# Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie Prof. Dr. med. Stefan W. Schneider

# Der Einfluss von Heparansulfat auf die Rekrutierung von Immunzellen beim malignen Melanom

#### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Karena Opitz aus Detmold

Hamburg 2022

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 20.03.2023

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prof. Dr. Leticia Oliveira- Ferrer

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:

Prof. Dr. Stefan W. Schneider

# Inhaltsverzeichnis

A	bbildur	gsverzeichnis	V
Т	abellen	verzeichnis	VI
Α	bkürzu	ngsverzeichnis	. VII
		Disclaimer	
1	. Einl	eitung	1
	1.1.	Das maligne Melanom	1
	1.1.1.	Definition und Epidemiologie	1
	1.1.2.	Ätiologie und Risikofaktoren	3
	1.1.3.	Klinik und Diagnostik	5
	1.1.4.	Klassifikation des malignen Melanoms	8
	1.1.5.	Therapie des malignen Melanoms	9
	1.1.6.	Nachsorge des malignen Melanoms	12
	1.1.7.	Tumorprogression und Konsequenz für den Patienten	13
	1.1.8.	Tumor und das Immunsystem	14
	1.2.	Chemokine und ihre Verteilung	17
	1.3.	Heparansulfat	20
	1.3.1.	Die Wechselwirkung zwischen HS und seinen Bindungspartnern	22
	1.3.2.	Die Rolle von HS bei Tumorentwicklung und Metastasierung	25
	1.4.	Arbeitshypothese und Fragestellung	26
2	. Mat	erial und Methoden	28
	2.1.	Material	28
	2.1.1.	Geräte und Utensilien	28
	2.1.2.	Lösungen und Reagenzien	30
	2.1.3.	Antikörper	32
	2.1.4.	Primer	32
	2.1.5.	Software	
	2.2.	Methoden	34
	2.2.1.	Ablauf des Tierexperiments	34
	2.2.2.	Anfertigung der Gefrierschnitte	
	2.2.3.	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung	
	2.2.4.	Immunfluoreszenzfärbung von Gefrierschnitten	

	2.2.5.	Bestimmung des Anteils der Immunzellen	37
	2.2.6.	Bestimmung des Anteils an Lungenmetastasen	38
	2.2.7.	Isolierung der RNA aus dem Gewebe	38
	2.2.8.	RNA Konzentrationsmessung	39
	2.2.9.	Umschreiben der Proben in cDNA	40
	2.2.10.	Durchführung der qPCR	40
	2.2.11.	Validierung der qPCR amplifizierten PCR Produkte mittels	
	Gelelek	ktrophorese	42
	2.2.12.	Statistische Auswertung	43
3.	Erge	bnisse	44
	3.1. I	EXT-1 knock-out Tumorzellen führen zu einer hohen Metastasierun	gslast
	4	45	
,	3.2. <sup>\\</sup>	Vergleich des Immunzellinfiltrats in das metastatische Lungengewel	be .47
,	3.3. I	Ergebnisse der qPCR	52
,	3.4.	Analyse des Zusammenhangs zwischen der Anzahl der Immunzelle	n und
	der Anz	zahl von Metastasen	55
4.	Disk	ussion	57
5.	Zusa	mmenfassung	66
6.	Supp	plement	70
7.	Litera	aturverzeichnis	81
8.	Dank	sagung	102
9.	Lebe	nslauf	103
10	. Eid	desstattliche Versicherung	104

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Melanozyten in der menschlichen Haut	1
Abbildung 2 Tumordicke nach Breslow, angepasst an die Klassifikation der AJC	C
2016	9
Abbildung 3 Das GAGosom, der Biosyntheseapparat von HS	.21
Abbildung 5 Möglichkeiten der HS-Protein-Wechselwirkungen	.23
Abbildung 6 Ein Modell für die Auswirkung einer insuffizienten HS-Biosynthese.	.27
Abbildung 6 Zeitlicher Ablauf des verwendeten Mausmodells	. 35
Abbildung 8 Quantifizierung der Lungenmetastasen	.46
Abbildung 9 Fotografische Darstellung der B16F10 induzierten murinen	
Lungenmetastasen	.46
Abbildung 10 Vergleich des Immunzellinfiltrats in Metastasen und des	
umliegenden Lungengewebes	.48
Abbildung 11 Die Anzahl der Immunzellen in dem metastasierten Lungengeweb	Эе
	.51
Abbildung 12 Die Expressionsanalyse von Immunzellen mit Hilfe einer qPCR	.53
Abbildung 13 Die Expressionsanalyse von Cytokinen mit Hilfe einer qPCR	. 54
Abbildung 14 Analyse des Zusammenhangs zwischen der Anzahl der	
Immunzellen und der Anzahl der Metastasen	.56

# **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1 ABCDE-Regel	5
Tabelle 2 Risikoadaptierte Nachsorgeintervalle des malignen Melanoms	
(Leitlinienprogramm-Onkologie 2020)	. 13
Tabelle 3 Die Bindungsaffinität verschiedener Chemokine zu GAG	. 24
Tabelle 4 Verwendete Antikörper und Verdünnung der Färbung	.37

# Abkürzungsverzeichnis

AKT.Z. Aktenzeichen AK Antikörper APC Antigenpräsentierende Zelle BRAF Serine/Threonine-Protein Kinase B-Raf bspw. beispielsweise ca. circa CCL2 CC-Chemokin Ligand 2 CCL21 CC-Chemokin Ligand 27 CCL27 CC-Chemokin Ligand 27 CCR4 CC-Chemokinrezeptor Typ 4 CCR7 CC-Chemokinrezeptor Typ 7 CCR10 CC-Chemokinrezeptor Typ 10 CD Cluster of differentiation cDNA komplementäre Desoxyribonukleinsäure CRISPR/Cas9 Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats und CRISPR-associated Protein 9 CS Chondroitinsulfat CSf3 Kolonie-stimulierender Faktor 3 Ct Cycle threshold CT Computertomographie CTLA-4 zytotoxisches T-Lymphozytenantigen 4 CXCL4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 4 CXCL8 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 8 CXCL9 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10 CXCL12 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10 CXCL12 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12 CXCR4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10 DEPC Diethylpyrocarbonat DNA Desoxyribonukleinsäure	Abb.	Abbildung	
AK Antikörper APC Antigenpräsentierende Zelle BRAF Serine/Threonine-Protein Kinase B-Raf bspw. beispielsweise ca. circa CCL2 CC-Chemokin Ligand 2 CCL21 CC-Chemokin Ligand 21 CCL27 CC-Chemokin Ligand 27 CCR4 CC-Chemokin Ligand 27 CCR4 CC-Chemokin Ligand 27 CCR6 CCR7 CC-Chemokin Ligand 27 CCR7 CC-Chemokin Ligand 27 CCR8 CC-Chemokin Ligand 27 CCR9 CC-Chemokin Ligand 28 CRISPR/Cas9 Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats und CRISPR-associated Protein 9 CS Chondroitinsulfat CSG3 Kolonie-stimulierender Faktor 3 Ct Cycle threshold CT Computertomographie CTLA-4 zytotoxisches T-Lymphozytenantigen 4 CXCL4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 4 CXCL8 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 8 CXCL9 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 9 CXCL10 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10 CXCL12 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12 CXCR4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12 CXCR4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12 CXCR4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10 DEPC Diethylpyrocarbonat	AJCC	American Joint Committee on Cancer	
APC Antigenpräsentierende Zelle BRAF Serine/Threonine-Protein Kinase B-Raf bspw. beispielsweise ca. circa CCL2 CC-Chemokin Ligand 2 CCL21 CC-Chemokin Ligand 21 CCL27 CC-Chemokin Ligand 27 CCR4 CC-Chemokin Ligand 27 CCR4 CC-Chemokin Ligand 27 CCR0 CC-Chemokin Ligand 27 CCR10 CLuster of differentiation CDNA komplementäre Desoxyribonukleinsäure CRISPR/Cas9 Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats und CRISPR-associated Protein 9 CS Chondroitin Sulfat Csf3 Kolonie-stimulierender Faktor 3 Ct Cycle threshold CT Computertomographie CTLA-4 zytotoxisches T-Lymphozytenantigen 4 CXCL4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 4 CXCL4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 8 CXCL9 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 9 CXCL10 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10 CXCL12 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12 CXCR4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12 CXCR4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12 CXCR4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10 DEPC Diethylpyrocarbonat	AKT.Z.	Aktenzeichen	
BRAF Serine/Threonine-Protein Kinase B-Raf bspw. beispielsweise ca. circa CCL2 CC-Chemokin Ligand 2 CCL21 CC-Chemokin Ligand 21 CCL27 CC-Chemokin Ligand 27 CCR4 CC-Chemokinrezeptor Typ 4 CCR7 CC-Chemokinrezeptor Typ 7 CCR10 CC-Chemokinrezeptor Typ 10 CD Cluster of differentiation cDNA komplementäre Desoxyribonukleinsäure CRISPR/Cas9 Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats und CRISPR-associated Protein 9 CS Chondroitinsulfat Csf3 Kolonie-stimulierender Faktor 3 Ct Cycle threshold CT Computertomographie CTLA-4 zytotoxisches T-Lymphozytenantigen 4 CXCL4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 4 CXCL8 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 8 CXCL9 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10 CXCL12 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12 CXCR4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12 CXCR4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12 CXCR4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12 CXCR4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10 DEPC Diethylpyrocarbonat	AK	Antikörper	
bspw. beispielsweise ca. circa CCL2 CC-Chemokin Ligand 2 CCL21 CC-Chemokin Ligand 21 CCL27 CC-Chemokin Ligand 27 CCR4 CC-Chemokinrezeptor Typ 4 CCR7 CC-Chemokinrezeptor Typ 7 CCR10 CC-Chemokinrezeptor Typ 10 CD Cluster of differentiation cDNA komplementäre Desoxyribonukleinsäure CRISPR/Cas9 Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats und CRISPR-associated Protein 9 CS Chondroitinsulfat Csf3 Kolonie-stimulierender Faktor 3 Ct Cycle threshold CT Computertomographie CTLA-4 zytotoxisches T-Lymphozytenantigen 4 CXCL4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 4 CXCL8 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 9 CXCL10 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10 CXCL12 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12 CXCR4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12 CXCR4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10 DEPC Diethylpyrocarbonat	APC	Antigenpräsentierende Zelle	
ca. circa  CCL2 CC-Chemokin Ligand 2  CCL21 CC-Chemokin Ligand 21  CCL27 CC-Chemokin Ligand 27  CCR4 CC-Chemokin Ligand 27  CCR4 CC-Chemokin Ligand 27  CCR7 CC-Chemokin Ligand 27  CCR10 CIuster of differentiation  cDNA komplementäre Desoxyribonukleinsäure  CRISPR/Cas9 Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats und CRISPR-associated Protein 9  CS Chondroitinsulfat  Csf3 Kolonie-stimulierender Faktor 3  Ct Cycle threshold  CT Computertomographie  CTLA-4 zytotoxisches T-Lymphozytenantigen 4  CXCL4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 4  CXCL8 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 8  CXCL9 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 9  CXCL10 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10  CXCL12 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12  CXCR4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12  CXCR4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10  DEPC Diethylpyrocarbonat	BRAF	Serine/Threonine-Protein Kinase B-Raf	
CCL21 CCL21 CC-Chemokin Ligand 21 CCL27 CC-Chemokin Ligand 27 CCR4 CC-Chemokin Ligand 27 CCR4 CC-Chemokin Ligand 27 CCR7 CCR7 CCR7 CC-Chemokin Ligand 27 CCR7 CCR8 CC-Chemokin Ligand 27 CCR9 CCR9 CC-Chemokin Ligand 27 CCR9 CCR9 CC-Chemokin Ligand 27 CCR9 CCR9 CCP-Chemokin Ligand 27 CCR9 CCP-Chemokin Ligand 27 CCR9 CCR9 CCR9 CCR9 CCR0-Motiv-Chemokin Ligand 38 CCCL9 CCC-Motiv-Chemokin Ligand 39 CCCCL12 CCCCR9 CCCC-Motiv-Chemokin Ligand 10 CCCCL12 CCCCR9 CCCC-Motiv-Chemokin Ligand 11 CCCCCR9 CCCCR9 CCCC-Motiv-Chemokin Ligand 11 CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	bspw.	beispielsweise	
CCL21 CCL27 CC-Chemokin Ligand 27 CCR4 CC-Chemokin Ligand 27 CCR4 CC-Chemokinrezeptor Typ 4 CCR7 CCR6 CC-Chemokinrezeptor Typ 7 CCR10 CC-Chemokinrezeptor Typ 10 CD Cluster of differentiation CDNA komplementäre Desoxyribonukleinsäure CRISPR/Cas9 Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats und CRISPR-associated Protein 9 CS Chondroitinsulfat Csf3 Kolonie-stimulierender Faktor 3 Ct Cycle threshold CT Computertomographie CTLA-4 Zytotoxisches T-Lymphozytenantigen 4 CXCL4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 4 CXCL8 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 8 CXCL9 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 9 CXCL10 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10 CXCL12 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12 CXCR4 DAPI Diethylpyrocarbonat	ca.	circa	
CCL27 CCR4 CC-Chemokin Ligand 27 CCR4 CC-Chemokinrezeptor Typ 4 CCR7 CC-Chemokinrezeptor Typ 7 CCR10 CC-Chemokinrezeptor Typ 10 CD Cluster of differentiation cDNA komplementäre Desoxyribonukleinsäure CRISPR/Cas9 Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats und CRISPR-associated Protein 9 CS Chondroitinsulfat Csf3 Kolonie-stimulierender Faktor 3 Ct Cycle threshold CT Computertomographie CTLA-4 Zytotoxisches T-Lymphozytenantigen 4 CXCL4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 4 CXCL8 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 9 CXCL9 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10 CXCL12 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12 CXCR4 DAPI Diethylpyrocarbonat	CCL2	CC-Chemokin Ligand 2	
CCR4 CC-Chemokinrezeptor Typ 4 CCR7 CC-Chemokinrezeptor Typ 7 CCR10 CC-Chemokinrezeptor Typ 10 CD Cluster of differentiation CDNA komplementäre Desoxyribonukleinsäure CRISPR/Cas9 Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats und CRISPR-associated Protein 9 CS Chondroitinsulfat Csf3 Kolonie-stimulierender Faktor 3 Ct Cycle threshold CT Computertomographie CTLA-4 Zytotoxisches T-Lymphozytenantigen 4 CXCL4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 4 CXCL8 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 8 CXCL9 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 9 CXCL10 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10 CXCL12 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12 CXCR4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12 CXCR4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12 CXCR4 DAPI DEPC Diethylpyrocarbonat	CCL21	CC-Chemokin Ligand 21	
CCR7 CC-Chemokinrezeptor Typ 7 CCR10 CC-Chemokinrezeptor Typ 10 CD Cluster of differentiation cDNA komplementäre Desoxyribonukleinsäure CRISPR/Cas9 Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats und CRISPR-associated Protein 9 CS Chondroitinsulfat Csf3 Kolonie-stimulierender Faktor 3 Ct Cycle threshold CT Computertomographie CTLA-4 Zytotoxisches T-Lymphozytenantigen 4 CXCL4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 4 CXCL8 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 8 CXCL9 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 9 CXCL10 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10 CXCL12 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12 CXCR4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12 CXCR4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10 DEPC Diethylpyrocarbonat	CCL27	CC-Chemokin Ligand 27	
CCR10  CD  Cluster of differentiation  cDNA  komplementäre Desoxyribonukleinsäure  CRISPR/Cas9  Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats und CRISPR-associated Protein 9  CS  Chondroitinsulfat  Csf3  Kolonie-stimulierender Faktor 3  Ct  Cycle threshold  CT  Computertomographie  CTLA-4  CXCL4  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 4  CXCL8  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 8  CXCL9  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 9  CXCL10  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10  CXCL12  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12  CXCR4  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12  CXCR4  DAPI  4',6-Diamidin-2-phenylindol  DEPC  Diethylpyrocarbonat	CCR4	CC-Chemokinrezeptor Typ 4	
CD Cluster of differentiation  cDNA komplementäre Desoxyribonukleinsäure  CRISPR/Cas9 Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats und CRISPR-associated Protein 9  CS Chondroitinsulfat  Csf3 Kolonie-stimulierender Faktor 3  Ct Cycle threshold  CT Computertomographie  CTLA-4 zytotoxisches T-Lymphozytenantigen 4  CXCL4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 4  CXCL8 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 8  CXCL9 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 9  CXCL10 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10  CXCL12 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12  CXCR4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12  CXCR4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10  DEPC Diethylpyrocarbonat	CCR7	CC-Chemokinrezeptor Typ 7	
CDNA komplementäre Desoxyribonukleinsäure  CRISPR/Cas9 Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats und CRISPR-associated Protein 9  CS Chondroitinsulfat  Csf3 Kolonie-stimulierender Faktor 3  Ct Cycle threshold  CT Computertomographie  CTLA-4 zytotoxisches T-Lymphozytenantigen 4  CXCL4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 4  CXCL8 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 8  CXCL9 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 9  CXCL10 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10  CXCL12 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12  CXCR4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12  CXCR4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10  DEPC Diethylpyrocarbonat	CCR10	CC-Chemokinrezeptor Typ 10	
CRISPR/Cas9 Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats und CRISPR-associated Protein 9 CS Chondroitinsulfat Csf3 Kolonie-stimulierender Faktor 3 Ct Cycle threshold CT Computertomographie CTLA-4 Zytotoxisches T-Lymphozytenantigen 4 CXCL4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 4 CXCL8 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 8 CXCL9 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 9 CXCL10 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10 CXCL12 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12 CXCR4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12 CXCR4 DAPI 4',6-Diamidin-2-phenylindol DEPC Diethylpyrocarbonat	CD	Cluster of differentiation	
Repeats und CRISPR-associated Protein 9  CS Chondroitinsulfat  Csf3 Kolonie-stimulierender Faktor 3  Ct Cycle threshold  CT Computertomographie  CTLA-4 zytotoxisches T-Lymphozytenantigen 4  CXCL4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 4  CXCL8 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 8  CXCL9 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 9  CXCL10 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10  CXCL12 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12  CXCR4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12  CXCR4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10  DAPI 4',6-Diamidin-2-phenylindol  DEPC Diethylpyrocarbonat	cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure	
CS Chondroitinsulfat  Csf3 Kolonie-stimulierender Faktor 3  Ct Cycle threshold  CT Computertomographie  CTLA-4 zytotoxisches T-Lymphozytenantigen 4  CXCL4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 4  CXCL8 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 8  CXCL9 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 9  CXCL10 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10  CXCL12 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12  CXCR4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12  CXCR4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10  DEPC Diethylpyrocarbonat			
Csf3  Ct  Cycle threshold  CT  Computertomographie  CTLA-4  CXCL4  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 4  CXCL8  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 8  CXCL9  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 9  CXCL10  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10  CXCL12  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12  CXCR4  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12  CXCR4  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10	CRISPR/Cas9	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic	
Ct Cycle threshold  CT Computertomographie  CTLA-4 zytotoxisches T-Lymphozytenantigen 4  CXCL4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 4  CXCL8 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 8  CXCL9 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 9  CXCL10 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10  CXCL12 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12  CXCR4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12  CXCR4 CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4  DAPI 4',6-Diamidin-2-phenylindol  DEPC Diethylpyrocarbonat	CRISPR/Cas9		
CT Computertomographie  CTLA-4 zytotoxisches T-Lymphozytenantigen 4  CXCL4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 4  CXCL8 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 8  CXCL9 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 9  CXCL10 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10  CXCL12 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12  CXCR4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12  CXCR4 CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4  DAPI 4',6-Diamidin-2-phenylindol  DEPC Diethylpyrocarbonat		Repeats und CRISPR-associated Protein 9	
CTLA-4  CXCL4  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 4  CXCL8  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 8  CXCL9  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 9  CXCL10  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10  CXCL12  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12  CXCR4  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12  CXCR4  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12  CXCR4  DAPI  4',6-Diamidin-2-phenylindol  DEPC  Diethylpyrocarbonat	CS	Repeats und CRISPR-associated Protein 9 Chondroitinsulfat	
CXCL4  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 4  CXCL8  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 8  CXCL9  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 9  CXCL10  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10  CXCL12  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12  CXCR4  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12  CXCR4  CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4  DAPI  4',6-Diamidin-2-phenylindol  DEPC  Diethylpyrocarbonat	CS Csf3	Repeats und CRISPR-associated Protein 9  Chondroitinsulfat  Kolonie-stimulierender Faktor 3	
CXCL8  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 8  CXCL9  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 9  CXCL10  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10  CXCL12  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12  CXCR4  CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4  DAPI  DAPI  4',6-Diamidin-2-phenylindol  DEPC  Diethylpyrocarbonat	CS Csf3	Repeats und CRISPR-associated Protein 9  Chondroitinsulfat  Kolonie-stimulierender Faktor 3  Cycle threshold	
CXCL9 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 9  CXCL10 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10  CXCL12 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12  CXCR4 CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4  DAPI 4',6-Diamidin-2-phenylindol  DEPC Diethylpyrocarbonat	CS Csf3 Ct CT	Repeats und CRISPR-associated Protein 9  Chondroitinsulfat  Kolonie-stimulierender Faktor 3  Cycle threshold  Computertomographie	
CXCL10  CXCL12  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10  CXCL12  CXCR4  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12  CXCR4  CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4  DAPI  4',6-Diamidin-2-phenylindol  DEPC  Diethylpyrocarbonat	CS Csf3 Ct CT CTLA-4	Repeats und CRISPR-associated Protein 9  Chondroitinsulfat  Kolonie-stimulierender Faktor 3  Cycle threshold  Computertomographie  zytotoxisches T-Lymphozytenantigen 4	
CXCL12 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12 CXCR4 CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 DAPI 4',6-Diamidin-2-phenylindol DEPC Diethylpyrocarbonat	CS Csf3 Ct CT CTLA-4 CXCL4	Repeats und CRISPR-associated Protein 9  Chondroitinsulfat  Kolonie-stimulierender Faktor 3  Cycle threshold  Computertomographie  zytotoxisches T-Lymphozytenantigen 4  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 4	
CXCR4 CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4  DAPI 4',6-Diamidin-2-phenylindol  DEPC Diethylpyrocarbonat	CS Csf3 Ct CT CTLA-4 CXCL4 CXCL8	Repeats und CRISPR-associated Protein 9  Chondroitinsulfat  Kolonie-stimulierender Faktor 3  Cycle threshold  Computertomographie  zytotoxisches T-Lymphozytenantigen 4  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 4  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 8	
DAPI 4',6-Diamidin-2-phenylindol DEPC Diethylpyrocarbonat	CS Csf3 Ct CT CTLA-4 CXCL4 CXCL8 CXCL9	Repeats und CRISPR-associated Protein 9  Chondroitinsulfat  Kolonie-stimulierender Faktor 3  Cycle threshold  Computertomographie  zytotoxisches T-Lymphozytenantigen 4  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 4  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 8  CXC-Motiv-Chemokin Ligand 9	
DEPC Diethylpyrocarbonat	CS Csf3 Ct CT CT CTLA-4 CXCL4 CXCL8 CXCL9 CXCL10	Repeats und CRISPR-associated Protein 9 Chondroitinsulfat Kolonie-stimulierender Faktor 3 Cycle threshold Computertomographie zytotoxisches T-Lymphozytenantigen 4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 8 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 9 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10	
	CS Csf3 Ct CT CT CTLA-4 CXCL4 CXCL8 CXCL9 CXCL10 CXCL12	Repeats und CRISPR-associated Protein 9 Chondroitinsulfat Kolonie-stimulierender Faktor 3 Cycle threshold Computertomographie zytotoxisches T-Lymphozytenantigen 4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 8 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 9 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12	
DNA Desoxyribonukleinsäure	CS Csf3 Ct CT CT CTLA-4 CXCL4 CXCL8 CXCL9 CXCL10 CXCL12 CXCR4	Repeats und CRISPR-associated Protein 9 Chondroitinsulfat Kolonie-stimulierender Faktor 3 Cycle threshold Computertomographie zytotoxisches T-Lymphozytenantigen 4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 8 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 9 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12	
	CS Csf3 Ct CT CT CTLA-4 CXCL4 CXCL8 CXCL9 CXCL10 CXCL12 CXCR4 DAPI	Repeats und CRISPR-associated Protein 9 Chondroitinsulfat Kolonie-stimulierender Faktor 3 Cycle threshold Computertomographie zytotoxisches T-Lymphozytenantigen 4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 4 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 8 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 9 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 10 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12 CXC-Motiv-Chemokin Ligand 12 CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 4',6-Diamidin-2-phenylindol	

