

Aus dem Bereich für Transplantations- und Infektionsimmunologie
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**T-zelluläre Charakteristika von Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom unter
Immun-Checkpoint-Inhibitor Therapie und von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten bei
Personen mit Nierenzellkarzinom**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES 2025

vorgelegt von: Markus Werner

geb. am: 26.03.1996 in Müllheim

Datum der mündlichen Prüfung: 13.04.2026

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig

Erstgutachter: Frau Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Martina Sester

Zweitgutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. Dr. Philipp Staber

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	6
2	Summary	9
3	Einleitung	11
3.1	Das Melanom	11
3.1.1	Epidemiologie des Melanoms	11
3.1.2	Ätiologie und Pathogenese des Melanoms	11
3.1.3	Klinik und Diagnose des Melanoms	12
3.1.4	Klassifikation nach American Joint Comission on Cancer	12
3.1.5	Therapie und Diagnostik bei primären Melanomen	13
3.1.6	Therapie bei lokoregionalen Befall	13
3.1.7	Therapie des fernmetastasierten Melanoms	13
3.2	Das Nierenzellkarzinom	14
3.2.1	Epidemiologie des Nierenzellkarzinoms	14
3.2.2	Ätiologie, Pathogenese und Klinik des Nierenzellkarzinoms	15
3.2.3	Klassifikation nach der Union International contre le cancer (UICC)	15
3.2.4	Diagnostik und Therapie des Nierenzellkarzinoms	15
3.3	Das Immunsystem	16
3.3.1	Die adaptive Immunantwort	17
3.3.1.1	CD8 T-Zellen	18
3.3.1.2	CD4 T-Zellen	19
3.3.1.3	Regulatorische T-Zellen	19
3.3.1.4	Phänotypische und funktionelle Kompartimente der T-Zellen	20
3.3.2	Antigen-spezifische T-Zellen und T-Zell-Erschöpfung	20
3.3.3	Das Tumormikromilieu und die Immunantwort	21
3.3.4	Die Immun-Checkpoint-Inhibitoren	22
3.4	Ziele dieser Arbeit	24
4	Material und Methoden	26
4.1	Geräte, Materialien, Reagenzien und Software	26

4.2	Charakterisierung und Quantifizierung von T-Zellen in Vollblut	28
4.2.1	Direkte extra- und intrazelluläre Färbung von T-Zell-Subpopulationen in Vollblut.....	28
4.2.2	Nachweis Antigen-spezifischer T-Zellen nach Stimulation	29
4.2.2.1	Stimulation von T-Zellen in Vollblut.....	30
4.2.2.2	Fixierung von T-Zellen nach Stimulation in Vollblut.....	31
4.2.2.3	Färbung der fixierten T-Zellen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern.....	32
4.3	Analyse Tumor-infiltrierender Lymphozyten aus Nierenzellkarzinomgewebe	33
4.3.1	Mechanische Isolierung von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten aus Nierenzellkarzinomgewebe	33
4.3.2	Oberflächenfärbungen von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten aus Nierenzellkarzinomgewebe	34
4.3.3	Stimulation Antigen-spezifischer Tumor-infiltrierender Lymphozyten	35
4.3.3.1	Protokoll 1: Kombinierte Stimulation der TIL mit Vollblut	36
4.3.3.2	Protokoll 2: Direkte Stimulation der TIL in Medium.....	37
4.4	Durchflusszytometrische Messung und Gating	39
4.4.1	Durchflusszytometrische Messung.....	39
4.4.2	Analysierte Parameter der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten im Vergleich zu Lymphozyten im Vollblut	42
4.5	Studiendesign	43
5	Ergebnisse.....	45
5.1.1	Personen mit Melanom.....	45
5.1.2	Personen mit Nierenzellkarzinom	47
5.2	Charakteristika der Immunzellen im Blut von Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom im Vergleich zu gesunden Kontrollen	49
5.2.1	Kollektive der Tumorentitäten Melanom und Nierenzellkarzinom sowie gesunder Kontrollen ohne Tumor	49
5.2.2	Qualitative Analyse der Leukozyten und Lymphozyten	50
5.2.3	Differenzierungsstatus der T-Zellen	51
5.2.4	Phänotypische Marker für T-Zellfunktionalität	52
5.2.5	Vergleich der Reaktivität von T-Zellsubpopulationen nach Antigen-spezifischer und polyklonaler Stimulation	55

5.3	Charakteristika der Immunzellen bei Subgruppen von Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom.....	61
5.3.1	Charakteristika der Immunzellen bei Personen mit Nierenzellkarzinom und benignem Tumor	61
5.3.2	Vergleich der Charakteristika der Immunzellen von Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom in Abhängigkeit der durchgeführten Therapien.....	61
5.3.3	Vergleich der Immunzellen von Personen mit Melanom in Abhängigkeit des Therapieansprechens	65
5.3.4	Vergleich der Immunzellen von Personen mit Melanom in Abhängigkeit von den ICPI-Therapie-assoziierten autoimmunen Nebenwirkungen.....	71
5.3.5	Vergleich der Immunzellen von Personen mit Melanom im Therapieverlauf	74
5.4	Analyse und Optimierung der Methodik zur Isolierung von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten aus Tumorgewebe.....	83
5.4.1	Einfluss auf die Analysequalität durch die Färbung vor oder nach der Aufreinigung mittels eines Dichtegradienten	85
5.4.2	Einfluss der Tumor-Lagerungszeit auf die Analysequalität.....	88
5.4.3	Direkter Vergleich der Immunzellen aus Tumorgewebe mit den Immunzellen aus peripherem Blut bei Personen mit Nierenzellkarzinom oder einem benignen Tumor der Niere	91
5.4.4	Optimierung der Stimulationsprotokolle zum Nachweis Antigen-spezifischer Tumor-infiltrierender Lymphozyten aus Nierenzellkarzinom	94
6	Diskussion	101
6.1	T-zelluläre Charakteristika von Personen mit Melanom	101
6.1.1	T-Zelldifferenzierung, Proliferationskapazität, Expression der Immun-Checkpointmoleküle und CD39 der T-Zellen von Personen mit Melanom.....	101
6.1.2	Personen mit Melanom unter Therapie und im Therapieverlauf	103
6.1.3	Personen mit Melanom in Abhängigkeit des Therapieansprechens	106
6.1.4	Autoimmune Nebenwirkungen bei Personen mit Melanom unter Immun-Checkpoint-Inhibitor Therapie.....	110
6.2	T-Zellen aus peripherem Blut und Tumor-infiltrierende Lymphozyten bei Personen mit Nierenzellkarzinom.....	113
6.2.1	T-Zelldifferenzierung, Expression der Immun-Checkpointmoleküle und Zytokinprofile der T-Zellen im peripheren Blut von Personen mit Nierenzellkarzinom	113

6.2.2	Evaluation von Einflussfaktoren der Analysequalität von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten zur Etablierung geeigneter Auswahlkriterien	114
6.2.3	T-Zelldifferenzierung, Expression der Immun-Checkpointmoleküle und CD39 der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten im Vergleich zu T-Zellen im peripherem Blut von Personen mit Nierenzellkarzinom.....	115
6.3	Limitationen, Schlussfolgerungen und Ausblick	117
7	Anhang	119
8	Abbildungsverzeichnis	121
9	Tabellenverzeichnis	125
10	Literaturverzeichnis.....	127
11	Danksagung.....	135
12	Publikationen	136
13	Kongressbeiträge (nur Erstautorenschaften).....	136
14	Lebenslauf	137

1 Zusammenfassung

Zwei der häufigsten Tumore in Deutschland sind das Melanom auf Platz fünf und das Nierenzellkarzinom auf Platz zehn der Krebserkrankungen bei beiden Geschlechtern. Nicht nur in der Entstehung von Tumoren, sondern auch in deren Therapie spielt die zelluläre Immunantwort eine große Rolle. Im vergangenen Jahrzehnt haben sich die Therapieoptionen insbesondere für das Melanom gebessert und es stehen mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren wie PD-1 sowie CTLA-4 Inhibitoren potente Systemtherapeutika zur Verfügung, welche nicht nur im metastasierten Stadium, sondern auch in der adjuvanten Therapie in niedrigeren Stadien Einzug gehalten haben. Auch für das Nierenzellkarzinom im metastasierten Stadium haben sich die Immun-Checkpoint-Inhibitoren etabliert, da konventionelle Chemotherapeutika aufgrund der Tumorbilogie wenig wirksam sind. Die Immun-Checkpoint-Inhibitoren zielen auf die T-zelluläre Immunantwort ab und führen zu einer Enthemmung des Immunsystems und reaktiverer, antitumoröser Immunaktivität.

Diese Arbeit hatte zum Ziel das Immunsystem der Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom mit einer Immun-Checkpoint-Inhibitor Therapie zu charakterisieren. Es wurden mögliche T-zelluläre Charakteristika und Marker untersucht, welche möglicherweise mit einem Therapieansprechen oder mit dem Auftreten von autoimmunen Nebenwirkungen assoziiert sind. Diese wurden bei Personen mit Melanom im Therapieverlauf untersucht. Des Weiteren wurden bei an einem Nierenzellkarzinom erkrankten Personen Tumor-infiltrierende Lymphozyten mit Lymphozyten aus peripherem Blut verglichen. Neben der quantitativen und qualitativen Analyse der Immunzellen lag ein Schwerpunkt der Arbeit auf der methodischen Weiterentwicklung der Isolationsprotokolle, mit anschließender Stimulation von T-Zellen aus solidem Tumorgewebe.

Insgesamt wurden 92 Tumorpatienten sowie 50 gesunde Kontrollpersonen in die Studie eingeschlossen. Die Patientengruppe umfasste 47 Personen mit Melanom, von denen 10 im Verlauf unter Immun-Checkpoint-Inhibitor Therapie untersucht wurden. Zudem wurden 45 Personen mit einem Tumor der Niere eingeschlossen. Von diesen lagen 20 Tumorgewebeproben vor. 11 Personen mit einem Tumor der Niere wurden nachträglich aufgrund der Histologie ausgeschlossen, da bei diesen kein Nierenzellkarzinom vorlag. Somit lagen von 34 Personen mit histologisch bestätigtem Nierenzellkarzinom Proben aus peripherem Blut vor, wobei von 15 dieser Personen auch Tumorgewebe vorlag.

Untersuchte Parameter der Immunzellen waren die absoluten und relativen Zellzahlen der Leukozyten, Lymphozyten, T-Zellen, CD8, CD4, und regulatorischer T-Zellen. Zudem erfolgte eine Bestimmung des Differenzierungsstatus durch Analyse von CD45RO und CD62L, kürzlich proliferierter Zellen mit Ki67, der Immun-Checkpointmoleküle CTLA-4, PD-1 und BTLA, sowie des immunmodulatorischen Funktionsmarkers CD39. Überdies wurde die Funktionalität der Immunzellen in Stimulationsassays durch Induktion der Zytokine Interferon- γ , Tumornekrosefaktor- α und Interleukin-2 überprüft. Bei der Analyse wurden Vergleiche vor und unter Immun-Checkpoint-

Inhibitor Therapie, zwischen den Medikamenten, bezüglich des Therapieansprechens und dem Auftreten von autoimmunen Nebenwirkungen durchgeführt. Zudem wurden die Tumor-infiltrierenden Lymphozyten nach mechanischer Isolierung aus Nierenzellkarzinomen mittels zwei verschiedener Stimulationsprotokolle mit Lymphozyten aus peripherem Blut verglichen.

Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom wiesen in allen Subpopulationen eine geringere Anzahl an Lymphozyten auf, während der relative Anteil an regulatorischen T-Zellen bei Personen mit Melanom erhöht war. Zudem war ein erhöhter Anteil an kürzlich proliferierter Ki67+ CD4 und CD8 T-Zellen und regulatorischen T-Zellen sowie CD39+ CD4 T-Zellen und regulatorischen T-Zellen bei Personen mit Melanom gegenüber gesunden Kontrollen nachweisbar. Unter Immun-Checkpoint-Inhibitor Therapie nahm die absolute Zahl an Leukozyten, Lymphozyten, CD4 und CD8 T-Zellen und regulatorischen T-Zellen signifikant ab. Zudem zeigte sich ein Rückgang der Anteile an PD-1+ CD4 und CD8 T-Zellen sowie regulatorischen T-Zellen. Dahingegen stieg der Anteil an CTLA-4+ CD4 T-Zellen und regulatorischen T-Zellen signifikant. Im Therapieverlauf zeigten sich nur dezente Veränderungen der Zytokinexpression. Personen mit Melanom und Immun-Checkpoint-Inhibitor-Therapieansprechen wiesen gegenüber Personen ohne Immun-Checkpoint-Inhibitor-Therapieansprechen eine signifikant höhere Lymphozytenzahl, geringere PD-1 Expression auf CD4 T-Zellen und regulatorischen T-Zellen, als auch eine erhöhte CTLA-4 Expression auf CD8 T-Zellen nach polyklonaler Stimulation auf. Eine erhöhte CTL-4 Expression als Ausdruck einer aktiven CD8 T-Zellantwort bei Personen mit Melanom unter Immun-Checkpoint-Inhibitor Therapie wurde auch im Rahmen der autoimmunen Nebenwirkung detektiert. Herausragend zeigte sich bei Personen mit autoimmunen Nebenwirkungen unter Immun-Checkpoint-Inhibitor Therapie ein signifikant geringerer Anteil an CD39+ Zellen gegenüber Personen ohne Nebenwirkungen, am ehesten als Ausdruck eines aktiven T-Zellphänotyps.

Als mögliches Merkmal einer Antigenauseinandersetzung konnte eine markante erhöhte CTLA-4 Expression für CD8, CD4 und regulatorische T-Zellen auch bei Personen mit NZK gegenüber gesunden Kontrollen identifiziert werden. Im soliden Tumor war die Expression von PD-1 auf CD8, CD4 und regulatorischen T-Zellen gegenüber Zellen aus peripherem Blut erhöht, ohne dass jedoch eine Korrelation zu diesen bestand. Überraschend waren hingegen die Ergebnisse zu CD39, für das sich nicht nur eine erhöhte Expression auf CD8, CD4 und regulatorischen T-Zellen der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten, sondern auch eine positive Korrelation für CD39 auf regulatorischen T-Zellen aus solidem Tumor und peripherem Blut zeigte.

Insgesamt zeigten sich verschiedene Merkmale bei Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom, welche vielversprechende Ansätze für weitere Untersuchung hinsichtlich prätherapeutischer Marker zur Prognose, Therapieansprechen und dem Auftreten von autoimmunen Nebenwirkungen in der Zukunft bieten könnten und sollten in größeren Kollektiven untersucht werden. Schlussendlich konnten auch methodische Kriterien für die Isolation, Weiterverarbeitung

und Stimulation der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten erarbeitet werden, welche eine gestärkte Basis für weitere Untersuchungen bieten.

2 Summary

In Germany, two of the most common cancer entities affecting both sexes are melanoma, ranked fifth, and renal cell carcinoma, ranked tenth. The cellular immune response plays a major role not only in the development of tumours, but also in their treatment. Over the past decade, treatment options have drastically improved, especially for melanoma. Immune checkpoint inhibitors such as PD-1 and CTLA-4 inhibitors, which have found their way not only into metastatic stages but also into adjuvant therapy in lower stages, are available as potent systemic therapies. As conventional chemotherapeutic agents are not very effective in renal cell carcinoma, due to the biology of the tumours, immune checkpoint inhibitors have also become established. Immune checkpoint inhibitors lead to disinhibition of the T-cell immune response and reconstituted antitumoural activity.

The aim of this study was to characterise the immune system of individuals with melanoma or renal cell carcinoma, undergoing immune checkpoint inhibitor therapy. Potential T-cell characteristics and markers that may be associated with a treatment response or the occurrence of autoimmune side effects were investigated. These were evaluated in individuals with melanoma during therapy. Furthermore, tumour-infiltrating lymphocytes were compared with lymphocytes from peripheral blood in individuals with renal cell carcinoma. In addition to the quantitative and qualitative analysis of immune cells, the study focused on the methodological development of isolation protocols, followed by stimulation of T cells from solid tumour tissue.

A total of 92 tumour patients and 50 healthy controls were included in this study. The patient group consisted of 47 individuals with melanoma, 10 of whom were followed up and analysed during immune checkpoint inhibitor therapy. 45 individuals with a kidney tumour were included. From those, 20 tumour tissue samples were collected. 11 individuals with a tumour of the kidney were subsequently excluded due to their histopathology, as they did not have renal cell carcinoma. Thus, peripheral blood samples were available from 34 individuals with histologically confirmed renal cell carcinoma, and tumour tissue was also available from 15 of these individuals.

The analysed immune cell parameters comprised absolute and relative cell counts of leukocytes, lymphocytes, T cells, CD8, CD4, and regulatory T cells. Moreover, the differentiation status was assessed by evaluating CD45RO and CD62L, Ki67 for recently proliferated cells, CTLA-4, PD-1 and BTLA as immune checkpoint molecules and CD39 with immunomodulatory function. The T cell functionality was evaluated in stimulation assays encompassing the cytokines interferon- γ , tumour necrosis factor- α and interleukin-2. The analysis included comparisons before and during immune checkpoint inhibitor therapy, between drugs, in terms of response to therapy and the occurrence of autoimmune side effects. Tumour-infiltrating lymphocytes were additionally compared with lymphocytes from peripheral blood using two different stimulation protocols after mechanical isolation from renal cell carcinomas.

Individuals with melanoma or renal cell carcinoma had lower lymphocyte counts in all subpopulations, while the relative proportion of regulatory T cells was increased in individuals with melanoma. An increased proportion of recently proliferated Ki67+ CD4 and CD8 T cells and regulatory T cells, as well as CD39+ CD4 T cells and regulatory T cells, was detected in patients with melanoma compared to healthy controls. The absolute number of leukocytes, lymphocytes, CD4 and CD8 T cells, and regulatory T cells decreased significantly under immune checkpoint inhibitor therapy. Furthermore, a decrease in the proportions of PD-1+ CD4 and CD8 T cells and regulatory T cells was detected in patients with melanoma undergoing immune checkpoint inhibitor therapy. In contrast, the proportion of CTLA-4+ CD4 T cells and regulatory T cells increased in this cohort significantly. Regarding cytokine expression, only subtle changes were observed during therapy. Individuals with melanoma who responded to immune checkpoint inhibitor therapy had significantly higher lymphocyte counts, lower PD-1 expression on CD4 T cells and regulatory T cells, and increased CTLA-4 expression on CD8 T cells after polyclonal stimulation compared to those who did not respond to immune checkpoint inhibitor therapy. Higher CTL-4 expression on CD8 T cell in individuals with melanoma with autoimmune side effects due to immune checkpoint inhibitor therapy was also observed. Strikingly patients with autoimmune side effects under immune checkpoint inhibitor therapy showed a significantly lower proportion of CD39+ CD8, CD4 and regulatory T cells, most likely as an expression of an active T cell phenotype, compared to those without autoimmune side effects.

For CD8, CD4 and regulatory T cells an increase in CTLA-4 expression was identified as a possible feature of antigen confrontation, mainly in individuals with renal cell carcinoma compared to healthy controls. The expression of PD-1 on CD8, CD4 and regulatory T cells originating from tumour-infiltrating lymphocytes from renal cell carcinoma was increased compared to cells from peripheral blood, but there was no correlation between the two. Remarkably CD39 showed not only increased expression on CD8, CD4 and regulatory T cells of tumour-infiltrating lymphocytes, but also a positive correlation on regulatory T cells from solid tumours and peripheral blood.

Comprehensively various remarkable characteristics were observed in patients with melanoma or renal cell carcinoma, as promising approaches for further evaluations. Regarding pre-therapeutic markers for prognosis, response to therapy and the occurrence of autoimmune side effects promising candidates have been outlined. Additionally, we provided a stronger basis with optimized methodological criteria for the isolation, further processing and stimulation of tumour-infiltrating lymphocytes. Taking together, this forms an extensive basis for further investigations in larger collectives.

3 Einleitung

3.1 Das Melanom

Das Melanom gehört zu den fünf häufigsten Tumoren in Deutschland, welcher primär an der Haut auftritt. In der Gruppe der Hauttumoren ist das Melanom für circa 70% der Sterbefälle verantwortlich (ROBERT KOCH-INSTITUT (HRSG) UND DIE GESELLSCHAFT DER EPIDEMIOLOGISCHEN KREBSREGISTER IN DEUTSCHLAND E.V. (HRSG), 2021).

3.1.1 Epidemiologie des Melanoms

Aus dem aktuellen Jahresbericht zur Epidemiologie von Krebserkrankungen in Deutschland von 2021 gehen folgende Zahlen hervor. Die altersstandardisierte Inzidenz beträgt im Jahre 2018 bei Frauen von 18,9/100.000 Einwohner und bei Männern 20,2/100.000. Das mittlere Erkrankungsalter (Median) betrug in diesem Jahr für Frauen 62 und für Männer 68 Lebensjahre. In den Prognosen für 2022 zeigte sich eine altersstandardisierte Inzidenz bei Frauen von 28,8/100.000 Einwohner und bei Männern 22,0/100.000 (ROBERT KOCH-INSTITUT (HRSG) UND DIE GESELLSCHAFT DER EPIDEMIOLOGISCHEN KREBSREGISTER IN DEUTSCHLAND E.V. (HRSG), 2021).

3.1.2 Ätiologie und Pathogenese des Melanoms

Melanozyten gehen entwicklungsgeschichtlich von Zellen der Neuralleiste aus und sind auf behaarter und unbehaarter Haut, den Schleimhäuten, den Meningen und im Auge in unterschiedlicher Häufigkeit zu finden. Unterschiedlichen exogene als auch endogenen Risikofaktoren wie erhöhte UV-Belastung, heller Hauttyp, Pigmentierungsgrad, Sonnenbrände in der Kindheit, Anzahl der Naevi sowie eine familiäre Melanombelastung sind bekannt (ARMSTRONG, KRICKER, 1993; EIGENTLER et al., 2007; MORT et al., 2015; TUCKER, GOLDSTEIN, 2003).

Ungefähr 10% der Melanome treten familiär gehäuft auf. Hier können Gene der Zelldifferenzierung und Proliferation sowie DNA-Reparaturprozesse betroffen sein (PLEWIG, 2018). Bei den nicht familiären Melanomen wird zwischen epithelassozierten und nicht epithelassozierten Melanomen unterschieden. Zu den nicht-epithelassozierten Melanomen zählen Primärmelanome des zentralen Nervensystems, blaue Naevus ähnliche Melanome und das Melanom des Uvealtraktes, welche trotz unterschiedlicher anatomischer Lokalisation ähnliche genetische Alterationen, betreffend G-Protein-Rezeptor gekoppelte Signalwege (GNAQ, GNA11 und BAP-1), aufweisen und sich von epithelassozierten Melanomen unterscheiden (BASTIAN, 2014; HARBOUR et al., 2010).

Melanome auf sonnenexponierter chronisch lichtgeschädigter Haut kommen vor allem bei älteren Individuen (>70. Lebensjahr) vor (WHITEMAN et al., 2003). Im Gegensatz zu den nicht-chronisch lichtgeschädigten Melanomen finden sich seltener BRAF-Mutationen, insbesondere des Typs BRAF V600E (BASTIAN, 2014; MALDONADO et al., 2003; PLEWIG, 2018). Bei Melanomen auf sonnenexponierter nicht-chronisch lichtgeschädigter Haut besteht eine Assoziation zu einer

erhöhten Anzahl an Naevi, weniger beruflicher Sonnenexposition und weniger aktinischer Keratosen (WHITEMAN et al., 2003). Häufig sind bei 50-70% der Mutationen Veränderungen im Gen für BRAF, vor allem in Form des klassischen Typs BRAF V600E. Falls BRAF nicht betroffen ist, können auch Mutationen für NRAS bei 15% vorliegen (BASTIAN, 2014; CURTIN et al., 2005; PLEWIG, 2018).

Zu den epithelassoziierten Melanomen der unbehaarten Haut gehören akrale sowie mukosale Melanome, die somit auf relativ lichtgeschützter Haut entstehen. Sie treten eher nach der sechsten Lebensdekade auf und die Inzidenz verblieb in den vergangenen Jahren stabil. BRAF-Mutationen betreffen die akralen, nicht jedoch mukosalen Melanome. Beide weisen KIT- und NRAS-Mutationen auf, wobei sich die betroffenen Gene von den sonnenexponierten Melanomen unterscheiden (BASTIAN, 2014; BASTIAN et al., 2000; PLEWIG, 2018).

3.1.3 Klinik und Diagnose des Melanoms

Das Erscheinungsbild des Melanoms ist häufig gekennzeichnet durch eine Kombination von Asymmetrie, variabler Begrenzung, Mehrfarbigkeit (schwarz, blaugrau, weiß, braune und rote Töne), vergrößertem Durchmesser, Erhabenheit und einer Entwicklungsdynamik. Historisch wird es anhand der Morphologie und Histologie in Subtypen z.B. superfiziell spreitendes Melanom oder noduläres Melanom unterteilt (CLARK et al., 1969). Die Diagnose erfolgt nach klinischen und auflichtmikroskopischen Kriterien, gefolgt von der histologischen Sicherung (PLEWIG, 2018).

3.1.4 Klassifikation nach American Joint Commission on Cancer

Für die Wahl der Therapie und zur Abschätzung der individuellen Prognose ist die Klassifikation nach der American Joint Commission on Cancer (AJCC) essenziell. Zum Zeitpunkt dieser Studie existierten die 7. Edition von 2009 und die 8. Edition von 2017. Es werden vier Stadien nach AJCC unterschieden, wobei jedes Stadium nochmals mit einem Buchstaben versehen in Unterkategorien eingeteilt wird. Je höher das Stadium, desto schlechter die Prognose und desto umfassender die Therapie. Zur Bestimmung des Stadiums erfolgt die Erfassung nach TNM-Klassifikation. T bezieht sich auf den Primärtumor und richtet sich nach der Tumordicke nach Breslow. N bezieht sich auf den regionären Lymphknotenbefall, mit N0 definiert als „keine Lymphknoten befallen“ und N1 als „Lymphknoten befallen“. N1 wird weiterführend mit aufsteigenden Nummern (N1-N3) und kleinen Buchstaben nach Ausdehnung des Lymphknotenbefalls graduiert. M bezieht sich auf das Vorhandensein von Fernmetastasen, wobei M0 für die Abwesenheit von Metastasen steht und M1 für das Vorhandensein von Metastasen. In den Zulassungsstudien für die Immun-Checkpoint-Inhibitoren fand die 7. Edition nach AJCC Anwendung und wurde zum Zeitpunkt dieser Studie weiterhin zur Therapieplanung herangezogen. Die 8. Edition weist eine leicht veränderte Definition der T-Stadien auf und die Laktatdehydrogenase (LDH) als im Blut bestimmbarer prognostischer Parameter erhielt eine veränderte Kategorisierung gegenüber der 7. Edition, wobei hinter dem M-Stadium eine normwertige LDH als „0“ und eine elevierte LDH als „1“ vermerkt wird (GERSHENWALD et al., 2017).

3.1.5 Therapie und Diagnostik bei primären Melanomen

Zur Sicherung der Diagnose sollte die komplette Exzision mit 2 mm Sicherheitsabstand nach lateral im Gesunden erfolgen. Der definitive Sicherheitsabstand und die weiteren therapeutischen und diagnostischen Maßnahmen sind abhängig von der Tumordicke nach Breslow und dem definitiven Tumorstadium (ADO/DDG/DKG, 2019; BRESLOW, 1970).

3.1.6 Therapie bei lokoregionalen Befall

Sofern keine Lymphknotenmetastasierung und Fernmetastasierung vorliegen befinden sich erkrankte Personen im Stadium II. Demgegenüber befinden sich Personen im Stadium III bei Vorliegen von Mikrosatelliten-, in transit-, oder Lymphknotenmetastasen ohne Fernmetastasierung. Die 5-Jahresüberlebensrate von Personen im Stadium III ist heterogen (IIIA 78%, IIIB 59%, IIIC 40%). Jedoch weisen auch Personen ohne Loko-regionäre-, und Fernmetastasierung (N0, M0) mit dickem Primärtumor (>4mm, mit Ulzerationen) eine 5-Jahresüberlebensrate von 53% (vgl. Stadium III s.o.) sowie ein hohes Rezidivrisiko auf (44,3% Stadium IIC, 51% Stadium III)(BALCH et al., 2009; FRANCKEN et al., 2008; LEITER et al., 2012).

Im Stadium III erfolgt ergänzend eine adjuvante Therapie. Bei Vorliegen von BRAF V600 mutierten Tumoren kann diese mit BRAF und MEK-Inhibitoren erfolgen, welche mit einer höheren Rate an rezidivfreiem Überleben und Gesamtüberleben einhergeht (LONG et al., 2017).

Nachdem die Immun-Checkpoint-Inhibitor Therapie (ICPI-Therapie) das progressionsfreie und Gesamtüberleben von Personen im Stadium IV mit fernmetastasiertem Melanom in palliativer nachweislich verbessern konnte, folgten Studien zur adjuvanten Therapie von Patienten im Stadium III und IV. Zur Verfügung stehen die Immun-Checkpoint-Inhibitoren als monoklonalen Antikörper gegen CTLA-4 (Ipilimumab) und PD-1 (Nivolumab, Pembrolizumab). Eine adjuvante Therapie mit dem PD-1-Inhibitoren Nivolumab (Checkmate-238) oder Pembrolizumab (Keynote-054) zeigte eine höhere Rate an rezidivfreiem Überleben (ADO/DDG/DKG, 2019; ASCIERTO et al., 2020; EGGERMONT et al., 2018).

3.1.7 Therapie des fernmetastasierten Melanoms

Bei Vorliegen von Fernmetastasen (M1) befinden sich Personen mit Melanom im Stadium IV und weisen eine schlechte Prognose mit einer medianen Überlebenszeit von unter einem Jahr auf (BALCH et al., 2009). S100B korreliert positiv mit dem TNM-Stadium und schlechterem Überleben. Steigende oder abnorme LDH-Werte sind ein prognostischer Parameter für das Gesamt- und progressionsfreie Überleben im Stadium IV (AGARWALA et al., 2009; MOCELLIN et al., 2008; PFANNENBERG et al., 2007). Die Einführung der zielgerichteten Therapie mit BRAF und MEK-Inhibitoren sowie ICPI-Therapie hat die Prognose im Stadium IV wesentlich verbessert. Bei BRAF V600E Mutation werden BRAF und MEK-Inhibitor therapeutisch eingesetzt (MAI et al., 2015). Im Stadium IV findet neben den PD-1 Inhibitoren Pembrolizumab und Nivolumab, auch der CTLA-4

Inhibitor Ipilimumab, in der Erstlinientherapie als Kombinationstherapie mit Nivolumab über vier Zyklen, gefolgt von einer Monoerhaltungstherapie mit Nivolumab, Verwendung. Personen mit nicht resektablem, unbehandeltem Melanom im Stadium III-IV (Checkmate-67; Keynote-006) zeigten unter Kombinationstherapie mit Ipilimumab und Nivolumab gegenüber der jeweiligen Monotherapie ein verlängertes progressionsfreies Überleben (5-Jahre: Kombination 36%, Mono-Nivolumab 29%, Mono-Ipilimumab 8%) und Gesamtüberleben (5-Jahre: Kombination 54%, Mono-Nivolumab 44%, Mono-Ipilimumab 26%). Schwere immunvermittelte Ereignisse waren jedoch unter Kombitherapie am häufigsten (LARKIN et al., 2019). Des Weiteren zeigt die Monotherapie mit Pembrolizumab gegenüber der Monotherapie mit Ipilimumab ein verbessertes medianes Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben (ROBERT et al., 2019).

Die Ergebnisse dieser und weiterer Studien führten in Europa zu der Zulassung von Ipilimumab 2012, Pembrolizumab und Nivolumab 2015 und der Kombination von Ipilimumab und Nivolumab im Jahr 2016 für Patienten mit Melanom.

3.2 Das Nierenzellkarzinom

Die Nieren sind das zentrale Organ für die Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes. Sie liegen als ein paarig angelegtes Organ im Retroperineum (HEROLD, 2020; LÜLLMANN-RAUCH, 2015; MÜLLER, 2016). Eine Vielzahl an Tumoren können an den Nieren auftreten. Circa 15% sind von benigner Natur, wie z.B. papilläre Adenome, Angiomyolipome, benigne Zysten und das Onkozytom. Weitere seltenere sind bekannt (EUROPEAN ASSOCIATION OF UROLOGY, 2025; HAIFLER et al., 2012; HEROLD, 2020; MOCH et al., 2016; MÜLLER, 2016; RENEHAN et al., 2008). Den Großteil der malignen Tumore der Niere macht mit circa 90% das sporadische Nierenzellkarzinom (NZK) aus, welches von epithelialen Zellen der Nierenkanälchen ausgeht (EUROPEAN ASSOCIATION OF UROLOGY, 2025; HEROLD, 2020).

3.2.1 Epidemiologie des Nierenzellkarzinoms

Das Nierenzellkarzinom belegt Platz zehn der häufigsten bösartigen Tumore in Deutschland. Weltweit ist die Inzidenz in Europa und Nordamerika am höchsten, in Asien, Afrika, Ozeanien und Südamerika ist es nicht unter den zehn häufigsten bösartigen Tumoren zu finden (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

Nach dem aktuellen Jahresbericht zur Epidemiologie von Krebserkrankungen in Deutschland von 2021 beträgt die altersstandardisierte Inzidenz im Jahre 2018 bei Frauen 7,6/100.000 Einwohner und bei Männern 15,4/100.000. Das mittlere Erkrankungsalter (Median) betrug im Jahre 2018 für Frauen 71 und für Männer 68 Lebensjahre. In den Prognosen für 2022 zeigte sich eine altersstandardisierte Inzidenz bei Frauen von 7,1/100.000 Einwohner und bei Männern 14,7/100.000.

Die Überlebensraten der Erkrankten sind günstig. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate ist vom Stadium nach der „Union International contre le cancer“ (UICC) abhängig und beträgt 98,4% in

Stadium I, 88,8% in Stadium II, 73,0% in Stadium III und 18,3% in Stadium IV (TUMORREGISTER-MÜNCHEN, 2021).

3.2.2 Ätiologie, Pathogenese und Klinik des Nierenzellkarzinoms

Das Nierenzellkarzinom umfasst eine breite Variation an verschiedenen Tumorentitäten, die sich nach histologischen und genetischen Kriterien differenzieren lassen. Das Nierenzellkarzinom tritt häufiger sporadisch auf, kann aber auch selten familiär gehäuft auftreten. Verschiedene genetische Syndrome können mit einem Nierenzellkarzinom assoziiert sein (HEROLD, 2020). In der WHO-Klassifikation werden die Subtypen von Nierentumoren anhand von zytoplasmatischen Eigenschaften (z.B. chromophob, klarzellig), Zellarchitektur (z.B. papillär), molekularen Veränderungen und Lokalisation des Tumors in der Niere (Nierenmark, Sammelrohr) unterschieden. Unter den sporadischen Nierenzellkarzinom ist am häufigsten mit circa 75% das klarzellige (hellzellige) NZK, gefolgt mit bis zu 15% das papilläre NZK mit zwei Untertypen Typ 1 und Typ 2 und mit etwa 5% das chromophobe NZK. Weitere seltenere sind das Sammelrohrkarzinom, das renale medulläre NZK, das muzinös tubulär und spindelzellige Karzinom, die NZK sowie neuroendokrine Tumore der Niere (HEROLD, 2020; MOCH et al., 2016).

Durch die exklusive Lage von Nierentumoren im Nierenparenchym gibt es keine spezifischen Frühsymptome. Inkretorische als auch exkretorische Funktionen der Niere können durch ein NZK gestört sein und dadurch klinisch apparent werden. (HEROLD, 2020).

3.2.3 Klassifikation nach der Union International contre le cancer (UICC)

Die Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms erfolgt nach der 8. Edition der UICC. Der Schweregrad der Erkrankung nimmt von Stadium I bis Stadium IV zu, wobei sich Prognose und Therapie nach dem Stadium richten. Das T-Stadium (T1-T4) wird bestimmt durch die Größe des Tumors (in cm). Das N-Stadium beziffert den Lymphknotenbefall mit Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen (N1) oder unauffälligen Lymphknoten (N0). Das Vorhandensein (M1) oder Abwesenheit von Metastasen (M0) definiert das M-Stadium (SWAMI et al., 2019).

3.2.4 Diagnostik und Therapie des Nierenzellkarzinoms

Häufig wird ein Nierenzellkarzinom akzidentiell durch verbreitete bildgebende Verfahren (Sonographie, Computertomographie) entdeckt. Die Schnittbildgebung dient der Stadieneinteilung und Therapieplanung. Eine Stanzbiopsie zur histologischen Sicherung erfolgt nur in bestimmten Situationen (DGU/DGHO, 2020; RICHARD et al., 2018; VOLPE et al., 2012).

Die Therapie des Nierenzellkarzinoms richtet sich nach der Stadieneinteilung nach UICC. Die operative Entfernung als radikale oder partielle Nephrektomie in diversen Verfahren (offen, laparoskopisch, oder Roboter-assistiert laparoskopisch) ist die Therapie der Wahl für Nierenzellkarzinome mit der Klassifikation T1-T2 N0 M0 (DGU/DGHO, 2020).

Das klarzellige Nierenzellkarzinom ist auch unter den metastasierten NZK am häufigsten anzutreffen. Eine Chemotherapie spielt aufgrund der Expression von Transportproteinen, die es gegen die Therapeutika weitgehend resistent macht, eine untergeordnete Rolle (DGU/DGHO, 2020).

Die Erstlinientherapie bei dem metastasierten Nierenzellkarzinom besteht aus der Kombination eines ICPI (anti PD-L1; Avelumab, anti PD-1; Nivolumab und Pembrolizumab, anti CTLA-4; Ipilimumab) und eines Tyrosinkinase-Inhibitors (Axitinib, Sunitinib) oder der Kombination aus zwei ICPI (anti PD-1; Nivolumab und anti CTLA-4; Ipilimumab). Sollte eine Therapie mit ICPI nicht in Frage kommen, kann eine Therapie mit einem Tyrosinkinase-Inhibitor erfolgen. Verschiedene Studien haben zur Zulassung der ICPI-Therapie bei Nierenzellkarzinomen geführt. Es wurden die Kombinationstherapie eines ICPI mit einem Tyrosinkinase-Inhibitor (Javelin Renal 101 und Keynote 426) oder die Kombinationstherapie zweier ICPI (CheckMate 214) gegenüber der Monotherapie mit einem Tyrosinkinase-Inhibitor verglichen. Das mediane progressionsfreie Überleben ist in dem ICPI enthaltenden Therapiearm deutlich länger im Vergleich zu dem Therapiearm mit der Monotherapie eines Tyrosinkinase-Inhibitors (MOTZER et al., 2019; MOTZER et al., 2018; RINI et al., 2019).

3.3 Das Immunsystem

Täglich ist unser Körper mit einer Vielzahl potenziell infektiöser und krankheitsauslösender Mikroorganismen wie Bakterien, Parasiten, Pilze und Viren konfrontiert. Neben der Abwehr von Mikroorganismen kann das Immunsystem die Entstehung und das Wachstum von Tumoren verhindern. Es wird die angeborene Immunantwort von der erworbenen/adaptiven Immunantwort unterschieden.

Zu der angeborenen Immunantwort gehören antimikrobiell wirksame Peptide auf der Körperoberfläche, das Komplementsystem, dendritische Zellen, Makrophagen, Granulozyten (basophile, eosinophile und neutrophile) und ILCs (innate lymphoid cells), zu denen die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) zählen. Wichtige Mediatoren in der angeborenen Immunantwort und Schnittstelle zur adaptiven Immunantwort bilden die Zytokine (Murphy, 2018).

Die adaptive Immunantwort ermöglicht eine dezidierte, langfristige und hochspezifische Abwehr von Pathogenen. Wichtige zelluläre Komponenten sind T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Antigen-präsentierende Zellen (APZ). Dendritische Zellen machen den Großteil der APZ aus. Die Reifung und Induktion einer adaptiven Immunantwort findet in den primären (Knochenmark, Thymus) und sekundären (z.B. Lymphknoten, Milz) lymphatischen Organen statt (LÜLLMANN-RAUCH, 2015; MURPHY, 2018). APZ können Peptide externer Antigene und Fremdpartikel in ihrem Major Histocompatibility Complex (MHC) II präsentieren (MILDNER, JUNG, 2014). Neben körpereigenen Proteinen werden auch körperfremde Proteine (z.B. Virusfragmente) in Form von Peptiden in den MHC I Komplexen präsentiert (BEVAN, 1976). Die Kreuzpräsentation in MHC I und MHC II gewährleistet neben der Aktivierung von zytotoxischen CD8 T-Zellen, über die CD4 T-Zellen auch zum Teil die Aktivierung von B-Zellen (LÜLLMANN-RAUCH, 2015; MURPHY, 2018).

3.3.1 Die adaptive Immunantwort

In der adaptiven humoralen Immunantwort spielen B-Zellen und die aus ihnen hervorgehenden Plasmazellen eine wesentliche Rolle. Die von den Plasmazellen produzierten Immunglobuline bilden den humoralen Teil der Immunantwort. B-Zellen können zudem als APZ fungieren und sind in der Lage Gedächtniszellen zu bilden (MURPHY, 2018).

Die Hauptkomponenten der adaptiven zellulären Immunantwort bilden die T-Zellen. Die Aktivierung der naiven T-Zellen findet in den sekundär lymphatischen Organen statt. Die antigenvermittelte Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen werden als Priming bezeichnet. Allen gemeinsam ist der T-Zell-Rezeptor (TZR), welcher spezifisch für ein bestimmtes Epitop eines Antigenes ist. Der T-Zell-Rezeptor besteht aus einem $\alpha:\beta$ Heterodimer mit der Antigenbindungsstelle und bildet mit sechs Signalketten (CD3) den funktionstüchtigen T-Zell-Rezeptor-Komplex. (CALL, WUCHERPFENNIG, 2004). Der TZR kann an Peptide binden, die in MHC I oder MHC II auf Zelloberflächen präsentiert werden.

Wichtig für die spezifische Antigenbindung von Peptid:MHC-Komplexen sind die Zellpopulationen definierenden Corezeptoren CD4 und CD8 (cluster of differentiation; CD). $CD8^+/CD4^-$ T-Zellen interagieren mit MHC I, während $CD4^+/CD8^-$ T-Zellen mit MHC II Komplexen interagieren können. Die Corezeptoren CD4 und CD8 stabilisieren die Wechselwirkung zwischen TZR und Peptid:MHC-Komplex und sind an der intrazellulären Signalgebung beteiligt.

Für eine Aktivierung von naiven T-Zellen werden weitere Corezeptoren benötigt. Der Corezeptor CD28 ist ein Homodimer und befindet sich auf naiven T-Zellen, während sich seine Liganden B7.1 (CD80, Dimer) und B7.2 (CD86, Monomer) auf der Oberfläche von aktivierten APZ befinden. Bindungen zwischen CD28 und den B7 Molekülen verstärken die antigenabhängige Aktivierung der T-Zellen und fördern über intrazelluläre Signalwege die Zellproliferation, das Zellüberleben und die Zytokinproduktion (ACUTO, MICHEL, 2003). Über CD28 wird die Produktion von Interleukin-2 (IL-2) sowie Synthese der α Kette (CD25) des IL-2 Rezeptors auf der T-Zelle gefördert. Der IL-2 Rezeptor besteht aus einer γ , β und α Kette. Naive T-Zellen exprimieren die niedrigaffine $\gamma:\beta$ Variante, aktivierte T-Zellen und regulatorische T-Zellen (Treg), die hochaffine trimere Variante. Durch Expression der trimeren Variante werden die aktivierten T-Zellen auch für niedrige physiologische Konzentrationen von IL-2 sensibel. IL-2 spielt eine wichtige Rolle in der Aktivierung, Proliferation und Differenzierung naiver T-Zellen und in der Homöostase der Immunantwort bei bereits aktivierten T-Zellen (GAFFEN, 2001). Als weiterer stimulierender Faktor bindet CD40 auf APZ an CD40L auf T-Zellen. Die aktivierte APZ exprimiert dadurch mehr B7 Moleküle, welches die T-Zell-Antwort stabilisiert und verstärkt. Eine überschießende Aktivierung wird durch inhibitorische Rezeptoren reguliert. Mit CD28 verwandt sind die inhibitorischen Rezeptoren CTLA-4 (cytotoxic t-lymphocyte associated protein 4) und PD-1 (programmed death 1) welche sich auf der Oberfläche von aktivierten T-Zellen befinden. Das Dimer CTLA-4 ist in der Lage mit hoher Avidität zwei Dimere B7.1 zu binden, im Gegensatz zu CD28 welches nur ein B7.1 binden kann. Zudem kann es seine

Liganden B7.1 und B7.2 von der Zielzelle über transzelluläre Endozytose entfernen (QURESHI et al., 2011). Über weitere intrazelluläre Mechanismen wirkt CTLA-4 der CD28-vermittelten T-Zellaktivierung inhibierend entgegen (RUDD et al., 2009).

PD-1 bindet an seine Liganden PD-L1 (programmed death ligand 1, B7-H1) oder PD-L2 (programmed death ligand 2 B7-DC) welche zu der Gruppe der B7 Moleküle gehören. Während einer Inflammation können APZ PD-L2 exprimieren, PD-L1 wird hingegen konstitutiv auf vielen verschiedenen Zellen exprimiert (CHEN, FLIES, 2013). Sowohl der Verlust von CTLA-4 als auch PD-1 in Mausmodellen führt zum vermehrten Auftreten von autoimmunen Erkrankungen (ACUTO et al., 2008).

BTLA (B- and T-Lymphocytes-Attenuator) gehört ebenfalls zur Familie der CD28 Moleküle, interagiert jedoch nicht mit den B7 Molekülen, sondern mit HVEM (Herpes Virus Entry Mediator) ein Molekül der Tumornekrose-Faktor (TNF) Rezeptor Superfamilie. Werden die Moleküle BTLA und HVEM zusammen auf derselben Zelle exprimiert führt das zu inhibitorischen Signalen, wohingegen die Interaktion der beiden, zwischen zwei unterschiedlichen Zellen, positive Überlebenssignale auf der HVEM exprimierenden Zelle vermittelt (MURPHY, 2018).

Die naiven T-Zellen zirkulieren mehrmals am Tag durch das Blut- und Lymphsystem. Besonders in den sekundären lymphatischen Organen, in denen sich auch eine Vielzahl von APZ befinden, steigt die Wahrscheinlichkeit auf ein zu ihrem TZR passendes Antigen treffen. CD62L (L-Selektin) auf naiven T-Zellen befähigt diese, durch Interaktion mit der Endothelwand, in die sekundär lymphatischen Organe zu migrieren („*Homing*“). Aktivierte T-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche CD69, welcher den Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor inhibiert und dadurch die T-Zell-Migration, entlang eines steigenden Sphingosin-1-Phosphat-Gradienten, von dem sekundären Lymphgewebe zu dem extralymphatischen Gewebe aus dem Lymphgewebe, verhindert. Daher eignet sich CD69 als Marker für die Aktivierung und das Lymphknoten *Homing* (CYSTER, SCHWAB, 2012). Nach Aktivierung und Proliferation naiver T-Zellen entwickeln sich diese nach einigen Tagen zu T-Effektorzellen, welche auf ihr spezifisches Antigen auch ohne Kostimulation eine Immunantwort auszulösen.

3.3.1.1 CD8 T-Zellen

Für die Abwehr von Pathogenen (Viren, Bakterien, Tumorzellen), die sich im Zytosol der befallenen Zelle befinden ist die zytotoxische Immunabwehr der CD8 T-Effektor-T-Zellen unabdingbar. Ihr spezifisches Antigen erkennen zytotoxische T-Zellen, wenn es in MHC I präsentiert wird. Werden CD4 T-Zellen durch APZ aktiviert, wird über Expression von IL-2 und CD40L und folgender verstärkter Expression von B7 die Differenzierung der zytotoxischen T-Zellen gefördert. Zytotoxische T-Zellen bewirken über Effektorproteine eine Autophagie der Zielzellen und können über Zytokine wie Interferon γ (IFN γ) die virale Replikation hemmen sowie die Expression von MHC I auf den Zielzellen steigern. Tumornekrose Faktor α (TNF α) kann Makrophagen aktivieren und damit

Pathogenaufnahme steigern und die Verbreitung dessen einschränken (MURPHY, 2018; SZABO et al., 2003).

3.3.1.2 CD4 T-Zellen

Die CD4 T-Zellen sind maßgeblich an der Steuerung der humoralen und zytotoxischen Immunantwort beteiligt. Da sie wichtige Regulatoren und Unterstützer der pathogenerkennenden APZ und pathogenbekämpfenden Zellen (zytotoxische T-Zellen) sind, werden einige auch als T-Helferzellen (T_H-Zellen) bezeichnet. Anhand ihrer Zytokinprofile lassen sich CD4 T-Zellen in verschiedene Subpopulationen wie die TH₁-, TH₂-, TH₁₇-Zellen, TFH- Zellen (follikuläre T-Helferzellen) und die regulatorischen T-Zellen (Treg) unterteilen (MURPHY, 2018; SZABO et al., 2003).

3.3.1.3 Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen (Treg) können die adaptive T-Zell vermittelte Immunantwort regulieren (SAKAGUCHI, 2000). Die natürlichen Treg (nTreg) regulieren die Autoimmunität während der T-Zell-Reifung im Thymus. Sie sind gekennzeichnet durch eine hohe Expression von CD25 und des intranukleären Transkriptionsfaktors FOXP3 (Forkhead-Box-Protein 3). Induzierte Treg im peripherem Blut entwickeln sich ähnlich der T-Effektorzellen aus naiven CD4-T-Zellen, in sekundär lymphatischen Geweben während der Antigenerkennung. Eine Untergruppe ist phänotypisch und funktionell sehr ähnlich zu den nTreg, mit einer hohen Expression von CD25 und FOXP3 (WEAVER et al., 2006). Diese entwickeln sich unter dem Einfluss des Zytokins TGFβ (Transforming Growth Factor β), Retinsäure und der Abwesenheit pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6. Sie sind selbst in der Lage TGFβ zu produzieren und so über positive Rückkopplung die FOXP3 Expression und Zellfunktion zu stabilisieren (CHEN et al., 2003; WEAVER et al., 2006). Der Transkriptionsfaktor FOXP3 inhibiert den Transkriptionsfaktor NFAT (nuclear factor of activated T-cells) welcher wiederum mit anderen Promotoren die Produktion von inflammatorischen Zytokinen wie IL-2, IL-4 und IFNγ fördert (FONTENOT, RUDENSKY, 2005; SAKAGUCHI et al., 2008). Durch FOXP3 wird zudem die Expression von CTLA-4 und hohe Expression von CD25 gefördert (SAKAGUCHI, 2005).

Da FOXP3 ein intranukleärer Marker ist und dies die Zugänglichkeit für Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper erschwert, wurden alternative Distinktionsmerkmale der Treg gesucht. IL-7 spielt eine wichtige Rolle in der frühen Entwicklung unreifer Lymphozyten (VON FREEDEN-JEFFERY et al., 1995). Der IL-7 Rezeptor besteht aus zwei Untereinheiten, der IL-7 Rezeptor-α-Kette (CD127) und IL-7 Rezeptor-γ-Kette. Für die Entwicklung von Treg spielt IL-7 jedoch eine untergeordnete Rolle, weshalb sie eine niedrige Expressionsrate von CD127 aufweisen (SEDDIKI et al., 2006). Eine niedrige Expression von CD127 korreliert invers mit der FOXP3 Expression bei gleichzeitig hoher Expression von CD25 und CD4. Somit lassen sich die Treg neben CD25^{hoch} FOXP3^{hoch} T-Zellen auch als CD25^{hoch} CD127^{niedrig} T-Zellen darstellen (YU et al., 2012).

3.3.1.4 Phänotypische und funktionelle Kompartimente der T-Zellen

Während der T-Zell-vermittelten Immunantwort entwickeln sich nicht nur Effektorzellen, sondern auch T-Gedächtniszellen, welche für eine langanhaltende Immunität sorgen. Diese Gedächtniszellen sind in der Lage bei erneutem Antigenkontakt direkt, schnell und effizient auf das Antigen zu reagieren. In einem linearen Modell nehmen mit zunehmender Differenzierung unter anderem die Teilungsfähigkeit, Multipotenz und die Migration in sekundär lymphatisches Gewebe ab. Dem gegenüber steigt mit zunehmender Differenzierung die Antigenabhängigkeit, Effektorfunktion und Zirkulation in extralymphatisches Gewebe. Unter anderem können drei Gruppen phänotypisch und funktionell im peripherem Blut unterschieden werden. Von den naiven T-Zellen (T_N) lassen sich „central memory“ (CM) T-Zellen, „effector-memory“ (EM) T-Zellen und „effector memory with re-expression of CD45RA“ T-Zellen (TEMRA) differenzieren. Mögliche Marker zur Differenzierung der Untergruppen sind das L-Selektin CD62L und die Spleißvarianten CD45RA und CD45R0 von CD45 (MAHNKE et al., 2013). CD45RA und CD45R0 unterscheiden sich in ihrem Molekulargewicht. CD45RA ist schwerer und wird vor allem von ruhenden naiven unreifen T-Zellen exprimiert. CD45R0 ist leichter und findet sich auf der Oberfläche von aktivierten Antigen-geprägten T-Zellen (COSSARIZZA et al., 1996). Der TZR und CD4 können mit CD45R0 interagieren woraufhin die T-Zellen leichter mit Antigen:MHC Komplexen interagieren können. Die Expression von CCR7 und CD62L ist für die Migrationsfähigkeit in sekundär lymphatisches Gewebe zuständig und verringert sich mit Reifung der T-Zellen (MURPHY, 2018). Naive T-Zellen (T_N) können definiert werden als $CD45R0^{\text{niedrig}} CD62L^{\text{hoch}}$, CM T-Zellen als $CD45R0^{\text{hoch}} CD62L^{\text{hoch}}$, EM T-Zellen als $CD45R0^{\text{hoch}} CD62L^{\text{niedrig}}$, TEMRA-Zellen als $CD45R0^{\text{niedrig}} CD62L^{\text{niedrig}}$ (MAHNKE et al., 2013).

Neben der Expression von Oberflächenmarkern ist auch die Expression von Effektor-Zytokinen charakteristisch für die jeweiligen T-Zell-Kompartimente. IL-2 ist essenziell in der frühen Phase der Aktivierung von T-Zellen (3.3.1). Das Zytokin $TNF\alpha$ wird von kürzlich aktivierten T-Zellen ausgeschüttet und ist stark pro-inflammatorisch wirksam und in der Lage weitere Immunzellen anzulocken. Die Expression von $TNF\alpha$ sinkt in späteren Differenzierungsstadien wie den TEMRA. Die Produktion von $IFN\gamma$ kennzeichnet die späteren Phasen der Aktivierung und die Zellreife (EM T-Zellen, TEMRA). $IFN\gamma$ fördert die Expression von MHC I und MHC II auf den Zielzellen, hemmt die Virusreplikation, aktiviert Makrophagen und stimuliert zytotoxische Aktivitäten (MAHNKE et al., 2013).

Die Expression des nukleären Proteins Ki-67 ist assoziiert mit den aktiven Phasen des Zellzyklus und abwesend in der ruhenden Phase des Zellzyklus (G_0). Ki-67 eignet sich somit als Proliferationsmarker für kürzlich proliferierte Zellen (SCHOLZEN, GERDES, 2000).

3.3.2 Antigen-spezifische T-Zellen und T-Zell-Erschöpfung

T-Zellen, die chronisch kontinuierlich einem Antigen ausgesetzt sind, können in einem veränderten Phänotyp resultieren, der in der Zellproliferation eingeschränkt ist, und an ihrer Zelloberfläche

verschiedene co-inhibitorische Marker exprimiert (CHEN, FLIES, 2013). Ein chronischer Stimulus für das Immunsystem bilden unter anderem auch Infektionen mit Bakterien (z.B. *Mycobacterium tuberculosis*), Infektionen mit Viren (humane Herpesviren, z.B. VZV; Humanes Herpesvirus 3, HHV3, CMV; Humanes Herpesvirs 5, HHV5) oder Tumore.

Wichtige Zytokine für die Funktionalität der CD4 und CD8 T-Zellen sind IFN γ , TNF α und IL-2. Nach dem ersten Kontakt zu einem Antigen und der damit einhergehenden Inflammation, adaptiven Immunantwort und Antigenbeseitigung entwickeln sich multifunktionale T-Gedächtniszellen, die in der Lage sind, auf erneuten Antigenkontakt schnell zu reagieren (3.3.1.4). Diese T-Zellen zeichnen sich durch die Fähigkeit zur Expression der Zytokine IL-2, TNF α und IFN γ , ihrer Proliferationsfähigkeit und ggf. zytolytischer Aktivität aus. Persistiert jedoch das Antigen oder steigt sogar die Antigenlast, können diese T-Zellen durch verschiedenen Mechanismen dysfunktional werden und in einem erschöpften Phänotyp resultieren. Diese T-Zell-Erschöpfung ist gekennzeichnet durch die abnehmende oder gestörte Expression von Zytokinen (IL-2, TNF α , INF γ), steigender Expression von co-inhibitorischen Rezeptoren (CTLA-4 und PD-1), bis hin zu sinkender Zellzahl oder sogar Verlust der Antigen-spezifischen T-Zellen. Neben der Expression von co-inhibitorischen Rezeptoren (CTLA-4 und PD-1) kann auch eine erhöhte Anzahl Tregs eine Rolle bei der chronischen Antigenpersistenz und T-Zell-Erschöpfung spielen. Der dysfunktionale erschöpfte T-Zell-Phänotyp ist nicht mehr in der Lage das Antigen zu kontrollieren und zu eliminieren (WHERRY, 2011).

3.3.3 Das Tumormikromilieu und die Immunantwort

Man geht davon aus, dass Tumore durch verschiedene Mechanismen der Kontrolle des Immunsystem entgehen und dadurch apparent werden. Konzeptuell bestehen Wechselwirkungen zwischen Immunsystem und Tumoren, wobei das Immunsystem nicht nur suppressiv auf das Tumorwachstum wirkt, sondern durch den verursachten Selektionsdruck auch in gewisser Weise fördernd. Die aktive Rolle des Immunsystems wird als „tumor-immunoediting“ bezeichnet und in die drei Phasen bestehend aus Eliminationsphase, Gleichgewichtsphase und Entkommensphase unterteilt (SCHREIBER et al., 2011).

In der Eliminierungsphase ist das Immunsystem in der Lage, die entarteten Zellen zu eliminieren und ein weiteres Wachstum zu verhindern. Hierbei spielen vor allem Zellen der angeborenen und adaptiven Immunantwort mit zytolytischer Aktivität eine tragende Rolle (DUNN et al., 2004). Ein wichtiges Effektormolekül in der Kontrolle und Beseitigung ist IFN γ , welches eine zentrale Rolle in der Abwehr von intrazellulären Pathogenen in der TH₁-Zell-gewichteten Immunantwort spielt. Über die Expression verschiedener Tumorantigene durch den Tumor ist die adaptive Immunantwort in der Lage, diese als fremd zu erkennen. Während der Gleichgewichtsphase verändern sich durch den Selektionsdruck einzelne Tumorzellen und können der Immunabwehr entgehen. In der Entkommensphase übersteigt das Tumorwachstum die Elimination durch das Immunsystem (MITTAL et al., 2014). Hierbei spielt der Verlust von Tumorabstoßungsantigenen, MHC I oder der

Fähigkeit Antigene zu prozessieren und zu präsentieren eine Rolle. Ebenso etabliert sich während dieser Phase durch verschiedene humorale, physikalische und zelluläre Faktoren in der direkten Tumorzellumgebung ein immunsuppressives Milieu (*tumour microenvironment*). So können Tumorzellen TGF β als immunsuppressiven humoralen Faktor sezernieren oder an ihrer Oberfläche den inhibitorisch wirksamen Liganden PD-L1 exprimieren. Ebenso befinden sich in dem Tumormikromilieu regulatorische T-Zellen, die die negativ regulatorisch wirksamen Moleküle CTLA-4 und PD-1 exprimieren, über hohe Expression von CD25 um das Angebot von aktivierend wirkendem IL-2 konkurrieren und ebenfalls die immunsuppressiven Zytokine TGF β und IL-10 produzieren (siehe auch 3.3.1.3; (SCHREIBER et al., 2011). Im Tumoringterstitium fand man auch extrazelluläres ATP (Adenosintriphosphat) welches über P2X Rezeptoren auf der Zelloberfläche von T-Zellen proinflammatorisch wirkt (STAGG et al., 2011). CD39 (Ecto-Nukleosidtriphosphat-Diphosphohydrolase I) ist eine ATPase, die ATP unter enzymatischer Aktivität zu AMP (Adenosinmonophosphat) hydrolysieren kann. Über die enzymatische Aktivität von CD73 (Ecto-5'-Nukleotidase) entsteht dabei aus AMP Adenosin, welches über den G-Protein-gekoppelten Rezeptor A2A immunsuppressiv auf Lymphozyten wirken kann (LOKSHIN et al., 2006; STAGG et al., 2011). CD39 kann unter anderem auf der Oberfläche von regulatorischen T-Zellen, CD4 T-Zellen und CD8 T-Zellen exprimiert werden. CD8 T-Zellen mit hoher Expression von CD39 und einem erschöpften Phänotyp mit gestörter Zytokinausschüttung (siehe 3.3.2) konnten als Tumoringfiltrierende Lymphozyten (TIL) in Mammakarzinomen und Melanomen gefunden werden (CANALE et al., 2018).

3.3.4 Die Immun-Checkpoint-Inhibitoren

Einen Durchbruch in der Therapie von Tumorerkrankungen war die Entwicklung von monoklonalen Antikörpern, die hemmend auf die negativ regulatorisch wirksamen Rezeptoren CTLA-4 (zytotoxischen T-Lymphozyten assoziiertes Antigen 4) und PD-1 (programmed death 1) wirken. Diese werden auch als Immun-Checkpoint-Inhibitoren (ICPI) bezeichnet. Im Jahr 2018 wurden die Entdecker *James P. Allison* (CTLA-4) und *Tasuku Honjo* (PD-1) für ihre Arbeiten mit dem Nobelpreis ausgezeichnet (HUANG, CHANG, 2019).

