung des Gesamtüberlebens erzielt werden (22 vs. 16 Monate) (Hassel et al., 2023). Ob eine Wirksamkeit auch für das kutane Melanom besteht, ist Gegenstand aktueller Studien (NCT05549297).

Im Rahmen der SCOPE Studie befindet sich aktuell der Impfstoff SCIB1/iSCIB1+ in Kombination mit Nivolumab/ Ipilimumab in der Phase II. Der DNA- Impfstoff kodiert für einen modifizierten Antikörper, der Epitope aus gp100 und TRP2 (siehe 1.2.2.4) exprimiert. Die Fc- Komponente des Antikörpers soll an CD64 auf Antigen- präsentierenden Zellen binden, die Präsentation verstärken und so eine wirksamere T- Zellantwort induzieren (Shaw et al., 2024) .

#### 1.2.2.2 Melan- A/ MART- 1

Melan- A ist ein Transmembranmolekül auf Melanozyten. Es besteht aus 118 Aminosäuren. Auf HLA A\*02 präsentiert wird das darin enthaltene Nonamer

AAGIGILTV durch zytotoxische T- Zellen erkannt. Aufgrund dieser Eigenschaft wird das Protein auch als melanoma antigen recognized by T cells (MART- 1) bezeichnet (Coulie et al., 1994; Kawakami et al., 1994). 80- 95% aller Melanome exprimieren Melan- A (Chen et al., 1996). Melan- A ist daher ein wichtiger immunhistochemischer Marker und gilt als sensitiver als HMB- 45 (Orosz, 1999). Auch bei der LDI wird mit einem Anti- Melan- A- Antikörper gearbeitet (Ulmer et al., 2005).

#### 1.2.2.3 Tyrosinase

Tyrosinase ist ein kupferhaltiges Enzym der Melanin- Biosynthese. Als Transmembranmolekül wird es auf den pigmentbildenden Melanosomen exprimiert. Dysregulationen des Enzyms können in Hypo- oder Hyperpigmentierung resultieren, was die charakteristische uneinheitliche Pigmentierung eines Melanoms erklärt (Lai et al., 2018).

Brichard et al. identifizierten Tyrosinase als Zielantigen Melanom- spezifischer CTLs, die aus dem Blut HLA A\*02 positiver Melanompatienten isoliert wurden. Bereits hier wurde Tyrosinase als potentielles Ziel einer Immuntherapie diskutiert (Brichard et al., 1993). Der mRNA- Impfstoff BNT111 codiert u.a. für Tyrosinase. Aktuell wird er in Kombination mit dem PD- 1- Inhibitor Cemiplimab bei Patienten mit therapierefraktärem, inoperablem Melanom im Stadium III und IV in einer Phase II Studie untersucht (Sahin et al., 2020).

#### 1.2.2.4 Tyrosinase- related- peptide 2 (TRP2)

TRP2, auch bekannt als Dopachrom-Tautomerase (DCT), ist ein Melanozyten-spezifisches Enzym. In gesunden Melanozyten katalysiert TRP2 die Umwandlung von Dopachrom in 5,6-Dihydroxyindol-2-carbonsäure (DHICA) in der Melaninsynthese. Die Expression von TRP2 ist in diesen Zellen streng reguliert und trägt zur Aufrechterhaltung der Hautpigmentierung bei. In Melanomen findet eine abnorme Expression und Aktivität von TRP2 statt (Spritz and Hearing, 2013). Ein Nonamer aus der Proteinstruktur von TRP2 konnte als Epitop für Melanom- spezifische CTLs bei HLA-A\*02 positiven Patienten identifiziert werden (Wang et al., 1996). In Zellkulturen und Mausmodellen konnte durch sich replizierende virale Vektor- basierte Vakzine, die für TRP2 codieren,

eine tumorspezifische T- Zell- Reaktivität induziert werden (Purde et al., 2024). Der DNA- Impfstoff SCIB1 (siehe 1.2.2.1) wird aktuell in einer Phase II Studie bei Patienten mit inoperablem Melanom in Stadium III/IV untersucht (NCT04079166).

### **1.2.3 Wechselbeziehung von Tumor und Immunsystem**

Tumor und Immunsystem stehen in einer komplexen Wechselbeziehung zueinander. Absterbende Tumorzellen setzen TAAs und TSAs frei, die von Antigen- präsentierenden Zellen (APCs) aufgenommen werden. Über die Lymphabflusswege gelangen die APCs in die Lymphknoten, wo sie die Antigene präsentieren und T- Zellen primen und aktivieren (Chen and Mellman, 2013). Aktivierte T- Zellen exprimieren den Oberflächenmarker CD40L, der an CD40 auf den APCs bindet und costimulatorisch auf die Antigen- Präsentation und T- Zellaktivierung wirkt (Elgueta et al., 2009). Die aktivierten T- Zellen wandern ins Tumorgewebe. Dort erkennen sie über den T- Zell- Rezeptor (TZR) auf MHC I präsentierte Antigene und zerstören als Tumor- infiltrierende Lymphozyten (TILs) maligne Zellen durch die Ausschüttung von intrazellulären Granula, Tumornekrose Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und Interferon  $\gamma$  (INF $\gamma$ ). Zu den TILs zählen auch CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, B-Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen), die ebenfalls direkt oder indirekt an der Zerstörung von Tumorzellen mitwirken und wiederum weitere Tumorantigene freisetzen. Jede Phase kann durch stimulatorische und inhibitorische Faktoren beeinflusst werden (Chen and Mellman, 2013). In einer aktualisierten Version dieses Krebs- Immunitäts- Zyklus wird auch die Bedeutung des Tumormikromilieus betont. Dieses umfasst nicht nur die TILs, sondern auch Zellen der angeborenen Immunantwort, APCs und umliegendes Stroma- Gewebe. Das Tumormikromilieu ist nicht nur entscheidend bei der Aufrechterhaltung einer antitumoralen T- Zellaktivität, sondern auch im Rahmen von Immuntoleranzmechanismen und T- Zellerschöpfung. Insbesondere bei sehr hoher Antigenexpression auf dem Tumor scheinen diese Mechanismen zu greifen (Mellman et al., 2023)

### **1.3 Zusammenfassung und Studienziel**

Wichtigster Risikofaktor für das Melanom ist die UV- Exposition, die zu kumulativen DNA- Schäden führt. Entsprechend hoch ist die Mutationslast beim Melanom. Eine hohe Mutationslast ist einhergehend mit vielen in Struktur und Expressionsmuster veränderten Antigenen. Das Immunsystem ist in der Lage diese zu erkennen, sodass sich das Melanom durch seine ausgeprägte Immunogenität auszeichnet. Der Erfolg verschiedener Immuntherapien unterstreicht diese Eigenschaft.

Der WLK ist der erste Lymphknoten im Lymphabflussgebiet des Tumors. Entsprechend tragend ist seine Rolle bei der Tumorimmunantwort. Die LDI ist eine immunzytologische Methode, um Melanommetastasen im WLK zu detektieren, und an der Universitätsklinik Tübingen fest in die diagnostischen Abläufe etabliert. Im Rahmen der LDI verbleibt Suspension mit vitalen Zellen. Dies eröffnet neue Möglichkeiten, das immunozelluläre Milieu in den WLK von Melanompatienten in großer Zahl zu untersuchen. Eine Kryokonservierung ermöglicht eine gesteigerte Praktikabilität bei der Arbeit mit den Zellsuspensionen.

Versuchsteil I:

Ziel war es zunächst, den Einfluss des Zeitpunkts der Aufarbeitung auf die Vitalität der Zellen in den Zellsuspensionen zu untersuchen. Da die WLK gesammelt am Nachmittag aus dem OP- Saal abgeholt werden, erfolgt die Aufarbeitung normalerweise am Folgetag. Für diese Arbeit wurde eine Gruppe WLK direkt am Tag der Exzision aufgearbeitet, eine andere am Folgetag. Im zweiten Schritt wurde der Einfluss der Kryokonservierung auf die Vitalität der Zellen untersucht. Hierfür wurde die Vitalität in den WLK vor und nach der Kryokonservierung verglichen. Der erste Versuchsteil erfolgte mit einer kleinen Probenzahl und diente dazu, orientierend zu evaluieren, ob eine Kryokonservierung der WLK generell sinnvoll ist.

## Versuchsteil II:

MDAs waren die ersten Tumorantigene, die als Zielstruktur einer antitumoralen Immunantwort identifiziert werden konnten. Fast alle Melanome exprimieren zumindest eines der vier MDAs gp100, Melan-A, Tyrosinase oder TRP2. Sie sind potentielle Kandidaten für eine Off- the Shelf Immuntherapie, da sie im Gegensatz zu Neoantigenen nicht patientenindividuell sind. Zugleich sind Immuntoleranzmechanismen bei MDAs oft besonders ausgeprägt, da sie auch auf gesunden Melanozyten exprimiert werden. Entsprechend ist es wichtig, die Mechanismen des Tumor- Immunitätszyklus und die Rolle der WLK als erster Lymphknoten im Lymphabflussgebiet des Tumors zu verstehen. Im zweiten Versuchsteil wurden die WLK von Melanom- Patienten auf T- Zell- Reaktivität gegen MDAs untersucht.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Probenmaterial**

#### **2.1.1 Ethikstatement**

Die Verwendung der Patientenproben zu Forschungszwecken wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki (1975, revidiert in 2013) durch die Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät Tübingen und am Universitätsklinikum Tübingen unter der Antragsnummer 118/2021 BO2 genehmigt. Eine schriftliche Einwilligung aller eingeschlossenen Patienten liegt vor.

#### **2.1.2 Herkunft der Proben**

Als Probenmaterial wurden WLK von Patienten mit malignem Melanom verwendet. Alle WLK wurden im Rahmen der WLK- Biopsie am Universitätsklinikum Tübingen exzidiert. Die WLK- Biopsie erfolgte standardmäßig ab einer Tumordicke von  $\geq 1$  mm oder bei einer Tumordicke von 0,75- 1 mm und dem gleichzeitigen Vorliegen weiterer Risikofaktoren (siehe 1.1.4.4.1). Der Ausschluss von Makrometastasen war zuvor im Rahmen der initialen Ausbreitungsdiagnostik erfolgt (siehe 1.1.4.3). Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Operation volljährig und über den Eingriff und die Verwendung des Materials zu Forschungszwecken aufgeklärt.

Die Aufarbeitung erfolgte zweigleisig. Eine Hälfte des WLK wurde in Formaldehyd eingelegt an das Institut für Pathologie der Universität Tübingen gesandt. Dort wurde der halbierte WLK histopathologisch und immunhistochemisch angefärbt und mikroskopisch auf metastasierte Tumorzellen untersucht.

Unabhängig davon wurde die andere Hälfte unfixiert im Labor der Hautklinik Tübingen aufgearbeitet. Im Rahmen der LDI wurde der WLK mechanisch zu einer Zellsuspension disaggregiert, immunzytologisch angefärbt und auf Tumorzellen untersucht (siehe 2.2). Nach der Routinediagnostik verbliebene Zellsuspension, konnte für die folgenden Versuche verwendet werden.

## 2.2 Gemeinsame Methodik für beide Versuchsteile

### 2.2.1 Materialien und Reagenzien

| Produkt                             | Hersteller               | Katalognummer |
|-------------------------------------|--------------------------|---------------|
| Medimaschine                        | DAKO                     |               |
| Countess Cell Counter               | Thermo Fisher Scientific | C10227        |
| Verstellbare Pipetten (10, 1000 µl) | Gilson                   |               |
| Pipettierhilfe                      | Brand                    | Z637637       |
| Zentrifuge                          | Thermo Fisher Scientific | 12004376      |
| Pipettierhilfe                      | Brand                    | Z637637       |
| Kühlschrank (4°C)                   | Liebherr                 |               |
| Tiefkühlschrank (-80°C)             | sanyo                    | MDF-U5386S    |
| Tiefkühlschrank (-150°C)            | PHC                      | MDF-1156      |

*Tabelle 1: Liste der für die LDI und Kryokonservierung der Lymphknoten verwendeten Geräte*

| Produkt                        | Hersteller               | Katalognummer |
|--------------------------------|--------------------------|---------------|
| Schneidebrett                  |                          |               |
| Messer                         |                          |               |
| Pinzette                       |                          |               |
| Lineal                         |                          |               |
| Medicon                        | BD                       | 340592        |
| 50 ml Röhrchen                 | greiner Bio- One         | 210261        |
| Zellsieb                       | greiner Bio- One         | 542000        |
| 15 ml Röhrchen                 | Thermo Fisher Scientific | 11507411      |
| Countess Cell Counting Chamber |                          |               |
| Slides                         | Thermo Fisher Scientific | C10228        |
| Objektträger                   | Langenbrinck             | 03-0085/E     |
| Pipettenspitzen (10, 1000µl)   | Eppendorf                |               |
| Cryo.s storage vials           | greiner Bio- One         | 122263        |
| CoolCell Container             | Biozym                   | 210000        |
| CryoLabels                     | scienova                 | 80060         |

*Tabelle 2: Liste der für die LDI und Kryokonservierung der Lymphknoten verwendeten Verbrauchsmaterialien*

| Produkt                          | Hersteller               | Katalognummer |
|----------------------------------|--------------------------|---------------|
| RPMI 1640 Medium ohne Phenolrot  | Biochrom                 | F1275         |
| L- Glutamin                      | Biochrom                 | K0283         |
| Hepes (1M)                       | Biochrom                 | L1613         |
| Penicillin/Streptomycin          | Biochrom                 | A2213         |
| Fetales Kälberserum (FCS)        | Biochrom                 | S0115         |
| Percoll Plus                     | GE Healthcare            | GE17-5445-01  |
| HBSS 10x mit Phenolrot           | Thermo Fisher Scientific | 14180-046     |
| NaCl 0,9 %                       | Universitätsapotheke     |               |
| Hanks Salt Solution              | Biochrom                 | L2045         |
| Phosphat Bufferend Albumin (PBS) | Biochrom                 | L1825         |
| Trypan Blau (0,4%)               | Thermo Fisher Scientific | T10282        |
| DPBS                             | Sigma- Aldrich           | D8537         |
| CryoStor                         | STEMCELL                 | 7930          |

*Tabelle 3: Liste der für die LDI und Kryokonservierung der Lymphknoten verwendeten Reagenzien und Chemikalien*

## **2.2.2 Aufarbeitung der Wächterlymphknoten**

### 2.2.2.1 Reagenzvorbereitung

#### RPMI Medium

Zu RPMI Medium ohne Phenolrot wurden 5ml L- Glutamin, 50 ml FCS, 5ml Penicillin/Streptomycin und 5 ml Hepes hinzugegeben. Je 10 ml des Mediums wurden in sterile Falcon Röhrchen gefüllt, die der Zwischenlagerung der Lymphknoten nach der operativen Dissektion dienen.

#### Percoll

Zur Herstellung der Stammlösung wurden 100ml Percoll Plus mit 9 ml HBSS 10X mit Phenolrot angesetzt, anschließend wurde der PH- Wert mittels HCl auf 7,4 eingestellt. Um die Gebrauchslösung herzustellen, wurde je 30 ml der Stammlösung mit 20 ml NaCl (0,9 %) versetzt. Pro 15 ml Tube wurden 3 ml Gebrauchslösung für die Zellseparation verwendet.

### 2.2.2.2 Probenvorbereitung

Postoperativ wurden die exziierten WLK in RPMI eingelegt und im Kühlschrank gelagert. Die Abholung aus dem OP zur Aufarbeitung erfolgte in der Regel am Folgetag. Um den Einfluss der Zwischenlagerungszeit zu untersuchen, wurde ein

Teil der WLK jedoch bereits am Tag der OP abgeholt und direkt aufgearbeitet (siehe 3.2.2).

Im Rahmen der Aufarbeitung wurden die Lymphknoten zunächst freipräpariert, vermessen und entlang ihrer Longitudinalachse halbiert. Eine Hälfte wurde in 3,5% Formaldehyd dem Institut für Pathologie zugesandt, die andere Hälfte wurde im Labor der Hautklinik aufgearbeitet.

#### 2.2.2.3 Durchführung

Der halbierte Lymphknoten wurde mechanisch mit dem Messer in ca. 1 mm große Stücke zerkleinert. Die Stückchen wurden mit 1 ml RPMI Medium in Medicons gefüllt und in der Medimaschine disaggregiert. Die entstandene Zellsuspension wurde durch ein Zellsieb in 50 ml Falcon Röhrchen gegossen und mit Hanks Lösung aufgefüllt. Die Röhrchen wurden zentrifugiert (5 Minuten, 300 x g), der Überstand auf 7,5 ml abpipettiert, resuspendiert und vorsichtig auf Percoll Lösung aufgeschichtet. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 800 x g für 15 Minuten ohne Bremsen. Die entstandene Grenzschicht wurde zusammen mit der darüber liegenden Flüssigkeit durch ein Zellsieb in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt. Das Zellsieb wurde mit PBS ausgewaschen und das Röhrchen auf 50 ml aufgefüllt. Nach einer weiteren Zentrifugation (300 x g, 5 Minuten) wurde der Überstand auf 1 ml abgesaugt. Das Zellpellet wurde resuspendiert und 10 µl der Zellsuspension wurden in 10 µl Trypanblau (0,4%) angefärbt. Nach einer automatisierten Zellzählung wurde die Zellsuspension mit PBS verdünnt, sodass pro Milliliter Flüssigkeit je eine Millionen Zellen enthalten waren. Auf die Kammern der mit LDI Nummer und Datum versehenen Objektträger wurden je 500 µl der Zellsuspension aufgetragen. Pro WLK wurden maximal acht Objektträger verwendet, sodass übriggebliebene Zellsuspension mit Einverständnis des Patienten kryokonserviert oder direkt für die Versuche verwendet werden konnten.

#### **2.2.3 Kryokonservierung der Zellsuspension**

Für die Kryokonservierung wurde die verbliebene Zellsuspension auf 50 ml mit PBS aufgefüllt und zentrifugiert (10 Minuten, 300 x g). Das Zellpellet wurde anschließend in CryoStor Medium gelöst, sodass pro ml Medium  $10 \times 10^6$  Zellen

vorlagen. Nach 10 Minuten im Kühlschrank wurden die Röhrchen in einem CoolCell Container in einen -80°C Gefrierschrank überführt. Durch den CoolCell Container wurde ein schonendes Einfrieren mit einer Rate von etwa 1°C/min ermöglicht. Für die langfristige Kryokonservierung wurden die Röhrchen alle zwei Wochen in eine -150°C Tiefkühltruhe transferiert.

## 2.3 Versuchsteil I: Einfluss des Aufarbeitungszeitpunkts und der Kryokonservierung auf das immunzelluläre Milieu im Wächterlymphknoten

### 2.3.1 Material und Reagenzien

| Produkt                                | Hersteller               | Katalognummer |
|----------------------------------------|--------------------------|---------------|
| Zentrifuge                             | Thermo Fisher Scientific | 12004376      |
| Pipetten (10µl, 100µl, 200µl, 1000 µl) | Gilson                   |               |
| FACS Gerät                             | Becton Dickinson         |               |

*Tabelle 4: Liste der für Versuchsteil I verwendeten Geräte*

| Produkt                 | Hersteller       | Katalognummer |
|-------------------------|------------------|---------------|
| sterile Pipettenspitzen |                  |               |
| 96-Well-Platten         | greiner Bio- One | M2186         |
| Probenröhre             | SARSTEDT         | 551.579       |

*Tabelle 5: Liste der für Versuchsteil I verwendeten Verbrauchsmaterialien*

| Produkt            | Hersteller     | Katalognummer |
|--------------------|----------------|---------------|
| DPBS               | Sigma- Aldrich | D8537         |
| Albumin Fraktion V | ROTH           | 8076.4        |

*Tabelle 6: Liste der für Versuchsteil I verwendeten Chemikalien*

| Produkt                                | Hersteller | Katalognummer |
|----------------------------------------|------------|---------------|
| Brilliant Violet 421™ anti-human CD11c | BioLegend  | 337225        |
| Brilliant Violet 510™ anti-human CD3   | BioLegend  | 317331        |
| FITC anti-human CD4                    | BioLegend  | 300505        |
| PE anti-human CD56 (NCAM)              | BioLegend  | 304605        |
| PE/Cyanine7 anti-human CD8             | BioLegend  | 344711        |
| PerCP/Cyanine5.5 anti-human CD19       | BioLegend  | 302229        |
| Zombie NIR™ Fixable Viability Kit      | BioLegend  | 423105        |

*Tabelle 7: Liste der für Versuchsteil I verwendeten FACS- Antikörper*

| Produkt   | Hersteller       |
|-----------|------------------|
| FACS Diva | Becton Dickinson |
| FlowJo    | Becton Dickinson |
| SPSS      | IBM              |

*Tabelle 8: Liste der für Versuchsteil I verwendeten Software*

## 2.3.2 Vorgehen

### 2.3.2.1 Reagenzvorbereitung

#### FACS Puffer

Der FACS Puffer wurde in 50 ml Falcon Röhrchen angesetzt. Hierfür wurden 0,25 g BSA in 50 ml PBS gelöst.

### 2.3.2.2 Probenvorbereitung

Zielsetzung dieses Versuchsteils war es, die Vitalität der Zellen im WLK und die immunzelluläre Zusammensetzung im WLK unter verschiedenen Aufarbeitungsbedingungen zu vergleichen.

Alle WLK wurden entsprechend 2.2.2 entweder am Tag der OP oder am Folgetag aufgearbeitet. Für die Immunzytologie werden bis zu 8 Millionen Zellen verwendet. Nur wenn Zellsuspension übrigblieb, konnte diese für den Versuchsteil verwendet werden. Der Schwellenwert wurde auf eine Millionen Zellen gesetzt, um bei der FACS Analyse eine ausreichend hohe Zellzahl zu erreichen.

Für die Untersuchung des Einflusses der Kryokonservierung wurde ab einem Schwellenwert von 10 Millionen Zellen eingefroren, insgesamt mussten also min. 19 Millionen Zellen in der aufgearbeiteten Lymphknotenhälfte enthalten

sein. Der Einfluss der Kryokonservierung wurde nur bei der Aufarbeitung am selben Tag untersucht, um die Ergebnisse vergleichbar zu machen.

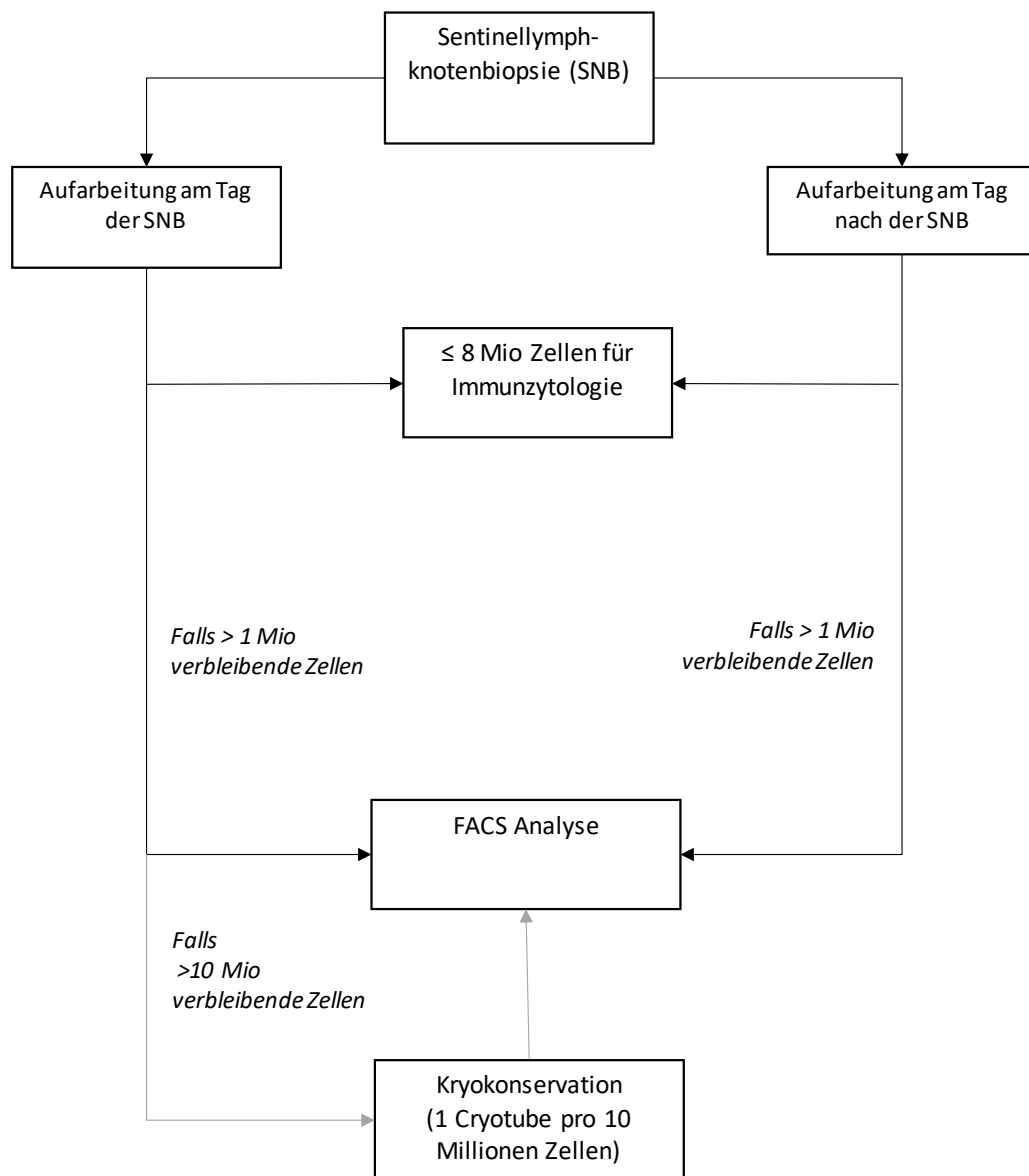


Abbildung 1: Workflow für Versuchsteil I

### 2.3.2.3 Durchführung

Die kryokonservierte Zellsuspension wurde zunächst in einem warmen Wasserbad aufgetaut. Der Inhalt der Cryo- Rörchen wurde in ein 50ml Falcon Rörchen transferiert, mit RPMI auf 20 ml aufgefüllt und zentrifugiert (490 x g, 5 Minuten, mit Bremsen). Nach Abschütten des Überstands wurde das Zellpellet in

1ml DPBS gelöst und der Zellgehalt der Suspension bestimmt. Nach einem weiteren Waschschrift wurde das verbliebene Zellpellet in FACS Puffer gelöst, sodass pro 100 µl eine Millionen Zellen enthalten war.