DNAase	Desoxyribonuklease	
dNTP	desoxyNukleosidTriPhosphat	
dUTP	2´-Deoxyuridine, 5´-Triphosphate	
Dr.	Doktor	
DS	Dermatansulfat	
ECM	Extrazelluläre Matrix	
EXT-1	Exostosin 1	
EXT-2	Exostosin 2	
EXT-1 KO	Exostosin 1 Knock-Out	
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	
GAG	Glycosaminoglykan	
GalNAc	N-acetylgalactosamin	
GlcAβ1,3Galβ1,3Galβ1, 4Xyl	Glucuronosyl-Galactosyl-Galactosyl- Xylosyl-	
-Tetrasaccharid	Tetrasaccharid	
GlcN	Glucosamin	
GlcNAc	N-acetylglucosamin	
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor	
HE	Hämatoxylin-Eosin	
HI-Virus	Humanes Immundefizienz-Virus	
HMB45	Human Melanoma Black 45	
HS	Heparansulfat	
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykane	
ICB	Immune-Checkpoint-blockade	
IdoA	Idoronsäure	
IF	Immunfluoreszenzfärbung	
IgG	Immunglobulin-G	
i.v.	intravenös	
Kat.Nr	Katalog Nummer	
KCI	Kaliumchlorid	
KH2PO4	Kaliumdihydrogenphosphat	
КО	Knock out	
LDH	Laktat-Dehydrogenase	
Ly6C	Lymphocyte antigen 6 complex, locus C1	

Ly6G	Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D
M	Vorliegen von Fernmetastasen
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
Melan-A/MART-1	Melanoma Antigen Recognized by T-cells 1
MHC-I	Haupthistokompatibilitätskomplexe der Klasse I
MMP 8/9	Matrix Metallopeptidase 8/9
mRNA	messenger RNA
N	regionäre Lymphknoten
n	Anzahl
NaCL	Natriumchlorid
Na2HPO4	Dinatriumhydrogenphosphat
NETs	Neutrophile Extrazelluläre Fallen
NK	Natürliche Killerzellen
Nr.	Nummer
NRAS	Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
ОР	Operation
р	Signifikanzniveau
PAP	Phosphatidic Acid Phosphatase
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PBS-T	Phosphat gepufferte Salzlösung-Tween
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PD-1	Programmed Death 1
PD-L 1	Programmed Death-Ligand 1
PFA	Paraformaldehyd
PG	Proteoglykane
рН	Potential des Wasserstoffs
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog deleted on
	chromosome 10
qPCR	quantitative Polymerase Ketten Reaktion
$R^2$	Korrelationskoeffizient
RNA	Ribonukleinsäuren
RNAse	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies

ROX	6-carboxy-X-rhodamine	
RT	Raumtemperatur	
SDD	sequenzielle digitale Dermatoskopie	
SDF-1alpha	Stromal-cell-derived factor 1-alpha	
sgRNA	single-guide RNA	
SLNB	Sentinel-Lymphknoten-Biopsie	
SPECT/CT	Single-Photon-Emissionscomputertomographie/	
	Computertomographie	
Supp.	Supplement	
S100B	S100 calcium-binding protein B	
T	Primärtumor	
Tab	Tabelle	
TBE	TRIS-Borsäure-EDTA-Puffer	
<sup>99m</sup> Tc	Technetium-99m	
U	Unit	
UDP	Uridindiphosphat	
UNG	uracil-DNA glycosylase	
UV	Ultraviolett	
vgl.	vergleiche	
vWF	von Willebrand Faktor	
WHO	World Health Organization	
WT	Wildtyp	
ZNS	Zentrales Nervensystem	
z.B.	zum Beispiel	
3D	dreidimensional	
6Ckine	6CkineSmall-inducible cytokine A21	

# **Gender-Disclaimer**

Zur besseren Lesbarkeit wird in dieser Dissertation das generische Maskulinum verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Personenbezeichnungen beziehen sich – sofern nicht anders kenntlich gemacht – auf weibliche, männliche und diverse Personen.

## 1. Einleitung

## 1.1. Das maligne Melanom

# 1.1.1. Definition und Epidemiologie

Das Melanom ist ein hochgradig maligner Tumor der Pigmentzellen, auch Melanozyten genannt, der sich in der Haut manifestiert. Melanozyten befinden sich in der Basalschicht (Stratum basale) der Oberhaut (Epidermis). Ihre Aufgabe ist die Produktion von Melanin, einem Farbstoff, der Hautzellen vor Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Schäden durch ultraviolette (UV)-Einstrahlungen schützen soll (Nagai et al. 2006). (siehe **Abb. 1**)

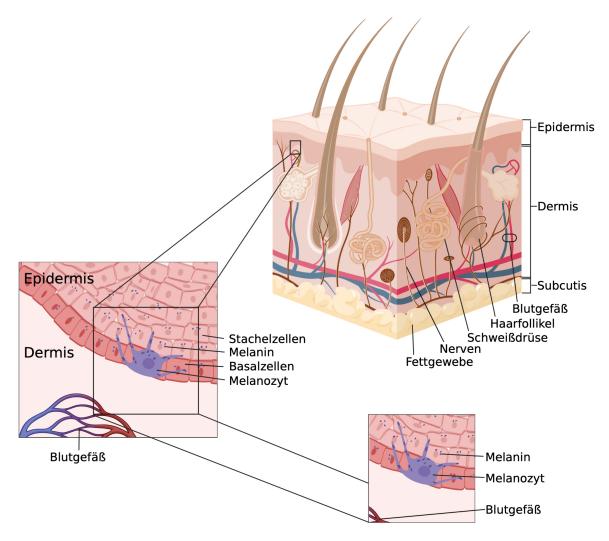


Abbildung 1 Melanozyten in der menschlichen Haut

Die äußere menschliche Haut wird in drei Schichten unterteilt, die Epidermis (Oberhaut), die Dermis (Lederhaut) und die Subcutis (Unterhaut). Das Stratum basale ist die unterste Schicht der Epidermis, die überwiegend über Hemidesmosome mit der unter ihr liegenden Basallamina verbunden ist. Die

Melanozyten befinden sich neben adulten Stammzellen und in unmittelbarer Nähe zu den Blutgefäßen im Stratum basale. Abbildung erstellt mithilfe von BioRender, mit Genehmigung.

Beim malignen Melanom handelt es sich um einen bösartigen Tumor, der vorwiegend im mittleren Lebensalter (50.-60. Lebensjahr) auftritt. Das maligne Melanom zeichnet sich nicht nur durch seine lokale Aggressivität, sondern auch durch seine frühzeitige sowohl lymphogene als auch hämatogene Metastasierung aus (Plewig et al. 2018).

In fortgeschrittenen Tumorstadien ist das Melanom somit die häufigste tödlich verlaufende Hauterkrankung und für mehr als 90% der Todesfälle aller Hautmalignome verantwortlich (Pflugfelder et al. 2013).

Das Melanom befällt nach einer Studie von 2021 vor allem die hellhäutige, kaukasische Bevölkerung und gehört mit jährlich etwa 320 000 Fällen weltweit und seit Jahren steigender Inzidenz zu den am häufigsten diagnostizierten Malignomen (Fritsch and Schwarz 2018, Garbe and Blum 2001, Sung et al. 2021).

2008 wurde in Deutschland sogar eine sprunghafte Zunahme der Erkrankungszahlen verzeichnet und das maligne Melanom lag bei Männern auf Platz 8 und bei Frauen auf Platz 5 der häufigsten soliden Tumore (Kaatsch et al. 2012).

Die altersstandardisierten Inzidenzraten in Deutschland sind in dem Zeitraum von 1970 bis 2012 von 3 Fällen auf 19 Fälle pro 100 000 Einwohner und Jahr, und damit auf mehr als das Sechsfache, gestiegen. In Zukunft wird bei Männern eine Verdopplung der Inzidenzraten in den nächsten 20 Jahren und bei Frauen in den nächsten 30 Jahren erwartet (Kaatsch et al. 2015).

Trotz steigender Erkrankungsrate fällt der Anstieg der Mortalitätsrate deutlich geringer aus und es kann von einer relativen Stabilisierung der Mortalitätsrate ausgegangen werden. Dies ist vor allem auf eine bessere Aufklärung der Bevölkerung, neue Therapieansätze und hauptsächlich auf das 2008 eingeführte gesetzliche Hautkrebs-Screening zurückzuführen, das Frühdiagnosen von prognostisch günstigeren Tumoren, die vollständig chirurgisch reseziert werden können, ermöglicht (Breitbart et al. 2012, Elwood 1994).

# 1.1.2. Ätiologie und Risikofaktoren

Melanozyten haben ihren Ursprung in den Zellen der Neuralleiste, die sich während der embryologischen Entwicklung z.B. in der Haut, den Augen und weiteren Bereichen des Körpers ablagern. Es kann zu benignen Proliferationen dieser Zellen kommen, die aber durch das Auftreten von Nävi sichtbar werden (Dimitriou et al. 2018).

Es ist bekannt, dass maligne Entartungen häufig durch Mutationen von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen entstehen. Dazu gehören sowohl Serine/Threonine-Protein Kinase B-Raf (BRAF)- und Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog (NRAS)-Genmutationen, die Wachstum induzieren können, als auch Phosphatase and TENsin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN)- und p53-Protein-Mutationen, die Tumorsuppressorgene betreffen (Nalcaci et al. 2016). Die konkrete Ätiologie ist jedoch derzeit trotz umfangreicher Studien noch nicht vollständig geklärt (Leitlinienprogramm-Onkologie 2021).

Sowohl endogene als auch exogene Risikofaktoren spielen für die Entstehung des malignen Melanoms eine Rolle. Der bedeutendste exogene Risikofaktor für die Entstehung des Melanoms ist die allgemeine UV-Belastung z.B. durch Sonne oder Solarium. Besonders gefährdet, durch ihre erhöhte Sonnenempfindlichkeit, sind dabei Menschen hellen Hauttyps (Typ I und II), mit rotblonder Haarfarbe und blauen Augen. Insgesamt eher selten treten Melanome bei Menschen mit dunkler Haut auf (Hauttyp III und IV), wobei sie dann meist palmoplantar oder an den Schleimhäuten zu finden sind, da die schützende Pigmentierung hier gering ist (Gilchrest et al. 1999, Leitlinienprogramm-Onkologie 2020).