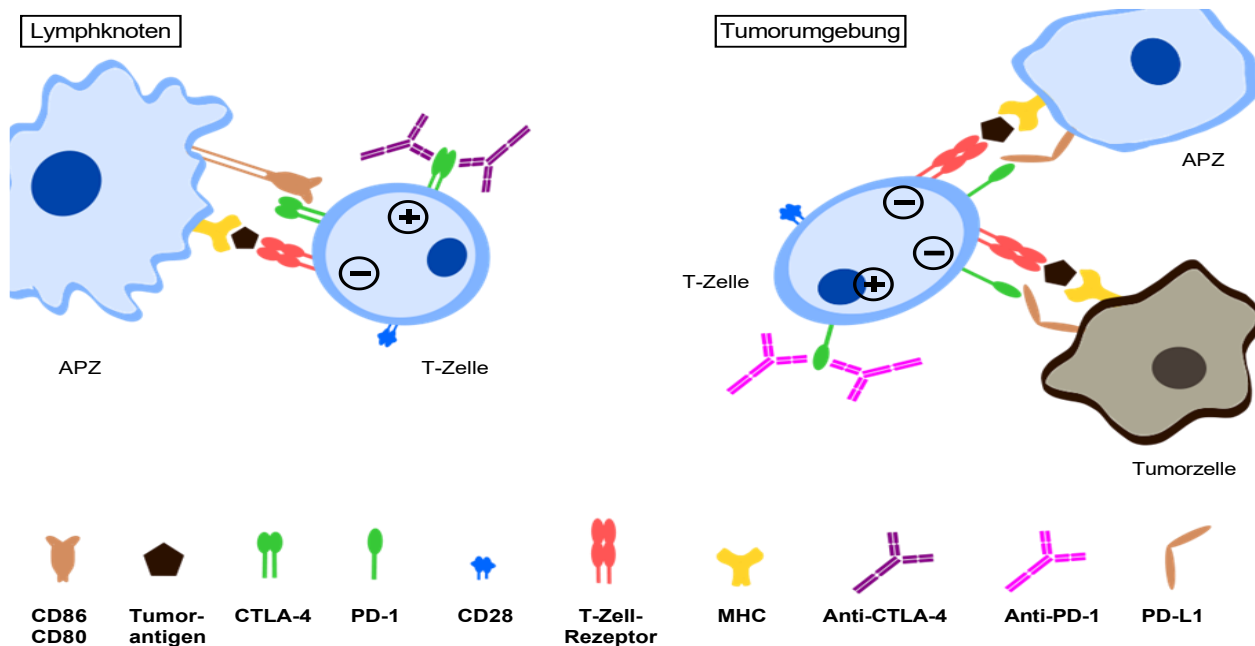


Abbildung 1 Schematische Darstellung der ICPI-Wirkung von anti-CTLA-4 Antikörper Ipilimumab und anti-PD-1 Antikörper Pembrolizumab und Nivolumab. Dargestellt ist die ICPI-Wirkung. Im Lymphknoten (links dargestellt) interagieren T-Zellen ihren T-Zell-Rezeptor (rot) auf ihr passendes Tumorantigen, welches im MHC (gelb) von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) präsentiert wird. Über die Interaktion von CD80/CD86 auf APZ mit CTLA-4 (grünes Dimer) auf T-Zellen wird die Immunantwort auf das Tumorantigen vermindert. Bindet nun anti-CTLA-4 (lila Antikörper) an das CTLA-4 der T-Zellen wird die inhibierende Interaktion zwischen CD80/CD86 und CTLA-4 vermindert, die die Immunantwort gegenüber dem Tumorantigen „enthemmt“. In der Tumorumgebung (rechts dargestellt) interagieren T-Zellen ebenfalls auf ihr passendes Tumorantigen in MHC, welches hier jedoch neben APZ auch von Tumorzellen präsentiert wird. Hier wird die Immunantwort durch Interaktion von PD-1 (grünes Monomer) mit PD-L1 (hellbraun) gehemmt. Durch anti-PD-1 (rosa Antikörper) wird diese verminderte Immunantwort ebenfalls „enthemmt“. Die Grafik wurde mit dem „Inkscape vector graphics editor“ erstellt und wurde nach einer Illustration von Dr. med. Guido Hegasy modifiziert (https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/45/11_Hegasy_CTLA4_PD1_Immuntherapie.png).

Die Suppression der T-Zell-Antwort auf Tumore durch CTLA-4 und PD-1 wird als ein Hauptfaktor für das Entkommen von Tumorzellen vor der Immunantwort angesehen. Wird diese „Bremse“ durch monoklonale Antikörper wieder aufgehoben lässt sich eine Wiederherstellung und Aktivierung der Immunantwort gegenüber Tumoren beobachten. Dies führte zur Zulassung der ICPI in der Therapie von diversen Krebsarten in fortgeschrittenen Stadien (z.B. Melanom, kutanes Plattenepithelkarzinom, Merkelzellkarzinom, Nierenzellkarzinom, nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom; (HUANG, CHANG, 2019)). So wurde das progressionsfreie Überleben und Gesamtüberleben für einen Teil der Patienten in fortgeschrittenen Krankheitsstadien teilweise sehr deutlich verbessert (3.1.6, 3.1.7, 3.2.4). Warum dennoch nur ein Teil der Patienten von der ICPI-Therapie profitiert, ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Für PD-1 existieren in der Therapie des Melanoms die zwei Antikörper Pembrolizumab und Nivolumab. Beide Medikamente werden in der Therapie des Melanoms gleichwertig eingesetzt. Sie unterscheiden sich im Zeitintervall zwischen den Applikationen.

Autoimmune Nebenwirkung (AI NW) sind unter Therapie mit ICPI nicht selten. So gibt es transiente akute Nebenwirkungen, wie eine Autoimmunkolitis oder Autoimmunpneumonitis, aber auch bleibende Nebenwirkungen, wie eine Autoimmunthyreoditis bis zu einer Autoimmunhypophysitis. Neben der akuten Beeinträchtigung durch die Nebenwirkung an sich, können diese zu einer ungewollten Hospitalisierung bis hin zur Todesfolge führen (RAMOS-CASALS et al., 2020). Aufgrund des Erfolges der Immun-Checkpoint-Inhibitor Therapie im Stadium IV und III, hat diese als adjuvante Therapie im Stadium IIB und IIC, mit Verbesserung des Rezidiv-freien Überlebens, im klinischen Alltag Einzug gehalten (KIRKWOOD et al., 2023; RUTKOWSKI, CZARNECKA, 2023).

3.4 Ziele dieser Arbeit

Wie zuvor beschrieben, profitiert trotz der bahnbrechenden Fortschritte der ICPI-Therapie im Bereich der metastasierten Malignome nur ein Teil der Personen, die an einer Tumorerkrankung leiden. Des Weiteren wird sich auch die Zulassung der ICPI-Therapie in Zukunft vergrößern und für Personen mit anderen Tumorleiden in Betracht gezogen werden. Jedoch birgt die Therapie neben ihrem Nutzen erhebliche Risiken durch das Auftreten von autoimmunvermittelten Nebenwirkungen. Diese sind mitunter schwer und vermindern die Lebensqualität der Personen mit Tumorleiden. Wünschenswert für die Zukunft sind prädiktive Biomarker, die sowohl Aufschluss über das Ansprechen auf die ICPI-Therapie als auch über autoimmunvermittelte Nebenwirkung zum Beginn oder im Verlauf der Therapie geben könnten, um individuelle Therapieempfehlungen treffen zu können. Immunzellen aus dem peripheren Blut der Personen mit Tumorleiden sind aufgrund geringer Invasivität der Probenentnahme attraktiv, da sich diese ohne weitere Belastung im Rahmen der Routinekontrollen vor und im Verlauf der ICPI-Therapie gewinnen lässt. Da Immunzellen einerseits Ziel der ICPI-Therapie sind und andererseits direkt an der Bekämpfung des Tumors mitwirken, können Veränderungen in den Eigenschaften bzw. im Phänotyp der Immunzellen erwartet werden.

Für die vorliegende Arbeit wurden zwei übergeordnete Ziele definiert. Im ersten Teil wurde eine detaillierte Charakterisierung der T-Zellen von Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom unter ICPI-Therapie vorgenommen. Hierbei sollten die T-Zellen auf mögliche Unterschiede hinsichtlich der Medikamentenwirkung auf das Immunsystem, des Therapieansprechens und dem Auftreten von Immun-Checkpoint-Inhibitor Therapie vermittelten autoimmunen Nebenwirkungen analysiert werden. Zunächst wurden die Analysen in größeren Kollektiven im Querschnitt durchgeführt und im Anschluss erste longitudinale Evaluationen angestrebt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit stand die Optimierung und Weiterentwicklung eines bereits etablierten Protokolls zur mechanischen Isolierung von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten aus Gewebe von Personen mit Nierenzellkarzinom und anschließender Antigen-spezifischer Stimulation im Mittelpunkt. Hierbei wurde der Fokus auf die effektive Nutzung der gewonnenen Lymphozyten, der Zeitoptimierung, der Auswahl geeigneter Antigene zur Stimulation und dem geeigneten

Stimulationsprotokoll für Antigen-spezifische Tumor-infiltrierende Lymphozyten gelegt. Ergänzend erfolgte nach Prozessoptimierung die Charakterisierung der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten hinsichtlich ihrer Funktionalität und ihres Phänotyps. Zusätzlich wurden auch diese mit den Immunzellen aus dem peripheren Blut verglichen. Mögliche Gemeinsamkeiten zwischen den Tumor-infiltrierenden Lymphozyten und Lymphozyten aus peripherem Blut wären als zusätzliche diagnostische Aussagekraft für Personen mit Nierenzellkarzinom von Interesse. In der Zukunft ließen sich daraus möglicherweise Hilfen für eine Therapieentscheidung ableiten.

4 Material und Methoden

4.1 Geräte, Materialien, Reagenzien und Software

In den folgenden Tabellen sind Geräte (Tabelle 1), Materialien und Reagenzien (Tabelle 2-Tabelle 5) sowie verwendete Software (Tabelle 6) zusammengefasst. Die Tabellen enthalten auch die Zusammensetzungen und Konzentrationen von Puffern und Reagenzien.

Tabelle 1: Geräte und Materialien

Materialien und Geräte	Hersteller, Firmensitz
ASSISTENT-Zählkammer nach Neubauer doppelt	Assistent, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim vor der Rhön, Deutschland
Brutschrank (Hera cell 240i CO2 Incubator)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Cell Strainer Falcon 40µm Nylon	Fisher Scientific, Hampton, USA
CryoTube Vials 1,8ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Deckglas	Assistent, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim vor der Rhön, Deutschland
Durchflusszytometer (FACSCanto II)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Glaspipette	Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht, Deutschland
Inverses Mikroskop, VisiScope® IT415 PH	VWR International, Radnor, USA
Kolbenhubpipette 10,20,100,200,1000µl Discovery Comfort	PZ HTL S.A., Warszawa, Polen
Kühlschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
Laboprot Vakuumpumpe	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Deutschland
Lithium - Heparin Monovette	Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht, Deutschland
Minilys personal homogenizer	Bertin Technologies SAS, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich
Multipipette plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitze für Kolbenhubpipette	Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht, Deutschland
Pipettierhilfe (Pipetboy acu 2)	Integra Bioscience GmbH, Biebertal, Deutschland
Polypropylen-Röhrchen 15ml, 50ml	Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht, Deutschland
Präzisions Dispenser Combipips advanced	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Precellys® CK14 Lysing Kit, Soft Tissue Homogenizing 2ml	Bertin Technologies SAS, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich
Reagiergefäß 1,5ml	Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht, Deutschland
Röhrchen für Durchflusszytometrie 5ml 75x12mm Polystyrol	Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht, Deutschland
Röhrchen für Durchflusszytometrie 5ml 75x13mm Polypropylen	Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipette 2, 5, 25ml	Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipette, Corning® Costar® Stripette® 10ml Skalpell	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA P.J. Dahlhausen & Co. GmbH, Köln, Deutschland
Zellkulturschale TC-Schale 100	Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht, Deutschland
Vortex Mixer 7-2020	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
VWR Light-Duty Tissue Wipers One-Ply White Whipers	VWR International, Radnor, USA
Werkbank, steril (Herasafe KS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Zentrifuge Mega Star 1.6	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.OR Centrifuge	Heraeus, Hanau, Deutschland

Tabelle 2: Chemikalien und Testkits

Chemikalien und Kits	Hersteller, Firmensitz
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Brefeldin A (BFA, Stock 5mg/ml in Ethanol)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Diluent-Ki67-eBioscience	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Essigsäure 3%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
FACS- Clean	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS-Flow	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS-Rinse	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
FicoLite-H (Ficoll)	PAA, Pasching, Österreich

Chemikalien und Kits	Hersteller, Firmensitz
Fix/Perm-Konzentrat-Ki67-eBioscience	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Lysingsolution (10fach konzentriert, einfache Verdünnung mit Aqua dest.)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Natriumazid (NaN ₃ , 10% in Aqua)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Paraformaldehyd, 1%, 4%, (PFA pH 7,4-7,6)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Permeabilisierungspuffer-Ki67-eBioscience	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Phosphate buffered saline (PBS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium 1640 mit 1% L-Glutamin (Gln)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Saponin (2g in 10% Natriumazid (NaN ₃))	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Aqua dest.	Fresenius, Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland

Tabelle 3: Medien und Puffer

Medien und Puffer	Formulierung
Waschmedium	RPMI, 0,5% HUS, 1%P/S
FACS-Puffer	PBS, 5%FCS, 0,5%BSA, 0,07%NaN ₃
PBS-EDTA	PBS, 0,02% EDTA
Permeabilisierungspuffer-Ki67-eBioscience	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Saponin-Puffer	FACS-Puffer 0,1% Saponin
Transportmedium	RPMI, 0,5% HUS, 1%P/S

Tabelle 4: Antikörper

Antigen	Fluorochrom	Klon	Isotyp
CD3	PE-Cy7	SK7*	Mouse BALB/c IgG1, k
CD3	PerCP	SP34-2*	Mouse BALB/c IgG1, k
CD3	APC	UCHT1*	Mouse BALB/c IgG1, k
CD4	APC-H7	L200*	Mouse BALB/c IgG1, k
CD4	PE-Cy7	L200*	Mouse BALB/c IgG1, k
CD8	V500	SK1 /RUO)	Mouse BALB/c IgG1, k
CD8	PerCP	SK1*	Mouse BALB/c IgG1, k
CD14	V450	M5E2*	Mouse IgG1, K
CD16	PE	B73.1*	Mouse BALB/c IgG1, K
CD19	FITC	H1B19*	Mouse IgG1, K
CD25	V450	M-A251*	Mouse BALB/c IgG1, K
CD39	APC	TU66*	Mouse IgG2b, k
CD39	PE	A1*	Mouse BALB/c IgG1, k
CD45R0	PE-Cy7	UCHL1*	Mouse BALB/c IgG2a, k
CD56	PE	MY31*	Mouse BALB/c X C57BL/6 IgG1, k
CD62L	PE	DREG-56*	Mouse IgG1, K
CD69	PE-Cy7	FN50*	Mouse IgG,k
CD69	PerCP	L78 (RUO(GMP))	Mouse BALB/c IgG1, k
CD127	FITC	eBioRDR5	Mouse IgG1, K
CD127	PE-Cy7	HIL-7R-M21*	Mouse IgG1, K
CD152 (CTLA-4)	PE	BNI3*	Mouse BALB/c IgG2a, k
CD152 (CTLA-4)	APC	BNI3*	Mouse BALB/c IgG2a, k
CD272 (BTLA)	PE	J168-540*	Mouse IgG1, K
CD274 (PD-L1)	BV515	Clone MIH1*	Mouse BALB/c IgG1, k
CD279 (PD-1)	APC	MIH4	Mouse IgG,k
IFN γ	FITC	B27*	Mouse IgG1,K
IL-2	PE	MQ1-17H12*	Rat IgG2a, k
Ki67	Alexa 647 (APC)	Clone B56*	Mouse IgG1, k
TNF	V450	MAB11*	Mouse IgG, k

*RUO (research use only); alle Antikörper wurden von BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland bezogen.

Tabelle 5: Antigene

Antigen	Hersteller
CMV-Ag (Zellkulturlysat aus Virus-infizierten Fibroblasten)	Virion, Hanau, Deutschland
CMV-Ag (Zellkulturlysat aus Virus-infizierten Fibroblasten)	BioWhittaker, (Lonza), Veviers, Belgien
CMV-Peptide	JPT Peptide Technologies, Berlin, Deutschland
KoAg (Zellkulturlysat aus nicht-infizierten Fibroblasten)	Virion, Hanau, Deutschland
VZV-Ag (Zellkulturlysat aus Virus-infizierten Fibroblasten)	Virion, Hanau, Deutschland

Antigen	Hersteller
Staphylococcus aureus Enterotoxin B (SEB)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Tabelle 6: Software

Software	Hersteller, Firmensitz
BD FACS Diva Software	BD Bioscience, Heidelberg
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc., SanDiego, USA
Microsoft Excel Version 18.2004.1162.0	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Word Version 18.2004.1162.0	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Inkscape Version 1.2.2	Community, Open Source

4.2 Charakterisierung und Quantifizierung von T-Zellen in Vollblut

Im Rahmen der durchflusszytometrischen Messverfahren zur Charakterisierung und Quantifizierung von T-Zellen der Patienten erfolgten zwei verschiedene Prozessierungen von Lithium-heparinisierem Vollblut. Zum einen wurden T-Zell-Populationen direkt aus dem Vollblut angefärbt (Abschnitt 4.2.1). Zum anderen wurden Antigen-spezifische T-Zellen nach Stimulation auf Basis von intrazellulärer Zytokin-Induktion charakterisiert (Abschnitt 4.2.2).

4.2.1 Direkte extra- und intrazelluläre Färbung von T-Zell-Subpopulationen in Vollblut

Zur Quantifizierung der T-Zell-Subpopulationen aus Vollblut wurden pro Blutprobe zwei verschiedene Oberflächenfärbungen (1 und 2) durchgeführt. Eine dritte Färbung bestand aus einer Oberflächenfärbung (3a) gefolgt von einer intranukleären Färbung (3b). Die in den Färbungen enthaltenen Fluorochrom-gekoppelten Antikörper sind in Tabelle 7 aufgeführt. Hierbei handelt es sich bei Färbung 1 und Färbung 2 um Markermoleküle, die hauptsächlich auf der Zelloberfläche exprimiert werden, während Färbung 3 auch Marker umfasst, die sich intrazellulär (der Großteil von CTLA-4) und intranukleär (Ki67) befinden. Zur Identifizierung der Subpopulation wurden CD3, CD4, CD8, CD25 und CD127 untersucht. Zusätzlich wurden Marker der Differenzierung (CD45R0, CD62L) der Funktionalität (PD-1, PD-L1, CD272 (BTLA), CD39) und der Proliferation (Ki67) angefärbt.

Tabelle 7: Antikörpergemisch für direkte Färbungen von T-Zellen in Vollblut

Färbung 1			Färbung 2		
Antikörper	Fluorochrom	Menge in µl	Antikörper	Fluorochrom	Menge in µl
CD3	PerCP	4,00	CD3	PerCP	4,00
CD4	APC-H7	1,00	CD4	APC-H7	1,00
CD8	V500	1,00	CD8	V500	1,00
CD25	V450	1,25	CD25	V450	1,25
CD127	FITC	1,25	CD127	PE-Cy7	2,00
CD45R0	PE-Cy7	1,25	PD-1	APC	5,00
CD62L	PE	8,00	PD-L1	BV515	5,00
CD39	APC	10,00	CD272 (BTLA)	PE	2,50

Färbung 3a		
Antikörper	Fluorochrom	Menge in µl
CD3	PerCP	4,00
CD4	APC-H7	1,00
CD8	V500	1,00
CD25	V450	1,25
CD127	FITC	1,25

Färbung 3b		
------------	--	--

Ki67	Alexa647	1,00
CTLA-4	PE	4,00

Die Färbungen 1-3 wurden entsprechend des in Tabelle 8 aufgeführten Schemas durchgeführt. Pro Färbung wurden 100 µl Li-Heparin Vollblut mit den in Tabelle 7 gelisteten Antikörper-Gemischen (1, 2 und 3a) in 5 ml Polysterol Röhren versetzt. Es erfolgte die Inkubation der Ansätze für 25 Minuten bei RT im Dunkeln. Zur Lyse der Erythrozyten und Fixierung der Leukozyten wurde anschließend 900 µl Lysing Solution hinzugegeben. Die Ansätze wurden gemischt und für zehn Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für sieben Minuten bei 320 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Ansätze wurden mit je 2 ml FACS-Puffer gewaschen. Abschließend erfolgte die Zentrifugation der Ansätze für sieben Minuten bei 320 x g und die Abnahme des Überstandes. Ansatz 1 und 2 wurden in je 150 µl 1% PFA aufgenommen werden und konnten bis zur durchflusszytometrischen Messung bei 4°C im Kühlschrank gelagert werden. Für die intranukleäre Färbung 3b wurden 250 µl Fix/Perm Konzentrat mit 750 µl Diluent versetzt. Dies wurde dann mit Ansatz 3 versetzt und für 30 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Der eBioscience Permeabilisierungsansatz wurde mit Aqua dest. 1:10 verdünnt und diente als Permeabilisierungspuffer. Hiervon wurden 2 ml zu Ansatz 3 hinzugegeben. Der Ansatz wurde für sieben Minuten bei 320 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Es folgte die Zugabe der Antikörper aus Färbung 3b (Tabelle 7), Vortexen und die Inkubation für 30 Minuten bei RT im Dunkeln. Es wurden 2 ml verdünnter Permeabilisierungspuffer hinzugegeben und die Probe für sieben Minuten bei 320 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet in Ansatz 3 wurde in 150 µl 1% PFA aufgenommen. Ansatz 1, 2 und 3 konnten nun mittels Durchflusszytometrie im FACS Canto II gemessen werden.

Tabelle 8: Pipettierschema zur Prozessierung für die direkte Färbung von T-Zellen in Vollblut

Färbung	Vollblut [µl]	Färbe-Ansatz (Tabelle 7)	Lysing [µl]	FACS-Puffer [ml]	Fix/Perm Diluent [ml]	Perm-Puffer [ml]	Färbe-Ansatz (Tabelle 7)	Perm-Puffer [ml]	1%-PFA [µl]
1	100	1	900	2	X	X	X	X	150
2	100	2	900	2	X	X	X	X	150
3*	100	3a	900	2	1	2	3b	2	150

Die Tabellenspalten 4-10 zeigen die Mengen an Lösungen und Reagenzien, die in den im Text beschriebenen Arbeitsschritten hinzugefügt werden; *Färbung 3 erfolgte in 2 aufeinanderfolgenden Schritten.

4.2.2 Nachweis Antigen-spezifischer T-Zellen nach Stimulation

Zur funktionellen Charakterisierung Antigen-spezifischer T-Zellen gegen CMV und VZV aus Lithium-Heparin Vollblut wurde ein bereits im Labor etabliertes Protokoll verwendet (SCHMIDT, SESTER, 2013). Als erregerspezifische Antigene wurden CMV-Lysat + CMV-Peptidmix sowie VZV-Lysat verwendet. CMV- und VZV-Lysate sind jeweils Lysate von mit CMV oder VZV infizierten Fibroblastenkulturen, die vorwiegend CD4 T-Zellen stimulieren. Der CMV-Peptidmix dient zusätzlich zur Stimulation von CD8 T-Zellen. Die zu den Vollblutproben zugegebenen Antigene werden von APZ prozessiert und als Peptidfragmente in ihren MHC auf der Zelloberfläche präsentiert. In Kombination mit den kostimulatorischen Antikörper anti-CD28 und anti-CD49d wird die Aktivierung

der T-Zellen und Produktion von Zytokinen (v.a. IFN γ , IL-2, TNF α) in vitro induziert. Durch Zugabe von Brefeldin A nach zwei Stunden während der sechsstündigen Inkubationszeit wird die Sezernierung unterbunden, sodass die Zytokine intrazellulär akkumulieren (CHARDIN, MCCORMICK, 1999). Nach Hämolyse des Vollblutes und Fixierung der Leukozyten wird die Zellmembran durch Zugabe des Detergens Saponin durchlässig gemacht (JAMUR, OLIVER, 2010). Anschließend können versuchsspezifisch Fluorochrom-gekoppelte Antikörper hinzugegeben werden.

Zur Diskriminierung der erregerspezifischen T-Zell-Aktivität erfolgte parallel eine Stimulation mit einem Ko-Antigen (Ko-Ag) als Negativkontrolle. Bei dem Ko-Antigen handelt es sich um die gleichen Fibroblastenkulturen, welche für die CMV- und VZV- Lysate genutzt werden, jedoch ohne Infektion, sondern als reines Zellkulturlysate. Als Positivkontrolle und zur Analyse polyklonal stimulierter T-Zellen wurde eine Stimulation mit Staphylokokken Enterotoxin B (SEB) durchgeführt. Diese führt zu einer Kreuzvernetzung außerhalb der Peptidbindungsstelle des TZR auf T-Zellen und den MHC der APZ, woraufhin die T-Zellen ebenfalls aktiviert werden und Zytokine produzieren. Diese stimulierten T-Zellen dienen als Positivkontrolle der T-Zell-Aktivität, wobei es in Einzelfällen auch SEB Non-Responder gibt. Die T-Zell-Reaktion, auf die nicht mit VZV oder CMV infizierten Zellkulturlysate stellt, die nicht erregerspezifische Hintergrundaktivität dar und wird als Negativkontrolle von der spezifischen Reaktion subtrahiert.

4.2.2.1 Stimulation von T-Zellen in Vollblut

Im Rahmen der Arbeit wurden pro Probe vier Stimulationsreaktionen 1-4 durchgeführt (Ko-Ag, CMV-Ag+CMV-Peptid, VZV-Ag und SEB). Der Nachweis und die Charakterisierung Antigen-spezifischer T-Zellen erfolgte für jede Stimulationsreaktion über jeweils 2 Färbegemische. Bei Färbung 4 wurden alle Antikörper in einem Ansatz gemischt, Färbung 5 erforderte aufgrund der Fixierungsinstabilität von 2 Antikörpern ein zweistufiges Verfahren (5a und 5b, Tabelle 9). Pro Färbung wurde 200-225 μ l Vollblut eingesetzt.

Tabelle 9: Antikörpergemisch für Färbung 4 und 5 nach Stimulation

Färbung 4		
Antikörper	Fluorochrom	Menge [μ l]
CD4	APC-H7	1,00
CD69	PE-Cy7	1,50
IL-2	PE	4,00
IFN γ	FITC	0,50
CTLA-4	APC	2,00
CD8	PerCP	4,00
TNF α	V450	1,00
<hr/>		
Saponin 5%		1,00
FACS-Puffer		35,00
Σ		50,00

Färbung 5a		
Antikörper	Fluorochrom	Menge [μ l]
PD1	APC	7,50
CD8	V500	1,50
Σ		9,00
<hr/>		
Färbung 5b		
CD4	APC-H7	1,00
CD25	V450	2,00
CD127	PE-Cy7	2,50
CD69	PerCP	2,00
IFN γ	FITC	0,50
CD39	PE	3,00
<hr/>		
Saponin 5%		1,00
FACS-Puffer		38,00
Σ		50,00

Bei ausreichender Menge Vollblut (mehr als 2250 µl) wurde die Stimulation nach dem Pipettierschema in Tabelle 10 durchgeführt. Zunächst wurden 6,75 µl Ko-Stimulations-Mix in ein 15 ml Polypropylen-Reaktionsgefäß vorgelegt. Aus Li-Heparin-Abnahmeröhrchen wurden gepoolt 2250 µl Vollblut entnommen und zu dem Stimulations-Mix hinzugegeben. Das Blut wurde anschließend auf 1x 450 µl und 3x 600 µl in 15 ml Polypropylen-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Zu den vier Stimulationsansätzen 1-4 (Tabelle 10) wurde jeweils die entsprechende Menge Antigen/Peptid hinzugefügt und gevortext. Zur Gewährleistung des Gasaustausches wurden die Deckel nur lose aufgesetzt. Die Ansätze wurden für sechs Stunden bei 37°C und 5% Kohlenstoffdioxid Gaszufuhr inkubiert. Nach zweistündiger Inkubationsdauer wurde der Sekretionsvorgang der Zytokine durch Zugabe von 10 µg/ml Brefeldin A gestoppt (Tabelle 10). Die Ansätze wurden für weitere vier Stunden zurück in den Brutschrank bei 37°C und 5% Kohlenstoffdioxid Gaszufuhr gestellt. Nach sechsständiger Inkubation wurden mögliche Zell zu Zell-Adhäsionen durch Zugabe von 100 µl/ml 20mM EDTA (Tabelle 10) gelöst. Nach einem Vortexen der Proben für mindestens zehn Sekunden wurden die Ansätze dazu für 15 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.

Tabelle 10: Pipettierschema zum Ansatz der Stimulation aus heparinisierem Vollblut

Ansatz	Antigen	Vollblut [µl]	Ko-Stimulations-Mix [µl; 3µl/ml Vollblut]*	Antigen [µl]	BFA [µl; 10µg/ml]*	EDTA [µl; 100 µl/ml]
Σ		2250	6,75			
Aufteilen auf 4 Stimulationsansätze						
1	Ko-Ag	600		19,2	1,2	60
2	CMV-Ag+ CMV-Peptide*	450		14,4+ 3,96	0,9	45
3	VZV-Ag*	600		19,2	1,2	60
4	SEB	600		1,5	1,2	60

*Ko-Stimulations-Mix bestehend aus 1:1 Verhältnis von 1 µg/ml antiCD28 und 1 µg/ml antiCD49d. Ko-Ag, CMV-Ag und VZV-Ag des Herstellers Virion. *CMV-Peptide* des Herstellers JPT Peptide Technologies (Berlin). *CMV-Peptide* lagen 1:10 verdünnt in PBS vor. SEB des Herstellers Sigma-Aldrich (Steinheim). * BFA, Stock 5mg/ml in Ethanol. Die beschriebenen Konzentrationen X/ml beziehen sich auf einen Milliliter Vollblut aus Lithium-Heparin-Abnahmegefäßen.

4.2.2.2 Fixierung von T-Zellen nach Stimulation in Vollblut

Vor der Fixierung der Proben erfolgte im Anschluss eine Aufteilung der Proben in die geplanten Färbeansätze 4 und 5 (Tabelle 9). Da Färbung 5 die Antikörper PD-1 APC und CD8 V500 beinhaltet, die nicht fixierungsstabil sind, musste die Färbung dieser Antikörper vor der Fixierung vorgenommen werden (Färbung 5a). Hierzu wurden nun aus jedem der vier Stimulationsansätze 225 µl Vollblut in je ein 5 ml Polystyrol Röhrchen überführt. Diese Proben wurden einmal mit 500 µl RPMI-Medium gewaschen und anschließend für sieben Minuten bei 320 x g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Antikörper PD-1 APC und CD8 V500 hinzugegeben (Färbung 5a, Tabelle 9) und anschließend für 25 Minuten bei RT im Dunklen inkubiert. Diese Proben bildeten Ansatz 5 bis 8.

Im Folgenden wurden die in den Reaktionsgefäßen verbliebenen Blutmengen (Ansatz 1 bis 4) sowie die bereits mit Färbemix 5a behandelten Ansätze 5 bis 8 entsprechend den Angaben der Tabelle 11 fixiert. Zur Fixierung der Leukozyten und Lyse der Erythrozyten wurden nun 9 ml Becton Lysingsolution/ml Vollblut hinzugegeben und gevortext (Tabelle 11). Es erfolgte eine Inkubation für

zehn Minuten bei RT im Dunkeln. Die Ansätze wurden für sieben Minuten bei 320 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Die Zellpellets der Ansätze 1 bis 8 wurden mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen (Tabelle 11). Nach erneuter Zentrifugation bei 320 x g für sieben Minuten und Abnahme des Überstands wurden Ansatz 1, 3, 4 in 400 µl, und Ansatz 2, 5, 6, 7, 8 in je 200 µl FACS-Puffer aufgenommen (Tabelle 11). Ansatz 1 bis 4 konnten im Kühlschrank bei 5°C für maximal 72 Stunden bis zur Weiterverarbeitung gelagert werden. Die bereits mit den Antikörpern PD-1-APC und CD8-V500 versetzten Ansätze 5 bis 8 konnten im Kühlschrank bei 5°C für maximal 24 Stunden gelagert werden.

Tabelle 11: Pipettierschema zur Prozessierung der Ansätze nach der Stimulation.

Färbung	Ansatz	Antigen	Lysing-Solution [ml]	FACS-Puffer [ml; Waschschrift	FACS-Puffer [µl; Aufnahmevolumen]
4	1	Ko-Ag	4	2	400
	2	CMV-Ag+CMV-Peptide	3	2	200
	3	VZV-Ag	4	2	400
	4	SEB	4	2	400
5	5	Ko-Ag	3	2	200
	6	CMV-Ag+CMV-Peptide	3	2	200
	7	VZV-Ag	3	2	200
	8	SEB	3	2	200

Die Tabellenspalten 4-6 zeigen die Mengen an Lösungen und Reagenzien, die in den im Text beschriebenen Arbeitsschritten hinzugefügt werden.

4.2.2.3 Färbung der fixierten T-Zellen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern

Die Ansätze 1 bis 4 wurden mittels Vortex Mixer in Suspension gebracht. Aus den Ansätzen 1 bis 4 in den 15 ml Polypropylen Reaktionsgefäßen wurden jeweils 200 µl Zellsuspension in vier separate 5 ml Polystyrol Röhrrchen für Durchflusszytometrie überführt. Es erfolgte die Zugabe von 2 ml Saponin Puffer pro Ansatz 1 bis 8 (Tabelle 12). Es erfolgte die Inkubation für zehn Minuten bei RT, im Dunkeln. Die Ansätze wurden für sieben Minuten bei 320 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Es erfolgte die Zugabe der Antikörpermischung für Färbung 4 in 50 µl Gesamtvolumen (Tabelle 9) pro Ansatz zu den Ansätzen 1 bis 4, und der Antikörpermischung für Färbung 5 in 50 µl Gesamtvolumen (Tabelle 9) pro Ansatz zu den Ansätzen 5 bis 8 (Tabelle 12). Anschließend folgte eine Inkubation der Ansätze 1 bis 8 für 30 Minuten bei RT im Dunkeln. Die Fluorochrom-gekoppelten Antikörper konnten in dieser Zeit an Oberflächenmoleküle und intrazelluläre Ziele binden. Nicht-bindende Antikörper wurden mit 3 ml FACS-Puffer im anschließenden Waschschrift entfernt (Tabelle 12). Es wurde erneut für sieben Minuten bei 320 x g zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 150 µl 1% Paraformaldehyd pro Ansatz in Suspension gebracht (Tabelle 12). Es erfolgte die direkte Messung der in den Ansätzen enthaltenen Zellen mittels Durchflusszytometer FACS Canto II.

Tabelle 12: Pipettierschema zur Prozessierung der Ansätze während der Färbung mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern.

Färbung	Ansatz	Antigen	Ausgangsvolumen [µl]	Saponin-Puffer [ml]	Färbemix 4 oder 5b* [µl]	FACS-Puffer [ml]	1%- PFA [µl]
4	1	Ko-Ag	200	2	50	3	150

Färbung	Ansatz	Antigen	Ausgangs- volumen [µl]	Saponin- Puffer [ml]	Färbemix 4 oder 5b* [µl]	FACS- Puffer [ml]	1%- PFA [µl]
	2	CMV-Ag+ CMV-Peptide	200	2	50	3	150
	3	VZV-Ag	200	2	50	3	150
	4	SEB	200	2	50	3	150
5b	5	Ko-Ag	200	2	50	3	150
	6	CMV-Ag+ CMV-Peptide	200	2	50	3	150
	7	VZV-Ag	200	2	50	3	150
	8	SEB	200	2	50	3	150

Die Tabellenspalten 4-8 zeigen die Mengen an Lösungen und Reagenzien, die in den im Text beschriebenen Arbeitsschritten hinzugefügt werden; *Färbemix siehe (Tabelle 9).

4.3 Analyse Tumor-infiltrierender Lymphozyten aus Nierenzellkarzinomgewebe

Für die Analyse der TIL wurde eine zellfunktionsschonende Kollagenase-freie mechanische Aufarbeitung zur Isolation der TIL aus dem Tumorgewebe verwendet (CROSSEY et al., 2018). Mit der Zielsetzung, einen Vergleich zu Lymphozyten aus Vollblutproben der Probanden zu ziehen, wurden die TIL analog auf ihre Quantität und Qualität untersucht. Die Quantität und der Phänotyp wurde mittels Oberflächenfärbung in Anlehnung an das oben geschildertes Protokoll (Abschnitt 4.2.1) durchgeführt. Die funktionelle Charakterisierung der TIL erfolgte in Anlehnung an das Protokoll in Abschnitt 4.2.2.

4.3.1 Mechanische Isolierung von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten aus Nierenzellkarzinomgewebe

Um die TIL aus dem Tumormikromilieu des Nierenzellkarzinoms zu untersuchen, müssen die Zellen aus dem Gewebe gelöst werden, wofür eine kollagenasefreie mechanische Aufarbeitung verwendet wurde (CROSSEY et al., 2018). Im Operationssaal wurde von einem Facharzt der Urologie ein für den Tumor repräsentatives Stück des resezierten Tumors entnommen. Dieses wurde ohne Zeitverzögerung bearbeitet. Alle Schritte wurden, sofern nicht anders vermerkt, unter sterilen Bedingungen bei Raumtemperatur durchgeführt.

Das Probenstück wurde mit zwei Skalpelln in gegenläufiger Schnittrichtung zerkleinert. Ein Volumen der Schnittstücke unter 1mm³ wurde angestrebt. Zur weiteren mechanischen Bearbeitung wurde die zerkleinerte Tumormasse mit der Skalpellspitze in ein Precellys®-Röhrchen überführt. Es wurden sechs 2 ml Röhrchen aus dem Precellys® CK14 Lysing Kit, Soft Tissue Homogenizing befüllt. Hierbei war die zugegebene Menge maximal 1 g Probe je Röhrchen. Es wurde die komplette Menge des verfügbaren Gewebes verwendet, maximal jedoch 6 g Tumorgewebe.

Je Precellys®-Röhrchen wurden 1 ml PBS zugeben. Die Precellys® -Röhrchen wurden bei 3000 rpm für 40 s im „Minilys personal homogenizer“ unter „Vorgang A“ homogenisiert. Ein 50 ml Polypropylen-Gefäß mit 40 µm Cell-Strainer wurde bereitgestellt. Die Probe aus den Precellys® -Röhrchen wurde durch den 40 µm Strainer filtriert. Reste wurden mit 1 ml PBS abgespült und filtriert. Die im Strainer befindliche Probe wurde mit 1 ml PBS nachgespült. Nach zwei gefilterten Proben wurde der Strainer erneuert. Das Transportmedium, in dem die Tumorprobe transportiert wurde,

wurde ebenfalls durch den Strainer in dasselbe Gefäß überführt. Es erfolgte die Zentrifugation des 50 ml Polypropylen-Gefäßes mit homogenisierter Probe bei 230 x g für fünf Minuten. Der Überstand wurde abgenommen. Das Pellet wurde größenabhängig in 2-6 ml Waschmedium (RPMI, 0,5% HUS, 1% P/S) aufgenommen und in Suspension gebracht. 10 µl der Suspension wurden mit 90 µl 3% Essigsäure 1:10 verdünnt. Anschließend wurden hieraus 10 µl mit 90 µl 3% Essigsäure 1:100 verdünnt. Die Zellzahl wurde in einer Neubauerkammer bestimmt.

Die Zellen wurden je nach Versuchsbedingung entweder direkt zur Färbung eingesetzt und/oder wurde zudem einer Dichtegradientenzentrifugation unterzogen. Hierzu wurden zu der homogenisierten Probe im 50 ml Gefäß 35 ml PBS 0,02% EDTA hinzugegeben. Die Probe wurde mit 13 ml FicoLite H unterschichtet. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 1180 x g für 20 Minuten mit ausgeschalteter Bremsfunktion. Nach der Dichtegradientenzentrifugation wurde die mononukleäre Zellen tragende Intermediärschicht abgenommen und in ein neues steriles 50 ml Polypropylen-Gefäß überführt. Diese Probe wurde auf 50 ml Volumen mit PBS 0,02% EDTA aufgefüllt und durchmischt. Die Zentrifugation erfolgte bei 615 x g für zehn Minuten bei eingeschalteter Bremse. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet mit 30 ml PBS 0,02% EDTA gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte bei 280 x g für zehn Minuten. Das Zellpellet wurde in 2 ml Medium (RPMI, 0,5% HUS, 1% P/S) in Suspension überführt. Folgend wurden 10 µl der Probe mit 90 µl 3% Essigsäure 1:10 verdünnt. Die Zellzahl nach Dichtegradiententrennung wurde erneut in einer Neubauerkammer bestimmt.

4.3.2 Oberflächenfärbungen von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten aus Nierenzellkarzinomgewebe

Wenn ausreichend Zellen vorhanden waren, wurden standardmäßig zwei Färbungen à $0,5 \cdot 10^6$ Zellen zur Oberflächenfärbung eingesetzt (Tabelle 13). Färbung 6 diente der Quantifizierung der Lymphozytensubpopulationen. Färbung 7 diente zur Quantifizierung und weiteren Phänotypisierung der T-Zell-Subpopulationen. Das Protokoll dieser Oberflächenfärbung entspricht dem unter Abschnitt 4.2.1 beschriebenen Vorgehen. Bei der Färbung galt zu beachten, dass die Antikörperkonzentrationen auf 100 µl Probenvolumen ausgelegt sind. Gegebenenfalls mussten die Proben bei zu großen Volumina zuerst zentrifugiert werden (320 x g für zehn Minuten, Abnahme des Überstandes) und dann in 100 µl Medium resuspendiert, oder bei zu kleinen Volumina direkt auf 100 µl Probenmenge mit Medium aufgefüllt werden.

Tabelle 13: Antikörpergemisch für Färbung der TIL

Färbung 6: Lymphozytensubpopulationenfärbung			Färbung 7: TIL Oberflächenfärbung		
Antikörper	Fluorochrom	Menge [µl]	Antikörper	Fluorochrom	Menge [µl]
CD4	PE-Cy7	0,5	CD3	PerCP	4,00
CD3	APC	0,5	CD4	APC-H7	1,00
CD19	FITC	2,5	CD8	V500	1,00
CD8	PerCP	4	CD25	V450	1,25
CD16	PE	1	CD127	PE-Cy7	2,00
CD56	PE	4	PD-1	APC	5,00
CD14	V450	1	PD-L1	BV515	5,00
			CD39	PE	3,00

Pro Färbeansatz erfolgte die Färbung mit $0,5 \cdot 10^6$ Zellen in einem Gesamtvolumen von 100µl Medium.

4.3.3 Stimulation Antigen-spezifischer Tumor-infiltrierender Lymphozyten

Je nach ermittelter Zellzahl und Restmenge an Zellen nach den Oberflächenfärbungen wurden nun verschiedene Entscheidungen bezüglich der Untersuchung der Charakteristika Antigen-spezifischer T-Zellen getroffen. Zur Auswahl standen zwei verschiedene Protokolle zur Stimulation Antigen-spezifischer T-Zellen. Zum einen wurden TIL nach Vorfärbung mit einem anti-CD45-APC dem Vollblut desselben Probanden zugegeben und gemeinsam wie unter Abschnitt 4.2.2 beschrieben stimuliert. Dieses Procedere war ebenfalls im Labor etabliert (SCHUB et al., 2018b) und erlaubt einen direkten Vergleich Antigen-spezifischer TIL im Verhältnis zu Antigen-spezifischen T-Zellen des Blutes. Durchflusszytometrisch ließen sich dann die CD45-positiven Zellen als TIL gegenüber den CD45 negativen Zellen als T-Zellen des Vollblutes diskriminieren. Zum anderen wurden TIL direkt analog eines bereits für mononukleäre Zellen des peripheren Blutes etablierten Protokolls (PBMC-Protokoll) stimuliert.

Es wurde eine Stimulation mit CMV-Lysat/CMV Peptiden und/oder SEB angestrebt. Um abzuschätzen, ob eine Person CMV positiv ist, wurde wie unter Abschnitt 4.2.1 beschrieben vorab eine Oberflächenfärbung (Färbung 8; Tabelle 15) zur Identifizierung CD27-CD28- CD4+ T-Zellen im peripherem Blut durchgeführt, für die eine klare Assoziation mit dem CMV-Status bekannt ist. (DIRKS et al., 2013) Bei Probanden, die deutlich CMV-assoziierte CD27-CD28- CD4+ T-Zellen aufwiesen, wurden zusätzlich CMV-Antigene verwendet. Bei Personen ohne CD27-CD28- CD4+ T-Zellen wurde aus logistischen Gründen auf die CMV-spezifische Stimulation verzichtet. Als Hersteller der CMV-Antigen-Lysate standen BioWhittaker (BW) und Virion (V; Kontrolle mit Ko-Ag, Test mit CMV-Ag) zur Verfügung.

Abhängig von der Zellzahl wurde eine der 5 verschiedene Entscheidungsfälle (Tabelle 14) zur Art der Stimulation (direkt und/oder in Kombination mit Vollblut) bzw. der Stimuli getroffen:

Tabelle 14 Entscheidungsalgorithmus für die direkte Stimulation oder kombinierte Stimulation mit Vollblut der TIL

Fall	Zellzahl	Direkte Stimulation	Kombinierte Stimulation mit Vollblut
1	$>10^6$	Ko-Ag (BW)+DMSO CMV-Ag (BW)+CMV Peptide Ko-Ag (V)+DMSO CMV-Ag (V) SEB	Ko-Ag (BW)+DMSO CMV-Ag (BW)+CMV Peptide Ko-Ag (V)+DMSO CMV-Ag (V) SEB

Fall	Zellzahl	Direkte Stimulation	Kombinierte Stimulation mit Vollblut
2	8-10*10 ⁶	Ko-Ag (BW)+DMSO CMV-Ag (BW)+CMV Peptide SEB	Ko-Ag (BW)+DMSO CMV-Ag (BW)+CMV Peptide Ko-Ag (V)+DMSO CMV-Ag (V) SEB
3	6-8*10 ⁶	Ko-Ag (BW)+DMSO CMV-Ag (BW)+CMV Peptide SEB	Ko-Ag (BW)+DMSO CMV-Ag (BW)+CMV Peptide SEB
4	3-6*10 ⁶	Nur eine der beiden Prozeduren mit 3 Stimuli	
		Ko-Ag (BW)+DMSO CMV-Ag (BW)+CMV Peptide SEB	Ko-Ag (BW)+DMSO CMV-Ag (BW)+CMV Peptide SEB
5	<3*10 ⁶	Nur eine der beiden Prozeduren mit einem Stimulus	
		SEB	SEB

Pro Stimulationsansatz wurden 1x10⁶ eingesetzt, BW=BioWhittaker, V, Virion

Tabelle 15 Antikörpergemisch zur Identifizierung CMV-assoziiertes T-Zellen

Färbung 8: CMV positive T-Zellen		
Antikörper	Fluorochrom	Menge [µl]
CD28	PerCP-Cy5.5	5,00
CD27	PE	1,50
PD-1	APC	5,00
CD127	FITC	1,25
CD25	PE-Cy7	1,00
CD4	APC-H7	1,00

4.3.3.1 Protokoll 1: Kombinierte Stimulation der TIL mit Vollblut

Aufgrund Basis der vorhandenen Zellzahl wurde eine der oben genannten Entscheidungen 1-5 getroffen. Anfangs wurde von einer benötigten Zellzahl 1*10⁶ TIL pro Antigenansatz bei Stimulation der TIL in Vollblut ausgegangen. Diese Zahl wurde nach Titrationsexperimenten (siehe Ergebnisteil) nach unten korrigiert.

Die benötigte Anzahl an TIL wurde zur Vorfärbung mit anti-CD45-APC Antikörper eingesetzt. Hierzu wurden 0,5 µl anti-CD45-APC Antikörper zu je 1*10⁶ Zellen TIL hinzugefügt. Die Probe wurde durchmischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur RT im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte ein zweimaliger Waschschrift mit RPMI, 0,5% HUS, 1% P/S. Die Probe wurde für zehn Minuten bei 280 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

Pro Stimulationsansatz wurden anschließend 300 µl Vollblut aus einer Li-Heparin Monovette desselben Patienten zu den vorgefärbten TIL in einem 5 ml Polystyrol Röhrchen gegeben. Je nach Entscheidung wurden bis zu fünf Antigenansätze mit je 300 µl Vollblut benötigt. In diesem Fall mussten bis zu 1500 µl Li-Heparin Vollblut zu den vorgefärbten TIL gegeben werden. Das Pipettierschema zur Verarbeitung von 5 Ansätzen ist in Tabelle 16 dargestellt. Das Procedere der Stimulation entspricht der in Abschnitt 4.2.2 dargestellten Methodik.

Zu der Probe wurden je 1 µg/ml der kostimulatorischen Antikörper anti-CD28 und 1 µg/ml (Probenvolumen) anti-CD49d (Probenvolumen) hinzugegeben. Pro Ansatz A-E wurden 300 µl des TIL-Vollblutgemisches in jeweils ein 15 ml Polypropylen Reaktionsgefäß überführt. Pro Stimulationsansatz A-E wurden nun die Antigene aus Tabelle 16 hinzugegeben.

Tabelle 16: Pipettierschema zum Ansatz der Stimulation von TIL in heparinisiertem Vollblut

Ansatz	Antigen	TIL in Vollblut [μ l]	Kostimulations-Mix [μ l; 3 μ l/ml Probenvolumen] *	Antigen [μ l]
	Σ	1500	4,5	
Aufteilen auf 5 Stimulationsansätze				
A	Ko-Ag BioWhittaker+DMSO	300		9,6 + 2,64
B	CMV-Ag BioWhittaker+ <i>CMV-Peptide</i>	300		9,6 + 2,64
C	Ko-Ag Virion	300		9,6 + 2,64
D	CMV-Ag Virion+ <i>CMV-Peptide</i>	300		9,6 + 2,64
E	SEB	300		0,75

*Stimulations-Mix bestehend aus 1:1 Verhältnis von 1 μ g/ml anti-CD28 und 1 μ g/ml anti-CD49d. Ko-Ag, CMV-Ag und VZV-Ag des Herstellers BioWhittaker© und Virion©. CMV-Peptide des Herstellers (JPT Peptide Technologies). CMV-Peptide liegen 1:10 verdünnt in PBS vor. DMSO liegt 1:10 verdünnt in PBS vor.

Die Deckel der Polypropylen-Reaktionsgefäße wurden nur lose angedreht, damit ein Gasaustausch weiterhin gewährleistet war. Die Ansätze wurden nun für sechs Stunden im Brutschrank bei 37° C und 5% Kohlenstoffdioxid Gaszufuhr inkubiert. Nach zweistündiger Inkubationsdauer wurde der Sekretionsvorgang der Zytokine wie oben beschrieben durch Zugabe von 10 μ g/ml Brefeldin A gestoppt. Die Ansätze wurden weitere vier Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Fixierung und Färbung der TIL und T-Zellen in Vollblut entsprach der Fixierung von Vollblutproben in Abschnitt 4.2.2.2. Die für die Färbung verwendeten Antikörper sind der Tabelle 17 zu entnehmen.

Tabelle 17: Antikörpergemisch für die kombinierte Färbung von TIL und T-Lymphozyten in Vollblut

Färbung 8a:		
TIL Vorfärbung pro 1 Millionen Zellen		
Antikörper	Fluorochrom	Menge [μ l]
CD45	APC	0,5

Färbung 8b:		
TIL + Vollblut nach Fixierung in 300 μ l Probenvolumen		
Antikörper	Fluorochrom	Menge [μ l]
CD4	APC-H7	3,00
CD3	PE-Cy7	3,00
CD39	PE	3,00
IFN γ	FITC	0,50
CD8	PerCP	5,00
TNF α	V450	1,00
Saponin 5%		1,00
FACS-Puffer		33,50

4.3.3.2 Protokoll 2: Direkte Stimulation der TIL in Medium

Zur direkten Stimulation der isolierten TIL wurden pro Antigenansatz 1*10⁶ Zellen in 400 μ l Medium (RPMI, 0,5% HUS, 1% P/S) eingesetzt. Wichtig für eine suffiziente Stimulation der TIL war hierbei die Verwendung eines Rundbodenröhrchens aus Polypropylen. Geht man von fünf Stimulationsansätzen aus, so wurde auf ein Gesamtvolumen von 2000 μ l Gesamtvolumen aufgefüllt. Zu dem Gesamtvolumen wurden je 1 μ g/ml der kostimulatorischen Antikörper anti-CD28 und 1 μ g/ml (Probenvolumen) anti-CD49d (Probenvolumen) hinzugegeben. Die Antigene wurden nach dem Pipettierschema in Tabelle 18 zu den jeweiligen Ansätzen in neuen Reaktionsgefäße hinzugefügt.

Die Ansätze wurden mit losem aufgesetztem Deckel für 30 Minuten inkubiert. Die Proben wurden erneut durchmischt und anschließend für fünf Minuten bei 230 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet erneut für eineinhalb Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Sekretionsvorgang der Zytokine, wie oben beschrieben, durch Zugabe von 10 µg/ml Brefeldin A gestoppt (Tabelle 18). Die Ansätze wurden durchmischt und für weitere vier Stunden im Brutschrank inkubiert.

Tabelle 18: Pipettierschema zum Ansatz der Stimulation von TIL in Medium

Ansatz	Antigen	TIL in Medium	Kostimulations-	Antigen [µl]	BFA
		[µl]	Mix [µl]*		
		2000	6		
Aufteilen auf 5 Stimulationsansätze					
A	Ko-Ag BioWhittaker+DMSO	400		12,8 + 3,52	0,8
B	CMV-Ag BioWhittaker+ <i>CMV-Peptide</i>	400		12,8 + 3,52	0,8
C	Ko-Ag Virion	400		12,8 + 3,52	0,8
D	CMV-Ag Virion+ <i>CMV-Peptide</i>	400		12,8 + 3,52	0,8
E	SEB	400		1	0,8

*Stimulations-Mix bestehend aus 1:1 Verhältnis von 1µg/ml anti-CD28 und 1µg/ml anti-CD49d. Ko-Ag, CMV-Ag und VZV-Ag des Herstellers BioWhittaker© und Virion©. *CMV-Peptide* des Herstellers JPT Peptide Technologies (Berlin). *CMV-Peptide* liegen 1:10 verdünnt in PBS vor. DMSO liegt 1:10 verdünnt in PBS vor.

Nach der Inkubation wurden die Ansätze mit 100 µl/ml 20 mM EDTA versetzt und mindestens zehn Sekunden gevortext (Tabelle 19). Durch eine anschließende Inkubation bei RT für 15 Minuten wurden mögliche Zelladhäsionen gelöst. Nach dem Ablauf der Zeitspanne erfolgte die Zugabe von 2 ml PBS pro Ansatz und die Ansätze wurden für zehn Minuten bei 320 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Aus der Erfahrung zeigte sich, dass sich trotz Aufreinigung durch Strainer, FicoLite H-Dichtegradienten und mehreren Waschschritten, nach der sechsstündigen Inkubation Zelldetritus absetzte. Die weißen, fadenförmigen Konglomerate wurden, falls vorhanden, entfernt, um die durchflusszytometrische Messung nicht zu behindern. Der Überstand wurde entfernt.

Tabelle 19: Pipettierschema zur Fixierung von TIL in Medium

Ansatz	20mM EDTA	PBS	Färbung 7a	PBS-EDTA	4% PFA	FACS-	FACS-
	[µl; 100 µl/ml]	[ml]	[µl]	[ml]	37°C	Puffer	Puffer
					[µl]	[ml]	[µl]
A	40	2	50	2	300	2	200
B	40	2	50	2	300	2	200
C	40	2	50	2	300	2	200
D	40	2	50	2	300	2	200
E	40	2	50	2	300	2	200

Die Tabellenspalten 2-8 zeigen die Mengen an Lösungen und Reagenzien, die in den im Text beschriebenen Arbeitsschritten hinzugefügt werden.

Zur Färbung fixierungsempfindlicher Antikörper wurden die Zellpellets durch Zugabe des PD-1-APC Antikörpers in FACS-Puffer in Suspension gebracht (Färbung 7a, Tabelle 20) und anschließend für 20 Minuten bei RT, im Dunkeln inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von 2 ml PBS-EDTA (Tabelle 18), gefolgt von einem Zentrifugationsschritt für zehn Minuten bei 320 x g. Der Überstand wurde abgenommen. Die Zellpellets wurden mit 300 µl 37°C warmen 4% PFA zur

Fixierung resuspendiert und für fünf Minuten im Dunkeln bei RT inkubiert. Der Vorgang wurde durch die Zugabe von 2 ml FACS-Puffer je Ansatz abgestoppt (Tabelle 19).

Anschließend erfolgte die Zentrifugation für zehn Minuten bei 320 x g, sowie die Abnahme des Überstands. Das Zellpellet wurde in 200 µl FACS-Puffer je Probe aufgenommen und in Suspension gebracht.

Zur durchflusszytometrischen Messung wurden die Ansätze in 5 ml Polystyrol Röhrchen überführt. Die Proben wurden analog zu der Färbung von Vollblutproben (Abschnitt 4.2.2.3) mit den untenstehenden Antikörpern (Färbung 7b, Tabelle 20) gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen.

Tabelle 20: Antikörpergemisch für die Färbung von TIL nach Stimulation

Färbung 7a: TIL vor Fixierung			Färbung 7b: TIL nach Fixierung		
Antikörper	Fluorochrom	Menge [µl]	Antikörper	Fluorochrom	Menge [µl]
PD1	APC	10,00	CD4	APC-H7	3,00
			CD3	PE-Cy7	3,00
FACS-Puffer		40,00	CD39	PE-Cy7	3,00
Σ		50,00	IFN γ	FITC	0,50
			CD8	PerCP	5,00
			TNF α	V450	1,00
			Saponin 5%		1,00
			FACS-Puffer		33,50
			Σ		50,00

4.4 Durchflusszytometrische Messung und Gating

Die bearbeiteten Proben wurden in einem FACS CANTO II durchflusszytometrisch gemessen und die gewonnenen Datensätze in der BD FACS Diva Software manuell hierarchisch nach Bivariaten-Gating ausgewertet.

4.4.1 Durchflusszytometrische Messung

In einem Durchflusszytometer können Proben unter Verwendung von Lasern, halbdurchlässigen Spiegelsystemen, optischen Bandbreite-Filtern und Photonendetektoren auf Ebene einzelner Zellen untersucht werden. Zellen aus peripherem Blut, können über ihre physikalischen Parameter, ihrer Zellgröße im FSC (forward scatter, Vorwärtsstreulicht) und ihre Zellgranularität im SSC (sideward scatter, Seitwärtsstreulicht) aufgeteilt werden. Unter Verwendung von Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern lassen sich Multiparameter-Analysen durchführen. So haben Lymphozyten einen intermediären FSC und SSC, während Erythrozyten einen niedrigen FSC und SSC aufweisen und Granulozyten und Monozyten sich durch einen hohen FSC und SSC auszeichnen. Unter Verwendung mehrerer Feststoff-Laser unterschiedlicher Wellenlänge erhöht sich die Anzahl möglicher Fluorochrome. Durch den Laser werden Fluorochrome dazu angeregt Photonen mit einem bestimmten Spektrum zu emittieren. Diese werden durch das Detektorensystem registriert. Halbdurchlässige Spiegel mit optischen Bandbreite-Filtern können, gemäß ihrer Filterspezifikation, Photonen längerer oder kürzer Wellenlänge, passieren lassen oder reflektieren (PERFETTO et al.,

2004). Jedes Fluorochrom besitzt ein eigenes Emissionsspektrum, welches sich jedoch mit dem von anderen Fluorochromen überlappen kann (z.B. *PE* und *PE-Cy7*). Hierfür müssen computerassistent Kompensationen für die gegebenen Kanäle erstellt werden. Neben Kompensation der Spektren muss auch die Menge der Antikörper individuell zur Zellzahl titriert werden, um Hintergrundsignale durch nichtspezifische Antikörperbindung zu verhindern. Des Weiteren sollten Zielantigene mit unbekannter oder niedriger Expression mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert werden, welche ein starkes Signal emittieren (z.B.: *PE* und *PE-Cy7*) um eine genau Unterscheidung zwischen niedriger oder keiner Markerexpression zu ermöglichen. Zur Analyse der Markerexpression nach der durchflusszytometrischen Messung stehen die Cluster-Analyse und die Bivariate-Gating-Analyse zur Verfügung. In der manuellen Bivariate-Gating-Analyse ist die Darstellung unterschiedlicher Populationen durch eine hierarchische Unterteilung nach Gating in Zwei-Variaten-Dotplots möglich (PERFETTO et al., 2004). Dies erlaubt die präzise Differenzierung von Zellpopulationen bei geringer bzw. überlappender Markerexpression (siehe Abbildung 2) In der durchflusszytometrischen Messung werden im ersten Gating über das Signal im FSC und SSC, die Lymphozyten nach Größe und Granularität von den anderen Leukozyten unterschieden. Der T-Zell spezifische Marker CD3 wurde gegenüber CD8 aufgetragen, um CD3-positive von CD3-negativen Lymphozyten zu unterscheiden. Zellen aus dem Gating mit hohem Signal für CD3 wurden weiter nach ihrem Signal für CD4 und CD8 unterteilt. In dem Gate der CD4⁺/CD8⁻ T-Zellen (CD4 T-Zellen) wurde das CD25 Signal gegenüber dem CD127 Signal aufgetragen um die regulatorischen T-Zellen als CD25^{hoch} CD127^{niedrig} T-Zellen darzustellen.

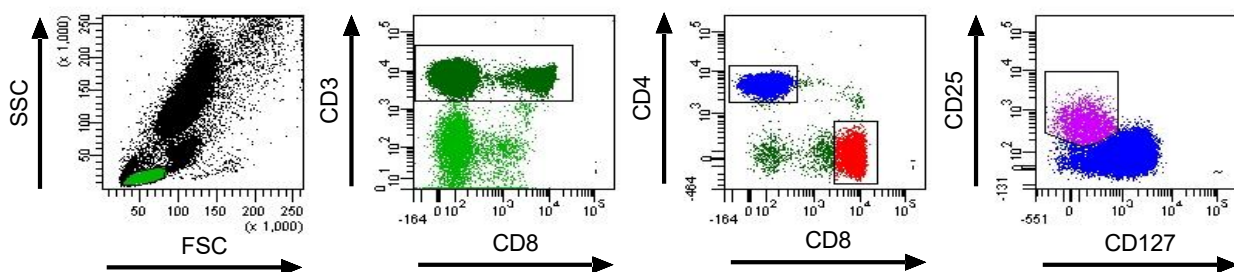


Abbildung 2 Gatingstrategie zur Identifizierung der Immunzellsubpopulationen. Nach Bestimmung der Lymphozytenpopulation anhand ihrer Größe im Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreuung (SSC) erfolgte die Identifizierung der T-Zell-Subpopulationen anhand der Markermoleküle CD3 (T-Zellen), CD4 und CD8. In der Population der CD4 T-Zellen erfolgt die Identifizierung von regulatorischen T-Zellen (Treg) mittels CD25 und CD127.