Frische Zellsuspension wurde direkt gewaschen und auf eine Millionen Zellen pro 100 µl gelöst.

Die für die FACS Analyse verwendeten Antikörper und Farbstoffe sind zusammen mit Hersteller und Katalognummer unter 2.3.1 gelistet. Die Antikörper wurden in einem Verhältnis von 1:20 im FACS Puffer verdünnt. Der Zombie-Farbstoff wurde in einem Verhältnis von 1:1000 verdünnt. Um Fehlmessungen aufgrund der Überschneidung der Emissionsspektren der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern, wurde eine Kompensation durchgeführt. Für die Kompensationen wurden die Zellen jeweils nur mit einem Fluoreszenzgekoppelten Antikörper markiert. Als Positivkontrolle für die Zombie Färbung wurden Zellen mittels fünfminütiger Inkubation in Ethanol abgetötet. Aus den Messdaten der Kompensationsproben wurde eine Kompensationsmatrix errechnet, um durch überlappende Emissionsspektren falsch positive Signale zu minimieren.

Für die eigentliche Probenfärbung wurden jeweils mindestens eine Millionen Zellen verwendet. Die Messung erfolgte an einem BD LSR II Gerät mithilfe der BD FACSDiva Software. Die Daten wurden mit der FlowJo Software Version 10 ausgewertet.

## 2.4 Versuchsteil II: In- vitro T- Zellstimulation mit Melanozyten-Differenzierungsantigenen

### 2.4.1 Material und Reagenzien

| Produkt                          | Hersteller               | Katalognummer |
|----------------------------------|--------------------------|---------------|
| Zentrifuge                       | Thermo Fisher Scientific | 12004376      |
| Pipetten (10µl, 100 µl, 1000 µl) | Gilson                   |               |
| Pipettierhilfe                   | INTEGRA Biosciences      | 155021        |
| Neubauer Zählkammer              | Hecht Assistent          | 40442002      |
| Mikroskop                        | Zeiss                    |               |
| CO2- Inkubator                   | Binder                   |               |
| FACS Gerät                       | Becton Dickinson         |               |

Tabelle 9: Liste der für Versuchsteil II verwendeten Geräte

| Produkt                 | Hersteller               | Katalognummer |
|-------------------------|--------------------------|---------------|
| sterile Pipettenspitzen | Eppendorf                |               |
| 50 ml Röhrchen          | greiner Bio- One         | 210261        |
| 24-well Platte          | corning                  | 3527          |
| 15 ml Röhrchen          | Thermo Fisher Scientific | 11507411      |
| Probenröhre             | SARSTEDT                 | 551.579       |

Tabelle 10: Liste der für Versuchsteil II verwendeten Verbrauchsmaterialien

| Produkt                              | Hersteller     | Katalognummer |
|--------------------------------------|----------------|---------------|
| RPMI 1640                            | Sigma- Aldrich | R8758         |
| Penicillin/ Streptomycin             |                |               |
| Nicht essentielle Aminosäuren-Lösung | Sigma- Aldrich | M7145         |
| Na- Pyruvat                          | Lonza          | BE-13-115E    |
| 2β- Mercaptoethanol                  | Gibco          | 31350-010     |
| Humanes Serum                        | bioWest        | S419H-100     |
| IL-2 (Proleukin)                     | Novartis       |               |
| Trypan Blue Stain (0,4%)             | gibco          | 15250061      |
| DPBS                                 | Sigma- Aldrich | D8537         |
| EDTA                                 |                |               |
| Saponin                              |                |               |
| Natriumazid                          |                |               |
| Fixier- und Permeabilisierungslösung | BioLegend      | 750000133     |

*Tabelle 11: Liste der für Versuchsteil II verwendeten Chemikalien und Reagenzien*

| Produkt                                   | Verdünnung | Hersteller | Katalognummer |
|-------------------------------------------|------------|------------|---------------|
| APC anti-human TNF- $\alpha$              | 1:100      | BioLegend  | 502913        |
| APC/Cyanine7 anti-human CD3               | 1:100      | BioLegend  | 317341        |
| Brilliant Violet 421™ anti-human CD45RA   | 1:400      | BioLegend  | 304129        |
| FITC anti-human CD154                     | 1:100      | BioLegend  | 310804        |
| PE/Cyanine7 anti-human CD4                | 1:100      | BioLegend  | 317413        |
| PerCP anti-human CD8                      | 1:100      | BioLegend  | 344707        |
| Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit        | 1:1000     | BioLegend  | 423101        |
| INF $\gamma$ Monoclonal Antibody (B27) PE | 1:100      | Invitrogen | MHCIFG04      |

*Tabelle 12: Liste der für Versuchsteil II verwendeten FACS- Antikörper und Farbstoffe*

| Produkt                                         | Hersteller               | Katalognummer |
|-------------------------------------------------|--------------------------|---------------|
| CEF Pool (extended)                             | JPT Peptide Technologies | PM-CEF-E-4    |
| PepMix Human (Melan-A/MART-1)                   | JPT Peptide Technologies | PM-MelA       |
| PepMix Human (Melanocyte protein Pmel 17 gp100) | JPT Peptide Technologies | PM-GP100      |
| PepMix Human (Tyrosinase)                       | JPT Peptide Technologies | PM-Tyr        |
| PepMix Human (Tyrosinase-related protein 2)     | JPT Peptide Technologies | PM-TRP-2      |

*Tabelle 13: Liste der für Versuchsteil II verwendeten Peptidpools*

## 2.4.2 Vorbereitung

### Auswahl des Probenmaterials

Der Nodalstatus der WLK war zu Beginn von Versuchsteil II bekannt. Gezielt wurde eine 1:1 Verteilung von positiven und negativen Nodalstatus angestrebt.

### Ansatz IVS Medium

In eine unbenutzte Flasche mit RPMI Medium wurden 5ml Penicillin/Streptomycin, 5ml nicht essentielle Aminosäuren- Lösung, 5ml Na- Pyruvat, 500 $\mu$ l 2 $\beta$ - Mercaptoethanol und 40ml humanes Serum pipettiert. 50ml der entstandenen Lösung wurden in ein Falcon Röhrchen überführt und 15 $\mu$ l

Interleukin-2 (IL-2) hinzugegeben, sodass ein Ansatz ohne Interleukin in der RPMI Flasche und ein Ansatz mit Interleukin im Falcon Röhrchen vorlag.

#### FACS Puffer

Zu PBS wurden 0,1% Natriumazid und 2mM EDTA hinzugegeben.

#### Permeabilisierungspuffer

1ml der Permeabilisierungslösung wurde in 9ml deionisierten Wasser gelöst.

### **2.4.3 Vorgehen**

Für die T- Zell in vitro Stimulation (IVS) wurden kryokonservierte Zellsuspensionen aus aufgearbeiteten WLK verwendet (siehe 2.2). Zunächst wurden diese in einem Wasserbad aufgetaut. Der Inhalt der Cryo- Röhrchen wurde in ein 50ml Falcon Röhrchen transferiert, mit RPMI Medium auf 20 ml aufgefüllt und zentrifugiert (490 x g, 5 Minuten, mit Bremsen). Nach Abschütten des Überstands wurde das Zellpellet in 1ml RPMI Medium gelöst und der Zellgehalt der Suspension bestimmt. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Zellkultur vorbereitet. Hierfür wurden pro Well eine Millionen Zellen verwendet, in 2ml des IVS Mediums ohne IL gelöst und bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Stimulation. Ohne den Grund der Platte und damit die Zellschicht zu berühren, wurde 1 ml des Mediums abpipettiert und verworfen. Die Peptide wurden in einer Konzentration von 2ng/μl hinzugegeben. Als Positivkontrolle diente ein CEF- Peptidpool, für die Negativkontrolle wurde auf die Peptidzugabe verzichtet. Um eine unspezifische Reaktion der T- Zellen auszuschließen, wurde eine Kontrollgruppe mit Actin stimuliert. Nachdem 1ml des IVS Mediums ohne IL-2 in die Wells pipettiert worden war, wurden die Zellen wieder bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> inkubiert. Alle zwei Tage erfolgte ein Wechsel des Mediums. Hierfür wurde 1ml des Mediums nahe der Wasseroberfläche abpipettiert und durch 1ml des frischen Mediums mit IL-2 ausgetauscht.

Bevor die Zellen zehn Tage nach Beginn des Versuchs für die FACS Analyse angefärbt wurden, erfolgte eine Restimulation mit den Peptiden. Hierfür wurden die Zellen mit einer Pipettenspitze vom Boden der Wellplatte abgelöst und der

Inhalt der einzelnen Wells in 15ml Röhrchen überführt. 5 ml des IVS Mediums wurden hinzugegeben und die Zellsuspension zentrifugiert (490 x g, 5 Minuten). Nach Abschütten des Überstands wurde das Pellet in 5ml des IVS Mediums gelöst und bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 20 Minuten wurde zentrifugiert (490 x g, 5 Minuten). Das Pellet wurde in einer entsprechenden Menge Medium gelöst, in eine 96 Well Platte transferiert und erneut zentrifugiert (490 x g, 5 Minuten). Der Überstand wurde abgeschüttet und 160 µl des IVS Mediums hinzugegeben. Die Restimulation erfolgte mit den Peptiden in einer Konzentration von 2ng/µl. Brefeldin A in einer Konzentration von 5mg/ml wurde in einem separaten Behältnis im Verhältnis 1:100 in IVS Medium verdünnt und je 40µl der Lösung in die Wells pipettiert. Es folgte eine Inkubation für vier bis sechs Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

Die Vitalitätsfärbung erfolgte nach einem Waschschrift durch Zugabe von Zombie Farbstoff im Verhältnis 1:1000 verdünnt in DPBS. Die Zellen wurden für 30 Minuten inkubiert und anschließend mit 150 µl FACS Puffer gewaschen. Die Antikörper für die Markierung von Oberflächenantigenen wurden im Verhältnis 1:100 (CD3, CD4, CD 8, CD40L) bzw. 1:400 (CD45RA) in FACS Puffer verdünnt. Auf eine weitere Inkubation für 30 Minuten und einen Waschschrift mit 150µl FACS Puffer folgte die intrazelluläre Färbung. Die Zellen wurden mit 100µl Fix/Perm Puffer für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100µl Permeabilisierungspuffer hinzupipettiert und zentrifugiert (491 x g, 5 Minuten). Es folgte eine Waschschrift mit 150 µl Permeabilisierungspuffer. Die Antikörper für die intrazelluläre Markierung wurden 1:100 im Permeabilisierungspuffer verdünnt. Nach einer Stunde Inkubation und der Zugabe von 150µl Permeabilisierungslösung folgten zwei Waschschriffe mit DPBS. Anschließend wurde die Zellsuspension für die durchflusszytometrische Untersuchung in die Probenröhren überführt.

## **2.5 Durchflusszytometrie**

### **2.5.1 Prinzip der Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die quantitative Analyse verschiedener Zellpopulationen und -subtypen. Die Zellen werden einzeln in einer mobilen

Phase durch eine dünne Messkammer geleitet und mit einem Laser mit definierter Wellenlänge bestrahlt. Aufgrund der physikalischen und chemischen Eigenschaften der Zellen wird das Licht gestreut. Zusätzlich können Proteine auf und in den Zellen mit Antikörper- gekoppelten fluoreszierenden Farbstoffen markiert werden. Detektoren erfassen die gestreuten Lichtstrahlen und Floreszenzen. Die gesammelten Daten werden dann in Form von Punktdiagrammen oder Histogrammen dargestellt, die eine detaillierte Analyse der Zellpopulationen ermöglichen.

## **2.5.2 Gating**

### **2.5.2.1 Versuchsteil I: Einfluss des Aufarbeitungszeitpunkts und der Kryokonservierung auf das immunzelluläre Milieu im Wächterlymphknoten**

Nach der Färbung (siehe 2.3.2) erfolgte die Messung an einem BD LSR II Gerät mithilfe der BD FACSDiva Software. Aus den Messdaten der Kompensationsproben wurde eine Kompensationsmatrix errechnet, um durch überlappende Emissionsspektren falsch positive Signale zu minimieren. Vor jeder Messung wurden die Proben gevortext. Die Daten wurden mit der FlowJo Software Version 10 ausgewertet. Das Gating erfolgte entsprechend der Abbildung 2.

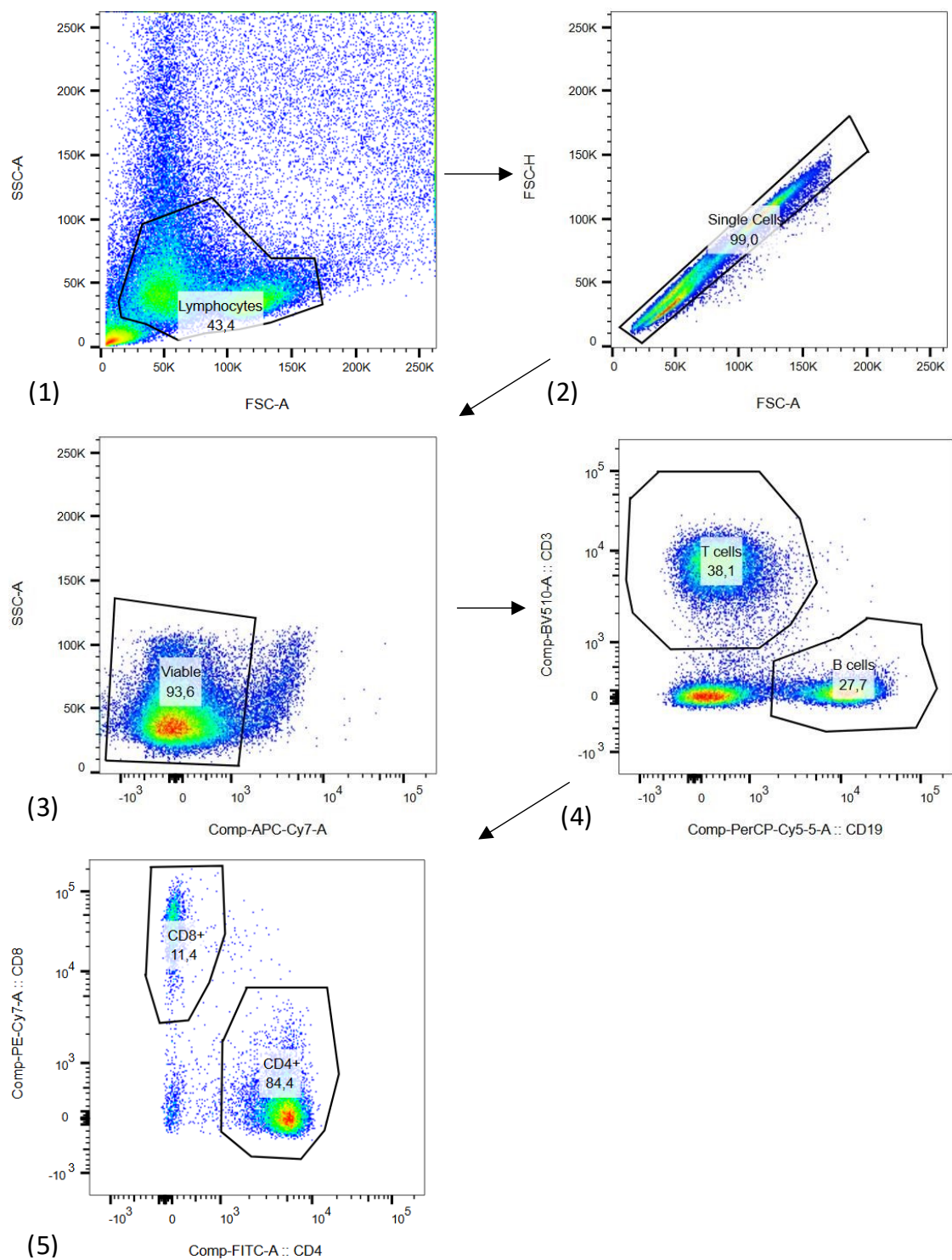


Abbildung 2: Gating- Strategie für Versuchsteil I am Beispiel eines WLK

Entlang der Pfeile (1) Gating der Lymphozyten- Population (2) Ausschluss von Zelldubletten durch graphische Gegenüberstellung von Vorwärtslichtstreuung (FSC) und Seitwärtslichtstreuung (SSC) (3) Ausschluss avitaler Zellen (4) Gating der Lymphozyten- Subpopulation in B- und T- Lymphozyten (5) Unterteilung der T- Zell- Subpopulation in CD4+- und CD8+- Zellen

#### 2.5.2.2 Versuchsteil II: In- vitro T- Zellstimulation mit Melanozyten- Differenzierungsantigenen

Die Messung nach Stimulation und Färbung der Zellen (siehe 2.4.2) erfolgte ebenfalls an einem BD LSR II Gerät mithilfe der BD FACSDiva Software und wurde mit der FlowJo Software Version 10 ausgewertet. Das Gating ist am Beispiel eines WLK nach Stimulation mit dem CEF- Pool in Abbildung 3 dargestellt.

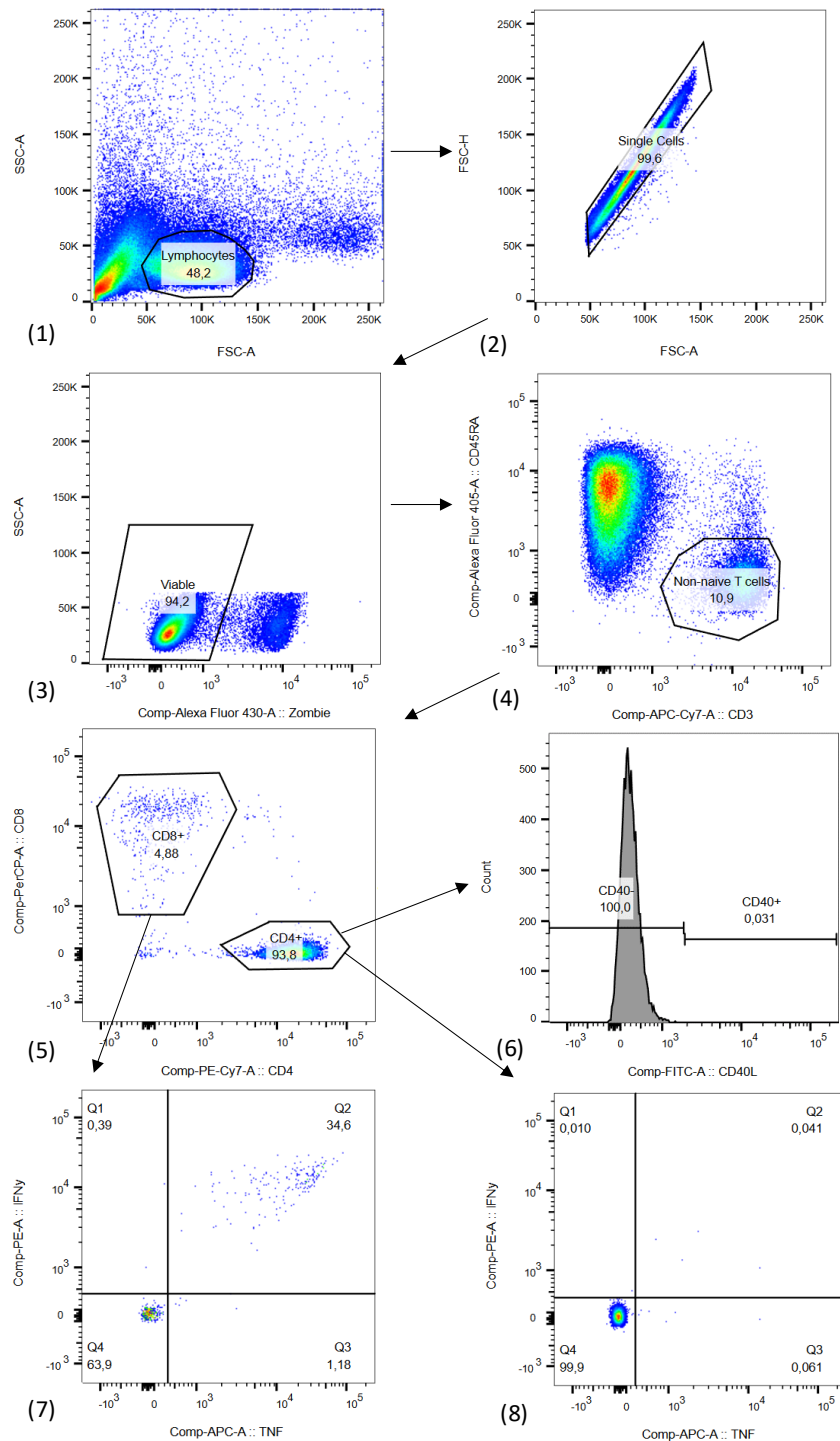


Abbildung 3: Gating- Strategie für Versuchsteil II am Beispiel eines WLK nach Stimulation mit dem CEF-Pool

Entlang der Pfeile (1) Gating der Lymphozyten- Population (2) Ausschluss verklumpter Zellen durch Einzelzell- Gating (3) Die Lebend- Tot- Diskriminierung erfolgte durch den Amin- reaktiven Zombie- Farbstoff (4) Gating aktivierter T- Zellen (5) Unterteilung der aktivierten Zellen in CD4+- und CD8+- Subpopulationen (6) Färbung der CD40L+- Zellen als Marker für Antigen- responsive CD4+- Zellen (7) Intrazelluläre IFN $\gamma$ - und TNF- Expression in der CD4+- T- Zell- Subpopulation (8) Intrazelluläre IFN $\gamma$ - und TNF- Expression in der CD8+- T- Zell- Subpopulation

## **2.6 Statistische Auswertung**

Die statistische Analyse erfolgte mithilfe der Statistiksoftware SPSS Version 29. Zur graphischen Gegenüberstellung der verschiedenen Aufarbeitungszeitpunkte wurden Boxplots verwendet. Punkte außerhalb der Whiskers wurden als Ausreißer dargestellt und sind Datenpunkte, die signifikant von der restlichen Datenverteilung abweichen.

Zur statistischen Auswertung wurden der Mann-Whitney-U-Test, der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, der Pearson-Chi-Quadrat und der Exakte Test nach Fisher genutzt.

Für die graphische Darstellung der Zellzusammensetzung vor und nach Kryokonservierung wurde aufgrund der geringen Fallzahlen Balkendiagramme gewählt. Die Vitalität vor und nach Kryokonservierung wurde in einem Liniendiagramm abgebildet.

Die Ergebnisse der TZS wurden tabellarisch dargestellt. Um die Reaktivität der CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu untersuchen, wurde eine Kreuztabelle verwendet. Hierbei wurden die kategorialen Variablen Lymphknotenstatus positiv/negativ und Reaktivität auf MDAs ja/nein gegenübergestellt. Als reaktiv gewertet wurden alle WLK, in denen in mindestens 1% der Zellen intrazelluläres TNF $\alpha$  und/oder INF $\gamma$  nachgewiesen werden konnten. Zeigte ein WLK im Medium ebenfalls eine T-Zell-Reaktivität, so musste der Prozentsatz der INF $\gamma$ <sup>+</sup>- bzw. TNF $\alpha$ <sup>+</sup>-Zellen in den Peptid-stimulierten Proben mindestens doppelt so hoch wie in der Medium-Kontroll-Probe sein, um als reaktiv gewertet zu werden. Mittels des Chi-Quadrat-Test wurde anschließend untersucht, ob ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den beiden Variablen Lymphknotenstatus und Reaktivität auf MDAs besteht.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Studienkollektiv

#### 3.1.1 Patienten

Die WLK wurden zwischen September 2021 und Mai 2022 in der Hautklinik des Universitätsklinikums Tübingen exzidiert. Insgesamt wurden 41 WLK von 36 Melanom- Patienten für die Versuche verwendet. Für Teil I konnten 24 WLK von 22 Patienten genutzt werden. In Teil II wurden 20 WLK von 17 Patienten stimuliert. 3 WLK hatten eine ausreichend hohe Zellzahl, um sie in beiden Versuchsteilen zu verwenden.

Das Patientenkollektiv setzte sich aus 20 (55,6 %) männlichen und 16 (44,4%) weiblichen Patienten zusammen. Die Altersverteilung der Patienten ist in Abb.4 dargestellt.