Durch Änderungen der Freizeit- und Urlaubsgewohnheiten in den letzten Jahren konnte die höchste Zunahme der Melanominzidenz in den Körperregionen verzeichnet werden, die vermehrt der Sonne exponiert wurden (Leitlinienprogramm-Onkologie 2020).

Die Sonnenexposition und Melanomentstehung verlaufen nicht direkt proportional zueinander. Vor allem eine kurzzeitige, intensive UV-Belastung, wie z.B. im Sonnenurlaub, auf einer Haut, die nicht an die Sonne gewöhnt ist beispielsweise (bspw.) im Kindesalter, führt zur Entstehung des Melanoms (Armstrong and Cust 2017). Im Gegensatz dazu kann für eine regelmäßige dosierte Sonnenexposition soweit kein negativer Effekt in der Entstehung des Melanoms erkannt werden, da

so die Haut stärker pigmentiert und sogar weniger anfällig für UV-Strahlen wird (Chang et al. 2009, Elwood and Jopson 1997, Gandini et al. 2016, Nelemans et al. 1993).

Ein weiterer Risikofaktor ist die familiäre Prädisposition, welche bei etwa 10% aller Melanompatienten besteht. Im Fall von Patienten mit familiärer Vorbelastung ist das Auftreten von Melanomen über mehrere Generationen charakteristisch und die Patienten sind meist bereits in jungem Alter mit multiplen Melanomen belastet (Fritsch and Schwarz 2018).

Bei der Diagnose eines malignen Melanoms bei einem Verwandten 1. Grades steigt somit das Risiko der Familienangehörigen von Melanompatienten, selbst ein Melanom zu entwickeln (Leitlinienprogramm-Onkologie 2021).

Frühere Studien haben gezeigt, dass auch ein gehäuftes Auftreten benigner Nävuszellnävi einen wichtigen Risikofaktor darstellt. Die Beschaffenheit der Nävi spielt dabei ebenfalls eine wichtige Rolle, da sich bei atypischen Nävi, z.B. mit erhöhtem Durchmesser >7mm, ungleichmäßiger Farbe oder unscharfer Abgrenzung, das Melanomrisiko noch einmal deutlich erhöht (≥100 gewöhnliche melanozytäre Nävi oder ≥5 atypische melanozytäre Nävi und ≥50 gewöhnliche melanozytäre Nävi) (Leitlinienprogramm-Onkologie 2021, Swerdlow et al. 1986). Ein weiterer wichtiger Risikofaktor, der die Entstehung maligner Melanome begünstigt, ist eine Immundefizienz. Mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HI-Virus) infizierte oder transplantierte Patienten entwickeln bspw. häufiger maligne Melanome als immunkompetente Personen (Moll 2016, Tumorzentrum-München 2011).

### 1.1.3. Klinik und Diagnostik

#### Klinische Untersuchung

In vorangehenden Studien wurde bereits ein positiver Krankheitsverlauf für Melanome mit geringer Tumordicke bestätigt (Balch et al. 1978, Barger et al. 1982, Breslow 1970, Wick 1980). Eine frühzeitige Erkennung der Erkrankung stellt somit einen entscheidenden Faktor für die Prognose und den Verlauf des malignen Melanoms dar.

Zur initial klinischen Diagnostik des malignen Melanoms gehört daher neben einer ausführlichen Anamnese, in der mögliche Risikofaktoren und die Chronologie der Eigenanamnese erfasst werden, die sogenannte ABCDE-Regel (**Tab. 1**). Anhand der ABCDE-Regel ist auch für Laien eine makroskopische Selbstbeurteilung auffälliger Pigmentflecken möglich. Dabei sollen die entsprechenden Läsionen im Gesamtkontext aller vorliegenden Pigmentmale beurteilt werden. Sobald zwei Kriterien der ABCDE-Regel zutreffen, wird zu einer dermatoskopischen Kontrolle und häufig zu einer vorsorglichen Entfernung des Pigmentflecks geraten (Abbasi et al. 2004, Friedman et al. 1985, Yagerman and Marghoob 2013).

#### Tabelle 1 ABCDE-Regel

<b>A</b> symmetrie	Ungleichmäßige Form	
Begrenzung	Unscharfe Begrenzung	
Coloration	Unterschiedliche Pigmentierung	
Durchmesser	Durchmesser >5mm	
Erhabenheit	Erhabenheit über das normale Niveau der Haut	
	hinaus	

Die ABCDE-Regel dient der Früherkennung einer malignen Transformation, sowohl durch dermatologisches Fachpersonal als auch durch die Patienten selbst.

#### **Dermatoskopie**

Bei diesem Verfahren können verdächtige Läsionen durch eine Lupenvergrößerung und unter Verwendung von z.B. polarisiertem Licht detaillierter begutachtet und mit

einer signifikant höheren Genauigkeit diagnostiziert werden als mit dem bloßen Auge (Dinnes et al. 2018, Kittler et al. 2002). Die Dermatoskopie wird vor allem zu einer differentialdiagnostischen Einordnung von pigmentierten Hautveränderungen eingesetzt und berücksichtigt lokalisationstypische Besonderheiten und dermatoskopische Kriterien bezüglich der beobachteten Farbtöne und Strukturelemente. Die sequenzielle digitale Dermatoskopie (SDD) ist eine weiterentwickelte Form, die auf dem Prinzip einer einfachen Dermatoskopie beruht, darüber hinaus aber eine Speicherung und digitale Auswertung der Bilder und somit eine genauere Verlaufsanalyse ermöglicht. Die SDD wird leitliniengemäß zur verbesserten Früherkennung maligner Melanome empfohlen, bei denen keine dermatoskopischen Malignitätskriterien spezifischen erkennbar sind (Leitlinienprogramm-Onkologie 2020).

Sollte es zu einer Größenprogredienz, Farbveränderung, Juckreiz, spontaner Blutung oder Nässen von pigmentierten Läsionen kommen, muss in jedem Fall ein Malignitätsverdacht gestellt werden (Schultz and Mastrangelo 1989).

## Sonographie

Präoperativ kann unter Verwendung der hochfrequenten 20MHz-Sonographie die Tumorausdehnung in die Tiefe und auch in die Breite gemessen werden (Tumorzentrum-München 2011). Sowohl die Dermis als auch die Subcutis sind mit einer Eindringtiefe von ca. 8mm sehr gut darzustellen (Leitlinienprogramm-Onkologie 2020, Tumorzentrum-München 2011). Die mittelfrequente 7,5-15MHz-Sonographie wird zur frühzeitigen Detektion von In-transit-Metastasen und Lymphknoten- und subcutanen Metastasen eingesetzt, sowohl im präoperativen Staging des Lymphknotenstatus als auch in der Nachsorge des malignen Melanoms (Tumorzentrum-München 2011). Durch die Sonographie kann eine Sensitivität und Spezifität von ca. 80% erreicht werden, wobei dieses jedoch stark von dem vorliegendem Stadium abhängig ist und vor allem die Erfassung kleiner Lymphknotenmetastasen eine geringere Sensitivität hat (Leitlinienprogramm-Onkologie 2020).

#### Sentinel-Lymphknoten-Biopsie

Gemäß der aktuellen Leitlinien dient die Sentinel-Lymphknoten-Biopsie (SLNB) in der heutigen Therapie des malignen Melanoms primär dem Staging des Patienten und stellt damit eine diagnostische Maßnahme dar (Leitlinienprogramm-Onkologie 2020). Die SLNB wird ab einer Tumordicke von 1mm empfohlen, falls es keine Hinweise auf lokoregionale Metastasen oder Fernmetastasen gibt, wobei die Tumordicke mit der Wahrscheinlichkeit einen positiven Wächterlymphknoten zu detektieren steigt (Leitlinienprogramm-Onkologie 2020). Falls das Vorliegen eines positiven Wächterlymphknotens durch zusätzliche Risikofaktoren begünstigt wird, soll die SLNB auch bereits bei einer geringeren Tumordicke durchgeführt werden (Leitlinienprogramm-Onkologie 2020). Zu diesen zusätzlichen Risikofaktoren zählen eine Ulzeration des Primärtumors, eine erhöhte Mitoserate im Primärtumor und das Vorhandensein von Tumorzellen in peritumoralen Lymphgefäßbahnen (Leitlinienprogramm-Onkologie 2020). Auch bei einem Erkrankungsalter unter dem 40. Lebensjahr ist eine SLNB indiziert, da vor allem jüngere Patienten häufiger einen positiven Wächterlymphknoten auch bei geringen Tumordicken (<1mm) aufweisen (Leitlinienprogramm-Onkologie 2020). Bei dem malignen Melanom wird der Sentinel- oder auch Wächterlymphknoten als der erste Lymphknoten im Lymphabstromgebiet des betroffenen Hautareals mit zuführender Lymphbahn (Plewig et al. 2018). Indem die Lymphabflusswege definiert Lymphoszintigraphie dargestellt werden, ist es möglich den betreffenden Sentinel-Lymphknoten zu lokalisieren. Dafür wird eine radioaktive Tracersubstanz, meist technetiummarkiertes Nanokolloid 99mTc, in die Umgebung des zuvor exzidierten Melanoms oder nahe der Exzisionsnarbe streng intracutan injiziert. Danach können die abführenden Lymphbahnen mittels Gammakamera dargestellt und der Sentinel-Lymphknoten identifiziert, auf der Haut des Patienten markiert und anschließend exstirpiert werden. Durch die Lymphabstromszintigraphie ist es möglich, über 98% der Sentinel-Lymphknoten zu detektieren (Leitlinienprogramm-Onkologie 2020).

Im Kopf-Hals-Bereich bietet es sich, aufgrund der erschwerten Lokalisierbarkeit an, die Detektion mit einer statischen Single-Photon-Emissionscomputertomographie/Computertomographie (SPECT/CT) durchzuführen. Durch die Kombination von hochauflösenden CT-Bildern und der funktionellen Bildgebung einer Gammakamera kann so die anatomische Lage der zu exstirpierenden Lymphknoten

dargestellt werden (Leitlinienprogramm-Onkologie 2020). Der detektierte Sentinel-Lymphknoten wird nach seiner Entnahme histopathologisch untersucht. Dafür werden die Lymphknoten zunächst nach bestimmten Schemata geschnitten, mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt und zusätzlich mittels immunhistochemischer Färbungen analysiert (Leitlinienprogramm-Onkologie 2020). Die gängigen Marker sind dabei HMB45, S100B und Melan-A/MART-1 (Leitlinienprogramm-Onkologie 2020). Bei dieser histopathologischen Untersuchung ist die Unterscheidung von Melanomzellen von melanozytären Nävuszellen wichtig (Leitlinienprogramm-Onkologie 2020, Tumorzentrum-München 2011).

### 1.1.4. Klassifikation des malignen Melanoms

Nach der WHO lässt sich das Melanom klinisch und histologisch in vier verschiedene Haupttypen, das Lentigo-maligna-Melanom, das Superfiziell-spreitende-Melanom, das Noduläre Melanom und das Akrolentiginöse Melanom unterteilen (LeBoit et al. 2006). Daneben finden sich seltene Subtypen, wie das wenig bzw. nicht pigmentierte Amelanotische Melanom, das eine Sonderrolle einnimmt, da es aufgrund seiner meist späten Diagnose einen schlechteren Verlauf hat (Thomas et al. 2014).

Neben dem Typ des Melanoms ist die Tumorklassifikation in das TNM-System nach der American Joint Committee on Cancer (AJCC) entscheidend für die Einordnung der Tumore hinsichtlich der Prognose und des diagnostischen sowie therapeutischen Vorgehens. Die TNM-Klassifikation für das maligne Melanom umfasst den Primärtumor (T), regionäre Lymphknoten (N) sowie das Vorliegen von Fernmetastasen (M). Das Hauptaugenmerk der T-Klassifikation wird dabei auf die Tumordicke nach Breslow und die Tumorulzeration gelegt (Balch et al. 2009). Seit Beginn des Jahres 2018 ist die AJCC-Klassifikation 2016 verbindlich umzusetzen, die auf der Version von 2009 beruht (siehe Abb. 2 und Supplement (Supp.) 1-4).

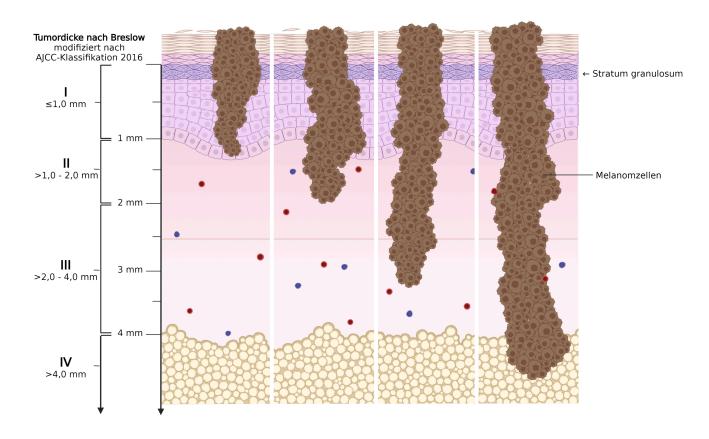


Abbildung 2 Tumordicke nach Breslow, angepasst an die Klassifikation der AJCC 2016

Grundlage für die histopathologische Beurteilung ist eine vollständige Exzision des Tumors, wobei die vertikale Tumordicke nach Breslow als wichtiger Parameter in die Klassifikation und Prognosebeurteilung des malignen Melanoms eingeht (Balch et al. 2009). So wird die Tumordicke am histologischen Präparat mit Hilfe eines Netzokulars, zwischen dem Stratum granulosum der Epidermis und der am tiefsten in das Gewebe infiltrierenden Melanomzelle gemessen und in Millimetern angegeben (Balch et al. 2009). Abbildung erstellt mithilfe von BioRender, mit Genehmigung.

## 1.1.5. Therapie des malignen Melanoms

Da das maligne Melanom ein sehr aggressiver Tumor ist, bei dem die bisher eingesetzten Therapien noch wenig erfolgreich sind, wurde in den letzten Jahren intensiv an der Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten geforscht. Ein großer Fortschritt konnte durch die 2011 in das Therapieschema eingeführten Immuncheckpoint-Inhibitoren (ICB) und durch sogenannte "targeted therapies" erzielt werden. Diese Therapien schlagen jedoch nicht bei allen Patienten an und es bilden sich weiterhin Tumorresistenzen. Daher ist noch eine Weiterentwicklung dieser erfolgsversprechenden Therapiemöglichkeiten erforderlich.

Sollte nach eingehender Diagnose der Verdacht auf ein malignes Melanom bestehen, wird die primäre Exzision mit einem ausreichenden Sicherheitsabstand und die anschließende histologische Aufbereitung empfohlen (Tran et al. 2008). Dabei ist die primäre radikale Exzision mit ausreichendem Sicherheitsabstand der wichtigste Bestandteil für einen kurativen Therapieansatz (Pflugfelder et al. 2013). In vorangehenden Studien wurde die Größe des nötigen Sicherheitsabstandes immer wieder kontrovers diskutiert. Laut der aktuellen Leitlinien wird ein Sicherheitsabstand von 1cm bei pT1 und pT2 Tumoren und ein Abstand von 2cm bei pT3 und pT4 Tumoren empfohlen. Im Einzelfall sollte die endgültige Entscheidung über den konkreten Sicherheitsabstand allerdings die Lokalisation des Primärtumors und die potenzielle Tumorausbreitung berücksichtigen und schließlich im Einverständnis zwischen Patient und Operateur erfolgen. (Leitlinienprogramm-Onkologie 2020). Ab einer Tumordicke von 1mm und ohne Hinweis auf lokoregionale Metastasen oder Fernmetastasen soll im Rahmen des Stagings und zu einer besseren Vorhersage des Krankheitsverlaufs eine SLNB erfolgen. Eine therapeutische Lymphknoten-Dissektion soll dagegen durchgeführt werden, falls es sich um eine zytologisch oder histologisch belegte lymphogene Metastasierung ohne Fernmetastasierung handelt (Leitlinienprogramm-Onkologie 2020).

Bei Vorliegen von fortgeschrittenen Tumorstadien, nicht-operablen lokoregionären Lymphknoten sowie nicht-operablen Fernmetastasen muss, zusätzlich zur operativen Tumorentfernung, auf weiterführende Therapieoptionen zurückgegriffen werden. Es haben sich mehrere Therapiemöglichkeiten etabliert, die grundsätzlich zur Verfügung stehen.