Jede der Immunzellsubpopulationen (CD4 T-Zellen, CD8 T-Zellen und regulatorische T-Zellen) wurde mithilfe Fluorochrom-gekoppelter Antikörper (Färbung 1, Tabelle 7) hinsichtlich ihrer Differenzierung untersucht. Hierbei wurde CD45R0, gegenüber CD62L, aufgetragen (Abschnitt 3.3.1.4). Daraus ergaben sich in der Definierung der Subpopulationen folgende Kombinationen: Naive T-Zellen als CD45R0^{niedrig}/CD62L^{hoch}, CM („central memory“ T-Zellen) als CD45R0^{hoch}/CD62L^{hoch}, EM („effector-memory“ T-Zellen) als CD45R0^{hoch}/CD62L^{niedrig}, TEMRA („effector memory with re-expression of CD45RA“ T-Zellen) als CD45R0^{niedrig}/CD62L^{niedrig} (MAHNKE et al., 2013).

Jede der Immunzellsubpopulationen (CD4 T-Zellen, CD8 T-Zellen und regulatorische T-Zellen) wurde hinsichtlich ihrer Expression von funktionellen Markern (CTLA-4, PD-1 und BTLA), sowie kürzlich erfolgter Proliferation (Ki67) untersucht (siehe Abschnitt 4.2.1). Hierbei wurde aus dem jeweiligen Gate von CD4 T-Zellen, CD8 T-Zellen und Treg das Signal von PD-1 gegenüber BTLA (Färbung 2, Tabelle 7) aufgetragen und die jeweils positiven Zellen im Dotplot bestimmt (Abbildung 3A). Ebenso wurde Ki67 gegenüber CTLA-4 (Färbung, 3 Tabelle 7) aufgetragen und die jeweils positiven Zellen im Dotplot bestimmt (Abbildung 3).

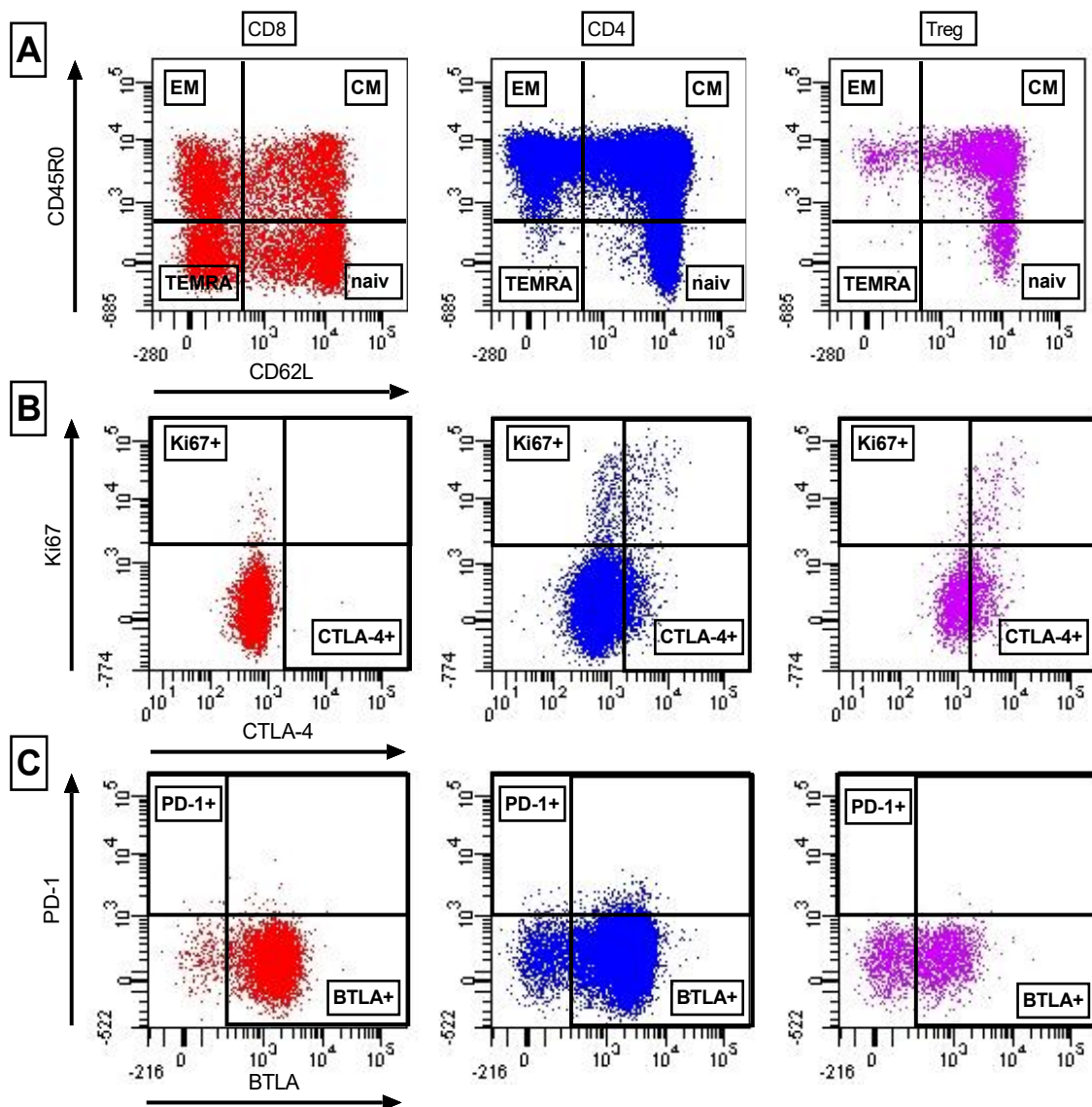


Abbildung 3: Analyse der Marker der Differenzierung CD45R0 und CD62L, des Markers für Proliferation Ki67 sowie der Immun-Checkpointmoleküle CTLA-4, PD-1 und BTLA. Repräsentative Dotplots für CD8, CD4 und regulatorische T-Zellen (Treg). (A) Auf Basis der jeweiligen Markerexpression werden vier Subgruppen in zunehmendem Differenzierungsgrad definiert: Naive T-Zellen (CD45R0-/CD62L+), „Central Memory“ (CM) T-Zellen (CD45R0+/CD62L+), „Effector Memory“ (EM) T-Zellen (CD45R0+/CD62L-) und „effector memory with re-expression of CD45RA“ (TEMRA) T-Zellen (CD45R0-/CD62L-) (B) Ki67 ist gegenüber CTLA-4 aufgetragen. Die jeweils Ki67 positiven und CTLA-4 positiven Zellen sind umrandet. (C) PD-1 ist gegenüber BTLA aufgetragen. Die jeweils PD-1 positiven und BTLA positiven Zellen sind umrandet.

Zur Visualisierung von CD39 (Färbung 1, Tabelle 7) wurde ein Histogramm verwendet und die erfassten Ereignisse gegenüber dem Signal von CD39 aufgetragen (Abbildung 4). Für die weitere

Auswertung von CD39 wurde der Anteil CD39-positiver Zellen (%CD39) sowie die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) gewählt. Die mediane Stärke des Fluoreszenzsignals (als Maß für die Expressionsstärke eines Markers) über alle Zellen kann über die MFI (median fluorescence intensity) ausgewertet werden.

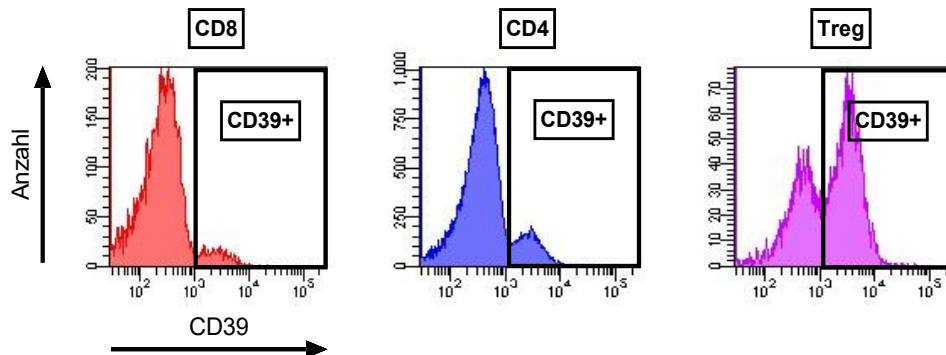


Abbildung 4: Analyse der CD39 Expression. Repräsentative Histogramme für CD8, CD4 und regulatorische T-Zellen (Treg). Das Signal für CD39 ist gegenüber der Anzahl aufgetragen. Rechtsseitig sind die CD39 positiven Zellen umrandet.

4.4.2 Analytierte Parameter der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten im Vergleich zu Lymphozyten im Vollblut

Ziel der Aufarbeitung von soliden Tumorproben war die Untersuchung von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten. Hierbei stand der quantitative Vergleich der Leukozyten, die Phänotypisierung der T-Zellen von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten, sowie funktionelle Charakterisierung der T-Zellen im Vergleich zu Leukozyten und T-Zellen im peripherem Blut desselben Patienten im Vordergrund. Es erfolgte eine Analyse der Zellzahlen der Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten T-, B- und NK Zellen, CD4-, CD8- und regulatorischen T-Zellen. Zudem wurden PD-1, PD-L1 und CD39 untersucht. In der durchflusszytometrischen Messung werden im ersten Gating über das Signal im FSC und SSC, die Leukozyten nach Größe und Granularität unterschieden. Granulozyten werden über ein mittleres Signal im FSC und hohes Signal im SSC definiert. Lymphozyten werden über ein geringes Signal im FSC und hohes Signal im SSC definiert. Unter Zunahme des Monozyten-spezifischen Markers CD 14 können bei Auftragung des SSC gegenüber dem CD14 Signal die Monozyten abgegrenzt werden. Als T-Zell spezifischer Marker diene CD3. Als B-Zell spezifischer Marker diene CD19. Unter Auftragung des Signals von CD19 gegenüber CD3 wurden B-Zellen, CD3 positive Lymphozyten und CD3 negative Lymphozyten unterschieden. Zellen aus dem Gating mit hohem Signal für CD3 wurden weiter nach ihrem Signal für CD4 und CD8 unterteilt. Aus dem Gate der CD3 negativen Lymphozyten wurden NK-Zellen (CD3-/CD16+ und/oder CD56+) unter Verwendung des Signals für CD16 und CD56 differenziert. Hierbei wurden anti-CD16 und anti-CD56 Antikörper verwendet, welche beide mit dem Fluorochrom PE gekoppelt waren (Färbung 6, Tabelle 13, Abbildung 5).

Des Weiteren wurden CD39, PD-1 und PD-L1 bestimmt (Färbung 7, Tabelle 13). Die Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen erfolgte analog der in 4.4.1 beschriebenen Gatingstrategie. Zur

Analyse von CD39, PD-1 und PD-L1 erfolgte die Visualisierung mittels Histogramms. Hierbei wurde bei einem zu untersuchenden Parameter zur Visualisierung ein Histogramm verwendet und die erfassten Ereignisse gegenüber dem Signal von CD39, PD-1, respektive PD-L1 aufgetragen.

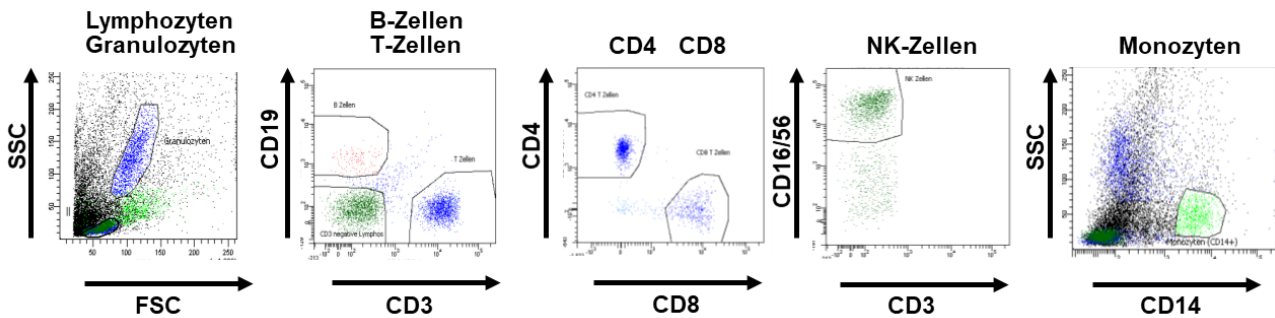


Abbildung 5 Gatingstrategie zur Identifizierung der Immunzellsubpopulationen der TIL in Nierenzellkarzinomen. Nach Bestimmung der Granulozyten und Lymphozytenpopulation anhand ihrer Größe im Vorwärts (FSC)- und Seitwärtsstreuung (SSC) erfolgt die Identifizierung der T-Zell-Subpopulationen, innerhalb der Lymphozytenpopulation anhand der Markermoleküle CD3 (T-Zellen), CD4 und CD8. Die Identifizierung von B-Zellen erfolgt mit Hilfe von CD19, NK-Zellen über das CD16/CD56 Signal und Monozyten über den SSC und das Signal für CD14.

4.5 Studiendesign

In die Studie wurden prospektiv Personen mit Melanom und mit Nierenzellkarzinom eingeschlossen. Zudem wurden gesunde Kontrollpersonen gematcht nach Alter und Geschlecht rekrutiert. Die Rekrutierung erfolgte über die Kliniken für Dermatologie und Urologie am Universitätsklinikum des Saarlandes. Generell betrug das Mindestalter zur Studienteilnahme 18 Jahre. Einschlusskriterien waren Personen mit Melanom ab Stadium IIIB bis IV, welche im Rahmen der zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses gültigen Medikamentenzulassung eine adjuvante oder palliative Therapie mit einem PD-1 Inhibitor (Pembrolizumab, Nivolumab), oder eine Kombinationstherapie mit ergänzender CTLA-4 Inhibition erhielten (Nivolumab und Ipilimumab). Der Einschluss erfolgte unabhängig des aktuellen Therapiezyklus. Während der Studieninitiierung wurden nach Studieneinschluss mehrere Proben einer Person im Therapieverlauf (zu den jeweiligen Therapiegaben) akquiriert. Eine Untergruppe an Personen mit Melanom, zur Analyse im longitudinalen Verlauf unter Therapie, musste zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses therapienaiv sein. Personen mit einer Raumforderung der Niere und V.a. Nierenzellkarzinom, welche sich für eine Operation entschieden, konnten unabhängig vom Stadium eingeschlossen werden. Zudem wurden Personen mit Nierenzellkarzinom im Stadium IV, welche sich für eine Immuntherapie entschieden, eingeschlossen werden. Der Krankheitsverlauf wurde anhand der digitalen Patientenakte eruiert. Die Definition Progress erfolgte anhand der letzten interdisziplinären Tumorkonferenz oder wurde dem letzten vorliegenden Arztbrief (Stand Juli 2021) entnommen.

Als gesunde Kontrollen konnten Personen über 18 Jahren ohne autoimmune Grunderkrankungen an der Studie teilnehmen. Die Definition Progress erfolgte anhand der letzten interdisziplinären Tumorkonferenz oder wurde dem letzten vorliegenden Arztbrief (Stand Juli 2021) entnommen.

Das Studiendesign wurde der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes vorgelegt, die der Durchführung der Studie zustimmte (Kennnummer 214/18). Ein Teil aller Proben der Personen mit Melanom und gesunder Kontrollen wurde im Rahmen einer Bachelorarbeit von Frau M.Sc. Saskia Bronder akquiriert und bearbeitet. Dennoch wurden alle Proben zusammen ausgewertet. Für die Auswertung des Vergleichs von Personen mit Melanom, Personen mit Nierenzellkarzinom und gesunden Kontrollen wurden 32 Proben von 134 Proben auf diese Weise zur Verfügung gestellt. Für die stratifizierte Auswertung nach Therapieansprechen und autoimmunen Nebenwirkungen wurden 35 Proben (von 134 Proben) herangezogen. Für die Auswertung im Therapieverlauf wurden 17 Proben (von 57 Proben) verwendet.

5 Ergebnisse

Es erklärten sich insgesamt 154 Personen damit einverstanden an der Studie teilzunehmen. Darunter fanden sich 60 gesunde Kontrollen, 48 Personen aus der Klinik für Dermatologie und 45 Personen aus der Klinik für Urologie. Aufgrund ihres Alters und Geschlechts wurden in die Auswertung insgesamt 50 gesunde Kontrollen eingeschlossen. Eine Person aus der Dermatologie und 11 Personen aus der Urologie wurden aufgrund einer anderen Tumorentität ausgeschlossen. Bei sieben der 11 Personen aus der Urologie stellte sich ein benigner Befund heraus, bei vier Personen bestätigte die Histologie eine andere Tumorentität. In die primären Auswertungen gingen somit 50 gesunde Kontrollen, 47 Personen mit einem Melanom und 34 Personen mit Nierenzellkarzinom ein. Zwischen den Kollektiven bestanden keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Alters ($p=0,313$) oder Geschlechts ($p=0,086$, Tabelle 21).

Tabelle 21: Übersicht über die eingeschlossenen gesunden Kontrollen und Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom

	Gesunde Kontrollen	Personen mit Melanom	Personen mit Nierenzellkarzinom	p
n	50	47	34	
Alter (Jahre) [MW±StabW]	58,38±15,89	62,27±15,20	63,03±12,01	0,313 ¹
Geschlecht				0,086 ²
weiblich [n, (%)]	22 (44,0%)	17 (36,2%)	7 (20,6%)	
männlich [n, (%)]	28 (56,0%)	30 (63,8%)	27 (79,4%)	

¹one-way-ANOVA mit Dunn's-post-test, ²Chi-Square

5.1.1 Personen mit Melanom

Von den Personen mit Melanom ($n=47$) wurde die Erkrankungshistorie, sowie die Charakteristika der Tumorerkrankung erfasst. Die Daten umfassen das Alter, das Geschlecht, die Tumordicke nach Breslow, das Stadium nach AJCC 2017, die Therapie mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren, S100B, Mutationsstatus (BRAF, NRAS, c-KIT) sowie Informationen über das Therapieansprechen (Tabelle 22).

Tabelle 22 Erkrankungscharakteristika der Personen mit Melanom

Personen mit Melanom [n]		47
Alter (Jahre) [MW±StabW]		62,27±15,20
Geschlecht [n (%)]		
	Weiblich	17 (36,1%)
	Männlich	30 (55,9%)
Tumordicke nach Breslow in mm [Median (Minimum-Maximum)]		2,2 (0,6-19,0) ¹
Tumorstadium nach AJCC 2017 [n (%)]		
	IIIB	5 (10,6%)
	IIIC	10 (21,3%)
	IV	30 (63,8%)
	M1a	1
	M1b	12

	M1c	9
	M1d	7
	M1 nicht näher spezifiziert	1
	Aderhautmelanom ²	2 (4,3%)
Immun-Checkpoint-Inhibitor Therapie [n (%)]		
	Nivolumab*	30 (63,8%)
	Pembrolizumab	17 (36,2%)
Therapiezyklen [Median (Minimum -Maximum)]		
	Zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses (47 Messung)	4 (0–38)
	Therapiezyklen gesamt (151 Messungen)	6 (0–43)
Umgestellt auf Chemotherapie oder zielgerichtete Therapie [n, %]		
	Dacarabazin	1
	Dabrafenib + Trametinib	1
S100 erhöht (cut-off 0.0105 µg/l) [ja/nein]		
	Bei Studieneinschluss, gesamt	17/30
	Nach Stadium	
	3B	2/3
	3C	4/6
	4	10/20
Mutationen [n, %]		
	BRAF-Mutation	
	V600E	10 (21,3%)
	wt	33 (70,2%)
	n.a.	4 (8,5%)
	NRAS-Mutation	
	wt	30 (63,8%)
	ja	10 (21,3%)
	n.a.	7 (14,9%)
	c-Kit	
	wt	41 (87,2%)
	n.a.	6 (12,8%)
Immun-Checkpoint-Inhibitor-Therapie Nebenwirkungen [ja/nein]		
	Gesamtkollektiv	11/36
	Non-Responder	6/6
	Responder	5/30
Therapieansprechen [n, %]		
	Responder	34 (72,3%)
	stable disease	8
	mixed response	2
	Response	1
	Regression	1
	no evidence of disease	22
	Non-Responder	13 (27,7%)
	Progress	13

¹für 12 Personen mit Melanom konnte die Tumordicke nach Breslow nicht angegeben werden, 2AJCC 2017 nicht zutreffend, *3 Personen mit Melanom erhielten initial eine Kombitherapie mit Ipilimumab und Nivolumab für 4 Zyklen gefolgt von Nivolumab in der Erhaltungstherapie., wt: Wildtyp.

Das mittlere Alter betrug 62,27 Jahre bei einem Anteil von 36,17% Frauen im Kollektiv der Personen mit Melanom. Die mediane Tumordicke nach Breslow betrug 2,2 mm. 30 Personen mit Melanom befanden sich im Stadium IV, 10 Personen im Stadium IIIC und sieben Personen im Stadium IIIB. 30 Personen erhielten Nivolumab und 17 Pembrolizumab als systemische Therapie. Eine Person wurde auf die Kombinationstherapie mit einem BRAF- und MEK-Inhibitor umgestellt, eine weitere

Person auf eine Chemotherapie mit Dacarbizin. 10 Personen wiesen die typische BRAF V600E Mutation auf. NRAS war bei weiteren 10 Personen mutiert. Keine Person wies eine c-Kit Mutation auf, wobei der Mutationsstatus bei sechs nicht angegeben war. 12 Personen waren Non-Responder. Die restlichen 35 Personen wurde der Gruppe der Responder zugewiesen (siehe 5.3.3).

Die histologischen Subtypen der 47 Patienten mit Melanom sind der Tabelle 22 zu entnehmen. Hierbei ist der dominierende Subtyp das noduläre Melanom mit 13 Fällen gefolgt von dem superfiziell spreitenden Melanom mit sieben Fällen und dem akrolentignösem Melanom mit sechs Fällen. Bemerkenswert sind die zwei Fälle mit Aderhautmelanomen. Aufgrund der Histologie wurde eine Person mit Klarzellkarzinom (Melanom der Weichteile) ausgeschlossen.

Tabelle 23 Histologie der Personen mit Melanom

Histologie	Anzahl Personen (n=47)
Noduläres Melanom	13
Superfiziell spreitendes Melanom	7
Akrolentignöses Melanom	6
Melanom bei unbekanntem Primarius	3
Aderhautmelanom	2
Melanom nicht näher definiert	2
Polypöses noduläres Melanom	2
Akrales Melanom	1
Amelanotisches Melanom	1
Amelanotisches Melanom vom nodulären Typ	1
Desmoplastisches Melanom	1
Lentigo maligna Melanom	1
Noduläres Melanom, klarzellige Variante	1
Polypöses Melanom, ursprünglich SSM	1
Regressives Melanom	1
Schleimhautmelanom	1
Sekundär noduläres Melanom	1
Superfiziell spreitendes Melanom, amelanotisch	1
Teilweise noduläres Melanom	1

5.1.2 Personen mit Nierenzellkarzinom

Von den Personen mit Nierenzellkarzinom (n=34) wurde ebenfalls die Erkrankungshistorie, sowie die Eckdaten zu der Tumorerkrankung erfasst. Die Daten umfassen das Alter, das Geschlecht, die Tumorgröße, das Stadium nach UICC 2017, die Therapieart, Operation, Art der Operation, systemische Therapie, Therapieansprechen und Nachsorgestatus (Tabelle 24).

Die Personen mit Nierenzellkarzinom waren im Mittel 63,03 Jahre alt mit einem Anteil der Frauen von 20,59%. Im Vergleich zur Epidemiologie des NZK ist dieses Studienkollektiv etwas jünger und der Anteil der Frauen etwas niedriger als es die epidemiologischen Daten für Deutschland erwarten ließen. Letztere betreffen jedoch alle Stadien der Erkrankung, während diese Studie nur einen Ausschnitt widerspiegelt. Die mediane Tumorgröße betrug 3,55 cm. 25 Personen befanden sich im Stadium I und neun Personen im Stadium IV nach UICC 2017. Bei sieben Personen wurde eine systemische Therapie mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren durchgeführt. Von den 27 Personen mit

primärer Operation ohne systemische Therapie stellten sich 13 Personen nicht mehr zur Nachsorge in der Klinik für Urologie vor, sodass hierfür keine Verlaufsdaten vorliegen („lost to follow up“).

Die histologischen Subtypen der 34 Personen mit einem NZK sind Tabelle 33 (Anhang) zu entnehmen. Hierbei ist der dominierende Subtyp des Nierenzellkarzinoms das klarzellige mit 22 Fällen, gefolgt von dem chromophoben mit drei Fällen und dem papillären Typ II mit zwei Fällen.

Aufgrund ihrer Histologie wurden aus dem Gesamtkollektiv der Personen mit einem Tumor der Niere (n=45), 11 Personen ausgeschlossen. Zwei Personen wiesen ein Urothelkarzinom auf, eine Person ein metachron metastasiertes Plattenepithelkarzinom der Harnblase, eine Person einen extrapleuralem solitär fibrösen Tumor (SFT), dessen Malignität nicht beurteilbar war. Sieben Personen wiesen in der Histologie nach Operation einen benignen Befund auf und wurden in Subanalysen als weitere Kontrollgruppe hinzugezogen. Vier Personen hatten ein Onkozytom, zwei Personen ein Angiomyolipom und eine Person Nierenzysten ohne Hinweis auf Malignität.

Während der Studienlaufzeit konnten insgesamt 20 Personen rekrutiert werden, die bereit waren an der Studie zur Untersuchung der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten bei Nierenzellkarzinom teilzunehmen. Im Voraus wurde bildmorphologisch der Verdacht auf ein Nierenzellkarzinom gestellt und der verdächtige Tumor von einem Facharzt der Urologie des Universitätsklinikum des Saarlandes entnommen. Dieser sandte ein repräsentatives Stück in unser Labor. Es erfolgte ebenfalls eine histopathologische Begutachtung durch die Pathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes. Somit lagen von 20 Personen sowohl eine Gewebeprobe des Tumors als auch Proben des peripheren Blutes vor.

Tabelle 24 Erkrankungscharakteristika der Personen mit Nierenzellkarzinom

Personen mit Nierenzellkarzinom [n]		34
Alter (Jahre) [MW±StabW]		63,03±12,01
Geschlecht [n (%)]		
	Weiblich	7 (20,6%)
	Männlich	27 (79,4%)
Tumorgröße¹ in cm [Median (Minimum-Maximum)]		3,55 (0,50-10,00)
Tumorstadium nach UICC 2017 [n (%)]		
	I	25 (73,5%)
	IV	9 (26,5%)
Therapie		
Primäre Operation ohne Immun-Checkpoint-Inhibitor Therapie [n (%)]		
	Kollektiv „vor OP“	27 (100%)
Operationsart Kollektiv Personen mit Nierenzellkarzinom [n (%)]		
	Radikale Nephrektomie	6 (17,6%)
	Partielle Nephrektomie	23 (67,6%)
	nicht angegeben	5 (14,7%)
Therapieansprechen der primären Operation ohne Immun-Checkpoint-Inhibitor Therapie [n (%)]		
	Responder	27 (100 %)

Lost to follow up nach primärer Operation ohne Immun-Checkpoint-Inhibitor Therapie [n (%)]		13 (38,2%)
Immun-Checkpoint-Inhibitor Therapie [n (%)]		
	Nivolumab	6 (17,6%)
	Nivolumab und Ipilimumab	1 (2,9%)
Therapiezyklen [Median (Minimum -Maximum)]		
	Zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses (7 Messung)	1 (0–33)
	Therapiezyklen gesamt (10 Messungen)	2,5 (0–33)
Therapieansprechen [n, %]		
	Non-Responder	3 (42,9%)
	Responder	4 (57,1%)
Immun-Checkpoint-Inhibitor Therapie Nebenwirkungen [ja/nein]		
	Ja	1
	n.a.	6
Tumorgewebe von an Nierenzellkarzinom erkrankten Personen		
	Vorliegend und histologisch bestätigt	15 (44,1%)

¹für 6 Personen konnte die Tumorgöße nicht angegeben werden.

5.2 Charakteristika der Immunzellen im Blut von Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom im Vergleich zu gesunden Kontrollen

Um Gemeinsamkeiten und Unterschiede der immunologischen Charakteristika bei verschiedenen Tumorentitäten zu untersuchen, wurden zunächst die Immunzellen der Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom hinsichtlich Quantität, Phänotyp und Funktionalität untersucht. In Subgruppenanalysen wurden sowohl Unterschiede gegenüber gesunden Kontrollen als auch Unterschiede zwischen Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom herausgearbeitet.

Initial wurden quantitativ die absoluten und relativen Zellzahlen der Leukozyten, Lymphozyten und T-Zellsubpopulationen (CD4, CD8, Treg) untersucht. Zudem wurden phänotypische Eigenschaften hinsichtlich Differenzierungsstatus, kürzlich erfolgter Proliferation (Ki67), immunmodulatorischer Funktion (CD39) und die Immun-Checkpointmoleküle (CTLA-4, PD-1 und BTLA) evaluiert. Neben diesen phänotypischen Markern wurde auch nach Stimulationsassays die Zytokinprofile ausgewertet, um die Funktionalität der T-Zellen zu überprüfen. In den Stimulationsassays dienten neben dem polyklonalem Stimulus durch SEB für die generelle T-Zell-Funktionalität, CMV und VZV reaktive T-Zellen als spezifische Stimuli um exemplarisch Virus-spezifische Funktionalität zu erfassen. Des Weiteren wurde untersucht, ob Unterschiede hinsichtlich der Antigen-spezifischen Funktionalität CMV und VZV-reaktiver T-Zellen bestehen, beziehungsweise inwieweit diese sich quantitativ in den Subgruppen der Patienten unterscheiden.

5.2.1 Kollektive der Tumorentitäten Melanom und Nierenzellkarzinom sowie gesunder Kontrollen ohne Tumor

Zunächst wurden die demografischen Parameter der Patienten mit Melanom (M) oder Nierenzellkarzinom (NZK), zum Zeitpunkt des Studieneinschluss und gesunden Kontrollpersonen

(K) verglichen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Altersverteilung und des Geschlechts (Tabelle 21). Das Ziel der ersten Analyse war die quantitative und phänotypische Analyse der T-Zellen bei Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen anhand von Oberflächenfärbungen (siehe Tabelle 7).

5.2.2 Qualitative Analyse der Leukozyten und Lymphozyten

Im Vergleich zu gesunden Kontrollen wiesen Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom ähnlich viele Gesamt-Leukozyten (Abbildung 6A), jedoch signifikant weniger Lymphozyten auf ($p < 0,0001$, Abbildung 6B). Diese Unterschiede betrafen alle Lymphozytensubpopulationen (T-Zellen $p < 0,0001$, CD8 $p = 0,001$, CD4 $p < 0,0001$, Treg $p < 0,001$, Abbildung 6C-F).

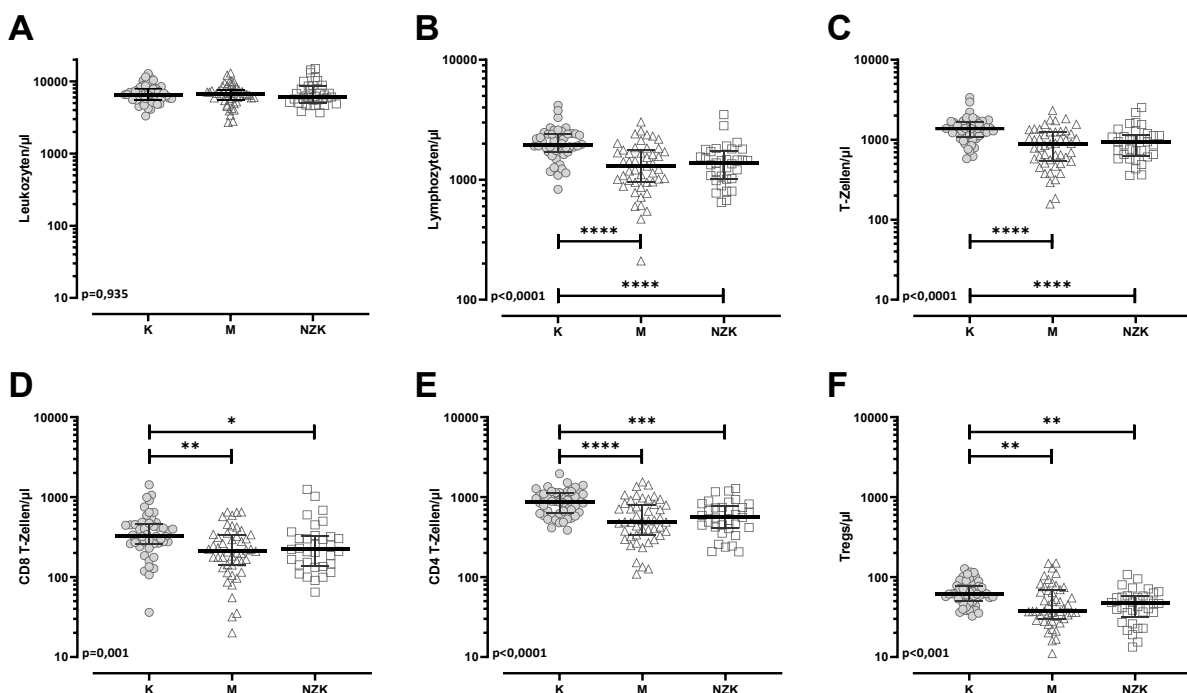


Abbildung 6 Vergleich der absoluten Zellzahlen im Blut von Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom und gesunden Kontrollpersonen. Dargestellt ist die absolute Immunzellzahl pro μl Vollblut der untersuchten Personen. Die absolute Zellzahl von Leukozyten, Lymphozyten, T-Zellen, CD8 T-Zellen, CD4 T-Zellen und regulatorischen T-Zellen (Treg) von gesunden Kontrollen (K; $n=48$) und Personen mit Melanom (M; $n=47$) oder mit Nierenzellkarzinom (NZK; $n=33$) wird jeweils verglichen. Die Querbalken repräsentieren jeweils Median und Interquartilsabstand (IQR). Es wurde ein Kruskal-Wallis Test mit Dunn's post Test durchgeführt. Signifikante Unterschiede im post-Test sind durch Sternsymbole markiert (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

Beim Vergleich der relativen Immunzellzahlen wiesen Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom einen signifikant geringeren Anteil an Lymphozyten (% Leukozyten) im Vergleich zu gesunden Kontrollen auf ($p < 0,0001$, Abbildung 7A). Der relative Anteil der Gesamt-T-Zellen sowie der CD8 und CD4 T-Zellen zeigte jedoch keine Unterschiede (Abbildung 7B-D). Interessanterweise zeigten Personen mit Melanom jedoch gegenüber gesunden Kontrollen einen signifikant höheren Anteil regulatorischer T-Zellen ($p = 0,003$, Abbildung 7E). Auch wenn bei Vergleich der drei Gruppen mittels des Dunn's post Tests keine Unterschiede zwischen den beiden Tumorentitäten nachweisbar waren, zeigten sich bei alleiniger Analyse der beiden Gruppen mit Tumoren bei Personen mit

Melanom auch signifikant höhere Treg-Anteile im Vergleich zu Personen mit Nierenzellkarzinom ($p=0,016$; Mann-Whitney Test, nicht dargestellt).

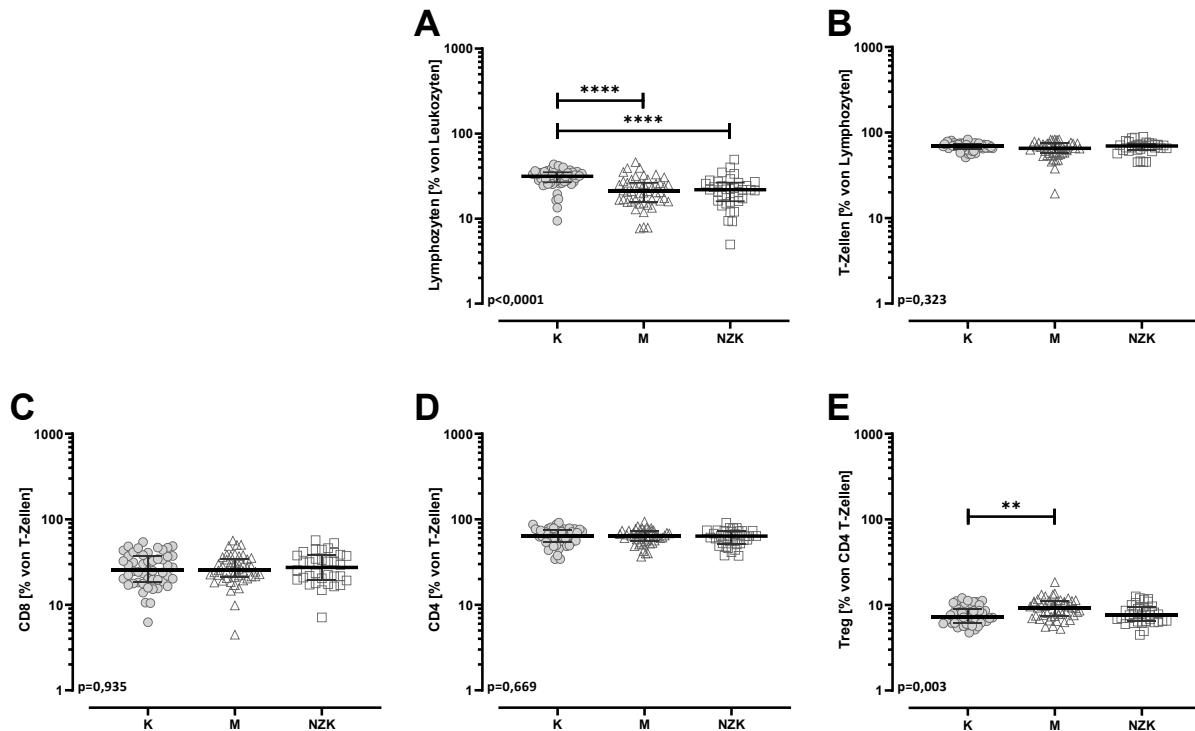


Abbildung 7 Vergleich der relativen Immunzell-Zahlen im Blut von Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom und gesunden Kontrollpersonen. Dargestellt ist der Anteil der Lymphozyten (% Leukozyten), Lymphozyten (% Leukozyten) und der Lymphozytensubpopulationen als T-Zellen (% von Lymphozyten), CD8 T-Zellen [% von T-Zellen], CD4 T-Zellen (% von T-Zellen) und regulatorische T-Zellen (Treg, % von CD4 T-Zellen). Verglichen werden gesunde Kontrollpersonen (K; $n=50$) und Personen mit Melanom (M; $n=47$) oder mit Nierenzellkarzinom (NZK; $n=34$). Die Querbalken repräsentieren jeweils Median und Interquartilsabstand (IQR). Es wurde ein Kruskal-Wallis Test mit Dunn's post Test durchgeführt. Signifikante Unterschiede im post-Test sind durch Sternsymbole markiert (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; **** $p<0,0001$).

5.2.3 Differenzierungsstatus der T-Zellen

Der Differenzierungsstatus der T-Zellen wurde mithilfe der Marker CD45RO und CD62L bestimmt. Es wurden die relativen Anteile von naiven, zentralen Gedächtniszellen (central memory, CM), Effektor-Gedächtniszellen (effector memory, EM) und terminal differenzierten EM-Zellen (effector memory with re-expression of CD45RA, TEMRA) in den jeweiligen T-Zellsubgruppen (CD4, CD8 und Treg) quantifiziert und zwischen Personen mit Melanom, Nierenzellkarzinom und gesunden Kontrollen verglichen. Generell wies die Verteilung der vier Differenzierungsstadien der CD8 T-Zellen keine Unterschiede zwischen Kontrollpersonen und Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom auf. Demgegenüber zeigten Personen mit Melanom ein signifikant erhöhter Anteil an höher differenzierten EM CD4 T-Zellen gegenüber gesunden Kontrollen sowie Personen mit NZK bei erniedrigtem Anteil an naiven CD4 T-Zellen gegenüber gesunden Kontrollen ($p=0,019$). Gleichsinnig zeigte sich auch der Anteil der EM und CM Treg der Personen mit Melanom signifikant gegenüber gesunden Kontrollen erhöht, bei geringerem Anteil der naiven T-Zellen ($p=0,001$; Abbildung 8).

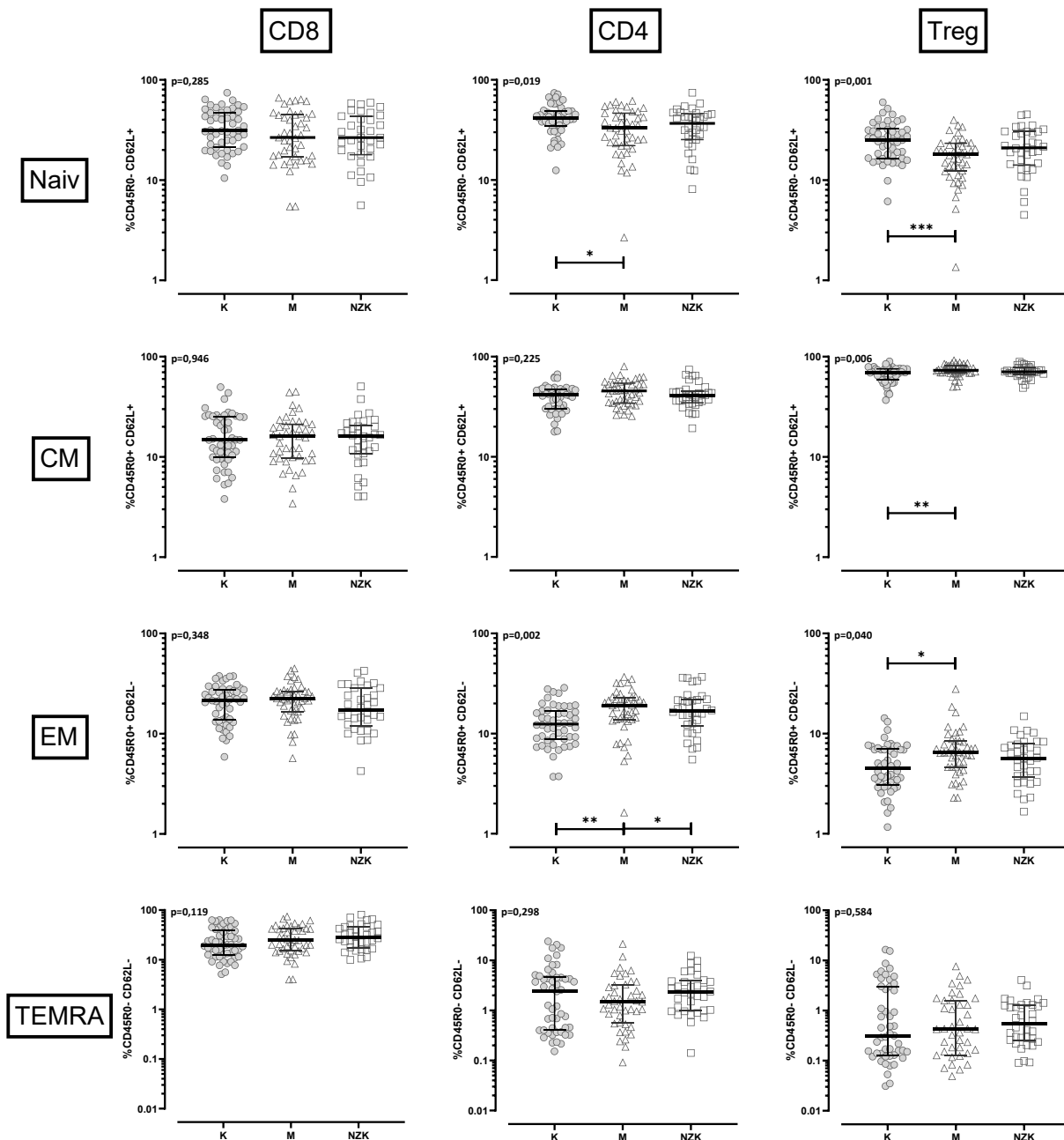


Abbildung 8 Vergleich der Differenzierung der Immunzellen im Blut von Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom und gesunden Kontrollpersonen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Differenzierungssubpopulationen von CD8 T-Zellen (links), CD4 T-Zellen (Mitte) und regulatorischen T-Zellen (Treg; rechts). Der prozentuale Anteil der Differenzierungssubpopulationen, definiert als Naiv (%CD45R0-/CD62L+), „central memory“ CM (% CD45R0+/CD62L+), „effector memory“ (CD45R0+/CD62L-) und „effector memory with re-expression of CD45RA“ TEMRA (CD45R0-/CD62L-) bezogen auf die jeweiligen T-Zellsubpopulationen (CD8 T-Zellen, CD4 T-Zellen und Treg) wird in den Zeilen dargestellt und zwischen den gesunden Kontrollen (K; n=50) und Personen mit Melanom (M; n=43) oder mit Nierenzellkarzinom (NZK; n=34) jeweils verglichen. Die Querbalken repräsentieren jeweils Median und Interquartilsabstand (IQR). Es wurde ein Kruskal-Wallis Test mit Dunn's post Test durchgeführt. Signifikante Unterschiede im post-Test sind durch Sternsymbole markiert (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001). In die Auswertung eingeschlossen wurden Proben mit mindestens 15000 T-Zellen pro Messung.

5.2.4 Phänotypische Marker für T-Zellfunktionalität

In die weitere phänotypische Analyse wurden Marker der T-Zellfunktionalität wie Immun-Checkpointmoleküle CTLA-4, PD-1 und BTLA sowie Ki67 und CD39 in den jeweiligen T-

Zellsubgruppen (CD8 T-Zellen, CD4 T-Zellen und Treg) untersucht (siehe Färbung 3, Abschnitt 4.2.1).

Personen mit Melanom wiesen gegenüber Personen mit Nierenzellkarzinom und gesunden Kontrollen unter allen T-Zell-Populationen einen signifikant geringeren Anteil an PD-1+ Zellen auf (Abbildung 9A; CD8 T-Zellen, CD4 T-Zellen und Treg, alle $p < 0,0001$). Für die mittlere Fluoreszenzintensität von PD-1, die ein Maß für die mittlere PD-1 Expression pro Zelle darstellt, ließen sich keine signifikanten Unterschiede detektieren (Abbildung 9B).

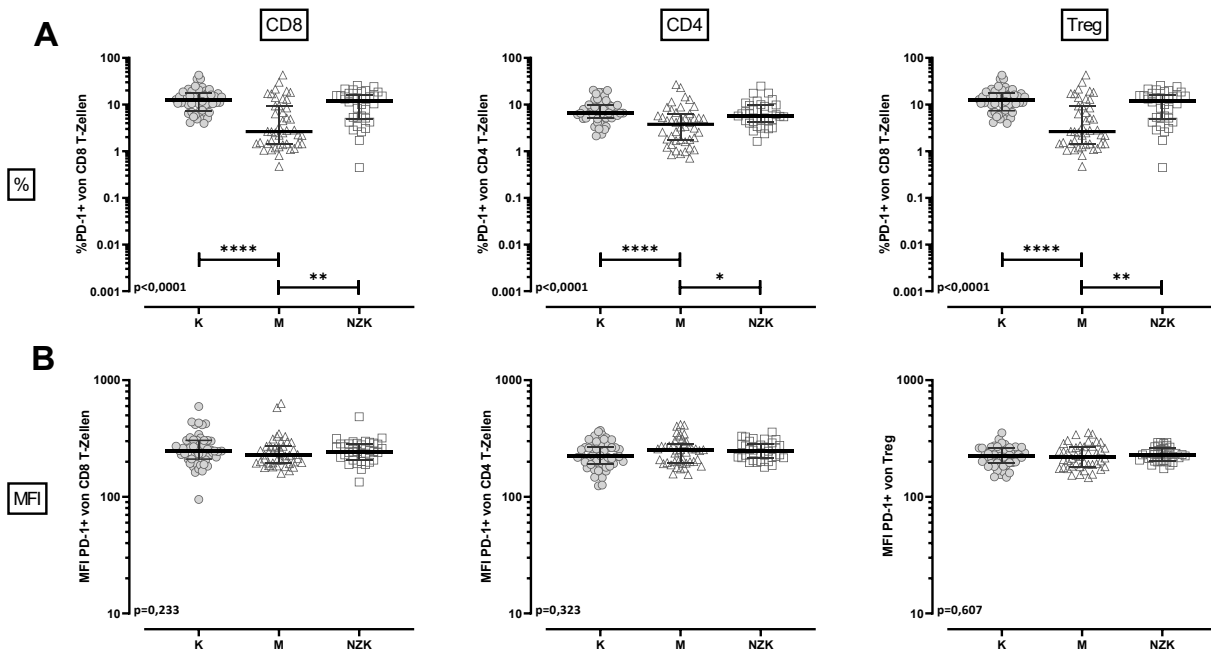


Abbildung 9 Vergleich der Anteile an PD-1+ und der MFI von PD-1 bei den Immunzellen im Blut von Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom und gesunden Kontrollpersonen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der PD-1+ Zellen (A) und die mittlere Fluoreszenzintensität MFI (B) von PD-1 von CD8 T-Zellen (links), CD4 T-Zellen (Mitte) und regulatorischen T-Zellen (Treg; rechts). Der prozentuale Anteil an PD-1+ Zellen und die MFI von PD-1 wurde zwischen gesunden Kontrollen (K; n=50) und Personen mit Melanom (M; n=44) oder mit Nierenzellkarzinom (NZK; n=34) jeweils verglichen. Die Querbalken repräsentieren jeweils Median und Interquartilsabstand (IQR). Es wurde ein Kruskal-Wallis Test mit Dunn's post Test durchgeführt. Signifikante Unterschiede im post-Test sind durch Sternsymbole markiert (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$). In die Auswertung eingeschlossen wurden Proben mit mindestens 15000 T-Zellen pro Messung.

Bei Analyse von CTLA-4 wiesen Personen mit NZK gegenüber gesunden Kontrollen und Personen mit Melanom in CD8 T-Zellen ($p < 0,001$), CD4 T-Zellen ($p = 0,009$) und regulatorischen T-Zellen ($p = 0,056$; dort nicht gegenüber Personen mit Melanom) einen signifikant erhöhten Anteil an CTLA-4+ Zellen auf (Abbildung 10). Bei Personen mit Melanom konnten dagegen keine Unterschiede zu den gesunden Kontrollen festgestellt werden. Generell war der Anteil an CTLA-4+ Zellen unter den Treg am größten. Am geringsten war der Anteil CTLA-4+ Zellen unter den CD8 T-Zellen, wobei sich hier die einzelnen Personen am deutlichsten unterschieden.

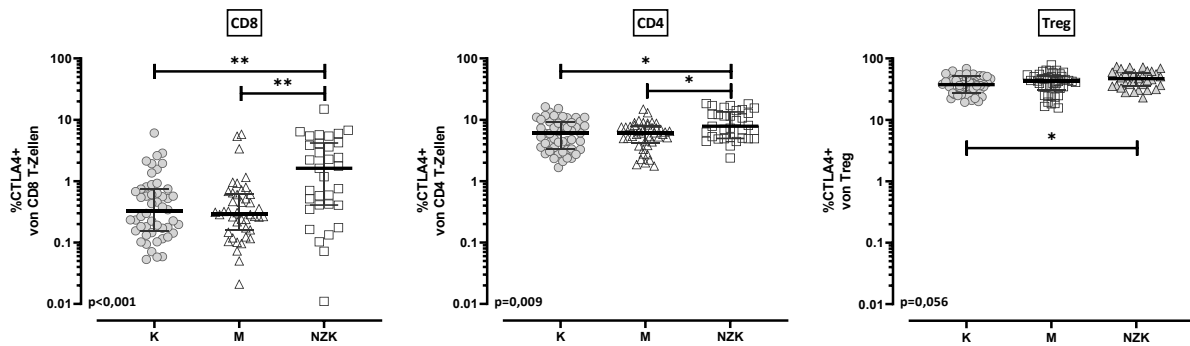


Abbildung 10 Vergleich der Anteile an CTLA-4+ bei den Immunzellen im Blut von Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom und gesunden Kontrollpersonen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der CTLA-4+ Zellen von CD8 T-Zellen (links), CD4 T-Zellen (Mitte) und regulatorischen T-Zellen (Treg; rechts). Der prozentuale Anteil an CTLA-4+ Zellen wird zwischen den gesunden Kontrollen (K; n=50) und Personen mit Melanom (M; n=42) oder Nierenzellkarzinom (NZK; n=33) verglichen. Die Querbalken repräsentieren jeweils Median und Interquartilsabstand (IQR). Es wurde ein Kruskal-Wallis Test mit Dunn's post Test durchgeführt. Signifikante Unterschiede im post-Test sind durch Sternsymbole markiert (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). In die Auswertung eingeschlossen wurden Proben mit mindestens 10000 T-Zellen pro Messung.

Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom wiesen keine Unterschiede in der Expression von BTLA auf CD8, CD4 T-Zellen oder Treg gegenüber gesunden Kontrollen auf (Daten nicht gezeigt).

Bei Betrachtung der Proliferationsfähigkeit mithilfe des Markers Ki-67 zeigte sich, dass Personen mit Melanom einen erhöhten Anteil Ki-67+, kürzlich proliferierter CD8 T-Zellen ($p = 0,020$), CD4 T-Zellen ($p < 0,001$) und Treg ($p = 0,018$) gegenüber gesunden Kontrollen aufwiesen. Der Anteil der Ki-67+ CD4 T-Zellen war auch bei Personen mit NZK gegenüber gesunden Kontrollen erhöht ($p < 0,001$; Abbildung 11).

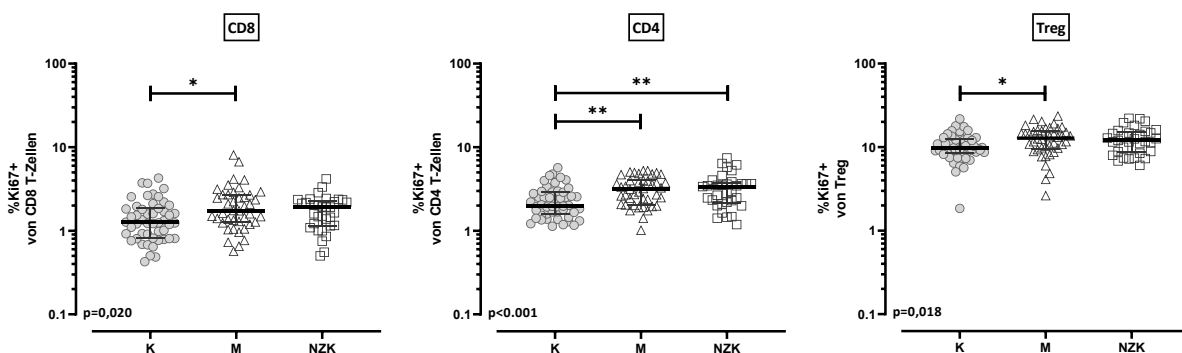


Abbildung 11 Vergleich der Anteile an Ki-67+ bei den Immunzellen im Blut von Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom und gesunden Kontrollpersonen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Ki-67+ Zellen von CD8 T-Zellen (links), CD4 T-Zellen (Mitte) und regulatorischen T-Zellen (Treg; rechts). Der prozentuale Anteil an Ki-67+ Zellen wird zwischen den gesunden Kontrollen (K; n=50) und Personen mit Melanom (M; n=42) oder mit Nierenzellkarzinom (NZK; n=33) jeweils verglichen. Die Querbalken repräsentieren jeweils Median und Interquartilsabstand (IQR). Es wurde ein Kruskal-Wallis Test mit Dunn's post Test durchgeführt. Signifikante Unterschiede im post-Test sind durch Sternsymbole markiert (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). In die Auswertung eingeschlossen wurden Proben mit mindestens 10000 T-Zellen pro Messung.

Die Analyse CD39+ T-Zellen zeigte bei Personen mit Melanom ein signifikant erhöhter Anteil an CD39+ CD4 T-Zellen ($p = 0,005$) und Treg ($p = 0,004$) gegenüber gesunden Kontrollen (Abbildung 12).

Personen mit Nierenzellkarzinom wiesen in keiner der drei Populationen signifikante Unterschiede auf.

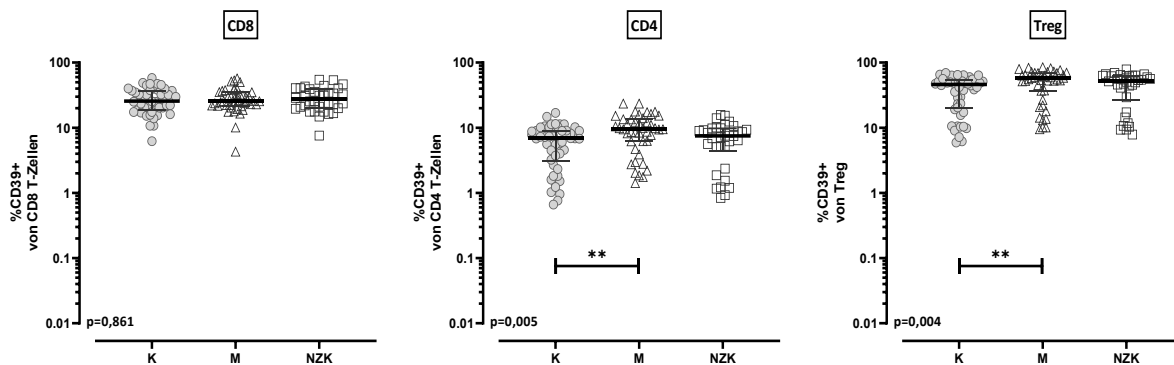


Abbildung 12 Vergleich der Anteile an CD39+ Immunzellen im Blut von Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom und gesunden Kontrollpersonen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der CD39+ Zellen von CD8 T-Zellen (links), CD4 T-Zellen (Mitte) und regulatorischen T-Zellen (Treg; rechts). Der prozentuale Anteil an CD39+ Zellen wird zwischen den gesunden Kontrollen (K; n=50) und Personen mit Melanom (M; n=43) oder mit Nierenzellkarzinom (NZK; n=34) jeweils verglichen. Die Querbalken repräsentieren jeweils Median und Interquartilsabstand (IQR). Es wurde ein Kruskal-Wallis Test mit Dunn's post Test durchgeführt. Signifikante Unterschiede im post-Test sind durch Sternsymbole markiert (**p<0,01). In die Auswertung eingeschlossen wurden Proben mit mindestens 15000 T-Zellen pro Messung.

5.2.5 Vergleich der Reaktivität von T-Zellsubpopulationen nach Antigen-spezifischer und polyklonaler Stimulation

Von 47 gesunden Kontrollen, 42 Personen mit Melanom und 33 Personen mit NZK wurde neben phänotypischen Markern auch die Reaktivität der T-Zellen untersucht (siehe Tabelle 24). Für die Untersuchung der Reaktivität der T-Zellen wurden diese mit Lysat aus CMV und VZV infizierten Fibroblasten sowie SEB stimuliert und auf Basis der Co-Expression des Aktivierungsmarkers CD69 und des Zytokins IFN γ durchflusszytometrisch analysiert. Reaktive CD4 und CD8 T-Zellen wurden durch die Expression von CD69 und Positivität für IFN γ identifiziert. Es wurden die reaktiven T-Zellen nach Stimulation mit Ko-Ag (Negativkontrolle), nach Antigen-spezifischer Stimulation mit CMV und VZV-Antigenen und nach polyklonalem Stimulus mit SEB als Positivkontrolle untersucht. Die beiden Viren wurden aufgrund ihrer breiten Durchseuchung gewählt, um umfassend bei möglichst vielen Personen Antigen-spezifische Zellen charakterisieren zu können. Nach Ermittlung der reaktiven Zellen auf Basis der einzelnen Stimuli bei CD4 und CD8 T-Zellen, wurden zusätzlich die Frequenzen nach Antigen-spezifischer Stimulation durch Abzug der Negativkontrolle normiert. Zudem wurde die CTLA-4 Expression, die Induktion zweier weiterer Zytokine (IL-2 und TNF) sowie die CD39 und PD-1 Expression, durch Antigen-spezifische CD8 und CD4 Effektor-T-Zellen untersucht.