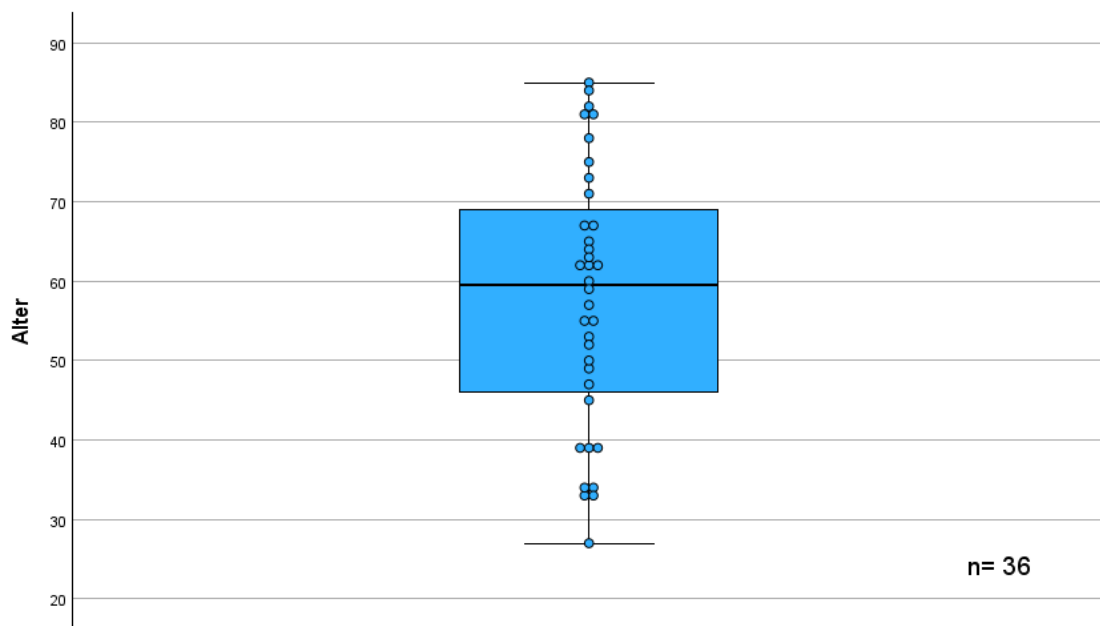


Abbildung 4: Altersverteilung des Patientenkollektivs

Der Median lag bei 59,5 Jahren. Der jüngste Patient war 27 Jahre alt, der älteste Patient war 85 Jahre alt. Das 25%- Quantil lag bei 46 Jahren, das 75%- Quantil bei 70 Jahren.

### 3.1.2 Primärtumor

In Abb.5 ist die Verteilung der Subtypen des Primarius dargestellt. Am häufigsten waren die vier Haupttypen SSM, NM, ALM und LMM, doch auch seltenere Subtypen waren im Patientenkollektiv vertreten. In zwei Fällen lag ein amelanotisches Melanom vor. Bei einem Patienten wurde ein spitzoides Melanom beschrieben.

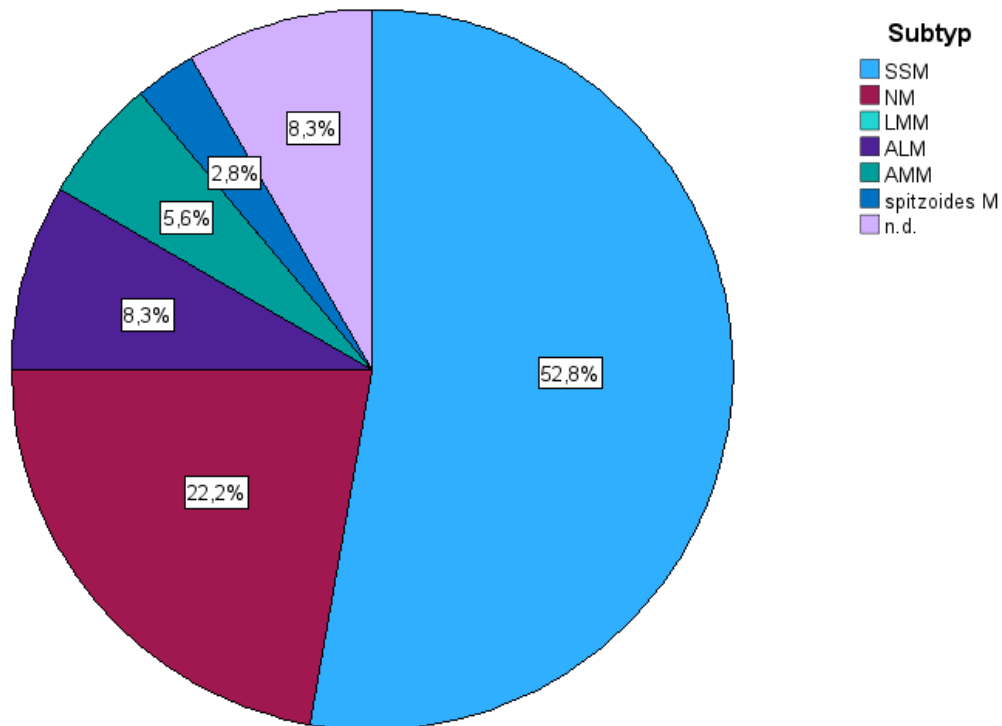


Abbildung 5: Prozentualer Anteil verschiedener Melanom- Subtypen im Patientenkollektiv

Superfiziell spreitendes Melanom (SSM); noduläres Melanom (NM); Lentigo- maligna- Melanom (LM); akrolentiginöses Melanom (ALM); amelanotisches Melanom (AMM); spitzoides Melanom (spitzoides M); Subtyp nicht näher definiert (n.d.)

Die Tumordicke des Primarius variierte zwischen 0,8 mm und 12,0 mm. Im Median betrug sie 1,9 mm (vgl. Abb.6).

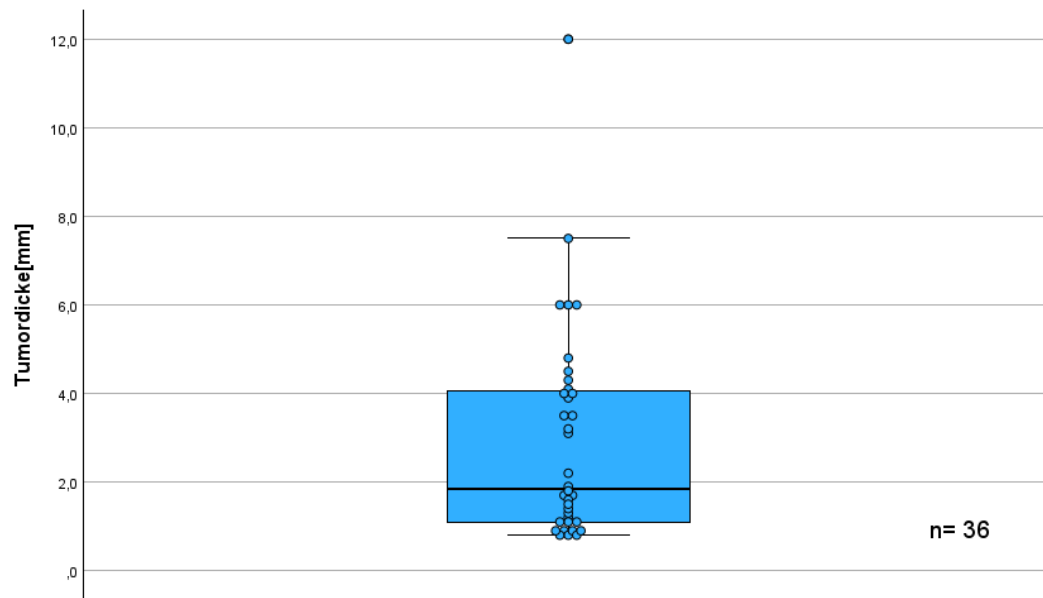


Abbildung 6: Tumordicke des Primarius im Patientenkollektiv dargestellt als Boxplot

Der Median lag bei 1,9 mm. Das Minimum war 0,8 mm, das Maximum 12,0 mm. Bei 25 % der Patienten betrug die Tumordicke 1,1 mm oder weniger. 75 % der Patienten wiesen eine Tumordicke von 4,1 mm oder weniger auf.

Die Verteilung der T- Stadien im Patientenkollektiv ist Tabelle 1 zu entnehmen. Aufgrund der Indikationsstellung zur WLK- Biospie ab einer Tumordicke von  $\geq 1$  mm oder dem zusätzlichen Vorliegen von Risikofaktoren lagen tendenziell höhere T- Stadien vor. Mit steigendem T- Stadium nahm die Häufigkeit von Ulzerationen zu.

|           |   | Ulzerationen |    |                 | Gesamt |
|-----------|---|--------------|----|-----------------|--------|
|           |   | nein         | ja | nicht definiert |        |
| T-Stadium | 1 | 7            | 0  | 0               | 7      |
|           | 2 | 10           | 0  | 2               | 12     |
|           | 3 | 3            | 4  | 1               | 8      |
|           | 4 | 1            | 7  | 1               | 9      |

Tabelle 14: Verteilung von Ulzerationen nach T- Stadium im Patientenkollektiv

Dargestellt sind absolute Häufigkeiten. Ulzerationen traten im Patientenkollektiv ab T- Stadium III auf. In vier Fällen war das Vorliegen von Ulzerationen nicht definiert.

### 3.1.3 Eigenschaften der Wächterlymphknoten

Von den untersuchten WLK waren 31 (75,6%) aus der Axilla und 10 (24,4%) aus der Leiste exzidiert worden.

Die Verteilung des Nodalstatus ist in Abb.7 dargestellt. In Versuchsteil I waren 18 WLK (75,0%) negativ und 6 WLK (25,0%) positiv. Für Versuchsteil II wurde gezielt eine gleiche Verteilung von positiven und negativen Nodalstatus angestrebt (siehe 2.4.2).

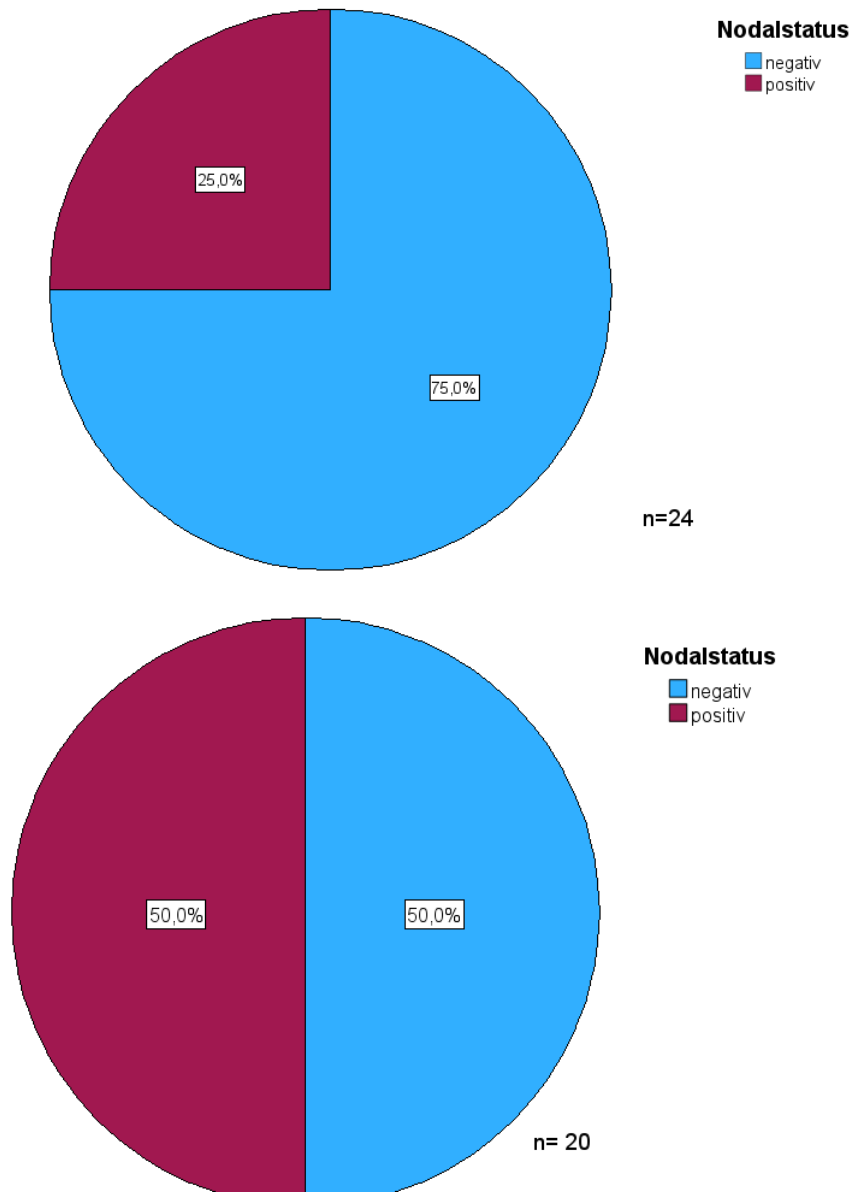


Abbildung 7: Prozentuale Verteilung des Nodalstatus der WLK im Patientenkollektiv (Diagnostik durch kombinierten Einsatz von Histopathologie und LDI)

Oben: Versuchsteil I; Unten: Versuchsteil II

## 3.2 Versuchsteil I: Durchflusszytometrische Untersuchung des immunzellulären Milieus der Wächterlymphknoten

### 3.2.1 Workflow

Für Versuchsteil I wurden insgesamt 48 WLK aufgearbeitet, davon 22 (46%) am Nachmittag des OP Tages und 26 (54%) einen Tag nach der OP. 50 % der erhaltenen Zellsuspensionen konnten aufgrund einer zu geringen Zellzahl nicht weiter für die Versuche verwendet werden. Die verbliebenen 50%, davon 13 vom Tag der OP und 11 vom Folgetag, konnten für die FACS Analyse verwendet werden. Fünf Zellsuspensionen enthielten ausreichend viele Zellen, um einen Teil direkt per FACS zu analysieren und einen weiteren Teil abzufrieren, zu einem späteren Teil aufzutauen und ebenfalls durchflusszytometrisch zu untersuchen.

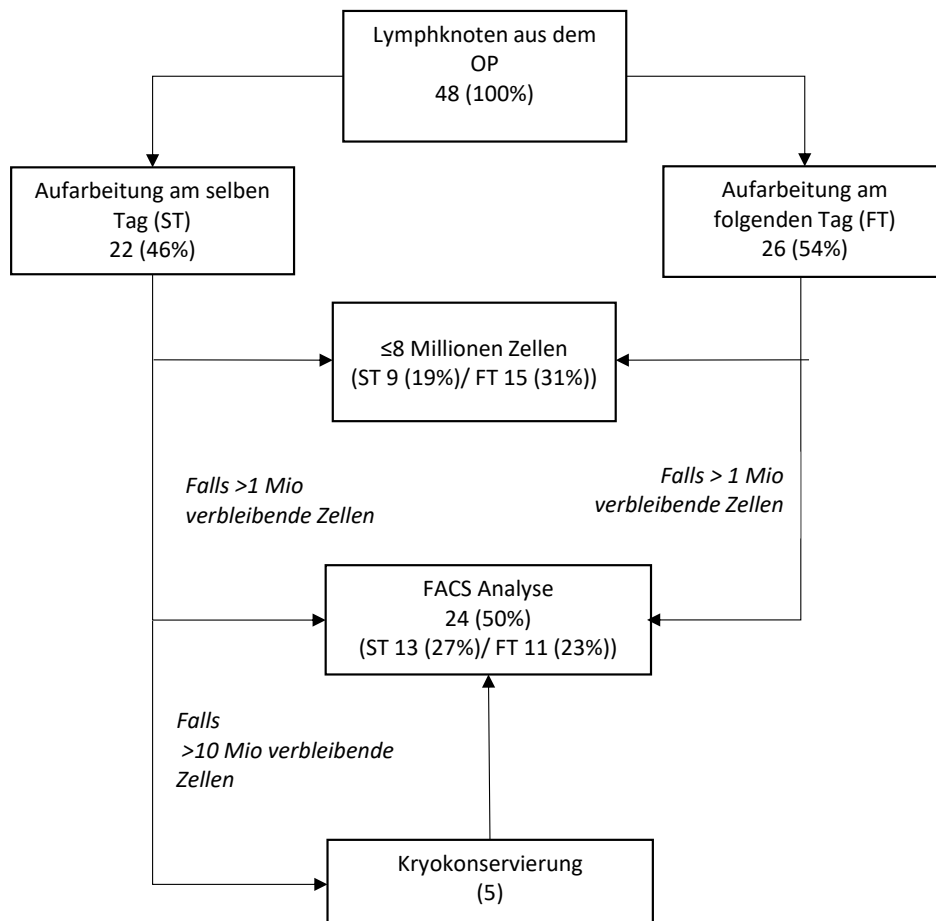


Abbildung 8: Flussdiagramm der Probenselektion für Versuchsteil I

### 3.2.2 Einfluss des Zeitabstands zwischen OP und Aufarbeitung der WLK

#### 3.2.2.1 Anzahl der untersuchten Lymphozyten in den Zellsuspensionen

Die Anzahl der Lymphozyten in den untersuchten Zellsuspensionen ist im folgenden Boxplot dargestellt (Abb.9). Der Gesamtmedian lag bei 137.000 Lymphozyten. Beim Vergleich nach Zeitpunkt der Aufarbeitung war der Median bei Aufarbeitung am Folgetag um rund 30.000 Lymphozyten geringer. Die Spannweite der Lymphozytenzahl war bei Aufarbeitung am Folgetag größer, ebenso der Interquartilsabstand.

Im Mann-Whitney-U-Test zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Lymphozytenzahl zwischen den beiden Gruppen ( $U = 50,0$ ;  $z = -1,246$ ;  $p = 0,228$ ;  $r = -0,254$ ).

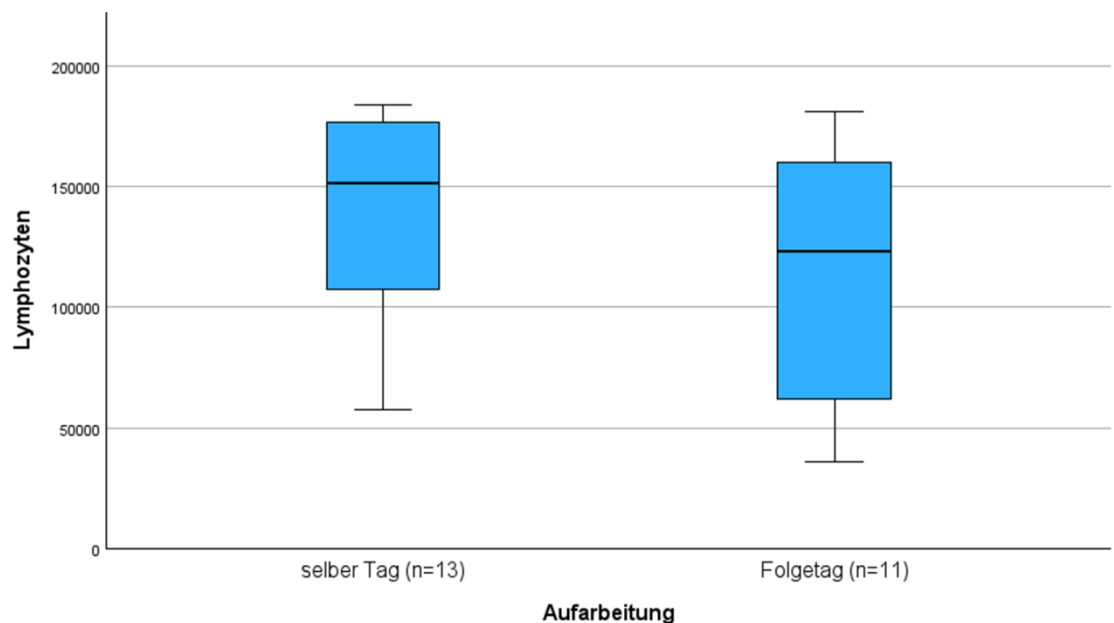


Abbildung 9: Lymphozytenzahl in den Zellsuspensionen nach Aufarbeitung der WLK am OP-Tag vs. am Folgetag in Boxplot-Darstellung

| Lymphozyten  |           |         |         |            |    |
|--------------|-----------|---------|---------|------------|----|
| Aufarbeitung | Median    | Minimum | Maximum | Spannweite | N  |
| selber Tag   | 151480,00 | 57356   | 183563  | 126207     | 13 |
| Folgetag     | 123345,00 | 36212   | 180724  | 144512     | 11 |
| Insgesamt    | 136584,00 | 36212   | 183563  | 147351     | 24 |

Tabelle 15: Lymphozytenzahl in den Zellsuspensionen nach Aufarbeitung der WLK am OP-Tag vs. am Folgetag

### 3.2.2.2 Anteil vitaler Zellen

In Abb.10 ist der Anteil vitaler Zellen an der Gesamtymphozyten- Population in den Zellsuspensionen bei Aufarbeitung am OP- Tag bzw. am Folgetag als Boxplot dargestellt. In beiden Gruppen waren im Median über 98% der Zellen vital, wobei der Median in der Gruppe mit Aufarbeitung am Folgetag sogar etwas höher lag. Im Mann- Whitney- U- Test zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ( $U= 59,0$ ;  $z= -0,724$ ;  $p= 0,494$ ,  $r= -0,148$ ). Durch einen Ausreißer bedingt war die Spannweite in der Gruppe mit Aufarbeitung am OP- Tag deutlich größer als bei Aufarbeitung am Folgetag.

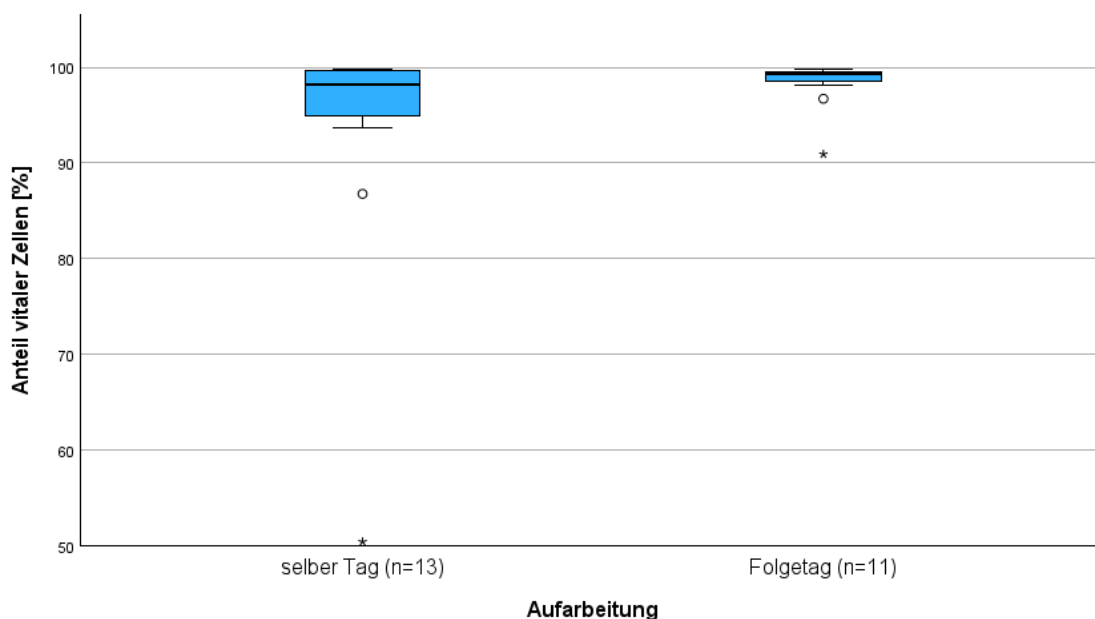


Abbildung 10: Anteil vitaler Zellen an der Lymphozyten- Population nach Aufarbeitung der WLK am OP- Tag vs. am Folgetag in Boxplot- Darstellung

| Anteil vitale Zellen in Prozent |        |         |         |            |    |
|---------------------------------|--------|---------|---------|------------|----|
| Aufarbeitung                    | Median | Minimum | Maximum | Spannweite | N  |
| selber Tag                      | 98,2%  | 50,4%   | 99,8%   | 49,3%      | 13 |
| Folgetag                        | 99,3%  | 90,9%   | 99,8%   | 8,9%       | 11 |
| Insgesamt                       | 99,2%  | 50,4%   | 99,8%   | 49,4%      | 24 |

Tabelle 16: Anteil vitaler Zellen an der Lymphozyten- Population nach Aufarbeitung der WLK am OP- Tag vs. am Folgetag

### 3.2.2.3 Vergleich der zellulären Zusammensetzung der WLK

Abb.11 stellt den Anteil der CD19+- B- und CD3+-T- Lymphozyten an der Gesamt- Lymphozytenzahl in den Zellsuspensionen bei Aufarbeitung am selben Tag bzw. am Folgetag dar. Unabhängig vom Aufarbeitungszeitpunkt waren in

beiden Gruppen mehr CD3+- als CD19+- Lymphozyten enthalten. Beim Vergleich nach Zeitpunkt der Aufarbeitung war der Median für beide Populationen bei Aufarbeitung am Folgetag höher, ebenso vergrößerten sich der Interquartilsabstand und die Spannweite.

Im Mann-Whitney-U-Test ergaben sich für den Anteil der B-Lymphozyten und der T-Lymphozyten keine signifikanten Unterschiede bei Aufarbeitung am OP-Tag bzw. am Folgetag (CD19+ - Lymphozyten:  $U = 42,0$ ;  $z = -1,709$ ;  $p = 0,093$ ;  $r = -0,349$ ; CD3+ - Lymphozyten:  $U = 41,0$ ;  $z = -1,767$ ;  $p = 0,082$ ;  $r = -0,361$ ).