Eine mögliche adjuvante Therapie ist die Radiotherapie mit 50-60Gy des entsprechenden Areals, die laut der aktuellen Leitlinien nach Lymphadenektomie empfohlen wird, wenn mehr als drei Lymphknoten befallen waren, ein Kapseldurchbruch diagnostiziert wurde, eine Lymphknotenmetastase mit einem Durchmesser von mehr als 3cm aufgefunden wurde oder auch im Falle eines lymphogenen Rezidivs. Es konnte derzeit jedoch noch kein positiver Einfluss einer postoperativen adjuvanten Radiotherapie des Lymphabflussgebietes auf die Überlebenszeit belegt werden (Leitlinienprogramm-Onkologie 2020, Mendenhall et al. 2017). Einen weiteren Therapieansatz stellt die medikamentöse Immuntherapie

dar. Dabei wurde in diversen Studien über viele Jahre hin die Therapie mit Interferon alpha untersucht im Hinblick auf chemische Zusammensetzung, Dosierung, Applikationsform und Therapiedauer und es konnten signifikante Verbesserungen im Hinblick auf ein rezidivfreies Überleben der Patienten festgestellt werden. Dabei gehören zu den wichtigsten Wirkmechanismen der Interferone die Induktion der Apoptose und Antiangiogenese, die Verstärkung der phagozytären Aktivität, die Aktivierung der natürlichen Killerzellen (NK) und die Stimulation von zytotoxischen T-Lymphozyten (Tumorzentrum-München 2011). Der positive Effekt auf das Gesamtüberleben bleibt jedoch weiterhin umstritten und konnte teilweise nur unter Hochdosistherapien erreicht werden. Leitliniengemäß wird aktuell ab einem Stadium IIB eine adjuvante Interferontherapie angeboten, die jedoch häufig mit Nebenwirkungen einhergeht (Fallahian schwerwiegenden et Leitlinienprogramm-Onkologie 2020, Mocellin et al. 2010). Ein Meilenstein in der Therapie des malignen Melanoms konnte durch die Etablierung von humanen monoklonalen Antikörpern (AK) erreicht werden. Diese fungieren als ICB, indem sie das zytotoxische T-Lymphozytenantigen 4 (CTLA-4) auf den T-Zellen blockieren, das zuvor aktivierte T-Zellen negativ reguliert. Mittels dieser Blockade von CTLA-4 kann die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen, Autoimmunität und die Antitumor-Immunität modelliert und verstärkt werden. Dabei wird der Tumor zum Ziel des Immunsystems und seine Immuntoleranz aufgehoben. Den Anfang als zugelassenes Medikament dieser Art machte Ipilimumab im Jahr 2011 (Tumorzentrum-München 2011). Durch die Kombination dieser Immuntherapeutika mit monoklonalen AK, die an den Rezeptor Programmed Death 1 (PD-1) binden, wurde die Therapie weiterentwickelt und optimiert. PD-1 ist ein Molekül, das ebenfalls an der Regulierung der T-Zell-Aktivität beteiligt ist, das bei Tumorpatienten allerdings durch den Liganden PD-L1 inhibiert wird. Die Blockade von PD-1 bzw. PD-L1, durch bspw. Nivolumab und Pembrolizumab, kann die Antitumor-Aktivität der T-Zellen enthemmen, so dass das Immunsystem den Tumor wiedererkennen und diesen abwehren kann. Diverse Studien berichten über immense Erfolge dieser Behandlungsoptionen (Agarwala 2010, Hamid et al. 2013, Luke et al. 2013, Samuel et al. 2019). Die vorangehenden Studien weisen darauf hin, dass Patienten sogar trotz Metastasierung geheilt werden könnten, wobei derzeit allerdings noch keine ausreichende Nachbeobachtungszeit existiert, in der diese Vermutung bestätigt werden kann (Ahmed and Kelly 2016). Falls die Aktivität spezifischer Kinasen

aufgrund einer Mutation im Tumorgenom erhöht ist, kann die Inhibition einzelner oder mehrerer Signalmoleküle ("targeted therapies") die Proliferation und das Überleben der Tumorzellen eindämmen. Sollte bspw. eine BRAF-Mutation des Codons V600 vorliegen, was bei ungefähr 50% aller metastasierten Melanome der Fall ist, besteht die Möglichkeit BRAF-Signaltransduktionsinhibitoren, wie z.B. Vemurafenib oder Dabrafenib, einzusetzen und somit gezielt mutierte Proteine anzugreifen. Es konnte gezeigt werden, dass 60-70% der Patienten auf diese Therapie ansprechen und sowohl BRAF- als auch Mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)-Inhibitoren einen verlängernden Einfluss auf die progressionsfreie Zeit und das Gesamtüberleben haben (Ahmed and Kelly 2016, Luke et al. 2013, Mackiewicz and Mackiewicz 2018). Laut aktuellen S3-Leitlinien wird die Kombination von BRAF-Inhibitoren mit einem MEK-Inhibitor oder einem ICB (PD-1 Monotherapie PD1+CTLA-4 Antikörpertherapie) oder empfohlen (Leitlinienprogramm-Onkologie 2020). Falls überlegenere Therapieschemata (BRAF/MEK-Inhibitoren oder PD-1-AK) nicht in Frage kommen, besteht die Möglichkeit eine Monochemotherapie mit Dacarbazin durchzuführen. Mit einer Polychemotherapie als etablierte Systemtherapie lässt sich eine höhere Remissionsrate gegenüber der Monochemotherapie erzielen, es muss jedoch sowohl mit einer deutlich höheren Toxizität als auch Nebenwirkungsprofil gerechnet werden. Insgesamt gilt das Melanom jedoch als wenig Chemotherapie-sensibel und es zeigte sich keine signifikante Verlängerung des medianen Gesamtüberlebens progressionsfreien Überlebens der Patienten nach Chemotherapie (Leitlinienprogramm-Onkologie 2020). Aus diesem Grund ist die Indikation einer Chemotherapie sorgfältig abzuwägen und wird gewöhnlich bei therapierefraktären Fällen als palliative Therapie eingesetzt.

# 1.1.6. Nachsorge des malignen Melanoms

Einen besonderen Stellenwert für die frühzeitige Erkennung von Rezidiven und Zweitmelanomen sowie für die psychosoziale Unterstützung des Patienten hat die engmaschige Melanomnachsorge. Das diagnostizierte Stadium bestimmt dabei in welchem Intervall die Kontrolle erfolgen soll, da ein fortgeschrittenes Stadium gleichzeitig ein dementsprechend erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Rezidivs anzeigt (Pflugfelder et al. 2012, Rutkowski and Blank 2014) (**Tab. 2**).

Gerade in den ersten drei Jahren nach der Diagnosestellung hat eine adäquate Nachkontrolle einen sehr hohen Stellenwert, da hier die Gefahr einer Rezidiventwicklung mit 80% am höchsten ist. Da sich nach sechs bis zehn Jahren das Risiko einer Rezidiventwicklung allmählich verringert, können die Kontrollen ab diesem Zeitraum individuell reduziert werden (Bauer and Garbe 2003, Hohnheiser et al. 2011, Leitlinienprogramm-Onkologie 2020).

Tabelle 2 Risikoadaptierte Nachsorgeintervalle des malignen Melanoms (Leitlinienprogramm-Onkologie 2020)

Nachsorgeintervalle				
Stadium	Jahr 1-3	Jahr 4-5	Jahr 6-10	
IA	6-monatlich	Jährlich	Jährlich	
IB-IIB	3-monatlich	6-monatlich	6-bis 12-monatlich	
Ab IIC	3-monatlich	3-monatlich	6-monatlich	

Den aktuellen deutschen Leitlinien zufolge sollte die Nachsorge aller Patienten eine genaue körperliche Untersuchung beinhalten. Dies beinhaltet eine sorgfältige Anamnese, Inspektion und Palpitation des OP-Gebietes und die Untersuchung angrenzender Lymphregionen, die ab dem Stadium IB auch sonographisch erfolgen sollte. Bei asymptomatischen Patienten soll ab Stadium IB ebenfalls die Bestimmung des Tumormarkers S100B im Rahmen der regulären Nachsorge durchgeführt werden (Bafounta et al. 2004, Leitlinienprogramm-Onkologie 2020, Voit et al. 2001). Ab dem Stadium IIC sind außerdem regelmäßige Schnittbildgebungen zur frühzeitigen Detektion von Fernmetastasen sinnvoll. Im Hinblick auf die Vermeidung von Strahlenbelastung und die bessere Auflösung bei der Abbildung von Weichteilen ist dabei die Magnetresonanztomographie das Mittel der Wahl (Hausmann et al. 2011). Nach einem Zeitraum von zehn Jahren sollten regelmäßige Selbstuntersuchungen sowie eine jährliche Ganzkörperuntersuchung auf Zweitmelanome stattfinden (Leitlinienprogramm-Onkologie 2020).

# 1.1.7. Tumorprogression und Konsequenz für den Patienten

Ein entscheidender Faktor für Progression und Mortalität des malignen Melanoms ist die Metastasierung in Lymphknoten oder entfernten Organen (Pflugfelder et al.

2013). Die malignen Tumorzellen breiten sich dabei über das Blut- und Lymphsystem im gesamten Organismus aus (Pantel and Brakenhoff 2004). Dieser Vorgang wird in der "seed and soil"-Theorie beschrieben, die besagt, dass die Metastasierung ein zielgerichteter Prozess ist und sich nur in Organen und an Stellen mit optimalen Wachstumsbedingungen entwickeln kann (Ganley et al. 1989). Die bevorzugten Metastasierungsorgane des malignen Melanoms sind die umgebende Haut, das zentrale Nervensystem (ZNS), die Leber, die Lunge und das Skelettsystem (Abusaif et al. 2013).

Das maligne Melanom besitzt im Verhältnis zu seiner zunächst noch relativ geringen Tumormasse, schon früh eine schlechte Prognose aufgrund einer frühzeitigen lymphogenen und hämatogenen Metastasierung (Abusaif et al. 2013). Falls das maligne Melanom jedoch früh diagnostiziert wurde, im Ganzen chirurgisch reseziert werden konnte und weder Lymphknoten- oder Fernmetastasen aufweist, liegt die 10-Jahres-Überlebensrate bei ca. 90%. Im Falle des Nachweises von Melanomzellen in nahen Lymphknoten oder Mikrometastasen in naher Umgebung, sinkt die Überlebensrate nach zehn Jahren allerdings schon auf 68-25%. Bereits einer einmaligen Metastasierung in entfernte Lymphknoten Fernmetastasierung in andere Organe liegt die 10-Jahres-Überlebensrate dann bei unter 10% (Abusaif et al. 2013, Balch et al. 2001, Balch et al. 2001).

# 1.1.8. Tumor und das Immunsystem

Das maligne Melanom gehört zu den besonders immunogenen Tumoren, deren Entstehung und Entwicklung vom Immunsystem beeinflusst wird. Die Rolle des Immunsystems bei der Tumorentstehung und Metastasierung wird kontrovers diskutiert. Weil bei immunsupprimierten Patienten sowohl Spontanremissionen als auch aggressive Verläufe beobachtet werden können wird deutlich, dass das Immunsystem eine komplexe Rolle einnimmt (de Visser et al. 2006, Eigentler et al. 2008). Das Immunsystem spielt, im Rahmen der Immunosurveillance, eine wichtige Rolle bei der Kontrolle und Abwehr entarteter Zellen (Becker et al. 2002, Burnet 1970, Shankaran et al. 2001). Dennoch gibt es ebenfalls Hinweise, dass das Immunsystem das Tumorwachstum fördern kann (Santin et al. 2004). Die gegenseitige Wechselwirkung zwischen Immunsystem und Tumor wird von einigen Autoren mit dem Begriff Immunoediting beschrieben (Santin et al. 2002). Bestimmte

Zellen des Immunsystems sind dazu fähig, entartete von gesunden Zellen zu unterscheiden und anschließend zu lysieren. Vor allem die Cluster of differentiation (CD)8<sup>+</sup> T-Lymphozyten nehmen bei der Tumorsuppression eine Schlüsselrolle ein, da sie die Fähigkeit haben entartete Zellen anhand spezifischer Peptide, sogenannter Tumor assoziierter Antigene, zu erkennen und folglich zu lysieren. Die Grundlage für diesen Prozess ist dabei die Präsentation des entsprechenden Peptids auf den Haupthistokompatibilitätskomplexen der Klasse I (MHC-I) von Antigen präsentierenden Zellen (APC) (Chavez-Galan et al. 2009). NK sind dazu fähig, Tumorzellen nicht nur ohne vorherige Aktivierung, sondern auch unabhängig von präsentierten Selbstantigenen und über verschiedene Keimbahn-codierte Rezeptoren zu erkennen (Morvan and Lanier 2016). Im Gegensatz dazu sind Makrophagen bspw. dazu fähig, durch Freisetzung bestimmter Wachstumsfaktoren, Enzyme und Cytokine zur Tumorprogression beizutragen (Siveen and Kuttan 2009). Die Rolle der neutrophilen Granulozyten wird weiter kontrovers dargestellt, wobei der protumoröse Aspekt im Vordergrund steht. Sie werden unter anderem als Hauptbestandteil und Antrieb bei der Initiation von Metastasen innerhalb einer (prä-)metastatischen Mikroumgebung in entfernten Organen beschrieben. Neutrophile sind dazu fähig sowohl Faktoren zu produzieren, welche die Tumorproliferation und -invasion direkt verstärken und Angiogenese stimulieren. als immunosupressive Effekte direkt zu induzieren (Coffelt et al. 2016, Powell and Huttenlocher 2016, Wculek and Malanchi 2015). Neutrophile können bspw. durch Freisetzen von neutrophiler Elastase und Matrix Metallopeptidase 8/9 (MMP 8/9) aus ihrer Granula die extrazelluläre Matrix (ECM) und die Inflammation in der Tumormikroumgebung modulieren und die Tumorprogression fördern (Coffelt et al. 2016, Pieterse et al. 2017, Powell and Huttenlocher 2016). Durch die von ihnen freigesetzte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) ist es ihnen möglich, sowohl DNA-Schäden und genetische Instabilität zu verursachen als auch die CD8<sup>+</sup>T-Zellfunktion zu hemmen und somit eine immunsuppressive Mikroumgebung zu schaffen (Siska et al. 2017). Tumorzell-vermittelte Aktivierung der Neutrophilen kann unter anderem zu der Formation von Neutrophilen Extrazellulären Fallen (NETs) führen. Dieser Prozess der Anordnung von netzartigen extrazellulären Strukturen aus Histonen und Bestandteilen der neutrophilen Granula auf einem Gerüst aus dekondensiertem Chromatin der Neutrophilen wird allgemein als NETose bezeichnet. Mittels der NETose ist es den Neutrophilen möglich, eine immunsuppressive Wirkung auf die CD8+T-Zellen auszuüben und durch freigesetzte protumoröse Faktoren wie z.B. ROS, MMP9 oder Elastasen eine Tumorproliferation und -invasion direkt zu stimulieren. Darüber hinaus fördern NETs außerdem Tumor-assoziierte Thrombose (Carlos E de Andrea 2021, Cedervall et al. 2016, Demers et al. 2012, Demers et al. 2016). Im Gegensatz zu der vermeintlich tumor- und metastasierungsfördernden Wirkung von Neutrophilen, gibt es auch neue Arbeiten, die eine anti-metastasierende Wirkung von Neutrophilen und NETs zeigen (Casanova-Acebes et al. 2018, Schedel et al. 2020). In vorangehenden Studien konnte gezeigt werden, dass eine große Anzahl von Neutrophilen in die meisten gesunden Gewebe mit gewebsspezifischer Dynamik und tageszeitabhängigen Schwankungen infiltrieren kann. Kontext des Tumorgeschehens konnte gezeigt werden, dass eine Depletion der Neutrophilen die Karzinogenese, das Zellüberleben und die Migration beeinflusst. In einer vorangehenden Studie konnten die Tageszeit abhängigen Schwankungen bei der Bildung von B16F1 induzierten Lungenmetastasen gezeigt werden, wobei diese durch Depletion der Neutrophilen entfiel (Casanova-Acebes et al. 2018). Genauer erwies sich das Infiltrationsverhalten von Neutrophilen und B16F1 Zellen in das Lungengewebe im Tagesverlauf als konträr und zeigt somit eine mögliche antimetastatische Wirkung der Neutrophilen. Es wurde somit postuliert, dass die Tageszeit ein kritischer Punkt für die Bildung von Metastasen und die initiale Infiltration von Tumorzellen ins Gewebe ist, die durch Neutrophile beeinflusst wird (Casanova-Acebes et al. 2018).

Des Weiteren konnte im Einklang mit der antineoplastischen Rolle von NETs in murinen Melanom Modellen und in Experimenten mit humanen Melanomzellen gezeigt werden, dass NETs die Migration von Melanomzellen in vitro hemmen und einen zytotoxischen Effekt haben (Blenman et al. 2019, Schedel et al. 2020). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Menge an intratumoralen NETs nicht mit der Tumorprogression bei malignem Melanom korreliert (Schedel et al. 2020). Ein antitumoröser Effekt ebenfalls durch **NETs** konnte bspw. für Plattenepithelkarzinome im Kopf- und Halsbereich beobachtet werden (Millrud et al. 2017).

Es wird deutlich, dass die inflammatorischen Zellen in der Tumormikroumgebung eine entscheidende Rolle spielen. Trotz allem ist die genaue Kommunikation und Wirkung des Immunsystems auf die Tumorzellen nach wie vor noch nicht vollständig verstanden.