Generell zeigte sich erwartungsgemäß eine geringe bis nicht messbare Reaktivität in der Negativkontrolle. Der Anteil reaktiver T-Zellen gegenüber VZV war eher geringer als gegenüber CMV und nach polyklonaler Stimulation zeigte sich eine hohe Reaktivität. Nach Normierung ließen sich keine Unterschiede in den Frequenzen der reaktiven CD4 T-Zellen für CMV, VZV sowie polyklonaler Stimulation zwischen den gesunden Kontrollen, Personen mit Melanom oder

Nierenzellkarzinom detektieren (Abbildung 13). Die Detektionslimits ($DL \geq 0,05\%$ für CMV-spezifische und $DL \geq 0,02\%$ für VZV-spezifische CD4 T-Zellen) wurden auf Basis früherer Arbeiten unserer Arbeitsgruppe definiert (SCHUB et al., 2015; SESTER et al., 2001). Nach CMV-spezifischer Stimulation, waren Personen mit reaktiven CD4 T-Zellen oberhalb und unterhalb des Detektionslimits deutlich zu unterscheiden. Für VZV war der Unterschied weniger scharf und wies einen kontinuierlichen Übergang auf (Abbildung 13A). Der Anteil von Personen mit Reaktivität oberhalb der jeweiligen Nachweisgrenze zeigte ebenfalls keine Unterschiede (Tabelle 25). Außer einer leicht erhöhten Basisaktivität für CD8 T-Zellen ergaben sich für die nicht normierten und normierten Frequenzen keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 13B). Das verwendete VZV-Antigen lässt valide Aussage über VZV spezifische CD4 T-Zellen zu, ist jedoch für die Detektion von reaktiven CD8 T-Zellen ungeeignet, sodass auf die Darstellung dieser verzichtet wurde (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 25 CMV- und VZV-spezifische T-Zell-Analyse

	Gesunde Kontrollen	Personen mit Melanom	Personen mit Nierenzellkarzinom	p
Antigen-spezifische T-Zell-Analyse, n ¹	47	42	33	
CMV positiv [n, (%)]	24 (51,1%)	24 (57,1%)	18 (54,6%)	0,846 ²
VZV positiv [n, (%)]	31 (66,0%)	32 (76,2%)	24 (72,7%)	0,554 ²

¹von 34 Patienten erwiesen sich 7 Tumoren im Verlauf nach Operation als benigne; ²Chi-Square Test

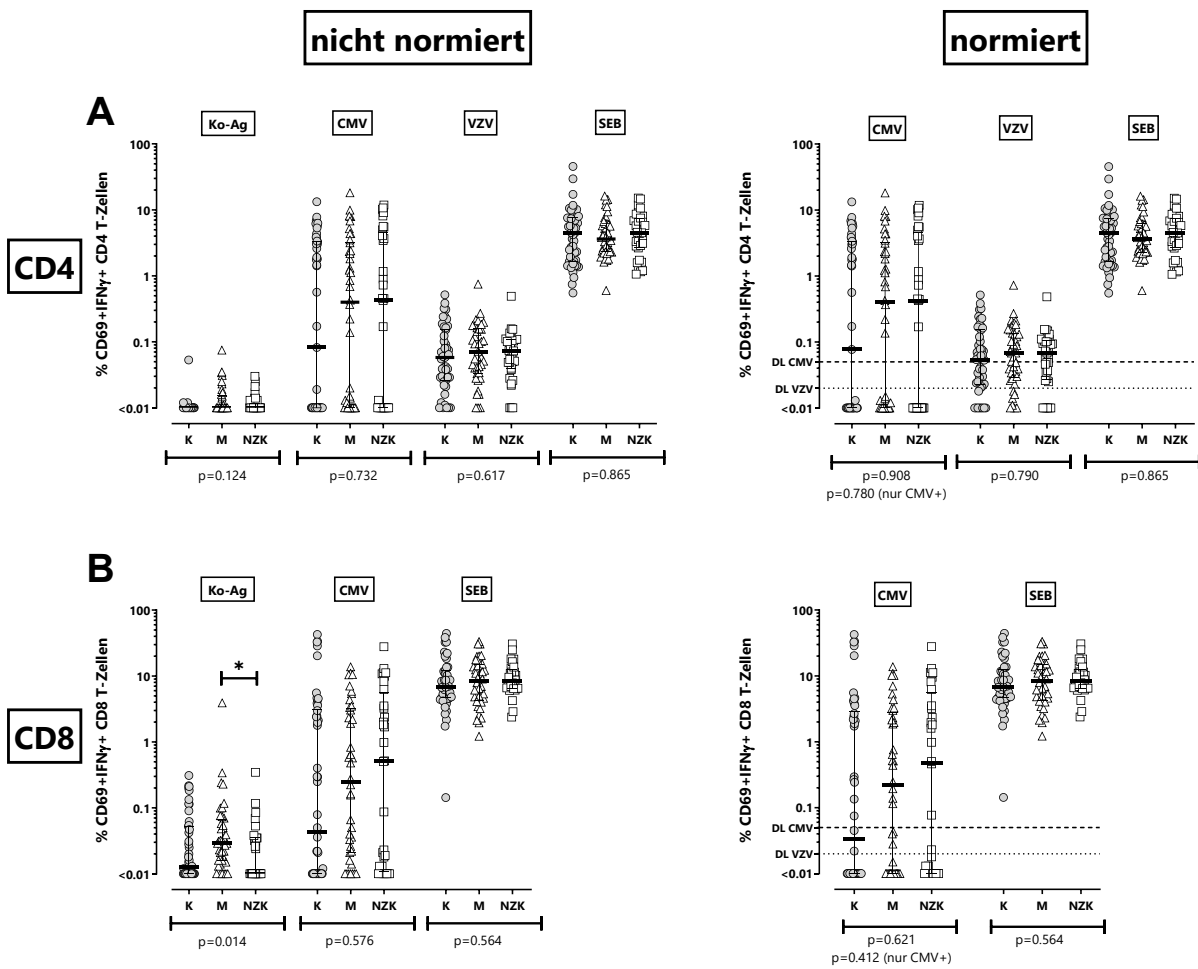


Abbildung 13 Vergleich der Frequenzen und normierten Frequenzen von CMV und VZV Antigen-spezifischen CD4 und CD8 T-Zellen bei Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom gegenüber gesunden Kontrollen. Dargestellt sind die nicht normierten Zellfrequenzen (links) auf die Negativkontrolle Ko-Ag, CMV, VZV und Positivkontrolle SEB und die nach Abzug der Negativkontrolle normierten Zellfrequenzen (rechts) von CD4 (A) und CD8 (B) T-Zellen. Die Frequenzen wurden zwischen gesunden Kontrollen (K; n=47) und Personen mit Melanom (M; n=42) oder mit Nierenzellkarzinom (NZK; n=33) jeweils verglichen. Die Querbalken repräsentieren jeweils Median und Interquartilsabstand (IQR). Es wurde ein Kruskal-Wallis Test mit Dunn's post Test durchgeführt. Signifikante Unterschiede im post-Test sind durch Sternsymbole markiert (* $p < 0,05$). Für A) und B) gilt das Einschlusskriterium von mindestens 10000 CD8 und CD4 T-Zellen. Es wurden Proben mit mindestens 20 CD69/IFN γ positiven Zellen im Stimulus aber weniger als 20 CD69/IFN γ positive Zellen in der Kontrolle pro Messung eingeschlossen.

Es zeigte sich eine starke Korrelation zwischen CD4 und CD8 T-Zellen nach CMV-spezifischer Stimulation ($p < 0,0001$; $r = 0,750$) und eine signifikante, jedoch schwächer ausgeprägte Korrelation nach polyklonaler Stimulation ($p < 0,00001$; $r = 0,455$; Abbildung 14).

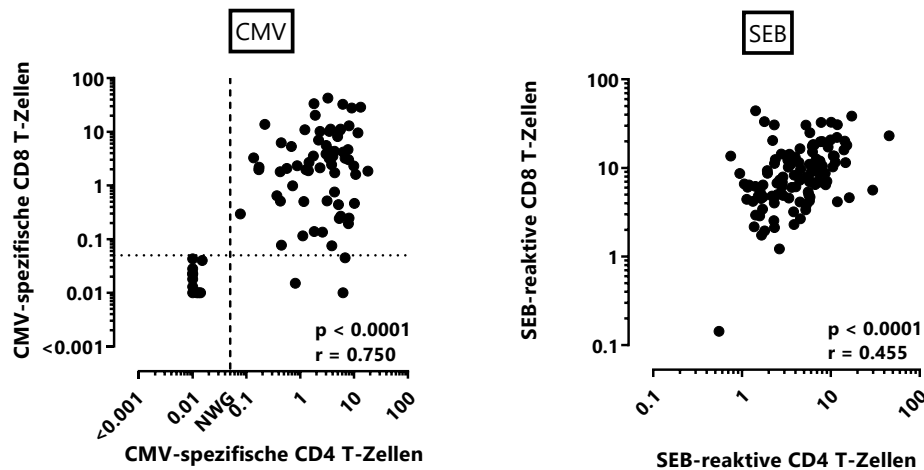


Abbildung 14 Korrelation von CMV und SEB reaktiven CD8 und CD4 T-Zellen. Dargestellt sind die Korrelationen der (A) CMV und (B) SEB reaktiven CD8 und CD4 T-Zellen dargestellt. Es wurde eine Korrelationsanalyse nach Spearman durchgeführt.

Für die Expression von CTLA-4 der reaktiven CD4 T-Zellen ließ sich eine signifikant erhöhte MFI der VZV-reaktiven CD4 T-Zellen bei Personen mit NZK gegenüber gesunden Kontrollen ($p=0,039$) detektieren, während der Unterschied bei Personen mit Melanom keine statistische Signifikanz erreichte. Die CTLA-4 Expression der CMV- oder SEB-reaktiven CD4 T-Zellen oder der Antigen-spezifischen CD8 T-Zellen zeigte keine Unterschiede (Abbildung 15A).

Zudem wurde das Zytokinprofil der reaktiven CD4 und CD8 T-Zellen bestehend aus $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ und Interleukin-2 (IL-2) untersucht. Aus der Kombination dieser 3 Zytokine ergaben sich 7 Subpopulationen an dreifach, doppelt und einfach-Zytokin-positiven T-Zellen ($IFN\gamma-/TNF\alpha+/IL-2-$, $IFN\gamma+/TNF\alpha-/IL-2-$, $IFN\gamma+/TNF\alpha+/IL-2-$, $IFN\gamma+/TNF\alpha+/IL-2+$, $IFN\gamma+/TNF\alpha-/IL-2+$, $IFN\gamma-/TNF\alpha+/IL-2+$, $IFN\gamma-/TNF\alpha-/IL-2+$).

Insgesamt zeigten sich Unterschiede in den Zytokinprofilen der CMV-spezifischen, VZV-spezifischen und SEB-reaktiven CD4 und CD8 T-Zellen, jedoch nur marginale Unterschiede zwischen den drei Personengruppen. CMV-reaktive CD4 und CD8 T-Zellen wiesen einen hohen Anteil an $IFN\gamma+/TNF\alpha+$ Zellen sowie auch dreifach positive, multifunktionale Zellen auf. VZV-reaktive CD4 T-Zellen waren vorwiegend multifunktional. Eine Fraktion aus $TNF/IL-2$ -doppelt positiven CD4 T-Zellen zeigte sich bei Personen mit Melanom gegenüber Kontrollen signifikant geringer ($p=0,033$). Nach polyklonaler Stimulation waren signifikant weniger reaktive CD4 T-Zellen isoliert $IL-2+$ bei Personen mit Nierenzellkarzinom gegenüber gesunden Kontrollen und Personen mit Melanom ($p<0,0001$). Diese Population machte jedoch generell nur einen geringen Anteil aus. Unter CD8 T-Zellen war die IL-2 Expression generell schwach ausgeprägt, so dass hier die $TNF\alpha+$ und/oder $IFN\gamma+$ Zellen dominierten. CMV-spezifische CD8 T-Zellen wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf, während sich nach polyklonaler Stimulation ein geringerer Anteil an $TNF\alpha+$ CD8 T-Zellen bei Personen mit NZK gegenüber gesunden Kontrollen beobachten ließ ($p=0,031$; Abbildung 15).

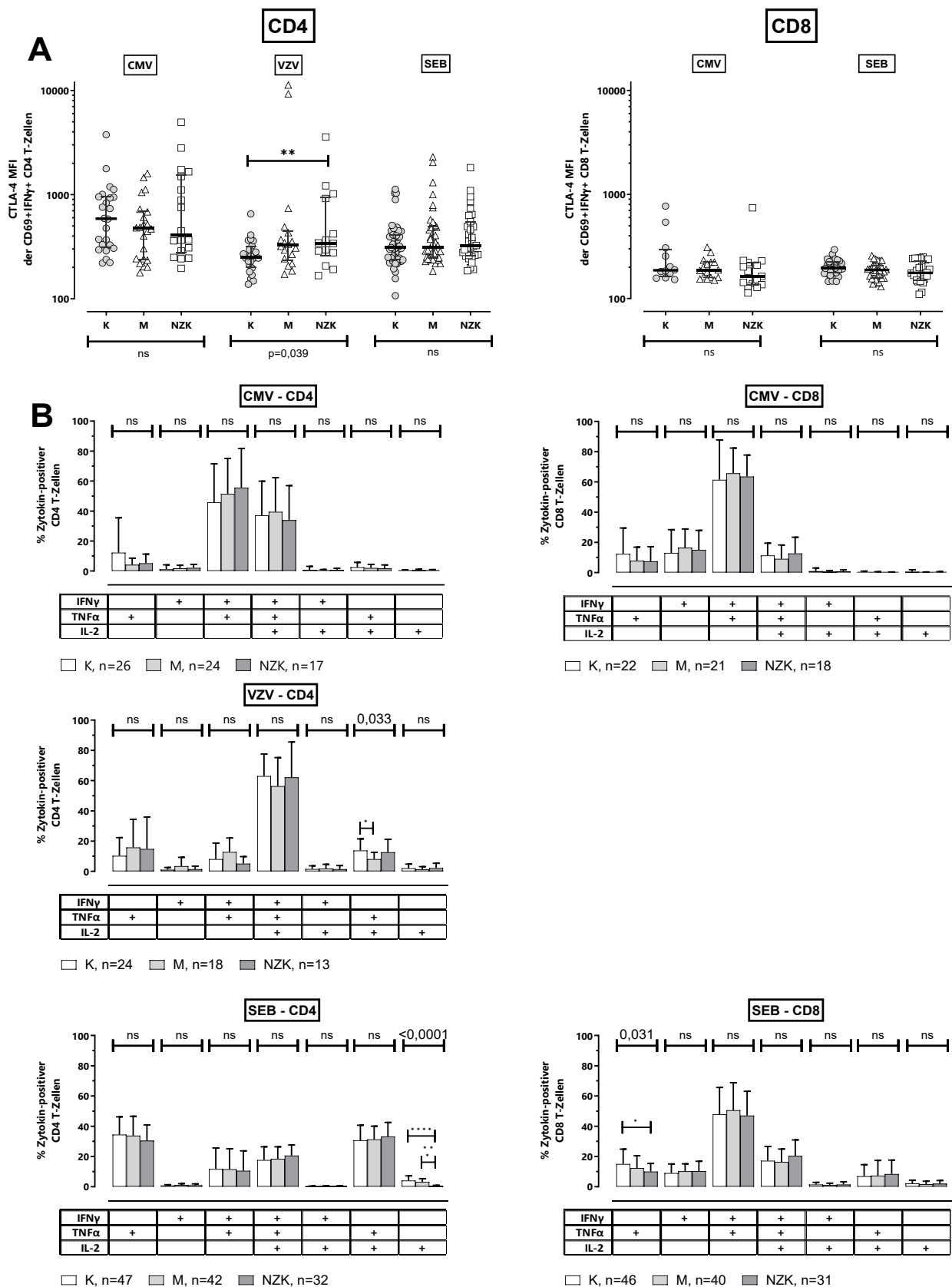


Abbildung 15 Vergleich der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) von CTLA-4 auf reaktiven CD4 und CD8 T-Zellen sowie Vergleich der Zytokinprofile von IFN γ , TNF α und IL-2 der CMV, VZV und SEB reaktiven CD4 und CD8 T-Zellen bei Personen mit Nierenzellkarzinom oder Melanom gegenüber gesunden Kontrollen. (A) Dargestellt ist die MFI von CTLA-4 auf CMV, VZV und SEB reaktiven CD4 und CD8 T-Zellen verglichen zwischen gesunden Kontrollen (K n=47) und Personen mit Melanom (M n=42) oder Nierenzellkarzinom (NZK; CMV/VZV n=33, SEB n=32). Die Querbalken

repräsentieren jeweils Median und Interquartilsabstand (IQR). **(B)** In den Balkendiagrammen ist der prozentuale Anteil der sieben Populationen mit unterschiedlicher Zytokinexpression dargestellt (IFN γ -/TNF α +/IL-2-, IFN γ +/TNF α -/IL-2-, IFN γ +/TNF α +/IL-2-, IFN γ +/TNF α +/IL-2+, IFN γ -/TNF α -/IL-2+, IFN γ -/TNF α +/IL-2+, IFN γ -/TNF α -/IL-2+). Diese sind jeweils für CMV, VZV und SEB reaktive CD4 T-Zellen und CMV und VZV reaktive CD8 T-Zellen dargestellt. Es wurde ein Kruskal-Wallis Test mit Dunn's post Test **(A)** durchgeführt. Signifikante Unterschiede im post-Test sind durch Sternsymbole markiert (**p<0,01). Des Weiteren wurde ein One-Way-ANOVA Test mit Tukeys multiplen Vergleichstest **(B)** durchgeführt. In die Auswertung eingeschlossen wurden Personen mit mehr als 20 CD69/IFN γ positive Zellen im Stimulus aber weniger als 20 CD69/IFN γ positive Zellen in der Kontrolle pro Messung **(A)**. Es wurden Proben eingeschlossen die mindestens 30 Zytokin positive Events pro Messung **(B)** aufweisen. Das Einschlusskriterium betrug mindestens 10000 CD8 und CD4 T-Zellen.

Schließlich wurde der Anteil CD39+ T-Zellen sowie die mittlere Expression von PD-1 analysiert. Bezüglich der CD39+ reaktiven T-Zellen zeigten sich insgesamt zu wenige reaktive T-Zellen, um eine verlässliche Aussage zu treffen, wobei Tendenzen zu einer erniedrigten Anzahl CD39+ CMV reaktiver CD4 T-Zellen bei Personen mit Melanom sowie CD4 T-Zellen bei Personen mit Nierenzellkarzinom nach polyklonaler Stimulation bestanden (Daten nicht gezeigt). Wie auf den gesamten CD4 T-Zellen wiesen auch CMV- und SEB reaktive CD4 T-Zellen von Personen mit Melanom, gegenüber Personen mit Nierenzellkarzinom eine signifikant geringere PD-1 MFI auf (CMV p=0,004; SEB p=0,012; Abbildung 16). Signifikante Unterschiede der PD-1 MFI der CMV- und SEB-reaktiven CD8 T-Zellen ließen sich nicht beobachten.

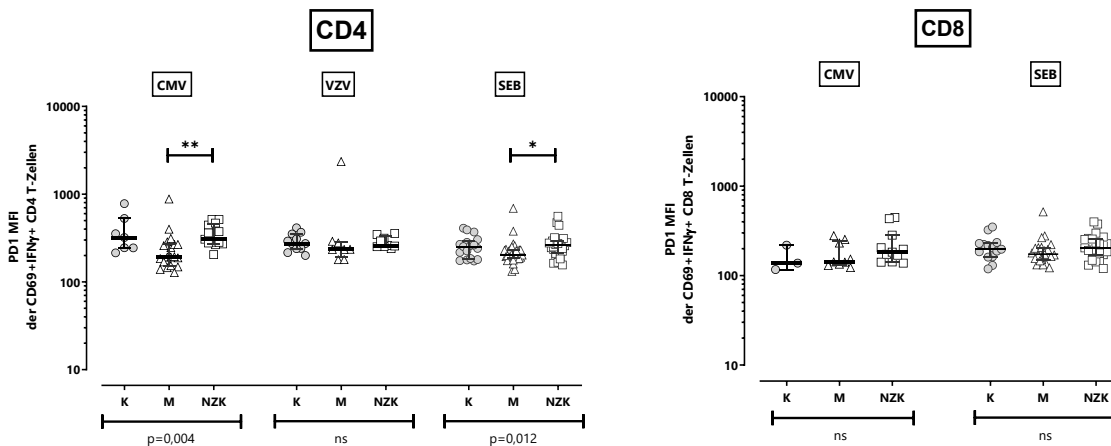


Abbildung 16 Vergleich der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) von PD-1 auf reaktiven CD4 und CD8 T-Zellen bei Personen mit Nierenzellkarzinom oder Melanom gegenüber gesunden Kontrollen. Dargestellt ist die MFI von PD-1 auf CMV, VZV und SEB reaktiven CD4 und CD8 T-Zellen verglichen zwischen gesunden Kontrollen (K) und Personen mit Melanom (M) oder Nierenzellkarzinom (NZK). Die Querbalken repräsentieren jeweils Median und Interquartilsabstand (IQR). Es wurde ein Kruskal-Wallis Test mit Dunn's post Test durchgeführt. Signifikante Unterschiede im post-Test sind durch Sternsymbole markiert (*p<0,05; **p<0,01). Es wurden Proben eingeschlossen die mindestens 30 Zytokin positive Events pro Messung aufweisen. Das Einschlusskriterium betrug mindestens 10000 CD4 T-Zellen und 3000 CD8 T-Zellen. Anzahl der eingeschlossenen Proben bei CD4 T-Zellen (K: CMV n=7, VZV n=11, SEB n=17; M: CMV n=19, VZV n=8, SEB n=32; NZK: CMV n=13, VZV n=9, SEB n=28). Anzahl der eingeschlossenen Proben bei CD8 T-Zellen (K: CMV n=8, SEB n=14; M: CMV n=9, SEB n=22; NZK: CMV n=11, SEB n=23).

5.3 Charakteristika der Immunzellen bei Subgruppen von Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom

In folgenden Kapiteln werden die in Abschnitt 5.2 dargestellten Ergebnisse, unter verschiedenen klinisch relevanten Gesichtspunkten, gemäß dem oben beschriebenen Vorgehen stratifiziert. Die aus diesen Subgruppenanalysen resultierenden Daten sowie relevante Unterschiede, werden mit fokussierten Darstellungen punktiert grafisch unterstützt. Zudem wurden bei einzelnen Patientengruppen Messungen im Verlauf durchgeführt.

5.3.1 Charakteristika der Immunzellen bei Personen mit Nierenzellkarzinom und benignem Tumor

Nicht jede Person, die mit einer Raumforderung in der Niere vorstellig war, litt an einem malignen Geschehen. Bei sieben weiteren Personen stellten sich die Nierentumore nach Operation in der histologischen Untersuchung als benigner Befund dar. Bei Stratifizierung der Daten von Personen mit Nierentumoren in Personen mit Nierenzellkarzinom (n=34) und Personen mit benigner Raumforderung (BRF, n=7) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Alter. Bei Personen mit einer BRF war der Anteil an Frauen signifikant höher (p=0,015). Im Hinblick auf die gemessenen immunologischen Parameter ließen sich jedoch keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen feststellen (Daten nicht gezeigt).

5.3.2 Vergleich der Charakteristika der Immunzellen von Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom in Abhängigkeit der durchgeführten Therapien

Im Folgenden wurden die Daten der Personen mit Melanom oder NZK nach der Art der Therapie stratifiziert (Tabelle 26). Bei 10 Personen mit Melanom, die bezüglich einer systemischen medikamentösen ICPI-Therapie naiv waren, wurde eine Immun-Checkpoint-Inhibitor (ICPI) Therapie eingeleitet („vor ICPI“). Die restlichen Personen befanden sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme bereits unter einer ICPI-Therapie („ICPI“). Im Median befanden sich diese im 8. Zyklus (Minimum 1, Maximum 38).

Bei den Personen mit NZK ergaben sich drei Gruppen. Die größte Gruppe umfasste Personen mit NZK, bei denen die Blutentnahme vor elektiver OP erfolgte („vor OP“); zudem lagen zwei kleinere Gruppen mit Personen mit metastasiertem NZK vor Einleitung einer ICPI-Therapie und unter einer ICPI-Therapie vor. Im Median befanden sich diese Personen im 5,5. Zyklus (Minimum 1, Maximum 33; Tabelle 26). Bei allen Patienten mit ICPI-Therapie erfolgte Blutabnahme am Ende eines jeden Zyklus vor Gabe der nächsten Infusion.

Tabelle 26 Übersicht der Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom in Abhängigkeit von der Therapie

	Personen mit Melanom		p	Personen mit Nierenzellkarzinom			p
	Vor ICPI	ICPI		Vor OP	Vor ICPI	ICPI	
n	10	37		27	3	4	
Alter (Jahre) [MW±StabW]	55,9±14,9	64,0±15,0	0,135 ¹	60,7±11,9	73,5±9,2	71,2±6,5	0,070 ¹
Geschlecht [n; %]	>0,999 ²						n.a.
weiblich	4 (40,0%)	13 (35,1%)		5 (18,5%)	0 (0%)	2 (50,0%)	
männlich	6 (60,0%)	24 (64,9%)		22 (81,5%)	3 (100%)	2 (50,0%)	
Therapiezyklen [Median (Min-Max)]	0	8 (1-38)	n.a.	0	0	5,5 (1-33)	n.a.

¹ungepaarter t-Test, ²exakter Test nach Fisher.

Bezüglich der absoluten Zellzahlen ließen sich keine signifikanten Unterschiede beobachten. Die Personen mit NZK vor ICPI wiesen einen erhöhten Anteil an Treg gegenüber den anderen Personen mit NZK auf. Darüber hinaus ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in den beiden Kollektiven (Abbildung 17).

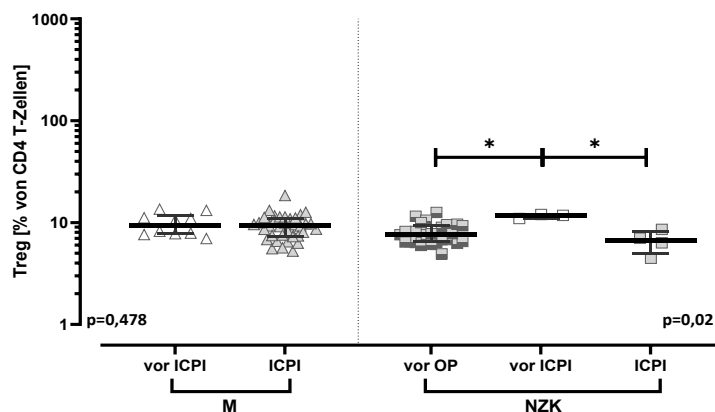


Abbildung 17 Auszug aus dem Vergleich der relativen Immunzell-Zahlen im Blut von Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom und gesunden Kontrollpersonen in Abhängigkeit von der Therapie. Dargestellt ist der Anteil der regulatorischen T-Zellen [% von CD4 T-Zellen] von Personen mit Melanom (M) „vor ICPI“ (n=10), Personen mit Melanom unter „ICPI“ (n=37), Personen mit Nierenzellkarzinom (NZK) vor operativer Entfernung des Tumors („vor OP“, n=27), Personen mit Nierenzellkarzinom „vor ICPI“ (n=3) und unter „ICPI“ (n=4). Die Querbalken repräsentieren jeweils Median und Interquartilsabstand (IQR). Es wurde ein Mann Whitney Test im Kollektiv Melanom und ein Kruskal-Wallis Test mit Dunn’s post Test im Kollektiv Nierenzellkarzinom durchgeführt. Signifikante Unterschiede im post-Test sind durch Sternsymbole markiert (*p<0,05). Immun-Checkpoint-Inhibitor „ICPI“.

Es ließ sich in der Gruppe der Treg mit TEMRA-Differenzierung bei Personen mit NZK unter ICPI ein signifikant erhöhter Anteil gegenüber vor OP detektieren (Abbildung 18). Ansonsten waren keine signifikanten Unterschiede in der Subgruppenanalyse ersichtlich (Daten nicht gezeigt).

Treg TEMRA

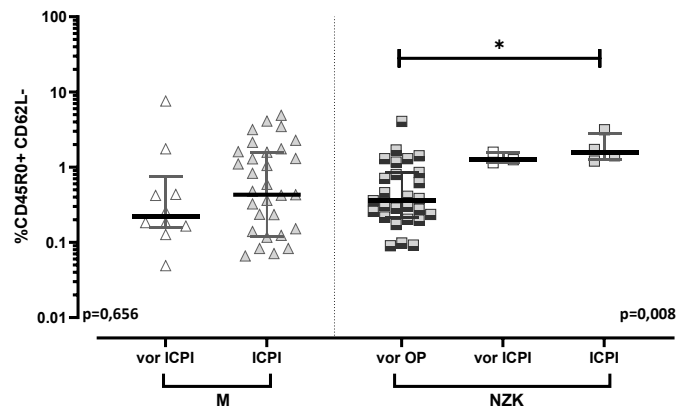


Abbildung 18 Auszug aus der Differenzierung von Treg im Blut von Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom in Abhängigkeit von der Therapie. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Differenzierungssubpopulationen von „effector memory with re-expression of CD45RA“ TEMRA (CD45RO-/CD62L-) der regulatorischen T-Zellen (Treg). Der prozentuale Anteil an Zellen wird in den Spalten dargestellt und zwischen Personen mit Melanom (M) „vor ICPI“ (n=10) gegenüber unter „ICPI“ (n=33), sowie Personen mit Nierenzellkarzinom (NZK) vor operativer Entfernung des Tumors „vor OP“ (n=27), „vor ICPI“ (n=3) und unter „ICPI“ (n=4) verglichen. Die Querbalken repräsentieren jeweils Median und Interquartilsabstand (IQR). Es wurde ein Mann Whitney Test im Kollektiv Melanom und ein Kruskal-Wallis Test mit Dunn's post Test im Kollektiv Nierenzellkarzinom durchgeführt. Signifikante Unterschiede im post-Test sind durch Sternsymbole markiert (* $p < 0,05$). In die Auswertung eingeschlossen wurden Proben mit mindestens 15000 T-Zellen pro Messung.

Betrachtet man das CTLA-4 ergeben sich interessante Ergebnisse (Abbildung 19). Therapienaive Personen mit Melanom wiesen einen signifikant geringeren Anteil an CTLA-4+ Zellen über alle Zellpopulationen im Vergleich zu Personen unter ICPI auf (CD4 T-Zellen $p=0,001$; CD8 T-Zellen $p < 0,0001$; Treg $p < 0,0001$). Zudem wiesen Personen mit Nierenzellkarzinom vor OP in allen untersuchten T-Zell-Subpopulationen die höchste Expression von CTLA-4 auf, wobei sich diese insbesondere auf CD8 T-Zellen gegenüber Personen unter ICPI erhöht darstellte ($p=0,023$).

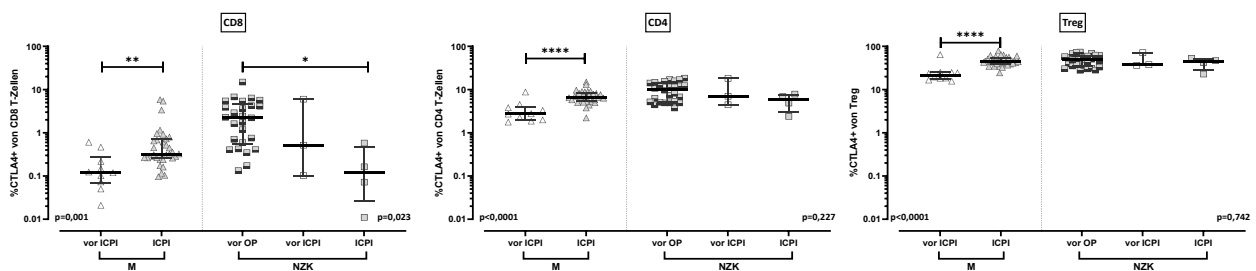


Abbildung 19 Vergleich der Anteile an CTLA-4+ Immunzellen im Blut von Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom in Abhängigkeit von der Therapie. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der CTLA-4+ Zellen von CD8 T-Zellen (links), CD4 T-Zellen (Mitte) und regulatorischen T-Zellen (Treg; rechts). Der prozentuale Anteil an CTLA-4+ Zellen wird zwischen Personen mit Melanom „vor ICPI“ (n=10), Personen mit Melanom (M) unter „ICPI“ (n=32), Personen mit Nierenzellkarzinom (NZK) vor operativer Entfernung des Tumors „vor OP“ (n=26), Personen mit Nierenzellkarzinom „vor ICPI“ (n=3), Personen mit Nierenzellkarzinom unter „ICPI“ (n=4) jeweils verglichen. Die Querbalken repräsentieren jeweils Median und Interquartilsabstand (IQR). Es wurde ein Mann Whitney Test im Kollektiv Melanom und ein Kruskal-Wallis Test mit Dunn's post Test im Nierenzellkarzinom durchgeführt. Signifikante Unterschiede im post-Test sind durch Sternsymbole markiert (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). In die Auswertung eingeschlossen wurden Proben mit mindestens 10000 T-Zellen pro Messung.

In Bezug auf PD-1 ergaben sich ebenso klare Unterschiede zwischen den Therapiegruppen in den Personenkollektiven (Abbildung 20). Bei Personen mit Melanom unter ICPI ließ sich ein signifikant geringerer Anteil an PD-1+ Zellen gegenüber therapienaiven Personen nachweisen, was für alle drei analysierten Zellpopulationen zutrif (jeweils $p < 0,0001$, Abbildung 20A). Die mittlere Expression von PD-1 der CD8 T-Zellen war bei Personen mit Melanom unter ICPI gegenüber therapienaiven Personen ebenfalls geringer ($p < 0,001$, Abbildung 20B), während für CD4 T-Zellen und Treg keine signifikanten Unterschiede in der PD-1 Expression zu beobachten waren.

Personen mit NZK unter ICPI zeigten ebenso einen signifikant geringeren Anteil an PD-1+ CD8 T-Zellen gegenüber Personen vor OP und vor ICPI ($p = 0,021$). Unter den Gesamt CD4 T-Zellen waren keine Unterschiede detektierbar, während unter den Treg ein geringerer Anteil an PD-1+ Zellen unter ICPI im Vergleich zu Personen vor ICPI nachweisbar war ($p = 0,019$, Abbildung 20A).

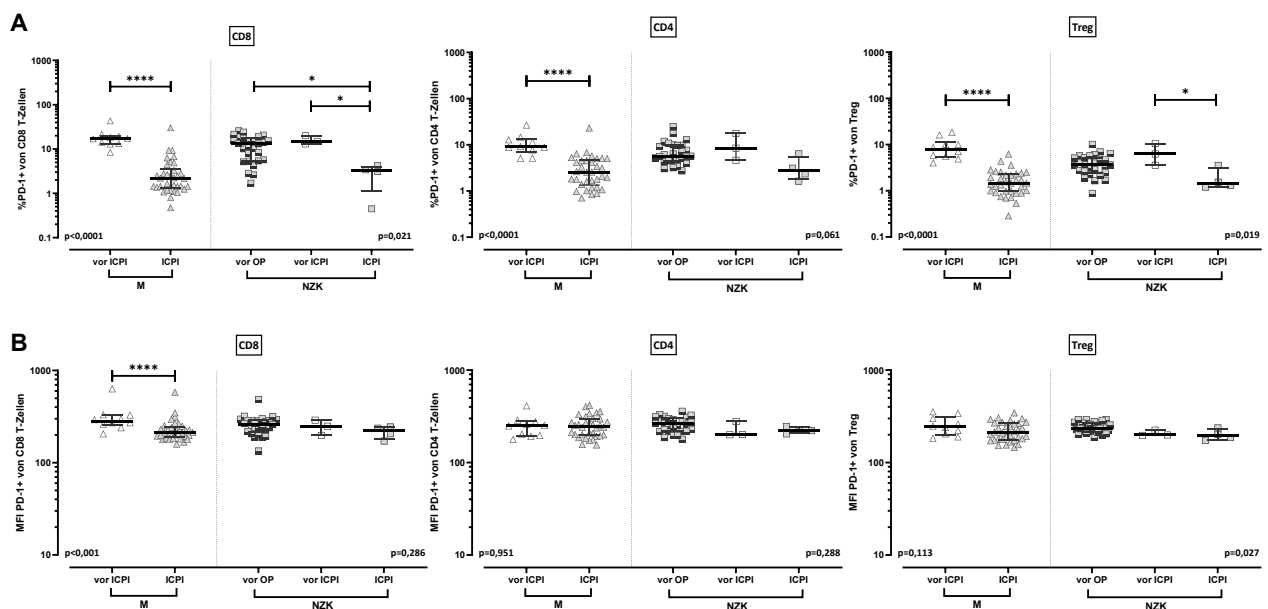


Abbildung 20 Vergleich der Anteile an PD-1+ und der MFI von PD-1 bei den Immunzellen im Blut von Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom in Abhängigkeit von der Therapie. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der PD-1+ Zellen (A) und die mittlere Fluoreszenzintensität MFI (B) von PD-1 von CD8 T-Zellen (links), CD4 T-Zellen (Mitte) und regulatorischen T-Zellen (Treg; rechts). Der prozentuale Anteil an PD-1+ Zellen und die MFI von PD-1 wird zwischen den Personen mit Melanom (M) „vor ICPI“ (n=10), unter „ICPI“ (n=34), Personen mit Nierenzellkarzinom (NZK) vor operativer Entfernung des Tumors „vor OP“ (n=27), Personen mit Nierenzellkarzinom „vor ICPI“ (n=3), Personen mit Nierenzellkarzinom unter „ICPI“ (n=4) jeweils verglichen. Die Querbalken repräsentieren jeweils Median und Interquartilsabstand (IQR). Es wurde ein Mann Whitney Test im Kollektiv Melanom und ein Kruskal-Wallis Test mit Dunn's post Test im Nierenzellkarzinom durchgeführt. Signifikante Unterschiede im post-Test sind durch Sternsymbole markiert (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). In die Auswertung eingeschlossen wurden Proben mit mindestens 15000 T-Zellen pro Messung.

Für das Immun-Checkpointmolekül BTLA ließen sich zwischen den Immunzellsubpopulationen keine signifikanten Unterschiede feststellen (Daten nicht gezeigt).

Für Personen mit Melanom unter ICPI gegenüber vor ICPI ließ sich ein erhöhter Anteil, kürzlich proliferierter Ki-67+ Treg detektieren ($p = 0,045$, Abbildung 21A), wobei sich die restlichen Subgruppen ohne signifikante Unterschiede darstellten (Daten nicht gezeigt). CD4 T-Zellen und

Treg bei Personen mit NZK unter ICPI wiesen einen höheren Anteil CD39+ Zellen als Personen vor OP ($p=0,013$, $p=0,017$; Abbildung 21B). Weitere Unterschiede bezüglich CD39 ließen sich nicht feststellen (Daten nicht gezeigt).

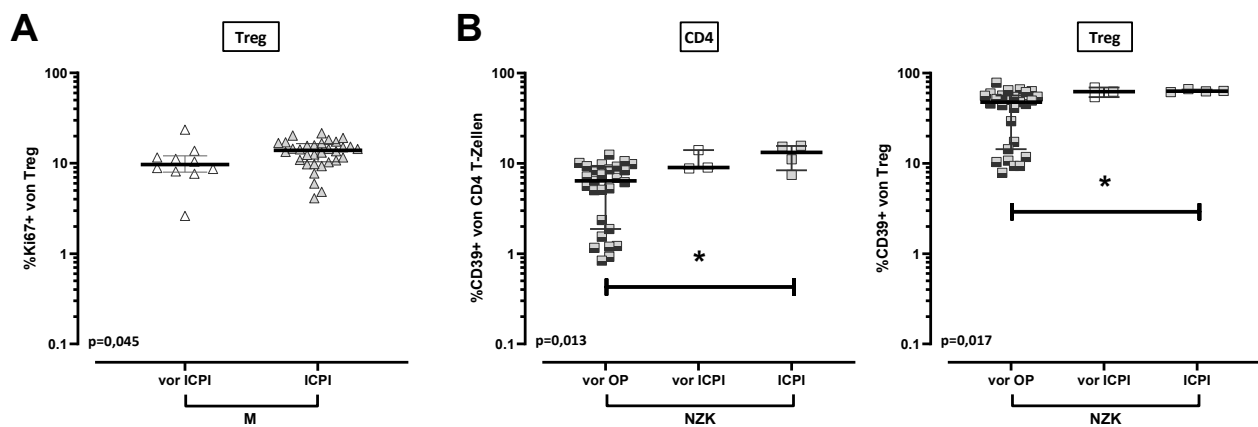


Abbildung 21 Auszug aus dem Vergleich der Anteile an Ki67+ und CD39+ Immunzellen im Blut von Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom in Abhängigkeit von der Therapie. (A) Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Ki67+ Zellen regulatorischen T-Zellen (Treg) bei Personen mit Melanom „vor ICPI“ (n=10) und Personen mit Melanom unter „ICPI“ (n=34). Es wurde ein Mann-Whitney Test durchgeführt. In die Auswertung eingeschlossen wurden Personen mit mindestens 10000 T-Zellen pro Messung. **(B)** Dargestellt ist der prozentuale Anteil der CD39+ Zellen von CD4 T-Zellen und regulatorischen T-Zellen (Treg) bei den Personen mit Nierenzellkarzinom „vor OP“ (n=27), Personen mit Nierenzellkarzinom „vor ICPI“ (n=3), Personen mit Nierenzellkarzinom unter „ICPI“ (n=4). Es wurde ein Kruskal-Wallis Test mit Dunn's post Test durchgeführt. Signifikante Unterschiede im post-Test sind durch Sternsymbole markiert (* $p<0,05$). In die Auswertung eingeschlossen wurden Proben mit mindestens 15000 T-Zellen pro Messung. Gezeigt sind jeweils Median und Interquartilsabstand (IQR).

5.3.3 Vergleich der Immunzellen von Personen mit Melanom in Abhängigkeit des Therapieansprechens

Die folgenden Punkte wurden Personen mit Melanom in Abhängigkeit des Therapieansprechens betrachtet. Hierzu wurden die immunologischen Parameter bei Personen mit und ohne Progress verglichen. 13 Personen (nach AJCC 2017 Stadium IV n=11; Aderhautmelanom n=2) mit Progress wurden in dieser Auswertung der Gruppe Non-Responder zugeteilt. In der Gruppe der Responder (n=34) fanden sich 22 Personen (Stadium nach AJCC 2017; IV n=10; IIIC=7; IIIB=5) mit dem Krankheitsstatus „kein Hinweis auf Erkrankung“, eine mit Regression (Stadium IV nach AJCC 2017), eine mit Ansprechen (Stadium IV nach AJCC 2017), zwei mit gemischtem Ansprechen (Stadium IV nach AJCC 2017) und acht mit stabiler Erkrankung (Stadium nach AJCC 2017; IV n=5; IIIC=3). Die mediane Nachbeobachtungszeit der Personen mit Melanom betrug 28 Monate mit einem Minimum von einem Monat und einem Maximum von 33 Monaten.

Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Alters oder des Geschlechts zwischen Non-Respondern und Respondern feststellen (Tabelle 27). Im Median befanden sich die untersuchten Personen im 7. Therapiezyklus wobei für Personen ohne Therapieansprechen Proben zwischen dem 1. und 38. Zyklus sowie für Personen mit Therapieansprechen Proben zwischen dem

2. und 34. Therapiezyklus vorlagen. Ein Unterschied im CMV oder VZV-T-Zell-Status ließ sich ebenfalls nicht feststellen.

Tabelle 27 Übersicht Personen mit Melanom in Abhängigkeit vom Therapieansprechen

	Non-Responder	Responder	p
n	13	34	
Alter (Jahre) [MW±StabW]	63,75±20,07	61,76±13,43	0,439 ¹
Geschlecht [n; %]			
weiblich	5 (38,5%)	12 (35,3%)	>0,999 ²
männlich	8 (61,5%)	22 (64,7%)	
Therapiezyklen [Median; Min; Max]	7 (1-38)	7 (2-34)	
T-Zell Analyse [n]			
CMV positiv [n (%)]	7 (63,6%)	16 (61,5%)	0,904 ²
VZV positiv [n (%)]	9 (81,8%)	21 (80,8%)	0,940 ²
Stadium nach AJCC 2017			
IV	11 (zzgl. 2 Aderhautmelanom)	19	
IIIC		10	
IIIB		5	

¹ungepaarter t-Test, ²exakter Test nach Fisher

Die generelle Leukozytenzahl zeigte keine signifikanten Unterschiede. Bemerkenswert war jedoch, dass bei Personen ohne Therapieansprechen eine Tendenz zu geringeren Zellzahlen bestand, die bei der Lymphozytenzahl statistische Signifikanz erreichte (p=0,039; Abbildung 22A). Non-Responder zeigten auch einen prozentual signifikant geringeren Anteil an Lymphozyten (p=0,042; Abbildung 22B). Für die restlichen T-Zellsubpopulationen ließen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen.

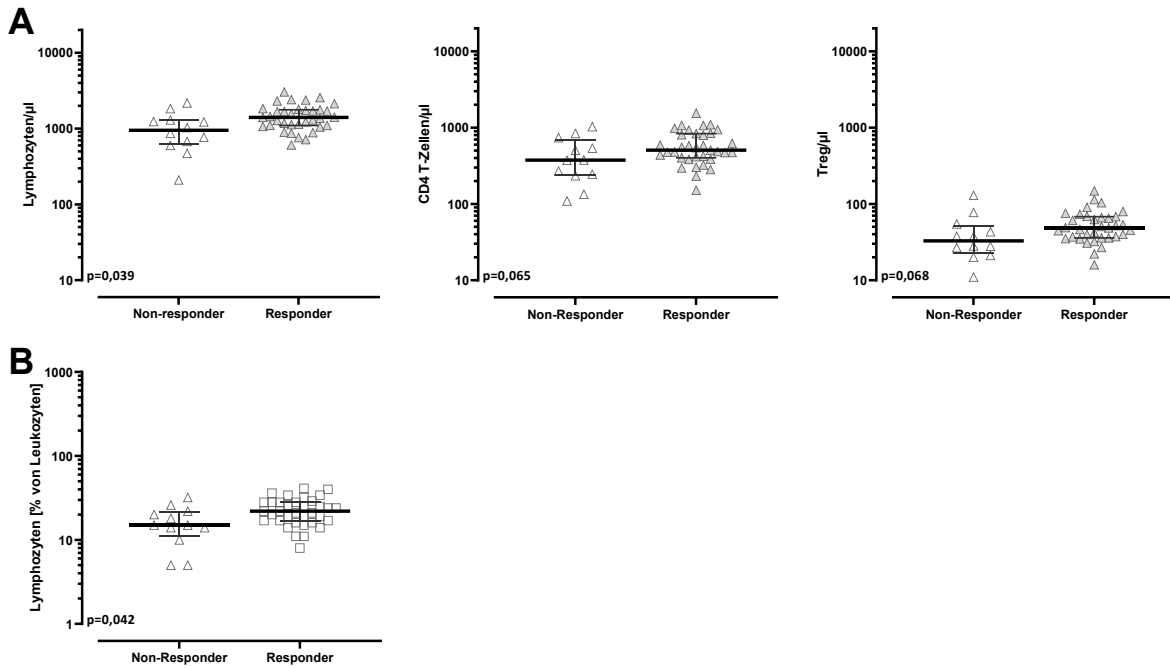


Abbildung 22 Auszug aus dem Vergleich der absoluten sowie relativen Immunzellzahlen von Personen mit Melanom in Abhängigkeit des Therapieansprechens. Dargestellt ist die absolute Immunzell-Zahl pro µl Vollblut der (A) Lymphozyten, CD4 T-Zellen und regulatorischen T-Zellen (Treg) sowie die relative Zellzahl (B) von Lymphozyten (% von Leukozyten) von Non-Responder (n=13) und Responder (n=34). Die Querbalken repräsentieren jeweils Median und Interquartilsabstand (IQR). Es wurde ein Mann-Whitney Test durchgeführt.

Bezüglich des Differenzierungsstatus zeigte sich in Abhängigkeit vom Therapieansprechen ein signifikant geringerer Anteil an EM CD8 T-Zellen bei Non-Respondern im Vergleich zu Respondern ($p=0,011$). Der geringere Anteil an EM CD8 T-Zellen schien mit einem erhöhten Anteil an TEMRA CD8 T-Zellen verbunden zu sein (Abbildung 23). Für CM CD8 T-Zellen und die restlichen Differenzierungskompartimente ließen sich keine signifikanten Unterschiede detektieren (Daten nicht gezeigt).

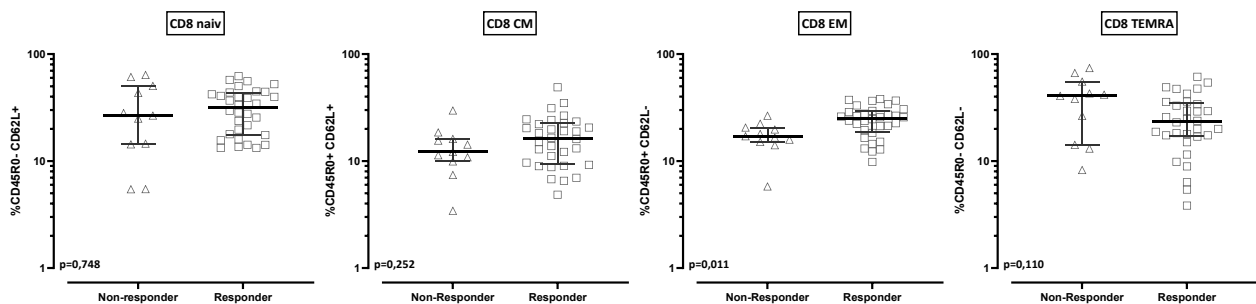


Abbildung 23 Auszug aus dem Vergleich der Differenzierung der Immunzellen im Blut von Personen mit Melanom in Abhängigkeit vom Therapieansprechen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Differenzierungssubpopulationen von CD8 T-Zellen. In den jeweiligen Spalten sind die Differenzierungssubpopulationen aufgeführt, definiert als naïv (%CD45R0-/CD62L+), „central memory“ CM (% CD45R0+/CD62L+), „effector memory“ (CD45R0+/CD62L-) und „effector memory with re-expression of CD45RA“ TEMRA (CD45R0-/CD62L-). Der prozentuale Anteil an naiven, CM, EM, TEMRA CD8 T-Zellen wurde zwischen Non-Respondern (n=13) und Respondern (n=34) verglichen. Die Querbalken repräsentieren

jeweils Median und Interquartilsabstand (IQR). Es wurde ein Mann-Whitney Test durchgeführt. In die Auswertung eingeschlossen wurden Proben mit mindestens 15000 T-Zellen pro Messung.

Bezüglich der Immun-Checkpointmoleküle ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der CTLA-4 Expression in Abhängigkeit vom Therapieansprechen nachweisen (Daten nicht gezeigt). Auch bezüglich des prozentualen Anteils PD-1+ T-Zellen wiesen Personen mit Melanom über alle Immunzell-Subpopulationen keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit des Therapieansprechens auf (Daten nicht gezeigt). Besonders hervorzuheben ist jedoch, dass Non-Responder eine signifikant höhere PD-1 Expression auf CD4 T-Zellen präsentierten ($p=0,014$). Ebenso wiesen Non-Responder eine signifikant höhere PD-1 Expression auf den Treg auf ($p=0,023$). Für CD8 T-Zellen stellten sich keine signifikanten Unterschiede dar (Abbildung 24). Auch für BTLA, Ki67 und CD39 ließen sich keine signifikanten Unterschiede für den Anteil an positiven CD8, CD4 und regulatorischen T-Zellen zwischen Non-Respondern und Respondern bei Personen feststellen (Daten nicht gezeigt).

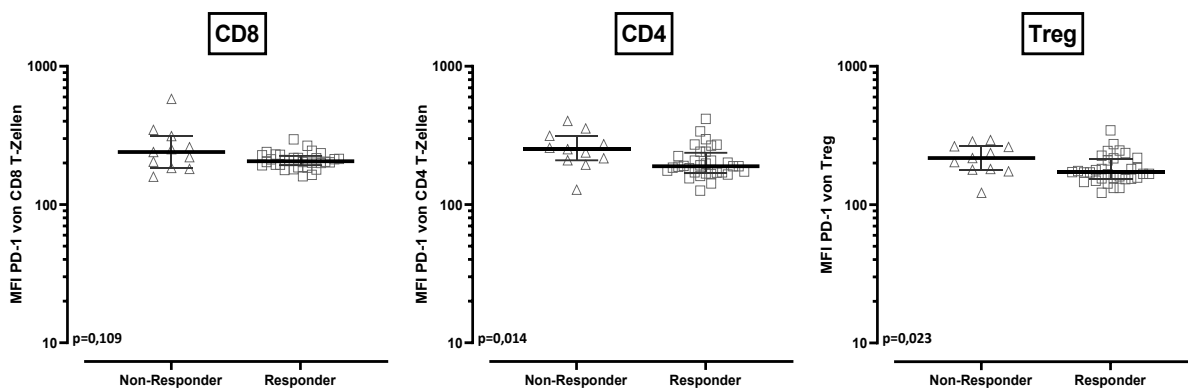


Abbildung 24 Vergleich der MFI von PD-1 bei den Immunzellen im Blut von Personen mit Melanom in Abhängigkeit vom Therapieansprechen. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität MFI (B) von PD-1 von CD8 T-Zellen (links), CD4 T-Zellen (Mitte) und regulatorischen T-Zellen (Treg; rechts). Der prozentuale Anteil an PD-1+ Zellen und die MFI von PD-1 wird zwischen den Non-Responder ($n=11$) und Responder ($n=30$) jeweils verglichen. Die Querbalken repräsentieren jeweils Median und Interquartilsabstand (IQR). Es wurde ein Mann-Whitney Test durchgeführt. In die Auswertung eingeschlossen wurden Proben mit mindestens 15000 T-Zellen pro Messung.

In der weiteren Betrachtung der Antigen-spezifischen T-Zellen wurden lediglich die normierten Frequenzen aufgeführt. Für die normierten Frequenzen der CMV- und VZV-reaktiven CD4 und CD8 T-Zellen sowie nach polyklonalem Stimulus, für Personen ohne und mit Therapieansprechen, ließen sich keine signifikanten Unterschiede darstellen (Daten nicht gezeigt). Die CTLA-4 MFI auf Antigen-reaktiven CD4 T-Zellen wies zwischen Non-Respondern und Respondern keine signifikanten Unterschiede auf. Interessanterweise zeigte sich bei Personen mit Therapieansprechen insgesamt eine Tendenz zu einem höheren Median der CTLA-4 MFI, im Vergleich zu Personen ohne Therapieansprechen. Nach polyklonalem Stimulus zeigte sich eine signifikant höhere CTLA-4 MFI auf CD8 T-Zellen bei Personen mit Therapieansprechen ($p=0,002$; Abbildung 25A). Reaktive CD4 und CD8 T-Zellen wiesen hingegen keine signifikanten Unterschiede in der PD-1 MFI oder dem Anteil der CD39+ Zellen auf (Daten nicht gezeigt).

CMV-reaktive CD4 T-Zellen zeigten keine Unterschiede in ihrer Zytokinexpression zwischen Non-Respondern und Respondern. Die VZV-reaktiven CD4 T-Zellen von Non-Respondern zeigten signifikant mehr Zellen welche alleinig IFN γ + (p=0,047) oder IFN γ +/IL-2+ (p=0,010) waren. Nach polyklonaler Stimulation wiesen die reaktiven CD4 T-Zellen von Non-Respondern signifikant weniger Zellen auf, welche nur TNF α + waren (p=0,014) und signifikant mehr, welche nur IFN γ +, IFN γ +/TNF α + sowie IFN γ +/IL-2+ waren (p=0,005; p=0,022; p=0,005; Abbildung 25B)). Non-Responder zeigten gegenüber Respondern einen erhöhten Anteil an IFN γ + (p=0,046) bei geringerem Anteil von IFN γ +/TNF α + (p=0,004) sowie gleichzeitig erhöhtem Anteil von IFN γ +/IL-2+ CMV-reaktiven CD8 T-Zellen (p=0,037). Nach polyklonaler Stimulation ließen sich keine Unterschiede in der Zytokinexpression der CD8 T-Zellen detektieren (Abbildung 25B).

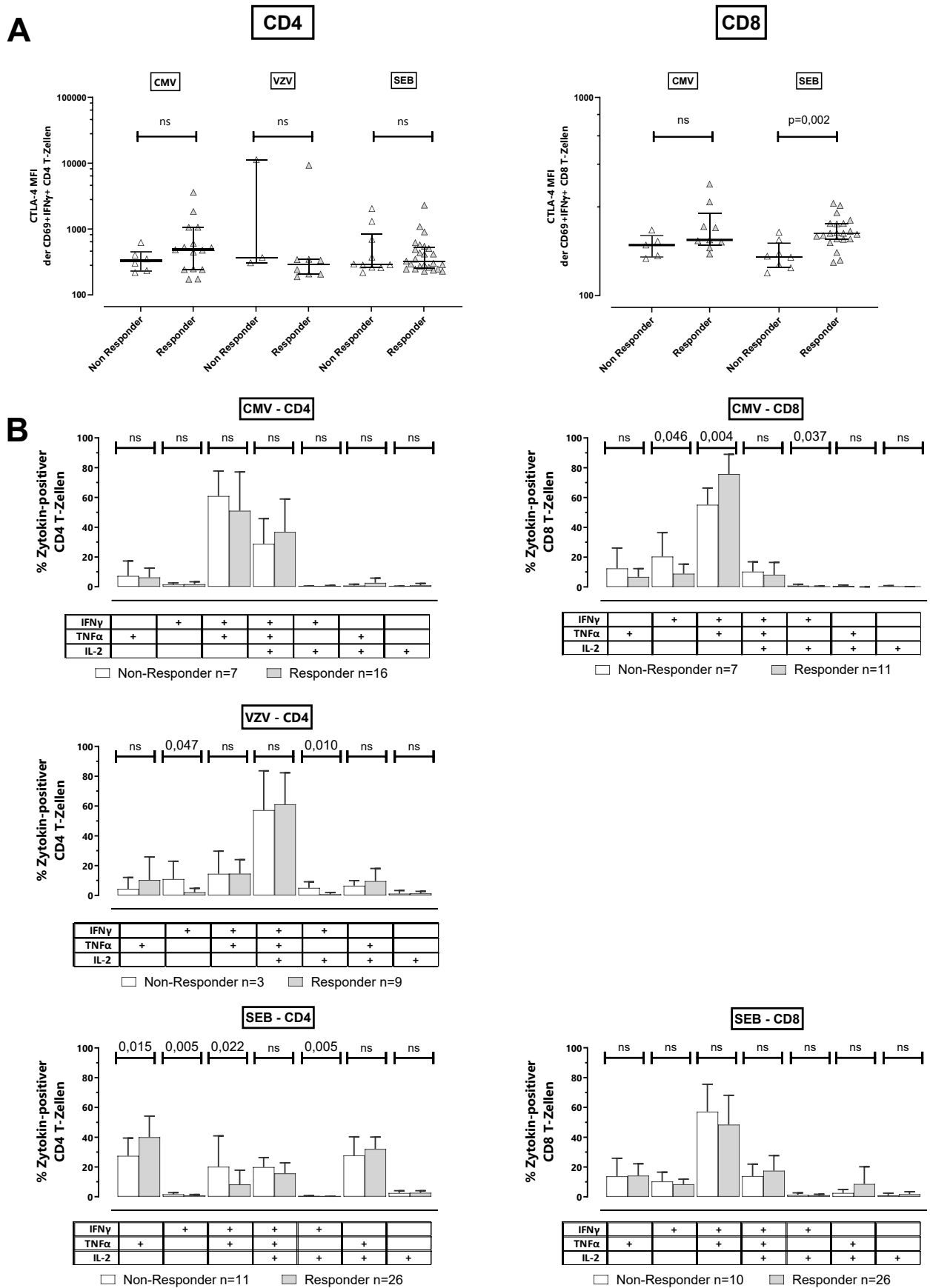


Abbildung 25 Vergleich der Expression von CTLA-4 auf reaktiven CD4 und CD8 T-Zellen und der Zytokinprofile der Antigen-spezifischen CD4 und CD8 T-Zellen bei Personen mit Melanom in Abhängigkeit vom Therapieansprechen. (A) Dargestellt ist die MFI von CTLA-4 auf CMV, VZV und SEB reaktiven CD4 und CD8 T-Zellen

verglichen zwischen den Non-Respondern (CD4 CMV n=6, VZV n=3, SEB n=10, CD4; CD8 CMV n=5, SEB n=21) und Respondern (CD4 CMV n=15, VZV n=8, SEB n=25; CD8 CMV n=9, SEB n=21). Die Querbalken repräsentieren jeweils Median und Interquartilsabstand (IQR). In die Auswertung eingeschlossen wurden Proben mit mehr als 20 CD69/IFN γ positive Zellen im Stimulus aber weniger als 20 CD69/IFN γ positive Zellen in der Kontrolle pro Messung. **(B)** In den Balkendiagrammen ist der prozentuale Anteil der sieben Populationen mit unterschiedlicher Zytokinexpression dargestellt (IFN γ -/TNF α -/IL-2-, IFN γ + /TNF α -/IL-2-, IFN γ + /TNF α + /IL-2-, IFN γ + /TNF α + /IL-2+, IFN γ - /TNF α -/IL-2+, IFN γ - /TNF α + /IL-2+, IFN γ + /TNF α -/IL-2+). Diese sind jeweils für CMV, VZV und SEB reaktive CD4 T-Zellen und CMV und VZV reaktive CD8 T-Zellen dargestellt. Es wurden Proben eingeschlossen die mindestens 30 Zytokin positive Events pro Messung aufweisen. Einschlusskriterium waren mindestens 10000, oder mehr als 3000 Zellen mit eindeutigem Ergebnis der Zytokinpositivität von CD8 und CD4 T-Zellen. Es wurde ein Mann Whitney Test **(A)** und ein ungepaarter t-Test durchgeführt **(B)**.

5.3.4 Vergleich der Immunzellen von Personen mit Melanom in Abhängigkeit von den ICPI-Therapie-assoziierten autoimmunen Nebenwirkungen

In dieser Studie traten bei 11 Personen unter Immun-Checkpoint-Inhibitor-Therapie autoimmune Nebenwirkungen auf, welche der Therapie zugeschrieben wurden. So kam es zu fünf Hypophysitiden, drei Alveolitiden/Pneumonitiden, zwei Pankreatiden und einer Hepatitis sowie einer Colitis. Drei Personen wiesen jeweils zwei Nebenwirkungen aus o.g. Spektrum auf (Kombination Hypophysitis/Hepatitis, Hypophysitis/Colitis oder Hypophysitis/Pneumonitis). Sechs Personen waren unter Therapie mit Nivolumab, fünf unter Therapie mit Pembrolizumab. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Altersstruktur und Geschlechterverteilung zwischen Personen mit oder ohne Nebenwirkungen. Der Median der Therapiezyklen betrug sieben, in der Vergleichsgruppe drei. Von allen in die Studie eingeschlossenen Personen, lagen Proben zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses und im weiteren Verlauf vor. Es wurde jeweils die früheste verfügbare Messung jeder Person in die Auswertung eingeschlossen. Alle 11 Personen mit autoimmunen Nebenwirkungen befanden sich im Stadium IV nach AJCC 2017, davon zwei Personen mit Aderhautmelanom. In der Vergleichsgruppe befanden sich 21 Personen im Stadium IV, 10 Personen im Stadium IIIC und fünf Personen im Stadium IIIB (Tabelle 28). Bezüglich des CMV-T-Zell-Status ließen sich keine Unterschiede feststellen. Der Anteil der VZV-T-Zell-positiven war in der Gruppe der Personen ohne autoimmune Nebenwirkungen geringer jedoch ohne Signifikanz.