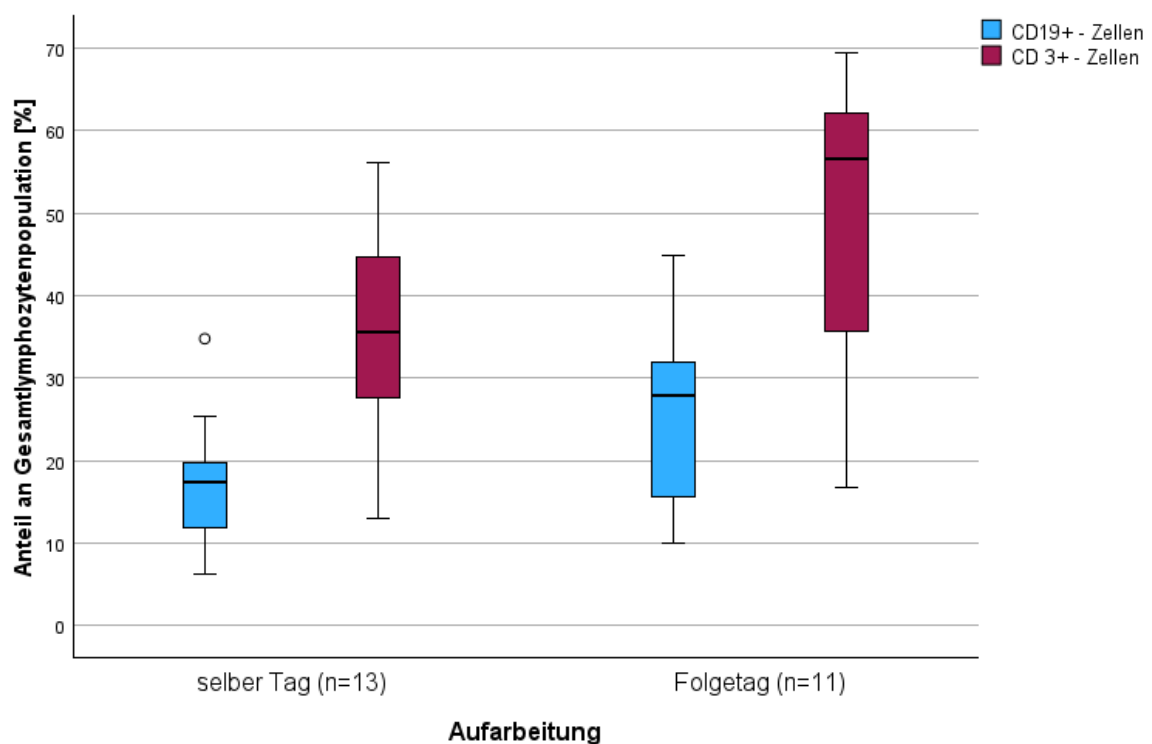


Abbildung 11: Anteil der CD19+- B- und CD3+- T- Lymphozyten an der Gesamtlymphozytenzahl bei Aufarbeitung der WLK am OP- Tag bzw. am Folgetag in Boxplot- Darstellung

| Aufarbeitung         |            |                     | Statistik (alle Angaben in %) |
|----------------------|------------|---------------------|-------------------------------|
| Anteil CD19+- Zellen | selber Tag | Median              | 17,5                          |
|                      |            | Minimum             | 6,3                           |
|                      |            | Maximum             | 34,8                          |
|                      |            | Spannweite          | 28,5                          |
|                      |            | Interquartilbereich | 9,5                           |
|                      | Folgetag   | Median              | 28,0                          |
|                      |            | Minimum             | 10,0                          |
|                      |            | Maximum             | 44,8                          |
|                      |            | Spannweite          | 34,8                          |
|                      |            | Interquartilbereich | 16,7                          |
| Anteil CD3+- Zellen  | selber Tag | Median              | 35,6                          |
|                      |            | Minimum             | 13,0                          |
|                      |            | Maximum             | 56,1                          |
|                      |            | Spannweite          | 43,1                          |
|                      |            | Interquartilbereich | 21,1                          |
|                      | Folgetag   | Median              | 56,6                          |
|                      |            | Minimum             | 16,8                          |
|                      |            | Maximum             | 69,5                          |
|                      |            | Spannweite          | 52,7                          |
|                      |            | Interquartilbereich | 30,4                          |

Tabelle 17: Anteil der CD19+- B- und CD3+- T- Lymphozyten an der Gesamtlymphozytenzahl bei Aufarbeitung der WLK am OP- Tag bzw. am Folgetag

Zur weiteren Differenzierung der T- Lymphozyten wurde in der CD3+ Population der Anteil CD4+ bzw. CD8+ Subpopulationen bestimmt (vgl. Abb.12).

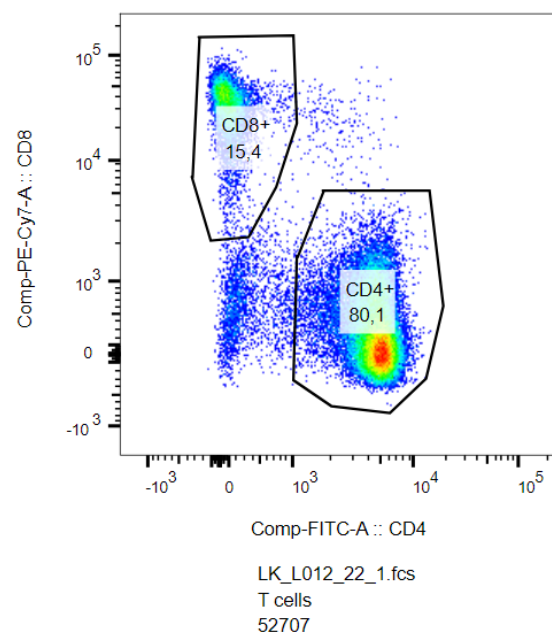


Abbildung 12: Beispiel für Bestimmung der T- Zell- Subpopulationen aus den CD3+ T- Zellen

Beim Vergleich nach Zeitpunkt der Aufarbeitung ergaben sich die beiden untenstehenden Boxplots (Abb.13). Unabhängig vom Aufarbeitungszeitpunkt war der Anteil CD4+- Zellen höher als der Anteil CD8+- Zellen. Im Mann-Whitney- U- Test zeigte sich für beide Subpopulationen kein signifikanter Unterschied bei unterschiedlichen Aufarbeitungszeitpunkt (CD4+- Zellen:  $U=54,0$ ;  $z=-1,014$ ;  $p=0,331$ ;  $r=-0,207$ ; CD8+- Zellen:  $U=58,0$ ;  $z=-0,782$ ;  $p=0,459$ ;  $r=-0,160$ ).

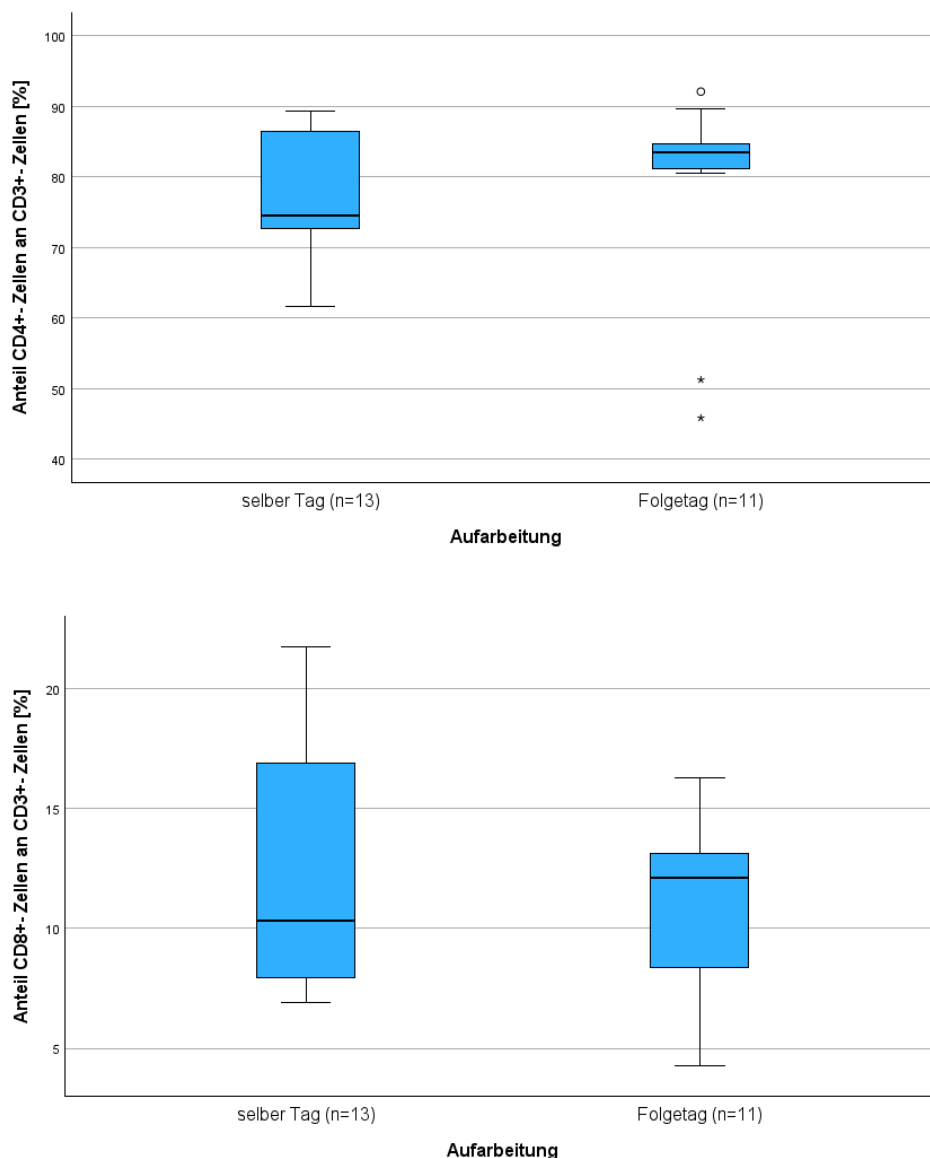


Abbildung 13: Oben: Anteil der CD4+- Zellen an den CD3+- positiven Lymphozyten bei Aufarbeitung am OP- Tag bzw. am Folgetag in Boxplot- Darstellung; Unten: Anteil der CD8+- Zellen an den CD3+- positiven Lymphozyten bei Aufarbeitung am OP- Tag bzw. am Folgetag in Boxplot- Darstellung

|                     |            |                     | Statistik (alle Angaben in %) |
|---------------------|------------|---------------------|-------------------------------|
| Aufarbeitung        |            |                     |                               |
| Anteil CD4+- Zellen | selber Tag | Median              | 74,5                          |
|                     |            | Minimum             | 61,7                          |
|                     |            | Maximum             | 89,3                          |
|                     |            | Spannweite          | 27,6                          |
|                     |            | Interquartilbereich | 14,9                          |
|                     | Folgetag   | Median              | 83,5                          |
|                     |            | Minimum             | 45,8                          |
|                     |            | Maximum             | 92,1                          |
|                     |            | Spannweite          | 46,3                          |
|                     |            | Interquartilbereich | 4,5                           |
| Anteil CD8+- Zellen | selber Tag | Median              | 10,3                          |
|                     |            | Minimum             | 6,9                           |
|                     |            | Maximum             | 21,7                          |
|                     |            | Spannweite          | 14,8                          |
|                     |            | Interquartilbereich | 9,9                           |
|                     | Folgetag   | Median              | 12,1                          |
|                     |            | Minimum             | 4,3                           |
|                     |            | Maximum             | 16,3                          |
|                     |            | Spannweite          | 12,0                          |
|                     |            | Interquartilbereich | 7,5                           |

Tabelle 18: Anteil der CD4+- und CD8+- Zellen an den CD3+- Lymphozyten bei Aufarbeitung am OP- Tag bzw. am Folgetag

### 3.2.3 Einfluss der Kryokonservierung

#### 3.2.3.1 Anteil vitaler Zellen

Fünf der untersuchten WLK enthielten eine ausreichend hohe Zellzahl, um eine FACS- Analyse vor und nach Kryokonservierung durchzuführen. Abb.14 zeigt exemplarisch die Bestimmung des Anteils vitaler Zellen zu den beiden Messzeitpunkten.

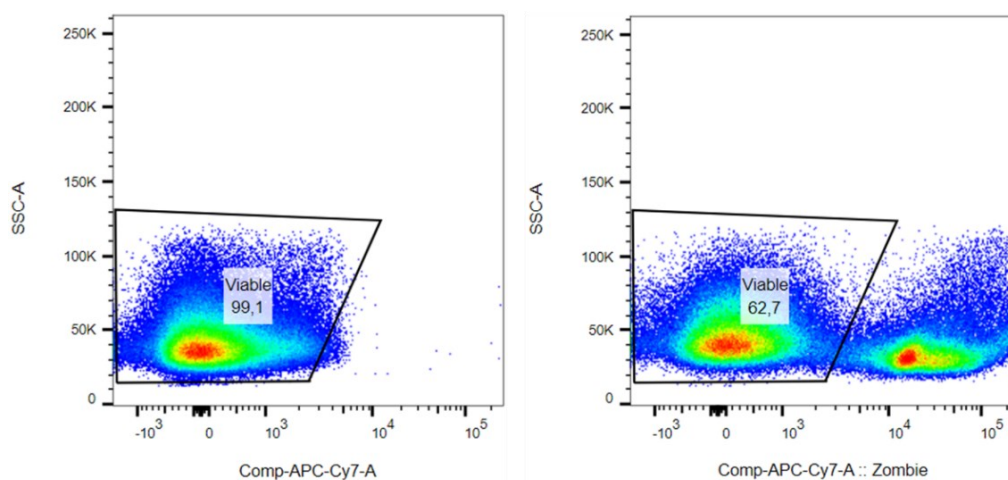


Abbildung 14: Anteil vitaler Zellen in den Zellsuspensionen eines WLK vor (links) und nach (rechts) Kryokonservierung in einer SSC-A versus APC Dotplot- Darstellung

Für alle fünf Zellsuspensionen zeigte sich ein deutlicher Abfall des Anteils vitaler Zellen nach Kryokonservierung (Abb.15). Um zu überprüfen, ob sich der Anteil vitaler Zellen durch die Kryokonservierung in gerichteter Weise verändert, wurde ein Wilcoxon- Vorzeichen- Rang- Test für verbundene Stichproben durchgeführt. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Messzeitpunkten ( $Z = -2,023$ ;  $p = 0,043$ ;  $r = -0,905$ ).

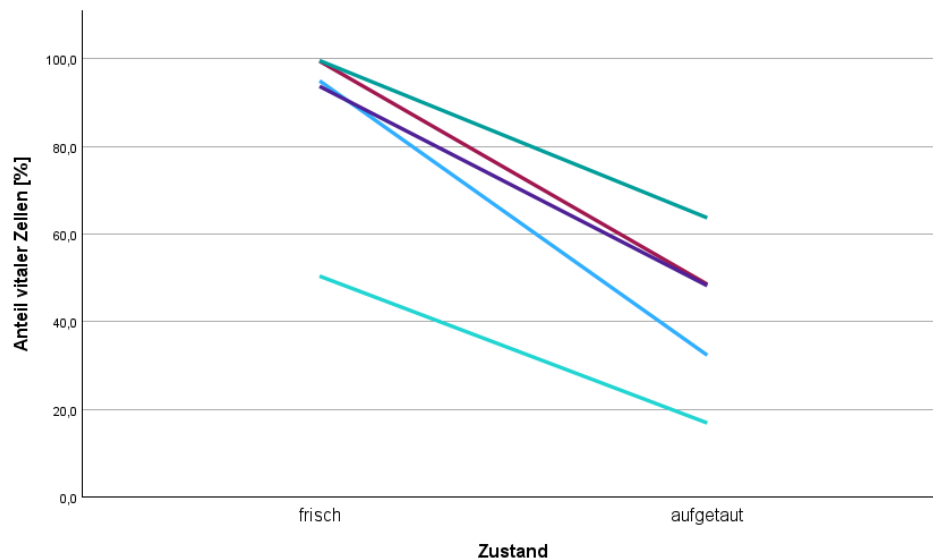


Abbildung 15: Anteil vitaler Zellen in fünf aufgearbeiteten WLK vor und nach Kryokonservierung

### 3.2.3.2 Zelluläre Zusammensetzung

Die folgenden beiden Abbildungen stellen den Anteil der CD19+- B Lymphozyten sowie der CD3+- T- Lymphozyten an der Gesamtlymphozytenpopulation vor und nach der Kryokonservierung dar. In beiden Subpopulationen zeigte sich ein Anstieg des Medians nach Kryokonservierung (CD3+- Zellen: 52, 04% auf 54,74%; CD19+- Zellen: 19,80% auf 37,17%). Ein signifikanter Unterschied im Wilcoxon- Vorzeichen- Rang- Test beim Vergleich der verbundenen Stichproben vor und nach Kryokonservierung zeigte sich jedoch nicht (CD3+- Zellen:  $Z = -1,483$ ;  $p = 0,138$ ;  $r = -0,663$ ; CD19+- Zellen:  $Z = -1,753$ ;  $p = 0,080$ ;  $r = -0,784$ ).

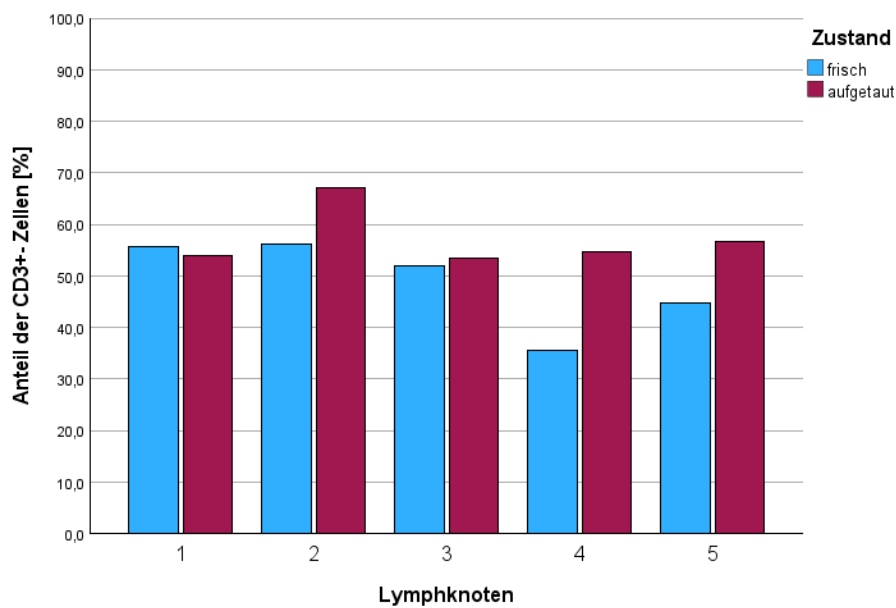
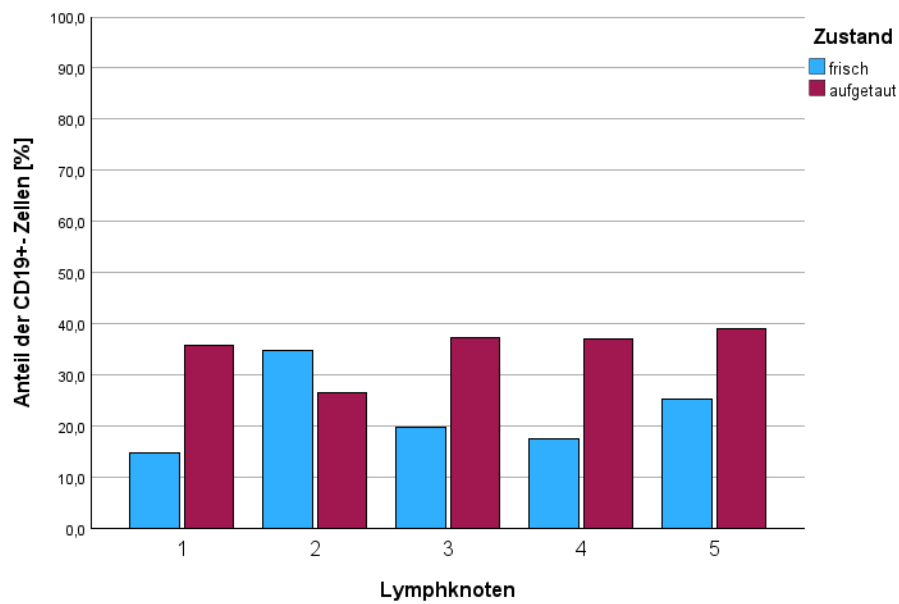


Abbildung 16: Anteil der CD19+- B- Lymphozyten (oben) und der CD3+- T- Lymphozyten (unten) an der Gesamt- Lymphozytenpopulation in den Zellsuspensionen von fünf WLK vor und nach Kryokonservierung

Bei Betrachtung des Anteils der CD4+- Zellen an den T- Lymphozyten zeigte sich eine signifikante Abnahme (Median frisch: 87,45 %, aufgetaut: 83,40 %;  $Z = -2,023$ ,  $p = 0,043$ ;  $r = -0.905$ ). Die CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten hingegen wiesen eine Zunahme auf (Median frisch: 7,87 %, aufgetaut: 9,34 %;  $Z = -2,023$ ,  $p = 0,043$ ;  $r = -0,905$ ).

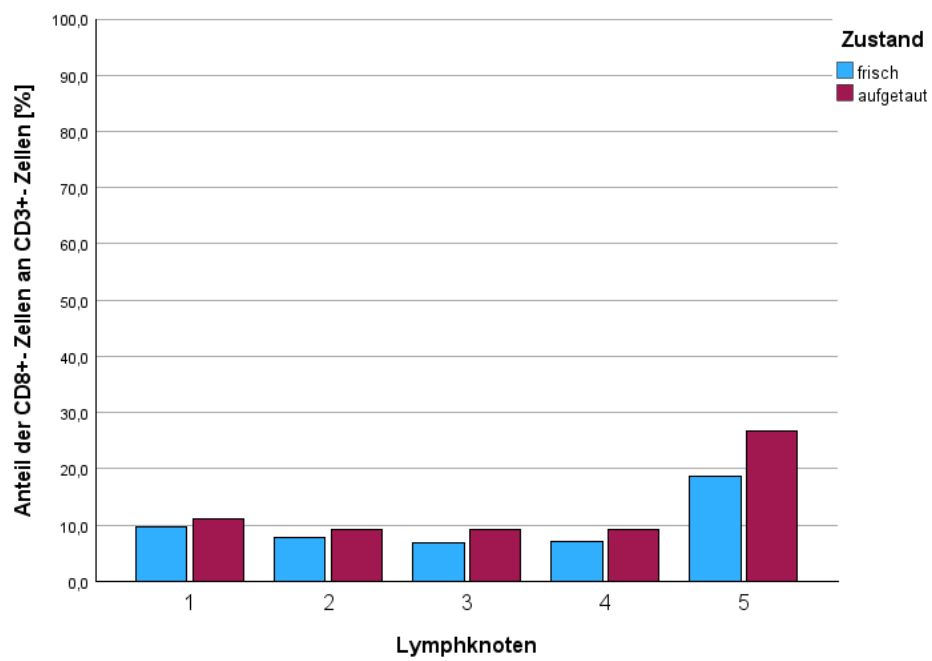
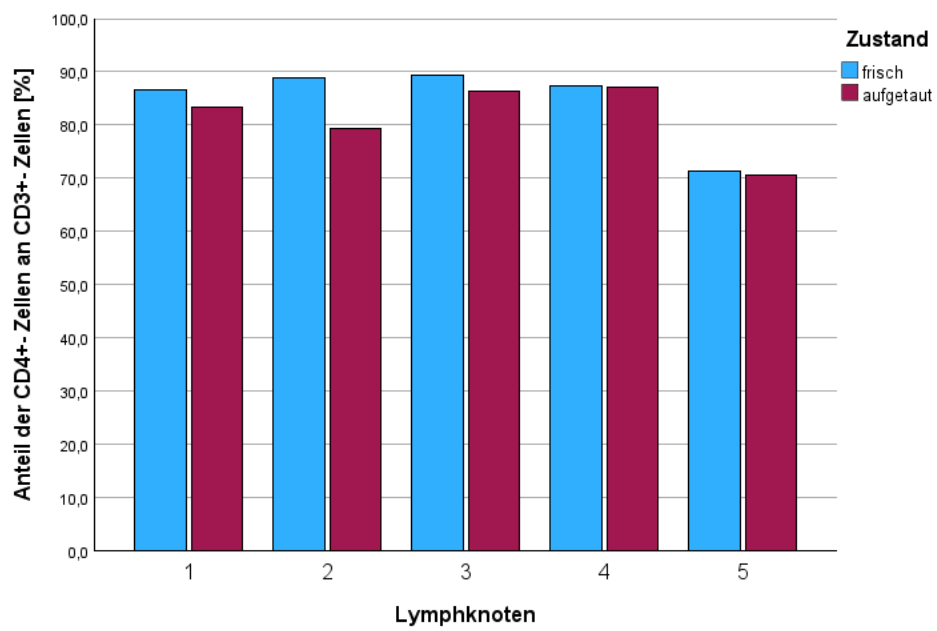


Abbildung 17: Anteil der CD4+- T- Lymphozyten (oben) und der CD8+- T- Lymphozyten (unten) an der Gesamt- T- Lymphozytenzahl in den Zellsuspensionen von fünf WLK vor und nach Kryokonservierung

### 3.3 In- vitro T- Zellstimulation mit Melanozyten-Differenzierungsantigenen

#### 3.3.1 Workflow

Für diesen Versuchsteil wurden 163 WLK im Rahmen der standardmäßigen LDI durch medizinische Technologen für Laboratoriumsanalytik aufgearbeitet. Davon enthielten 51 Lymphknoten (31%) ausreichend viele Zellen, dass eine Diagnostik möglich und die Kryokonservierung sinnvoll waren.

Um genug Zellen für die Stimulation zu erhalten, wurden nur WLK, von denen mindestens zwei Cryotubes vorhanden waren, aufgetaut. Trotzdem konnten 11 Zellsuspensionen (7%) aufgrund einer zu niedrigen Zellzahl nach dem Auftauen nicht für die Stimulationen verwendet werden. Von insgesamt 163 aufgearbeiteten WLK konnten daher nur 20 (12%) für die T- Zell- Stimulation verwendet und ausgewertet werden.