## 1.2. Chemokine und ihre Verteilung

Die Grundlage für die Kommunikation innerhalb des Immunsystems und zwischen den beteiligten Zellen sind Cytokine. Chemokine stellen eine Untergruppe der Cytokine dar, die ihren Namen erhalten, da sie kleine niedermolekulare chemotaktische Cytokine sind. Anhand eines Evolutionsmodells kann der Ursprung des Chemokinsystems auf eine Zeit vor ca. 650 Millionen Jahren zurückgeführt werden, wobei es jedoch bis zur heutigen Zeit noch nicht vollständig verstanden ist (DeVries et al. 2006). Im menschlichen Genom konnten 50 Chemokine und 18 Chemokinrezeptoren identifiziert werden. Sowohl für das angeborene als auch für das erworbene Immunsystem ist eine synchronisierte Migration von Leukozyten entscheidend, die hauptsächlich durch das Zusammenwirken von Chemokinen gesteuert wird. Chemokine haben die Fähigkeit eine große Anzahl von Zellen zu lenken und somit einen spezifischen Attraktionsgradienten festzulegen. Chemokine stellen einen vielseitigen Effektor bei dem Wachstum, der Veränderung und der Reparatur von Gewebe da. Dabei weist das Chemokinsystem, bestehend aus Liganden und Rezeptoren, eine "Kreuzreaktivität" von mehreren Liganden mit einer kleinen Menge an Rezeptoren auf (Burkhardt et al. 2012).

anderen fördert es die neurale Entwicklung. Außerdem beeinflusst es sowohl Angiogenese und Kollagenproduktion als auch die Proliferation hämatopoetischer Vorläuferzellen (Anthony and Link 2014, Broxmeyer 2006, Dimberg 2010, Kalderen et al. 2014, Lisignoli et al. 2006, Zou et al. 1998). Darüber hinaus wird vermutet, dass Chemokine und ihre Rezeptoren eine tragende Rolle bei der Bestimmung des Ziels von metastasierenden Tumorzellen haben (Sarvaiya et al. 2013). Im Fall des metastasierenden Mamma-Karzinoms werden z.B. der CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) und der CC-Chemokinrezeptor Typ 7 (CCR7) stark in den Karzinomzellen exprimiert und ihre jeweiligen Liganden CXC-Motiv-Chemokinligand 12 (CXCL12)/Stromal-cell-derived factor 1-alpha (SDF-1alpha) und CC-Chemokinligand 21 (CCL21)/ 6CkineSmall-inducible cytokine A21 (6Ckine) weisen in den primär metastasierten Zielorganen die höchste Expression auf. Somit

Das Chemokinsystem induziert zum einen die Migration von Immunzellen, zum

metastasieren Mamma-Karzinomzellen mit hochregulierter Expression dieser Rezeptoren in Organe, die die entsprechenden Liganden exprimieren (Muller et al. 2001). In früherer Literatur konnte für Melanomzellen ein ähnliches Verhalten in Bezug auf das Ligand-Rezeptor-System von CC-Chemokinligand 27 (CCL27)- CC-Chemokinrezeptor Typ 10 (CCR10) und CXCL12-CXCR4 festgestellt werden (Monteagudo et al. 2012). Des Weiteren scheinen Signale aus der Mikroumgebung von Parenchymzellen des Gehirns, wie z.B. Astrozyten, Melanomzellen, die CC-Chemokinrezeptor Typ 4 (CCR4) oder CD271 exprimieren, spezifisch zu steuern. des Gehirnparenchyms werden diese Innerhalb Melanomzellen umprogrammiert, dass sie einen "neuronalen" Phänotyp annehmen und somit weiter in das Gehirngewebe eindringen können (Redmer 2018).

Die Verfügbarkeit von Chemokinen hängt von der Expressionsregulation verschiedener Zelltypen ab und variiert innerhalb des Chemokinsystems, weshalb eine detaillierte Beschreibung den Rahmen der vorliegenden Arbeit sprengen würde (Deng et al. 2013, Fang et al. 2015, Owen et al. 2011, Prins et al. 2014, Sierra-Filardi et al. 2014).

Die Verteilung der Chemokine im Gewebe wird durch Bindungspartner wie Glycosaminoglykane (GAG), inaktivierende Proteine und rezeptorvermittelte Clearance gesteuert. GAGs sind lineare Polysaccharide mit Strukturen, die spezifisch für Zelle, Gewebe und Entwicklungsstadium sind (Li and Kusche-Gullberg 2016, Vallet et al. 2021). Aktuelle Literatur zeigt, dass eine spezifische Chemokinproduktion und -verteilung, die Verfügbarkeit von Chemokinen prägen (Yang et al. 2014, Zlotnik et al. 2011). Dabei wird die biologische Aktivität der meisten Chemokine durch ihre Wechselwirkung mit GAGs wie bspw. Heparansulfat (HS) gesteuert (Proudfoot et al. 2017). Somit kann in Bezug auf vorherige Literatur postuliert werden, dass die Chemokinverteilung im (Tumor-)gewebe durch Chemokin-Bindungspartner, im Besonderen GAGs gesteuert wird (Izraely et al. 2010, Pastore et al. 2004, von Luettichau et al. 2008).

Die physiologische Aufgabe von Chemokinen ist es, Zellen wie bspw. Leukozyten anzuziehen, wobei die Migration dieser Zellen durch die Konzentration der Chemokine gesteuert wird. In vorangehender Literatur wurde bspw. gezeigt, dass der von Makrophagen produzierte CXC-Motiv-Chemokinligand 9 (CXCL9) die Infiltration von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in das Gewebe fördert (House et al. 2020). Der

Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (G-CSF) steuert die Rekrutierung von Neutrophilen (Wculek and Malanchi 2015) und der CC-Chemokinligand 2 (CCL2) die Rekrutierung von Makrophagen (Roblek et al. 2019). Die Verteilung von Chemokinen innerhalb des Gewebes steuert dabei die Richtung, aber ebenfalls auch die Geschwindigkeit der Zellbewegung. Eine einfache homogene Chemokins führt nachgewiesenermaßen Konzentration eines zu ungerichteten Zellbewegung, wobei im Gegensatz dazu ein Konzentrationsgradient den Zellen eine Richtung für die Wanderung vorgibt. Daher ermöglicht der Konzentrationsgradient von Chemokinen die Rekrutierung einer großen Menge von Zellen an eine spezifische Stelle innerhalb des Gewebes. In vivo sind diese Gradienten aufgrund der Sequestierung von Chemokinen, in bestimmten Regionen des Migrationsweges, von GAGs abhängig (Allen et al. 2007). Die Wechselwirkung zwischen GAGs und Chemokinen kann über die Richtung der Zellmigration hinaus auch die Aufnahme von Reizen durch Chemokine und somit intrazelluläre Signale, die den Leukozytenarrest und die Zelldiapedese steuern, bestimmen (Proudfoot et al. 2003).

Da GAGs jedes Gewebes unterschiedlich sind und die Affinitäten von Chemokinen zu GAGs ebenfalls äußerst verschieden sind, wird laut früherer Literatur erwartet, dass eine gewebsspezifische Koordination zwischen Rezeptoren, GAGs und Liganden besteht (Proudfoot et al. 2017, Schenauer et al. 2007). Die Affinität zu den GAGs hängt sowohl von den molekularen Eigenschaften des Chemokins und dem Grad der Chemokin-Oligomerisation als auch von umgebungsbedingten Faktoren wie dem pH-Wert ab (Dubrac et al. 2010, Proudfoot et al. 2003, Veldkamp et al. 2005). Somit ist die Bindungsaffinität zu GAGs eine kritische Chemokineigenschaft, die ihre Verfügbarkeit und biologische Funktion bestimmt (Sheng et al. 2013).

In einer früheren Studie konnte z.B. gezeigt werden, dass die durch CXC-Motiv-Chemokinligand 8 (CXCL8) vermittelte Endotheladhäsion von Neutrophilen infolge einer Injektion von CXCL9 Liganden, die eine deutlich höhere Affinität zu HS aufweisen, inhibiert werden konnte (Vanheule et al. 2017).

Die Wechselwirkungen zwischen Chemokinen und GAGs sind hochkomplex und hängen von verschiedenen spezifischen Faktoren ab, wobei Änderungen des pH-Wertes, die GAG Struktur und die Chemokin-Oligomerisation das Ausmaß, die Intensität und die Dauer von Chemokin-Gradienten zu bestimmen scheinen (Allen

et al. 2007, Proudfoot et al. 2003, Schenauer et al. 2007, Veldkamp et al. 2005). Darüber hinaus hängt die biologische Aktivität jedes Chemokins von seiner Bioverfügbarkeit und wiederum von seiner Loslösung von den GAGs innerhalb der ECM ab (Izraely et al. 2010, Proudfoot et al. 2017, Sheng et al. 2013, Zlotnik et al. 2011).

## 1.3. Heparansulfat

Zu den sechs GAGs der Säugetiere zählen Chondroitinsulfat (CS), Dermatansulfat (DS), Heparin, HS (Gallagher 2015, Li and Kusche-Gullberg 2016), Hyaluronsäure (Caterson and Melrose 2018, Garantziotis and Savani 2019) und Keratansulfat (Caterson and Melrose 2018, Pomin 2015). GAGs sind lineare Polysaccharide, die aus Disaccharid Wiederholungen bestehen, wobei ihre Strukturen hinsichtlich Länge, Sulfatierung und Epimerisierungsmuster spezifisch für Zelle, Gewebe und Entwicklungsstadium sind (Li and Kusche-Gullberg 2016, Vallet et al. 2021). Laut aktuellem Kenntnisstand werden die Polysaccharid Ketten von allen Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPG) nach demselben Mechanismus synthetisiert (Esko and Lindahl 2001, Lindahl et al. 1998). Die Biosynthese findet im Golgiapparat statt und umfasst eine Reihe von Glykosylierungsreaktionen, die ein Glucuronosyl-Galactosyl-Galactosyl-Xylosyl (GlcAβ1,3Galβ1,3Galβ1,4Xyl)-Tetrasaccharid erzeugen, das kovalent an den Serin-Rest eines Kernproteins gebunden ist. Dabei ist die Tetrasaccharid-Protein-Verbindungssequenz für Proteoglykane (PG), die Heparin/HS oder CS/DS GAG-Ketten tragen, identisch. Welche Art von GAG-Kette synthetisiert wird, wird durch den anschließenden Glykolisierungsschritt bestimmt, bei dem entweder ein β1,4-gebundener N-acetylgalactosamin (GalNAc) oder ein α1,4-gebundener N-acetylglucosamin (GlcNAc) Rest an die nicht reduzierte terminale GlcA Einheit der Verbindungssequenz hinzugefügt wird. Dieser Schritt entscheidet über die Synthese von CS/DS- oder HS/Heparin-Ketten. Die auf die GlcNAc Substitution folgende Polymerisation der alterierenden GlcA und GlcNAc Reste resultiert in einem (GlcAβ1,4GlcNAcα1,4)<sub>n</sub> HS Vorläuferpolysaccharid. Anschließend wird der resultierende Polymer durch eine komplexe Abfolge von Reaktionen modifiziert. Es folgen eine N-Deacetylierung/N-Sulfatierung der GlcNAc Reste, eine Epimerisation von GlcA zu Idoronsäure (IdoA) Einheiten und eine O-Sulfatierung von Hexuronsäure und Glucosamin (GlcN) Resten (Kusche-Gullberg

and Kjellen 2003). Die einzelnen Reaktionen betreffen dabei nur einen Bruchteil der potenziell verfügbaren Zuckereinheiten, weshalb die finale Struktur von HS heterogen und für jedes Gewebe spezifisch ist. Diese Variabilität entsteht jedoch nicht willkürlich, sondern aufgrund des seguenziellen Charakters der Synthese und der Substratspezifität der beteiligten Enzyme. Somit besteht durch die Organisation der HS-Ketten in verschieden sulfatierte und mit IdoA angereicherte stark negativ geladene Domänen (S- oder NS-Domänen), die von nicht sulfatierten Domänen (NA- oder NAc-Domänen) durchsetzt sind, ein enormes Potenzial für strukturelle Die Variabilität (Gallagher 2015). meisten physiologischen pathophysiologischen Interaktionen von HS, mit verschiedenen Proteinen, beruhen dabei zumindest teilweise auf elektrostatischen Wechselwirkungen (Li and Kusche-Gullberg 2016).

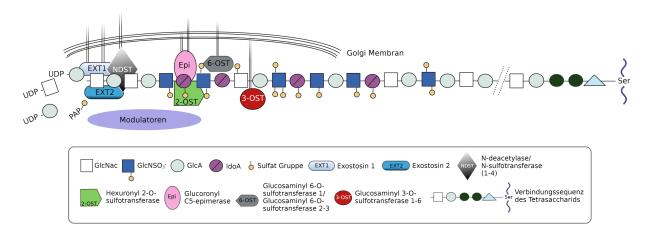


Abbildung 3 Das GAGosom, der Biosyntheseapparat von HS

Die Biosynthese von HS ist ein komplexer Prozess, bei dem verschiedene Enzyme beteiligt sind. Abgebildet ist der schematische Aufbau des GAGosoms, das die konsekutive Wirkung der Enzyme zeigt, die auf eine entstehende HS-Kette einwirken. Dabei ist die Beteiligung von Modulatoren rein spekulativ. Die abgebildete Sequenz ist willkürlich gestaltet, basierend auf Daten einer Strukturanalyse von HS (Li et al. 2003, Merry et al. 2001, Ringvall et al. 2000). Abbildung erstellt mithilfe von BioRender, mit Genehmigung.

Der Biosyntheseapparat ist im Golgiapparat lokalisiert, jedoch ist bisher wenig über die topographische Organisation, Lokalisierung der Enzyme in der Golgi-Membran oder ihre Interaktion untereinander und mit anderen Proteinen bekannt. Als GAGosom wird die Gesamtheit der Enzyme und Enzymisoformen bezeichnet, die auf die entstehende HS Kette einwirken. Es sind insgesamt 11 verschiedene Enzyme (Isoformen ausgeschlossen) an der HS Biosynthese beteiligt wie z.B. die

Glycosyltransferase Exostosin 1 (EXT-1), die für die Elongation der HS-Ketten essenziell ist. Über die tatsächliche Funktionsweise des GAGosom und über die verschiedenen Stadien der Polymermodifikation kann weiterhin nur spekuliert werden (Li and Kusche-Gullberg 2016). Das abgebildete Modell (**Abb. 3**) veranschaulicht die Reihenfolge und konzentrierte Wirkungsweise einiger Enzyme entlang eines entstehenden Vorläuferpolymers.

# 1.3.1. Die Wechselwirkung zwischen HS und seinen Bindungspartnern

Das GAG HS kommt sowohl auf der Oberfläche der meisten Zellen als auch ubiquitär in der ECM vor und macht bspw. ca. 60% der gesamten endothelialen Glykokalyx aus (Geller et al. 1993). Laut früherer Literatur kann HS verschiedene Moleküle, wie Wachstumsfaktoren, Cytokine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle und Proteasen binden, was HS für Zellmigration (Jayson et al. 2015, Watson et al. 2014), Angiogenese (Garner et al. 2011, Le Jan et al. 2012, Yoshida et al. 2014) und Chemotaxis der Immunzellen relevant macht (Kumar et al. 2015, Nonaka and Kawasaki 2014, Rops et al. 2014).

HS kann gebundene Faktoren akkumulieren und diese vor ihrem Abbau schützen (Sadir et al. 2004). Auf diese Weise moduliert HS z.B. die Verfügbarkeit und die Funktion von Chemokinen, da sich die biologische Wirkung eines löslichen Chemokinmoleküls von der eines an HS gebundenen Chemokins unterscheidet (Johnson et al. 2004). In vorangehender Literatur wurde beschrieben, dass die Bindung an und die Freisetzung von Chemokinen von HS ein entscheidendes und wahrscheinlich gut reguliertes Phänomen darstellt, das wichtige Prozesse wie Zelldifferenzierung, Proliferation, Chemotaxis und Zellmigration bestimmt (Monneau et al. 2016). Somit können GAGs in Verbindung mit Chemokinen und Wachstumsfaktoren zusammen das Schicksal der Zellen bestimmen (Wu et al. 2015). Ebenso sind Chemokine, während sie ungebunden zirkulieren, einem schnellen Abbau ausgesetzt (Denis et al. 2012) und es zeigt sich, dass der "Lebens-Zyklus" eine Chemokins weitgehend von der Bindung an oder der Freisetzung von GAGs abhängen kann (Rao et al. 1983).

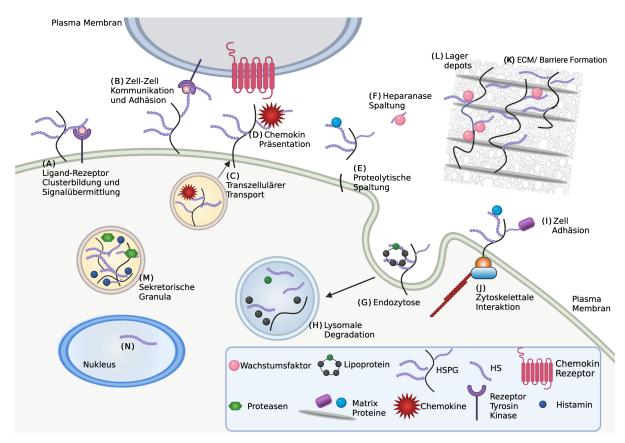


Abbildung 4 Möglichkeiten der HS-Protein-Wechselwirkungen

Schematische Darstellung von verschiedenen HS-Protein Interaktionen (A, B) HSPGs präsentieren Wachstumsfaktoren ihrem jeweiligen Rezeptor, der auf derselben oder einer benachbarten Zelle lokalisiert ist und können Teil von Signalkomplexen sein. Des Weiteren können HS-Ketten Chemokine zur Transzytose (C) und Präsentation an Zelloberflächen (D) binden. HSPGs können durch proteolytische Spaltung von Ektodomänen getrennt (E) und HS-Ketten durch Heparanase gespalten werden (F). Die an den Zelloberflächen lokalisierten HSPGs können per Endozytose aufgenommen werden (G) in Lysosomen abgebaut (H) oder an die Oberfläche zurückgeführt werden. HSPGs ermöglichen eine Zelladhäsion, indem sie über ihre HS-Ketten mit extrazellulären Matrixproteinen (I) und über zytoplasmatische Kernproteindomänen mit dem Zytoskelett (J) interagieren. In der ECM tragen HSPGs zu der physiologischen Barriere bei (K) und ermöglichen eine Speicherung von Wachstumsfaktoren und Morphogenen (L). In der sekretorischen Granula von Mastzellen werden Serglycin tragende Heparinketten für die Speicherung von Proteasen und Histamin benötigt (M). Vorangehende Studien deuten darauf hin, dass HS-Ketten mit besonderen Strukturmerkmalen im Zellkern lokalisiert sein könnten, wobei die genaue Funktion bisher unbekannt ist (N). (Bishop et al. 2007, Li and Kusche-Gullberg 2016). Abbildung erstellt mithilfe von BioRender, mit Genehmigung.