Tabelle 28 Übersicht Personen mit Melanom in Abhängigkeit vom Auftreten von autoimmunen Nebenwirkungen

	Autoimmune Nebenwirkungen	Keine autoimmune Nebenwirkungen	p
n	11	36	
Alter (Jahre) [MW \pm StabW]	63,71 \pm 17,88	61,83 \pm 14,54	0,724 ¹
Geschlecht [n; %]			0,282 ²
	weiblich	2 (18,2%)	15 (41,7%)
	männlich	9 (81,8%)	21 (58,3%)
Therapiezyklen [Median (Min-Max)]	7 (0-38)	3 (0-34)	
T-Zell Analyse [n]	9	33	
CMV positiv [n (%)]	5 (55,6%)	19 (57,6%)	0,914 ²
VZV positiv [n (%)]	3 (33,3%)	21 (63,6%)	0,104 ²
Tumorstadium nach AJCC 2017			
	IV	11 (zzgl. 2 Aderhautmelanome)	21

	Autoimmune Nebenwirkungen	Keine autoimmune Nebenwirkungen	p
	IIIC	10	
	IIIB	5	

Autoimmune Nebenwirkungen

Hypophysitis n=2
Pankreatitis=2
Pneumonitis=2
Alveolitis=1
Colitis=1
Hypophysitis/Colitis n=1
Hypophysitis/Hepatitis n=1
Hypophysitis/Pneumonitis/
Diabetes mellitus n=1

¹ungepaarter t-test; ²exakter Test nach Fisher

Bezüglich der absoluten sowie relativen Zellzahlen sowie der Differenzierung der Zellen ließen sich keine auffälligen Unterschiede zwischen Personen mit und ohne autoimmune Nebenwirkungen (AI NW) detektieren (Daten nicht gezeigt).

Personen mit AI NW zeigten jedoch einen erhöhten Anteil an CTLA4+ CD8 T-Zellen gegenüber Personen ohne AI NW ($p=0,037$). Für CD4 und Treg ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen (Abbildung 26).

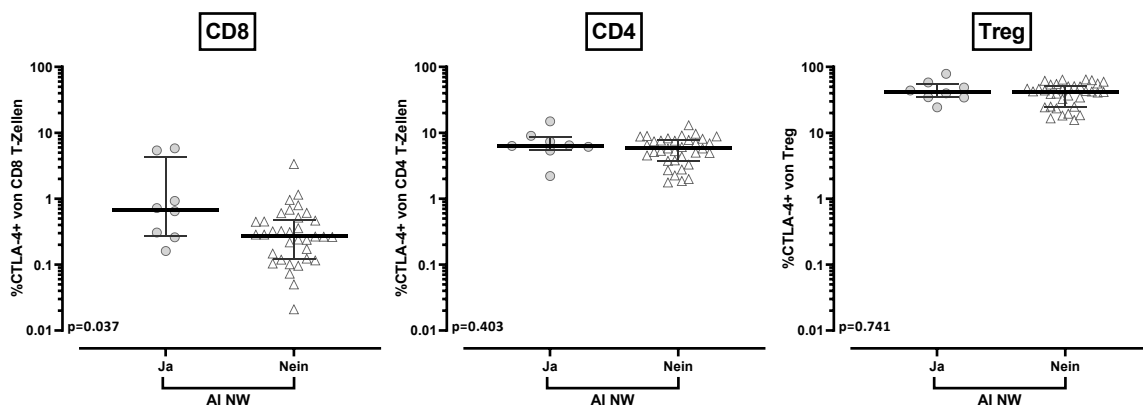


Abbildung 26 Vergleich der Anteile an CTLA4+ Immuzellen im Blut von Personen mit Melanom in Abhängigkeit vom Auftreten von autoimmunen Nebenwirkungen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der CTLA4+ Zellen von CD8 T-Zellen (links), CD4 T-Zellen (Mitte) und regulatorischen T-Zellen (Treg; rechts). Der prozentuale Anteil an CTLA4+ Zellen wird zwischen den Personen mit Melanom unter ICPI-Therapie mit AI NW (n=8), Personen unter ICPI-Therapie ohne AI NW (n=35) verglichen. Die Querbalken repräsentieren jeweils Median und Interquartilsabstand (IQR). Es wurde ein Mann-Whitney Test durchgeführt. In die Auswertung eingeschlossen wurden Proben mit mindestens 15000 T-Zellen pro Messung.

Bei Betrachtung von CD39 zeigten sich nicht nur Tendenzen für einen geringeren Anteil an CD39+ CD8 T-Zellen bei Personen mit AI NW, sondern auch ein signifikant geringerer Anteil an CD39+ CD4 T-Zellen und Treg ($p=0,004$ und $p=0,001$; Abbildung 27).

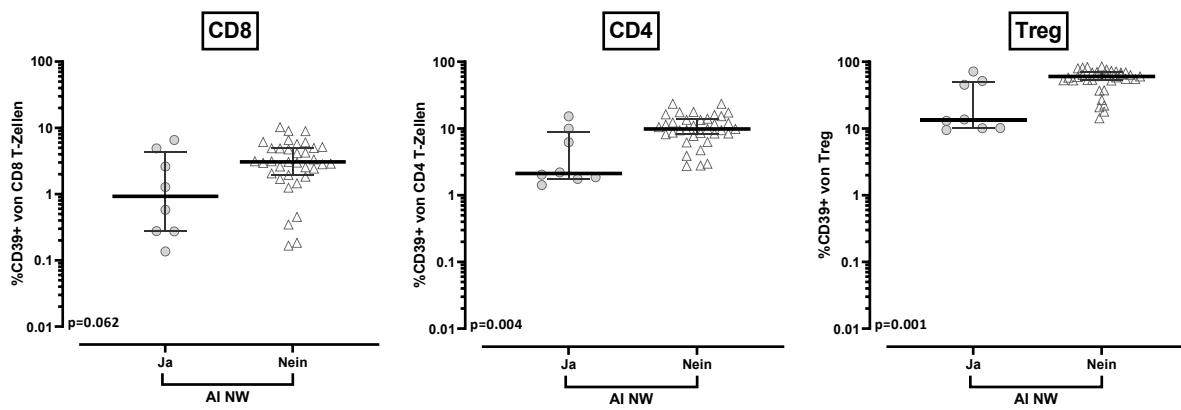


Abbildung 27 Vergleich der Anteile an CD39+ Immunzellen im Blut von Personen mit Melanom und gesunden Kontrollpersonen in Abhängigkeit vom Auftreten von autoimmunen Nebenwirkungen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der CD39+ Zellen von CD8 T-Zellen (links), CD4 T-Zellen (Mitte) und regulatorischen T-Zellen (Treg; rechts). Der prozentuale Anteil an CD39+ Zellen wird zwischen den Personen unter Therapie mit (n=8) und ohne AI NW (n=35) verglichen. Die Querbalken repräsentieren jeweils Median und Interquartilsabstand (IQR). Es wurde ein Mann-Whitney Test durchgeführt. In die Auswertung eingeschlossen wurden Personen mit mindestens 15000 T-Zellen pro Messung.

Hinsichtlich PD-1, Ki67 und BTLA waren keine signifikanten Unterschiede detektierbar. Ebenso ließen sich keine Unterschiede in der Frequenz Antigen-spezifischer bzw. SEB-reaktiver T-Zellen nachweisen (Daten nicht gezeigt). Bezüglich des Zytokinexpressionsprofils zeigten sich bei Personen mit AI NW signifikant mehr CMV-reaktive CD8 T-Zellen TNFα+ (p<0,001). Es bestand eine Tendenz zu einem geringeren Anteil an IFNγ+/TNFα+ CMV-reaktiven CD8 T-Zellen, sowie geringeren Anteil an IL-2+ Zellen bei Personen mit autoimmunen Nebenwirkungen. Der Anteil an TNFα+/IL-2+ CD4 T-Zellen war nach polyklonalem Stimulus in der Gruppe der Personen mit autoimmunen Nebenwirkungen geringer (p=0,016; Abbildung 28).

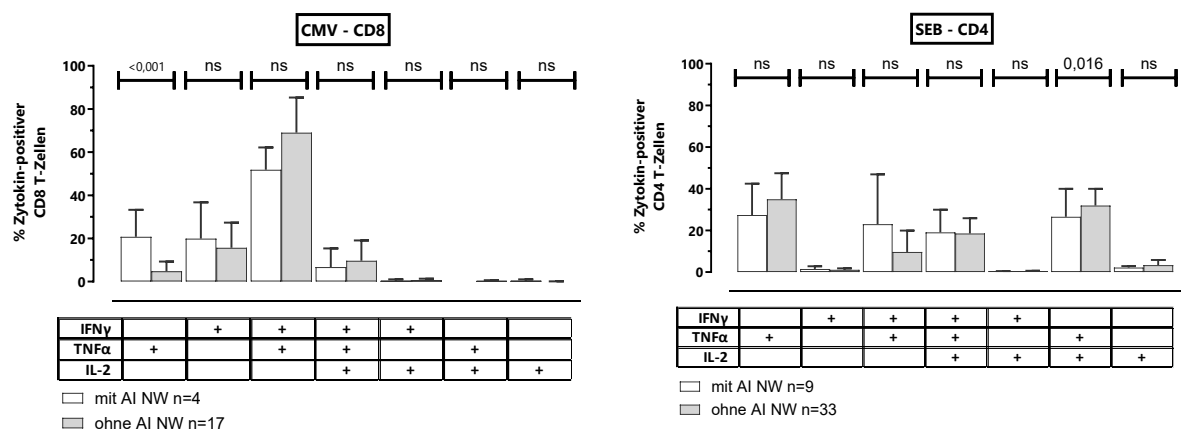


Abbildung 28 Vergleich der Zytokinprofile der CMV, VZV und SEB reaktiven CD4 und CD8 T-Zellen bei Personen mit Melanom in Abhängigkeit vom Auftreten von autoimmunen Nebenwirkungen. In den Balkendiagrammen ist der prozentuale Anteil der sieben Populationen mit unterschiedlicher Zytokinexpression dargestellt (IFNγ-/TNFα-/IL-2-, IFNγ+/TNFα-/IL-2-, IFNγ+/TNFα+/IL-2-, IFNγ+/TNFα+/IL-2+, IFNγ+/TNFα-/IL-2+, IFNγ-/TNFα-/IL-2+, IFNγ-/TNFα+/IL-2+). Diese sind jeweils für CMV, VZV und SEB reaktive CD4 T-Zellen und CMV und VZV reaktive CD8 T-Zellen dargestellt. Es wurden Proben eingeschlossen die mindestens 30 Zytokin positive Events pro Messung aufweisen. Einschlusskriterium waren mindestens 10000, oder mehr als 3000 Zellen mit eindeutigem Ergebnis der Zytokinpositivität von CD8 und CD4 T-Zellen. Es wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt.

5.3.5 Vergleich der Immunzellen von Personen mit Melanom im Therapieverlauf

Nachdem sich Unterschiede in Zellzahl und funktionellen Markermolekülen bei Personen mit Melanom im Vergleich zu gesunden Kontrollen detektieren ließen, wurden die immunologischen Parameter im Therapieverlauf untersucht.

Es konnten zehn Personen mit Melanom (M1-M10) vor und im Verlauf der ICPI-Therapie eingeschlossen werden (Tabelle 29). Diese Subgruppe war mit einem mittleren Alter von $45,0 \pm 4,4$ Jahren jünger als das gesamte Kollektiv der Personen mit Melanom. Der Anteil der Frauen betrug 40%. Fünf Personen waren im Stadium IV, vier Personen im Stadium IIIC und eine im Stadium IIIB nach AJCC 2017. Sieben Personen erhielten eine Therapie mit Pembrolizumab, drei Personen eine Kombinationstherapie mit Ipilimumab und Nivolumab für 4 Zyklen, gefolgt von einer Erhaltungstherapie mit Nivolumab (Nivolumab¹). Die meisten Werte lagen für Zyklus 1 bis 6 vor. Von einer Person (M10) konnten darüber hinaus noch Proben zu späteren Therapiezeitpunkten analysiert werden. M4 wies eine ICPI-Therapie-vermittelte autoimmune Alveolitis auf. M1 wies bei Zyklus 4 eine Kombinationstherapie mit einem BRAF und MEK-Inhibitor auf (Tabelle 29; M1, Zyklus 4, X²).

Für die Darstellung der Daten im Therapieverlauf wurden zwei Varianten gewählt. Zum einen erfolgte die Auftragung der Zeit nach Anzahl der Therapiezyklen. Ein Zyklus wurde bestimmt durch das Intervall der Gabe des ICPI und ließ die verstrichene Zeit in Wochen oder Monaten unbeachtet. Das Intervall der ICPI-Therapie unterschied sich für die verschiedenen PD-1 Inhibitoren. So betrug es für Pembrolizumab drei Wochen zwischen zwei Gaben und für Nivolumab zwei bzw. vier Wochen zwischen zwei Gaben. Während der Studie erschienen neue Empfehlungen für die Gabe von Nivolumab, wodurch das Intervall bei den Personen mit Melanom teilweise auf vier Wochen verlängert wurde. Zyklus 0 beschrieb hiermit den Wert nach initialer Blutabnahme vor Start des 1. Zyklus. Der Wert zu Zyklus 1 entsprach dem Wert nach Blutabnahme vor Gabe von Zyklus 2. Folgende Werte definieren sich entsprechend. Zum anderen wurde die Darstellung der Zeit nach verstrichenen Monaten gewählt. Hierbei wurde das Intervall der Gabe des ICPI unbeachtet gelassen. Der Wert zu Monat 0 ergab sich durch den Wert nach initialer Blutabnahme vor der 1. Gabe des ICPI. Die folgenden Werte zu den jeweiligen Monaten (1, 2, 3, etc.) definierten sich durch die zu diesem Zeitpunkt verfügbaren Werte. Neben der visuellen Darstellung des Verlaufs der absoluten sowie relativen Zellzahl wurden gepaarte nicht-parametrische Tests (Wilcoxon) durchgeführt. Hierbei wurde der Wert zum jeweiligen Zeitpunkt unter Therapie gegenüber dem Vorwert vor Therapie (=Nullwert) verglichen.

Tabelle 29 Übersicht über die Charakteristika der Personen mit Melanom unter ICPI-Therapie im Therapieverlauf

Person mit Melanom	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
Alter (Jahre) [MW±StabW]	45,04±4,39									
Geschlecht [n (%)]										
Weiblich	4 (40,0%)									
Männlich	6 (60,0%)									
Stadium nach AJCC 2017	IV	IV	IIIC	IIIC	IV	IV	IIIB	IIIC	IIIC	IV
Krankheitsstatus										
gemischtes Ansprechen (n=2)	X				X					
Kein Hinweis auf Erkrankung (n=5)				X		X		X	X	X
stabile Erkrankung (n=3)		X	X				X			
ICPI										
Nivolumab (n=3) ¹			X		X					X
Pembrolizumab (n=7)	X	X		X		X	X	X	X	
Autoimmune Nebenwirkung	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein
Vorhandene Messung										
Zyklus 1	X	X			X			X		X
Zyklus 2	X	X		X	X	X		X		
Zyklus 3		X	X		X	X	X	X	X	
Zyklus 4	X ²	X	X	X		X	X	X	X	X
Zyklus 5			X	X		X				
Zyklus 6		X	X				X	X	X	X
Zyklus 8										X
Zyklus 9										X
Zyklus 10										X
Zyklus 15										X
Zyklus 16										X
Zyklus 17										X
Zyklus 18										X
Zyklus 19										X
Zyklus 20										X

¹Initial Kombinationstherapie mit Ipilimumab und Nivolumab für 4 Zyklen, gefolgt von einer Monotherapie mit Nivolumab, ²Umstellung auf eine Kombinationstherapie mit einem BRAF und MEK-Inhibitor

Die absoluten Zellzahlen im Therapieverlauf sind in Abbildung 29 dargestellt. Bei Betrachtung der Verläufe nach Therapiezyklus zeigten sich in der gepaarten nicht-parametrischen Analyse signifikant weniger Lymphozyten in Zyklus 3 und Zyklus 4 gegenüber dem Vorwert (p=0,031; p=0,015). Nach Zyklus 4 waren weniger T-Zellen gegenüber dem Vorwert detektierbar (p=0,031, Abbildung 29).

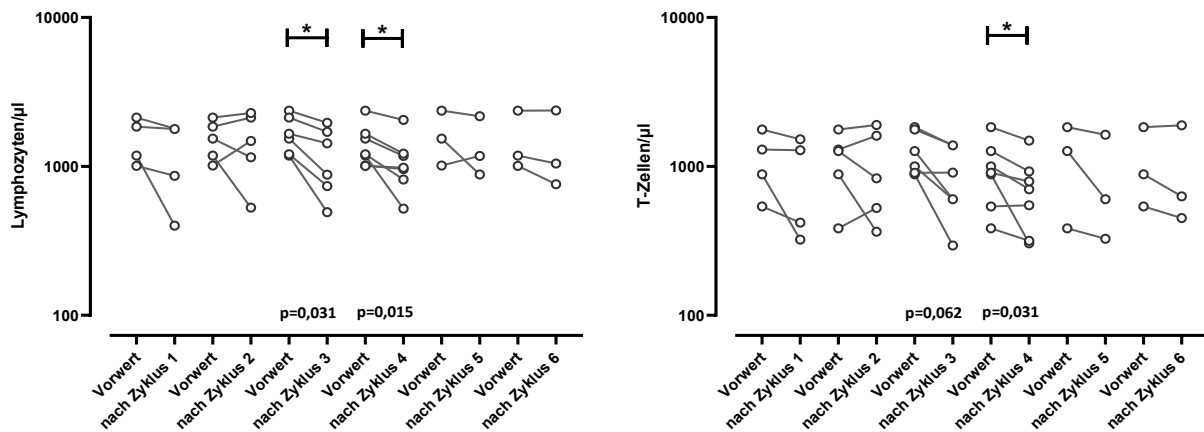


Abbildung 29 Vergleich der absoluten Immunzell-Zahlen im Blut von Personen mit Melanom unter ICPI-Therapie im Vergleich zum Vorwert. Dargestellt ist die absolute Zellzahl von Lymphozyten und T-Zellen von Personen mit Melanom (n=10) unter Therapie in gepaarter Darstellung mit dem Vorwert aufgetragen. Auf der linken Seite wurde die Darstellung der Zeit nach Therapiezyklen gewählt (Zyklus 1 n=4; Zyklus 2 n=5; Zyklus 3 n=6; Zyklus 4 n=7; Zyklus 5 n=3; Zyklus 6 n=3). Auf der rechten Seite die Zeit in Monaten nach Therapiestart (Monat 1 n=2; Monat 2 n=4; Monat 3 n=5; Monat 4 n=2; Monat 5 n=6; Monat 6 n=5; Monat 7 n=1; Monat 8 n=4; Monat 9 n=2). Gezeigt ist die Zellzahl zum jeweiligen Zeitpunkt. Es wurde jeweils ein gepaarter nicht-parametrischer Test (Wilcoxon) durchgeführt. Signifikante Unterschiede sind durch Sternsymbole markiert (*p<0,05). Vorwert bezeichnet den Wert vor Beginn der ICPI-Therapie.

Bei Betrachtung der Verläufe nach der absoluten Zeit in Monaten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, wobei hierbei der Therapiezyklus nicht beachtet wurde (Abbildung 30A). In sämtlichen folgenden Analysen wurde sowohl die verstrichene Zeit in Monaten als auch die Zeit nach Zyklus betrachtet. In dem Vergleich der Auswertungen zwischen Zyklen und Monaten fiel auf, dass die Veränderungen nach Zyklus homogener waren als nach Monaten. Die Auswertung nach Monaten hatte unter Umständen die Schwäche, dass sich Personen zu den Zeitpunkten in unterschiedlichen Zyklen befanden. Um der Medikamentengabe in verschiedenen Intervallen gerecht zu werden, erfolgte im Folgenden eine Beschränkung der Darstellung der Ergebnisse auf die Auswertung nach Zyklus. Die Daten nach Monaten sind im Folgenden nicht mehr gezeigt.

Der Verlauf der absoluten Zellzahlen der CD8, CD4 und regulatorischen T-Zellen verhielt sich ähnlich wie die Gesamt-Lymphozyten und T-Zellen. Nach wenigen Zyklen kam es zur Abnahme der jeweiligen Zellpopulationen (Abbildung 30B). So wiesen Personen mit Melanom unter ICPI-Therapie nach 4 Zyklen signifikant weniger CD8 T-Zellen gegenüber dem Vorwert auf (p=0,016). Die absolute Zahl der CD4 T-Zellen war sowohl nach dem 3. Zyklus als auch dem 4. Zyklus gegenüber dem Vorwert signifikant geringer (p=0,031; p=0,047). Dies galt auch für die Anzahl der Treg, die sich nach dem 3. Zyklus gegenüber dem Vorwert signifikant geringer zeigten (p=0,031). Insgesamt war eine Abnahme der absoluten Zellzahlen in allen Populationen (Lymphozyten, T-Zellen, CD8, CD4 und regulatorischen T-Zellen) im Verlauf unter ICPI-Therapie zu detektieren (Abbildung 30B).

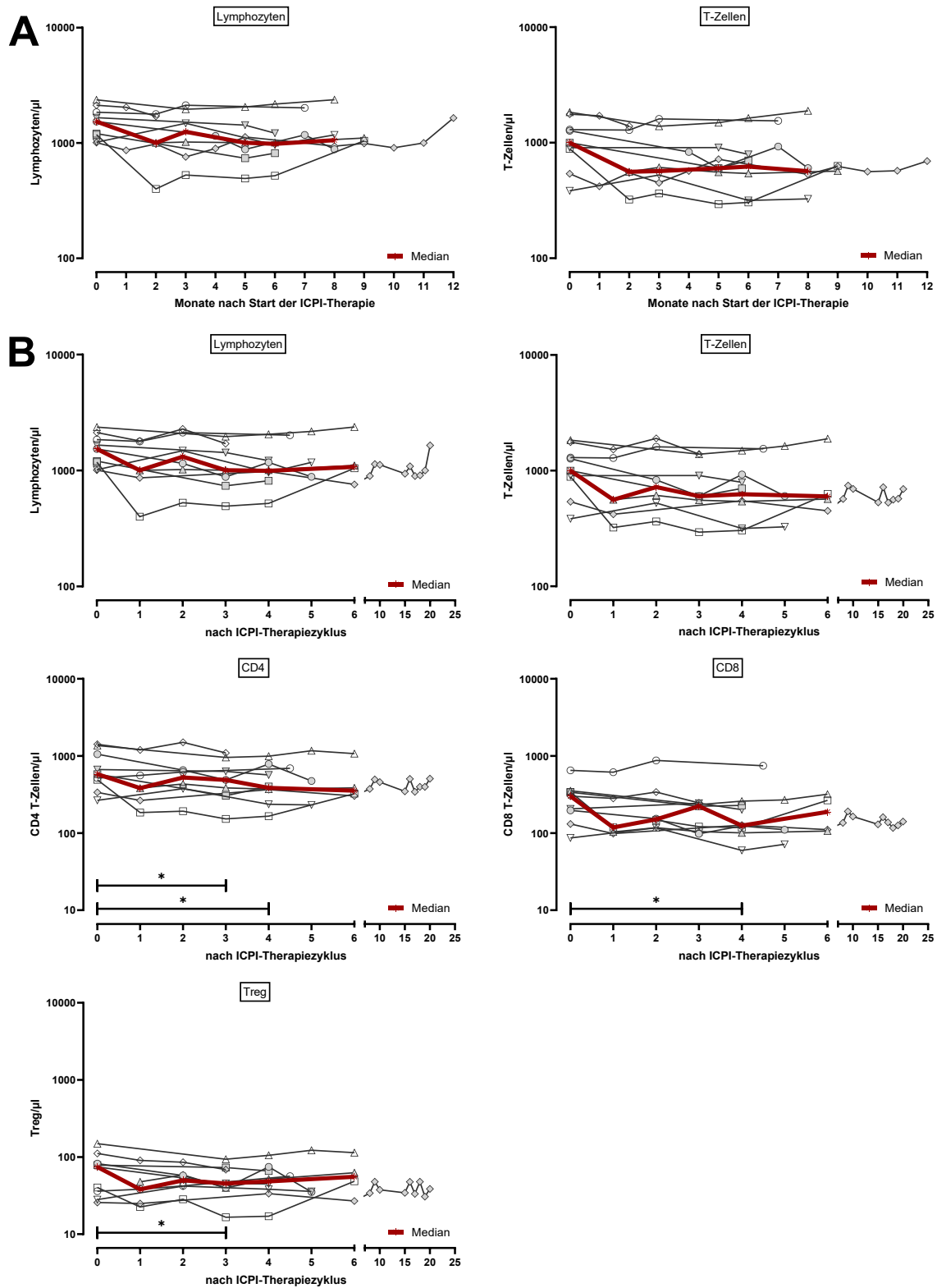


Abbildung 30 Vergleich der absoluten Immunzell-Zahlen im Blut von Personen mit Melanom im Therapieverlauf. Dargestellt ist die absolute Zellzahl von Lymphozyten, T-Zellen, CD8 T-Zellen, CD4 T-Zellen und regulatorischen T-Zellen von Personen mit Melanom (n=10) über die Zeit. Es wurde die Darstellung der Zeit nach der Zeit in Monaten nach Therapiestart als Auszug der Analysen für Lymphozyten und T-Zellen (A) und nach Therapiezyklus für alle Subpopulationen gewählt (B). Gezeigt ist jeweils die Zellzahl zum jeweiligen Zeitpunkt und der Median (rot). Der Median wurde nur bei einem Zeitpunkt, bei dem mindestens 4 Messungen vorlagen ermittelt (nach Zyklus 0, 1, 2, 3, 4, 6 und in Monat 0, 2, 3, 5, 6, 8). Die unterschiedlichen Symbole (Dreieck, Kreis, Quadrat, Raute) stellen Messwerte eines Individuums dar.

Des Weiteren wurden die relativen Immunzell-Zahlen im Blut von Personen mit Melanom unter ICPI-Therapie in Abhängigkeit der ICPI-Zyklen im Verlauf beobachtet. Der prozentuale Anteil an Lymphozyten unter den Leukozyten nahm mit zunehmenden Therapiezyklen ab (Abbildung 31). In der gepaarten Auswertung der relativen Immunzell-Zahlen gegenüber der Vorwerte ließ sich ein signifikant geringerer Anteil an Lymphozyten Zyklus 4 gegenüber dem Vorwert ($p=0,031$) detektieren. Für Gesamt T-Zellen bestand eine Tendenz zu Abnahme im Therapieverlauf, die jedoch keine statistische Signifikanz erzielte (Abbildung 31). Ein signifikant erhöhter Anteil an CD4 T-Zellen (% von T-Zellen) ließ sich im 3. Zyklus gegenüber dem Vorwert darstellen ($p=0,031$). Für die Anteile der CD8 T-Zellen und der regulatorischen T-Zellen ergaben sich keine relevanten Unterschiede.

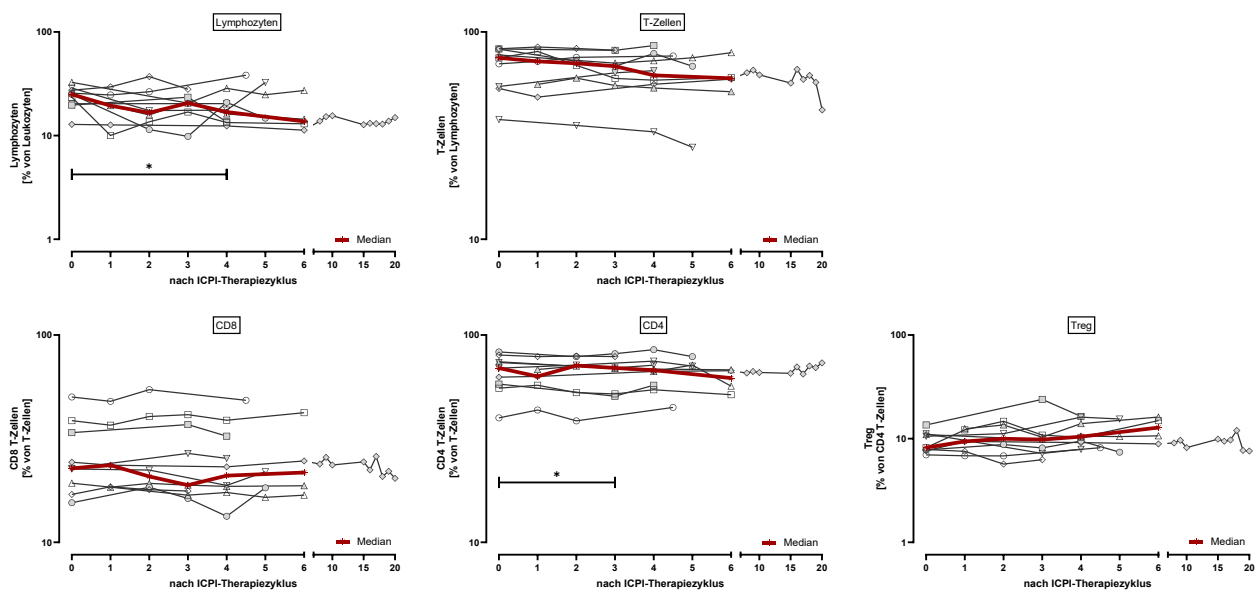


Abbildung 31 Vergleich der relativen Immunzell-Zahlen im Blut von Personen mit Melanom im Therapieverlauf. Dargestellt ist der Anteil der Lymphozytensubpopulationen der untersuchten Personen als Lymphozyten (% Leukozyten), T-Zellen (% von Lymphozyten), CD8 T-Zellen (% von T-Zellen), CD4 T-Zellen (% von T-Zellen), regulatorische T-Zellen (% von CD4 T-Zellen]. Die relative Zellzahl von CD8, CD4 und regulatorischen T-Zellen von Personen mit Melanom ($n=10$) ist gegenüber der Zeit nach Therapiezyklen aufgetragen. Gezeigt ist jeweils die Zellzahl zum jeweiligen Zeitpunkt und der Median (rot). Der Median wurde nur zu dem Zeitpunkt bei dem mindestens 4 Messungen vorlagen ermittelt (nach Zyklus 0, 1, 2, 3, 4, 6 und in Monat 0, 2, 3, 5, 6, 8). Es wurde jeweils ein gepaarter nicht-parametrischer Test (Wilcoxon) durchgeführt. Signifikante Unterschiede sind durch Sternsymbole markiert ($*p<0,05$). Vorwert bezeichnet den Wert vor Beginn der ICPI-Therapie. Die unterschiedlichen Symbole (Dreieck, Kreis, Quadrat, Raute) stellen Messwerte eines Individuums dar.

Bei Betrachtung der Expression der Immun-Checkpointmoleküle bestand in der gepaarten Auswertung zu Zyklus 3 und 4 gegenüber dem Vorwert ein signifikant geringerer Anteil an PD-1+ CD8 ($p=0,016$; $p=0,031$), CD4 ($p=0,031$; $p=0,031$) und regulatorischen T-Zellen ($p=0,031$; $p=0,031$, Abbildung 32A). Zudem kam es nach Beginn der ICPI-Therapie zu einem Abfall der PD-1 MFI sowie der PD-1+ CD8, CD4 und regulatorischen T-Zellen, die auf einem geringeren Niveau verblieb. Im Zyklus 4 ließ sich eine signifikant geringere PD-1 MFI auf CD8 ($p=0,016$), CD4 ($p=0,047$) und regulatorischen T-Zellen ($p=0,031$) gegenüber dem Vorwert nachweisen (Abbildung 32B).

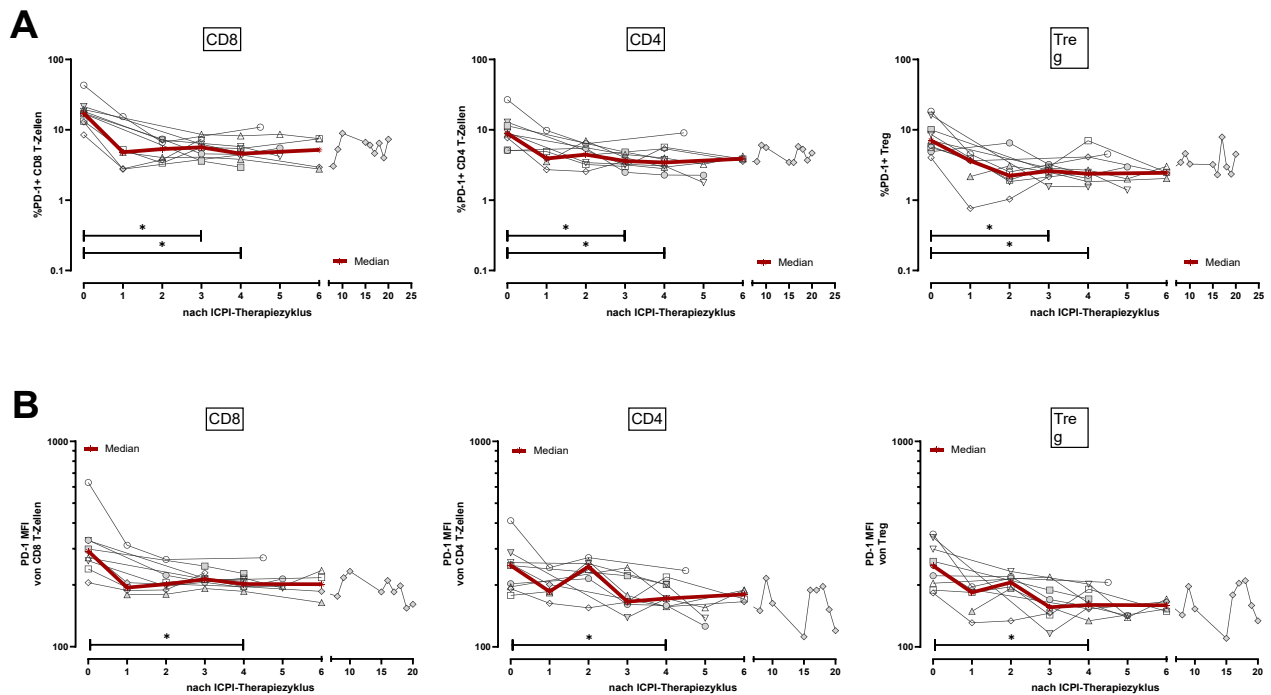


Abbildung 32 Prozentuale Anteile an PD-1+ Zellen und PD-1 Expression von Immunzellen im Blut von Personen mit Melanom im Therapieverlauf. Dargestellt sind die (A) prozentualen Anteile PD-1+ CD8 T-Zellen, CD4 T-Zellen und regulatorischen T-Zellen (Treg) sowie (B) deren mediane Fluoreszenzintensität (MFI) von Personen mit Melanom (M; n=10). Es wurde die Darstellung der Zeit nach ICPI-Therapiezyklus gewählt. Gezeigt ist jeweils der Anteil PD-1+ Zellen bzw. die PD-1 MFI zum jeweiligen Zeitpunkt und der jeweilige Median. Der Median wurde nur zu dem Zeitpunkt bei dem mindestens 4 Messungen vorlagen ermittelt (nach Zyklus 0, 1, 2, 3, 4, 6). Es wurde jeweils ein gepaarter nicht-parametrischer Test (Wilcoxon) durchgeführt. Signifikante Unterschiede sind durch Sternsymbole markiert (* $p < 0,05$). Vorwert bezeichnet den Wert vor Beginn der ICPI-Therapie. Die unterschiedlichen Symbole (Dreieck, Kreis, Quadrat, Raute) stellen Messwerte eines Individuums dar.

Auch für CTLA-4 zeigten sich eindeutige Effekte im Therapieverlauf. So nahm vor allem in der Anfangsphase der Therapie in den ersten ICPI-Therapiezyklen der Anteil an CTLA-4+ CD8 und besonders CD4 und Treg zu. Hier wiesen im gepaarten Vergleich CD4 ($p=0,031$) und Treg ($p=0,031$) im Zyklus 2 gegenüber dem Vorwert einen signifikant erhöhten Anteil auf (Abbildung 33). Dies bestätigt auch die Ergebnisse, die sich in dem Vergleich zwischen Personen mit Melanom vor ICPI-Therapie und unter ICPI-Therapie feststellen ließen (Abbildung 19). Interessanterweise nahm die CTLA-4 MFI auf CD8 und CD4 T-Zellen ab, wobei sich auch hier in der Frühphase die deutlichsten Effekte zeigten. In der gepaarten Auswertung ließ sich eine signifikant geringere CTLA-4 MFI auf CD8 ($p=0,031$) und CD4 T-Zellen ($p=0,031$) in Zyklus 3 gegenüber dem Vorwert feststellen. Der Verlauf der CTLA-4 MFI auf regulatorischen T-Zellen war relativ konstant und zeigt keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 33B).

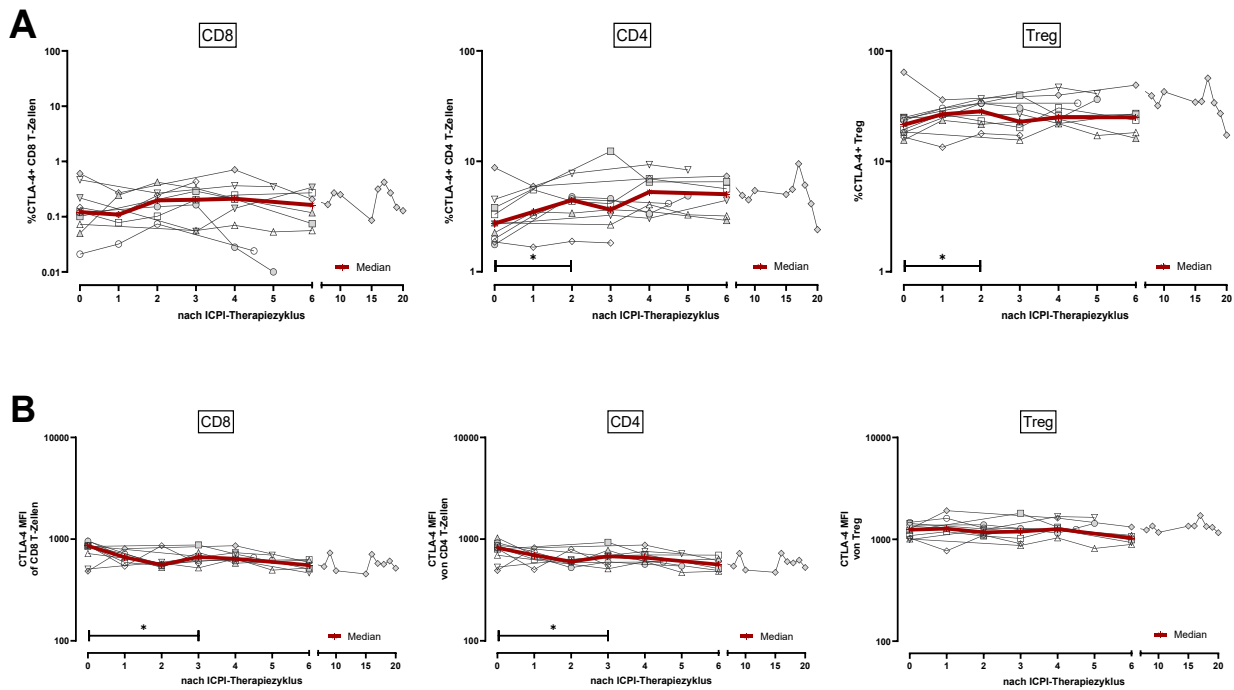


Abbildung 33 Vergleich der prozentualen Anteile an CTLA-4+ Zellen und CTLA-4 Expression von Immunzellen im Blut von Personen mit Melanom im Therapieverlauf. Dargestellt sind die (A) prozentualen Anteile CTLA-4+ CD8 T-Zellen (links), CD4 T-Zellen (Mitte) und regulatorischen T-Zellen (Treg; rechts). Die Anteile an CTLA-4+ Immunzellen im Blut von Personen mit Melanom (M; n=10) wird gegenüber der Zeit aufgetragen. Es wurde die Darstellung der Zeit nach ICPI-Therapiezyklus gewählt. Gezeigt ist jeweils der Anteil CTLA-4+ Zellen zum jeweiligen Zeitpunkt und der Median. Der Median wurde nur zu dem Zeitpunkt bei dem mindestens 4 Messungen vorlagen ermittelt (nach Zyklus 0, 1, 2, 3, 4, 6). Dargestellt ist die (B) MFI von CTLA-4 auf CD8 T-Zellen, CD4 T-Zellen und regulatorischen T-Zellen (Treg). Die CTLA-4 MFI auf den Immunzellen im Blut von Personen mit Melanom (M; n=10) wird gegenüber der Zeit aufgetragen. Es wurde die Darstellung der Zeit nach ICPI-Therapiezyklus gewählt. Gezeigt ist jeweils CTLA-4 MFI auf Zellen zum jeweiligen Zeitpunkt und der Median. Der Median wurde nur zu dem Zeitpunkt bei dem mindestens 4 Messungen vorlagen ermittelt (nach Zyklus 0, 1, 2, 3, 4, 6). Die unterschiedlichen Symbole (Dreieck, Kreis, Quadrat, Raute) stellen Messwerte eines Individuums dar.

Der Anteil an Ki67+ Treg zeigte sich im Vergleich bei Personen mit Melanom unter ICPI-Therapie gegenüber vor ICPI-Therapie signifikant erhöht (Abbildung 21A). Im Therapieverlauf zeigte sich schon nach den ersten Therapiezyklen eine Tendenz zu einem erhöhten Anteil an Ki67+ CD4 T-Zellen. Der Anteil an Ki67+ CD8 und regulatorischen T-Zellen erschien zu Beginn erhöht, im Verlauf dann aber auf ein dem Ausgangsniveau ähnliches Niveau zu sinken (Abbildung 34). In der gepaarten Auswertung ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen.

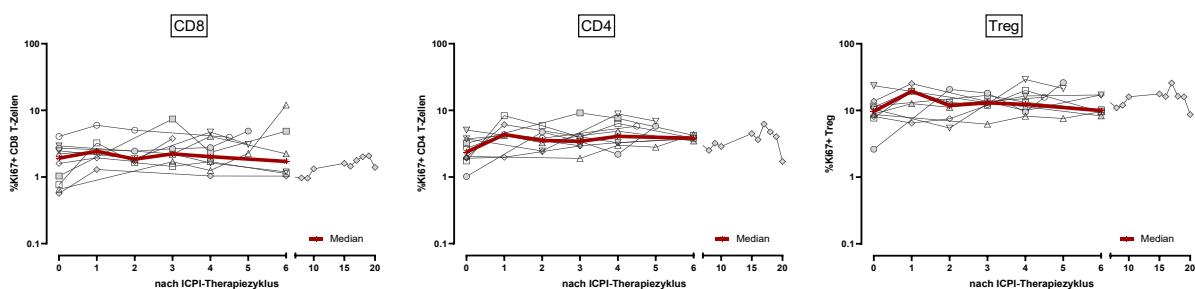


Abbildung 34 Anteile an Ki-67+ bei den Immunzellen im Blut von Personen mit Melanom im Therapieverlauf. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Ki-67+ Zellen von CD8 T-Zellen, CD4 T-Zellen und regulatorischen T-Zellen

(Treg). Der prozentuale Anteil an Ki-67+ Zellen im Blut von Personen mit Melanom (M; n=10) wird gegenüber der Zeit aufgetragen. Es wurde die Darstellung der Zeit nach ICPI-Therapiezyklus gewählt. Gezeigt ist jeweils der prozentuale Anteil an Ki67+ Zellen zum jeweiligen Zeitpunkt und der Median. Der Median wurde nur zu dem Zeitpunkt bei dem mindestens 4 Messungen vorlagen ermittelt (nach Zyklus 0, 1, 2, 3, 4, 6). Die unterschiedlichen Symbole (Dreieck, Kreis, Quadrat, Raute) stellen Messwerte eines Individuums dar.

Es zeigten sich keine Unterschiede im Anteil der normierten CMV und SEB reaktiven CD8 und CD4 T-Zellen im Therapieverlauf (Daten nicht gezeigt). Die CTLA-4 MFI auf CMV reaktiven CD8 T-Zellen und VZV reaktiven CD4 T-Zellen sowie deren Zytokinprofil ließ sich, aufgrund von zu wenigen auswertbaren Events entsprechend den Einschlusskriterien, überwiegend nicht substanziell auswerten. Daher wurde die Auswertung auf die funktionellen Daten der CD4 und CD8 T-Zellen nach polyklonaler Stimulation beschränkt. Die CTLA-4 MFI auf CD8 T-Zellen nahm im Verlauf nach polyklonaler Stimulation zu mit signifikanten Änderungen von Vorwert zu Zyklus 4 ($p=0,047$). Für CD4 T-Zellen ließ sich eine ähnliche Tendenz feststellen (Abbildung 37).

Für CD4 T-Zellen ließ sich eine Tendenz zu mehr TNF α + sowie TNF α /IL-2+ Zellen beobachten. Es bestand eine signifikante Zunahme der IFN γ /TNF α ausschüttenden Zellen nach Zyklus 1 ($p=0,049$; Abbildung 36). Der Anteil an IFN γ + CD8 T-Zellen nahm im Verlauf nach polyklonaler Stimulation signifikant ab (Zyklus 0:2 $p=0,034$, Zyklus 0:5 $p=0,049$). Ebenso nahm der Anteil der TNF α /IL-2+ (Zyklus 0:5, $p=0,014$) und der IL-2+ (Zyklus 0:5, $p=0,012$) CD8 T-Zellen signifikant ab. Der Anteil an multifunktionalen dreifach positiven CD8 T-Zellen nahm dagegen zumindest nach dem ersten Zyklus signifikant zu ($p=0,044$; Abbildung 37).

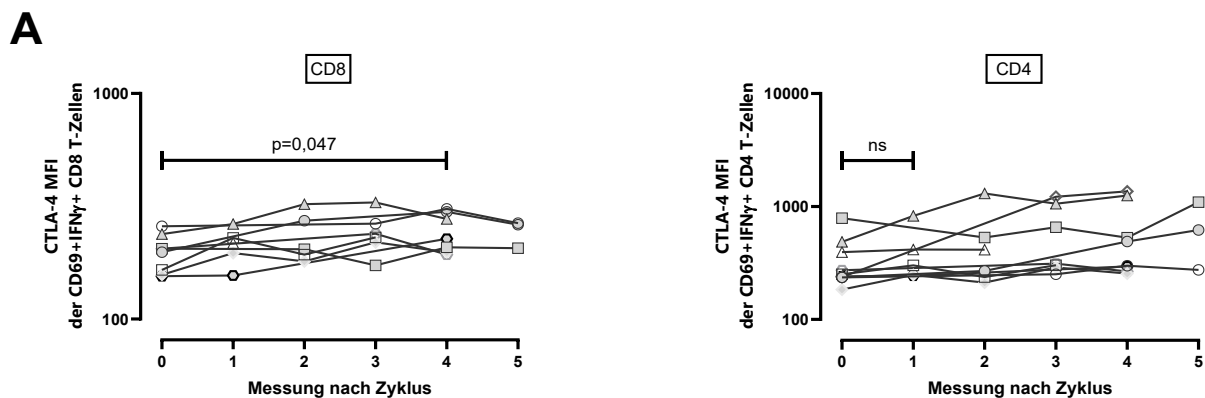


Abbildung 35 Mediane Fluoreszenzintensität (MFI) von CTLA-4 auf den Immunzellen und das Zytokinprofil von CD4 T-Zellen nach polyklonalem Stimulus im Blut von Personen mit Melanom im Therapieverlauf. Dargestellt ist MFI von CTLA-4 auf SEB reaktiven CD8 und CD4 T-Zellen von Personen mit Melanom (M; n=10) wird gegenüber der Zeit aufgetragen. Es wurde die Darstellung der Zeit nach ICPI-Therapiezyklus gewählt.

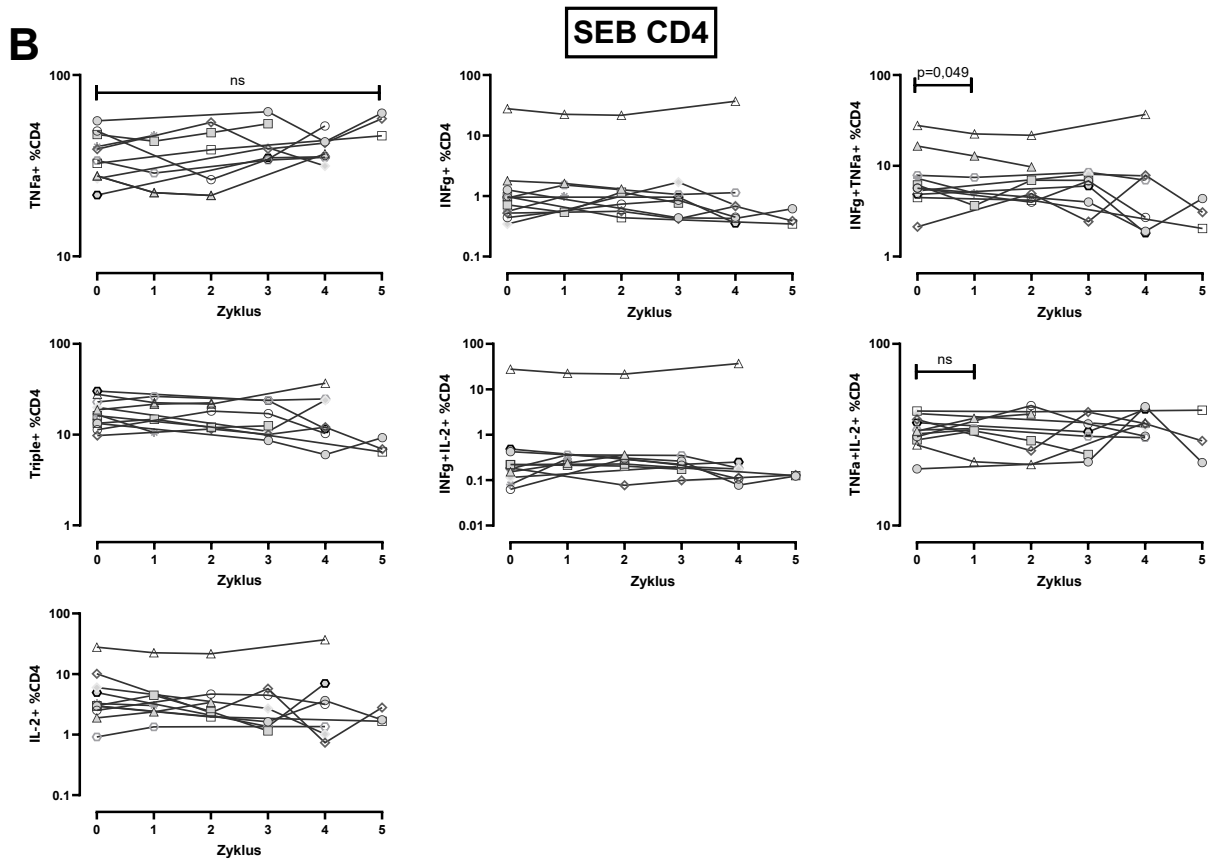


Abbildung 36 Mediane Fluoreszenzintensität (MFI) von CTLA-4 auf den Immunzellen und das Zytokinprofil von CD4 T-Zellen nach polyklonalem Stimulus im Blut von Personen mit Melanom im Therapieverlauf. Es wurde die Darstellung der Zeit nach ICPI-Therapiezyklus gewählt. In den Punktdiagrammen ist das Zytokinprofil von INF γ +, TNF α + und IL-2+ von CD4 T-Zellen nach polyklonalem Stimulus gegenüber der Zeit aufgetragen (ICPI-Therapiezyklus). Es wurde ein gepaarter t-Test zwischen dem Vorwert (0) sowie dem jeweiligen Zyklus (1, 2, 3, 4, 5) durchgeführt. Die unterschiedlichen Symbole (Dreieck, Kreis, Quadrat, Raute) stellen Messwerte eines Individuums dar.

C

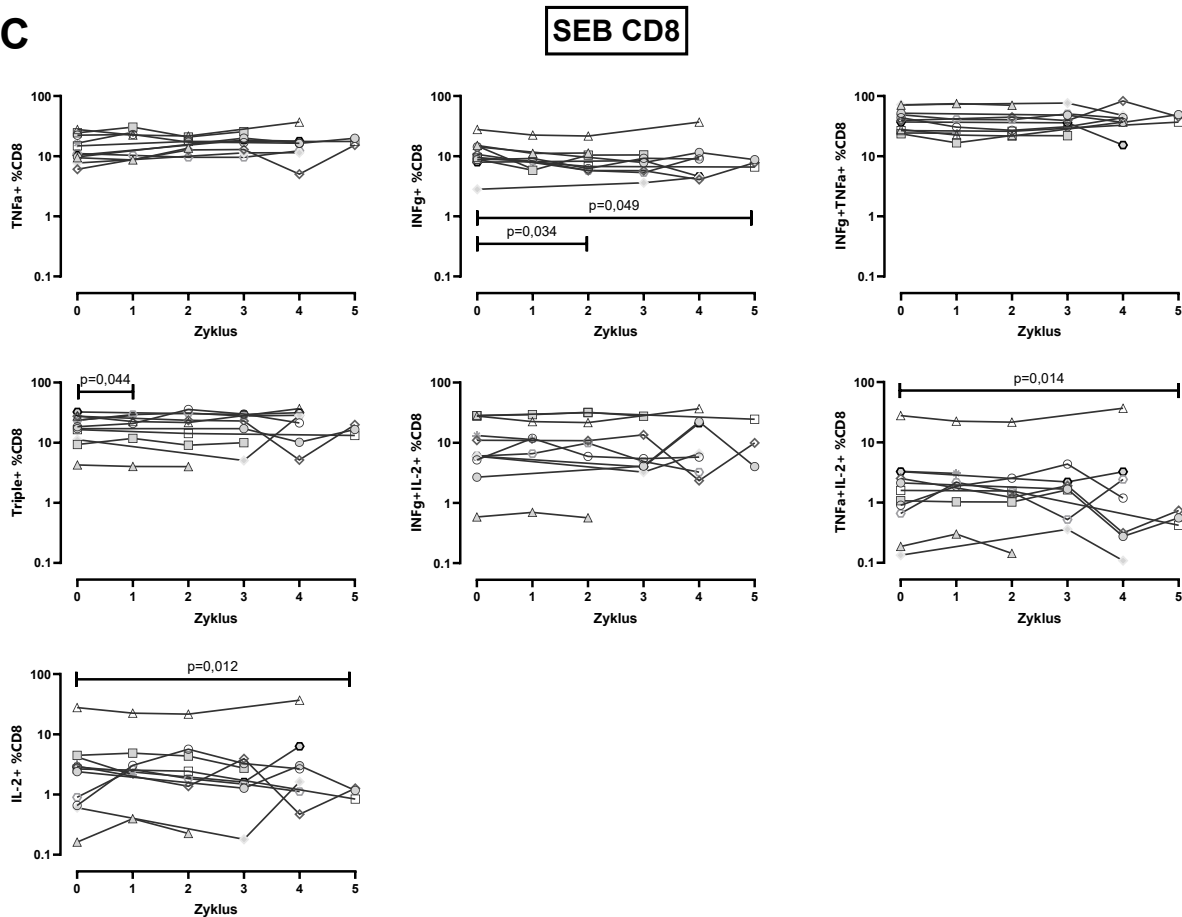


Abbildung 37 Mediane Fluoreszenzintensität (MFI) von CTLA-4 auf den Immunzellen und das Zytokinprofil von CD4 T-Zellen nach polyklonalem Stimulus im Blut von Personen mit Melanom im Therapieverlauf. Es wurde die Darstellung der Zeit nach ICPI-Therapiezyklus gewählt. In den Punktdiagrammen ist das Zytokinprofil von $\text{INF}\gamma^+$, $\text{TNF}\alpha^+$ und IL-2^+ von CD8 T-Zellen nach polyklonalem Stimulus gegenüber der Zeit aufgetragen (ICPI-Therapiezyklus). Es wurde ein gepaarter t-Test zwischen dem Vorwert (0) sowie dem jeweiligen Zyklus (1, 2, 3, 4, 5) durchgeführt. Die unterschiedlichen Symbole (Dreieck, Kreis, Quadrat, Raute) stellen Messwerte eines Individuums dar.

Eine Auswertung von CD39 und PD-1 auf reaktiven CD4 und CD8 T-Zellen war nicht möglich, da die erforderliche Menge an mindestens drei auswertbaren Proben vor und unter Therapie leider nicht gegeben war, da die Färbung 5 nicht immer durchgeführt wurde.

5.4 Analyse und Optimierung der Methodik zur Isolierung von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten aus Tumorgewebe

Ziel der Aufarbeitung von soliden Tumorproben war die Untersuchung von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) um Vergleiche zu Lymphozyten aus peripherem Blut ziehen zu können. Hierbei stand der quantitative Vergleich der Leukozyten, die Phänotypisierung der T-Zellen von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten, sowie funktionelle Charakterisierung der T-Zellen im Vergleich zu Leukozyten und T-Zellen im peripheren Blut desselben Patienten im Vordergrund.

Zu der Aufarbeitung und kollagenasefreien mechanischen Isolierung der TIL aus Tumorgewebe wurde ein bereits von PD Dr. Martin Janssen etabliertes Protokoll als Ausgangsbasis verwendet (CROSSEY et al., 2018). Dieses Protokoll sollte evaluiert und weiterentwickelt werden, um nicht nur

über quantitative und phänotypische, sondern auch über funktionelle Charakteristika der TIL nach Antigen-spezifischer Stimulation Auskunft zu erhalten. Ein Problem bei der Verarbeitung von Tumorgewebe ist die begrenzte Menge an Gewebe, welche neben der notwendigen histopathologischen Begutachtung zur Verfügung steht. Somit war ein zentrales Ziel dieser Arbeit die weitere Optimierung des Protokolls insbesondere der nach der Isolation folgenden Stimulationsprotokolle (4.3.3). Hier sollte eine gute Ausbeute an funktionellen (stimulierbaren) TIL erreicht werden, wobei hier Analysequalität und Ausbeute optimiert wurden.

Tumore der Niere wurde von einem Facharzt für Urologie entfernt und begutachtet, um ein repräsentatives Stück zu entnehmen. Hierfür wurde von dem Tumor, ohne ihn in der Hälfte zu teilen, von peripher nach zentral ein Tortenstück entnommen, um auch das Zellinfiltrat in den zentralen, tendenziell nekrotischen Abschnitten des Tumors zu erfassen, ohne dadurch die histologische Aussagekraft in der Pathologie zu beeinträchtigen. Diese zur Verfügung gestellte Tumorprobe wurde im Labor analysiert (CROSSEY et al., 2018).

Nach Isolation erfolgte eine quantitative Analyse der relativen Zellzahlen als prozentuale Anteile der Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten von Leukozyten, der T-, B- und NK-Zellen von Lymphozyten, der CD4 und CD8 T-Zellen von T-Zellen und der Tregs unter CD4 T-Zellen, untersucht. Bezüglich der Phänotypisierung wurden das Immun-Checkpointmolekül PD-1 und dessen Ligand PD-L1 sowie der immunmodulatorische Funktionsmarker CD39 untersucht.

Insgesamt wurden Tumorproben von 20 Personen (T1-T20) mit einer Raumforderung der Niere untersucht (Tabelle 30). Bei 15 Personen bestätigte die Histologie die Diagnose eines Nierenzellkarzinoms. Bei vier Personen mit einer Raumforderung der Niere fand sich ein benigner Befund (T2, T13, T14, T15). Diese wurden als Vergleich einer benignen Raumforderung den Personen mit Nierenzellkarzinom gegenübergestellt. Zwischen den beiden Kollektiven zeigten sich keine signifikanten Altersunterschiede. Der Tumor einer Person (T20) wurde von der Auswertung ausgeschlossen, da sich in der Histologie ein maligner Tumor der Niere einer Entität herausstellte, die nicht zu den Nierenzellkarzinomen zählt. Eine tabellarische Übersicht über die Tumorentitäten der bearbeiteten Gewebeproben, die durchgeführten Färbungen, Aufreinigung nach Dichtegradienten und Lagerungszeiten findet sich im Anhang (Tabelle 33-Tabelle 35).

Tabelle 30 Übersicht der Charakteristika von Personen mit Nierenzellkarzinom

	Benigner Tumor	Nierenzellkarzinom	p
n	4	15*	
Alter (Jahre) [MW±StabW]	59,55±17,81	63,74±7,55	0,1863 ¹
Geschlecht [n %]			n.a.
Weiblich	4 (100,0%)	3 (20,0%)	
Männlich	0 (0%)	12 (80,0%)	
Tumorgroße in cm (Median; Minimum- Maximum)	n=2: 1,7-2cm n=2: n.a.	n=14* 3,45 cm (1,1-10,5 cm)	

¹ungepaarter t-Test; *1 Probe wurde ausgeschlossen, da nicht NZK und nicht benigne.

5.4.1 Einfluss auf die Analysequalität durch die Färbung vor oder nach der Aufreinigung mittels eines Dichtegradienten

Es wurden die Immunzellen und Charakteristika der T-Zellen mit Hilfe der Oberflächenfärbung nach Isolierung aus dem Tumorgewebe und vor und nach Auftrennung mittels eines Dichtegradienten untersucht. Dies sollte mögliche quantitative und qualitative Unterschiede der Immunzellen bedingt durch den Zeitpunkt der Färbung detektieren. Hierfür wurden die Färbung 6 und Färbung 7 zur Identifizierung von Granulozyten, NK-Zellen, B-Zellen, T-Zellen, CD4 T-Zellen, CD8 T-Zellen und Treg verwendet. Dies erfolgte sowohl vor (direkt) als auch nach Aufreinigung mittels eines Ficoll-Dichtegradienten und die Ergebnisse wurden jeweils miteinander verglichen. In diese Auswertung gingen sowohl Tumore von Personen mit Nierenzellkarzinom als auch mit benigner Raumforderung ein. Die durchgeführten Färbungen 6 und/oder 7 richteten sich nach der, in der Neubauerkammer gezählten, Zellzahl. Es wurde angestrebt immer Färbung 6 vor und nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation durchzuführen sowie Färbung 7 nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation. Waren zu wenig Zellen vor Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation vorhanden wurden nach Möglichkeit Färbung 6 und 7 durchgeführt oder nur Färbung 6. Waren nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation zu wenig Zellen vorhanden wurde Färbung 7 priorisiert.