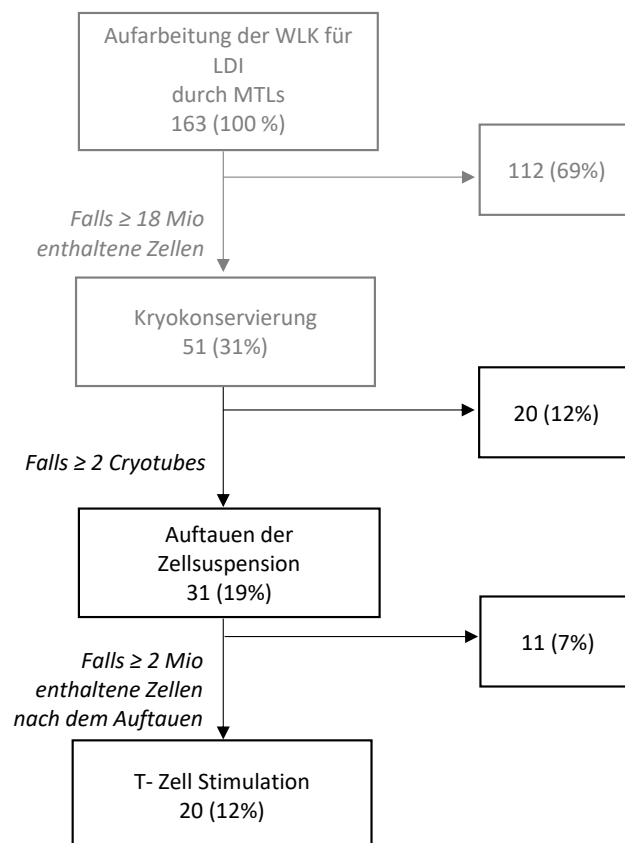


Abbildung 18: Flussdiagramm der Probenselektion für die T- Zell- Stimulationen. Alle Arbeitsschritte, die durch Medizinische Technologen für Laboratoriumsanalytik (MTL) durchgeführt wurden, sind in grau hinterlegt.

### **3.3.2 T- Zell- Aktivierungsmarker nach Stimulation mit MDAs**

#### **3.3.2.1 Intrazelluläre INF $\gamma$ - und TNF $\alpha$ - Expression**

##### **3.3.2.1.1 CD8+- Zellen**

Von 20 WLK zeigten 19 eine Reaktivität der CD8+-T- Zellen auf die Positivkontrolle mit dem CEF- Peptidpool (95%). Mit Ausnahme eines WLK äußerte sich die Reaktivität auf die Positivkontrolle v.a. in einer gleichzeitigen INF $\gamma$ - und TNF $\alpha$ - Expression der CD8+- Zellen.

In vier WLK zeigte sich eine Reaktivität in der Negativkontrolle. Ein WLK wurde aufgrund der erhöhten T- Zell- Reaktivität in der Negativkontrolle von den weiteren Auswertungen ausgeschlossen. In den weiteren drei WLK wurde zwar eine geringgradige Reaktivität in der Negativkontrolle nachgewiesen, allerdings war die Reaktivität in der Positivkontrolle mit CEF mehr als doppelt so hoch, sodass diese WLK zunächst beibehalten wurden. Trotzdem wurde keiner dieser WLK als reaktiv auf ein MDA gewertet, da in keiner Probe eine doppelt so hohe Aktivität auf die MDAs wie das Medium gemessen wurde (zur genauen Definition von Reaktivität siehe 2.5.3).

Eine Reaktivität auf MDAs zeigte sich in fünf WLK. In vier der WLK rief ein einzelnes Antigen eine Reaktion hervor (TRP2, Tyrosinase, 2x MLANA). Ein WLK reagierte gleichzeitig auf gp100, Tyrosinase und TRP2. In allen Fällen war das Ausmaß der Reaktivität vergleichsweise gering zur Positivkontrolle. Außerdem manifestierten sich die Reaktionen stets entweder in einer erhöhten TNF $\alpha$ - Expression oder einer erhöhten INF $\gamma$ - Expression, nicht aber in einer simultanen TNF $\alpha$ - & INF $\gamma$ - Expression. Von den fünf MDA- reaktiven WLK hatten zwei einen positiven Nodalstatus.

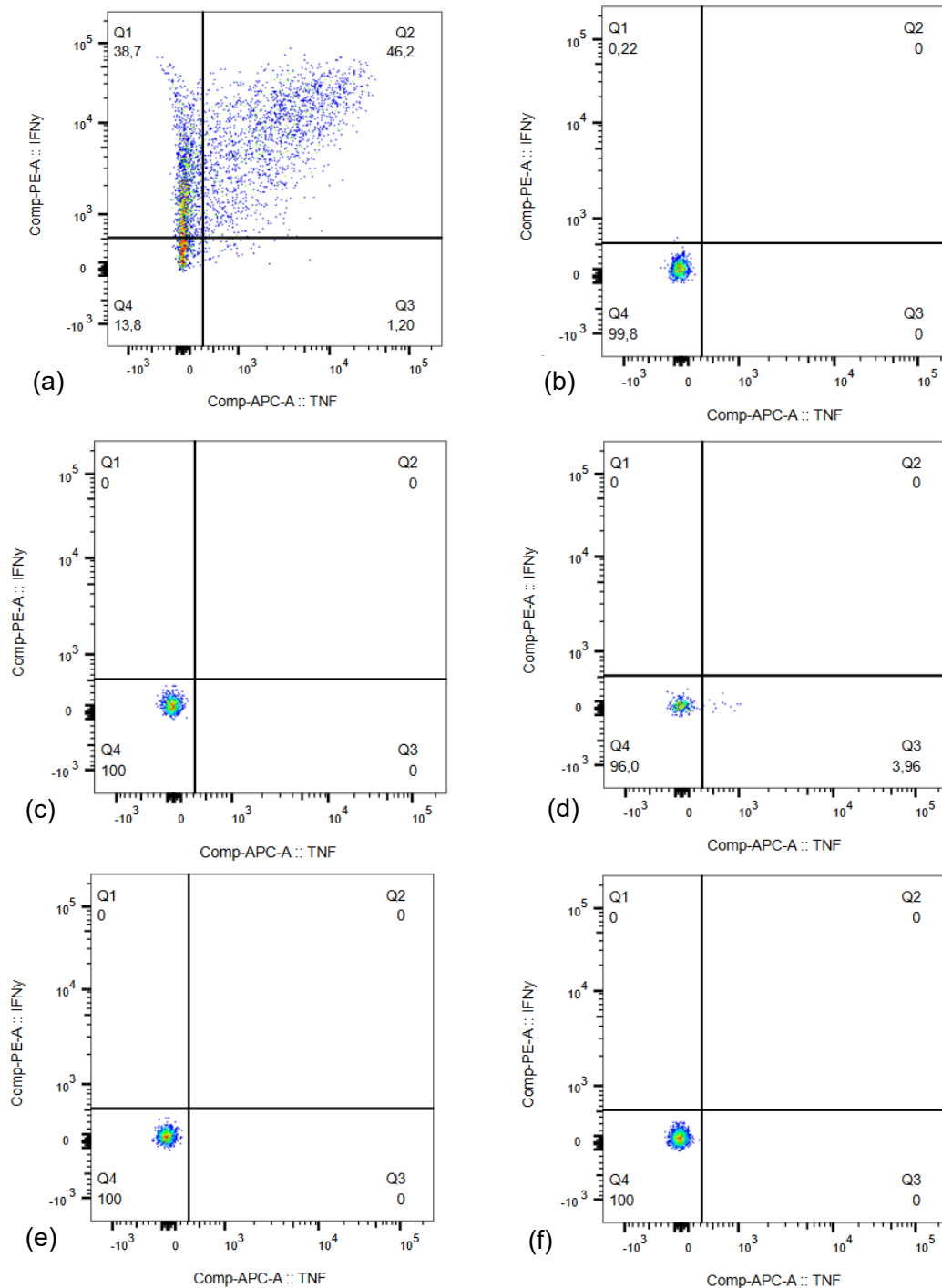


Abbildung 19: Intrazelluläre IFN $\gamma$ - und TNF $\alpha$ - Expression in CD3 $^{+}$ - CD8 $^{+}$ - Lymphozyten aus einem exemplarischen WLK (WLK 15 in Abb. 20) nach Stimulation mit (a) CEF- Peptidpool, (b) Medium, (c) gp100- Peptidpool, (d) MLANA- Peptidpool, (e) TRP2- Peptidpool, (f) Tyrosinase- Peptidpool.

Es zeigt sich eine deutliche IFN $\gamma^{+}$ - TNF $\alpha^{+}$ - Reaktivität auf den CEF- Pool, sowie eine geringer ausgeprägte IFN $\gamma^{+}$ -TNF $\alpha^{+}$ - Reaktivität auf den MLANA- Peptidpool.

| WLK | TNF-, INF+ |        |       |       |      | Tyrosinase | TNF+, INF- |        |       |       |      | TNF+, INF+ |      |        |       |       | Status | Vitalität [%] |       |
|-----|------------|--------|-------|-------|------|------------|------------|--------|-------|-------|------|------------|------|--------|-------|-------|--------|---------------|-------|
|     | CEF        | Medium | gp100 | MLANA | TRP2 |            | CEF        | Medium | gp100 | MLANA | TRP2 | Tyrosinase | CEF  | Medium | gp100 | MLANA |        |               | TRP2  |
| 1   | 1,2        |        |       |       |      |            | 1,2        |        |       |       |      | 10,5       |      |        |       |       |        |               | 90,07 |
| 2   | 33,5       |        |       |       |      |            | 2,8        |        |       |       |      | 40,4       |      |        |       |       |        |               | 90,20 |
| 3   | 2,8        |        |       |       |      |            | 1,0        |        |       | 1,4   |      | 4,8        |      |        |       |       |        |               | 87,97 |
| 4   | 23,1       |        |       |       |      |            | 2,3        | 2,3    | 1,9   | 1,8   | 1,9  | 1,7        | 52,0 |        |       |       |        |               | 91,94 |
| 5   | 3,0        |        |       |       |      |            | 3,0        | 7,4    | 5,4   | 2,2   |      | 2,4        | 3,0  |        |       | 2,2   |        |               | 74,10 |
| 6.1 |            |        |       |       |      |            |            |        |       |       | 1,3  |            | 6,5  |        |       |       |        |               | 91,14 |
| 6.2 |            |        |       |       |      |            | 1,2        |        |       |       |      | 34,6       |      |        |       |       |        |               | 91,94 |
| 7   |            |        |       |       |      |            |            |        |       |       |      |            |      |        |       |       |        |               | 94,67 |
| 8.1 | 7,7        |        |       |       |      |            |            |        |       |       |      |            | 27,8 |        |       |       |        |               | 91,79 |
| 8.2 | 10,6       |        |       |       |      |            |            |        |       |       |      |            | 22,6 |        |       |       |        |               | 92,21 |
| 9   | 7,6        | 1,1    |       |       |      |            | 1,1        |        |       |       |      |            | 41,7 |        |       |       |        |               | 92,04 |
| 10  | 1,5        |        |       |       |      |            | 5,9        |        |       |       |      | 19,3       |      |        |       |       |        |               | 85,70 |
| 11  | 55,4       |        | 1,4   |       | 1,5  | 2,2        |            |        |       |       |      | 28,9       |      |        |       |       |        |               | 78,60 |
| 12  | 6,5        |        |       |       |      |            |            |        |       |       |      | 1,2        | 26,1 |        |       |       |        |               | 96,55 |
| 13  | 10,1       | 1,4    |       |       |      |            |            |        |       |       |      |            | 21,0 |        |       |       |        |               | 96,52 |
| 14  | 6,9        |        |       |       |      |            |            |        |       |       |      |            | 6,3  |        |       |       |        |               | 78,42 |
| 15  | 38,7       |        |       |       |      |            | 1,2        |        |       | 4,0   |      |            | 46,2 |        |       |       |        |               | 74,11 |
| 16  | 2,4        |        |       |       |      |            | 1,0        |        |       |       |      |            | 2,6  |        |       |       |        |               | 60,68 |
| 17  |            |        |       |       |      |            |            |        |       |       |      |            | 1,6  |        |       |       |        |               | 82,00 |
| 18  | 3,4        |        |       |       |      |            |            |        |       |       |      |            | 18,6 |        |       |       |        |               | 68,06 |

Abbildung 20: Tabellarische Darstellung der INF $\gamma$ - und TNF $\alpha$ - Expression in den CD3+- CD8+- Lymphozyten nach T- Zell- Stimulation mit MDAs.

Es wurden 20 WLK von 18 Patienten mit gp100-, MLANA-, TRP2- sowie Tyrosinase- Peptidpools stimuliert. Als Positivkontrolle diente ein CEF- Peptidpool, in der Negativkontrolle wurde kein Peptidpool hinzugefügt (Medium). Waren  $\geq 1,0$  % der Zellen TNF $\alpha$ - und/oder INF $\gamma$ - positiv, so ist der Anteil an der Gesamt- CD8+- Population im jeweiligen Feld eingetragen (Angaben in %), zudem ist dieser farblich hinterlegt. In der vorletzten Spalte ist der Status des LK dargestellt (schwarz= positiv, weiß= negativ). In der letzten Spalte findet sich die durchschnittliche Vitalität zum Zeitpunkt der FACS- Analyse.

#### 3.3.2.1.2 CD4+- Zellen

Die Zahl der WLK, deren CD4+- Zellen auf den CEF- Peptidpool reagierten, sowie das Ausmaß der Reaktion verglichen mit den CD8+- Zellen war deutlich geringer. 95% der WLK reagierten mit den CD8+- Zellen, dagegen nur 30% mit den CD4+- Zellen. Eine Stimulation durch den CEF- Peptidpool führte meist zu einer erhöhten INF $\gamma$ - Expression, eine erhöhte TNF $\alpha$ - Expression zeigte sich nur bei einem WLK. Alle WLK, die eine Reaktion der CD4+- Zellen auf den CEF- Peptidpool aufwiesen, hatten auch mit den CD8+- Zellen auf den CEF- Pool reagiert.

Die Negativkontrolle ohne Zusatz von Peptiden verblieb bei allen Proben negativ. Jedoch wurde ein WLK wegen einer Reaktivität der CD8+- Zellen in der Negativkontrolle von den weiteren Auswertungen ausgeschlossen (siehe 3.3.2.1).

Eine Reaktivität der CD4+- Zellen auf MDAs konnte in sechs WLK nachgewiesen werden. Davon hatten drei der MDA- reaktiven WLK auch mit den CD8+- Zellen reagiert. Die Antigene, die eine Reaktion auslösten, stimmten zwischen CD4+- und CD8+- Zellen nur teilweise überein.

Am häufigsten reagierten die CD4+- Zellen auf den TRP2- Peptidpool (50% der MDA- reaktiven WLK). Auf den MLANA- und den gp100- Peptidpool reagierten je 33% der MDA- reaktiven WLK. In einem WLK (16,7%) führte der Tyrosinase- Peptidpool zu einer CD4+- Reaktivität. Wie bereits bei den CD8+- Zellen riefen auch bei den CD4+- Zellen zum Teil mehrere verschiedene MDA- Peptidpools eine T- Zell- Reaktion hervor.

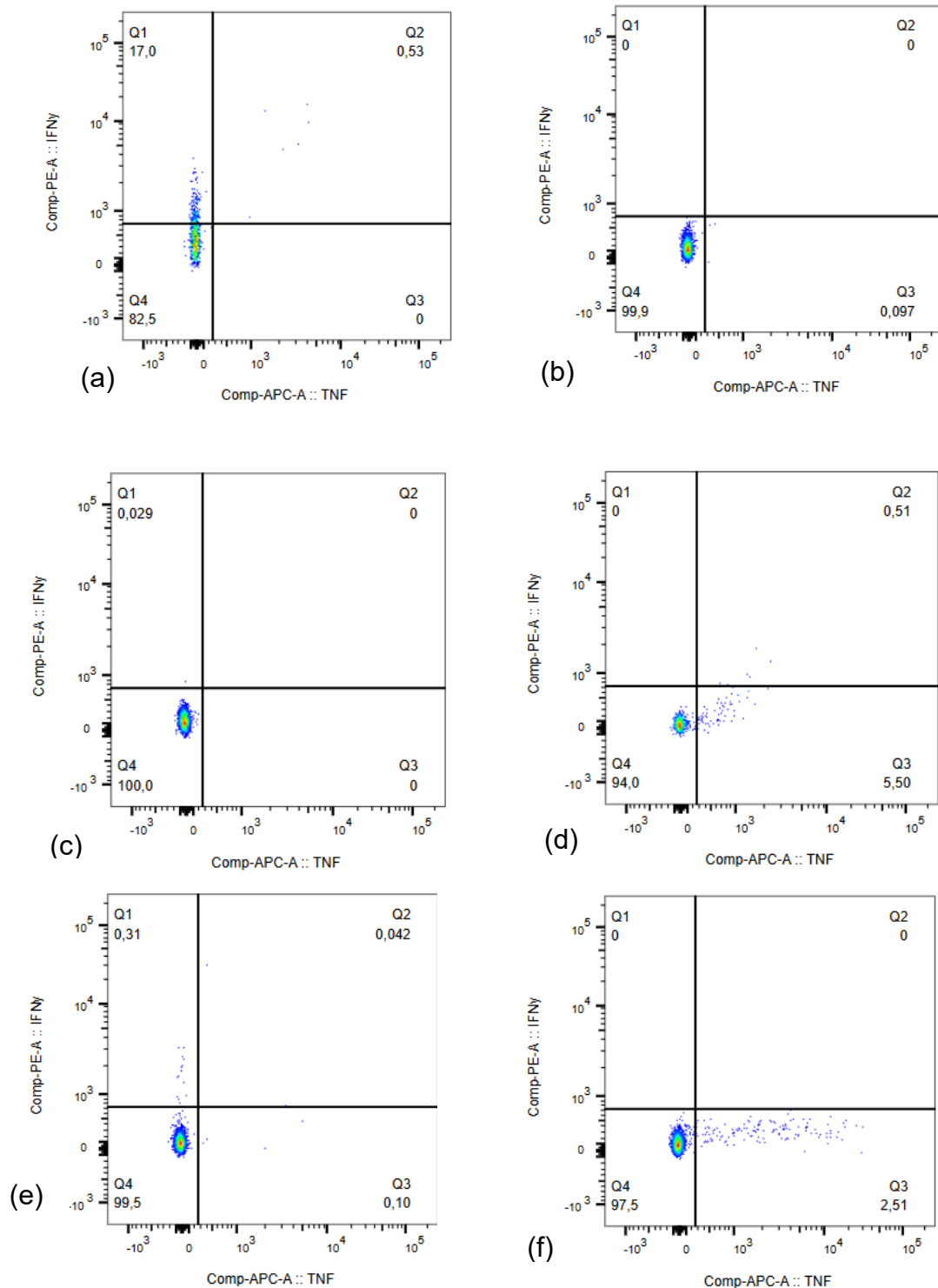


Abbildung 21: Intrazelluläre IFN $\gamma$ - und TNF $\alpha$ - Expression in CD3 $^{+}$ - CD4 $^{+}$ - Lymphozyten aus einem exemplarischen WLK (WLK 15 in Abb. 22) nach Stimulation mit (a) CEF- Peptidpool, (b) Medium, (c) gp100- Peptidpool, (d) MLANA- Peptidpool, (e) TRP2- Peptidpool, (f) Tyrosinase- Peptidpool

Das Ausmaß der Reaktion auf den CEF- Peptidpool war deutlich geringer als bei den CD8 $^{+}$ - Lymphozyten. Eine Reaktivität gegen MDAs über dem festgelegten Schwellenwert von 1% zeigte sich gegen den MLANA- Peptidpool sowie den Tyrosinase- Peptidpool. Auch bei den CD8 $^{+}$ - Zellen wurde durch den MLANA- Peptidpool eine Reaktion hervorgerufen (siehe Abb. 19).

| WLK | TNF-, INF+ |        |       |       | TNF+, INF- |            |     |        | TNF+, INF+ |       |      |            | Status | Vitalität [%] |
|-----|------------|--------|-------|-------|------------|------------|-----|--------|------------|-------|------|------------|--------|---------------|
|     | CEF        | Medium | gp100 | MLANA | TRP2       | Tyrosinase | CEF | Medium | gp100      | MLANA | TRP2 | Tyrosinase |        |               |
| 1   |            |        |       |       |            |            |     |        |            |       |      |            |        | 90,07         |
| 2   | 6,5        |        |       | 1,2   |            |            |     |        | 2,3        |       |      |            |        | 90,20         |
| 3   |            |        |       |       |            |            |     |        |            |       |      |            |        | 87,96         |
| 4   |            |        |       |       |            |            |     |        |            |       |      |            |        | 91,94         |
| 5   |            |        |       |       |            |            |     |        |            |       |      |            |        | 74,10         |
| 6.1 |            |        |       |       |            |            |     |        |            |       |      |            |        | 91,14         |
| 6.2 |            |        |       |       |            |            |     |        | 1,6        |       |      |            |        | 91,94         |
| 7   |            |        |       |       |            |            |     |        |            |       |      |            |        | 94,64         |
| 8.1 | 1,1        |        |       |       |            |            |     |        |            |       |      |            |        | 91,79         |
| 8.2 | 1,1        |        |       |       |            |            |     |        |            |       |      |            |        | 92,21         |
| 9   | 1,8        |        |       |       |            |            |     |        |            |       |      |            |        | 92,04         |
| 10  |            |        |       |       |            |            |     |        |            |       | 1,1  |            |        | 85,70         |
| 11  | 44,2       |        |       |       | 1,2        |            |     |        |            |       |      |            |        | 78,60         |
| 12  |            |        |       |       |            |            |     |        |            |       | 1,8  |            |        | 96,55         |
| 13  |            |        |       |       |            |            |     |        |            |       |      |            |        | 95,52         |
| 14  |            |        |       |       |            |            |     |        |            |       |      |            |        | 78,42         |
| 15  | 17,0       |        |       |       |            |            |     |        |            | 5,5   |      | 2,5        |        | 74,11         |
| 16  |            |        |       |       |            |            |     |        |            |       |      |            |        | 60,68         |
| 17  |            |        |       |       |            |            |     |        |            |       |      |            |        | 82,00         |
| 18  |            |        |       |       |            |            |     |        |            |       |      |            |        | 68,06         |

Abbildung 22: Tabellarische Darstellung der INF $\gamma$ - und TNF $\alpha$ - Expression in den CD3+- CD4+- Lymphozyten nach T- Zell- Stimulation mit MDAs.

Es wurden 20 WLK von 18 Patienten mit gp100-, MLANA-, TRP2- sowie Tyrosinase- Peptidpools stimuliert. Als Positivkontrolle diente ein CEF- Peptidpool, in der Negativkontrolle wurde kein Peptidpool hinzugefügt (Medium). Waren  $\geq 1,0$  % der Zellen TNF $\alpha$ - und/oder INF $\gamma$ - positiv, so ist der Anteil an der Gesamt- CD4+- Population im jeweiligen Feld eingetragen (Angaben in %), zudem ist dieser farblich hinterlegt. In der vorletzten Spalte ist der Status des LK dargestellt (schwarz= positiv, weiß= negativ). In der letzten Spalte findet sich die durchschnittliche Vitalität zum Zeitpunkt der FACS- Analyse.

#### 3.3.2.1.3 T- Zell- Aktivierung in verschiedenen Lymphknoten desselben Patienten

In zwei Fällen konnten je zwei WLK vom selben Patienten untersucht werden. Dabei war jeweils ein WLK positiv, der andere negativ. Von diesen WLK reagierten alle zumindest mit den CD8+- Zellen auf die Positivkontrolle und zeigten keine Reaktivität auf die Negativkontrolle. Auf die MDA- Peptidpools reagierten die WLK eines Patienten. Eine Übereinstimmung der T- Zell- Antwort konnte hierbei nicht beobachtet werden. Der negative WLK zeigte eine CD8+- T- Zellantwort auf TRP 2- Peptide, wohingegen der positive WLK eine CD4+- T- Zellantwort auf den gp100- Peptidpool aufwies.

#### 3.3.2.2 CD40L- Expression auf CD4+- Zellen

Entgegen den Erwartungen zeigte sich keine vermehrte CD40L- Expression auf CD3+- CD4+- Lymphozyten nach Stimulation mit dem CEF- oder den MDA- Peptidpools. In mehreren Mann- Whitney- U- Tests wurden der Anteil der CD40L+- CD4+- Zellen zwischen der Negativkontrolle ohne Peptide und je einem Peptidpool (CEF, gp100, MLANA, TRP 2, Tyrosinase) verglichen. Hier ergab sich in keinem Test ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Medium vs. CEF:  $Z = -0,950$ ;  $p = 0,342$ ;  $r = -0,158$ ; Medium vs. gp100:  $Z = -1,804$ ;  $p = 0,071$ ;  $r = -0,301$ ; Medium vs. MLANA:  $Z = -1,044$ ;  $p = 0,296$ ;  $r = -0,174$ ; Medium vs. TRP 2:  $Z = -0,317$ ;  $p = 0,751$ ;  $r = -0,053$ ; Medium vs. Tyrosinase:  $Z = -1,331$ ;  $p = 0,183$ ;  $r = -0,222$ ).

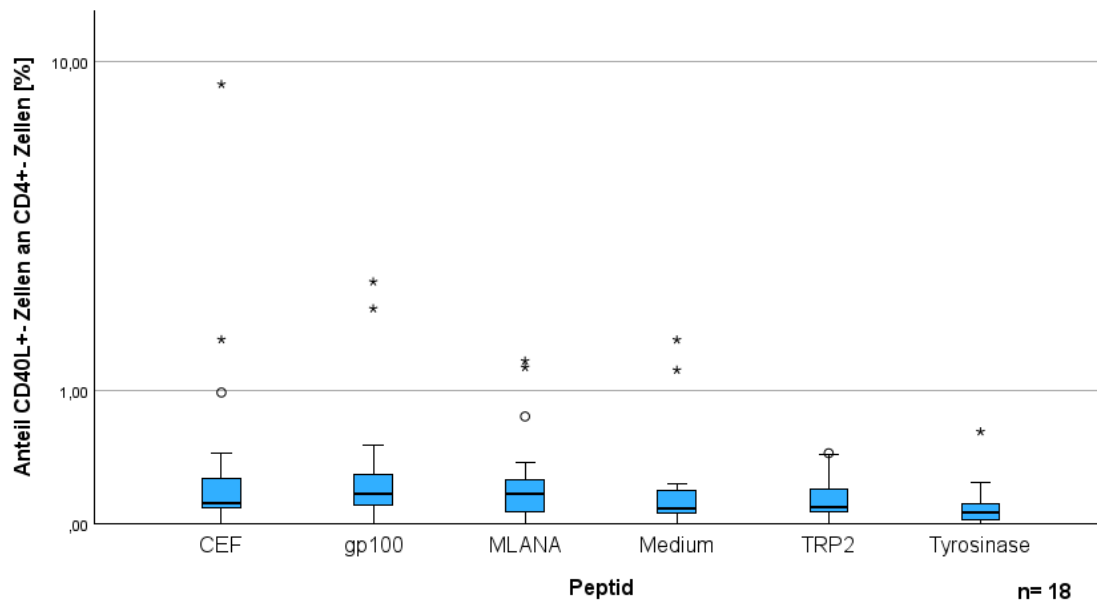


Abbildung 23: Logarithmische Boxplot- Darstellung des Anteils CD40L+- Zellen an den CD4+- Zellen [%] nach Stimulation mit den Peptidpools.