Zahlreiche Prozesse in der Entwicklung und Homöostase erfordern, dass Proteine an einem bestimmten Ort zu einer bestimmten Zeit im Körper präsentiert werden. Eine solche Positionierung kann durch Interaktion von Proteinen mit den

Polysaccharidketten von HS, an Zelloberflächen oder in der ECM erreicht werden (Li and Kusche-Gullberg 2016).

Unter den GAGs weist das stark negativ geladene HS mit Abstand die größte Anzahl an spezifischen Protein-Bindungspartnern auf, im Gegensatz zu z.B. DS, das keinen einzigen spezifischen Proteinbindungspartner aufweist (Vallet et al. 2021).

Die GAG-Protein-Wechselwirkungen bestehen aufgrund der Eigenschaften von GAGs (chemische Gruppe, Länge und Konfirmation) und ihrer Proteinpartner (Aminosäurereste in linearen Sequenzen oder dreidimensionalen (3D)-Strukturen). Dabei konnten die Bindungsschnittstellen zwischen HS und seinen Proteinpartnern mit der Konsensussequenz XBBXBX und XBBBXXBX identifiziert werden. Dieses sogenannte Cardin und Weintraub Motiv kann in den HS bindenden Proteinen gefunden werden und ist für die hohe Spezifität der Bindung verantwortlich, wobei B einen Arginin- oder Lysinrest und X eine hydrophobe Aminosäure darstellt (siehe Tab 3) (Cardin and Weintraub 1989, Vallet et al. 2021).

Tabelle 3 Die Bindungsaffinität verschiedener Chemokine zu GAG

Peptide	Aminosäuresequenz	M <sub>r</sub> (Da)
CXCL9 (74-103)	<sub>74</sub> <u>KKK</u> Q <u>K</u> NG <u>KK</u> HQ <u>KKK</u> VL <u>K</u> V <u>RK</u> SQ <u>R</u> S <u>R</u> Q <u>KK</u> TT <sub>103</sub>	3,661.4
CXCL9 (74-93)	<sub>74</sub> <u>KKK</u> Q <u>K</u> NG <u>KK</u> HQ <u>KKK</u> VL <u>K</u> V <u>RK<sub>93</sub></u>	2,460.1
CXCL9 (86-103)	86KKVLKVRKSQRSRQKKTT103	2,199.7
CXCL4 (47-70)	47NG <u>RK</u> ICLDLQAPLY <u>KK</u> II <u>KK</u> LLES <sub>70</sub>	2,785.4

Die Tabelle verschafft einen Überblick über die Aminosäuresequenz der COOH-terminalen Peptide von CXCL9 und CXC-Motiv-Chemokinligand 4 (CXCL4) die synthetisiert wurden, um ihre Bindungsaffinität der Chemokine zu GAGs zu untersuchen. Je häufiger das Cardin und Weintraub Motiv in der Aminosäuresequenz auftritt, desto höher ist die Bindungsaffinität zu den GAGs (Vanheule et al. 2017).

GAGs binden somit z.B. Cytokine und Wachstumsfaktoren in Abhängigkeit der unterschiedlichen Bindungsaffinitäten und unter variierenden physikalischchemischen Eigenschaften, wie bspw. dem pH-Wert (Dubrac et al. 2010, Proudfoot et al. 2003, Veldkamp et al. 2005). Dabei trägt auch die Organisation der HS-Ketten in sulfatierte und N-acetylierte Domänen zu der Spezifität von multiplen Proteinwechselwirkungen bei (Jemth et al. 2002). Anderseits können

Wachstumsfaktoren und Cytokine auch eine Modifikation von HS durch eine Quervernetzung seiner Polysaccharidzweige erzeugen (Migliorini et al. 2015).

# 1.3.2. Die Rolle von HS bei Tumorentwicklung und Metastasierung

Tumorbedingte Morbidität und Mortalität hängen von der Zelltransformation und von der Fähigkeit der Tumorzellen einzudringen und zu metastasieren ab. HSPG, sowohl auf den Tumorzellen als auch in umgebenden Zellen und Geweben, beeinflussen den pathologischen Prozess der Tumorentwicklung auf verschiedenen Ebenen. Die uneingeschränkte Proliferation von Tumorzellen, ihre erhöhte Mobilität und das Durchdringen von Grenzen wie der Endothelschicht, der Basalmembran und die stimulierte Angiogenese sind alles Phänomene, die der Regulierung durch HS-Protein-Wechselwirkungen unterliegen (Fuster and Esko 2005, Li and Kusche-Gullberg 2016).

Heparanase, die einzige Endoglykosidase, die HS bei Säugetieren spaltet, wird von Tumorzellen z.B. überexprimiert und hat eine starke Korrelation zu Malignität und einer Verschlechterung der Überlebenschancen der Patienten (Ramani et al. 2013). Die Spaltung von HS-Ketten unterbricht die Architektur der Basalmembranen und erleichtert so den Eintritt von Tumorzellen in den Kreislauf und deren weitere Verbreitung. Der Abbau der Basalmembran ist auch essenziell für die Angiogenese, die für das pathologische Wachstum von Primärtumoren und Metastasen erforderlich ist. Cytokine und Wachstumsfaktoren, die in der ECM an HSPGs gebunden sind, werden durch Spaltung von HS-Ketten, katalysiert durch Heparanase, mobilisiert und werden so für die Stimulation des Tumorwachstums, der Stromaentwicklung oder der Angiogenese zugänglich (Karlsson-Lindahl et al. 2012, Li and Kusche-Gullberg 2016).

#### 1.4. Arbeitshypothese und Fragestellung

Der Erfolg moderner Krebstherapien, wie z.B. der ICB, basiert entscheidend auf der Infiltration von Immunzellen in das Tumorgewebe. Aktuelle Arbeiten zum malignen Melanom zeigen, dass in Patienten, die nicht auf die ICB ansprechen, die Zahl von tumorinfiltrierenden CD8+ T-Zellen geringer ist als in Patienten mit einer guten Ansprechrate. Die Rekrutierung von Immunzellen wird unter anderem durch Cytokine wie CXCL9 reguliert. Die Menge an inflammatorischen Cytokinen im Tumor wird wahrscheinlich zu einem großen Teil über das extrazellulär vorkommende HS kontrolliert (Abb. 5a). Exom-Sequenzierung von humanen Melanomen weisen darauf hin, dass in ca. 40% der Patienten die Bildung des HS aufgrund von somatischen Mutationen gestört ist (von Palubitzki et al. 2020) (vgl. Abb. 5b). Inwiefern das von Melanomzellen produzierte HS bei der Rekrutierung von Immunzellen in das Tumorgewebe beteiligt ist, ist bislang nur wenig verstanden und wurde daher in dieser Studie untersucht.

Dabei war das Ziel, zu untersuchen, ob Tumorgewebe ohne HS vor der Infiltration von Immunzellen geschützt ist. Das Hauptaugenmerkt liegt dabei auf den rekrutierten Neutrophilen, CD8<sup>+</sup> T-Zellen und Monozyten. Durch die vorliegende Studie soll ein besseres Verständnis für die Vorgänge bei der Metastasierung des malignen Melanoms geschaffen werden und die Entwicklung therapeutischer Interventionen und folglich eine Verbesserung der Patientenergebnisse gefördert werden.

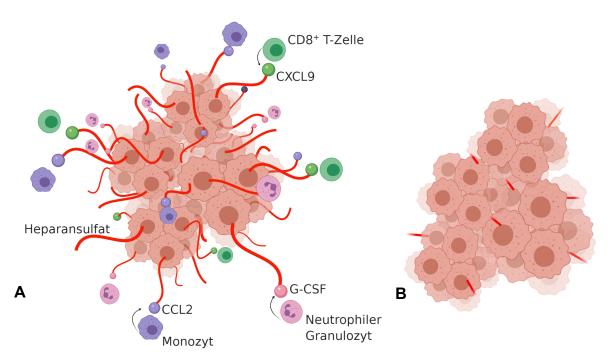


Abbildung 5 Ein Modell für die Auswirkung einer insuffizienten HS-Biosynthese

Schematische Darstellung der Interaktion von HS und Chemokinen. HS reguliert die Verfügbarkeit verschiedener Chemokine, wie bspw. G-CSF, CXCL9 und CCL2. Diese Chemokine sind für die Rekrutierung von Neutrophilen, CD8<sup>+</sup> T-Zellen und Monozyten relevant (A). Durch Mutationen, die die Enzyme des GAGosoms betreffen, kann es zum Ausbleiben einer suffizienten HS-Biosynthese und den damit verbundenen Effekten kommen (B). Abbildung erstellt mithilfe von BioRender, mit Genehmigung.

## 2. Material und Methoden

#### 2.1. Material

## 2.1.1. Geräte und Utensilien

Geräte	Hersteller
Mikrotom	Kryostat CM3050, Leica Microsystems;
	Wetzlar, Deutschland
Inverses Mikroskop	Carl Zeiss AG; Oberkochen, Deutschland
Zentrifuge	Biofuge Heraeus Biofuge fresco;
	40273085 Kendro Laboratory Products
	Osterode Deutschland
Zentrifuge (groß)	Eppendorf
Vortex	Heidolph
Wasserbad 55°C	Techne
Tissue Lyser	Quiagen
4°C Gefrierschrank	Liebherr
-20°C Gefrierschrank	Liebherr
-80°C Gefrierschrank	Thermo
Präzisionswage	Sartorius BP 211D
Spectrophotometer: Nano Drop	Thermo Fischer Scientific Waltha. USA
2000	
LightCycler	LightCycler 96 System. Roche Life
	Sciences, Mannheim, Deutschland
Electrophorese System	Biometra Standard Power Pack

Utensilien	Hersteller
Deckgläschen 24x60mm <sup>2</sup>	Menzel- Gläser, Thermo Fischer Scientific
	Gerhard Menzel B.V. & Co. KG
Einbettmedium	Tissue-Tek® O.C.T. TM Compound,
	Sakura, Finetek USA, Inc.; Torrance, CA,
	USA
Einbettschälchen	Peel-A-Way® Embedding Mold
	(truncated-T8) Polysciences, Inc.:
	Warrington, PA USA

Mikroliterpipetten	Eppendorf Research® plus, Eppendorf
	AG; Hamburg, Deutschland
Objektträger 25x75x1mm³	Menzel-Gläser Superfrost Plus, Thermo
	Fischer Scientific Gerhard Menzel B.V. &
	Co. KG
Pipettenspitzen	epT.I.P.S®, Eppendorf AG; Hamburg,
	Deuschland
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon®, Becton, Dickinson and Company
	(BD); Franklin Lakes, NJ, USA
RNase freie Mikroliterpipetten	Fa. Roche Nr.04.72962001
RNase freie Pipettenspitzen	epT.I.P.S®, Eppendorf AG; Hamburg,
	Deuschland
RNase freie Pinzetten	Aesculap
RNase freie Skalpelle	Aesculap
RNase freie Tubes 1,5ml (im Mini	Quiagen 74106 (im Kit)
Kit vorhanden)	
RNase freie Tubes 2,0ml (im Mini	Quiagen 74106 (im Kit)
Kit vorhanden)	
Sterile Kompresse	Fink Walter Nr.321063
Trockeneis	
Eisbehälter	
Mahlkugeln	Quiagen
96-Well-Platte	Thermo Scientific Nunc
Coverplates	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts,
	USA
RNase freie Tubes 0,5ml	Sarstedt 72.704
Erlenmeyer Kolben 100ml	

# 2.1.2. Lösungen und Reagenzien

Lösung	Zusammensetzung
Fixativ	4% Paraformaldehyd (PFA)
Phosphat gepufferte Salzlösung	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM
(PBS)	Na2HPO4; 1,8 mM KH2PO4
PBS-T (PBS-Tween)	0,1% Tween® 20 in PBS
Triton-X 100	Sigma Nr. T8787-250ml
Blockierungs-Lösung	10% Ziegenserum, 0,1% Triton-X in PBS
RLT lyse Puffer	RLT Puffer in 1% Mercaptoethanol; 300µl
	pro Gewebestück, das <30mg wiegen
	sollte
DNase I-Stammlösung	In 550µl RNase-freiem Wasser lösen; das
	Röhrchen vorsichtig schwenken und
	Kippen; Aliquot bei -20°C lagern
DNase-Verdaulösung	70μl RDD (4°C) + 10μl DNase I
	Stammlösung (-20°C) pro Probe;
	Röhrchen schwenken und Kippen
5x Reaction Mix	Reaktionspuffer; Deoxynucleotide Mix;
	Oligo-dT; Random Hexamer-Primer
Maxima Enzyme Mix	Reverse Transkriptase; RNase Inhibitor
Nuclease freies Wasser	Zum Umschreiben von 1µg RNA in CDNA
	wird pro Ansatz mit Wasser auf 20 μl
	aufgefüllt

Reagenz/ Substanz	Hersteller
Hydrophober Kleber	Marabu Bietigheim Bissingen
Ziegenserum	Dako Denmark A/S; Glostrup, Dänemark
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, Inc.; St. Louis, MO, USA
Fluromont-G™	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific
RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit	Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland
(50):	
<ul> <li>Collection Tubes 1,5ml</li> </ul>	

RNeasy Mini Spin Column RW 1Puffer (15-25°C) RPE Puffer (15-25°C) RLT Puffer (15-25°C) RNase freies Wasser (15-25°C) RNase-Free Dnase Set (4°C) Proteinase K (15-25°C) 2-Mercaptoethanol FLUKA Kat.No: 63689 Ethanol absolut reinst MERCK Kat.No: 1.00986. 1000 RNase ZAP SIGMA Kat.No.: R-2020 **DEPC Wasser** Quiagen Kat No: 1039498 Maxima First Strand cDNA ThermoFisher Scientific Waltham, USA Synthesis Kit for RT-qPCR (-20°C) Nr. K1642 5x Reaction Mix Maxima Enzyme Mix Nuclease freies Wasser Master Mix Promega Dual-Lock<sup>TM</sup> Taq DNA Nr. A600A Polymerase Heat-labile uracil-DNA glycosylase (UNG) dNTPs with dUTP Passive reference dye (ROX<sup>TM</sup> -or- MUSTANG PURPLETM) Optimized buffer components Agarose Pulver Lonza Cat.NO 50004 TRIS-Borsäure-EDTA-Puffer (TBE) Wird im Labor angesetzt Gel Stain Carl Roth GmbH + CO.KG

Thermo scientific

Gene Ruler DNA Ladder Mix

DNA Loading Dye	Thermo scientific R1161
Deionisiertes Wasser	
Kristallviolett	Merck

# 2.1.3. Antikörper

Antikörper	Hersteller
Polyclonal Rabbit Anti-Human von	Dako Denmark A/S; Glostrup, Dänemark
Willebrand Faktor	
Heparan Sulfate purified (clone	Amsbio
F58-10E4)	
Purified Rat Anti- Mouse Ly-6G	BD Pharmingen
Purified Rat Anti- Mouse Ly6C	BD Pharmingen
CD8 Monoclonal Antibody Rat Anti-	Invitrogen
Mouse	
FICT Goat Anti- Rabbit IgG	BD Pharmingen
Alexa Fluor® 555 Goat anti-Rat	Invitrogen
IgG	

# 2.1.4. **Primer**

Primer	Sequenz	Hersteller
ß-Actin	Forward:TCATGAAGGTGACGTTGACATCCGT	Eurofins
	Reverse:CCTAGAAGCATTTGCGGTGCACGATG	Genomics;
		Ebersberg
		Deutschland
Ly6G	Forward: CATTGCAAAGTCCTGTGTGCT	Eurofins
	Reverse: ATTGTCCAGAGTAGTGGGGC	Genomics;
		Ebersberg
		Deutschland
Ly6C	Forward: TGCCAGTCCTTCAGAAAGTGAA	Eurofins
	Reverse: GGGACATTTGCAAACACGCT	Genomics;
		Ebersberg
		Deutschland
	1	1

CD8	Forward: TGGACACTTCTCACACTACAAAG	Eurofins
	Reverse: TCCTTCTTTGAGAGTCCTCAATC	Genomics;
		Ebersberg
		Deutschland
CXCL9	Forward: GCTGTTCTTTCCTCTTGGGC	Eurofins
	Reverse: AGGCAGGTTTGATCTCCGTT	Genomics;
		Ebersberg
		Deutschland
CXCL10	Forward: TGCCGTCATTTTCTGCCTCA	Eurofins
	Reverse: CGGATTCAGACATCTCTGCTCAT	Genomics;
		Ebersberg
		Deutschland
Csf3	Forward: TCAACTTTCTGCCCAGAGGC	Г <b>.:</b>
	Folward, TOAACTTTCTGCCCAGAGGC	Eurofins
	Reverse: TAGAGCCTGCAGAGACCTT	Genomics;
		Genomics;
CCL2		Genomics; Ebersberg
CCL2	Reverse: TAGAGCCTGCAGGAGACCTT	Genomics; Ebersberg Deutschland
CCL2	Reverse: TAGAGCCTGCAGGAGACCTT  Forward: CACTCACCTGCTGCTACTCA	Genomics; Ebersberg Deutschland Eurofins
CCL2	Reverse: TAGAGCCTGCAGGAGACCTT  Forward: CACTCACCTGCTGCTACTCA	Genomics; Ebersberg Deutschland Eurofins Genomics;

## 2.1.5. Software

Software	Hersteller
Microsoft Office	Microsoft Cooperation, Washington, USA
Microsoft Excel	Microsoft Cooperation, Washington, USA
BioRender	BioRender, Toronto, Ontario, Kanada
Zeiss Zen Mikroskop Software	Zen system 2012, Carl Zeiss AG,
	Oberkochen, Deutschland
Light Cycler 96 Software	96 Software 1.1 Roche Life Sciences,
	Mannheim Deutschland
Image J	Wayne Rasband (NIH)
Origin Pro	OriginLab Corporation
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc. USA

#### 2.2. Methoden

#### 2.2.1. Ablauf des Tierexperiments

Die hier beschriebenen Tierexperimente wurden im Februar 2021 von Dr. Christian Wang in dem Gorzelanny und Yuanyuan Campus Forschung Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, in der Arbeitsgruppe für experimentelle Dermatologie von Professor Dr. Stefan W. Schneider, durchgeführt und in einer aktuellen Studie ausführlich beschrieben (Wang et al. 2022). Alle Tierexperimente wurden durch die zuständige Behörde in Hamburg "Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz" (AKT.Z. N033/2020) genehmigt. Für die tierexperimentellen Analysen wurden C57BL/6J Wildtyp (WT) Mäuse im Alter von 12 Wochen unter spezifischen pathogenfreien Bedingungen gehalten und verwendet.