Die Gesamtzellzahl der Leukozyten aus dem Tumorgewebe wurde in einer Neubauerkammer jeweils vor und nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation gezählt. Des Weiteren wurde der Anteil an Lymphozyten als % von allen Zellen über eine Färbung der Lymphozytensubpopulationen bestimmt. 12 der 20 bearbeiteten Tumore (T1-T20) wiesen ausreichend Zellen zur Durchführung einer Färbung der Lymphozytensubpopulationen auf. Die Tabelle 31 bietet eine Übersicht über die 12 der auf diese Weise analysierten Tumore. Die Masse des prozessierten Gewebes sowie die darin enthaltene Zellzahl wurden dokumentiert. Insgesamt wurde ersichtlich, dass die Aufreinigung mittels Dichtegradienten zu einem erheblichen Verlust an der Gesamtzellzahl sowie der absoluten Anzahl an Lymphozyten führte, jedoch der Anteil an Lymphozyten als % von allen Zellen nach Aufreinigung mittels Dichtegradienten zunahm.

Tabelle 31 Absolute sowie relative Lymphozytenzahlen in einer Neubauerkammer im Kontext des prozessierten Gewebes vor und nach Dichtegradiententrennung

	Gesamte Zellzahl Neubauerkammer [x10 ⁶]	Verlust in Prozent der Gesamtzahl	Prozentualer Lymphozytenanteil an Gesamtzellzahl [in %]	Absolute Lymphozytenzahl [x10 ⁶]	Verlust in Prozent an Lymphozyten [in%]	Gewicht prozessiertes Gewebe [g]	Lymphozyten nach Ficoll pro g Gewebe [x10 ⁶ /g]
T2	Vor Ficoll		12,90	0,91		1,78	0,04
	Nach Ficoll	-95,68%	26,9	0,08	-91,01		
T3	Vor Ficoll		28,40	22,15		5,32	0,94
	Nach Ficoll	-85,13%	43,30	5,02	-77,32		
T4	Vor Ficoll		59,50	8,57		0,61	2,46
	Nach Ficoll	-85,07%	69,70	1,50	-82,51		
T5	Vor Ficoll		20,70	48,13		6,16	2,67
	Nach Ficoll	-77,63	31,70	16,48	-65,75		
T7	Vor Ficoll		78,02	3,90		0,28	0,04
	Nach Ficoll	-97,00%	82,27	0,01	-96,84		

T8	Vor Ficoll	97,50		65,56	63,92			
	Nach Ficoll	14,00	-85,64%	69,18	9,68	-84,85	2,91	3,32
T9	Vor Ficoll	115,00		19,80	22,77			
	Nach Ficoll	14,45	-87,43%	25,20	3,64	-84,01	1,67	2,18
T12	Vor Ficoll	360,00		22,54	81,14			
	Nach Ficoll	12,00	-96,66%	6,04	0,07	-99,10	5,38	0,01
T13	Vor Ficoll	60,00		29,42	17,65			
	Nach Ficoll	20,50	-65,83%	30,87	6,33	-64,15	2,43	2,59
T17	Vor Ficoll	3,30		35,40	1,17			
	Nach Ficoll	0,03	-99,99%	55,50	0,02	-98,29	4,00	0,01
T18	Vor Ficoll	22,65		26,90	6,09			
	Nach Ficoll	2,35	-89,62%	48,10	1,13	-81,44	1,46	0,77
T19	Vor Ficoll	18,00		15,00	2,70			
	Nach Ficoll	2,50	-86,11%	20,40	0,51	-81,11%	0,59	0,86

Repräsentative Dotplots aus der durchflusszytometrischen Messung finden sich in Abbildung 38A und B. Für die Ermittlung der relativen Zellzahlen wurde Färbung 6 sowohl vor als auch nach Aufreinigung mittels Dichtegradienten bei 12 Gewebeproben durchgeführt (Abbildung 38A und B). Des Weiteren erfolgte die gepaarte Darstellung im Vergleich vor und nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (Abbildung 38C-F).

So waren bei Färbung der Zellen jeweils vor und nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation signifikante Unterschiede festzustellen. Wie aufgrund des Gradientenmediums zu erwarten war, war der Anteil der Granulozyten nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation signifikant geringer ($p=0,016$), während der Anteil an Monozyten und Lymphozyten nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation signifikant zunahm ($p=0,003$; $p=0,021$; Abbildung 38C). Für die Anteile der T- und B-Zellen sowie CD8, CD4 und Treg ließen sich keine relevanten Unterschiede detektieren. Nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation zeigte sich jedoch ein erhöhter Anteil an NK-Zellen ($p<0,001$; Abbildung 38D).

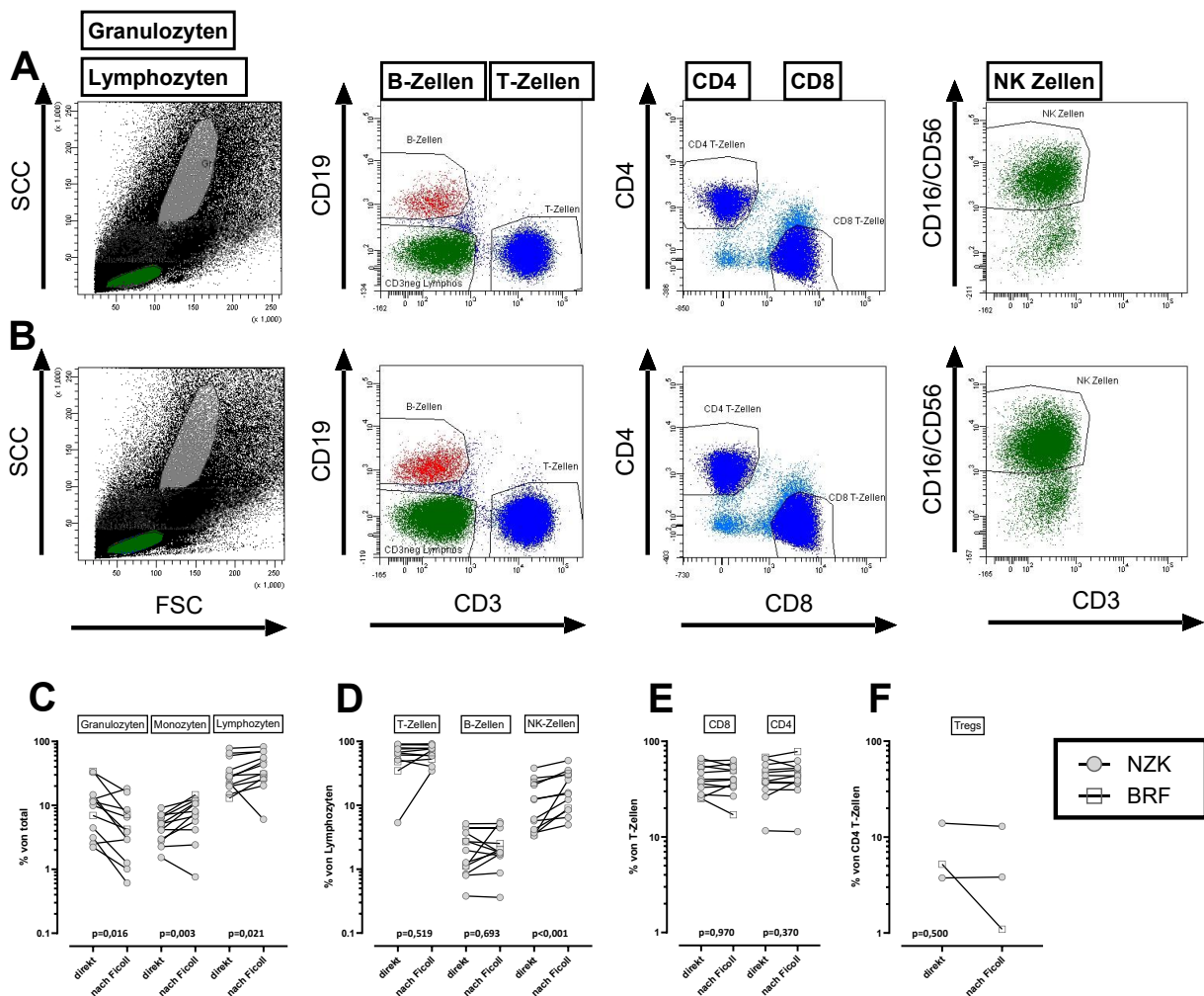


Abbildung 38 Vergleich der relativen Immunzellzahlen isoliert aus Tumorgewebe von Personen mit Nierenzellkarzinom oder einem benignen Tumor der Niere vor und nach Aufreinigung mittels eines Dichtegradienten. Repräsentative Dotplots der durchflusszytometrischen Analyse von isolierten Leukozyten aus Tumorgewebe vor (A) und nach (B) Auftrennung mittels eines Ficoll-Dichtegradienten (Ficoll). Nach Bestimmung der Lymphozytenpopulation (grün) und Granulozyten (hellgrau) anhand ihrer Größe im Vorwärts (FSC)- und Seitwärtsstreulicht (SSC) erfolgte die Identifizierung der Lymphozyten-Subpopulationen anhand der Markermoleküle CD3 (T-Zellen), CD4 und CD8, CD19+ (B-Zellen) und CD16/CD56+ der CD3- Zellen (NK-Zellen). Anteil von (C) Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten von allen gemessenen „Ereignissen“, (D) Lymphozytensubpopulationen der T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen, (E) CD8 und CD4 T-Zellen, und (F) regulatorischen T-Zellen (% von CD4 T-Zellen) jeweils im Vergleich vor und nach Ficoll. Runde Symbole stehen für Personen mit Nierenzellkarzinom (NZZK, n=10), eckige Symbole für Personen mit einer benignen Raumforderung (BRF, n=2). Es wurde jeweils ein gepaarter nicht-parametrischer Test (Wilcoxon) durchgeführt.

Für die MFI von PD-1, CD39 und PD-L1 auf CD8, CD4 und regulatorischen T-Zellen, die bei drei Tumorproben analysiert wurde (2x NZZK, 1x BRF), ließen sich keine signifikanten Unterschiede vor und nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation detektieren (Abbildung 39A). Die prozentualen Anteile von PD-1+ und CD39+ Zellen stellten sich vor und nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation ohne wesentliche Unterschiede dar (Abbildung 39B).

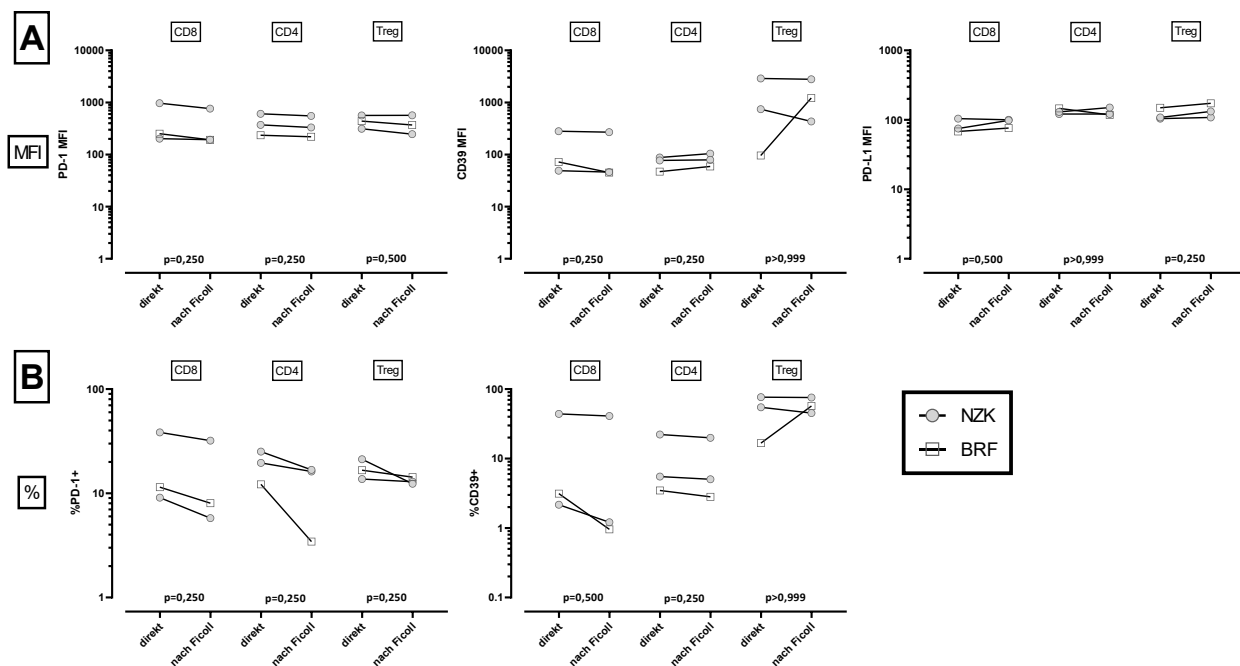


Abbildung 39 Vergleich der medianen Fluoreszenzintensität und der prozentualen Anteile von PD-1, CD39, sowie der medianen Fluoreszenzintensität von PD-L1 auf den Immunzellen aus Tumorgeweben. (A) MFI von PD-1, CD39 und PD-L1 auf CD8 und CD4 T-Zellen und regulatorischen T-Zellen jeweils im Vergleich vor und nach Ficoll. **(B)** Prozentuale Anteile an PD-1 und CD39 positiven CD8 und CD4 T-Zellen jeweils im Vergleich vor und nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll). Runde Symbole stehen für Personen mit Nierenzellkarzinom (NZK), eckige Symbole für Personen mit einer benignen Raumforderung (BRF). Es wurde jeweils ein gepaarter nicht-parametrischer Test (Wilcoxon) durchgeführt.

Aus diesen Ergebnissen ließen sich Grundsätze für die weitere Betrachtung der Immunzellen aus Tumorgewebe nach Isolation ableiten. Nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation war eine höhere Reinheit in der durchflusszytometrischen Untersuchung gegeben. War nicht genügend Ausgangsmaterial für eine weitere Prozessierung mittels Dichtegradientenzentrifugation vorhanden, konnte dennoch eine Analyse der T-Zell-Subpopulationen erfolgen, da hier aufgrund der Hinzunahme von spezifischen Markern (CD8, CD4, etc.) eine genauere Bestimmung der Zellpopulationen möglich war. Als Grenzwert für die Mindestanzahl von T-Zellen waren >3000 in der Messung erforderlich, um zur Detektion von kleinen Zellpopulation mit 1%-Anteil verlässliche Aussagen treffen zu können.

5.4.2 Einfluss der Tumor-Lagerungszeit auf die Analysequalität

In diesem Teil wurde untersucht, welchen Einfluss die Lagerungszeit des Tumorgewebes, von der Entnahme bis zum Beginn der Verarbeitung, auf die zu untersuchenden Immunzellen hat und ob sich daraus relevante Einschränkungen oder Vorteile ergeben. Die Möglichkeit der Lagerung von Tumorgewebe und nachfolgender Prozessierung hätte Vorteile für die flexiblere Integration der Methode in die Laborabläufe, da manche Operationen erst am Nachmittag erfolgten.

Insgesamt wurde Gewebe von 3 Tumoren (T1-T3) für diese Auswertung herangezogen. Es erfolgte die kollagenasefreie mechanische Isolierung sowohl direkt (T1-T3), als auch nach einer

Lagerungszeit von mehreren Stunden (19,5 bis 23,5 Stunden; T1g-T3g). T2 wies in der Histologie einen benignen Befund auf. Die Lagerung erfolgte in Medium (RPMI, 0,5% HUS, 1%P/S) bei 4°C im Kühlschrank. Von Probe T1 lagen für einen Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation nicht genügend Material und Zellen vor.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den relativen Immunzellzahlen von T1 bis T3 für direkt prozessierte oder gelagerte Proben. Auffallend war, dass T2 nach Lagerung einen deutlich geringeren Anteil an Monozyten und Lymphozyten aufwies. Ob dies mit der benignen Dignität von T2 zusammenhing, ist lediglich zu spekulieren (Abbildung 40B-E). Insgesamt schienen die relativen Immunzellzahlen unabhängig von der Lagerung stabil zu bleiben. Es wurden nur die Treg aus Färbung 7 dargestellt, die anderen Immunzellsubpopulationen sind aus Färbung 6 dargestellt.

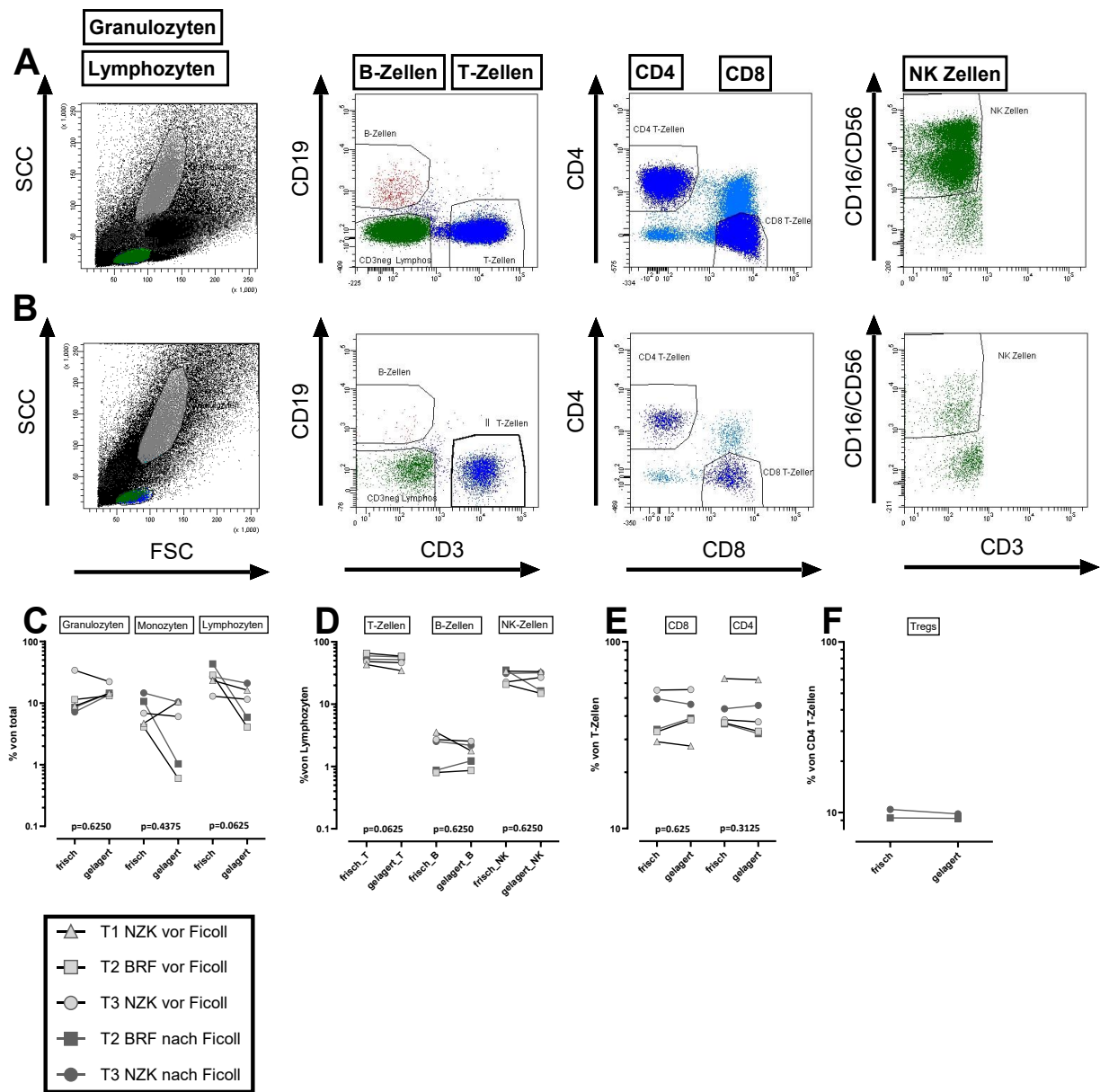


Abbildung 40 Vergleich der relativen Immunzell-Zahlen isoliert aus Tumorgewebe von Personen mit Nierenzellkarzinom oder einem benignen Tumor der Niere. Repräsentative Dotplots der durchflusszytometrischen Analyse von isolierten Leukozyten aus Tumorgewebe (**A**) bei direkter Prozessierung der Tumorprobe und (**B**) nach Lagerung (Medium (RPMI, 0,5% HUS, 1%P/S) bei 4°C im Kühlschrank). Nach Bestimmung der Lymphozytenpopulation

(grün) und Granulozyten (hellgrau) anhand ihrer Größe im Vorwärts (FSC)- und Seitwärtsstreulicht (SSC) erfolgt die Identifizierung der Lymphozyten-Subpopulationen anhand der Markermoleküle CD3 (T-Zellen), CD4 und CD8, CD19+ (B-Zellen) und CD16/CD56+ der CD3- Zellen (NK-Zellen). Anteil von (C) Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten von allen gemessenen „Ereignissen“, (D) Lymphozyten-subpopulationen der T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen, (E) CD8 und CD4 T-Zellen, und (F) regulatorischen T-Zellen (% von CD4 T-Zellen) jeweils im Vergleich bei direkter Prozessierung der Tumorseite (frisch) und nach Lagerung (gelagert). Hellgrau hinterlegte Symbole (n=3) bezeichnen Werte der Immunzellzahlen vor Aufreinigung durch einen Ficoll-Dichtegradienten (Ficoll), dunkelgrau hinterlegte Symbole (n=2) Werte der Immunzellzahlen nach Aufreinigung durch einen Ficoll. Es wurde jeweils ein gepaarter nicht-parametrischer Test (Wilcoxon) durchgeführt.

Von 2 Proben vor Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (T2 und T3) wurden zudem die T-zellulären Charakteristika vor und nach Lagerung des Tumorgewebes untersucht. Die MFI von PD-1, CD39 und PD-L1 blieb über die Lagerungszeit relativ stabil (Abbildung 41A). T2 schien eine Tendenz zur Abnahme der PD-1 MFI auf CD8 zu haben. Für die prozentualen Anteile (Abbildung 41B) ergab sich ein gemischtes Bild, wobei die Anteile an PD-1+ Zellen für T2 deutlich abnehmen. Die Anteile von CD39+ Zellen blieben stabil.

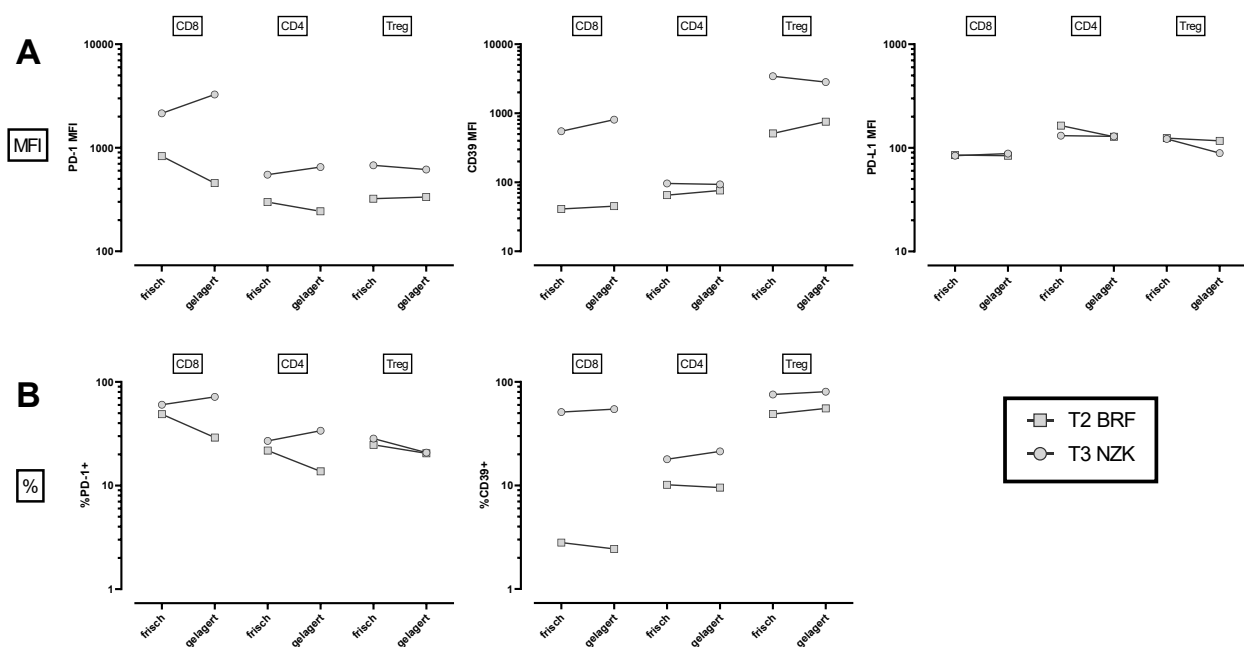


Abbildung 41 Vergleich der medianen Fluoreszenzintensität und der prozentualen Anteile von PD-1, CD39, sowie der medianen Fluoreszenzintensität von PD-L1 auf den Immunzellen isoliert aus Tumorgewebe. (A) MFI von PD-L1 auf CD8 T-Zellen, CD4 T-Zellen und regulatorischen T-Zellen (Treg) sowie (B) prozentuale Anteile von PD-1+, CD39+. Es werden in gepaarter Darstellung die jeweiligen Werte nach Isolierung der Immunzellen aus dem Gewebe direkt nach Operation (frisch) gegenüber den Werten nach Isolierung aus dem Gewebe nach Lagerung (T2: 20 Stunden; T3: 23,5 Stunden gelagert) dargestellt. Gezeigt ist die Zellzahl zum jeweiligen Zeitpunkt.

Insgesamt erschienen Oberflächenfärbungen nach Lagerung des Tumorgewebes und anschließender Prozessierung bedingt möglich zu sein. Betrachtete man die lichtbrechenden Eigenschaften der Zellpopulationen im Gating, so fiel auf, dass nach Lagerung deutlich mehr unspezifische Signale oberhalb der Lymphozytenpopulation, sowie vor der Granulozytenpopulation auftraten (siehe FSC/SSC Diagramme Abbildung 40A und B). Dies erschwerte ein adäquates Gating und beeinflusste besonders Populationen, die sich rein durch die physikalischen Parameter des FSC

und SSC definierten. Schlussfolgernd war die direkte Bearbeitung und Prozessierung des Tumorgewebes der Lagerung vorzuziehen.

5.4.3 Direkter Vergleich der Immunzellen aus Tumorgewebe mit den Immunzellen aus peripherem Blut bei Personen mit Nierenzellkarzinom oder einem benignen Tumor der Niere

In dieser Auswertung wurde der direkte Vergleich der Immunzellen, welche aus dem Tumorgewebe isoliert wurden mit den Immunzellen aus dem peripheren Blut derselben Person vorgenommen. Hierbei wurden mögliche Gemeinsamkeiten oder Unterschiede zwischen den gewebeständigen Immunzellen mit den im peripheren Blut zirkulierenden Immunzellen untersucht. Basierend auf den zuvor bestimmten Kriterien, die eine bestmögliche Auswertung der Tumor-Infiltrierenden Lymphozyten gewährleisten (direkte Bearbeitung, Aufarbeitung mittels Dichtegradientenzentrifugation, mehr als 3000 T-Zellen), wurden aus den 20 bearbeiteten Tumorproben die Proben der Personen mit einem NZK (T3, T4, T5, T7, T8, T9, T12, T16, T18, T19) und die Tumorproben der Personen mit einer BRF (T2, T13) ausgewählt. T17 konnte nach visueller Beurteilung, bei ausreichender Reinheit in den FACS-Plots sowie klar trennbaren Lymphozytensubpopulationen, zudem mit in die Auswertung eingeschlossen werden, auch wenn hier aufgrund der geringen Ausgangsmenge an Probenmaterial keine Dichtegradientenzentrifugation möglich war. T20 wurde aufgrund der Entität (maligner Tumor, kein NZK und nicht BRF) ausgeschlossen (Tabelle 34, Anhang). Ziel der ersten Auswertung war es, mögliche Unterschiede im relativen Anteil an T-Zellen, CD8, CD4 und regulatorischen T-Zellen zu detektieren. Die Ergebnisse der Personen mit Nierenzellkarzinom und einer benignen Raumforderung wurden vergleichend dargestellt (Abbildung 42). Zellen aus Blut und TIL zeigten individuelle Variabilitäten, aber insgesamt ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in den relativen Anteilen an T-Zellen, CD8 T-Zellen und Treg zwischen den aus Tumorgewebe isolierten TIL und den dem peripheren Blut gewonnenen Zellen bei den Personen mit NZK. Interessanterweise war jedoch der Anteil an CD4 T-Zellen bei Personen mit NZK in den TIL signifikant geringer als der Anteil an CD4 T-Zellen im peripherem Blut ($p=0,042$). Die Daten der Proben mit BRF verhielten sich ähnlich, aufgrund der kleinen Probenzahl erfolgte jedoch keine statistische Analyse.

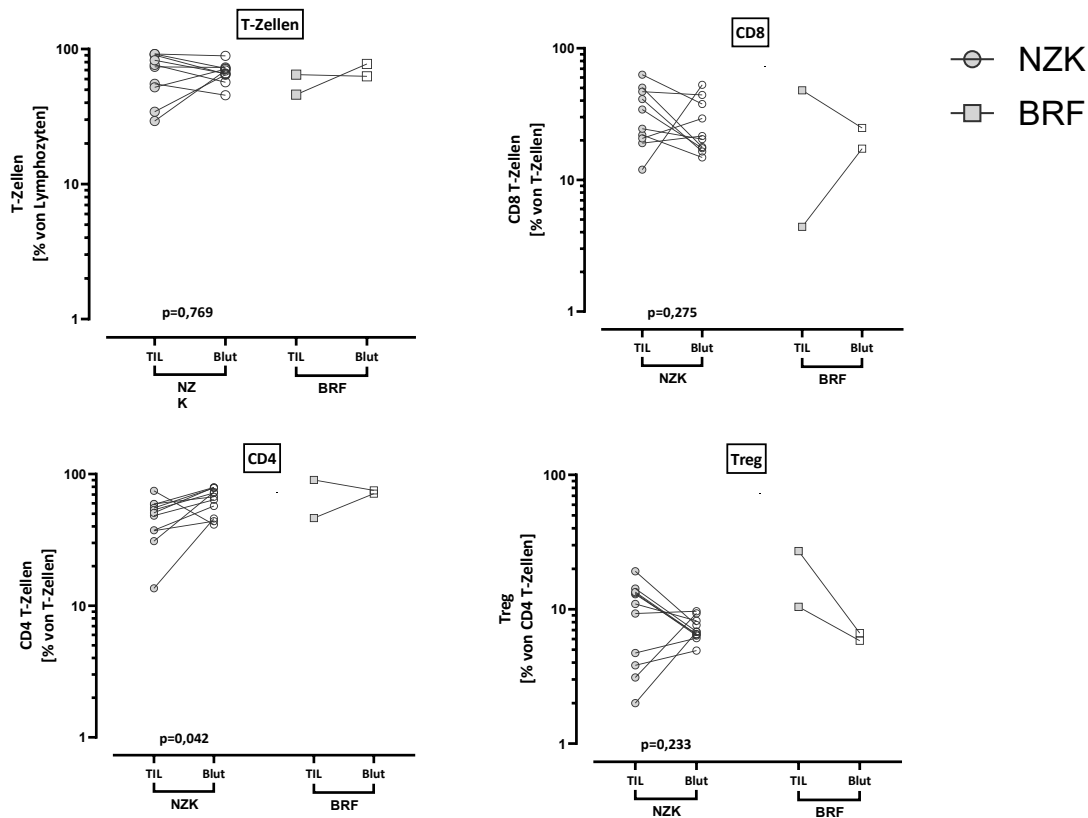


Abbildung 42: Vergleich der relativen Immunzell-Zahlen im Tumorgewebe gegenüber den Immunzellen im peripherem Blut von Personen mit Nierenzellkarzinom oder einem benignen Tumor der Niere. Dargestellt ist der Anteil der Lymphozytensubpopulationen der untersuchten Personen als T-Zellen (% von Lymphozyten), CD8 T-Zellen (% von T-Zellen), CD4 T-Zellen (% von T-Zellen), regulatorische T-Zellen (% von CD4 T-Zellen). Der relative der Immunzellzahlen von Personen mit Nierenzellkarzinom (NZK; T-Zellen n=10; CD8, CD4, regulatorische T-Zellen n=11) und Personen mit benigner Raumforderung (BRF; n=2) wird jeweils von derselben Person verglichen. Die Querbalken repräsentieren jeweils Median und Interquartilsabstand (IQR). Es wurde für Personen mit NZK jeweils ein gepaarter nicht-parametrischer Test (Wilcoxon) durchgeführt.

Interessanterweise zeigte sich die MFI von PD-1 auf CD8, CD4 und regulatorischen T-Zellen der TIL gegenüber den aus dem peripheren Blut stammenden signifikant erhöht ($p=0,006$; $p=0,003$; $p=0,002$; Abbildung 43)

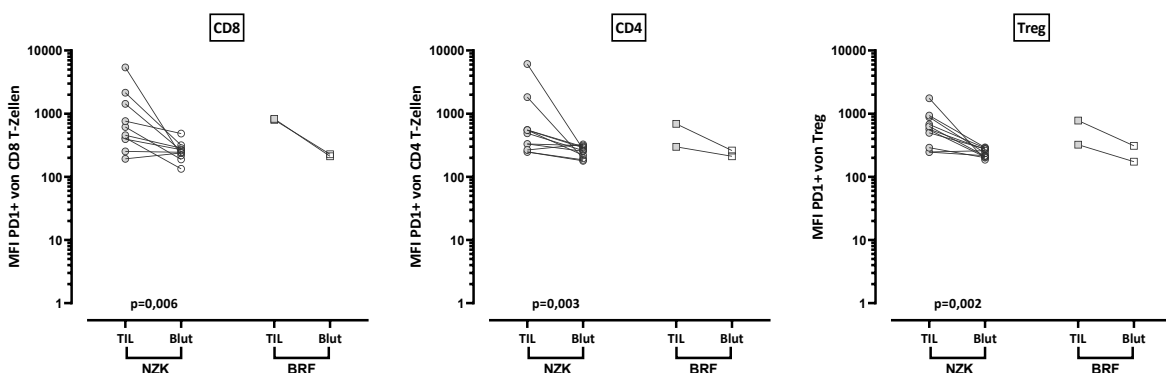


Abbildung 43 Vergleich der medianen Fluoreszenzintensität von PD-1 bei den Immunzellen im Tumorgewebe gegenüber den Immunzellen im peripherem Blut von Personen mit Nierenzellkarzinom oder einem benignen

Tumor der Niere. Dargestellt ist die MFI von PD-1 von CD8 T-Zellen, CD4 T-Zellen und regulatorischen T-Zellen (Treg). Die MFI von PD-1 auf den T-Zellen wird in Tumorgewebe (TIL) und peripherem Blut (Blut) von Personen mit Nierenzellkarzinom (NZK; CD8 T-Zellen n=10 CD4 und regulatorische T-Zellen n=11) und Personen mit benigner Raumforderung (BRF; n=2) wird jeweils von derselben Person verglichen. Die Querbalken repräsentieren jeweils Median und Interquartilsabstand (IQR). Es wurde für Personen mit NZK jeweils ein gepaarter nicht-parametrischer Test (Wilcoxon) durchgeführt.

Ebenso war der Anteil an CD39+ CD8, CD4 und regulatorischen T-Zellen der TIL signifikant gegenüber dem Kompartiment des peripheren Blutes erhöht ($p=0,004$; $p=0,002$; $p=0,002$; Abbildung 44). Für Personen mit einer benignen Raumforderung ließen sich Tendenzen ähnlich zu den Personen mit NZK beobachten.

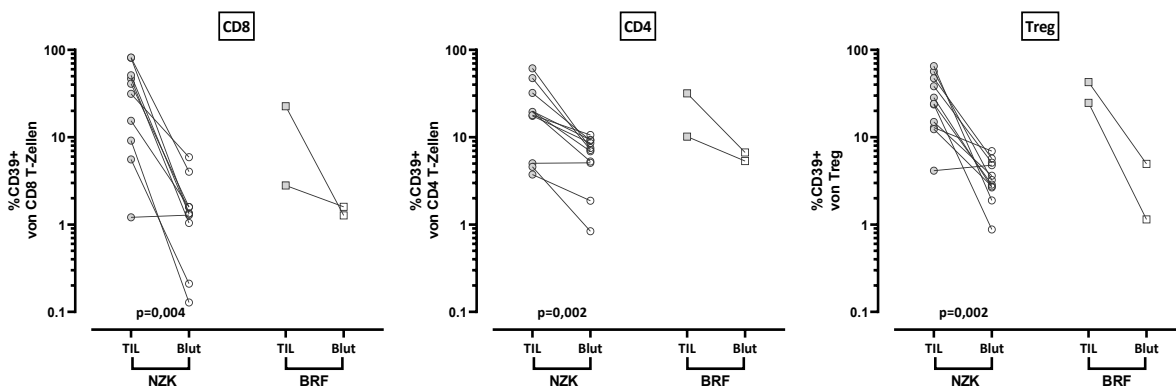


Abbildung 44 Vergleich der prozentualen Anteile der CD39+ Immunzellen im Tumorgewebe gegenüber den Immunzellen im peripherem Blut von Personen mit Nierenzellkarzinom oder einem benignen Tumor der Niere. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der CD39+ Zellen von CD8 T-Zellen, CD4 T-Zellen und regulatorischen T-Zellen (Treg). Die Anteile der CD39+ T-Zellen wird in Tumorgewebe (TIL) und peripherem Blut (Blut) von Personen mit Nierenzellkarzinom (NZK; CD8 T-Zellen n=10 CD4 und regulatorische T-Zellen n=11) und Personen mit benigner Raumforderung (BRF; n=2) jeweils von derselben Person verglichen. Die Querbalken repräsentieren jeweils Median und Interquartilsabstand (IQR). Es wurde für Personen mit NZK jeweils ein gepaarter nicht-parametrischer Test (Wilcoxon) durchgeführt.

Im Folgenden wurde jeweils eine Korrelationsanalyse durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Expressionsstärke der o.g. Marker auf T-Zellen im peripherem Blut Rückschlüsse auf deren Expression auf TIL zulässt. Für die MFI von PD-1 der CD8, CD4 und regulatorischen T-Zellen ließ sich zwischen den Zellen aus den TIL und den Zellen aus dem peripherem Blut keine signifikante Korrelation feststellen. Im Gegensatz dazu war eine starke Korrelation des Anteils an CD39+ Tregs detektierbar ($r=0,654$, $p=0,034$; Abbildung 45B)

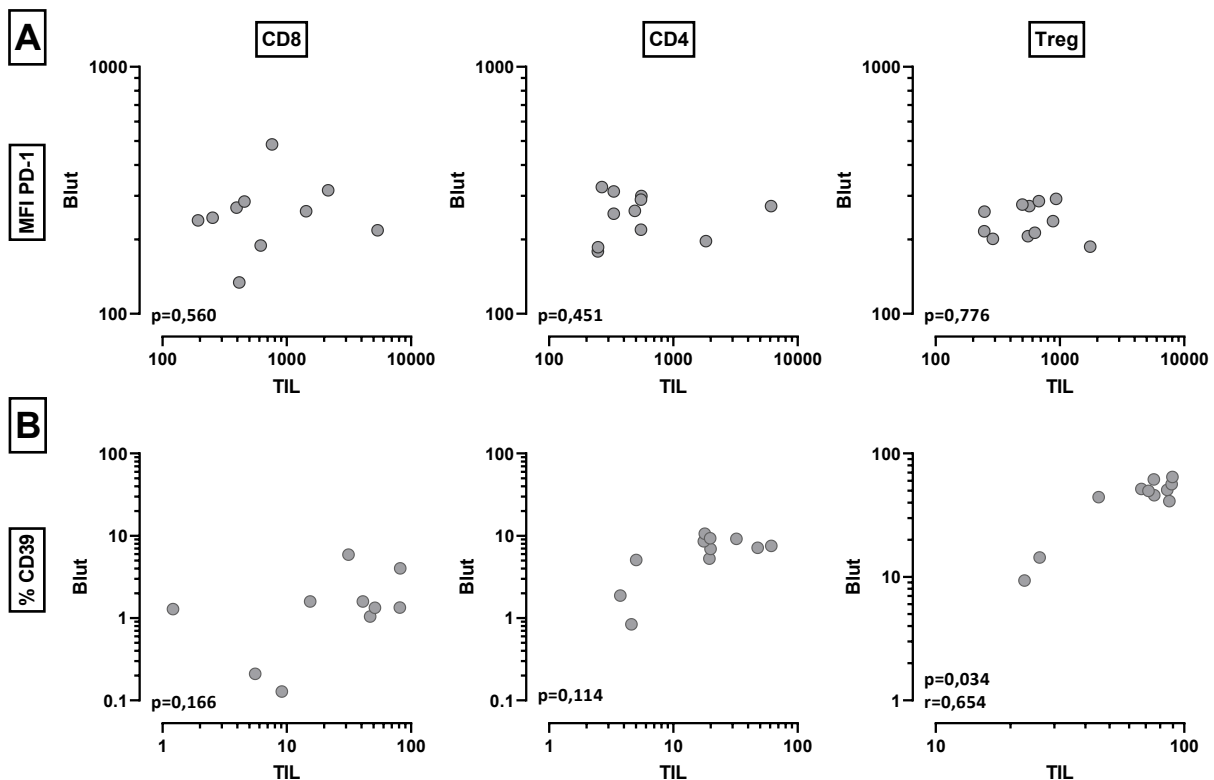


Abbildung 45 Korrelation der PD-1 MFI und prozentualen Anteilen von CD39+ von CD8, CD4 und regulatorischen T-Zellen zwischen Tumor-infiltrierenden-Lymphozyten und Zellen aus peripherem Blut. Dargestellt ist die Korrelation zwischen der (A) PD1 MFI und (B) der prozentualen Anteile von CD39+ von CD8 T-Zellen, CD4 T-Zellen und regulatorischen T-Zellen (Treg) aus peripherem Blut (Blut) und aus Tumor-infiltrierenden-Lymphozyten (TIL). Der Rang der MFI von PD-1+ T-Zellen wird in Tumorgewebe (TIL) gegenüber peripherem Blut (Blut) von Personen mit Nierenzellkarzinom jeweils verglichen. Es wurde jeweils ein Test nach rangbasierter nicht-parametrischer Korrelation (Spearman) durchgeführt.

5.4.4 Optimierung der Stimulationsprotokolle zum Nachweis Antigen-spezifischer Tumor-infiltrierender Lymphozyten aus Nierenzellkarzinom

Neben der quantitativen und phänotypischen Analyse der TIL sollte schließlich auch eine funktionelle Analyse, insbesondere im Vergleich zu den T-Zellen aus peripherem Blut stattfinden. Hierbei standen die unter Abschnitt 4.3.3.2 beschriebenen Stimulationsprotokolle zur Verfügung, welche für die Stimulation von T-Zellen aus peripherem Blut oder PBMCs optimiert waren, für die jedoch erst wenig Erkenntnisse zur Anwendung mit TIL vorlagen.

Hierzu wurden TIL nach mechanischer Isolation und Aufreinigung mittels Ficoll-Dichtegradienten isoliert (Protokoll in 4.3.1). Diese wurden entsprechend dem Standardprotokoll CMV-spezifisch sowie polyklonal mit SEB in Medium stimuliert, wobei die entsprechenden Stimulationsprotokolle bereits für PBMC etabliert waren (Protokoll 2 in Abschnitt 4.3.3.2). In der verwendeten Färbung (Tabelle 20; Färbung 7b) wurde zur Diskriminierung von CD4 T-Zellen der fluorochromgekoppelte Antikörper anti-CD4 APC-H7 verwendet, mit welchem bereits gute Erfahrungen in der Markierung von T-Zellen aus peripherem Blut vorlagen. Es zeigte sich, dass isolierte TIL grundsätzlich in der Lage sind, $\text{IFN}\gamma$ zu produzieren (Abbildung 46A). In der initial entsprechend einer Färbung von Zellen

im peripherem Blut verwendeten Dosierung von 1µl pro Färbeansatz zeigte sich jedoch für TIL eine unzureichende Unterscheidung der CD4+ von den CD4- T-Zellen (Abbildung 46A), während die Färbung von PBMC eine gute Anfärbung von CD4+ T-Zellen erlaubte (Abbildung 46B).

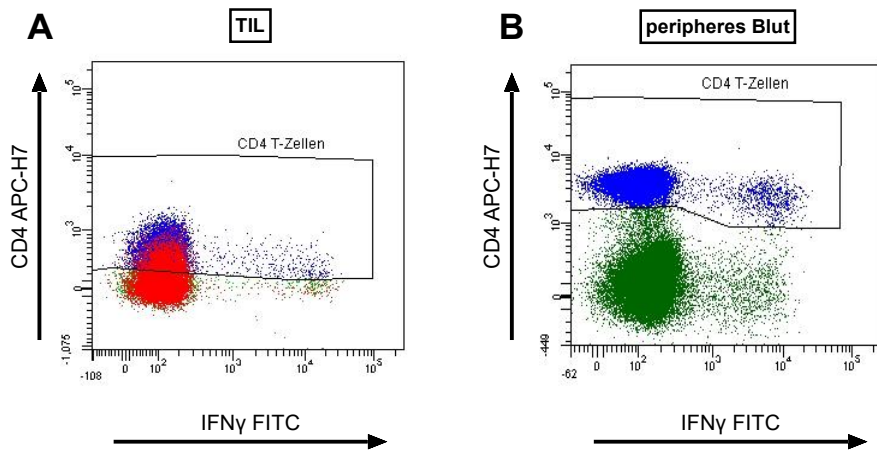


Abbildung 46 anti CD4 APC-H7 Signal unter Verwendung von 1µl Antikörpermenge. Repräsentative Dotplots zum Nachweis von CD4 T-Zellen aus TIL (A) und peripherem Blut (B) der Person T3 nach Stimulation mit CMV-Antigen. Das CD4 APC-H7 Signal ist zusammen mit dem Signal für IFN γ FITC aufgetragen.

Es erfolgten daher Titrationsreihen zur weiteren Optimierung des Nachweises von CD4 T-Zellen aus TIL. Hier zeigte sich unter Verwendung von 3µl anti-CD4 APC-H7 eine verbesserte Identifizierung der CD4+ T-Zellen gegenüber den CD4- T-Zellen. Für eine präzisere Untersuchung wurden aus diesen in einem weiteren Gate die IFN γ + CD4+/CD8- T-Zellen selektiert (Abbildung 47).

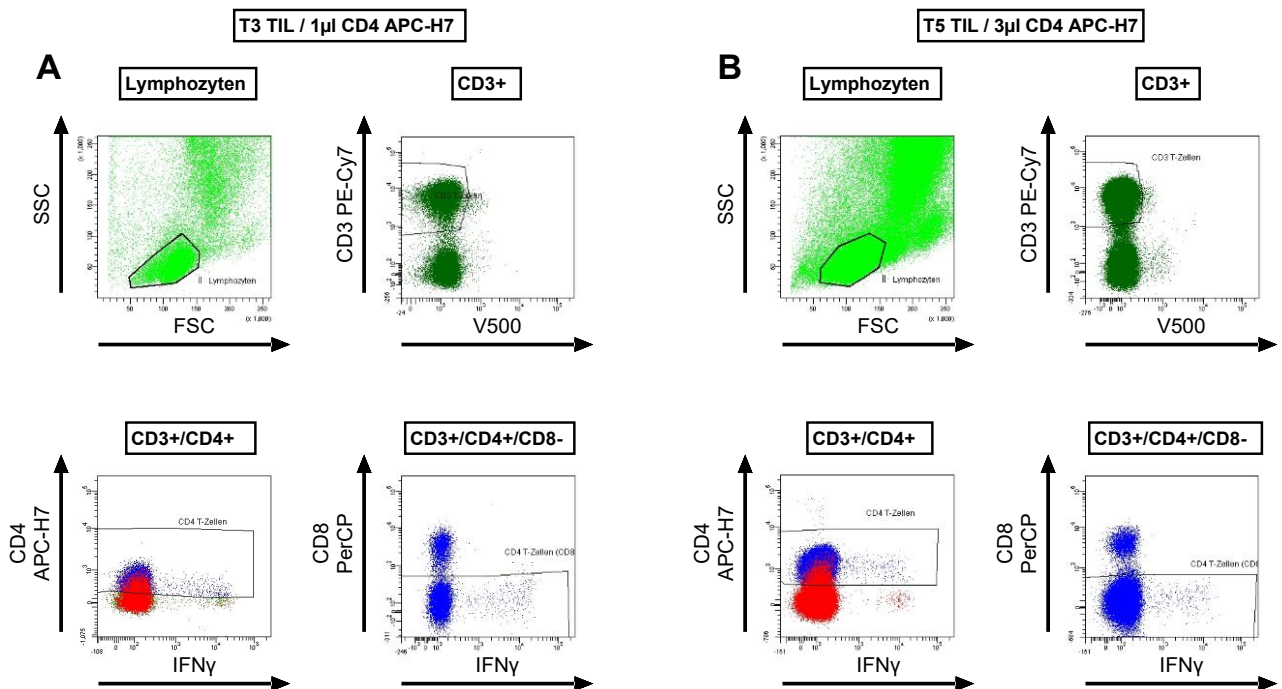


Abbildung 47 Repräsentative Dotplots des Titrierungsversuches von anti CD4 APC-H7 zur Identifizierung von CD4 T-Zellen aus TIL. Dargestellt sind TIL nach Stimulation mit CMV-Antigen (BioWhittaker) von (A) Person T3 unter Verwendung von 1µl anti CD4 APC-H7 (B) TIL von Person T5 unter Verwendung von 3µl anti-CD4 APC-H7. Es wurden jeweils im Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) die Lymphozyten definiert. Mithilfe von CD3 wurden die T-Zellen definiert und daraus die CD4+ T-Zellen welche IFN γ + waren detektiert. Zur weiteren Diskriminierung wurden diese gegenüber CD8 aufgetragen und die CD3+/CD4+/CD8- Zellen selektiert.

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, inwieweit die Lagerung von Tumorgewebe in Medium (RPMI, 0,5% HUS, 1%P/S) bei 4°C im Kühlschrank und anschließende Prozessierung und Stimulation (nach Protokoll 2 in 4.3.3.2) Auswirkungen auf die Induktion von IFN γ und TNF α in CD4 und CD8 T-Zellen der TIL hatte. Es wurden entsprechend die im Lagerungsversuch isolierten Tumorzellen verwendet ((Abschnitt 5.4.2, T1: 19,5 Stunden; T2: 20 Stunden; T3: 23,5 Stunden). Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass nach der direkten Isolation von TIL Antigen-spezifische CD4 und CD8 T-Zellen nachgewiesen werden können, aber nach untersuchter Lagerungszeit bis zu 23,5 Stunden kaum noch zytokinpositive funktionell aktive T-Zellen vorhanden sind (Abbildung 48). Auch die kombinierte Stimulation der TIL in Vollblut (Beispiel der Gatingstrategie: Abbildung 49, nach Protokoll 1 in 4.3.3.1) zeigte einen reduzierten Anteil an zytokinpositiven Zellen sowie erniedrigten Anteil an CD39+ Zellen (Daten nicht gezeigt). Ein Nachweis Antigen-spezifischer T-Zellen nach Lagerung von Tumorgewebe in Medium (RPMI, 0,5% HUS, 1%P/S) bei 4°C im Kühlschrank war somit nicht möglich.

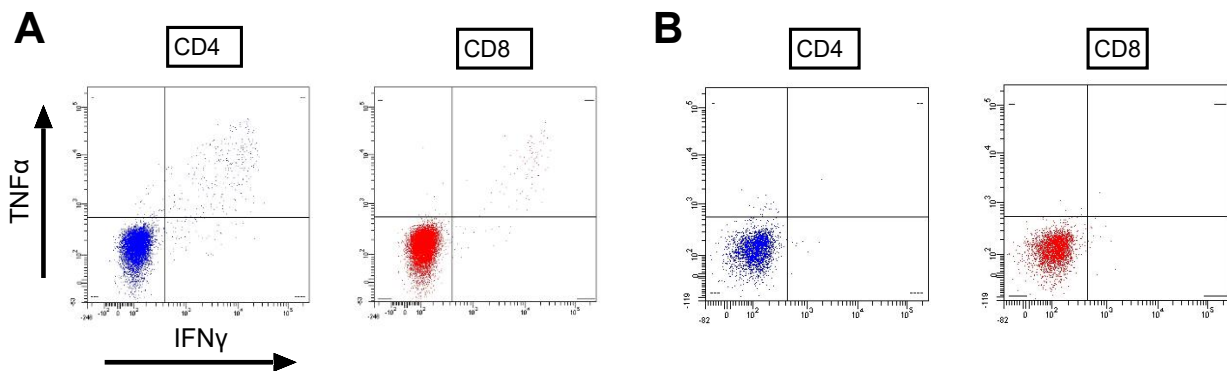


Abbildung 48 Repräsentative Dotplots der CMV-spezifischen CD4 und CD8 T-Zellen nach Stimulation isolierter Zellen aus Tumorgewebe von Person T3. TNF α + sowie IFN γ + CD4 und CD8 T-Zellen nach (A) direkter Prozessierung des Tumorgewebes und anschließender Stimulation sowie (B) nach 23,5 Stunden Lagerung des Tumorgewebes bei 4°C in Medium (RPMI, 0,5% HUS, 1%P/S) und anschließender Prozessierung und Stimulation. Dargestellt sind TNF α + und IFN γ + Zellen der CD4 und CD8 T-Zellen der TIL. Zur Stimulation wurde CMV-Ag verwendet (Biowhittaker).

Des Weiteren wurden die Frequenzen der CMV-reaktiven Zellen bei CMV-T-Zell positiven Personen für CD8 und CD4 T-Zellen der TIL und CD8 und CD4 T-Zellen aus peripherem Blut verglichen. Hierzu wurden TIL zum einen direkt stimuliert. Zum anderen erfolgte eine kombinierte Stimulation mit Vollblut derselben Person. Hierzu wurden die TIL vor der Stimulation mit anti-CD45 APC AK vorgefärbt, so dass nachfolgend eine Identifizierung der reaktiven Zellen aus TIL und aus Blut möglich ist.

Die Stimulationsreaktionen erfolgten unter Verwendung von CMV-Ag und Ko-Ag der Hersteller Biowhittaker und Virion (siehe auch Abschnitt 4.3.3). Hier zeigte sich, dass bei direkter Stimulation der TIL unter Verwendung von Ko-Ag der Firma Virion eine hohe Grundreaktivität bestand (Tabelle 32, TIL allein, Ko), während sich bei der Verwendung von Ko-Ag der Firma Biowhittaker keine wesentlich erhöhte Grundaktivität zeigte. Durch die hohe Grundreaktivität erscheinen die normierten Frequenzen für CMV-reaktive Zellen verfälscht, da sich bei Normierung negative Werte ergeben

können. Aufgrund dessen erschien die Verwendung von Antigen der Firma Virion für die Stimulation von TIL nicht geeignet. Bei alleiniger Stimulation der T-Zellen in Vollblut sowie bei Stimulation von TIL in Vollblut bestand das Problem der erhöhten Basisreaktivität für Ko-Ag von Virion nicht. Dennoch wurde in weiterführenden Experimenten auf die Verwendung von Virion Antigenen für die Stimulation von TIL verzichtet (Tabelle 32).

Tabelle 32 Frequenzen der CMV reaktiven CD8 und CD4 T-Zellen nach Stimulation der TIL

Tumor	Zellpopulation	TIL allein						TIL in Vollblut						Vollblut								
		BW			Virion			TIL			Vollblut			Virion								
		Ko	CMV	normiert (CMV-Ko)	Ko	CMV	normiert (CMV-Ko)	Ko	CMV	normiert (CMV-Ko)	Ko	CMV	normiert (CMV-Ko)	Ko	CMV	normiert (CMV-Ko)	Ko	CMV	normiert (CMV-Ko)			
																				Ko	CMV	normiert (CMV-Ko)
T3	CD4	0,2	3,8	3,6	5,8	6,2	0,4	0,0	3,1	3,1	0,1	6,1	6,0	0,0	1,4	1,4	0,0	3,6	3,6	0,0	5,6	5,6
	CD8	0,1	1,0	0,9	5,0	4,0	-1,0	0,0	1,8	1,8	0,0	3,7	3,7	0,0	6,2	6,2	0,0	9,8	9,8	0,0	11,2	11,2
T5	CD4	0,1	0,6	0,5	0,3	0,6	0,3	0,0	0,2	0,2	0,0	0,5	0,5	0,0	0,1	0,1	0,0	0,2	0,2	0,0	0,2	0,2
	CD8	0,0	0,2	0,2	0,3	0,3	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,2	0,2	0,0	0,9	0,9	0,0	0,8	0,8	0,0	2,0	2,0
T9	CD4	0,0	2,6	2,6	3,0	7,8	4,8	0,0	2,3	2,3	0,0	4,1	4,1	0,0	1,3	1,3	0,0	2,6	2,6			
	CD8	0,1	2,0	1,9	3,0	8,4	5,4	0,0	6,6	6,6	0,1	9,7	9,6	0,1	5,0	4,9	0,1	5,5	5,4			

Die Stimulation der TIL erfolgte direkt oder in Kombination mit Vollblut unter Verwendung von Antigenen der Hersteller Biowhittaker (BW) oder Virion.

Für die Stimulation von TIL in Vollblut wurden anfangs eine Millionen Zellen nach Aufreinigung mittels Dichtegradienten je Stimulationsansatz (Ko-Ag, CMV-Ag, SEB) verwendet. Die TIL wurden gemäß Protokoll mittels anti-CD45 APC vorgefärbt. In der Durchflusszytometrischen Messung waren die IFN γ + TIL gegenüber den Lymphozyten aus Vollblut jedoch nur unzureichend abzugrenzen (Abbildung 49).

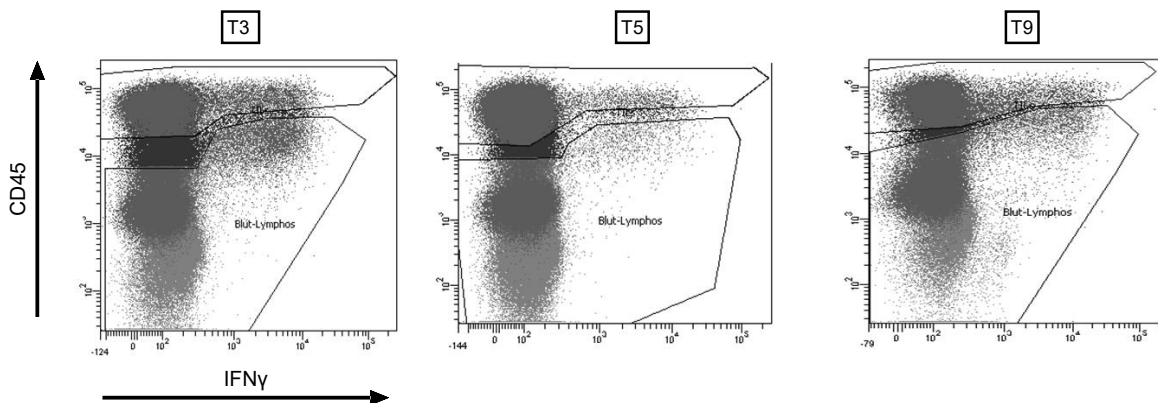


Abbildung 49 Repräsentative Dotplots der IFN γ + Lymphozyten der TIL sowie aus Vollblut nach Vorfärbung der TIL mittels anti CD45 APC. Dargestellt sind die durchflusszytometrischen Messungen von Person T3, T5 und T9. CD45 APC ist gegen IFN γ FITC aufgetragen. Im oberen Gate befinden sich die Lymphozyten der TIL, im unteren die Lymphozyten aus Vollblut.

Daraufhin wurden zwei Optimierungsschritte durchgeführt. Im ersten Schritt wurde die Menge von anti-CD45 APC titriert. Hier zeigte die Verwendung von 0,125 μ l, 0,25 μ l sowie 0,5 μ l jedoch keine wesentlich verbesserte Unterscheidung (Abbildung 50). Im zweiten Schritt wurde die Anzahl an

verwendeten TIL in der kombinierten Stimulation variiert. Hier zeigt sich unter Verwendung von 0,5 Millionen Zellen eine gute Diskriminierung zwischen TIL und Lymphozyten aus dem Blut, sodass diese für weitere Versuche beibehalten wurde (Abbildung 51). Exemplarisch ist dort auch die Färbung und Auswertung der CD39+ CD4 und CD8 T-Zellen der TIL und aus peripherem Blut dargestellt in Kombination mit der Expression der Zytokine IFN γ und TNF α .

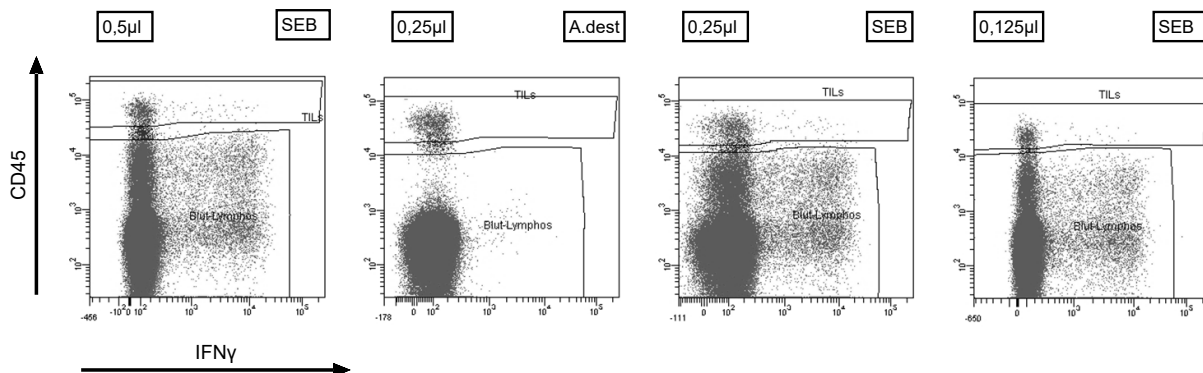


Abbildung 50 Repräsentative Dotplots der IFN γ + Lymphozyten der TIL sowie aus Vollblut nach Vorfärbung der TIL mittels anti CD45 APC. CD45 APC ist gegen IFN γ FITC aufgetragen. Im oberen Gate befinden sich die Lymphozyten der TIL, im unteren die Lymphozyten aus Vollblut. Dargestellt sind die durchflusszytometrischen Messungen von Person T12. Von links nach rechts nimmt die Menge an verwendeten anti-CD45 APC ab (linker Zahlenwert über dem jeweiligen Dotplot). Das zur Stimulation verwendete Antigen SEB und die Kontrolle mit Aqua destillata (A. dest.) sind rechts oberhalb des jeweiligen Dotplots aufgelistet.