Links die Negativkontrolle, bei der kein Peptidpool hinzugegeben wurde. Rechts daneben die Positivkontrolle mit einem CEF- Peptidpool, daneben die vier MDAs. Im Mann- Whitney- U- Test zeigte kein Peptidpool eine signifikante Veränderung des Anteils CD40L+- Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle. Ein WLK wurde wegen einer starken CD8+- Zell- Reaktivität in der Negativkontrolle aus der Wertung genommen, ein weiterer wegen einer fehlenden Reaktivität der CD4+- und CD8+- Zellen auf die Positivkontrolle (siehe 3.2.1.1).

### 3.3.3 Einfluss des Lymphknotenstatus auf die T- Zell- Reaktivität gegen MDAs

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen T- Zell- Reaktivität gegen MDAs und dem Nodalstatus zu untersuchen, wurden eine Kreuztabelle erstellt und ein Chi-Quadrat-Test, sowie ein Exakter Test nach Fisher bei kleiner Stichprobenzahl durchgeführt. Da entgegen der Erwartungen eine vermehrte CD40L- Expression auf stimulierten CD4+- Zellen ausblieb, wurden nur die intrazelluläre TNF $\alpha$ - und INF $\gamma$ - Expression zur Bestimmung einer Reaktivität gegen MDAs hinzugezogen. Zwei WLK wurden aufgrund einer fehlenden Reaktivität auf die Positivkontrolle bzw. einer T- Zell- Reaktivität auf die Negativkontrolle aus der statistischen Auswertung ausgenommen. Die entsprechend geringe Fallzahl (n=18) und die Auswirkungen auf die Teststärke wird im Diskussionsteil besprochen, soll aber hier bereits erwähnt sein.

### 3.3.3.1 CD8+- Zellen

In der Gruppe der nodal-negativen Patienten zeigten 3 von 10 eine Reaktivität gegen MDAs, während in der nodal-positiven Gruppe 2 von 8 Patienten reaktiv waren. Die beobachteten Häufigkeiten wichen dabei nur geringfügig von den erwarteten Häufigkeiten ab.

Die statistische Auswertung mittels Pearson-Chi-Quadrat-Test (p- Wert= 0,814), sowie mittels exakten Test nach Fisher (p = 1,000) wiesen keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der MDA-Reaktivität und dem Nodalstatus auf.

|                        |      |                  | Nodalstatus |         | Gesamt |
|------------------------|------|------------------|-------------|---------|--------|
|                        |      |                  | negativ     | positiv |        |
| Reaktivität gegen MDAs | nein | Anzahl           | 7           | 6       | 13     |
|                        |      | Erwartete Anzahl | 7,2         | 5,8     | 13,0   |
|                        | ja   | Anzahl           | 3           | 2       | 5      |
|                        |      | Erwartete Anzahl | 2,8         | 2,2     | 5,0    |
| Gesamt                 |      | Anzahl           | 10          | 8       | 18     |
|                        |      | Erwartete Anzahl | 10,0        | 8,0     | 18,0   |

Tabelle 19: Kreuztabelle CD8+- Reaktivität gegen MDAs \* Nodalstatus

### 3.3.3.2 CD4+- Zellen

Von den negativen WLK zeigten 3 von 10 eine Reaktivität der CD4+- Zellen gegen MDAs und 3 von 8 positive WLK. Wie bei den CD8+- Zellen lag nur eine geringe Abweichung von den erwarteten Häufigkeiten vor.

Sowohl der Pearson- Chi- Quadrat- Test (p- Wert= 0,737) als auch der exakte Test nach Fisher (p=1,000) deuteten gegen einen signifikanten Unterschied zwischen einer CD4+- Reaktivität gegen MDAs und dem Nodalstatus.

|                        |      |                  | Nodalstatus |         | Gesamt |
|------------------------|------|------------------|-------------|---------|--------|
|                        |      |                  | negativ     | positiv |        |
| Reaktivität gegen MDAs | nein | Anzahl           | 7           | 5       | 12     |
|                        |      | Erwartete Anzahl | 6,7         | 5,3     | 12,0   |
|                        | ja   | Anzahl           | 3           | 3       | 6      |
|                        |      | Erwartete Anzahl | 3,3         | 2,7     | 6,0    |
| Gesamt                 |      | Anzahl           | 10          | 8       | 18     |
|                        |      | Erwartete Anzahl | 10,0        | 8,0     | 18,0   |

Tabelle 20: Kreuztabelle CD4+- Reaktivität gegen MDAs \* Nodalstatus

## 4 Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung

Die LDI ist eine akkreditierte Methode und in der Universitätsklinik Tübingen fest in die diagnostischen Abläufe etabliert. Die Verwendung von nach der LDI übriggebliebener Zellsuspensionen eröffnet einzigartige Möglichkeiten, das Immunrepertoire in den WLK von Melanompatienten zu untersuchen.

Die Zielsetzung von Versuchsteil I war es, den Einfluss verschiedener Faktoren auf die Qualität der disaggregierten WLK zu untersuchen. Aus Praktikabilitätsgründen werden die WLK nach der Exzision über Nacht in RPMI-Medium gelagert und am Tag nach der OP aufgearbeitet. Dieses Vorgehen scheint keinen wesentlichen Einfluss auf die Qualität der WLK zu haben. Sowohl die Lymphozyten- Gesamtzahl als auch die Vitalität der Zellen und die zelluläre Zusammensetzung unterschieden sich nicht signifikant zwischen Aufarbeitung am OP- Tag und am Folgetag. Hingegen scheint der Einfluss der Kryokonservierung nicht unerheblich zu sein. In allen untersuchten WLK zeigte sich ein deutlicher Vitalitätsabfall nach der Kryokonservierung.

Für Versuchsteil II wurden die WLK aus Gründen der Umsetzbarkeit trotzdem zwischenzeitig eingefroren. Auf die Funktionalität der T- Zellen schien dies keinen wesentlichen Einfluss zu haben, 95 % der WLK zeigten eine Reaktivität auf die Positivkontrolle, die sich durch eine intrazelluläre Zytokinproduktion manifestierte. Fünf von 18 WLK zeigten eine CD8+- Reaktivität auf die MDAs, sechs von 18 WLK eine CD4+- Reaktivität. Die Reaktion fiel in der Regel deutlich schwächer aus als die auf die Positivkontrolle und zeigte sich meist in einer alleinigen INF $\gamma$ - oder TNF $\alpha$ - Expression (keine gleichzeitige INF $\gamma$ - und TNF $\alpha$ - Expression). Eine vermehrte CD40L+- Expression auf stimulierten CD4+- Zellen konnte nicht beobachtet werden. Ebenso konnte kein Zusammenhang zwischen WLK- Status und T- Zell- Reaktivität festgestellt werden.

## **4.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **4.2.1 Einfluss des Zeitabstands zwischen OP und Aufarbeitung der WLK**

In der vorliegenden Arbeit konnte kein nachteiliger Effekt einer Lagerung der exzidierten WLK in RPMI/ FCS- Medium (genaue Zusammensetzung siehe 2.2.2.1) bei 4°C über Nacht festgestellt werden. Diese Beobachtung deckt sich mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen zur kurzfristigen Lagerung von lymphatischem Gewebe in RPMI- Medium.

RPMI- 1640, oft ergänzt mit Komponenten wie FCS, ist ein gängiges Medium zur Kultivierung lymphatischer Zellen und kurzfristigen Lagerung von unfixiertem Gewebematerial. Shetuni und Kollegen zeigten eine konstante Vitalität von 87% in Gewebeproben aus Feinnadelbiopsien, die über 24h bei 4°C in RPMI/ FCS- Medium gelagert wurden. Auch nach fünf Tagen waren die Proben noch für durchflusszytometrische Untersuchungen geeignet (Shetuni et al., 2012). Auch in anderen Arbeiten stellte sich RPMI als geeignetes kurzfristiges Lagermedium zur Bewahrung der zellulären Integrität heraus, Rani und Kollegen betonten aber auch die Bedeutung der gleichzeitigen Kühlung der Proben (Rani et al., 2022; Renshaw et al., 2013).

### **4.2.2 Einfluss der Kryokonservierung**

Die Kryokonservierung von Proben ist ein gängiges Verfahren in Biobanken und Laboren. Dennoch zeigt sich in zahlreichen Studien ein nicht unerheblicher Einfluss der Einfrier- und Auftauprozesse auf die Vitalität und Funktionalität der Proben.

In Versuchsteil I zeigte sich ein signifikanter Abfall der Vitalität nach der Kryokonservierung in fünf exemplarischen WLK (im Median von 95,0% auf 48,3% vitale Zellen). Dieser wird auch in anderen Arbeiten beschrieben, allerdings in geringerem Ausmaß. Brincat und Kollegen beschrieben einen signifikanten Vitalitätsabfall von 88,2% auf 83,5% in 30 Lymphom- verdächtigen Lymphknoten (Brincat et al., 2012). Der Abfall der Vitalität scheint nicht nur vom Vorgang des Einfrierens und Auftauens abhängig zu sein, sondern auch von der Lagerungsdauer der kryokonservierten Proben. Min und Kollegen zeigten, dass ein signifikanter Vitalitätsabfall in kryokonservierten Milz- Gewebeproben erst

nach über vier Wochen Lagerungszeit auftritt (Min et al., 2025). Dies könnte den besonders drastischen Vitalitätsabfall nach Kryokonservierung in der vorliegenden Arbeit teilweise erklären, da die Lagerungszeit hier bis zu neun Monate betrug. Zu betonen gilt, dass in den beiden beschriebenen Arbeiten klassische Dimethylsulfoxid-/ FCS- Lösungen als Kryokonservierungsmittel verwendet wurde. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete CryoStor- Medium gilt jedoch als gleichwertige Alternative (Jantet-Blaudez et al., 2025).

Verschiebungen des prozentualen Anteils der CD3+- und CD19+- Lymphozyten wurden in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet. Dies deckt sich mit der einschlägigen Literatur. Der leichte Abfall des Anteils der CD4+- Zellen (im Median von 87,45% auf 83,40%) und die Zunahme des Anteils der CD8+- Zellen (im Median von 7,87% auf 9,34%) wird in der Literatur nicht beschrieben. Er könnte ein Hinweis auf eine höhere Kälte- Empfindlichkeit der CD4+- Zellen sein, kann in dieser Arbeit jedoch auch der geringen Fallzahl (n= 5) geschuldet sein (Brincat et al., 2012; Min et al., 2025).

#### **4.2.3 T- Zell- Stimulationen mit MDAs**

##### **4.2.3.1 MDA- spezifische T- Zellen in den WLK**

In der vorliegenden Arbeit konnten MDA- spezifische T- Zellen in den WLK von Melanompatienten nachgewiesen werden. Alle vier in der Einleitung dargestellten MDAs konnten dabei jeweils mindestens einmal als stimulierendes Antigen identifiziert werden. Aufgrund ihrer Position als erster Lymphknoten in den Lymphabflusswegen sind WLK sind nicht nur der Ort der primären Metastasierung, sondern auch zentral bei der antitumoralen Immunantwort. Es besteht ein stetiger Austausch von Antigenen und Immunzellen zwischen WLK und Tumorgewebe. In WLK und Tumorgewebe finden sich identische TZR- Klonotypen (Straten et al., 2006). Dass T- Zellen mit einer Reaktivität gegen die, auf Melanomzellen häufig exprimierten MDAs, in den WLK vorliegen, ist daher ein erwartbares Ergebnis dieser Arbeit gewesen.

Mit andauernder Antigenexposition und fortschreitender Erkrankung kommt es jedoch zu funktionellen Veränderungen der T- Zellen in den WLK. Effektorzellen und -funktionen werden herunterreguliert, hingegen kommt es zu einer Zunahme

der regulatorischen Zellen und der vermehrten Expression inhibitorischer Rezeptoren. Dieser Zustand wird als T- Zell- Erschöpfung bezeichnet und häufig in WLK beobachtet (Cochran et al., 2006). Die T- Zell- Erschöpfung könnte die, im Vergleich zur Positivkontrolle, deutlich geringer ausgeprägte Reaktion in dieser Arbeit teilweise erklären.

#### 4.2.3.2 Reaktivität der CD4+- Zellen auf die Positivkontrolle trotz Verwendung eines MHC- I- restringierten Peptidpools

Als Positivkontrolle wurde ein MHC- I restringierter CEF- Peptidpool verwendet, der kurze Peptidsequenzen aus je neun Aminosäuren enthält. Somit war eine Stimulation der CD8+- Zellen erwartbar. Tatsächlich reagierten von den untersuchten WLK 95% mit den CD8+- Zellen auf den CEF- Peptidpool, jedoch auch 30% mit den CD4+- Zellen.

Dass trotz der Verwendung eines MHC- I- restringierten Peptidpools eine CD4+- Reaktion vorlag, kann durch mehrere Faktoren erklärt werden. So kann eine ausgeprägte Zytokinsekretion der CD8+- Zellen auch die CD4+- Zellen unspezifisch mitaktivieren und zur Co- Sekretion von Effektorzytokinen anregen (Bystander- Effekt) (Lee et al., 2020). Ein weiterer Erklärungsansatz wäre die Aufnahme und atypische Präsentation der Peptide auf MHC- II aufgrund sehr hoher Peptidkonzentrationen (Kambayashi and Laufer, 2014). Ebenfalls möglich ist eine Kreuzreaktivität des T- Zell- Rezeptors (TZR). TZRs können neben ihrem ursprünglichen Zielpeptid auch strukturell ähnliche Antigene erkennen. Dies ermöglicht eine breite Immunantwort auf eine Vielfalt von Antigenen, ist aber auch bei Allergien und Autoimmunerkrankungen relevant (Mason, 1998). Grundsätzlich erkennen CD4+- Zellen Antigene mittels TZR und CD4- Corezeptor im Kontext von MHC-II. Dabei vermitteln die CD4- Corezeptoren die Stabilität und Signalstärke der Interaktion. Bei starker Affinität des TZRs oder sehr hohen Peptidkonzentrationen wurden jedoch bereits CD4+- Zellen beschrieben, die eine Kreuzreaktivität mit Peptid/ MHC- I- Komplexen zeigten (Nishimura et al., 1999). Derartige Kreuzreaktivitäten sind seltener und funktionell instabiler als klassische CD8+- vermittelte Reaktionen, sollten aber bei der Interpretation der Stimulationen berücksichtigt werden.

#### 4.2.3.3 Reaktivität sowohl der CD4+- als auch CD8+- Zellen auf die MDA-Peptidpools

Von 18 WLK zeigten sechs eine CD4+- Reaktivität und fünf eine CD8+- Reaktivität auf die MDA- Peptidpools. Im Gegensatz zur Positivkontrolle enthielten die MDA- Peptidpools längere, überlappende Sequenzen aus jeweils 15 Aminosäuren. Allgemein wird davon ausgegangen, dass MHC- I kurze Sequenzen aus 8- 10 Aminosäuren bindet, die aus dem Zellinneren stammen. Die Bindungstaschen sind hierbei an beiden Enden geschlossen. MHC-II bindet hingegen längere Sequenzen aus 13- 25 Aminosäuren bei beidseits offenen Bindungsgruben (Rammensee et al., 1995). Trotzdem konnte gezeigt werden, dass überlappende Peptidpools aus 15- meren sowohl eine CD4+- als auch eine CD8+- Immunantwort stimulieren können (Maecker et al., 2001). Dass auch kurze Peptide an MHC- II binden und eine CD4+- Reaktivität hervorrufen können, erscheint aufgrund der vorgehend beschriebenen, strukturellen Eigenschaften des Moleküls nicht verwunderlich. Wie es jedoch zur Bindung von längeren Peptidsequenzen (> 10 Aminosäuren) in die tiefen, an den Enden geschlossenen Bindungstaschen von MHC- I kommt, ist nicht abschließend geklärt. Möglich ist die Veränderung der räumlichen Struktur des gebundenen Peptids (Chen et al., 1994), ein beobachtetes Phänomen ist hierbei das Hervorwölben des Peptids aus der Bindungstasche (Guo et al., 1992). Auch die Bindungseigenschaften abhängig vom HLA- Typ können verschiedene Toleranzen gegenüber Peptidlängen vermitteln (Bade-Döding et al., 2011). Zuletzt ist eine Internalisierung und Zerlegung der Peptide nicht auszuschließen, durch die Verwendung von Brefeldin A aber unwahrscheinlich (Maecker et al., 2001).

#### 4.2.3.4 Unterschiede im Zytokin- Expressionsmuster zwischen Positivkontrolle und MDAs

In der vorliegenden Arbeit entwickelten die CD8+- T-Zellen auf die Positivkontrolle mit dem CEF-Pool eine ausgeprägte Antwort mit gleichzeitiger IFN- $\gamma$ - und TNF- $\alpha$ -Produktion. Hingegen blieb die Reaktivität auf MDAs zumeist auf die geringere Expression eines dieser Zytokine beschränkt.

Eine mögliche Erklärung ist der Einfluss der Kryokonservierung, welcher die Funktionalität der Zellen limitieren kann. In der Methodenkritik wurde bereits auf die beschränkte Aussagekraft des ersten Versuchsteils bezüglich der Funktionalität der Zellen nach Kryokonservierung verwiesen (siehe 4.2.3). Funktionelle Eigenschaften wie etwa die Proliferationsfähigkeit, die Zytokinproduktion und die zelluläre Zytotoxizität können durch die Kryokonservierung reduziert sein (Gómez-Mora et al., 2020). Linder und Kollegen gehen in ihrer Arbeit auch auf die Zytokine INF $\gamma$  und TNF $\alpha$  ein, die in der hier vorliegenden Arbeit als T- Zell- Aktivierungsmarker herangezogen wurden, und wiesen verschobene INF $\gamma$ / TNF $\alpha$ - Profile in kryokonservierten PBMCs nach (Linder et al., 2024). Unter den wenigen MDA- reaktiven T- Zellen können diese Effekte besonders auffallen. Virusspezifische T- Zellen weisen hingegen eine besonders hohe Klonfrequenz auf (Zhang et al., 2012), sodass sich die Effekte der Kryokonservierung bei Betrachtung der CEF- reaktiven T- Zellen weniger manifestieren könnten.

Auch immunologische Effekte könnten die Zytokin- Profile erklären. Der CEF- Peptidpool enthält virusspezifische Antigene, denen der Organismus regelmäßig ausgesetzt ist. Dies führt zur klonalen Expansion hoch- avider T- Zellen, die eine ausgeprägte Reaktivität aufweisen (Zhang et al., 2012). Bei den MDAs handelt es sich hingegen um Selbstantigene. Immuntoleranzmechanismen können die TZR- Avidität einschränken und eine starke Costimulation erforderlich machen (Oliveira et al., 2021). Hinzu kommen möglicherweise die tumorbedingten immunmodulatorischen Effekte, auf die in 4.2.3.1 bereits näher eingegangen wurde (Cochran et al., 2006).

#### 4.2.3.5 Fehlende CD40L+- Expression in allen Stimulationen

In keiner Stimulation konnte ein Anstieg des Aktivierungsmarkers CD40L (CD154) detektiert werden – weder mit dem CEF-Pool noch mit den MDA- Peptidpools. Für die Stimulation mit dem CEF- Peptidpools ist dies insofern plausibel, als dass dieser MHC- I restringierte Sequenzen enthielt, sodass primär eine CD8+- T- Zell- Reaktion erzielt wurde. CD40L wird hingegen vor allem von aktivierten CD4+- Lymphozyten exprimiert und vermittelt die Bindung zum CD40-

Rezeptor auf Antigen- präsentierenden Zellen (Armitage et al., 1992; Frentsch et al., 2005). Zudem tritt die Expression von CD40L nur sehr kurzzeitig nach TCR-Stimulation auf. Induziert durch die Bindung an den CD40- Rezeptor wird CD40L innerhalb der ersten sechs Stunden nach Aktivierung wieder herunterreguliert und internalisiert. Ohne spezifische Blockade von CD40 auf antigenpräsentierenden Zellen kann die Detektion daher erschwert sein (Poloni et al., 2023; Yellin et al., 1994). Zuletzt seien auch hier die Effekte der Kryokonservierung erwähnt. Ein verändertes Expressionsmuster von CD40L in CD4+- Zellen ist nicht auszuschließen und wurde bereits in kryokonservierten Thrombozyten nachgewiesen (Wood et al., 2021).

#### 4.2.3.6 Reaktivität und Status des WLK

Ein Zusammenhang zwischen Reaktivität und dem Status des WLK konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Auf die beschränkte Aussagekraft durch die geringe Fallzahl ist in der Methodenkritik (siehe 4.3.5) verwiesen. In anderen Arbeiten mit größeren Fallzahlen konnte durchaus eine Wechselbeziehung zwischen WLK- Status und Funktionalität der T- Zellen festgestellt werden. Grundtenor ist hierbei, dass der WLK eine wichtige Rolle bei der Initialisierung und Erhaltung der Tumorummunantwort spielt. Kommt es jedoch zu einer Metastasierung in den WLK, so zeigen sich Veränderungen im immunozellulären Milieu hin zur Hochregulation regulatorischer T- Zellen, Herunterregulation dendritischer Zellen und zur T- Zell- Erschöpfung (Ma et al., 2012; Yaddanapudi et al., 2022; Zippelius et al., 2004). Bisher ist unklar, ob die immunozellulären Veränderungen aufgrund der Metastasen im WLK auftreten oder ob die verminderte Immunüberwachung die Metastasierung in den WLK überhaupt erst ermöglicht. Favorisiert wird jedoch ein bidirektionales Modell, in dem eine frühe Umprogrammierung des WLK die Metastasierung erleichtert, während die Metastasen ihrerseits die T-Zell-Erschöpfung und Immuntoleranz weiter verschärfen (Delclaux et al., 2024).

#### 4.2.3.7 Reaktivität auf mehrere verschiedene MDAs im selben WLK

In einigen WLK konnte eine Reaktivität auf mehrere MDAs zugleich beobachtet werden. Dies könnte auf eine breite, polyklonale T- Zell-Antwort hinweisen. Eine

hohe TZR- Diversität als Zeichen einer funktionalen Immunantwort konnte als möglicher positiver prognostischer Faktor identifiziert werden. Hingegen scheint eine geringere TZR- Diversität mit einer geringeren Angriffsfläche der Tumorimmunantwort und einer schlechteren Prognose assoziiert zu sein. Dieser Zusammenhang wurde zunächst für PBMCs untersucht (Charles et al., 2020). Für andere hoch immunogene Tumorentitäten wie das Zervixkarzinom konnte jedoch bereits die besondere Bedeutung eines polyklonalen TZR- Repertoires im WLK gezeigt werden (Cui et al., 2018).

#### 4.2.3.8 T- Zell- Aktivierung in verschiedenen Lymphknoten desselben Patienten

In dieser Arbeit konnten in zwei Fällen jeweils ein positiver und ein negativer WLK desselben Patienten verglichen werden. In beiden Patienten zeigte sich keine Übereinstimmung der MDAs, die eine Reaktivität hervorriefen, zwischen den beiden WLK. Ebenso konnte bezüglich des Einflusses des WLK- Status kein Muster erkannt werden. Die geringe Fallzahl erlaubt jedoch lediglich deskriptive Aussagen.

Unterschiede zwischen positiven WLK und Lymphknoten ohne WLK- Status im selben Lymphabstromgebiet zeigten Ma und Kollegen. Es zeigten sich eine erhöhte Zahl regulatorischer T-Zellen und verringerte Zahl dendritischer Zellen in den WLK verglichen zu den anderen Lymphknoten (Ma et al., 2012). Diese Unterschiede im selben Patienten legen nahe, dass auch multiple WLK desselben Patienten unterschiedliche immunologische Profile aufweisen könnten. Insbesondere der Status des WLK könnte hierbei entscheidend sein. Systematische Arbeiten mit ausreichender Fallzahl stehen hierzu jedoch aus.

### 4.3 Limitationen

#### 4.3.1 *Patientenkollektiv*

Aufgrund der klar definierten Indikationskriterien zur WLK- Biopsie erfolgte eine gewisse Vorselektion des Patientenkollektivs hin zu höheren Tumordicken sowie dem Vorliegen von Risikokonstellationen.

#### **4.3.2 Auswahl der Wächterlymphknoten**

Für die LDI kommen nur WLK in Frage, die ausreichend groß sind, um den Lymphknoten longitudinal zu halbieren, sodass die andere Hälfte histopathologisch aufgearbeitet werden kann. Aufgrund der Vorrangstellung der Diagnostik konnten zudem nur WLK für weitere Versuche verwendet werden, die nach der LDI ausreichend viele Zellen enthielten. Entsprechend wurden ausschließlich große, zellreiche WLK untersucht.

#### **4.3.3 Kryokonservierung**

In Versuchsteils I wurde der Einfluss der Kryokonservierung in einer kleinen Stichprobe (n=5) untersucht. Hierbei zeigte sich ein Vitalitätsabfall um bis zu 50%. Die zelluläre Zusammensetzung blieb hingegen weitestgehend unverändert. Zur Lebend/ Tod- Diskriminierung wurde ein Zombie- Farbstoff eingesetzt. Zu berücksichtigen ist, dass dieser den Integritätszustand der Zellwand erfasst, jedoch keine Aussage über die Funktionalität der Zelle erlaubt.