Für die genetisch modifizierten Melanomzellen wurden single-guide RNA (sgRNA) mit dem Online-CRISPR-Designtool (http://crispor.tefor.net/) entworfen, wobei die Zielsequenzen von EXT-1 5'-CACCGAACATTCTAGCGGCCATCGA-3' und 5'-AAACTCGATGGCCGCTAGAATGTTC-3' waren. Die sgRNAs wurden in den pSpCas9(BB)-2A-Puro-Vektor geklont und die endgültigen Vektorkonstrukte wurden mittels Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific), wie zuvor berichtet, in die Melanomzellen transfiziert (Zeng et al. 2013). Es konnten dabei durch die Selektion mit Puromycin (2µg/ml) stabile EXT-1 Knock Out (KO) Zelllinien erzeugt werden. Anschließend wurden, mittels Reihenverdünnung der Puromycinresistenten Zellen in 96-Well Platten, Einzelzellklone ausgewählt. Nach der Bestätigung der genetischen Veränderungen mit Hilfe des Alt-R Genome Editing Detection Kit wurde die vollständige komplementäre DNA (cDNA) des EXT-1-Gens abschließend in einem pLenti CMV/TO Puro-Vektor geklont. Der Lentivirus-Bestandteil und die B16F10-Zellen wurden wie zuvor berichtet hergestellt (Kalagara et al. 2018).

Bei diesem Experiment handelt es sich um eine Induktion von Lungenmetastasen in Abwesenheit eines primären Tumors.

An Tag 0 wurden entsprechend der **Abbildung 6** einer Versuchsgruppe murine Melanomazellen (B16F10), bei denen zuvor das Gen für das Enzym EXT-1 via CRISPR/Cas9 deletiert worden war und die somit nicht in der Lage waren HS zu synthetisieren, intravenös (i.v.) in die Schwanzvene injiziert.

Für die Kontrollgruppe wurden B16F10 WT Tumorzellen verwendet, die ebenfalls an Tag 0 i.v. injiziert wurden (**Abb.6**).

Dieses Experiment wurde zum einen mit 100.000 Tumorzellen/150 µl PBS und zum anderen mit 750.000 Tumorzellen/150 µl PBS durchgeführt.

Diese Tumorzellen gelangten über den Kreislauf direkt in die Lungenkapillare und induzierten dort die Bildung von Metastasen. Anschließend wurden die Mäuse an Tag 15 in tiefer Isofluran Narkose schmerzfrei eingeschläfert. Abschließend wurde das Lungengewebe entnommen (vgl. **Abb 6**) und RNA des Gewebes extrahiert, bevor die Proben in Einbettschälchen mit Tissue-Tek® eingebettet und bei -80°C schockgefroren wurden. Darüber hinaus wurde als Kontrollgruppe das unveränderte Lungengewebe von 6 gesunden Mäusen, nachdem sie eingeschläfert worden waren, entnommen, in Einbettschälchen mit Tissue-Tek® eingebettet und bei -80°C schockgefroren.

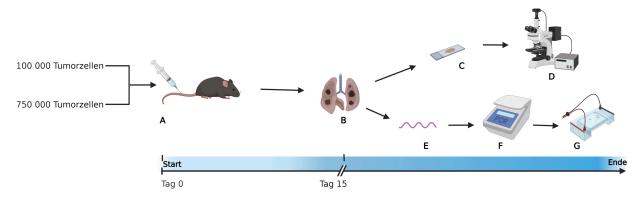


Abbildung 6 Zeitlicher Ablauf des verwendeten Mausmodells

Das dargestellte Tierexperiment wurde für eine Tiergruppe mit 100 000 Tumorzellen und für die andere Tiergruppe mit 750 000 Tumorzellen durchgeführt. Beginnend an Tag 0 wurden den Mäusen B16F10WT/bzw. EXT-1 KO Zellen i.v. injiziert, was die Bildung von Lungenmetastasen induzierte (A). An Tag 15 wurde das Lungengewebe der Mäuse entnommen (B). Im weiteren Verlauf der Studie wurden anschließend Gefrierschnitte der cryokonservierten metastasierten Mäuselungen angefertigt (C), um diese mittels einer Immunfluoreszenzfärbung mit einem Fluoreszenzmikroskop zu analysieren (D). Außerdem wurde RNA des Lungengewebes extrahiert und cryokonserviert, (E) um anschließen eine quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) durchzuführen (F). Die Größe der mittels qPCR nachgewiesenen Genabschnitte wurde abschließend mittels Gelelektrophorese kontrolliert (G). Abbildung erstellt mithilfe von BioRender, mit Genehmigung.

## 2.2.2. Anfertigung der Gefrierschnitte

Die bei -80°C gelagerten murinen Lungen wurden mithilfe des Mikrotoms in 8µm dicke Schnitte geschnitten. Da das Lungengewebe, aufgrund der unmittelbaren

Nähe, mit dem murinen Herz entnommen wurde, können die Gefrierschnitte der Lungen Anteile des murinen Herzmuskels enthalten. Die Schnitte wurden anschließend 45min lang luftgetrocknet und bei -20°C bis zur Färbung gelagert.

#### 2.2.3. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Diese Färbung basiert zum einen auf der Spezifität eines primären AK, der das Zielprotein bindet, und zum anderen auf der Fluoreszenzkopplung eines sekundären AK, der lokalisierbar ist.

Auf Grund der Bindung der sekundären AK an die Epitope des primären AK, lässt sich mittels der Fluoreszenzdetektion indirekt auf den Lokus des Zielproteins schließen (Barbierato et al. 2012). Die Anfertigung einer Negativkontrolle, die ausschließlich mit den sekundären AK behandelt wurde, dient dem Nachweis unspezifischer Bindungen.

Um solche unspezifischen Bindungen zu verringern, wird der sekundäre AK nicht wie der primäre mit PBS-T sondern mit der Blocksolution in seine jeweilige Verdünnung gebracht. Mit Hilfe einer DAPI-Färbung werden die Zellkerne sichtbar gemacht.

### 2.2.4. Immunfluoreszenzfärbung von Gefrierschnitten

Die bei -20°C gelagerten Gefrierschnitte wurden für 30min bei Raumtemperatur (RT) getrocknet und für 10min in 4% PFA fixiert. Da für jeden Schnitt im Folgenden 80µl Flüssigkeit verwendet werden sollten, wurden mit einem hydrophoben Kleber Begrenzungen für etwa diese Kapazität um jeden einzelnen Schnitt herum erstellt. Anschließend wurden die Schnitte zweimal mit PBS gewaschen und abschließend mit 10% Ziegenserum und 0,1% Triton-X in PBS für 10min bei RT geblockt. Ab diesem Schritt war darauf zu achten, dass die Schnitte nicht mehr trocken liegen durften.

Nach Abklopfen der Blocksolution wurde ein primär AK in Kombination mit dem primären AK für den von Willebrand Faktor (vWF) in PBS-T für 90min auf die Schnitte gegeben (vgl. **Tab. 4**). Für die Negativkontrolle wurde nur PBS-T aufgetragen. Die primären AKs wurde anschließend durch jeweils 10 minütiges zweimaliges Waschen mit PBS-T heruntergespült und die sekundären AKs mit der Blocksolution für 45min aufgetragen. Nach der finalen Inkubation mit den sekundären AKs, wurden sie 3min lang mit PBS-T und anschließend 3min mit PBS

gewaschen. Anschließend wurde die DAPI-Verdünnung für 10min bei RT aufgebracht. Danach wurde diese ebenfalls zweimalig für 5min mit PBS abgewaschen und die Schnitte dreimal jeweils für 5min mit destilliertem Wasser gewaschen. Abschließend wurden die Schnitte mit ein bis zwei Tropfen Fluromount-G und einem Deckgläschen versehen bei 4°C gelagert.

Tabelle 4 Verwendete Antikörper und Verdünnung der Färbung

Färbung	Antikörper	Verdünnung
vWF	Polyclonal Rabbit Anti-Human von	1:400
	Willebrand Faktor	1:500
	FICT Goat Anti-Rabbit IgG	
HS	Heparan Sulfate purified (clone F58-	1:500
	10E4)	1:1000
	3. Alexa Fluor® 555Goat anti-Rat IgG	
Ly6G	Purified Rat Anti- Mouse Ly6G	1:70
	2. Alexa Fluor® 555Goat anti-Rat IgG	1:1000
Ly6C	Purified Rat Anti- Mouse Ly6C	1:70
	2. Alexa Fluor® 555Goat anti-Rat IgG	1:1000
CD-8	CD8 Monoclonal Antibody Rat Anti-	1:20
	Mouse	1:1000
	2. Alexa Fluor® 555Goat anti-Rat IgG	

#### 2.2.5. Bestimmung des Anteils der Immunzellen

Mithilfe eines inversen Fluoreszenzmikroskops ließen sich die Schnitte hinsichtlich ihrer immunhistologischen Färbung auswerten. Dafür wurde jeweils eine Übersichtsaufnahme pro Präparat in 20-facher Vergrößerung mit den Kanälen AlexaFluor-550nm (rot), FICT- 470nm (grün) und DAPI-365nm (blau) angefertigt. Um die Übersichtsaufnahmen herzustellen, wurden über das "advanced setup" des Fluoreszenzmikroskops bis zu 40 Bereiche pro Präparat in 20-facher Vergrößerung fokussiert und anschließend das Programm für die Übersichtsaufnahme gestartet. Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops wurde jeder einzelne Bereich des Präparates fotografiert und entsprechend der Größe des Präparates ergaben die 500 bis 900 einzelnen Bildaufnahmen die resultierende Übersichtsaufnahmen. Die Fläche einer einzelnen Bildaufnahme betrug 301228,434  $\mu$ m².

Bei diesem Prozess wurde auf eine vergleichbare Belichtungszeit geachtet. Zur Bestimmung der Häufigkeit eingefärbter inflammatorischer Zellen, sowohl innerhalb

der Metastasen als auch in dem Lungengewebe, wurde die Anzahl der intensivsten Signale im Gewebe pro Bildaufnahme durch optisches Auszählen ermittelt. Für iedes Präparat wurden sowohl 10 Bildaufnahmen im Bereich der Lungenmetastasen als auch 10 Bildaufnahmen im Bereich des umliegenden Lungengewebes ausgewählt. Bei der Auswahl der Bildaufnahmen wurde darauf geachtet, dass die zu analysierenden Immunzellen sowohl fokussiert als auch von den umliegenden Zellen abgrenzbar zu erkennen waren und somit weder aus dem Randbereich des Metastasen- oder Lungengewebes noch aus dem Randbereich eines großen Blutgefäßes stammten.

Mit den 10 Bildaufnahmen aus dem Bereich der Lungenmetastasen und den 10 Bildaufnahmen aus dem Bereich des umliegenden Lungengewebes ließ sich in Relation zu der durchschnittlichen Fläche von 301228,434 µm<sup>2</sup> schließlich eine gewebespezifische Häufigkeit angeben.

#### 2.2.6. Bestimmung des Anteils an Lungenmetastasen

In einer vorangehenden Studie wurden bereits öffentliche Transkriptom Datensätze (Cerami et al. 2012, Gao et al. 2013), im Hinblick auf die Expression von HS verwandten Genen sowohl im primären Melanom als auch in den Metastasen analysiert. Dabei konnte die Analyse von Biopsien von Melanom Patienten und von Transkriptomdaten bestätigen, dass Melanomzellen, die weniger HS exprimieren, zur Metastasierung neigen (Wang et al. 2022). Die in unseren Experimenten verwendeten metastasierten Lungen, sowohl durch WT Melanom Zellen als auch durch EXT-1 Melanom Zellen induziert, wurden in der vorangehenden Studie (Wang et al. 2022) mittels der Image J Software per Particle Analyser analysiert und quantitativ ausgewertet.

### 2.2.7. Isolierung der RNA aus dem Gewebe

Die Gewebeproben wurden bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert. Vor Beginn der RNA Isolierung wurden sowohl die Arbeitsfläche als auch Pipetten, Präzisionswaage und die restlichen Materialien, die bereitgelegt wurde, mit RNase ZAP besprüht, um einen Abbau der RNA zu vermeiden.

Das Gewebe wurde bei RT aufgetaut, in ein neues beschriftetes 2,0ml Tube überführt und auf 30mg Gewebe abgewogen.

Anschließend wurde unter dem Abzug 300µl RLT lysis Puffer mit Mercaptoethanol in jedes 2,0ml Tube mit 30mg Gewebe pipettiert und eine Mahlkugel mit einer sterilen Pinzette hinzugegeben. Die Tubes wurden austariert und im Tyssue Lyser für 3min bei 30Hz homogenisiert. Nach der Zugabe von 590µl RNAse reinem Wasser und 10µl Proteinase K wurden die Proben gevortext und anzentrifugiert. Danach wurden die Proben für 10min bei 55°C schwimmend im Wasserbad inkubiert und anschließend für 3min bei 10.000U/min zentrifugiert. Die RNA war nun im Überstand zu finden.

Der Überstand wurde in ein neues 2,0ml Collection Tube überführt und mit 450µl absolut reinstem Ethanol durch Auf- und Abpipettieren gründlich gemischt.

Im nächsten Schritt wurde die RNeasy Mini Spin Column vorbereitet, 700µl Probe auf den Spin Column Filter gegeben und 15sek lang bei 10.000U/min zentrifugiert. Anschließend wurde unter Verwendung eines neuen Collection Tubes der Rest der Probe auf den Spin Column Filter gegeben und für 15sek bei 10.000U/min zentrifugiert. Durch die Abfolge von Waschschritten konnten andere Strukturen aus der Membran ausgewaschen werden. Die RNA befand sich nun auf dem Filter. Nach der Zugabe von 350µl RW1 Puffer und 5min Inkubation wurde erneut für 15sek bei 10.000U/min zentrifugiert. Unter Verwendung eines neuen Collection Tubes wurden 80µl DNase Verdaulösung zur Entfernung der DNA am Membranmaterial auf die Membran gegeben und für 15min bei RT verdaut. Anschließend wurde 350µl RW1 Puffer dazugegeben und erneut für 15sek bei 10.000U/min zentrifugiert. Nach erneutem Wechsel des Tubes wurden 500µl RPE Puffer dazugegeben, für 15sek bei 10.000U/min zentrifugiert und anschließend für 1min bei 14.000U/min zum Trocknen zentrifugiert. Unter Verwendung eines neuen 1,5ml Tubes wurden 40µl RNAse freies Wasser dazugegeben und für 10min inkubiert, bevor die Flüssigkeit für 1min bei 10.000U/min zentrifugiert wurde. Die RNA befand sich nun im Zentrifugat und die RNA-Proben wurden auf Eis gestellt

### 2.2.8. RNA Konzentrationsmessung

Zur Ermittlung der RNA-Konzentration wurde eine photometrische Messung mit einem Spektrophotometer durchgeführt. Zuerst wurde mit 2µl RNAse freiem Wasser der Leerwert ermittelt. Anschließend wurden jeweils 2µl Probe aufgetragen und die Daten direkt von der Nanodrop Software ermittelt. Dabei wurde darauf geachtet,

dass der Reinheitsfaktor (A260/A280) bei 2.0 und das Verhältnis (A260/A280) bei >2.0 lag.

#### 2.2.9. Umschreiben der Proben in cDNA

Um die qPCR durchführen zu können, ist es notwendig, die isolierte RNA in cDNA umzuschreiben. Mit Hilfe einer reversen Transkriptase, einem Enzym, das die ursprüngliche Richtung der Transkription umkehrt, ist es möglich, aus RNA cDNA herzustellen.