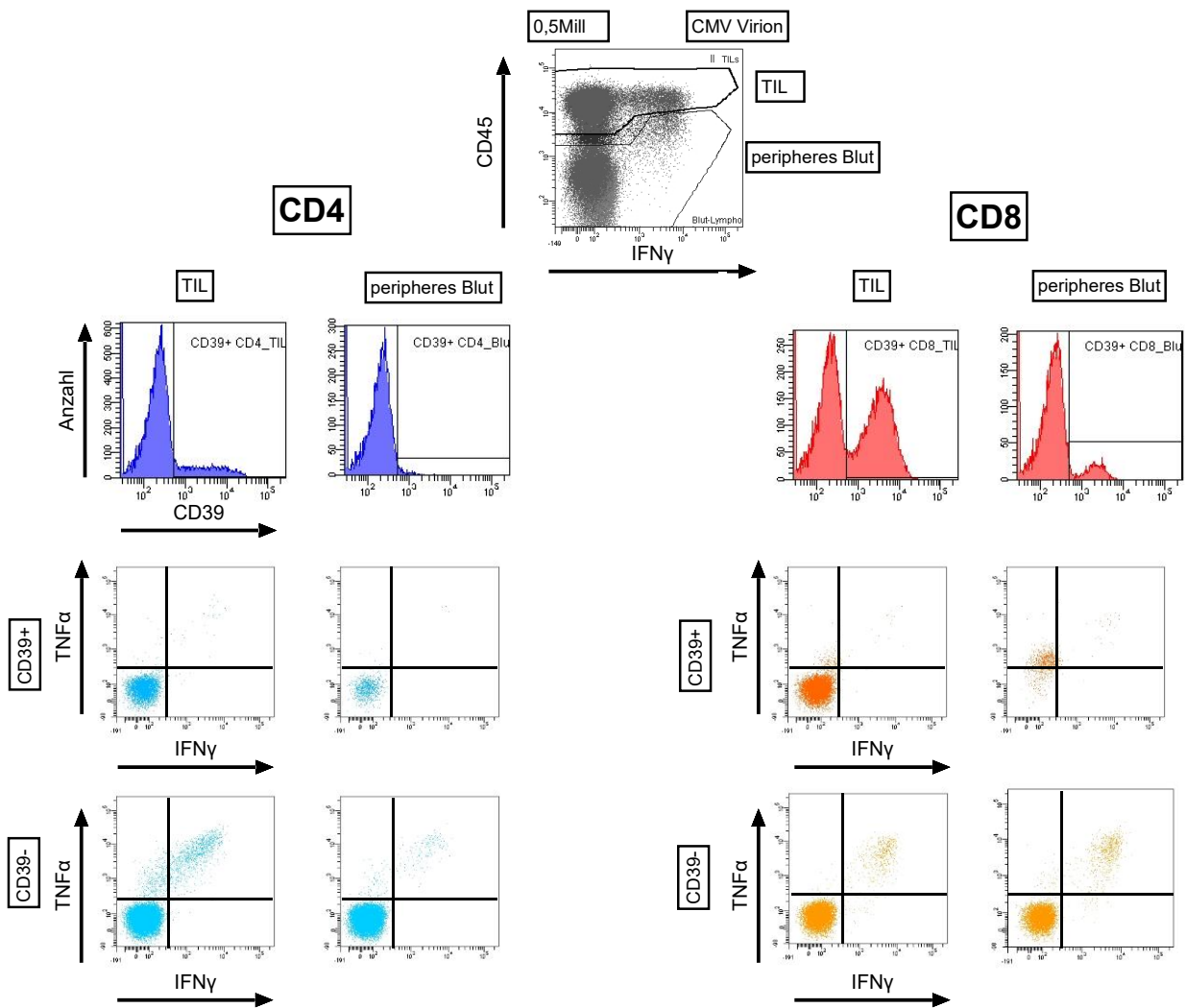


Abbildung 51 Repräsentative Dotplots der CMV reaktiven Lymphozyten der TIL sowie aus Vollblut unter Verwendung von 0,5 Millionen TIL. CD45 APC ist gegenüber IFN γ aufgetragen. Im oberen Gate befinden sich die Lymphozyten der TIL, im unteren die Lymphozyten aus Vollblut. Dargestellt sind die durchflusszytometrischen Messungen von Person T18 nach Stimulation mit CMV-Antigen (Virion). Zudem ist die Expression von CD39 gegenüber der gezählten Anzahl der Events im Histogramm für die jeweiligen CD4 und CD8 T-Zellen der TIL und aus peripherem Blut aufgetragen. Davon wurde wiederum die IFN γ + und TNF α + der CD39+ und CD39- CD4 und CD8 T-Zellen der TIL und aus peripherem Blut in den Dotplots dargestellt.

Des Weiteren wurde die Lagerungsfähigkeit der isolierten TIL in Medium überprüft. Hierzu wurden von T19 TIL isoliert und ein Teil direkt nach PBMC-Protokoll bearbeitet. Für den zweiten Teil wurden die TIL nach 14-stündiger Lagerung nach PBMC-Protokoll verarbeitet. Hier zeigt sich nach 14 Stunden Lagerung eine leichte Zunahme der IFN γ -/TNF α + sowie IFN γ + /TNF α + bei verringertem Anteil der IFN γ -/TNF α + und IFN γ -/TNF α - sowohl für CD4 als auch CD8 T-Zellen. Der prozentuale Anteil der CD4 und CD8 T-Zellen war weitgehend stabil (Daten nicht gezeigt). Abschließend wurde noch die benötigte Menge an TIL für eine Stimulation nach PBMC-Protokoll untersucht. Hierbei wurden 1, 0,5, 0,25, und 0,125 Millionen TIL mit SEB stimuliert. Hierbei zeigte sich bei Verwendung von 1 Millionen Zellen knapp über 15842 T-Zellen bei 0,5 Millionen TIL 8339 T-Zellen, bei 0,25 Millionen TIL: 4481 T-Zellen sowie bei 0,125 Millionen TIL 2043 T-Zellen. Entsprechend reduzierte sich die Anzahl der T-Zellsubgruppen (Daten nicht gezeigt). Wie bereits oben beschrieben ist für die Detektionen von kleinen Zellpopulationen mit 1% Anteil eine erforderliche Mindestanzahl von T-

Zellen >3000 notwendig, um verlässliche Aussagen treffen zu können und somit eine erforderliche Mindestmenge an TIL von 0,25 Millionen. Mithilfe der oben aufgeführten Untersuchungen war eine Optimierung der Bearbeitungs-, Färbe-, als auch Stimulationsprotokolle notwendig. Leider standen über die 20 Tumore, welche bearbeitet wurden, hinaus kein weiteres Probenmaterial zur Verfügung, sodass weiterführende Untersuchungen insbesondere sinnvolle statistische Auswertung in einer größeren Kohorte leider nicht möglich waren.

6 Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Merkmale von T-Zellen von Personen, welche an einem Melanom oder Nierenzellkarzinom erkrankt waren, näher untersucht. Bei Personen mit Melanom zeigten sich interessante Beobachtungen und erste Ausblicke zu Veränderungen der Immunzellen unter Therapie mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren. Des Weiteren wurden bei Personen mit Nierenzellkarzinom nicht nur Charakteristika von Immunzellen aus peripherem Blut, sondern auch von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten herausgearbeitet. Hierzu wurde ein bereits etabliertes Protokoll zur Isolation und Stimulation von T-Zellen auf die besonderen Bedingungen der TIL untersucht und weiter optimiert.

6.1 T-zelluläre Charakteristika von Personen mit Melanom

Bei Personen mit Melanom wurden die T-zellulären Charakteristika in Abhängigkeit von der Medikation mit Nivolumab und Pembrolizumab, unter Therapie, im Therapieverlauf, bezüglich des Therapieansprechens und dem Auftreten von autoimmunen Nebenwirkungen untersucht.

6.1.1 T-Zelldifferenzierung, Proliferationskapazität, Expression der Immun-Checkpointmoleküle und CD39 der T-Zellen von Personen mit Melanom

Insgesamt zeigte sich in unseren Untersuchungen für Personen mit Melanom eine über alle Lymphozytensubpopulationen erniedrigte Zellzahl im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Auch der relative Anteil an Lymphozyten von Leukozyten war erniedrigt. Interessanterweise wiesen Personen mit Melanom einen erhöhten Anteil regulatorischer T-Zellen auf. In einer anderen Arbeit zeigte sich ebenfalls ein erhöhter Anteil an regulatorischen T-Zellen (CD4+FOXP3+ T-Zellen) für Personen mit Melanom gegenüber gesunden Kontrollen, wobei hier keine Veränderungen der Lymphozytenzahl beschrieben wurde (HUANG et al., 2017). Eine reduzierte T-Zellzahl bei immuntherapienaiven Personen mit Melanom im Stadium IV gegenüber gesunden Kontrollen ließ sich bereits in einer vorherigen Untersuchung bestätigen (VAN DEN BROM et al., 2018).

Betrachtet man den Differenzierungsstatus der CD4 und regulatorischen T-Zellen, so zeigten Personen mit Melanom einen signifikant erhöhten Anteil an stärker differenzierten T-Zellen gegenüber gesunden Kontrollen. In einer Studie von kryokonservierten PBMCS von Personen mit Melanom im Stadium IV vor Ipilimumab Therapie waren naive T-Zellen mit 38,2%, CM mit 26,5%, EM mit 23,6% der CD4 T-Zellen nachweisbar, wobei TEMRA bei den CD4 T-Zellen vollständig fehlten. Für die Differenzierung der CD8 T-Zellen zeigten sich naive mit 23,3%, CM mit nur 2,5% EM mit 23,6% sowie TEMRA mit 23,8% der CD8 T-Zellen. Ein Vergleich zu gesunden Kontrollen wurde hier jedoch nicht gezogen (WISTUBA-HAMPRECHT et al., 2017). In unserer Studie ließen sich die Differenzierungsmuster auch teilweise für CD8 und CD4 T-Zellen feststellen, wobei sich TEMRA CD4 T-Zellen detektieren ließen. Für CD8 T-Zellen ließen sich in unseren Untersuchungen gegenüber gesunden Kontrollen keine signifikanten Unterschiede feststellen. In einer anderen

Studie wurde der T-Zell-Differenzierungsstatus von immuntherapienaiven Personen mit Melanom im Stadium IV (n=34) mit altersadaptierten Kontrollen verglichen. Hier zeigte sich für jüngere Personen (<50 Jahre; n=11) ein signifikant geringerer Anteil an naiven CD4 T-Zellen mit signifikant erhöhten Anteilen an CM und EM CD4 T-Zellen gegenüber gesunden Kontrollen. Für die Gruppe der älteren Personen (>65 J Jahre; n=23) ließen sich diese Unterschiede nicht feststellen (VAN DEN BROM et al., 2018). In der Studie wurden allerdings keine Personen im Alter von 50-65 Jahren untersucht, obwohl die Inzidenz des Melanoms in diesem Alter hoch ist. Diese Ergebnisse stehen zum Teil mit unseren Beobachtungen im Einklang, wobei in unserem Kollektiv das mediane Alter $62,27 \pm 15,20$ betrug und keine Unterscheidung in jüngere und ältere Personen vorgenommen wurde. Fehlende Unterschiede bezüglich des Differenzierungsstatus von CD8 T-Zellen bestätigten sich in unseren Untersuchungen. Generell überwiegen in jungen Jahren in der T-Zelldifferenzierung naive T-Zellen mit der größten Kapazität zur Immunantwort auf neue Antigene und Entwicklung von regulatorischen T-Zellen, wobei mit Adoleszenz die Gedächtnis-T-Zellen als prädominanter Anteil zunehmen und über Jahrzehnte stabil bleiben. Mit zunehmendem Lebensalter tritt eine Immunseneszenz mit sinkender T-Zell-Funktionalität ein. In anderen Untersuchungen ließ sich anhand von Vakzinierungen gegenüber Gelbfieber, Influenza und Pocken in der T-Zell-Differenzierung kurz nach Antigenkontakt eine Expansion der Effektor T-Zellen feststellen, welche mit der Antigenlast korrelierte. Im Anschluss formierten sich Gedächtnis-T-Zellen, welche über Jahre nach Antigenkontakt nachweisbar waren (KUMAR et al., 2018). Bisherige Studien zeigten, dass im Kompartiment der Gedächtnis-T-Zellen sowohl CM als auch EM T-Zellen nach Stimulation IL-2 und Effektorzytokine produzieren, jedoch überwiegte in den CM T-Zellen eine hohe Proliferationsaktivität und Fähigkeit zur Migration in lymphatisches Gewebe, gegenüber überwiegender Produktion von Effektorzytokinen bei den EM T-Zellen (GATTINONI et al., 2011; SALLUSTO et al., 1999; WILLINGER et al., 2005). Im Gegensatz zu dem Kompartiment der Effektor T-Zellen, welche nach Antigenkontakt und erfolgter Immunantwort mit Antigenkontrolle eine schnelle Reduktion erfahren, können TEMRA T-Zellen in Zirkulation verbleiben. Der dominierende Anteil der TEMRA ist vor allem durch CD8 T-Zellen gekennzeichnet. Diese wiesen eine hohe Kapazität zur IFN γ Produktion auf, mit geringer Proliferationskapazität und korrelieren z.B. mit persistierenden CMV-Infektionen (LARBI, FULOP, 2014). Im Kontext dessen könnte der erhöhte Anteil an höher differenzierten T-Zellen bei Personen mit Melanom gegenüber gesunden Kontrollen in unseren Beobachtungen für eine höhere Auseinandersetzungen des Immunsystems mit Antigenen stehen und durch die maligne Erkrankung bedingt gewesen sein. Des Weiteren wäre auch denkbar, dass ein erniedrigter Anteil an naiven T-Zellen die maligne Erkrankung begünstigte. Interessant wären diesbezüglich Differenzierungsmuster der T-Zellen von Erkrankten vor Entstehung/Detektion der malignen Erkrankung, wobei dies per se durch die vergleichsweise niedrige Inzidenz des Melanoms und Nicht-Vorhersagbarkeit für das jeweilige Individuum kaum zu realisieren wäre. Die in unseren Daten dargestellte Detektion von TEMRA CD4 T-Zellen könnte ein Hinweis für eine Auseinandersetzung

des Immunsystems sein, wobei in unserer Analyse die Melanom-Antigen-spezifischen T-Zellen nicht erfasst wurden.

Insgesamt wiesen Personen mit Melanom ein T-Zell-Differenzierungsmuster auf, welches man bei älteren Individuen erwarten würde. Dies könnte auch als Hinweis für eine Neigung zu einer Immunseneszenz der Erkrankten gewertet werden. Unter ICPI-Therapie zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der T-Zell-Differenzierungsmuster, welche ICPI-Therapie assoziierte Veränderungen eher unwahrscheinlich machen und eher auf eine mit der malignen Erkrankung Melanom assoziierte Veränderung im T-Zell-Differenzierungsmuster hinweist.

Personen mit Melanom wiesen einen signifikant erhöhten Anteil an Ki67+, also kürzlich proliferierter CD8, CD4 und regulatorischer T-Zellen gegenüber gesunden Kontrollen auf. Dies deckt sich mit vorherigen Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen bei CD8 und regulatorische T-Zellen und könnte als weiterer Hinweis für eine aktive Auseinandersetzung der T-Zellen mit Antigenen gewertet werden (HUANG et al., 2017). Für die CD39+ Zellen zeigte sich ein signifikant erhöhter Anteil an CD4 und regulatorischen T-Zellen bei Personen mit Melanom gegenüber gesunden Kontrollen. Eine erhöhte Expression von CD39 zeigte sich in anderen Untersuchungen auch auf CD8 T-Zellen der TIL bei Mammakarzinom und Melanom und repräsentierte dort einen erschöpften Phänotyp mit gestörterer Zytokinproduktion (CANALE et al., 2018).

6.1.2 Personen mit Melanom unter Therapie und im Therapieverlauf

Bei Personen mit Melanom im Stadium III A, B, C sowie Stadium IV fanden bei vergleichbaren Therapieerfolg die beiden anti-PD-1-Antikörper Nivolumab und Pembrolizumab Anwendung. Es ließen sich keine relevanten Unterschiede der T-zellulären Charakteristika in Abhängigkeit der Medikamente (Nivolumab oder Pembrolizumab) feststellen. Zwischen Personen vor und unter ICPI zeigten sich hinsichtlich Lymphozytensubpopulationen und T-Zell-Differenzierungsstatus, bis auf einen erniedrigten Anteil an regulatorischen T-Zellen unter Therapie, keine Unterschiede. Im Median befanden sich hier Personen unter ICPI-Therapie im 8. Zyklus.

In der longitudinalen Evaluation der 10 Personen mit Melanom nahm die absolute Zellzahl an Leukozyten, Lymphozyten, CD8, CD4 und regulatorischen T-Zellen im Therapieverlauf ab, mit signifikanten Änderungen zum Vorwert, vor allem im Vergleich des 4. Zyklus. Im grafischen Verlauf sind die Änderungen nach Beginn der Therapie wahrscheinlich am stärksten, jedoch ohne Signifikanz im gepaartem nicht-parametrischen Test (Wilcoxon). Für die relativen Zellzahlen sinkt der Anteil an Lymphozyten im Therapieverlauf, während der Anteil an CD4 T-Zellen steigt und T-Zellen insgesamt, CD8 und regulatorische T-Zellen insgesamt weitgehend stabil bleiben. Eventuell zeigen sich ausschließlich in der frühen Phase der Therapie signifikante Änderungen in der Anzahl der Leukozyten und Lymphozyten, weshalb sich die Unterschiede im einfachen Vergleich vor und unter Therapie überwiegend bis auf die regulatorischen T-Zellen nicht signifikant darstellten.

In bisherigen Untersuchungen ließen sich bei Personen mit Melanom im Stadium IIIc und IV für Lymphozyten und T-Zellsubpopulationen mit Ausnahme von PD-1+ regulatorischen T-Zellen keine signifikanten Unterschiede feststellen. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu unseren Untersuchungen im Therapieverlauf (GAMBICHLER et al., 2020). In unseren Daten ergab sich für PD-1 ein signifikant geringerer Anteil an PD-1+ CD8, CD4 und regulatorischen T-Zellen und eine erniedrigte MFI von PD-1 auf CD8 T-Zellen unter ICPI-Therapie gegenüber vor ICPI-Therapie. Eine zu der PD-1 Expression unerwartete Entwicklung ließ sich hingegen für CTLA-4 beobachten. Unter ICPI-Therapie war der Anteil an CTLA-4+ CD8, CD4 und regulatorischen T-Zellen gegenüber vor ICPI signifikant erhöht. Die Beobachtung hinsichtlich PD-1 ließen sich auch in der longitudinalen Evaluation mit einer Abnahme des PD-1 Anteils und der MFI auf allen T-Zellsubpopulationen bestätigen, mit signifikanten Änderungen zwischen Therapiestart und dem 3. und 4. Zyklus (PD-1 Anteil) sowie dem 4. Zyklus (MFI). Dies bestätigt die Ergebnisse bisheriger Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe, wobei eine Abnahme der PD-1+ und Zunahme der CTLA-4+ regulatorischen T-Zellen nach dem ersten Zyklus Nivolumab beschrieben wurde. Zusätzlich war dort eine signifikante Abnahme der PD-1+ regulatorischen T-Zellen ein signifikanter Prädiktor für ein verbessertes progressionsfreies Überleben und Melanom-spezifischen Tod (GAMBICHLER et al., 2020).

Des Weiteren zeigte sich in unseren Auswertungen unter ICPI-Therapie der Anteil an kürzlich proliferierten regulatorischen T-Zellen gegenüber vor ICPI-Therapie erhöht. Die erhöhte Rate an Ki67+ Zellen steht im Einklang mit anderen Untersuchungen in Mausmodellen als ein Ausdruck für eine allgemein höhere Aktivität und T-Zell Rekonstitution unter der ICPI-Therapie und ließ sich bereits in anderen Studien für Personen unter ICPI-Therapie bestätigen (BLACKBURN et al., 2009; HUANG et al., 2019; HUANG et al., 2017; KAMPHORST et al., 2017; KOVACSOVICS-BANKOWSKI et al., 2024). Dort wurden die Veränderungen von Ki67 der ICPI-Therapie mit PD-1 Inhibitoren zugerechnet. Ungefähr 3 Wochen nach der PD-1 Inhibitor Behandlung stieg die Anzahl der Ki67+ wobei dies vor allem CD8 T-Zellen CD45RA^{niedrig} CD27^{hoch} mit hoher Expression für CTLA-4, 2B4 oder PD-1 waren. Zudem zeigten diese einen erschöpften Phänotyp mit Expression von Eomes^{hoch} und T-bet^{niedrig} wobei sich in der Vergleichsgruppe mit gesunden Kontrollen ein Effektor Phänotyp der CD8 T-Zellen mit Eomes^{hoch}, T-bet^{hoch} und CD27^{niedrig}. Ein Anstieg von Ki67 ließ sich auch für CD4 T-Zellen (FOXP3+ als auch FOXP3-) feststellen, wobei sich keine Korrelation zu dem klinischen Ansprechen ergab. Des Weiteren zeigten Ki67+ CD8 T-Zellen eine starke Korrelation mit der Tumorlast welche unter Therapie (nach 3 Wochen) als auch vor Therapie detektierbar war, sodass die Autoren von einer prätherapeutischen anti-tumoralen CD8 T-Zellen Antwort in Abhängigkeit von der Tumorlast ausgehen, welche durch die PD-1 Therapie moduliert wird (HUANG et al., 2017).

In unserer longitudinalen Evaluation ließ sich nach polyklonalem Stimulus eine signifikante Abnahme der IFN γ + und der TNF α + IL-2+ CD8 T-Zellen beobachten, wohingegen die multifunktionalen

dreifach positiven CD8 T-Zellen nach dem ersten Zyklus signifikant zunahm. CD4 T-Zellen zeigten im Therapieverlauf nach polyklonalem Stimulus eine signifikante Zunahme der IFN γ + / TNF α + Zellen.

In anderen Studien ließen sich Zytokinmuster mit Antigen-Eliminierung und -Persistenz assoziieren. IL-2+ CD4 T-Zellen mit hoher Proliferation waren mit einer hohen Eliminierung des Antigens und niedrigen Antigenkonzentrationen assoziiert. Bei persistierender Antigenexposition mit niedrigen Antigenkonzentrationen zeigte sich bereits in anderen Arbeiten bei erhaltener Proliferationskapazität ein polyfunktionales Zytokinmuster bestehend aus IL-2+, IL-2+/IFN γ +, IFN γ + CD4 T-Zellen sowie IL-2+/IFN γ +, IFN γ + CD8 T-Zellen mit CD4 unabhängiger IL-2 medierter Proliferation. Die Antigenpersistenz mit hohen Antigenkonzentrationen sowie erstmaliger Antigenexposition, Antigenreexposition mit hohen Antigenkonzentrationen war gezeichnet durch eine eingeschränkte Proliferationsfähigkeit sowie Fehlen der CD4 T-Zell-unabhängigen Proliferation der CD8 T-Zellen und einem Zytokinprofil dominiert durch IFN γ + CD4 und CD8 T-Zellen (HARARI et al., 2005; PANTALEO, HARARI, 2006). Abhängig von der T-Zell-Differenzierung ist bereits in anderen Studien gezeigt worden, dass CM CD4 T-Zellen vor allem eine IL-2 dominierte, in geringem Maße auch IL-2+/IFN γ + Zytokinsignatur aufwiesen, während EM CD4 T-Zellen ein breiteres Zytokinprofil mit IL-2+, IL-2+/IFN γ + sowie IFN γ + aufwiesen. Dem gegenüber wiesen TEMRA vor allem eine IFN γ geprägte Zytokinsignatur auf. Die Zytokinsignatur von CD8 T-Zellen verhielt sich ähnlich, wobei hier keine isoliert IL-2+ Zellen beobachtet wurden (PANTALEO, HARARI, 2006). Im Rahmen einer T-Zellerschöpfung wurde bereits in anderen Untersuchungen eine Abnahme oder ein Verlust der IL-2 Expression gefolgt von der zusätzlichen Abnahme von TNF α und einer konsekutiv IFN γ geprägten Zytokinsignatur beobachtet (KANNANGANAT et al., 2007; WHERRY et al., 2003). Eine IFN γ dominierte Signatur mit Verlust von IL-2+ T-Zellen ließ sich z.B. bei CMV reaktiven Zellen bei Nierentransplantierten mit einer hohen CMV-Virämie zeigen (SESTER et al., 2008b). Ähnliches ließ sich auch für CD8 T-Zellen feststellen (WHERRY et al., 2003).

In unseren Untersuchungen zeigten sich dezente Veränderungen in den Zytokinprofilen. Insgesamt könnten die Veränderung in der Zytokinsignatur mit Abnahme der IFN γ + und der TNF α + / IL-2+ und Zunahme der multifunktionalen (dreifach positiven) CD8 T-Zellen für einen Rückgang eines Kompartiments mit erschöpftem Phänotyp sprechen, mit gleichzeitiger Unterstützung/Rekonstitution eines multifunktionellen Phänotyps. Die einzelne Zunahme der IFN γ + / TNF α + CD4 T-Zellen könnten für einen Effektor-T-Zellphänotyp sprechen. Insgesamt sind die Veränderungen jedoch zu gering und die Aussagekraft durch die kleine Probandenzahl von 10 Personen sowie die inhomogen vorliegende Anzahl an Messwerten eingeschränkt, sodass sich hieraus keine allgemeingültigen Schlüsse ziehen lassen. Insgesamt ergeben sich jedoch vielversprechende Ausblicke zur weiteren Beobachtung der Zytokinexpression unter ICPI-Therapie.

6.1.3 Personen mit Melanom in Abhängigkeit des Therapieansprechens

Personen mit Melanom in der Gruppe der Non-Responder wiesen in unseren Daten einen signifikant geringeren Anteil der absoluten sowie der relativen Lymphozytenzahl gegenüber den Respondern auf. Zudem zeigte sich ein Trend zu geringerer absoluter Anzahl an CD4 und regulatorischen T-Zellen jedoch ohne Signifikanz. In bisherigen Untersuchungen zeigte sich der mediane Anteil der regulatorischen T-Zellen um den Faktor 1,5 bei den Respondern verändert, ohne jedoch Signifikanz zu erreichen (GAMBICHLER et al., 2020).

Der signifikant geringere Anteil an Lymphozyten in der Gruppe der Non-Responder gegenüber Respondern bei Personen mit Melanom unter ICPI-Therapie ließ sich in einer anderen Studie bestätigen, wobei die Trends zu weniger CD4 T-Zellen und regulatorischen T-Zellen nicht bestanden (KREBS et al., 2021). Die Studienmedikation Ipilimumab, ein CTLA-4 Inhibitor unterschied sich jedoch zu unserem Kollektiv welches durch eine PD-1 gerichtete Inhibition (n=47/47) dominiert war. Für andere Karzinome wie das papilläre und klarzellige Nierenzellkarzinome zeigte sich in anderen Publikationen ein signifikanter Zusammenhang einer Lymphopenie, assoziiert mit einem schlechteren progressionsfreien Überleben und Gesamtüberleben (MEHRAZIN et al., 2015; SAROHA et al., 2013). Womöglich besteht eine Assoziation einer geringeren Lymphozytenzahl verbunden mit einem schlechteren Ansprechen, wobei unsere Untersuchungen aufgrund der Studiengröße limitiert sind und dies einer Verifizierung in größeren Kollektiven bedarf.

Interessanterweise präsentierte sich in unseren Auswertungen ein signifikant höherer Anteil für die Gruppe der EM CD8 T-Zellen bei Respondern gegenüber Non-Responder. Im Rahmen der Checkmate-046 Studie, zeigte sich in Studienarm in dem Personen Nivolumab für 13 Woche erhielten, gefolgt von Ipilimumab, vor Therapiestart ein naiv-ähnlicher Phänotyp (CD45RO+, CD127+) der CD4 T-Zellen für Responder und nach 13 Wochen erhöhte CM-ähnliche (CD45RO+, CCR7+, CD127+, CD95+) CD4 und CD8 T-Zellen (WOODS et al., 2020). Bei Non-Responder zeigte sich vor Therapiestart ein erhöhter Anteil höher differenzierter Effektor CD4 T-Zellen (CD45RO+ CD95+) sowie CD45RO+ CD8 T-Zellen nach Nivolumab Therapie. (WOODS et al., 2020). In einer zu unserer Studie ähnlichen Kohorte mit Personen mit Melanom unter Nivolumab Monotherapie oder Ipilimumab mit Nivolumab Kombinationstherapie zeigte sich im Einklang mit unseren Ergebnissen bei Personen mit Therapieansprechen nach Behandlung eine erhöhte Monoklonalität im T-Zell-Rezeptor der CD8 T-Zellen welche positiv mit einem EM-Phänotyp und negativ mit einem naiven und TEMRA Phänotyp korrelierte (FAIRFAX et al., 2020). Zudem konnten andere Untersuchungen für Personen mit Melanom mit Therapieansprechen (anti-CTLA-4 und anti-PD-1 oder anti-PD-1 Monotherapie) eine Assoziation mit einem erhöhten Anteil an EM T-Zellen (EOMES+CD69+CD45RO) feststellen (GIDE et al., 2019). Dies ließ sich auch unter Ipilimumab Monotherapie bestätigen (WISTUBA-HAMPRECHT et al., 2017). Ein erhöhter Anteil an EM CD8 T-Zellen scheint somit in unseren Untersuchungen als auch der Literatur mit einem besseren Therapieansprechen assoziiert zu sein.

Bezüglich Ki67 ließen sich hinsichtlich des Therapieansprechens in unserem Kollektiv keine signifikanten Änderungen feststellen. Wohingegen eine hohe Ki67 Expression in PD-1+ CD8 T-Zellen in einer anderen Arbeit mit einer schlechteren Prognose assoziiert war. Zudem konnte dort als positiver Marker für ein Therapieansprechen eine erhöhte Ratio von Ki67+ CD8 T-Zellen zur Tumorlast (angegeben in Zentimeter des längsten Tumorachse) bereits in der 6. Woche nach Therapieinitiierung unter PD-1 Inhibitor eruiert werden (HUANG et al., 2017). Demgegenüber zeigte sich in einer anderen Studie die Rate der kürzlich proliferierten Ki67+ CD4 T-Zellen bei den Personen mit Therapieansprechen gegenüber den Personen ohne Therapieansprechen signifikant erhöht ($p=0.042$; (KREBS et al., 2021)), wobei jedoch die unterschiedliche Studienmedikation (PD-1 vs. CTLA-4 Inhibitor) zu beachten ist.

Während sich in unserer Studie hinsichtlich CD39+ T-Zellen keine Unterschiede zwischen Respondern und Non-Respondern ergaben, zeigte sich in einer anderen Arbeit eine gesteigerte Population von CD38+CD39+CD127–GARP– CD4+ T-Zellen in der Checkmate-046, assoziiert mit einer schlechteren Prognose, vor Therapie mit Nivolumab oder Ipilimumab bei Personen mit Melanom. Die Autoren schrieben dies der immunsuppressiven Wirkung von CD39 und CD38 zu (WOODS et al., 2020).

Interessanterweise ließ sich in einer anderen Arbeit eine Abnahme an PD-1+ regulatorischen T-Zellen als ein signifikanter Prädiktor für ein besseres progressionsfreies Überleben ($p=0.04$) und des Melanom spezifischen Todes feststellen ($p=0.017$; (GAMBICHLER et al., 2020)). Beachtenswert sind diesbezüglich die von uns entdeckten Unterschiede bezüglich PD-1. Für den Anteil an PD-1+ Zellen ließen sich in unserem Kollektiv im Querschnitt bezüglich des Therapieansprechens keine signifikanten Unterschiede detektieren. Jedoch wiesen Personen mit Therapieansprechen eine niedrigere MFI von PD-1 auf CD4 und regulatorischen T-Zellen gegenüber Personen ohne Therapieansprechen auf. Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen der Kollegen.

Der prozentuale Anteil und die MFI von PD-1 von regulatorischen und CD4 T-Zellen hängt anscheinend mit dem Ansprechen zusammen und sollte in weiteren Studien überprüft werden, da sich hierdurch mögliche Marker für das Ansprechen auf eine ICPI-Therapie ergeben könnten.

In unserer Auswertung ließ sich für Personen mit Therapieansprechen kein signifikanter Unterschied für CTLA4+ CD8, CD4 und regulatorischer T-Zellen eruieren. Dies steht im Einklang mit anderen Evaluationen, wobei die CTLA-4+ regulatorischen T-Zellen bei Responder die Hälfte der Non-Respondern betrug ohne Signifikanz zu erreichen (GAMBICHLER et al., 2020). Betrachtet man genauer die reaktiven CD8 T-Zellen so zeigte sich eine signifikant erhöhte CTLA-4 MFI nach polyklonalem Stimulus mit SEB für Personen mit Therapieansprechen gegenüber ohne Therapieansprechen. Generell nahm hingegen im Therapieverlauf die CTLA-4 MFI auf CD8 T-Zellen nach polyklonalem Stimulus im Verlauf tendenziell zu mit signifikanten Änderungen von Vorwert zu Zyklus 4. Für CD4 T-Zellen ließ sich eine ähnliche Tendenz feststellen. Im vermeintlichen Gegensatz dazu stehen Beobachtungen bei denen Responder signifikant weniger CTLA4+ CD4 T-Zellen

($p=0.032$) gegenüber Non-Responder aufwiesen. Hier Bedarf es jedoch der näheren Betrachtung des Studienkollektivs in dem der Anteil an einer Therapie mit Ipilimumab mit 60% und der Kombitherapie mit Ipilimumab und Nivolumab von 17% und somit des Zielmoleküls CTLA-4 von 77% hoch ist (KREBS et al., 2021). Dies mag vor allem am Einschlusszeitraum von 2014-2017 liegen, repräsentiert jedoch nicht die aktuell präferierten Therapieoptionen mit der Monotherapie von PD-1 Inhibitoren beziehungsweise der Kombitherapie Ipilimumab und Nivolumab, gefolgt von einer Erhaltungstherapie mit Nivolumab. Bedingt durch die aktuell präferierten Therapieoptionen war der Anteil an Personen mit der Zielstruktur PD-1 in unserem Kollektiv 100%, wobei 4 Personen zuvor eine Kombinationstherapie aus Ipilimumab und Nivolumab für 4 Zyklen erhielten. In bisherigen Studien unserer Arbeitsgruppe (LEDO et al., 2020; SCHUB et al., 2018a; SCHUB et al., 2015) konnten im infektiologischen Kontext T-Zellen mit erhöhter Expression von CTLA-4 assoziiert mit einer Antigen-Auseinandersetzung identifiziert werden. So war eine erhöhte CTLA-4 Expression auf VZV spezifischen T-Zellen bei Personen mit Herpes Zoster sowie auf reaktiven CD4 T-Zellen nach polyfunktionalem Stimulus erkennbar (SCHUB et al., 2015). Über dies war eine erhöhte CTLA-4 Expression auf VZV spezifischen T-Zellen als Marker für eine ZNS-Beteiligung bei VZV-Infektionen feststellbar (SCHUB et al., 2018a). Auch nach VZV-Vakzinierung konnte eine erhöhte CTLA-4 Expression identifiziert werden (LEDO et al., 2020). Insgesamt kann somit eine erhöhte CTLA-4 Expression als Hinweis für eine Antigenauseinandersetzung und Regulation einer weiteren T-Zell-Expansion gewertet werden. Die oben genannte erhöhte CTLA-4 MFI auf CD8 T-Zellen nach polyklonalem Stimulus bei Personen mit Therapieansprechen kann als Zeichen einer T-Zell Aktivierung und Regulation im Rahmen einer Antigenauseinandersetzung interpretiert werden. Die CTLA-4 MFI bietet somit ein lohnendes Ziel für weitere Untersuchungen bezüglich melanomspezifischer Antigen-reaktiver T-Zellen, insbesondere hinsichtlich der Verwendung als einfach zu erfassender Biomarker für ein Therapieansprechen.

Bei Personen ohne Therapieansprechen zeigte sich nach polyklonaler Stimulation der CD4 T-Zellen ein Zytokinprofil mit weniger TNF α + Zellen und erhöhtem Anteil an IFN γ +, IFN γ +/TNF α + sowie IFN γ +/IL-2+ Zellen. Für CD8 T-Zellen ließen sich nach polyklonaler Stimulation keine Unterschiede in der Zytokinsignatur feststellen. In der näheren Analyse der virusspezifischen, als Beispiel einer Antigen-spezifischen, T-Zellantwort ließen sich zwischen Personen mit und ohne Therapieansprechen keine Unterschiede bezüglich des CMV- und VZV-T-Zell-positiven Status feststellen. Der CMV T-Zell-Status betrug für Personen mit Melanom 57,1% welches einer erwarteten Rate von 56,7% in der deutschen Population sehr nahe kommt (LACHMANN et al., 2018). Bei den CMV-reaktiven CD8 T-Zellen wiesen Personen ohne Therapieansprechen einen signifikant erhöhten Anteil an IFN γ +, IFN γ +/IL-2+, bei erniedrigtem Anteil an IFN γ +/TNF α + Zellen auf. Für CMV-reaktive CD4 T-Zellen ließen sich keine Unterschiede feststellen. Für Personen ohne Therapieansprechen ließen sich signifikant mehr VZV-reaktive CD4 T-Zellen welche IFN γ oder IFN γ /IL-2 exprimierten detektieren. Eine Tendenz zu einer IFN γ geprägten Zytokinsignatur ließ sich somit in geringem Maße auch für die virusspezifische T-Zellantwort feststellen.

Eine Tendenz zu einer IFN γ + CD4 T-Zell Signatur könnte vereinbar sein mit einer Antigenpersistenz im Sinne eines fortbestehenden Tumors bei Personen ohne Therapieansprechen. Hier steht vor allem die Betrachtung der Zytokinprofile nach polyklonaler Stimulation im Vordergrund, da diese das gesamte T-Zell-Kompartiment und dessen generelle (unspezifische) Aktivität repräsentiert. In eingeschränkten Maßen zeigten sich auch geringe Veränderungen nach virusspezifischer als Beispiel einer Antigen-spezifischen T-Zell-Reaktion, gleicher Tendenz. In einer anderen Arbeit zeigte sich für Personen mit Melanom, nach Initiierung einer anti-PD-1-Inhibitor Therapie, eine T-Zell-Signatur bei Personen ohne Therapieansprechen mit signifikant niedriger TNF α und IFN γ Expression gegenüber Personen mit Therapieansprechen. Eine weitere Unterteilung in spezifische CD4 oder CD8 T-Zell oder Zytokinprofile wurde nicht durchgeführt. Vor Therapieinitiierung ließen sich keine Unterschiede feststellen. Die Autoren nahmen an, dass die gesteigerten TNF α Spiegel die zytotoxische antitumorale T-Zell-Antwort in Personen mit Ansprechen unter ICPI-Therapie unterstützen. Gesamtansprechen und Überleben waren zudem wesentlich geringer in Tumoren in denen Mutationen, die den TNF α Signalweg betreffen oder signifikant die Proteinfunktion dessen negativ beeinflussen, vorlagen. Die Exposition von hohen Konzentrationen von TNF α in-vitro erbrachte keine zytotoxischen Effekte, sodass die TNF α bedingten Effekte, nicht auf eine zytotoxische Funktion des TNF α an sich, sondern vor allem durch die ICPI-Therapie abhängige T-Zellfunktion bedingt seien (VREDEVOOGD et al., 2019). Überdies hinaus wurde in Melanom-Mausmodellen, bei denen TNF α die CD8 T-Zell-Migration in Tumorgewebe störte, eine TNF α -Blockade in Kombination mit einer anti PD-1 Therapie diskutiert (BERTRAND et al., 2017). Im Gegensatz dazu und im Kontext ihrer Ergebnisse sahen die Autoren eine Modulation des tumoralen intrazellulären TNF α Signalweges als vielversprechendes Ziel um die durch TNF α vermittelten zytotoxischen Effekte zu steigern (VREDEVOOGD et al., 2019). In einer anderen Studie konnten keine Unterschiede in der Ausschüttung von IFN γ zwischen Respondern und den Non-Respondern festgestellt werden (KREBS et al., 2021).

Die Annahme einer Assoziation zwischen Abnahme einer TNF α Signatur und verminderten Therapieansprechen lässt sich durch unsere Daten stützen. Bezüglich einer verminderten IFN γ Signatur ergeben sich in der Literatur verschiedene Beobachtungen, wobei sich in unserer Studie diese im Einklang mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen nicht belegen ließ. In unseren Untersuchungen wurde IFN γ auf T-Zellsubgruppenebene erfasst und eine IFN γ geprägte Signatur kann bei Persistenz des Antigens, im Kontext eines mangelnden Therapieansprechens mit verminderter Antigeneliminierung für unsere Daten diskutiert werden.

Die Stärken unserer Auswertung liegen in der Analyse der Zytokinprofile auf T-Zellsubgruppenebene und sind äußerst vielversprechend für die weitere Evaluation in größeren Kollektiven.

6.1.4 Autoimmune Nebenwirkungen bei Personen mit Melanom unter Immun-Checkpoint-Inhibitor Therapie

Trotz bahnbrechenden Erfolgen durch die ICPI-Therapie fehlen sowohl den Behandlern als auch den erkrankten Personen prädiktive Marker für das Therapieansprechen und das Auftreten autoimmuner Nebenwirkungen. Nicht nur für die individuelle Bedeutung, sondern auch für die optimale Therapiesteuerung (z.B. Umstellen auf BRAF/MEK-Inhibitor, Kombinationstherapie, Re-Challenge) und Angeboten von adjuvanten Therapien in frühen Stadien in Anbetracht von potenziellen schweren Nebenwirkungen sind solche Marker dringend wünschenswert. Bezüglich der autoimmunen Nebenwirkungen zeigten sich bei Personen mit Melanom und ICPI-Therapie für die absoluten als auch relativen Zellzahlen sowie der Differenzierung keine signifikanten Unterschiede. In anderen Arbeiten wurde dem hingegen eine erhöhte Frequenz naiver CD4 T-Zellen bei Personen mit schweren autoimmunen Nebenwirkungen bei erniedrigter Anzahl CD16+ NK-Zellen gegenüber Personen ohne autoimmune Nebenwirkungen und Personen mit Melanom im Stadium II-IV vor ICPI-Therapie festgestellt. Diese Veränderungen waren zudem assoziiert mit einem klinischen Ansprechen auf die ICPI-Therapie (KOVACSOVICS-BANKOWSKI et al., 2024). Überdies hinaus wurde eine zweifach erhöhte Frequenz von B-Gedächtniszellen bei Personen mit autoimmunen Nebenwirkungen gegenüber solchen ohne gefunden. Im Unterschied zu unserer Studie wurden die Analysen aus kryokonservierten PBMC massenspektrometrisch bestimmt (KOVACSOVICS-BANKOWSKI et al., 2024). Für Personen mit Adenokarzinom der Lunge konnte, in einer anderen Arbeitsgruppe mittels Einzelzell-RNA-Sequenzierung, eine Assoziation zwischen einer erhöhten Anzahl an CD4+ Th2-Zellen bei ICPI assoziierter Pneumonitis sowie einer erhöhten Anzahl Th17 Zellen bei ICPI assoziierter Thyreoiditis festgestellt werden (BUKHARI et al., 2023). Eine erhöhte Anzahl an Th1 sowie Th17 Zellen war des Weiteren mittels Durchflusszytometrie bei nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom sowie epithelialen Thymuskarzinom mit ICPI assoziierten Nebenwirkungen CTCAE Grad 3 und höher zu detektieren (KIM et al., 2020).

Hinsichtlich CTLA-4 zeigte sich in unseren Daten ein signifikant erhöhter Anteil an CTLA-4+ CD8 T-Zellen in der Gruppe mit autoimmunen Nebenwirkung gegenüber denen ohne autoimmune Nebenwirkungen. Dieses Ergebnis ist jedoch kritisch zu betrachten da sich im Therapieverlauf ein Anstieg bzw. Veränderungen der CTLA-4 Expression zeigten. Es ließen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede der ICPI - Zyklusanzahl zwischen den beiden Kollektiven feststellen, sodass hier kein Effekt zu erwarten gewesen wäre. Auf reaktiven CD4 und CD8 T-Zellen ließen sich keine Unterschiede bezüglich der CTLA-4 MFI feststellen. Eine erhöhte CTLA-4 Expression ließ sich in anderen Studien unserer Arbeitsgruppe im Kontext viraler (Erst-)Infektionen (z.B. CMV, VZV oder SARS-CoV-2) beobachten und war insgesamt ein Hinweis für eine aktive Auseinandersetzung mit dem Antigen (DIRKS et al., 2013; SCHUB et al., 2018c; SCHUB et al., 2015; SCHUB et al., 2020). Die Veränderungen der CTLA-4+ CD8 T-Zellen kann in dieser aktuellen Auswertung als Ausdruck

einer aktiven CD8 T-Zell-Antwort im Rahmen der autoimmunen Nebenwirkung interpretiert werden und bietet einen Ausgangspunkt für die Evaluation in zukünftigen Studien.

Personen mit autoimmunen Nebenwirkungen zeigten signifikant mehr CMV reaktive TNF α + CD8 T-Zellen in diesen aktuellen Daten. Für IL-2+ sowie IFN γ +/TNF α + CMV reaktive CD8 T-Zellen bestand eine Tendenz zu niedrigeren Anteilen ohne Signifikanz. Nach polyklonalem Stimulus mit SEB war der Anteil an TNF α +/IL-2+ CD4 T-Zellen bei Personen mit autoimmunen Nebenwirkungen signifikant niedriger. Unterschiede bezüglich des CMV T-Zell-Status gemessen anhand der CMV reaktiven Zellen ergaben sich in unserer Beobachtung nicht. Wie bereits von unserer Arbeitsgruppe gezeigt spielen multifunktionale T-Zellen eine wichtige Rolle in der Abwehr von Pathogenen z.B. CMV, *Mycobacterium tuberculosis* (SESTER et al., 2011; SESTER et al., 2008b). Wie zuvor beschrieben haben nach polyklonalem Stimulus CD4 T-Zellen üblicherweise ein Zytokinprofil bestehend vor allem aus TNF α +, TNF α +/IL-2+ und multifunktionalen (dreifach positiven) Zellen (SCHMIDT et al., 2014). In Nierentransplantierten Personen konnte in vorausgehenden Studien gezeigt werden, dass eine CMV-Virämie bei CMV reaktiven CD4 T-Zellen mit einem Phänotyp einhergeht, welcher eine erhöhte Expression von PD-1 bei deutlich reduzierter IL-2 Positivität aufweist. Des Weiteren war der Anteil an IFN γ + gegenüber PD-1 negativen T-Zellen reduziert. Dies war im Einklang mit einem PD-1 vermittelten erschöpften Phänotyp welcher nach PD-1 Blockade einen 10-fachen Anstieg der CMV reaktiven CD4 T-Zellen zeigte (SESTER et al., 2008b). Ebenso konnte bei Nierentransplantierten mit in der Vergangenheit klinisch relevanter Replikation des BK-Polyomavirus gegenüber solchen ohne relevante Replikation und gesunden Kontrollen ein verminderter Anteil polyfunktionaler CD4 T-Zellen beobachtet werden, wobei sich keine Unterschiede nach polyklonaler Stimulation hinsichtlich des Zytokinprofils ergaben (SCHMIDT et al., 2014).

Anscheinend weisen Personen mit autoimmunen Nebenwirkungen in der aktuellen Auswertung ein verändertes Zytokinprofil gegenüber solchen ohne autoimmune Nebenwirkungen auf, wobei die Veränderungen jedoch dezent sind. Zuvor konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass eine Auseinandersetzung mit bakteriellen und viralen Antigenen mit einem multifunktionalen Phänotyp mit einer Antigenkontrolle assoziiert ist, sodass ein Rückgang dieses Phänotyps wie er für Personen mit Melanom in Teilen in dieser Studie beobachtet wurde auf eine unkontrollierte Aktivierung ähnlich einer aktiven Erkrankung ohne ausreichende Antigenkontrolle bzw. hohe Antigenreplikation interpretiert werden könnte. Dies würde zu dem Vorliegen von autoimmunen Nebenwirkungen prinzipiell passen, bleibt jedoch in größeren Kollektiven zu überprüfen.

Eindeutig und überraschend zeigten sich die Ergebnisse bezüglich der Expression von CD39. So wiesen Personen mit Nebenwirkungen einen signifikant geringeren Anteil an CD39+ Zellen gegenüber Personen ohne Nebenwirkungen auf. Nach Antigen-spezifischer Stimulation mit CMV, VZV-Antigen und nach polyklonalem Stimulus ließen sich keine Unterschiede in dem Anteil an CD39+ T-Zellen feststellen. Dies steht im Einklang mit den Analysen einer anderen Studie bei denen sich für CMV und EBV spezifische CD8 T-Zellen keine erhöhte Expression von CD39 zeigte. Jedoch

ließen sich eine hohe Expression von CD39 auf HIV und HCV spezifischen CD8 T-Zellen feststellen, welche ein phänotypisches und funktionelles Profil von terminal erschöpften CD8 T-Zellen aufweisen (GUPTA et al., 2015). Im Einklang hiermit, konnte eine weitere Arbeitsgruppe unter Therapie mit PD-1 Inhibitoren eine T-Zellsubgruppe mit Zeichen einer T-Zell-Erschöpfung identifizieren, die eine erhöhte Expression von CD39 zeigte. Hier wurden Ki67+ T-Zellen als auf PD-1-Inhibitor ansprechende Zellen angesehen und PD-1 konnte als Marker der T-Zell-Erschöpfung auf T-Effektor- und T-Gedächtniszellen identifiziert werden. Neben diesen zeigte sich eine dritte Population mit Zeichen der T-Zell-Erschöpfung, wobei diese unter anderem durch Expression von CD39, Eomes und CTLA-4 gekennzeichnet war. Genexpressionsanalysen enthüllten eine T-Zell-Signatur vergleichbar einer Rekonstitution von erschöpften T-Zellen aus Mausmodellen, sodass die Autoren von einer Rekonstitution eines erschöpften Phänotyps der T-Zellen unter PD-1 Inhibitor-Therapie ausgingen (HUANG et al., 2017). Die Analyse der Parameter erfolgte hier mit der Massenzytometrie. Es zeigte sich dort die Massenintensität für CD39 für erschöpfte T-Zellen am höchsten, gefolgt von T-Gedächtniszellen und niedrigster Intensität für T-Effektorzellen. Die dargestellte Kohorte war klein (n=4) und signifikante Unterschiede ließen sich nicht feststellen. Weitere Analysen hinsichtlich CD39 ließen sich hier nicht eruieren. Interessanterweise wurde zuvor das Auftreten von immunvermittelten schweren Nebenwirkungen per-se als unabhängiger signifikanter Parameter für einen reduzierten Melanom spezifische Tod sowie einem längeren progressionsfreien Überleben und Gesamtüberleben beschrieben (GAMBICHLER et al., 2020; YE et al., 2021).

Insgesamt zeigte sich bei Personen mit autoimmunen Nebenwirkungen Hinweise für einen T-Zellphänotyp mit Anzeichen für eine erhöhte Aktivierung, gekennzeichnet durch eine erhöhte CTLA-4 Expression sowie, wenn auch nur dezenten Hinweisen für eine Aktivierung mit Rückgang von polyfunktionalen Zytokinprofilen. Insbesondere der erniedrigte Anteil der CD39+ T-Zellen bei den Personen mit autoimmunen Nebenwirkungen war markant. Passend zu dem gezeichneten Bild ist es plausibel, dass besonders aktive, reaktive T-Zellen, welche die autoimmunen Nebenwirkungen verursachen, eine niedrige CD39 Expression gegenüber Personen ohne autoimmune Nebenwirkungen aufweisen, welche mit einer höheren Expression von CD39 eher eine T-Zell-Signatur vereinbar mit einem im Verhältnis weniger aktiven T-Zellphänotyp aufweisen.

Im Kontext des Wissens, dass Personen mit autoimmunen Nebenwirkungen ein besseres progressionsfreies und Gesamtüberleben aufweisen wäre ein aktiver nicht erschöpfter T-Zellphänotyp zu vermuten. Die erhobenen Daten mit erhöhter CTLA-4 Expression und erniedrigter CD39 Expression sind vielversprechende Ziele für Biomarker, welche in größeren Studien validiert werden müssen.

6.2 T-Zellen aus peripherem Blut und Tumor-infiltrierende Lymphozyten bei Personen mit Nierenzellkarzinom

In dieser Arbeit sollten auch der Phänotyp und die generelle Reaktivität Tumor-infiltrierender Lymphozyten (TIL) untersucht werden. Dies sollte in den Kontext der im peripheren Blut befindlichen Lymphozyten gesetzt werden, um mögliche Gegensätze oder Zusammenhänge zu detektieren die als einfaches diagnostisches Mittel eingesetzt werden könnten. Hierzu wurden sowohl Lymphozyten aus Tumorgewebe von Nierenzellkarzinomen als auch aus peripherem Blut von Personen mit Nierenzellkarzinom (NZK) evaluiert.

6.2.1 T-Zelldifferenzierung, Expression der Immun-Checkpointmoleküle und Zytokinprofile der T-Zellen im peripheren Blut von Personen mit Nierenzellkarzinom

Wie Personen mit Melanom wiesen auch Personen mit NZK im peripheren Blut eine signifikant geringere Anzahl an Lymphozyten, T-Zellen, CD8 und CD4 T-Zellen gegenüber gesunden Kontrollen auf. Die relative Anzahl an Lymphozyten zeigte sich bei Personen mit NZK signifikant verringert. Zuvor ließ sich bereits in anderen Studien eine verringerte absolute Lymphozytenzahl bei Personen mit Nierenzellkarzinom (klarzelliges; papilläres NZK) feststellen, wobei sich hier teilweise auch Assoziationen zu einem höheren TNM-Stadium sowie verringerten Gesamtüberleben bei Lymphopenie ($<1300/\mu\text{l}$) feststellen ließen (MEHRAZIN et al., 2015; SAROHA et al., 2013). Dies deckte sich insofern mit unseren Beobachtungen, als dass eine reduzierte Anzahl an Lymphozyten sich auch in unserem Kollektiv beobachten ließ. Rückschlüsse auf Gesamtüberleben und Assoziationen mit höheren TNM-Stadien ließen sich aus unserem Kollektiv aufgrund der Kollektivgröße und der guten Prognose nicht ziehen. Die präoperative Lymphozytenzahl als prädiktiver Marker ist jedoch äußerst spannend und es wäre ein lohnendes Ziel die T-Zell-Subgruppen hinsichtlich ihres Potenzials als prädiktiver Marker in größeren Kollektiven weiter zu evaluieren.

Im peripheren Blut wiesen Personen mit NZK vor ICPI einen signifikant erhöhten Anteil an regulatorischen T-Zellen auf. Im Differenzierungsstatus war der Anteil an TEMRA regulatorischen T-Zellen unter ICPI gegenüber vor OP signifikant erhöht eben. Diese Beobachtungen sind jedoch durch die untersuchte Anzahl vor ICPI ($n=3$) und unter ICPI ($n=4$) stark limitiert. Zudem war das mediane Alter unter ICPI-Therapie mit $71,20 (\pm 6,50)$ deutlich höher als vor OP $60,65 (\pm 11,94)$, sodass eine Tendenz zu höher differenzierten Zellen erwartbar war.

Des Weiteren wiesen Personen mit NZK im peripheren Blut einen signifikant erhöhten Anteil an CTLA4+ CD8, CD4 und regulatorische T-Zellen gegenüber gesunden Kontrollen auf. In der Feinuntersuchung nach Therapie ließen sich bei Personen mit NZK vor OP über alle T-Zellsubgruppen der höchste Anteil an CTLA-4+ Zellen detektieren. Bezüglich der Antigen-spezifischen Zellen zeigte sich auf VZV-reaktiven CD4 T-Zellen bei Personen mit NZK eine signifikant erhöhte CTLA-4 MFI gegenüber gesunden Kontrollen. Für reaktive CD8 T-Zellen ergaben

sich jedoch keine Unterschiede. Für die Zytokinprofile zeigte sich nach polyklonaler Stimulation ein signifikant geringerer Anteil an singular IL-2+ CD4 T-Zellen sowie ein signifikant geringerer Anteil an TNF α + CD8 T-Zellen bei Personen mit NZK gegenüber gesunden Kontrollen. In dieser Studie ließ sich bereits für Personen mit Melanom eine auf reaktiven T-Zellen erhöhte CTLA-4 Expression unter autoimmunen Nebenwirkungen und Therapieansprechen detektieren. Zuvor wurde bereits durch unsere Arbeitsgruppe im infektiologischen Kontext eine erhöhte CTLA-4 Expression auf reaktiven T-Zellen sowie ein geringerer Anteil an IL-2+T-Zellen als Zeichen einer Antigen-Auseinandersetzungen porträtiert (LEDO et al., 2020; SCHUB et al., 2018a; SCHUB et al., 2015; SESTER et al., 2008a). Insgesamt könnte bezüglich der Personen mit NZK die erhöhte CTLA-4 Expression als Zeichen der Antigen-Auseinandersetzung gewertet werden, insbesondere da diese sich zum Großteil „vor OP“ befanden und somit vermehrt Antigen in situ zum Zeitpunkt der Blutprobengewinnung bestand. Die Veränderungen im Zytokinprofil sind dezent, wobei auch diese mit einer Antigen-Auseinandersetzung vereinbar wären. Andere Studien untersuchten lösliches CTLA-4 als prädiktiven Marker für Tumorstadium und Überleben, wobei sich hier keine Unterschiede für CTLA-4 zeigten (MASUDA et al., 2014; WANG et al., 2019). Bezüglich PD-1 bestätigten sich unsere Beobachtungen aus der Gruppe der Personen mit Melanom unter ICPI mit niedrigerem Anteil an PD-1+ Zellen unter ICPI-Therapie auch bei Personen mit NZK.

Die Beobachtungen der Veränderungen von Immunzellen im peripherem Blut sind von großem Interesse für das mögliche Vorkommen von prädiktiven prognostischen Markern und ein mögliches Therapiemonitoring bei ICPI-Therapie bezüglich Ansprechens und Auftreten von Nebenwirkungen. Dies spiegelt jedoch nur einen Ausschnitt aus der komplexen Tumorantwort bei Melanom und NZK wider, da es sich hierbei um solide Tumore handelt.

6.2.2 Evaluation von Einflussfaktoren der Analysequalität von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten zur Etablierung geeigneter Auswahlkriterien

Für ein besseres Verständnis der direkten Immunantwort auf Tumorzellen wurden Immunzellen und TIL aus Gewebe von Tumoren bei Personen mit dem Verdacht auf NZK isoliert und die extrahierten Immunzellen und die untersuchten Marker PD-1, CD39 und PD-L1 evaluiert. Anhand von drei Tumoren wurde exemplarisch überprüft, ob die Lagerung des Tumorgewebes auf die erhobenen Parameter eine Auswirkung hat. Bezüglich der relativen Zellzahl zeigte sich die Auswertung über alle Immunzellen stabil in einem Lagerungszeitraum von 19,5 bis 23,5 Stunden. Eine Auswertung wäre auch bei Bearbeitung des Tumorgewebes am Folgetag der Operation bezüglich der Immunzellzahl möglich. Bezüglich der Marker PD-1, CD39 und PD-L1 zeigte sich ein gemischtes Bild wobei die MFI der jeweiligen Marker relativ stabil verblieb, jedoch der Anteil an positiven Zellen schwankte. Ebenso war nach Lagerung in der Durchflusszytometrie eine zunehmende Degradation der Leukozyten zu beobachten. Populationen, die sich durch das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht definieren, ließen sich dadurch nur erschwert eingrenzen. Über dies hinaus war der Anteil an zytokinpositiven CD4 und CD8 T-Zellen nach Antigen-spezifischer Stimulation mit CMV-Antigen

deutlich niedriger, sodass eine Auswertung der Zytokinexpression nach Lagerung nicht möglich war. Schlussfolgernd empfehlen wir die direkte Prozessierung des Tumorgewebes der Lagerung vorzuziehen.

Eine etablierte Methode bezüglich der Aufreinigung von Immunzellen ist die Trennung nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll). Zur Evaluation der Veränderung vor und nach Aufreinigung wurden exemplarisch anhand von 12 Tumoren die relative Immunzellzahl (s.o.) und die Immunmarker (s.o.) verglichen. Hier zeigte sich, wie aufgrund der Methode zu erwarten, nach Ficoll eine signifikante Zunahme der Anteile an Monozyten und Lymphozyten sowie eine signifikante Abnahme an Granulozyten. Dies ließ sich vor allem durch das verminderte Auftreten von unspezifischen Signalen nach Ficoll im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht erklären, da diese Populationen vor allem durch diese definiert wurden. Für NK-Zellen, B-Zellen und T-Zellen sowie deren Subpopulationen CD8, CD4 und regulatorischen T-Zellen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Dies mag vor allem durch die weitere Definition durch populationspezifische Marker bedingt gewesen sein. Des Weiteren ließen sich keine Unterschiede bezüglich PD-1, CD39 und PD-L1 feststellen. Somit waren zumindest auf T-Zellebene Aussagen über die relativen Zellzahlen bei direkter Färbung der Immunzellen ohne Aufreinigung nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation möglich, da diese unter Hinzunahme von Oberflächenmarkern (CD4, CD8, etc.) ausgewertet wurden und damit weniger abhängig vom Vorwärts und Seitwärtsstreulicht waren.

Nach Etablierung der Auswahlkriterien „direkte Messung ohne Lagerung“ und „Messung nach Dichtegradienten“, konnten Tumorproben von insgesamt 13 Personen weiter evaluiert werden die diese Kriterien erfüllten. Bei zwei der 13 zeigte sich eine benigne Raumforderung (BRF), weshalb diese separat betrachtet wurden. Inwieweit sich nun TIL von Lymphozyten aus peripherem Blut unterscheiden, wurde direkt miteinander verglichen.