Trotz des Vitalitätsabfalls und der mangelnden Aussagekraft bezüglich Funktionalität wurde eine Kryokonservierung der Zellsuspensionen durchgeführt. Der Zwischenschritt der Kryokonservierung reduzierte den logistischen Aufwand für Versuchsteil II deutlich, da so eine gleichzeitige In- vitro T- Zellstimulation mehrerer Proben möglich war. Die Anzahl der CryoTubes, die pro WLK für Versuchsteil II aufgetaut wurden, wurde entsprechend angepasst. Dass die Funktionalität der Zellen nach dem Auftauen größtenteils erhalten blieb, zeigen die Ergebnisse der TZS. Auf die Positivkontrolle reagierten 95% der Proben mit einer Zytokinproduktion- wichtige Marker für eine funktionelle Antwort vitaler Lymphozyten. Allerdings bleibt zu erwähnen, dass sich funktionelle Veränderungen auf seltenere Populationen wie die MDA- reaktiven- T- Zellen stärker auswirken könnten (siehe 4.3.3).

#### **4.3.4 Fehlende HLA- Typisierung**

Ein wesentlicher methodischer Limitationsfaktor besteht darin, dass vor der T- Zell-Stimulation keine HLA-Typisierung der Patienten erfolgte. Um trotz der HLA- Abhängigkeit der Antigenpräsentation eine breite T- Zell- Antwort zu ermöglichen, wurden Pools mit überlappenden Peptidsequenzen verwendet.

Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein Teil der verwendeten Peptide in manchen Proben keine adäquate Bindung und Präsentation vermittelte. Dies könnte zu einer Unterschätzung der tatsächlich vorhandenen Antigen-spezifischen T-Zellantwort geführt haben.

#### **4.3.5 Geringe Fallzahl**

Eine weitere Limitation der vorliegenden Arbeit stellen die geringen Fallzahlen in beiden Versuchsteilen dar. Aufgrund der hohen Zellzahlen, die in den WLK benötigt wurden, um weitere Versuche durchzuführen, konnte ein Großteil der WLK nicht verwendet werden (siehe 3.2.1 und 3.3.1). Entsprechend gering sind die Fallzahlen in beiden Versuchsteilen.

Versuchsteil I diente einer orientierenden Einschätzung verschiedener Einflussfaktoren auf die Qualität der WLK, sodass die geringe statistische Power hierbei bewusst in Kauf genommen wurde.

In Versuchsteil II ist die statistische Power durch die begrenzte Anzahl an untersuchten Proben reduziert, wodurch insbesondere schwächere Effekte möglicherweise nicht erfasst wurden. Zudem schränkt die geringe Stichprobengröße die Generalisierbarkeit der Ergebnisse ein. Die Befunde sind daher mit Vorsicht zu interpretieren und sollten in zukünftigen Studien mit größeren Kohorten überprüft werden.

## 5 Zusammenfassung

Erkenntnisse zur Wechselbeziehung zwischen Immunsystem und Tumor haben die Therapie des Melanoms revolutioniert. Immuntherapien sind heute fester Bestandteil der Leitlinien und haben die Prognose selbst fortgeschrittener Stadien verbessert.

Der WLK ist der erste Lymphknoten im Lymphabstromgebiet des Tumors. Er ist nicht nur Ort der primären Metastasierung, sondern spielt auch eine zentrale Rolle bei der Tumorimmunantwort.

Die LDI nach Ulmer und Kollegen ist ein besonders sensitives Verfahren, um Mikrometastasen in den WLK zu detektieren (Ulmer et al., 2005). Sie ist am Universitätsklinikum Tübingen als akkreditierte Methode fest in die diagnostischen Abläufe integriert. Dabei übriggebliebene Zellsuspension wird seit 2021 nicht mehr verworfen, sondern zum Aufbau einer Biobank kryokonserviert, sofern die Zustimmung des Patienten vorliegt.

Die Verwendung von nach der LDI übriggebliebener Zellsuspension eröffnet einzigartige Möglichkeiten, das Immunrepertoire in den WLK von Melanompatienten zu untersuchen. Im ersten Versuchsteil wurde der Einfluss des Aufarbeitungszeitpunkts und der Kryokonservierung auf die Vitalität und zelluläre Zusammensetzung per FACS- Analyse untersucht. Die Zwischenlagerung in RPMI/FCS- Medium und Aufarbeitung am Folgetag scheint keinen wesentlichen Einfluss auf die Vitalität und zelluläre Zusammensetzung der WLK zu haben. Die Kryokonservierung verursacht einen Abfall der Vitalität und eine fragliche Verschiebung des CD4/ CD8- Verhältnisses. Auswirkungen auf die Funktionalität wurden mit der Methodik nicht ausreichend erfasst. Die Literaturrecherche ergab jedoch, dass diese wahrscheinlich sind. Da eine Kryokonservierung der WLK aus Praktikabilitätsgründen meist notwendig ist, sollten mögliche Auswirkungen auf die Funktionalität weiter spezifiziert werden.

In Versuchsteil II erfolgte eine In- vitro- T- Zellstimulation von aufgetauten Zellsuspensionen mit Protein- überspannenden MDA- Peptidpools. MDAs sind weit verbreitete Tumor- assoziierte Antigene und somit eine potenzielle Zielstruktur verschiedener Immuntherapien. Jedoch sind

Immuntoleranzmechanismen besonders ausgeprägt, da MDAs auch auf gesunden Melanozyten exprimiert werden. In einigen untersuchten WLK konnten MDA- reaktive T- Zellen nachgewiesen werden. Alle vier untersuchten MDAs (gp100, MLANA, TRP2 und Tyrosinase) riefen mindestens einmal eine T- Zell-Reaktion hervor. Nach Ausschluss der WLK mit Reaktivität in der Negativkontrolle bzw. fehlender Reaktivität in der Positivkontrolle verblieben 18 WLK. Davon reagierten fünf WLK mit den CD8+- Zellen und sechs WLK mit den CD4+- Zellen auf die MDA- Peptidpools. Die Reaktivität fiel im Vergleich zur Positivkontrolle jedoch deutlich geringer und mit einem veränderten Zytokin-Expressionsmuster aus. Immuntoleranzmechanismen sowie Einflüsse der Kryokonservierung sind hierfür mögliche Erklärungen. Ein Einfluss des Status des WLK auf die Reaktivität konnte nicht nachgewiesen werden. Ebenso konnte kein Muster in mehreren WLK desselben Patienten erkannt werden. Jedoch sei hier auf die geringe Fallzahl verwiesen.

Zusammenfassend verdeutlicht diese Arbeit die Bedeutung der WLK bei der Immunüberwachung des Melanoms. Es zeigten sich dort nachweisbare T- Zell-Reaktivitäten gegen MDAs. Eine genauere Charakterisierung dieser Zellen z.B. mittels TZR- Sequenzierungen sowie Single- Cell- Analysen, sowie der Vergleich mit TILs und PBMCs könnten zum Verständnis der antitumoralen Immunantwort und der tumorinduzierten Immunsuppression beitragen. Die Verwendung von nach der LDI übriggebliebener Zellsuspension eröffnet hierfür neuartige Möglichkeiten.

## 6 Literaturverzeichnis

Abrahamsen, H.N., Sorensen, B.S., Nexø, E., Hamilton-Dutoit, S.J., Larsen, J., Steiniche, T., 2005. Pathologic assessment of melanoma sentinel nodes: a role for molecular analysis using quantitative real-time reverse transcription-PCR for MART-1 and tyrosinase messenger RNA. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 11, 1425–1433. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1193>

Ali, Z., Yousaf, N., Larkin, J., 2013. Melanoma epidemiology, biology and prognosis. *Eur. J. Cancer Suppl.* 11, 81–91.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejcsup.2013.07.012>

Armitage, R.J., Fanslow, W.C., Strockbine, L., Sato, T.A., Clifford, K.N., Macduff, B.M., Anderson, D.M., Gimpel, S.D., Davis-Smith, T., Maliszewski, C.R., Clark, E.A., Smith, C.A., Grabstein, K.H., Cosman, D., Spriggs, M.K., 1992. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature* 357, 80–82. <https://doi.org/10.1038/357080a0>

Bade-Doding, C., Theodossis, A., Gras, S., Kjer-Nielsen, L., Eiz-Vesper, B., Seltsam, A., Huyton, T., Rossjohn, J., McCluskey, J., Blasczyk, R., 2011. The impact of human leukocyte antigen (HLA) micropolymorphism on ligand specificity within the HLA-B\*41 allotypic family. *Haematologica* 96, 110–118.  
<https://doi.org/10.3324/haematol.2010.030924>

Bafounta, M.-L., Beauchet, A., Chagnon, S., Saiag, P., 2004. Ultrasonography or palpation for detection of melanoma nodal invasion: a meta-analysis. *Lancet Oncol.* 5, 673–680. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(04\)01609-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(04)01609-2)

Balabanov, K., Andreev, V.C., Tchernozemski, I., 1969. Malignant Melanoma and Vitiligo. *Dermatology* 139, 211–219. <https://doi.org/10.1159/000253915>

Berk-Krauss, J., Stein, J.A., Weber, J., Polsky, D., Geller, A.C., 2020. New Systematic Therapies and Trends in Cutaneous Melanoma Deaths Among US Whites, 1986–2016. *Am. J. Public Health* 110, 731–733.  
<https://doi.org/10.2105/AJPH.2020.305567>

Blank, C.U., Lucas, M.W., Scolyer, R.A., Van De Wiel, B.A., Menzies, A.M., Lopez-Yurda, M., Hoeijmakers, L.L., Saw, R.P.M., Lijnsvelt, J.M., Maher, N.G., Pulleman, S.M., Gonzalez, M., Torres Acosta, A., Van Houdt, W.J., Lo, S.N., Kuijpers, A.M.J., Spillane, A., Klop, W.M.C., Pennington, T.E., Zuur, C.L., Shannon, K.F., Seinstra, B.A., Rawson, R.V., Haanen, J.B.A.G., Ch'ng, S., Naipal, K.A.T., Stretch, J., Van Thienen, J.V., Rtshiladze, M.A., Wilgenhof, S., Kapoor, R., Meerveld-Eggink, A., Grijpink-Ongering, L.G., Van Akkooi, A.C.J., Reijers, I.L.M., Gyorki, D.E., Grünhagen, D.J., Speetjens, F.M., Vlieg, S.B., Placzke, J., Spain, L., Stassen, R.C., Amini-Adle, M., Lebbé, C., Faries, M.B., Robert, C., Ascierto, P.A., Van Rijn, R., Van Den Berkmortel, F.W.P.J., Piersma, D., Van Der Westhuizen, A., Vreugdenhil, G., Aarts, M.J.B., Stevensen-den Boer, M.A.M., Atkinson, V., Khattak, M., Andrews, M.C., Van Den Eertwegh, A.J.M., Boers-Sonderen, M.J., Hospers, G.A.P., Carlino, M.S., De Groot, J.-W.B., Kapiteijn, E., Suijkerbuijk, K.P.M., Rutkowski, P., Sandhu, S., Van Der Veldt, A.A.M., Long, G.V., 2024. Neoadjuvant Nivolumab and Ipilimumab in Resectable Stage III Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 391, 1696–1708. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2402604>

Bloem, M., De Meza, M.M., Van Den Eertwegh, A.J.M., Aarts, M.J.B., Van Den Berkmortel, F.W.P.J., Blank, C.U., Blokx, W.A.M., Boers-Sonderen, M.J., Bonenkamp, J.J., Boreel, C.D.M., De Groot, J.W.B., Haanen, J.B.A.G., Hospers, G.A.P., Kapiteijn, E., Van Not, O.J., Piersma, D., Rikhof, B., Stevensen-den Boer, A.M., Van Der Veldt, A.A.M., Vreugdenhil, G., Suijkerbuijk, K.P.M., Wouters, M.W.J.M., 2025. Adjuvant BRAF/MEK versus anti-PD-1 in BRAF-mutant melanoma: a propensity score matched survival analysis. *Br. J. Cancer* 132, 1124–1130. <https://doi.org/c>

Breslow, A., 1970. Thickness, Cross-Sectional Areas and Depth of Invasion in the Prognosis of Cutaneous Melanoma: *Ann. Surg.* 172, 902–908. <https://doi.org/10.1097/00000658-197011000-00017>

Brichard, V., Van Pel, A., Wölfel, T., Wölfel, C., De Plaen, E., Lethé, B., Coulie, P., Boon, T., 1993. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by

autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J. Exp. Med.* 178, 489–495. <https://doi.org/10.1084/jem.178.2.489>

Brincat, P., Degaetano, J., Donaldson, C., 2012. Evaluation of a method allowing preservation of fresh lymph nodes for flow cytometric immunophenotyping. *Cytometry B Clin. Cytom.* 82B, 245–251. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21021>

Charles, J., Mouret, S., Challende, I., Leccia, M., De Fraipont, F., Perez, S., Plantier, N., Plumas, J., Manuel, M., Chaperot, L., Aspod, C., 2020. T-cell receptor diversity as a prognostic biomarker in melanoma patients. *Pigment Cell Melanoma Res.* 33, 612–624. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12866>

Chen, D.S., Mellman, I., 2013. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity* 39, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.012>

Chen, Y., Sidney, J., Southwood, S., Cox, A.L., Sakaguchi, K., Henderson, R.A., Appella, E., Hunt, D.F., Sette, A., Engelhard, V.H., 1994. Naturally processed peptides longer than nine amino acid residues bind to the class I MHC molecule HLA-A2.1 with high affinity and in different conformations. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 152, 2874–2881.

Chen, Y.T., Stockert, E., Jungbluth, A., Tsang, S., Coplan, K.A., Scanlan, M.J., Old, L.J., 1996. Serological analysis of Melan-A(MART-1), a melanocyte-specific protein homogeneously expressed in human melanomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 5915–5919. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.12.5915>

Cochran, A.J., Huang, R.-R., Lee, J., Itakura, E., Leong, S.P.L., Essner, R., 2006. Tumour-induced immune modulation of sentinel lymph nodes. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 659–670. <https://doi.org/10.1038/nri1919>

Coulie, P.G., Brichard, V., Van Pel, A., Wölfel, T., Schneider, J., Traversari, C., Mattei, S., De Plaen, E., Lurquin, C., Szikora, J.P., Renauld, J.C., Boon, T., 1994. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J. Exp. Med.* 180, 35–42. <https://doi.org/10.1084/jem.180.1.35>

Cui, J.-H., Lin, K.-R., Yuan, S.-H., Jin, Y.-B., Chen, X.-P., Su, X.-K., Jiang, J., Pan, Y.-M., Mao, S.-L., Mao, X.-F., Luo, W., 2018. TCR Repertoire as a Novel Indicator for Immune Monitoring and Prognosis Assessment of Patients With Cervical Cancer. *Front. Immunol.* 9, 2729.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02729>

Delclaux, I., Ventre, K.S., Jones, D., Lund, A.W., 2024. The tumor-draining lymph node as a reservoir for systemic immune surveillance. *Trends Cancer* 10, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2023.09.006>

Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF, 2020. Leitlinienprogramm Onkologie: Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms (No. AWMF Registernummer: 032/024OL), S3-Leitlinie Prävention von Hautkrebs, Langversion. Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF.

Dinnes, J., Deeks, J.J., Chuchu, N., Ferrante di Ruffano, L., Matin, R.N., Thomson, D.R., Wong, K.Y., Aldridge, R.B., Abbott, R., Fawzy, M., Bayliss, S.E., Grainge, M.J., Takwoingi, Y., Davenport, C., Godfrey, K., Walter, F.M., Williams, H.C., Cochrane Skin Cancer Diagnostic Test Accuracy Group, 2018. Dermoscopy, with and without visual inspection, for diagnosing melanoma in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* 12, CD011902.  
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD011902.pub2>

Eggermont, A.M.M., Chiarion-Sileni, V., Grob, J.-J., Dummer, R., Wolchok, J.D., Schmidt, H., Hamid, O., Robert, C., Ascierto, P.A., Richards, J.M., Lebbé, C., Ferraresi, V., Smylie, M., Weber, J.S., Maio, M., Konto, C., Hoos, A., De Pril, V., Gurunath, R.K., De Schaetzen, G., Suci, S., Testori, A., 2015. Adjuvant ipilimumab versus placebo after complete resection of high-risk stage III melanoma (EORTC 18071): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 16, 522–530. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70122-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70122-1)

Eggermont, A.M.M., Kicinski, M., Blank, C.U., Mandalá, M., Long, G.V., Atkinson, V., Dalle, S., Haydon, A., Khattak, A., Carlino, M.S., Sandhu, S., Larkin, J., Puig, S., Ascierto, P.A., Rutkowski, P., Schadendorf, D., Koornstra,

R., Hernandez-Aya, L., Di Giacomo, A.M., van den Eertwegh, A.J.M., Grob, J.-J., Gutzmer, R., Jamal, R., Lorigan, P.C., Krepler, C., Ibrahim, N., Marreaud, S., van Akkooi, A., Robert, C., Suci, S., 2020. Association Between Immune-Related Adverse Events and Recurrence-Free Survival Among Patients With Stage III Melanoma Randomized to Receive Pembrolizumab or Placebo: A Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 6, 519–527. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.5570>

Elder, D.E., Bastian, B.C., Cree, I.A., Massi, D., Scolyer, R.A., 2020. The 2018 World Health Organization Classification of Cutaneous, Mucosal, and Uveal Melanoma: Detailed Analysis of 9 Distinct Subtypes Defined by Their Evolutionary Pathway. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 144, 500–522. <https://doi.org/10.5858/arpa.2019-0561-RA>

Elgueta, R., Benson, M.J., De Vries, V.C., Wasiuk, A., Guo, Y., Noelle, R.J., 2009. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol. Rev.* 229, 152–172. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00782.x>

Faries, M.B., Thompson, J.F., Cochran, A.J., Andtbacka, R.H., Mozzillo, N., Zager, J.S., Jahkola, T., Bowles, T.L., Testori, A., Beitsch, P.D., Hoekstra, H.J., Moncrieff, M., Ingvar, C., Wouters, M.W.J.M., Sabel, M.S., Levine, E.A., Agnese, D., Henderson, M., Dummer, R., Rossi, C.R., Neves, R.I., Trocha, S.D., Wright, F., Byrd, D.R., Matter, M., Hsueh, E., MacKenzie-Ross, A., Johnson, D.B., Terheyden, P., Berger, A.C., Huston, T.L., Wayne, J.D., Smithers, B.M., Neuman, H.B., Schneebaum, S., Gershenwald, J.E., Ariyan, C.E., Desai, D.C., Jacobs, L., McMasters, K.M., Gesierich, A., Hersey, P., Bines, S.D., Kane, J.M., Barth, R.J., McKinnon, G., Farma, J.M., Schultz, E., Vidal-Sicart, S., Hofer, R.A., Lewis, J.M., Scheri, R., Kelley, M.C., Nieweg, O.E., Noyes, R.D., Hoon, D.S.B., Wang, H.-J., Elashoff, D.A., Elashoff, R.M., 2017. Completion Dissection or Observation for Sentinel-Node Metastasis in Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 376, 2211–2222. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1613210>

Farrow, N.E., Turner, M.C., Salama, A.K.S., Beasley, G.M., 2020. Overall Survival Improved for Contemporary Patients with Melanoma: A 2004–2015 National Cancer Database Analysis. *Oncol. Ther.* 8, 261–275.  
<https://doi.org/10.1007/s40487-020-00117-1>

Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D.M., Piñeros, M., Znaor, A., Bray, F., 2021. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int. J. Cancer* 149, 778–789. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>

Frauchiger, A.L., Dummer, R., Mangana, J., 2019. Serum S100B Levels in Melanoma, in: Heizmann, C.W. (Ed.), *Calcium-Binding Proteins of the EF-Hand Superfamily, Methods in Molecular Biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 691–700. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9030-6\\_43](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9030-6_43)

Frentsch, M., Arbach, O., Kirchhoff, D., Moewes, B., Worm, M., Rothe, M., Scheffold, A., Thiel, A., 2005. Direct access to CD4<sup>+</sup> T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. *Nat. Med.* 11, 1118–1124.  
<https://doi.org/10.1038/nm1292>

Gandini, S., Sera, F., Cattaruzza, M.S., Pasquini, P., Abeni, D., Boyle, P., Melchi, C.F., 2005. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 41, 28–44.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2004.10.015>

Gershenwald, J.E., Scolyer, R.A., Hess, K.R., Sondak, V.K., Long, G.V., Ross, M.I., Lazar, A.J., Faries, M.B., Kirkwood, J.M., McArthur, G.A., Haydu, L.E., Eggermont, A.M.M., Flaherty, K.T., Balch, C.M., Thompson, J.F., for members of the American Joint Committee on Cancer Melanoma Expert Panel and the International Melanoma Database and Discovery Platform, 2017. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual: Melanoma Staging: AJCC 8<sup>th</sup> Edition. *CA. Cancer J. Clin.* 67, 472–492. <https://doi.org/10.3322/caac.21409>

Gershenwald, J.E., Tseng, C.H., Thompson, W., Mansfield, P.F., Lee, J.E., Bouvet, M., Lee, J.J., Ross, M.I., 1998. Improved sentinel lymph node

localization in patients with primary melanoma with the use of radiolabeled colloid. *Surgery* 124, 203–210.

Gómez-Mora, E., Carrillo, J., Urrea, V., Rigau, J., Alegre, J., Cabrera, C., Oltra, E., Castro-Marrero, J., Blanco, J., 2020. Impact of Long-Term Cryopreservation on Blood Immune Cell Markers in Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome: Implications for Biomarker Discovery. *Front. Immunol.* 11, 582330. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.582330>

Grotz, T.E., Markovic, S.N., Erickson, L.A., Harmsen, W.S., Huebner, M., Farley, D.R., Pockaj, B.A., Donohue, J.H., Sim, F.H., Grant, C.S., Bagaria, S.P., Shives, T.C., Balch, C.M., Jakub, J.W., 2011. Mayo Clinic Consensus Recommendations for the Depth of Excision in Primary Cutaneous Melanoma. *Mayo Clin. Proc.* 86, 522–528. <https://doi.org/10.4065/mcp.2011.0059>

Guo, H.-C., Jardetzky, T.S., Garrettt, T.P.J., Lane, W.S., Strominger, J.L., Wiley, D.C., 1992. Different length peptides bind to HLA-Aw68 similarly at their ends but bulge out in the middle. *Nature* 360, 364–366. <https://doi.org/10.1038/360364a0>

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. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0387-x>

Hassel, J.C., Piperno-Neumann, S., Rutkowski, P., Baurain, J.-F., Schlaak, M., Butler, M.O., Sullivan, R.J., Dummer, R., Kirkwood, J.M., Orloff, M., Sacco, J.J., Ochsenreither, S., Joshua, A.M., Gastaud, L., Curti, B., Piulats, J.M., Salama, A.K.S., Shoushtari, A.N., Demidov, L., Milhem, M., Chmielowski, B., Kim, K.B., Carvajal, R.D., Hamid, O., Collins, L., Ranade, K., Holland, C., Pfeiffer, C., Nathan, P., 2023. Three-Year Overall Survival with Tebentafusp in Metastatic Uveal Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 389, 2256–2266. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2304753>

Hollingsworth, R.E., Jansen, K., 2019. Turning the corner on therapeutic cancer vaccines. *Npj Vaccines* 4, 7. <https://doi.org/10.1038/s41541-019-0103-y>

Hussaini, S., Chehade, R., Boldt, R.G., Raphael, J., Blanchette, P., Vareki, S.M., Fernandes, R., 2021. Association between immune-related side effects and efficacy and benefit of immune checkpoint inhibitors – A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat. Rev.* 92.

<https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2020.102134>

Hussussian, C.J., Struewing, J.P., Goldstein, A.M., Higgins, P.A.T., Ally, D.S., Sheahan, M.D., Clark, W.H., Tucker, M.A., Dracopoli, N.C., 1994. Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat. Genet.* 8, 15–21.

<https://doi.org/10.1038/ng0994-15>

Jantet-Blaudez, F., Ruiz, J., Gautheron, S., Pagnon, A., 2025. Evaluation of the viability and functionality of human peripheral blood mononuclear cells cryopreserved up to 2 years in animal-protein-free freezing media compared to the FBS-supplemented reference medium. *Front. Immunol.* 16, 1627973.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1627973>

Kambayashi, T., Laufer, T.M., 2014. Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell? *Nat. Rev. Immunol.* 14, 719–730. <https://doi.org/10.1038/nri3754>

Kawakami, Y., Eliyahu, S., Delgado, C.H., Robbins, P.F., Rivoltini, L., Topalian, S.L., Miki, T., Rosenberg, S.A., 1994. Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 3515–3519.

Keim, U., Gandini, S., Amaral, T., Katalinic, A., Holleczeck, B., Flatz, L., Leiter, U., Whiteman, D., Garbe, C., 2021. Cutaneous melanoma attributable to UVR exposure in Denmark and Germany. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 159, 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2021.09.044>

Kempf, W., Hantschke, M., Kutzner, H., 2020. Melanozytäre Läsionen, in: Kempf, W., Hantschke, M., Kutzner, H., Burgdorf, W. (Eds.), *Dermatopathologie*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 207–243.

[https://doi.org/10.1007/978-3-662-59240-3\\_22](https://doi.org/10.1007/978-3-662-59240-3_22)

Koh, H.K., Sober, A.J., Nakagawa, H., Albert, D.M., Mihm, M.C., Fitzpatrick, T.B., 1983. Malignant melanoma and vitiligo-like leukoderma: An electron microscopic study. *J. Am. Acad. Dermatol.* 9, 696–708.

[https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(83\)70183-0](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(83)70183-0)

Lai, X., Wichers, H.J., Soler-Lopez, M., Dijkstra, B.W., 2018. Structure and Function of Human Tyrosinase and Tyrosinase-Related Proteins. *Chem. – Eur. J.* 24, 47–55. <https://doi.org/10.1002/chem.201704410>

Lee, H.-G., Cho, M.-J., Choi, J.-M., 2020. Bystander CD4<sup>+</sup> T cells: crossroads between innate and adaptive immunity. *Exp. Mol. Med.* 52, 1255–1263.

<https://doi.org/10.1038/s12276-020-00486-7>

Leiter, U., Stadler, R., Mauch, C., Hohenberger, W., Brockmeyer, N.H., Berking, C., Sunderkötter, C., Kaatz, M., Schatton, K., Lehmann, P., Vogt, T., Ulrich, J., Herbst, R., Gehring, W., Simon, J.-C., Keim, U., Verver, D., Martus, P., Garbe, C., German Dermatologic Cooperative Oncology Group, 2019. Final Analysis of DeCOG-SLT Trial: No Survival Benefit for Complete Lymph Node Dissection in Patients With Melanoma With Positive Sentinel Node. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 37, 3000–3008. <https://doi.org/10.1200/JCO.18.02306>

Lens, M.B., Dawes, M., Goodacre, T., Newton-Bishop, J.A., 2002. Elective Lymph Node Dissection in Patients With Melanoma: Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Arch. Surg.* 137.

<https://doi.org/10.1001/archsurg.137.4.458>

Linder, A., Portmann, K., Eyer, K., 2024. The impact of cryopreservation on cytokine secretion and polyfunctionality in human PBMCs: a comparative study. *Front. Immunol.* 15, 1478311. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1478311>

Livingstone, E., Zimmer, L., Hassel, J.C., Fluck, M., Eigentler, T.K., Loquai, C., Haferkamp, S., Gutzmer, R., Meier, F., Mohr, P., Hauschild, A., Schilling, B., Menzer, C., Kiecker, F., Dippel, E., Roesch, A., Ziemer, M., Conrad, B., Körner, S., Windemuth-Kieselbach, C., Schwarz, L., Garbe, C., Becker, J.C., Schadendorf, D., Dermatologic Cooperative Oncology Group, 2022. Adjuvant nivolumab plus ipilimumab or nivolumab alone versus placebo in patients with

resected stage IV melanoma with no evidence of disease (IMMUNED): final results of a randomised, double-blind, phase 2 trial. *Lancet Lond. Engl.* 400, 1117–1129. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)01654-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)01654-3)

Long, G.V., Menzies, A.M., Nagrial, A.M., Haydu, L.E., Hamilton, A.L., Mann, G.J., Hughes, T.M., Thompson, J.F., Scolyer, R.A., Kefford, R.F., 2011. Prognostic and Clinicopathologic Associations of Oncogenic *BRAF* in Metastatic Melanoma. *J. Clin. Oncol.* 29, 1239–1246. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.32.4327>

Long, G.V., Stroyakovskiy, D., Gogas, H., Levchenko, E., De Braud, F., Larkin, J., Garbe, C., Jouary, T., Hauschild, A., Grob, J.J., Chiarion Sileni, V., Lebbe, C., Mandalà, M., Millward, M., Arance, A., Bondarenko, I., Haanen, J.B.A.G., Hansson, J., Utikal, J., Ferraresi, V., Kovalenko, N., Mohr, P., Probachai, V., Schadendorf, D., Nathan, P., Robert, C., Ribas, A., DeMarini, D.J., Irani, J.G., Casey, M., Ouellet, D., Martin, A.-M., Le, N., Patel, K., Flaherty, K., 2014. Combined BRAF and MEK Inhibition versus BRAF Inhibition Alone in Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 371, 1877–1888. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1406037>

Long, G.V., Swetter, S.M., Menzies, A.M., Gershenwald, J.E., Scolyer, R.A., 2023. Cutaneous melanoma. *The Lancet* 402, 485–502. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)00821-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)00821-8)

Ma, M.W., Medicherla, R.C., Qian, M., Vega-Saenz De Miera, E., Friedman, E.B., Berman, R.S., Shapiro, R.L., Pavlick, A.C., Ott, P.A., Bhardwaj, N., Shao, Y., Osman, I., Darvishian, F., 2012. Immune response in melanoma: an in-depth analysis of the primary tumor and corresponding sentinel lymph node. *Mod. Pathol.* 25, 1000–1010. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.43>

Maecker, H.T., Dunn, H.S., Suni, M.A., Khatamzas, E., Pitcher, C.J., Bunde, T., Persaud, N., Trigona, W., Fu, T.-M., Sinclair, E., Bredt, B.M., McCune, J.M., Maino, V.C., Kern, F., Picker, L.J., 2001. Use of overlapping peptide mixtures as antigens for cytokine flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 255, 27–40. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(01\)00416-1](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(01)00416-1)

Maher, V.E., Fernandes, L.L., Weinstock, C., Tang, S., Agarwal, S., Brave, M., Ning, Y., Singh, H., Suzman, D., Xu, J., Goldberg, K.B., Sridhara, R., Ibrahim, A., Theoret, M., Beaver, J.A., Pazdur, R., 2019. Analysis of the Association Between Adverse Events and Outcome in Patients Receiving a Programmed Death Protein 1 or Programmed Death Ligand 1 Antibody. *J. Clin. Oncol.* 37, 2730–2737. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.00318>

Mason, D., 1998. A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunol. Today* 19, 395–404. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(98\)01299-7](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(98)01299-7)

McGovern, V.J., 1971. The classification of melanoma. *Minn. Med.* 54, 426–428.

Mellemgaard, C., Christensen, I.J., Salkus, G., Wrenfeldt Staun, P., Korsgaard, N., Hein Lindahl, K., Skaarup Larsen, M., Klausen, S., Lade-Keller, J., 2023. Reducing workload in malignant melanoma sentinel node examination: a national study of pathology reports from 507 melanoma patients. *J. Clin. Pathol.* jcp-2022-208743. <https://doi.org/10.1136/jcp-2022-208743>

Mellman, I., Chen, D.S., Powles, T., Turley, S.J., 2023. The cancer-immunity cycle: Indication, genotype, and immunotype. *Immunity* 56, 2188–2205. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2023.09.011>

Mihm, M.C., Clark, W.H., From, L., 1971. The Clinical Diagnosis, Classification and Histogenetic Concepts of the Early Stages of Cutaneous Malignant Melanomas. *N. Engl. J. Med.* 284, 1078–1082. <https://doi.org/10.1056/NEJM197105132841907>

Min, Q., Lv, Q., Jiang, L., Chen, Q., Peng, J., Zhou, H., Zhou, Ju, Dai, Q., Zhou, Jianyun, Huang, Q., 2025. The Effect of Cryopreservation on T-Cell Subsets by Flow Cytometry Automated Algorithmic Analysis and Conventional Analysis. *J. Clin. Lab. Anal.* 39, e25146. <https://doi.org/10.1002/jcla.25146>

Morton, D.L., 1992. Technical Details of Intraoperative Lymphatic Mapping for Early Stage Melanoma. *Arch. Surg.* 127, 392. <https://doi.org/10.1001/archsurg.1992.01420040034005>

Morton, D.L., Cochran, A.J., Thompson, J.F., Elashoff, R., Essner, R., Glass, E.C., Mozzillo, N., Nieweg, O.E., Roses, D.F., Hoekstra, H.J., Karakousis, C.P., Reintgen, D.S., Coventry, B.J., Wang, H., Multicenter Selective Lymphadenectomy Trial Group, 2005. Sentinel node biopsy for early-stage melanoma: accuracy and morbidity in MSLT-I, an international multicenter trial. *Ann. Surg.* 242, 302–311; discussion 311-313.  
<https://doi.org/10.1097/01.sla.0000181092.50141.fa>

Nishimura, M.I., Avichezer, D., Custer, M.C., Lee, C.S., Chen, C., Parkhurst, M.R., Diamond, R.A., Robbins, P.F., Schwartzentruber, D.J., Rosenberg, S.A., 1999. MHC class I-restricted recognition of a melanoma antigen by a human CD4+ tumor infiltrating lymphocyte. *Cancer Res.* 59, 6230–6238.

Núñez, 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., Ali, O.H., Bomze, D., Dimitriou, F., Diem, S., Ascierto, P.A., Dummer, R., Jäger, E., Driessen, C., Levesque, M.P., Veen, W. van de, 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. <https://doi.org/10.1016/j.medj.2022.12.007>

Oliveira, G., Stromhaug, K., Klaeger, S., Kula, T., Frederick, D.T., Le, P.M., Forman, J., Huang, T., Li, S., Zhang, W., Xu, Q., Cieri, N., Clauser, K.R., Shukla, S.A., Neuberg, D., Justesen, S., MacBeath, G., Carr, S.A., Fritsch, E.F., Hacohen, N., Sade-Feldman, M., Livak, K.J., Boland, G.M., Ott, P.A., Keskin, D.B., Wu, C.J., 2021. Phenotype, specificity and avidity of antitumour CD8+ T cells in melanoma. *Nature* 596, 119–125. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03704-y>

Olsen, C.M., Carroll, H.J., Whiteman, D.C., 2010. Estimating the attributable fraction for melanoma: a meta-analysis of pigmentary characteristics and freckling. *Int. J. Cancer* 127, 2430–2445. <https://doi.org/10.1002/ijc.25243>

Orosz, Z., 1999. Melan-A/Mart-1 expression in various melanocytic lesions and in non-melanocytic soft tissue tumours. *Histopathology* 34, 517–525.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1999.00679.x>

Palermo, B., Campanelli, R., Garbelli, S., Mantovani, S., Lantelme, E., Brazzelli, V., Ardigó, M., Borroni, G., Martinetti, M., Badulli, C., Necker, A., Giachino, C., 2001. Specific Cytotoxic T Lymphocyte Responses Against Melan-A/MART1, Tyrosinase and Gp100 in Vitiligo by the Use of Major Histocompatibility Complex/Peptide Tetramers: the Role of Cellular Immunity in the Etiopathogenesis of Vitiligo. *J. Invest. Dermatol.* 117, 326–332.

<https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2001.01408.x>

Patel, S.P., Othus, M., Chen, Y., Wright, G.P., Yost, K.J., Hyngstrom, J.R., Hu-Lieskovan, S., Lao, C.D., Fecher, L.A., Truong, T.-G., Eisenstein, J.L., Chandra, S., Sosman, J.A., Kendra, K.L., Wu, R.C., Devoe, C.E., Deutsch, G.B., Hegde, A., Khalil, M., Mangla, A., Reese, A.M., Ross, M.I., Poklepovic, A.S., Phan, G.Q., Onitilo, A.A., Yasar, D.G., Powers, B.C., Doolittle, G.C., In, G.K., Kokot, N., Gibney, G.T., Atkins, M.B., Shaheen, M., Warneke, J.A., Ikeguchi, A., Najera, J.E., Chmielowski, B., Crompton, J.G., Floyd, J.D., Hsueh, E., Margolin, K.A., Chow, W.A., Grossmann, K.F., Dietrich, E., Prieto, V.G., Lowe, M.C., Buchbinder, E.I., Kirkwood, J.M., Korde, L., Moon, J., Sharon, E., Sondak, V.K., Ribas, A., 2023. Neoadjuvant–Adjuvant or Adjuvant-Only Pembrolizumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 388, 813–823.

<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2211437>

Poloni, C., Schonhofer, C., Ivison, S., Levings, M.K., Steiner, T.S., Cook, L., 2023. T-cell activation–induced marker assays in health and disease. *Immunol. Cell Biol.* 101, 491–503. <https://doi.org/10.1111/imcb.12636>

Purde, M.-T., Cupovic, J., Palmowski, Y.A., Makky, A., Schmidt, S., Rochwarger, A., Hartmann, F., Stemeseder, F., Lercher, A., Abdou, M.-T., Bomze, D., Besse, L., Berner, F., Tüting, T., Hölzel, M., Bergthaler, A., Kochanek, S., Ludewig, B., Lauterbach, H., Orlinger, K.K., Bald, T., Schietinger, A., Schürch, C.M., Ring, S.S., Flatz, L., 2024. A replicating LCMV-based

vaccine for the treatment of solid tumors. *Mol. Ther.* 32, 426–439.

<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2023.11.026>

Quaglino, P., Marenco, F., Osella-Abate, S., Cappello, N., Ortoncelli, M., Salomone, B., Fierro, M.T., Savoia, P., Bernengo, M.G., 2010. Vitiligo is an independent favourable prognostic factor in stage III and IV metastatic melanoma patients: results from a single-institution hospital-based observational cohort study. *Ann. Oncol.* 21, 409–414.

<https://doi.org/10.1093/annonc/mdp325>

Rammensee, H.-G., Friede, T., Stevanović, S., 1995. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41, 178–228.

<https://doi.org/10.1007/BF00172063>

Rani, U., Singh, M., Saith, A., Jain, S.L., Aggarwal, A., Aggarwal, S., 2022. Evaluation of Use of RPMI Medium to Preserve Cell Morphology for Pleural/Peritoneal Fluid Cytology. *J. Cytol.* 39, 26–29.

[https://doi.org/10.4103/joc.joc\\_130\\_21](https://doi.org/10.4103/joc.joc_130_21)

Renshaw, S.A., Gupta, S., Campos, M., Hodes, L., Renshaw, A.A., Gould, E.W., 2013. The addition of RPMI significantly improves the cellularity of cerebrospinal fluid cytology specimens over time. *Cancer Cytopathol.* 121, 271–274. <https://doi.org/10.1002/cncy.21243>

Robbins, H.A., Clarke, C.A., Arron, S.T., Tatalovich, Z., Kahn, A.R., Hernandez, B.Y., Paddock, L., Yanik, E.L., Lynch, C.F., Kasiske, B.L., Snyder, J., Engels, E.A., 2015. Melanoma Risk and Survival among Organ Transplant Recipients. *J. Invest. Dermatol.* 135, 2657–2665. <https://doi.org/10.1038/jid.2015.312>

Robert, C., Ribas, A., Schachter, J., Arance, A., Grob, J.-J., Mortier, L., Daud, A., Carlino, M.S., McNeil, C.M., Lotem, M., Larkin, J.M.G., Lorigan, P., Neyns, B., Blank, C.U., Petrella, T.M., Hamid, O., Su, S.-C., Krepler, C., Ibrahim, N., Long, G.V., 2019. Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma (KEYNOTE-006): post-hoc 5-year results from an open-label, multicentre, randomised, controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol.* 20, 1239–1251.

[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30388-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30388-2)

Robert Koch-Institut, 2016. Berichts zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016.  
<https://doi.org/10.17886/RKIPUBL-2016-014>

Roesch, A., Berking, C., 2018. Melanom, in: Plewig, G., Ruzicka, T., Kaufmann, R., Hertl, M. (Eds.), *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1869–1885.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-662-49544-5\\_105](https://doi.org/10.1007/978-3-662-49544-5_105)

Rossi, A.J., Verbus, E.A., Faries, M.B., Moncrieff, M., Henderson, M., Hernandez, J.M., Lowe, M.C., 2022. A Phase III, Multicenter, Randomized Controlled Trial Investigating 1-cm Versus 2-cm Surgical Excision Margins for Stage II Primary Cutaneous Melanoma (MelMarT-II). *Ann. Surg. Oncol.* 29, 4050–4051. <https://doi.org/10.1245/s10434-022-11766-z>

Sahin, U., Oehm, P., Derhovanessian, E., Jabulowsky, R.A., Vormehr, M., Gold, M., Maurus, D., Schwarck-Kokarakis, D., Kuhn, A.N., Omokoko, T., Kranz, L.M., Diken, M., Kreiter, S., Haas, H., Attig, S., Rae, R., Cuk, K., Kemmer-Brück, A., Breitkreuz, A., Tolliver, C., Caspar, J., Quinkhardt, J., Hebich, L., Stein, M., Hohberger, A., Vogler, I., Liebig, I., Renken, S., Sikorski, J., Leierer, M., Müller, V., Mitzel-Rink, H., Miederer, M., Huber, C., Grabbe, S., Utikal, J., Pinter, A., Kaufmann, R., Hassel, J.C., Loquai, C., Türeci, Ö., 2020. An RNA vaccine drives immunity in checkpoint-inhibitor-treated melanoma. *Nature* 585, 107–112. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2537-9>

Shaw, H.M., Patel, P.M., Payne, M., Kumar, S., Danson, S., Highley, M., Prasad, K., Board, R., Barlow, C., Larkin, J., Young, K., Fitzpatrick, A., Karydis, I., Marples, M., Lee, R., Corrie, P.G., Miller, R., Goodhew, G., Master, F., Durrant, L., 2024. A DNA plasmid melanoma cancer vaccine, SCIB1, combined with nivolumab + ipilimumab in patients with advanced unresectable melanoma: Efficacy and safety results from the open-label phase 2 SCOPE trial. *J. Clin. Oncol.* 42, 9535–9535. [https://doi.org/10.1200/JCO.2024.42.16\\_suppl.9535](https://doi.org/10.1200/JCO.2024.42.16_suppl.9535)

Shetuni, B., Lakey, M., Kulesza, P., 2012. Optimal specimen processing of fine needle aspirates of non-hodgkin lymphoma. *Diagn. Cytopathol.* 40, 984–986.  
<https://doi.org/10.1002/dc.21780>

Soura, E., Eliades, P.J., Shannon, K., Stratigos, A.J., Tsao, H., 2016. Hereditary melanoma: Update on syndromes and management: Genetics of familial atypical multiple mole melanoma syndrome. *J. Am. Acad. Dermatol.* 74, 395–407. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2015.08.038>

Spritz, R.A., Hearing, V.J., 2013. Abnormalities of Pigmentation, in: Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics. Elsevier, pp. 1–44. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-383834-6.00154-3>

Straten, P. thor, Dahl, C., Schrama, D., Pedersen, L.Ø., Andersen, M.H., Seremet, T., Bröcker, E.-B., Guldberg, P., Becker, J.C., 2006. Identification of identical TCRs in primary melanoma lesions and tumor free corresponding sentinel lymph nodes. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 55, 495–502. <https://doi.org/10.1007/s00262-005-0023-8>

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F., 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* 71, 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

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. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001604>

Ulmer, A., Fischer, J.R., Schanz, S., Sotlar, K., Breuninger, H., Dietz, K., Fierlbeck, G., Klein, C.A., 2005. Detection of Melanoma Cells Displaying Multiple Genomic Changes in Histopathologically Negative Sentinel Lymph Nodes. *Clin. Cancer Res.* 11, 5425–5432. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1995>

Utgés, D., Malmstedt, J., Teras, J., Drzewiecki, K., Gullestad, H.P., Ingvar, C., Eriksson, H., Gillgren, P., 2019. 2-cm versus 4-cm surgical excision margins for primary cutaneous melanoma thicker than 2 mm: long-term follow-up of a

multicentre, randomised trial. *The Lancet* 394, 471–477.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31132-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31132-8)

Van Der Leest, R.J.T., Flohil, S.C., Arends, L.R., De Vries, E., Nijsten, T., 2015. Risk of subsequent cutaneous malignancy in patients with prior melanoma: a systematic review and meta-analysis. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 29, 1053–1062. <https://doi.org/10.1111/jdv.12887>

van Diest, P.J., 1999. Histopathological workup of sentinel lymph nodes: how much is enough? *J. Clin. Pathol.* 52, 871–873. <https://doi.org/10.1136/jcp.52.12.871>

Voit, C., Van Akkooi, A.C.J., Schäfer-Hesterberg, G., Schoengen, A., Kowalczyk, K., Roewert, J.C., Sterry, W., Eggermont, A.M.M., 2010. Ultrasound Morphology Criteria Predict Metastatic Disease of the Sentinel Nodes in Patients With Melanoma. *J. Clin. Oncol.* 28, 847–852. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.25.7428>

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, 2207–2216. <https://doi.org/10.1084/jem.184.6.2207>

Weber, J.S., Schadendorf, D., Del Vecchio, M., Larkin, J., Atkinson, V., Schenker, M., Pigozzo, J., Gogas, H., Dalle, S., Meyer, N., Ascierto, P.A., Sandhu, S., Eigentler, T., Gutzmer, R., Hassel, J.C., Robert, C., Carlino, M.S., Di Giacomo, A.M., Butler, M.O., Muñoz-Couselo, E., Brown, M.P., Rutkowski, P., Haydon, A., Grob, J.-J., Schachter, J., Queirolo, P., de la Cruz-Merino, L., van der Westhuizen, A., Menzies, A.M., Re, S., Bas, T., de Pril, V., Braverman, J., Tenney, D.J., Tang, H., Long, G.V., 2023. Adjuvant Therapy of Nivolumab Combined With Ipilimumab Versus Nivolumab Alone in Patients With Resected Stage IIIB-D or Stage IV Melanoma (CheckMate 915). *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 41, 517–527. <https://doi.org/10.1200/JCO.22.00533>

Wheless, L., Black, J., Alberg, A.J., 2010. Nonmelanoma Skin Cancer and the Risk of Second Primary Cancers: a Systematic Review. *Cancer Epidemiol.*

Biomarkers Prev. 19, 1686–1695. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-0243>

Whiteman, D.C., Green, A.C., Olsen, C.M., 2016. The Growing Burden of Invasive Melanoma: Projections of Incidence Rates and Numbers of New Cases in Six Susceptible Populations through 2031. *J. Invest. Dermatol.* 136, 1161–1171. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.01.035>

Wolchinsky, R., Hod-Marco, M., Oved, K., Shen-Orr, S.S., Bendall, S.C., Nolan, G.P., Reiter, Y., 2014. Antigen-Dependent Integration of Opposing Proximal TCR-Signaling Cascades Determines the Functional Fate of T Lymphocytes. *J. Immunol.* 192, 2109–2119. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301142>

Wood, B., Padula, M.P., Marks, D.C., Johnson, L., 2021. Cryopreservation alters the immune characteristics of platelets. *Transfusion (Paris)* 61, 3432–3442. <https://doi.org/10.1111/trf.16697>

Yaddanapudi, K., Stamp, B.F., Subrahmanyam, P.B., Smolenkov, A., Waigel, S.J., Gosain, R., Egger, M.E., Martin, R.C.G., Buscaglia, R., Maecker, H.T., McMasters, K.M., Chesney, J.A., 2022. Single-Cell Immune Mapping of Melanoma Sentinel Lymph Nodes Reveals an Actionable Immunotolerant Microenvironment. *Clin. Cancer Res.* 28, 2069–2081. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-0664>

Yee, C., Thompson, J.A., Roche, P., Byrd, D.R., Lee, P.P., Piepkorn, M., Kenyon, K., Davis, M.M., Riddell, S.R., Greenberg, P.D., 2000. Melanocyte Destruction after Antigen-Specific Immunotherapy of Melanoma. *J. Exp. Med.* 192, 1637–1644. <https://doi.org/10.1084/jem.192.11.1637>

Yellin, M.J., Sippel, K., Inghirami, G., Covey, L.R., Lee, J.J., Sinning, J., Clark, E.A., Chess, L., Lederman, S., 1994. CD40 molecules induce down-modulation and endocytosis of T cell surface T cell-B cell activating molecule/CD40-L. Potential role in regulating helper effector function. *J. Immunol. Baltim. Md* 150, 598–608.

Zhang, W., Moldovan, I., Targoni, O.S., Subbramanian, R.A., Lehmann, P.V., 2012. How much of Virus-Specific CD8 T Cell Reactivity is Detected with a

Peptide Pool when Compared to Individual Peptides? *Viruses* 4, 2636–2649.  
<https://doi.org/10.3390/v4112636>

Zippelius, A., Batard, P., Rubio-Godoy, V., Bioley, G., Liénard, D., Lejeune, F., Rimoldi, D., Guillaume, P., Meidenbauer, N., Mackensen, A., Rufer, N., Lubenow, N., Speiser, D., Cerottini, J.-C., Romero, P., Pittet, M.J., 2004.

Effector Function of Human Tumor-Specific CD8 T Cells in Melanoma Lesions: A State of Local Functional Tolerance. *Cancer Res.* 64, 2865–2873.

<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3066>

## **7 Erklärung zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde in der Universitätshautklinik Tübingen unter Betreuung von Prof. Lukas Flatz durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Lukas Flatz, und Dr. Vincent Walter.

Die Einholung des Ethikvotums erfolgte durch Dr. Vincent Walter.

Die LDI wurde als akkreditierte Methode für Versuchsteil I unter Aufsicht der medizinischen Technologen für Laboratoriumsanalytik der Universitätshautklinik Tübingen durchgeführt. Für Versuchsteil II wurden nach der LDI übriggebliebene Zellsuspensionen verwendet. Die LDI und die Kryokonservierung für Versuchsteil II wurden durch die medizinischen Technologen für Laboratoriumsanalytik der Universitätshautklinik Tübingen durchgeführt. Alle weiteren Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr. Vincent Walter eigenständig von mir durchgeführt.

Die Datenrecherche und -auswertung erfolgten durch mich.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

Sophie Thomä

## **8 Danksagung**

Mein Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Lukas Flatz, für die Überlassung des Dissertationsthemas, das mir spannende Einblicke in die dermatoonkologische und immunologische Forschung ermöglicht hat, sowie für die stets verlässliche und konstruktive Betreuung meiner Arbeit.

Ganz besonders danke ich meinem Betreuer Dr. Vincent Walter für seine außergewöhnliche Begleitung während der gesamten Promotionszeit. Mit seiner Begeisterungsfähigkeit hat er mich immer wieder motiviert und inspiriert. Für seine Geduld, seine wertvollen Anregungen und seine unermüdliche Unterstützung bin ich ihm sehr dankbar.

Den Mitarbeiterinnen des Hautkliniklabors danke ich für ihre Unterstützung bei der Durchführung der LDI. Mein besonderer Dank gilt Monica Beer, die mich oft bis in die späten Abendstunden im Labor begleitet hat.

Von Herzen danke ich auch meinen Eltern für die beständige Unterstützung, ihren Rückhalt und ihr Vertrauen.