6.2.3 T-Zelldifferenzierung, Expression der Immun-Checkpointmoleküle und CD39 der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten im Vergleich zu T-Zellen im peripherem Blut von Personen mit Nierenzellkarzinom

Bemerkenswerterweise zeigte sich hier ein signifikant erhöhter Anteil an CD4 T-Zellen im peripherem Blut gegenüber TIL bei NZK während sich für T-Zellen, CD8 und regulatorische T-Zellen keine signifikanten Unterschiede ergaben. Zudem zeigte sich die PD-1 Expression für CD8, CD4 und regulatorische T-Zellen der TIL signifikant gegenüber den korrespondierenden Partnern aus peripherem Blut erhöht. Es ließ sich jedoch keine signifikante positive Korrelation zwischen der MFI von PD-1 auf TIL und Zellen aus peripherem Blut eruieren. Ein Rückschluss von PD-1 auf TIL aus der Analyse der PD-1+ T-Zellen aus peripherem Blut war somit leider nicht möglich. Ein erhöhter Anteil an PD-1+ CD8 T-Zellen der TIL ließ sich auch in anderen Studien für Melanom, Mammakarzinom als auch muskelinvasiven Blasentumoren bestätigen (CANALE et al., 2018; WONG et al., 2018) Ebenso zeigte bereits eine andere Arbeitsgruppe für Personen mit

Lungenkarzinom (non small lung cancer; NSCLC) einen erhöhten Anteil an hochklonalen, vermutlich Antigen vermittelten expandierten PD-1+ CD8 T-Zellen der TIL, welche eine gestörte Zytokinproduktion (IL-2, IFN γ , TNF α) aufwiesen (THOMMEN et al., 2018). Über dies hinaus konnte ein erhöhter Anteil an PD-1+ CD8 T-Zellen der TIL bei 21 Personen mit NSCLC im Stadium IV als positiver prädiktiver Marker für das Ansprechen und Überleben auf eine PD-1 ICPI-Therapie von der Arbeitsgruppe evaluiert werden (THOMMEN et al., 2018). In unseren Untersuchungen zeigte sich ein erhöhter Anteil an PD-1+ CD8 T-Zellen und darüber hinaus auch eine erhöhte Anzahl an CD4 T-Zellen und regulatorischen T-Zellen der TIL. Eine immunhistochemisch detektierte erhöhte Expression von PD-1 und CTLA-4 auf Tumor-infiltrierenden mononukleären Zellen bei Personen mit NZK ging in einer anderen Studie mit einem schlechteren Gesamtüberleben und progressionsfreien Überleben einher (KAHLMAYER et al., 2019). Eine Evaluation bezüglich des Ansprechens im Zusammenhang mit der Funktionalität der isolierten PD-1+ TIL wäre für Personen mit NZK aber auch insbesondere für Melanom interessant. Leider konnte die CTLA-4-Expression der TIL aufgrund des äußerst limitiert vorliegenden Probenmaterials in unserer Studie nicht untersucht werden. Im Kontext der Literatur und unserer Beobachtung mit distinkter CTLA-4 Expression auf CD8, CD4 und regulatorischen T-Zellen im peripherem Blut bei Personen mit NZK ist hier eine weitere Investigation und Korrelation von großem Interesse. Vielleicht ließen sich Rückschlüsse von CTLA-4 von T-Zellen im peripherem Blut bezüglich TIL ziehen.

Interessanterweise zeigte sich CD39 auf CD8, CD4 und regulatorischen T-Zellen der TIL gegenüber peripherem Blut bei Personen mit NZK signifikant erhöht. Herausragend ist hier zudem eine signifikante positive Korrelation von CD39 auf regulatorischen T-Zellen der TIL und regulatorischen T-Zellen aus peripherem Blut. Für Melanom, Brustkrebs sowie Miss-match-Repair negativen Endometriumkarzinom ließ sich zuvor in anderen Arbeitsgruppen ein erhöhter Anteil CD39+ CD8 T-Zellen der TIL detektieren (Canale et al 2018; Lubbers et al. 2018). Teilweise ließ sich dort ein Differenzierungsmuster der CD39+ CD8 T-Zellen feststellen, welches eher einem Effektor/Memory Typ gegenüber naivem Phänotyp von CD39- TIL entsprach. Eine erhöhte CD39 Expression wurde dort assoziiert mit einem erschöpften Phänotyp mit hoher PD-1 Expression und gestörter IFN γ und IL-2 Produktion identifiziert (CANALE et al., 2018). Eine Korrelation zwischen TIL und peripheren T-Zellen ließ sich jedoch nicht identifizieren.

Neben der gemäß der Literatur zu erwartendem erhöhten Anteil an CD39+ CD8 T-Zellen konnten wir somit auch einen erhöhten Anteil CD39+ für CD4 und regulatorischen T-Zellen detektieren und eine Korrelation aus peripherem Blut identifizieren. Der Kontext dieses erhöhten Anteils bedarf einer weiteren fokussierten Untersuchung zur Rolle von CD4 und regulatorischen T-Zellen in der antitumoralen Immunantwort. Zudem ließ sich eine distinkte Expression von CTLA-4 auf T-Zellen im peripherem Blut für Personen mit NZK vor OP feststellen. Die Ergebnisse der CD39+ regulatorischen T-Zellen und die Korrelation mit regulatorischen T-Zellen aus peripherem Blut sind beachtenswert, da sich hieraus womöglich bei Analyse von peripherem Blut Rückschlüsse auf die

TIL ziehen ließen. Dies wäre für zukünftige diagnostische Analysen von peripherem Blut bedeutungsvoll.

6.3 Limitationen, Schlussfolgerungen und Ausblick

In Kooperation mit der Klinik für Urologie konnten wir von 34 Personen mit Nierenzellkarzinom Vollblutproben sowie 15 Tumorproben für die wissenschaftliche Aufarbeitung gewinnen. Da sich bei Personen mit einem Tumor der Niere postoperativ bei 11 Personen ein benigner Befund darstellte konnte deren Vollblut als auch von 4 Personen Tumorgewebe als Vergleich herangezogen werden. Von diesem äußerst limitierten Material wurde ein Großteil für die zeitintensive und aufwändige Etablierung der Methoden verwendet, so dass die Anzahl der Proben für die tatsächliche Charakterisierung der T-Zellen unter optimalen Bedingungen begrenzt war. Nichtsdestotrotz war es uns möglich, ein optimiertes Protokoll nicht nur für die Phänotypisierung und Bestimmung von Immun-Checkpointmolekülen und Funktionsmarkern der TIL nach Isolierung aus Tumorgewebe zu etablieren, sondern auch die Zytokinprofile und damit Funktionalität der TIL nach isolierter Stimulation, aber auch im direkten Vergleich zu T-Zellen aus dem peripherem Blut, bei simultaner Stimulation mit optimierter Qualität darzustellen. In dem Vergleich der TIL zu Lymphozyten aus peripherem Blut konnte eine erhöhter CTLA-4 Anteil der CD8, CD4 und regulatorischen T-Zellen im peripherem Blut für Personen mit Nierenzellkarzinom zu den gesunden Kontrollen als hervorstechendes Merkmal identifiziert werden. Zudem ergab sich eine starke Korrelation zwischen dem Anteil der CD39+ regulatorischen T-Zellen der TIL und dem aus dem peripherem Blut stammenden T-Zellen.

Über dies war es uns gemeinsam mit der Klinik für Dermatologie möglich von insgesamt 47 Personen mit Melanom auch zehn Personen vor Therapieinitiierung für eine longitudinale Analyse einzuschließen. Weitere Personen konnten während der begrenzten Dauer der Arbeit nicht eingeschlossen werden. Es ergab sich eine Variation in der Art der Medikation und in der Anzahl der Therapiezyklen. Trotzdem war es uns möglich nicht nur eine Auswertung in der Grundgesamtheit der erkrankten Personen gegenüber gesunden Kontrollen zu ziehen, sondern auch eine initiale Auswertung des Einflusses der zellulären Veränderungen im Therapieverlauf. Limitiert sind die Aussagen durch die begrenzte Fallzahl von 47 Personen mit Melanom, davon nur 10 im Therapieverlauf mit Immunzelldaten vor Initiierung der Therapie. Als Grundlage für zukünftige Studienprojekte haben sich hieraus jedoch wertvolle Kenntnisse ziehen lassen. Besonders hervorzuheben ist hinsichtlich Auswirkungen der Therapie auf die Markerepression der Rückgang der PD-1+ CD8, CD4 und regulatorischen T-Zellen bei Personen mit Melanom unter Therapie gegenüber vor Therapie, der gegensinnige Anstieg der CTLA-4+ CD4 und regulatorischen T-Zellen unter Therapie gegenüber vor Therapie. Bezüglich des Therapieansprechens ist zu bemerken, dass die PD-1 MFI auf CD4 und regulatorischen T-Zellen bei Personen mit Therapieansprechen signifikant geringer war gegenüber ohne Therapieansprechen. Betrachtet man die autoimmunen Nebenwirkungen, so war neben einem erhöhten Anteil von CTLA-4+ CD8 T-Zellen unter

autoimmunen Nebenwirkungen, der verringerte Anteil der CD39+ CD4 und regulatorischen T-Zellen ein herausstechendes Merkmal. Im Hinblick auf die Zytokinprofile sind Tendenzen zu einer Rekonstitution eines multifunktionalen T-Zellphänotyp unter ICPI-Therapie, eine Abnahme einer, potenziell antitumoralen, TNF α geprägten Signatur bei Personen ohne Therapieansprechen sowie für eine T-Zell-Aktivierung mit Rückgang von polyfunktionalen Zytokinprofilen bei Personen mit autoimmunen Nebenwirkungen zu erkennen. Die beobachteten Unterschiede sind durch die limitierte Probandenanzahl begrenzt, dennoch bieten sie eine fundierte Grundlage für weitere Untersuchungen in größeren Probandenkollektiven. Neben einem besseren Verständnis der ICPI-Therapie abhängigen Alterationen der T-Zell-Funktionalität, stellen insbesondere zukünftige mögliche Rückschlüsse aus der T-Zell-Funktionalität, hinsichtlich Therapieansprechen und autoimmune Nebenwirkungen, Kernaspekte für betroffene Personen als auch Behandler dar.

Somit bietet diese Arbeit, trotz ihrer Limitierung durch die kleine Studiengröße, eine umfassende Basis für weitere Studien hinsichtlich TIL von Personen mit Nierenzellkarzinom im Vergleich zu Lymphozyten aus peripherem Blut als auch T-Zell-Charakteristika von Personen mit Melanom unter Immun-Checkpoint-Inhibitor Therapie im Hinblick auf Therapieansprechen sowie dem Auftreten von autoimmunen Nebenwirkungen.

7 Anhang

Tabelle 33 Histologie der resezierten Tumore der Niere

Histologie	Anzahl
Chromophiles Nierenzellkarzinom	1
Chromophobes Nierenzellkarzinom	3
Gemischt klarzelliges papilläres Nierenzellkarzinom	1
Klarzelliges Nierenzellkarzinom	22
Klarzelliges Nierenzellkarzinom (mit klarzellig-eosinophiler Komponente)	1
Nierenzellkarzinom, nicht näher spezifiziert	3
Papilläres Nierenzellkarzinom Typ II	2
Papilläres Nierenzellkarzinom vom eosinophilen Typ II	1

Tabelle 34 Übersicht der Tumorproben für den Vergleich mit Immunzellen aus peripherem Blut

Probe	Tumor	Lagerungszeit [h]	kein Ficoll	vor Ficoll Färbung 6	nach Ficoll Färbung 6	vor Ficoll Färbung 7	nach Ficoll Färbung 7
T1	NZK	0	x	x			
T1g	NZK	19,5		x	x		
T2	BRF	0		x	x		x
T2g	BRF	20		x	x		x
T3	NZK	0		x	x		x
T3g	NZK	23,5		x	x		x
T4	NZK	0		x	x		x
T5	NZK	0		x	x		x
T6	NZK	0		x			x
T7	NZK	0		x	x		x
T8	NZK	0		x	x		x
T9	NZK	0		x	x		x
T10	NZK	0	x	x			
T11	NZK	0	x	x			
T12	NZK	0		x	x		x
T13	BRF	0		x	x		x
T14	BRF	0	x	x		x	
T15	BRF	0		x		x	x
T16	NZK	0		x		x	x
T17	NZK	0		x	x	x	
T18	NZK	0		x	x	x	x
T19	NZK	0		x	x		x
T20*	nicht-NZK	0		x	x		x

*ausgeschlossen, da nicht NZK und nicht BRF.

Tabelle 35 Übersicht der durchgeführten Färbung von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten aus bearbeiteten Tumorgewebe

Probe	Tumor	Direkte Bearbeitung	>3000 T-Zellen	Färbung 7 vor/nach Ficoll	Alle Kriterien erfüllt ¹
T2	BRF	X	X	nach	Ja
T3	NZK	X	X	nach	Ja
T4	NZK	X	X	nach	Ja
T5	NZK	X	X	nach	Ja
T7	NZK	X	X	nach	Ja
T8	NZK	X	X	nach	Ja
T9	NZK	X	X	nach	Ja
T12	NZK	X	X	nach	Ja
T13	BRF	X	X	nach	Ja
T16	NZK	X	X	nach	Ja
T17	NZK	X	X	vor	Nein
T18	NZK	X	X	nach	Ja
T19	NZK	X	X	nach	Ja
T20*	Nicht-NZK	x		x	n.a.*

¹Kriterien: direkte Bearbeitung, Aufarbeitung mittels Dichtegradientenzentrifugation, mehr als 3000 T-Zellen;
 *ausgeschlossen, da nicht NZK und nicht BRF.

8 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1 Schematische Darstellung der ICPI-Wirkung von anti-CTLA-4 Antikörper Ipilimumab und anti-PD-1 Antikörper Pembrolizumab und Nivolumab.....	23
Abbildung 2 Gatingstrategie zur Identifizierung der Immunzellsubpopulationen.	40
Abbildung 3: Analyse der Marker der Differenzierung CD45RO und CD62L, des Markers für Proliferation Ki67 sowie der Immun-Checkpointmoleküle CTLA-4, PD-1 und BTLA.	41
Abbildung 4: Analyse der CD39 Expression.	42
Abbildung 5 Gatingstrategie zur Identifizierung der Immunzellsubpopulationen der TIL in Nierenzellkarzinomen.	43
Abbildung 6 Vergleich der absoluten Zellzahlen im Blut von Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom und gesunden Kontrollpersonen.	50
Abbildung 7 Vergleich der relativen Immunzell-Zahlen im Blut von Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom und gesunden Kontrollpersonen.	51
Abbildung 8 Vergleich der Differenzierung der Immunzellen im Blut von Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom und gesunden Kontrollpersonen.	52
Abbildung 9 Vergleich der Anteile an PD-1+ und der MFI von PD-1 bei den Immunzellen im Blut von Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom und gesunden Kontrollpersonen.	53
Abbildung 10 Vergleich der Anteile an CTLA-4+ bei den Immunzellen im Blut von Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom und gesunden Kontrollpersonen.	54
Abbildung 11 Vergleich der Anteile an Ki-67+ bei den Immunzellen im Blut von Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom und gesunden Kontrollpersonen.	54
Abbildung 12 Vergleich der Anteile an CD39+ Immunzellen im Blut von Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom und gesunden Kontrollpersonen.	55
Abbildung 13 Vergleich der Frequenzen und normierten Frequenzen von CMV und VZV Antigen-spezifischen CD4 und CD8 T-Zellen bei Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom gegenüber gesunden Kontrollen.	57
Abbildung 14 Korrelation von CMV und SEB reaktiven CD8 und CD4 T-Zellen.	58
Abbildung 15 Vergleich der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) von CTLA-4 auf reaktiven CD4 und CD8 T-Zellen sowie Vergleich der Zytokinprofile von IFN γ , TNF α und IL-2 der CMV, VZV und SEB reaktiven CD4 und CD8 T-Zellen bei Personen mit Nierenzellkarzinom oder Melanom gegenüber gesunden Kontrollen.	59
Abbildung 16 Vergleich der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) von PD-1 auf reaktiven CD4 und CD8 T-Zellen bei Personen mit Nierenzellkarzinom oder Melanom gegenüber gesunden Kontrollen.	60
Abbildung 17 Auszug aus dem Vergleich der relativen Immunzell-Zahlen im Blut von Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom und gesunden Kontrollpersonen in Abhängigkeit von der Therapie.	62

Abbildung 18 Auszug aus der Differenzierung von Treg im Blut von Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom in Abhängigkeit von der Therapie.....	63
Abbildung 19 Vergleich der Anteile an CTLA-4+ Immunzellen im Blut von Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom in Abhängigkeit von der Therapie.....	63
Abbildung 20 Vergleich der Anteile an PD-1+ und der MFI von PD-1 bei den Immunzellen im Blut von Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom in Abhängigkeit von der Therapie.....	64
Abbildung 21 Auszug aus dem Vergleich der Anteile an Ki67+ und CD39+ Immunzellen im Blut von Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom in Abhängigkeit von der Therapie.	65
Abbildung 22 Auszug aus dem Vergleich der absoluten sowie relativen Immunzellzahlen von Personen mit Melanom in Abhängigkeit des Therapieansprechens.	67
Abbildung 23 Auszug aus dem Vergleich der Differenzierung der Immunzellen im Blut von Personen mit Melanom in Abhängigkeit vom Therapieansprechen.	67
Abbildung 24 Vergleich der MFI von PD-1 bei den Immunzellen im Blut von Personen mit Melanom in Abhängigkeit vom Therapieansprechen.	68
Abbildung 25 Vergleich der Expression von CTLA-4 auf reaktiven CD4 und CD8 T-Zellen und der Zytokinprofile der Antigen-spezifischen CD4 und CD8 T-Zellen bei Personen mit Melanom in Abhängigkeit vom Therapieansprechen.....	70
Abbildung 26 Vergleich der Anteile an CTLA4+ Immunzellen im Blut von Personen mit Melanom in Abhängigkeit vom Auftreten von autoimmunen Nebenwirkungen.....	72
Abbildung 27 Vergleich der Anteile an CD39+ Immunzellen im Blut von Personen mit Melanom und gesunden Kontrollpersonen in Abhängigkeit vom Auftreten von autoimmunen Nebenwirkungen..	73
Abbildung 28 Vergleich der Zytokinprofile der CMV, VZV und SEB reaktiven CD4 und CD8 T-Zellen bei Personen mit Melanom in Abhängigkeit vom Auftreten von autoimmunen Nebenwirkungen. ...	73
Abbildung 29 Vergleich der absoluten Immunzell-Zahlen im Blut von Personen mit Melanom unter ICPI-Therapie im Vergleich zum Vorwert.	76
Abbildung 30 Vergleich der absoluten Immunzell-Zahlen im Blut von Personen mit Melanom im Therapieverlauf.....	77
Abbildung 31 Vergleich der relativen Immunzell-Zahlen im Blut von Personen mit Melanom im Therapieverlauf.....	78
Abbildung 32 Prozentuale Anteile an PD-1+ Zellen und PD-1 Expression von Immunzellen im Blut von Personen mit Melanom im Therapieverlauf.	79
Abbildung 33 Vergleich der prozentualen Anteile an CTLA-4+ Zellen und CTLA-4 Expression von Immunzellen im Blut von Personen mit Melanom im Therapieverlauf.....	80
Abbildung 34 Anteile an Ki-67+ bei den Immunzellen im Blut von Personen mit Melanom im Therapieverlauf.....	80
Abbildung 35 Mediane Fluoreszenzintensität (MFI) von CTLA-4 auf den Immunzellen und das Zytokinprofil von CD4 T-Zellen nach polyklonalem Stimulus im Blut von Personen mit Melanom im Therapieverlauf.....	81

Abbildung 36 Mediane Fluoreszenzintensität (MFI) von CTLA-4 auf den Immunzellen und das Zytokinprofil von CD4 T-Zellen nach polyklonalem Stimulus im Blut von Personen mit Melanom im Therapieverlauf.....	82
Abbildung 37 Mediane Fluoreszenzintensität (MFI) von CTLA-4 auf den Immunzellen und das Zytokinprofil von CD4 T-Zellen nach polyklonalem Stimulus im Blut von Personen mit Melanom im Therapieverlauf.....	83
Abbildung 38 Vergleich der relativen Immunzellzahlen isoliert aus Tumorgewebe von Personen mit Nierenzellkarzinom oder einem benignen Tumor der Niere vor und nach Aufreinigung mittels eines Dichtegradienten.....	87
Abbildung 39 Vergleich der medianen Fluoreszenzintensität und der prozentualen Anteile von PD-1, CD39, sowie der medianen Fluoreszenzintensität von PD-L1 auf den Immunzellen aus Tumorgeweben.....	88
Abbildung 40 Vergleich der relativen Immunzell-Zahlen isoliert aus Tumorgewebe von Personen mit Nierenzellkarzinom oder einem benignen Tumor der Niere.....	89
Abbildung 41 Vergleich der medianen Fluoreszenzintensität und der prozentualen Anteile von PD-1, CD39, sowie der medianen Fluoreszenzintensität von PD-L1 auf den Immunzellen isoliert aus Tumorgewebe.....	90
Abbildung 42: Vergleich der relativen Immunzell-Zahlen im Tumorgewebe gegenüber den Immunzellen im peripherem Blut von Personen mit Nierenzellkarzinom oder einem benignen Tumor der Niere.....	92
Abbildung 43 Vergleich der medianen Fluoreszenzintensität von PD-1 bei den Immunzellen im Tumorgewebe gegenüber den Immunzellen im peripherem Blut von Personen mit Nierenzellkarzinom oder einem benignen Tumor der Niere.....	92
Abbildung 44 Vergleich der prozentualen Anteile der CD39+ Immunzellen im Tumorgewebe gegenüber den Immunzellen im peripherem Blut von Personen mit Nierenzellkarzinom oder einem benignen Tumor der Niere.	93
Abbildung 45 Korrelation der PD-1 MFI und prozentualen Anteilen von CD39+ von CD8, CD4 und regulatorischen T-Zellen zwischen Tumor-infiltrierenden-Lymphozyten und Zellen aus peripherem Blut.	94
Abbildung 46 anti CD4 APC-H7 Signal unter Verwendung von 1µl Antikörpermenge.	95
Abbildung 47 Repräsentative Dotplots des Titrierungsversuches von anti CD4 APC-H7 zur Identifizierung von CD4 T-Zellen aus TIL.....	95
Abbildung 48 Repräsentative Dotplots der CMV-spezifischen CD4 und CD8 T-Zellen nach Stimulation isolierter Zellen aus Tumorgewebe von Person T3.....	96
Abbildung 49 Repräsentative Dotplots der IFN γ + Lymphozyten der TIL sowie aus Vollblut nach Vorfärbung der TIL mittels anti CD45 APC.....	97
Abbildung 50 Repräsentative Dotplots der IFN γ + Lymphozyten der TIL sowie aus Vollblut nach Vorfärbung der TIL mittels anti CD45 APC.....	98

Abbildung 51 Repräsentative Dotplots der CMV reaktiven Lymphozyten der TIL sowie aus Vollblut unter Verwendung von 0,5 Millionen TIL 99

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte und Materialien	26
Tabelle 2: Chemikalien und Testkits.....	26
Tabelle 3: Medien und Puffer	27
Tabelle 4: Antikörper.....	27
Tabelle 5: Antigene	27
Tabelle 6: Software	28
Tabelle 7: Antikörpergemisch für direkte Färbungen von T-Zellen in Vollblut	28
Tabelle 8: Pipettierschema zur Prozessierung für die direkte Färbung von T-Zellen in Vollblut.....	29
Tabelle 9: Antikörpergemisch für Färbung 4 und 5 nach Stimulation.....	30
Tabelle 10: Pipettierschema zum Ansatz der Stimulation aus heparinisiertem Vollblut	31
Tabelle 11: Pipettierschema zur Prozessierung der Ansätze nach der Stimulation.	32
Tabelle 12: Pipettierschema zur Prozessierung der Ansätze während der Färbung mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern.	32
Tabelle 13: Antikörpergemisch für Färbung der TIL	35
Tabelle 14 Entscheidungsalgorithmus für die direkte Stimulation oder kombinierte Stimulation mit Vollblut der TIL.....	35
Tabelle 15 Antikörpergemisch zur Identifizierung CMV-assoziiertes T-Zellen	36
Tabelle 16: Pipettierschema zum Ansatz der Stimulation von TIL in heparinisiertem Vollblut.....	37
Tabelle 17: Antikörpergemisch für die kombinierte Färbung von TIL und T-Lymphozyten in Vollblut	37
Tabelle 18: Pipettierschema zum Ansatz der Stimulation von TIL in Medium.....	38
Tabelle 19: Pipettierschema zur Fixierung von TIL in Medium	38
Tabelle 20: Antikörpergemisch für die Färbung von TIL nach Stimulation	39
Tabelle 21: Übersicht über die eingeschlossenen gesunden Kontrollen und Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom	45
Tabelle 22 Erkrankungscharakteristika der Personen mit Melanom	45
Tabelle 23 Histologie der Personen mit Melanom	47
Tabelle 24 Erkrankungscharakteristika der Personen mit Nierenzellkarzinom.....	48
Tabelle 25 CMV- und VZV-spezifische T-Zell-Analyse	56
Tabelle 26 Übersicht der Personen mit Melanom oder Nierenzellkarzinom in Abhängigkeit von der Therapie	62
Tabelle 27 Übersicht Personen mit Melanom in Abhängigkeit vom Therapieansprechen.....	66
Tabelle 28 Übersicht Personen mit Melanom in Abhängigkeit vom Auftreten von autoimmunen Nebenwirkungen.....	71
Tabelle 29 Übersicht über die Charakteristika der Personen mit Melanom unter ICPI-Therapie im Therapieverlauf.....	75

Tabelle 30 Übersicht der Charakteristika von Personen mit Nierenzellkarzinom	84
Tabelle 31 Absolute sowie relative Lymphozytenzahlen in einer Neubauerkammer im Kontext des prozessierten Gewebes vor und nach Dichtegradiententrennung	85
Tabelle 32 Frequenzen der CMV reaktiven CD8 und CD4 T-Zellen nach Stimulation der TIL	97
Tabelle 33 Histologie der resezierten Tumore der Niere	119
Tabelle 34 Übersicht der Tumorproben für den Vergleich mit Immunzellen aus peripherem Blut	119
Tabelle 35 Übersicht der durchgeführten Färbung von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten	120

10 Literaturverzeichnis

1. Acuto O, Michel F (2003) CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol* 3:939-951
2. Acuto O, Di Bartolo V, Michel F (2008) Tailoring T-cell receptor signals by proximal negative feedback mechanisms. *Nat Rev Immunol* 8:699-712
3. ADO/DDG/DKG (2019). Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms, Langversion 3.2, 2019, AWMF Registernummer: 032/024OL. In Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF):
4. Agarwala SS, Keilholz U, Gilles E, Bedikian AY, Wu J, Kay R, Stein CA, Itri LM, Suci S, Eggermont AM (2009) LDH correlation with survival in advanced melanoma from two large, randomised trials (Oblimersen GM301 and EORTC 18951). *Eur J Cancer* 45:1807-1814
5. Armstrong BK, Kricger A (1993) How much melanoma is caused by sun exposure? *Melanoma Res* 3:395-401
6. Ascierto PA, Del Vecchio M, Mandala M, Gogas H, Arance AM, Dalle S, Cowey CL, Schenker M, Grob JJ, Chiarion-Sileni V, Marquez-Rodas I, Butler MO, Maio M, Middleton MR, de la Cruz-Merino L, Arenberger P, Atkinson V, Hill A, Fecher LA, Millward M, Khushalani NI, Queirolo P, Lobo M, de Pril V, Loffredo J, Larkin J, Weber J (2020) Adjuvant nivolumab versus ipilimumab in resected stage IIIB-C and stage IV melanoma (CheckMate 238): 4-year results from a multicentre, double-blind, randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 21:1465-1477
7. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC, Jr., Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK (2009) Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 27:6199-6206
8. Bastian BC, Kashani-Sabet M, Hamm H, Godfrey T, Moore DH, 2nd, Brocker EB, LeBoit PE, Pinkel D (2000) Gene amplifications characterize acral melanoma and permit the detection of occult tumor cells in the surrounding skin. *Cancer Res* 60:1968-1973
9. Bastian BC (2014) The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annu Rev Pathol* 9:239-271
10. Bertrand F, Montfort A, Marcheteau E, Imbert C, Gilhodes J, Filleron T, Rochaix P, Andrieu-Abadie N, Levade T, Meyer N, Colacios C, Ségui B (2017) TNF α blockade overcomes resistance to anti-PD-1 in experimental melanoma. *Nat Commun* 8:2256
11. Bevan MJ (1976) Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med* 143:1283-1288
12. Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, Betts MR, Freeman GJ, Vignali DA, Wherry EJ (2009) Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol* 10:29-37
13. Breslow A (1970) Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 172:902-908
14. Bukhari S, Henick BS, Winchester RJ, Lerrer S, Adam K, Gartshteyn Y, Maniar R, Lin Z, Khodadadi-Jamayran A, Tsirigos A, Salvatore MM, Lagos GG, Reiner SL, Dallos MC, Mathew M, Rizvi NA, Mor A (2023) Single-cell RNA sequencing reveals distinct T cell populations in immune-related adverse events of checkpoint inhibitors. *Cell Rep Med* 4:100868
15. Call ME, Wucherpfennig KW (2004) Molecular mechanisms for the assembly of the T cell receptor-CD3 complex. *Mol Immunol* 40:1295-1305
16. Canale FP, Ramello MC, Nunez N, Bossio SN, Piaggio E, Gruppi A, Rodriguez EVA, Montes CL (2018) CD39 Expression Defines Cell Exhaustion in Tumor-Infiltrating CD8(+) T Cells-Response. *Cancer Res* 78:5175
17. Chardin P, McCormick F (1999) Brefeldin A: the advantage of being uncompetitive. *Cell* 97:153-155
18. Chen L, Flies DB (2013) Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 13:227-242

19. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM (2003) Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198:1875-1886
20. Clark WH, Jr., From L, Bernardino EA, Mihm MC (1969) The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 29:705-727
21. Cossarizza A, Ortolani C, Paganelli R, Barbieri D, Monti D, Sansoni P, Fagiolo U, Castellani G, Bersani F, Londei M, Franceschi C (1996) CD45 isoforms expression on CD4+ and CD8+ T cells throughout life, from newborns to centenarians: implications for T cell memory. *Mech Ageing Dev* 86:173-195
22. Crossey F, Marx S, Holters S, Schmitt K, Bohle RM, Schmidt T, Stockle M, Sester U, Sester M, Janssen MWW (2018) Robust method for isolation of tumor infiltrating lymphocytes with a high vital cell yield from small samples of renal cell carcinomas by a new collagenase-free mechanical procedure. *Urol Oncol* 36:402 e401-402 e410
23. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho KH, Aiba S, Brocker EB, LeBoit PE, Pinkel D, Bastian BC (2005) Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 353:2135-2147
24. Cyster JG, Schwab SR (2012) Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 30:69-94
25. DGU/DGHO (2020) Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms, Langversion 2.0, 2020, AWMF Registernummer: 043/017OL. Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften eV (AWMF), Deutschen Krebsgesellschaft eV (DKG) und Deutschen Krebshilfe (DKH)
26. Dirks J, Tas H, Schmidt T, Kirsch S, Gartner BC, Sester U, Sester M (2013) PD-1 analysis on CD28(-) CD27(-) CD4 T cells allows stimulation-independent assessment of CMV viremic episodes in transplant recipients. *Am J Transplant* 13:3132-3141
27. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD (2004) The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21:137-148
28. Eggermont AMM, Blank CU, Mandala M, Long GV, Atkinson V, Dalle S, Haydon A, Lichinitser M, Khattak A, Carlino MS, Sandhu S, Larkin J, Puig S, Ascierto PA, Rutkowski P, Schadendorf D, Koornstra R, Hernandez-Aya L, Maio M, van den Eertwegh AJM, Grob JJ, Gutzmer R, Jamal R, Lorigan P, Ibrahim N, Marreaud S, van Akkooi ACJ, Suci S, Robert C (2018) Adjuvant Pembrolizumab versus Placebo in Resected Stage III Melanoma. *N Engl J Med* 378:1789-1801
29. Eigentler TK, Mugge LO, Bembenek A, Garbe C (2007) [Cutaneous melanoma]. *Hautarzt* 58:885-897; quiz 898
30. European Association of Urology (2025) EAU Guidelines. Edn. presented at the EAU EAU Guidelines. Edn. presented at the EAU Congress).
31. Fairfax BP, Taylor CA, Watson RA, Nassiri I, Danielli S, Fang H, Mahé EA, Cooper R, Woodcock V, Traill Z, Al-Mossawi MH, Knight JC, Klenerman P, Payne M, Middleton MR (2020) Peripheral CD8(+) T cell characteristics associated with durable responses to immune checkpoint blockade in patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 26:193-199
32. Fontenot JD, Rudensky AY (2005) A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol* 6:331-337
33. Francken AB, Accortt NA, Shaw HM, Colman MH, Wiener M, Soong SJ, Hoekstra HJ, Thompson JF (2008) Follow-up schedules after treatment for malignant melanoma. *Br J Surg* 95:1401-1407
34. Gaffen SL (2001) Signaling domains of the interleukin 2 receptor. *Cytokine* 14:63-77
35. Gambichler T, Schroter U, Hoxtermann S, Susok L, Stockfleth E, Becker JC (2020) Decline of programmed death-1-positive circulating T regulatory cells predicts more favourable clinical outcome of patients with melanoma under immune checkpoint blockade. *Br J Dermatol* 182:1214-1220
36. Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, Almeida JR, Gostick E, Yu Z, Carpenito C, Wang E, Douek DC, Price DA, June CH, Marincola FM, Roederer M, Restifo NP (2011) A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med* 17:1290-1297
37. Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, Sondak VK, Long GV, Ross MI, Lazar AJ, Faries MB, Kirkwood JM, McArthur GA, Haydu LE, Eggermont AMM, Flaherty KT, Balch CM,

- Thompson JF, for members of the American Joint Committee on Cancer Melanoma Expert P, the International Melanoma D, Discovery P (2017) Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin* 67:472-492
38. Gide TN, Quek C, Menzies AM, Tasker AT, Shang P, Holst J, Madore J, Lim SY, Velickovic R, Wongchenko M, Yan Y, Lo S, Carlino MS, Guminski A, Saw RPM, Pang A, McGuire HM, Palendira U, Thompson JF, Rizos H, Silva IPD, Batten M, Scolyer RA, Long GV, Wilmott JS (2019) Distinct Immune Cell Populations Define Response to Anti-PD-1 Monotherapy and Anti-PD-1/Anti-CTLA-4 Combined Therapy. *Cancer Cell* 35:238-255.e236
 39. Gupta PK, Godec J, Wolski D, Adland E, Yates K, Pauken KE, Cosgrove C, Ledderose C, Junger WG, Robson SC, Wherry EJ, Alter G, Goulder PJ, Klenerman P, Sharpe AH, Lauer GM, Haining WN (2015) CD39 Expression Identifies Terminally Exhausted CD8+ T Cells. *PLoS Pathog* 11:e1005177
 40. Haifler M, Copel L, Sandbank J, Lang E, Raz O, Leibovici D, Lindner A, Zisman A (2012) Renal oncocytoma--are there sufficient grounds to consider surveillance following prenephrectomy histologic diagnosis. *Urol Oncol* 30:362-368
 41. Harari A, Vallelian F, Meylan PR, Pantaleo G (2005) Functional heterogeneity of memory CD4 T cell responses in different conditions of antigen exposure and persistence. *J Immunol* 174:1037-1045
 42. Harbour JW, Onken MD, Roberson ED, Duan S, Cao L, Worley LA, Council ML, Matatall KA, Helms C, Bowcock AM (2010) Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas. *Science* 330:1410-1413
 43. Herold G, et al. (2020) *Innere Medizin 2020*. Herold 2020 ISBN: 978-3-9814660-9-6
 44. Huang AC, Postow MA, Orlowski RJ, Mick R, Bengsch B, Manne S, Xu W, Harmon S, Giles JR, Wenz B, Adamow M, Kuk D, Panageas KS, Carrera C, Wong P, Quagliarello F, Wubbenhorst B, D'Andrea K, Pauken KE, Herati RS, Staupe RP, Schenkel JM, McGettigan S, Kothari S, George SM, Vonderheide RH, Amaravadi RK, Karakousis GC, Schuchter LM, Xu X, Nathanson KL, Wolchok JD, Gangadhar TC, Wherry EJ (2017) T-cell invigoration to tumour burden ratio associated with anti-PD-1 response. *Nature* 545:60-65
 45. Huang AC, Orlowski RJ, Xu X, Mick R, George SM, Yan PK, Manne S, Kraya AA, Wubbenhorst B, Dorfman L, D'Andrea K, Wenz BM, Liu S, Chilukuri L, Kozlov A, Carberry M, Giles L, Kier MW, Quagliarello F, McGettigan S, Kreider K, Annamalai L, Zhao Q, Mogg R, Xu W, Blumenschein WM, Yearley JH, Linette GP, Amaravadi RK, Schuchter LM, Herati RS, Bengsch B, Nathanson KL, Farwell MD, Karakousis GC, Wherry EJ, Mitchell TC (2019) A single dose of neoadjuvant PD-1 blockade predicts clinical outcomes in resectable melanoma. *Nat Med* 25:454-461
 46. Huang PW, Chang JW (2019) Immune checkpoint inhibitors win the 2018 Nobel Prize. *Biomed J* 42:299-306
 47. Jamur MC, Oliver C (2010) Permeabilization of cell membranes. *Methods Mol Biol* 588:63-66
 48. Kahlmeyer A, Stohr CG, Hartmann A, Goebell PJ, Wullich B, Wach S, Taubert H, Erlmeier F (2019) Expression of PD-1 and CTLA-4 Are Negative Prognostic Markers in Renal Cell Carcinoma. *J Clin Med* 8
 49. Kamphorst AO, Pillai RN, Yang S, Nasti TH, Akondy RS, Wieland A, Sica GL, Yu K, Koenig L, Patel NT, Behera M, Wu H, McCausland M, Chen Z, Zhang C, Khuri FR, Owonikoko TK, Ahmed R, Ramalingam SS (2017) Proliferation of PD-1+ CD8 T cells in peripheral blood after PD-1-targeted therapy in lung cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:4993-4998
 50. Kannanganat S, Ibegbu C, Chennareddi L, Robinson HL, Amara RR (2007) Multiple-cytokine-producing antiviral CD4 T cells are functionally superior to single-cytokine-producing cells. *J Virol* 81:8468-8476
 51. Kim KH, Hur JY, Cho J, Ku BM, Koh J, Koh JY, Sun JM, Lee SH, Ahn JS, Park K, Ahn MJ, Shin EC (2020) Immune-related adverse events are clustered into distinct subtypes by T-cell profiling before and early after anti-PD-1 treatment. *Oncoimmunology* 9:1722023
 52. Kirkwood JM, Del Vecchio M, Weber J, Hoeller C, Grob JJ, Mohr P, Loquai C, Dutriaux C, Chiarion-Sileni V, Mackiewicz J, Rutkowski P, Arenberger P, Quereux G, Meniawy TM, Ascierto PA, Menzies AM, Durani P, Lobo M, Campigotto F, Gastman B, Long GV (2023)

- Adjuvant nivolumab in resected stage IIB/C melanoma: primary results from the randomized, phase 3 CheckMate 76K trial. *Nat Med* 29:2835-2843
53. Kovacsovics-Bankowski M, Sweere JM, Healy CP, Sigal N, Cheng LC, Chronister WD, Evans SA, Marsiglio J, Gibson B, Swami U, Erickson-Wayman A, McPherson JP, Derose YS, Eliason AL, Medina CO, Srinivasan R, Spitzer MH, Nguyen N, Hyingstrom J, Hu-Lieskovan S (2024) Lower frequencies of circulating suppressive regulatory T cells and higher frequencies of CD4(+) naïve T cells at baseline are associated with severe immune-related adverse events in immune checkpoint inhibitor-treated melanoma. *J Immunother Cancer* 12
 54. Krebs FK, Trzeciak ER, Zimmer S, Ozistanbullu D, Mitzel-Rink H, Meissner M, Grabbe S, Loquai C, Tuettenberg A (2021) Immune signature as predictive marker for response to checkpoint inhibitor immunotherapy and overall survival in melanoma. *Cancer Med* 10:1562-1575
 55. Kumar BV, Connors TJ, Farber DL (2018) Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity* 48:202-213
 56. Lachmann R, Loenenbach A, Waterboer T, Brenner N, Pawlita M, Michel A, Thamm M, Poethko-Muller C, Wichmann O, Wiese-Posselt M (2018) Cytomegalovirus (CMV) seroprevalence in the adult population of Germany. *PLoS One* 13:e0200267
 57. Larbi A, Fulop T (2014) From "truly naïve" to "exhausted senescent" T cells: when markers predict functionality. *Cytometry A* 85:25-35
 58. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Rutkowski P, Lao CD, Cowey CL, Schadendorf D, Wagstaff J, Dummer R, Ferrucci PF, Smylie M, Hogg D, Hill A, Marquez-Rodas I, Haanen J, Guidoboni M, Maio M, Schoffski P, Carlino MS, Lebbe C, McArthur G, Ascierto PA, Daniels GA, Long GV, Bastholt L, Rizzo JI, Balogh A, Moshyk A, Hodi FS, Wolchok JD (2019) Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* 381:1535-1546
 59. Ledo A, Schub D, Ziller C, Enders M, Stenger T, Gärtner BC, Schmidt T, Meyer T, Sester M (2020) Elite athletes on regular training show more pronounced induction of vaccine-specific T-cells and antibodies after tetravalent influenza vaccination than controls. *Brain Behav Immun* 83:135-145
 60. Leiter U, Buettner PG, Eigentler TK, Brocker EB, Voit C, Gollnick H, Marsch W, Wollina U, Meier F, Garbe C (2012) Hazard rates for recurrent and secondary cutaneous melanoma: an analysis of 33,384 patients in the German Central Malignant Melanoma Registry. *J Am Acad Dermatol* 66:37-45
 61. Lokshin A, Raskovalova T, Huang X, Zacharia LC, Jackson EK, Gorelik E (2006) Adenosine-mediated inhibition of the cytotoxic activity and cytokine production by activated natural killer cells. *Cancer Res* 66:7758-7765
 62. Long GV, Hauschild A, Santinami M, Atkinson V, Mandala M, Chiarion-Sileni V, Larkin J, Nyakas M, Dutriaux C, Haydon A, Robert C, Mortier L, Schachter J, Schadendorf D, Lesimple T, Plummer R, Ji R, Zhang P, Mookerjee B, Legos J, Kefford R, Dummer R, Kirkwood JM (2017) Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in Stage III BRAF-Mutated Melanoma. *N Engl J Med* 377:1813-1823
 63. Lüllmann-Rauch R (2015) *Histologie Taschenlehrbuch*. Georg Thieme Verlag KG Stuttgart 5. Auflage
 64. Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E (2013) The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol* 43:2797-2809
 65. Mai R, Zhou S, Zhong W, Rong S, Cong Z, Li Y, Xie Q, Chen H, Li X, Liu S, Cheng Y, Huang Y, Zhou Y, Zhang G (2015) Therapeutic efficacy of combined BRAF and MEK inhibition in metastatic melanoma: a comprehensive network meta-analysis of randomized controlled trials. *Oncotarget* 6:28502-28512
 66. Maldonado JL, Fridlyand J, Patel H, Jain AN, Busam K, Kageshita T, Ono T, Albertson DG, Pinkel D, Bastian BC (2003) Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *J Natl Cancer Inst* 95:1878-1890
 67. Masuda A, Arai K, Nishihara D, Mizuno T, Yuki H, Kambara T, Betsunoh H, Abe H, Yashi M, Fukabori Y, Yoshida K, Kamai T (2014) Clinical significance of serum soluble T cell regulatory molecules in clear cell renal cell carcinoma. *Biomed Res Int* 2014:396064
 68. Mehrazin R, Uzzo RG, Kutikov A, Ruth K, Tomaszewski JJ, Dulaimi E, Ginzburg S, Abbosh PH, Ito T, Corcoran AT, Chen DY, Smaldone MC, Al-Saleem T (2015) Lymphopenia is an

- independent predictor of inferior outcome in papillary renal cell carcinoma. *Urol Oncol* 33:388 e319-325
69. Mildner A, Jung S (2014) Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity* 40:642-656
 70. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ (2014) New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol* 27:16-25
 71. Mocellin S, Zavagno G, Nitti D (2008) The prognostic value of serum S100B in patients with cutaneous melanoma: a meta-analysis. *Int J Cancer* 123:2370-2376
 72. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM (2016) The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol* 70:93-105
 73. Mort RL, Jackson IJ, Patton EE (2015) The melanocyte lineage in development and disease. *Development* 142:620-632
 74. Motzer RJ, Tannir NM, McDermott DF, Aren Frontera O, Melichar B, Choueiri TK, Plimack ER, Barthelemy P, Porta C, George S, Powles T, Donskov F, Neiman V, Kollmannsberger CK, Salman P, Gurney H, Hawkins R, Ravaud A, Grimm MO, Bracarda S, Barrios CH, Tomita Y, Castellano D, Rini BI, Chen AC, Mekan S, McHenry MB, Wind-Rotolo M, Doan J, Sharma P, Hammers HJ, Escudier B, CheckMate 1 (2018) Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 378:1277-1290
 75. Motzer RJ, Penkov K, Haanen J, Rini B, Albiges L, Campbell MT, Venugopal B, Kollmannsberger C, Negrier S, Uemura M, Lee JL, Vasiliev A, Miller WH, Jr., Gurney H, Schmidinger M, Larkin J, Atkins MB, Bedke J, Alekseev B, Wang J, Mariani M, Robbins PB, Chudnovsky A, Fowst C, Hariharan S, Huang B, di Pietro A, Choueiri TK (2019) Avelumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 380:1103-1115
 76. Müller M, et al. (2016) *Chirurgie für Studium und Praxis* ISBN 978-3-929851-12-0. Medizinische Verlags- und Informationsdienste Breisach 13.Auflage
 77. Murphy KW, Casey (2018) *Janeway Immunologie* ISBN 978-3-662-56003-7. Springer Spektrum, Springer Verlag GmbH Deutschland, ein Teil von Springer Nature 9.Auflage
 78. Pantaleo G, Harari A (2006) Functional signatures in antiviral T-cell immunity for monitoring virus-associated diseases. *Nat Rev Immunol* 6:417-423
 79. Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Roederer M (2004) Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nat Rev Immunol* 4:648-655
 80. Pfannenbergl C, Aschoff P, Schanz S, Eschmann SM, Plathow C, Eigentler TK, Garbe C, Brechtel K, Vonthein R, Bares R, Claussen CD, Schlemmer HP (2007) Prospective comparison of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography and whole-body magnetic resonance imaging in staging of advanced malignant melanoma. *Eur J Cancer* 43:557-564
 81. Plewig GR, Thomas; Kaufmann, Roland; Hertl, Michael (2018) *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie Band 1 und 2* ISBN 978-3-662-49545-2. Springer Verlag GmbH Deutschland, ein Teil von Springer Nature 7.Auflage
 82. Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, Baker J, Jeffery LE, Kaur S, Briggs Z, Hou TZ, Futter CE, Anderson G, Walker LS, Sansom DM (2011) Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* 332:600-603
 83. Ramos-Casals M, Brahmer JR, Callahan MK, Flores-Chávez A, Keegan N, Khamashta MA, Lambotte O, Mariette X, Prat A, Suárez-Almazor ME (2020) Immune-related adverse events of checkpoint inhibitors. *Nat Rev Dis Primers* 6:38
 84. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M (2008) Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 371:569-578
 85. Richard PO, Lavalley LT, Pouliot F, Komisarenko M, Martin L, Lattouf JB, Finelli A (2018) Is Routine Renal Tumor Biopsy Associated with Lower Rates of Benign Histology following Nephrectomy for Small Renal Masses? *J Urol* 200:731-736
 86. Rini BI, Plimack ER, Stus V, Gafanov R, Hawkins R, Nosov D, Pouliot F, Alekseev B, Soulieres D, Melichar B, Vynnychenko I, Kryzhanivska A, Bondarenko I, Azevedo SJ,

- Borchiellini D, Szczylik C, Markus M, McDermott RS, Bedke J, Tartas S, Chang YH, Tamada S, Shou Q, Perini RF, Chen M, Atkins MB, Powles T, Investigators K- (2019) Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 380:1116-1127
87. Robert C, Ribas A, Schachter J, Arance A, Grob JJ, Mortier L, Daud A, Carlino MS, McNeil CM, Lotem M, Larkin JMG, Lorigan P, Neyns B, Blank CU, Petrella TM, Hamid O, Su SC, Krepler C, Ibrahim N, Long GV (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
 88. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) (2021) Krebs in Deutschland für 2017/2018, Vol 13. Ausgabe, Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), Berlin).
 89. Rudd CE, Taylor A, Schneider H (2009) CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol Rev* 229:12-26
 90. Rutkowski P, Czarnecka AM (2023) Pembrolizumab for the adjuvant treatment of IIB or IIC melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 23:897-902
 91. Sakaguchi S (2000) Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 101:455-458
 92. Sakaguchi S (2005) Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6:345-352
 93. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M (2008) Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133:775-787
 94. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A (1999) Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401:708-712
 95. Saroha S, Uzzo RG, Plimack ER, Ruth K, Al-Saleem T (2013) Lymphopenia is an independent predictor of inferior outcome in clear cell renal carcinoma. *J Urol* 189:454-461
 96. Schmidt T, Sester M (2013) Detection of antigen-specific T cells based on intracellular cytokine staining using flow-cytometry. *Methods Mol Biol* 1064:267-274
 97. Schmidt T, Adam C, Hirsch HH, Janssen MW, Wolf M, Dirks J, Kardas P, Ahlenstiel-Grunow T, Pape L, Rohrer T, Fliser D, Sester M, Sester U (2014) BK polyomavirus-specific cellular immune responses are age-dependent and strongly correlate with phases of virus replication. *Am J Transplant* 14:1334-1345
 98. Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182:311-322
 99. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ (2011) Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331:1565-1570
 100. Schub D, Janssen E, Leyking S, Sester U, Assmann G, Hennes P, Smola S, Vogt T, Rohrer T, Sester M, Schmidt T (2015) Altered phenotype and functionality of varicella zoster virus-specific cellular immunity in individuals with active infection. *J Infect Dis* 211:600-612
 101. Schub D, Assmann G, Sester U, Sester M, Schmidt T (2018a) VZV-specific T-cell levels in patients with rheumatic diseases are reduced and differentially influenced by antirheumatic drugs. *Arthritis Res Ther* 20:252
 102. Schub D, Fousse M, Elsasser J, Fassbender K, Sester U, Schmidt T, Sester M (2018b) Assay for improved detection of antigen-specific immune cells from extrasanguineous fluids. *Eur J Immunol* 48:1412-1414
 103. Schub D, Fousse M, Fassbender K, Gartner BC, Sester U, Sester M, Schmidt T (2018c) CTLA-4-expression on VZV-specific T cells in CSF and blood is specifically increased in patients with VZV related central nervous system infections. *Eur J Immunol* 48:151-160
 104. Schub D, Klemis V, Schneitler S, Mihm J, Lepper PM, Wilkens H, Bals R, Eichler H, Gartner BC, Becker SL, Sester U, Sester M, Schmidt T (2020) High levels of SARS-CoV-2-specific T cells with restricted functionality in severe courses of COVID-19. *JCI Insight* 5
 105. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, Nanan R, Kelleher A, Fazekas de St Groth B (2006) Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 203:1693-1700

106. Sester M, Sester U, Gärtner B, Heine G, Girndt M, Mueller-Lantsch N, Meyerhans A, Köhler H (2001) Levels of virus-specific CD4 T cells correlate with cytomegalovirus control and predict virus-induced disease after renal transplantation. *Transplantation* 71:1287-1294
107. Sester U, Presser D, Dirks J, Gartner BC, Kohler H, Sester M (2008a) PD-1 expression and IL-2 loss of cytomegalovirus- specific T cells correlates with viremia and reversible functional anergy. *Am J Transplant* 8:1486-1497
108. Sester U, Presser D, Dirks J, Gärtner BC, Kohler H, Sester M (2008b) PD-1 expression and IL-2 loss of cytomegalovirus- specific T cells correlates with viremia and reversible functional anergy. *Am J Transplant* 8:1486-1497
109. Sester U, Fousse M, Dirks J, Mack U, Prasse A, Singh M, Lalvani A, Sester M (2011) Whole-blood flow-cytometric analysis of antigen-specific CD4 T-cell cytokine profiles distinguishes active tuberculosis from non-active states. *PLoS One* 6:e17813
110. Stagg J, Divisekera U, Duret H, Sparwasser T, Teng MW, Darcy PK, Smyth MJ (2011) CD73-deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis. *Cancer Res* 71:2892-2900
111. Swami U, Nussenzevig RH, Haaland B, Agarwal N (2019) Revisiting AJCC TNM staging for renal cell carcinoma: quest for improvement. *Ann Transl Med* 7:S18
112. Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH (2003) Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol* 21:713-758
113. Thommen DS, Koelzer VH, Herzig P, Roller A, Trefny M, Dimeloe S, Kiialainen A, Hanhart J, Schill C, Hess C, Savic Prince S, Wiese M, Lardinois D, Ho PC, Klein C, Karanikas V, Mertz KD, Schumacher TN, Zippelius A (2018) A transcriptionally and functionally distinct PD-1(+) CD8(+) T cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with PD-1 blockade. *Nat Med* 24:994-1004
114. Tucker MA, Goldstein AM (2003) Melanoma etiology: where are we? *Oncogene* 22:3042-3052
115. Tumorregister-München (2021) Überleben ICD-10 C64: Nierenkarzinom [Internet]. 2021 [aktualisiert 25.08.2021].
116. van den Brom RRH, van der Geest KSM, Brouwer E, Hospers GAP, Boots AMH (2018) Enhanced expression of PD-1 and other activation markers by CD4+ T cells of young but not old patients with metastatic melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 67:925-933
117. Volpe A, Finelli A, Gill IS, Jewett MA, Martignoni G, Polascik TJ, Remzi M, Uzzo RG (2012) Rationale for percutaneous biopsy and histologic characterisation of renal tumours. *Eur Urol* 62:491-504
118. von Freeden-Jeffry U, Vieira P, Lucian LA, McNeil T, Burdach SE, Murray R (1995) Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med* 181:1519-1526
119. Vredevoogd DW, Kuilman T, Ligtenberg MA, Boshuizen J, Stecker KE, de Bruijn B, Krijgsman O, Huang X, Kenski JCN, Lacroix R, Mezzadra R, Gomez-Eerland R, Yildiz M, Dagidir I, Apriamashvili G, Zandhuis N, van der Noort V, Visser NL, Blank CU, Altelaar M, Schumacher TN, Peeper DS (2019) Augmenting Immunotherapy Impact by Lowering Tumor TNF Cytotoxicity Threshold. *Cell* 178:585-599.e515
120. Wang Q, Zhang J, Tu H, Liang D, Chang DW, Ye Y, Wu X (2019) Soluble immune checkpoint-related proteins as predictors of tumor recurrence, survival, and T cell phenotypes in clear cell renal cell carcinoma patients. *J Immunother Cancer* 7:334
121. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM (2006) Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 24:677-688
122. Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, van der Most R, Ahmed R (2003) Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol* 77:4911-4927
123. Wherry EJ (2011) T cell exhaustion. *Nat Immunol* 12:492-499
124. Whiteman DC, Watt P, Purdie DM, Hughes MC, Hayward NK, Green AC (2003) Melanocytic nevi, solar keratoses, and divergent pathways to cutaneous melanoma. *J Natl Cancer Inst* 95:806-812
125. Willinger T, Freeman T, Hasegawa H, McMichael AJ, Callan MF (2005) Molecular signatures distinguish human central memory from effector memory CD8 T cell subsets. *J Immunol* 175:5895-5903

126. Wistuba-Hamprecht K, Martens A, Heubach F, Romano E, Geukes Foppen M, Yuan J, Postow M, Wong P, Mallardo D, Schilling B, Di Giacomo AM, Khammari A, Dreno B, Maio M, Schadendorf D, Ascierto PA, Wolchok JD, Blank CU, Garbe C, Pawelec G, Weide B (2017) Peripheral CD8 effector-memory type 1 T-cells correlate with outcome in ipilimumab-treated stage IV melanoma patients. *Eur J Cancer* 73:61-70
127. Wong YNS, Joshi K, Khetrapal P, Ismail M, Reading JL, Sunderland MW, Georgiou A, Furness AJS, Ben Aissa A, Ghorani E, Oakes T, Uddin I, Tan WS, Feber A, McGovern U, Swanton C, Freeman A, Marafioti T, Briggs TP, Kelly JD, Powles T, Peggs KS, Chain BM, Linch MD, Quezada SA (2018) Urine-derived lymphocytes as a non-invasive measure of the bladder tumor immune microenvironment. *J Exp Med* 215:2748-2759
128. Woods DM, Laino AS, Winters A, Alexandre J, Freeman D, Rao V, Adavani SS, Weber JS, Chattopadhyay PK (2020) Nivolumab and ipilimumab are associated with distinct immune landscape changes and response-associated immunophenotypes. *JCI Insight* 5
129. World Health Organization IAfRoC (2021) Globocan 2020. The Global Cancer Observatory
130. Ye W, Olsson-Brown A, Watson RA, Cheung VTF, Morgan RD, Nassiri I, Cooper R, Taylor CA, Akbani U, Brain O, Matin RN, Coupe N, Middleton MR, Coles M, Sacco JJ, Payne MJ, Fairfax BP (2021) Checkpoint-blocker-induced autoimmunity is associated with favourable outcome in metastatic melanoma and distinct T-cell expression profiles. *Br J Cancer* 124:1661-1669
131. Yu N, Li X, Song W, Li D, Yu D, Zeng X, Li M, Leng X, Li X (2012) CD4(+)CD25 (+)CD127 (low/-) T cells: a more specific Treg population in human peripheral blood. *Inflammation* 35:1773-1780

11 Danksagung

Für das Thema dieser Doktorarbeit möchte ich mich herzlich bei meiner Doktormutter Frau Professor Dr. rer. nat. Martina Sester bedanken, welche mir diese wissenschaftliche Arbeit an ihrem Institut für Transplantations- und Infektionsimmunologie überhaupt erst ermöglicht hat. Sie ermöglichte mir den Einstieg in eine fundierte wissenschaftliche Ausbildung. Für die geduldige und großartige Betreuung und Anleitung gilt mein herzlicher Dank Frau Dr. rer. nat. Tina Schmidt, welche mich mit dem wissenschaftlichen Arbeiten vertraut machen konnte und mich unermüdlich bei dem Erheben, der Auswertung, Interpretation der Daten und dem Zusammenfassen unterstützt hat. Herrn Professor Dr. med. Urban Sester danke ich dafür, dass er mich aus dem klinischen Abschnitt meines Studiums für eine Doktorarbeit in der Grundlagenforschung begeistern konnte und für die persönliche Beratung während meines Studiums. Frau Professor Dr. med. Claudia Pföhler als Leiterin des onkologischen Zentrums der Dermatologie möchte ich für die gelungene Kooperation und darüber hinaus für die Begeisterung an der Fachdisziplin ganz herzlich danken. Für die Unterstützung bei der Selektierung und Bereitstellung von Proben aus der Urologie sowie der methodischen Beratung gilt mein großer Dank Herrn Privatdozent Dr. med. Martin Janssen.

In diesem Zusammenhang gilt auch ein großer Dank allen Patientinnen und Patienten, welche sich trotz Erkrankung bereit erklärt, haben an dieser Studie teilzunehmen. Ohne Ihre Teilnahme wäre ein Fortschritt in der Forschung nicht möglich. Des Weiteren gilt ein großer Dank an alle freiwilligen Teilnehmerinnen und Teilnehmer, welche als gesunde Kontrollen in diese Studie mit eingeflossen sind.

Dem gesamten Labor der Infektions- und Transplantationsimmunologie möchte ich für die herzliche Aufnahme in das Team, und auch im Weiteren die ausdauernde Unterstützung, Anleitung und Hilfsbereitschaft rund um die Uhr danken. Frau Candida Guckelmus für die geduldige Einleitung in die praktischen Arbeitsabläufe und Handhabung der Gerätschaften im Labor. Für Anleitung zur Erhebung, Einstellung und Auswertung von FACS Analysen Herrn Dr. rer. nat. David Schub, Frau Dipl. Biol. Verena Klemis, Frau Dipl. Biol. Stefanie Marx und MSc. Franziska Hielscher, welche mich auch immer motivieren konnten die Arbeiten fortzuführen. Des Weiteren danke ich Frau MSc. Saskia Bronder welche im Rahmen ihrer Bachelorarbeit einen Teil der Proben bearbeitet hat, die gemeinsam mit den von mir bearbeiteten Proben ausgewertet wurden.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie, Freunden und Partnerin für ihre moralische Unterstützung über die Promotion hinaus bedanken.

12 Publikationen

Werner M, Stromer W, Hüning S, Loquai C, Kähler K, Susok L, Nashan D. (2025) Supportive pain therapy in dermatology. J Dtsch Dermatol Ges. 23(6):721-745

Niemcyk M‡, Werner M‡, Lücke A, Gambichler T, Susok L. (2025) Pseudoepitheliomatöse Hyperplasie im Rahmen einer Tätowierung mit rotem Pigment. Akt Dermatol. 51: 190–194 ‡ gleichwertige Erstautorschaft

Gambichler T, Weyer-Fahlbusch SS, Werner M, Schade U, Bissels L, Susok L. (2025) Primary cutaneous marginal zone lymphoma in a patient with multiple sclerosis under fingolimod therapy. Dermatol Reports. Epub ahead of print

Hüning S, Werner M, Susok L. (2024) Klinik und Therapie des Herpes zoster und der postherpetischen Neuralgie. Dermatologie (Heidelb). 75(9):733-742

13 Kongressbeiträge (nur Erstautorenschaften)

2025:

Tagraxofusp for the treatment of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasia, ADO Kongress, Essen, Deutschland 2025

Plastische Defektdeckung mit SUPRA SDRM® bei ausgedehntem mikrozystischen Adnexcarcinom an der linken Wange, DGDC Kongress, München, Deutschland 2025

2023:

Dermatologie mit allen Sinnen: Erstdiagnose eines invasiven lobulären Mammakarzinoms mit tastbarer Hautmetastasierung auf blander Haut, DWFA Kongress, Köln, Deutschland 2023

Refurbishment of rhabdomyosarcoma in adults by means of a case report, World Congress of Dermatology, Singapur 2023

State of knowledge –basal cell carcinoma syndrome instancing a missed diagnosis in a middle-aged patient, World Congress of Dermatology, Singapur 2023

2020:

T-cellular characteristics of patients with malignant melanoma in relation to therapy with PD-1 immune checkpoint inhibitors, ADO Kongress, digital, Deutschland 2020

14 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