Für diese cDNA-Synthese bildete das Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR der Firma Thermo Fisher die Grundlage.

Dazu wurden der Reaction Mix, Enzyme Mix und das Nuclease freie Wasser auf Eis aufgetaut.

Jeder Probe wurde der Reaktion-Mix mit dem Reaktionspuffer, Deoxynucleotide Mix, Oligo-dT und Random Hexamer-Primer zugeführt. Anschließend erfolgte die Zugabe des Enzymgemisches von Reverser Transkriptase und RNase Inhibitor.

Die Proben wurden wie folgt zusammen pipettiert:

	20µl Ansatz
Reaction Mix	4μΙ
Enzym Mix	2µІ
Nuclease freies Wasser	13µl
RNA	1μΙ

Dabei wurde als Erstes die RNA, dann der Reaction Mix und Enzyme Mix und anschließend das Nuclease freie Wasser zusammenpipettiert, gevortext und anzentrifugiert. Hieran schloss sich eine Inkubation an, in der die Proben für 10min bei 25°C, für 15min bei 50°C und für 5min bei 85°C erhitzt wurden. Die cDNA konnte unmittelbar für eine qPCR verwendet werden.

## 2.2.10. Durchführung der qPCR

Die qPCR ist ein Verfahren zur Vervielfältigung definierter DNA-Abschnitte und zur Quantifizierung der gewonnenen DNA. Für den Reaktionsansatz wurde die zuvor synthetisierte cDNA sowie der Master Mix der Firma Thermo Fisher und zwei Primer, die den Anfang und das Ende des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts

festlegten, benötigt. Der Master Mix enthielt Dual-LockTM Taq DNA Polymerase, Heat-labile uracil-DNA Glycosylase, Passive Reference Dye (ROX) und einen Nukleotid-Mix (dNTPs mit dUTP) in einem geeigneten Puffer, der als Substrat für die entstehenden DNA-Kopien diente.

Insgesamt wurde pro Probe ein Volumen von 10,5µl eingesetzt und die PCR in einer 96-Well-Platte durchgeführt. Pro Well wurden folgende Bestandteile pipettiert:

- 5,0µl Master Mix
- 0,5µl Forward Primer (1:10)
- 0,5µl Reverse Primer (1:10)
- 4,5µl cDNA (1:25) der jeweiligen Probe

Die Well-Platten wurden für die eigentliche Reaktion, bestehend aus 20-50 Zyklen, in das PCR-Gerät gegeben. Im ersten Schritt, der Denaturierung, wurden die Wasserstoffbrückenbindungen der doppelsträngigen DNA bei ca. 95°C aufgebrochen. Im folgenden Schritt, der Primerhybridisierung wurde die Temperatur auf 55 bis 65°C abgesenkt, was eine spezifische Anlagerung der Primer an die DNA ermöglicht. Dabei wurde die genaue Temperatur durch die Länge und die Sequenz der Primer bestimmt. Anschließend folgte der letzte Schritt, die Elongation, in der die DNA-Polymerase die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auffüllte. Die DNA-Polymerase begann dafür am 3'-Ende des angelagerten Primers und folgte dann dem DNA-Strang. Nach Ende der qPCR wurden die Proben bei 4°C gelagert.

Die Messung jeder einzelnen Probe erfolgte in dreifacher Bestimmung.

Dabei wurde die Expression der einzelnen Gene relativ zu der Expression des "Houskeeping-Gens" ß-Aktin ermittelt.

Anhand des gemittelten Cycle threshold (Ct) Wertes der dreifachen Bestimmung konnte die PCR ausgewertet werden. Dieser Wert gab die Anzahl der PCR-Zyklen an, nach denen die gemessene Fluoreszenz den Schwellenwert überstieg. Auf diese Weise konnte die relative Expression des jeweiligen Zielgens im Vergleich zu dem "Housekeeping-Gene" ß-Aktin ermittelt werden.

# 2.2.11. Validierung der qPCR amplifizierten PCR Produkte mittels Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht, durch eine Auftrennung der Nukleinsäure-Stränge auf dem Agarose-Gel entsprechend ihrer Größe, eine Beurteilung der isolierten RNA. Die Herstellung des Agarose-Gels erfolgte durch das kurze Aufkochen von 1g Agarosepulver und 50ml TBE in einem Erlenmeyer Kolben für 1min bei 600Watt. Nach vollständiger Homogenisierung der Agarose wurde sie anschließend für 10min heruntergekühlt. Die entstandene Agarose Lösung wurde anschließend in die Gelkammer zwischen die Kämme überführt und die Polymerisation des Gels abgewartet. Anschließend wurden 7µg Gel Stain hinzugegeben. Währenddessen wurde der Standardmix aus 1µl Gene Ruler DNA Ladder Mix, 1µl DNA Loading Dye und 4µl deionisiertem Wasser in Epi Tubes vorbereitet. Die qPCR Platten wurden für 3min bei 13.000 Umdrehungen zentrifugiert und es wurden 5µl jeder Probe mit jeweils 1µl Kristallviolett zusammenpipettiert. Standard- und Probengemisch wurden anschließend jeweils bei 13.000 Umdrehungen für 1min kurz anzentrifugiert. Daraufhin wurden die Kämme entfernt und 6µl des Standard- und des Probengemisches in die jeweiligen Taschen pipettiert. Der Gellauf wurde für 10min mit einer Spannung von 45 Volt gestartet und anschließend wurde für 30min eine Spannung für 90 Volt angelegt. Durch das so angelegte elektrische Feld ziehen die negativ geladenen Nukleinsäure-Moleküle in den Gel-Taschen in Richtung des Pluspols. Dies ermöglicht eine Auftrennung der Stränge nach ihrer Größe, wobei größere Moleküle stärker zurückgehalten werden als kleinere. Es entstand ein charakteristisches nach Längen sortiertes Bandenmuster im Gel, entsprechend den unterschiedlichen Längen der Nukleinsäuren. Nach einer Laufstrecke von ungefähr 4cm wurde das Gel aus der Kammer entfernt und zur Dokumentation der Banden unter UV-Licht fotografiert und interpretiert.

#### 2.2.12. Statistische Auswertung

Die erfassten Daten wurden mit Hilfe des Programmes Microsoft Excel tabellarisch dargestellt und die Statistiken unter Verwendung des Programms Graphpad Prism erstellt. Für die statistische Auswertung wurden pro Gruppe jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung gebildet. Um das Signifikanzniveau zu bestimmen, wurden der ungepaarte T-Test bzw. der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test und die einfache lineare Regression gewählt. Die Signifikanz wurde durch einen p-Wert gleich oder kleiner als 0,05 definiert.

Symbol	P-Wert
(*)	<0,1
*	≤0,05
**	<0,01
***	<0,0001

#### 3. Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des HS auf die infiltrierenden Immunzellen im Kontext des metastasierenden malignen Melanoms zu untersuchen.

Die folgenden Experimente wurden mit murinen B16F10 Melanomzellen durchgeführt, da sie in vorherigen Studien bereits ihr aggressiv metastasierendes Profil bewiesen hatten (Nakamura et al. 2002).

In früheren Arbeiten wurde bereits die tragende Rolle von HS bei der Interaktion mit Makromolekülen und Signalmolekülen wie z.B. Wachstumsfaktoren, Cytokinen, Adhäsionsmolekülen und Proteasen beschrieben, weshalb HS sowohl für die Zellmigration und die Angiogenese als auch für Chemotaxis der Immunzellen relevant ist (Forsberg and Kjellen 2001). Die Biosynthese von HS ist ein komplexer Prozess, bei dem zahlreiche Enzyme beteiligt sind. Bestimmte Enzyme, wie bspw. die Glycosyltransferanse EXT-1, haben sich als essenziell in der Biosynthese von HS erwiesen (Fang et al. 2016, Forsberg and Kjellen 2001).

Für die vorliegenden Experimente wurden daher zum einen murine Melanomzellen, bei denen das Gen für das Enzym EXT-1 via CRISP/Cas9 deletiert wurde, und zum anderen Melanom WT Zellen in die Schwanzvene von C57BL/6J WT Mäusen injiziert. Das metastasierte Lungengewebe wurde anschließend entnommen und kryokonserviert (siehe Kapitel 2). Außerdem wurde aus Teilen des Lungengewebes mRNA isoliert.

Für die Analyse der Infiltration von Immunzellen in das metastasierte Lungengewebe der Tiere wurden aus dem kryokonservierten Gewebe Schnitte der Lungen generiert und jeweils neutrophile Granulazyten, CD8<sup>+</sup> T-Zellen und Monozyten durch die Färbung spezifischer Oberflächenproteine mittels indirekter IF sichtbar gemacht.

In Ergänzung zu der IF wurden Expressionsanalysen der oben genannten Immunzellenmarker und verschiedener assoziierter Chemokine CXCL9, CXC-Motiv-Chemokinligand 10 (CXCL10), CCL2, Colony stimulating factor 3 (Csf3) mittels qPCR durchgeführt.

# 3.1. EXT-1 knock-out Tumorzellen führen zu einer hohen Metastasierungslast

Um die Auswirkungen einer dysregulierten HS Biosynthese bei Melanom Zellen auf das Metastasierungsverhalten und die Rekrutierung von Immunzellen zu untersuchen, wurden in einer vorangehenden Studie (Wang et al. 2022) genetisch modifizierte Melanom Zellen generiert. Dafür wurden sgRNA mit einem Online-CRISPR-Designtool entworfen und in einem pSpCas9(BB)-2A-Puro-Vektor geklont. Die resultierenden Vektorkonstrukte wurden mittels Lipofectamine 2000 in die Melanomzellen transfiziert. Durch eine Selektion mittels Puromycin konnten stabile EXT-1 KO Zelllinien erzeugt werden, aus denen anschließend Einzelzellklone für die weiteren Versuche ausgewählt wurden.

Die EXT-1 KO und WT Melanom Zellen wurden anschließend, zur Induktion von Lungenmetastasen, i.v. in die Schwanzvene der WT Mäuse injiziert. Dabei wurde das Tierexperiment für eine Versuchsgruppe mit 100 000 Tumorzellen und eine weitere Versuchsgruppe mit 750 000 Tumorzellen durchgeführt. Nach 15 Tagen wurde das metastasierte Lungengewebe entnommen und cryokonserviert. In der vorangehenden Studie konnte bereits durch die Analyse von Biopsien von Melanompatienten und die Analyse von öffentlichen Transkriptom Datensätze bestätigt werden, dass Melanomzellen die weniger HS exprimieren, zur Metastasierung neigen. Anschließend wurden die hier untersuchten Lungenmetastasen schließlich mittels der Image J Software per Particle Analyser analysiert und quantitativ ausgewertet (Wang et al. 2022).

Die Auswertung unserer Versuchsgruppen zeigte im Einklang mit den Transkriptom Datensätzen, dass unabhängig von der Menge der injizierten Tumorzellen, eine deutlich größere Anzahl an Lungenmetastasen in Folge der Injektion von EXT-1 KO Melanomzellen gebildet wurde (**Abb. 8**). Wie in Abb. 8b abgebildet, konnte in der Versuchsgruppe mit 750 000 injizierten Tumorzellen ein signifikanter Unterschied nach der Injektion mit WT oder EXT-1 KO Tumorzellen festgestellt werden. In dieser Versuchsgruppe bildeten die EXT-1 KO Tumorzellen mit blockierter HS Biosynthese durchschnittlich signifikant mehr Metastasen (Durchschnitt=368,0) als die WT Tumorzellen (Durchschnitt=265,1). p=0,0286, WT n=12, EXT-1 n=10. Dieses Ergebnis wird ebenfalls in der Versuchsgruppe mit 100 000 injizierten Tumorzellen tendenziell widergespiegelt

(siehe **Abb.8a**). Zur Verlaufskontrolle und Veranschaulichung des Tierexperiments erfolgte nach der Organentnahme eine fotografische Dokumentation der murinen Lungen, die aufgrund ihrer anatomischen Lage zusammen mit dem Herz entnommen wurden (siehe **Abb. 9**).

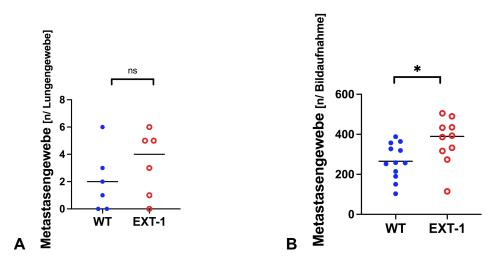


Abbildung 7 Quantifizierung der Lungenmetastasen

Durch die Injektion von B16F10 WT und B16F10 EXT-1 KO Tumorzellen in C57/BL6 WT Mäuse wurde die Bildung von Lungenmetastasen induziert und das murine Lungengewebe anschließend entnommen und kryokonserviert. Die Lungenmetastasen wurden mittels der Image J Software per Particle Analyser analysiert und quantitativ ausgewertet. A Die Versuchsgruppe mit 100 000 injizierten Tumorzellen konnte zeigen, dass Melanom Zellen, die weniger HS exprimieren, zur Metastasierung neigen p=0,3494, WT Durchschnitt=2 n=6, EXT-1 Durchschnitt=3,333 n=6; B In der Versuchsgruppe mit 750 000 injizierten Tumorzellen zeigte sich in Folge einer blockierten HS Biosynthese eine signifikant höhere Metastasierungslast p=0,0286, WT n=12, EXT-1 n=10.

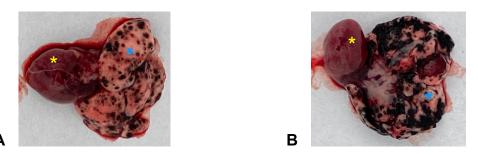


Abbildung 8 Fotografische Darstellung der B16F10 induzierten murinen Lungenmetastasen

In Folge der Injektion von B16F10 WT bzw. EXT-1 KO Zellen (Tag 0) wurde die Bildung von Lungenmetastasen induziert. Am 15. Tag des Tierexperimentes wurden die Lungen für weitere Analysen entnommen. Gezeigt wird das von Metastasen durchsetzte murine Lungengewebe (\*) in unmittelbarer anatomischer Nähe zu dem Herz (\*) A Lungenmetastasen infolge einer B16F10 WT Injektion. B Lungenmetastasen infolge einer B16F10 EXT-1 KO Injektion.

# 3.2. Vergleich des Immunzellinfiltrats in das metastatische Lungengewebe

Für die Analyse der Rolle des HS bei der Infiltration von Immunzellen in das metastasierte Lungengewebe der Tiere wurden Gefrierschnitte der Lungen generiert und jeweils Ly6G<sup>+</sup> Zellen, Ly6C<sup>+</sup> Zellen und CD8<sup>+</sup> Zellen mittels indirekter IF sichtbar gemacht (siehe Kapitel 2). Im Folgenden ist Ly6G (Neutrophile), CD8 (CD8<sup>+</sup> T-Zellen) und Ly6C (Monozyten und Neutrophile) jeweils rot, von Willebrand Faktor (vWF) als Gefäßmarker in grün und DAPI gefärbte Zellkerne in blau dargestellt. Das Fehlen von HS in den EXT-1 KO Mäuselungen wurde durch entsprechende Färbungen bestätigt (siehe **Supp. 11**). Mithilfe eines inversen Fluoreszenzmikroskops wurde anschließend jeder einzelne Bereich eines Präparats abfotografiert und entsprechend der Größe des Präparates ergaben ca. 500 bis 900 einzelne Bildaufnahmen schließlich eine Übersichtsaufnahme der Präparate (siehe Kapitel 2). Die Fläche einer einzelnen Bildaufnahme entsprach 301228,434 μm².

Anschließend wurde die Häufigkeit eingefärbter inflammatorischer Zellen sowohl innerhalb der Lungenmetastasen als auch in dem umliegenden Lungengewebe bestimmt. Dafür wurde die Anzahl der Signale im Gewebe pro Bildaufnahme durch optische Auszählung ermittelt. So wurden für jedes Präparat sowohl 10 Bildaufnahmen im Bereich der Lungenmetastasen als auch 10 Bildaufnahmen im Bereich des umliegenden Lungengewebes ausgewählt. Bei der Auswahl der Bildaufnahmen wurde darauf geachtet, dass die zu analysierenden Immunzellen sowohl fokussiert als auch von den umliegenden Zellen abgrenzbar zu erkennen waren und somit weder aus dem Randbereich des Metastasen- oder Lungengewebes noch aus dem Randbereich eines großen Blutgefäßes stammten.

Zur quantitativen Analyse der Immunzellen im Mikromilieu der murinen Lunge konnte schließlich, mit den jeweils 10 Bildaufnahmen aus dem Bereich der Lungenmetastasen und den aus dem Bereich des umliegenden Lungengewebes, in Relation zu der durchschnittlichen Fläche einer Bildaufnahme eine gewebespezifische Häufigkeit angeben werden.

Zunächst haben wir die Anzahl der rekrutierten Immunzellen innerhalb des Metastasen- und Lungengewebes aller Mäuse beider Versuchsgruppen verglichen. Hier zeigte sich, dass die Anzahl der infiltrierten Ly6G+-(Durchschnitt=10.43), Ly6C+-(Durchschnitt=9.922) und CD8+ Zellen (Durchschnitt=2.870) im Lungengewebe signifikant größer war als innerhalb der Mäuse (Ly6G<sup>+</sup> Lungenmetastasen der Durchschnitt=3.664, Durchschnitt=3.808, CD8+ Durchschnitt=1.409 n=23, p=<0.0001) (**Abb. 10**).

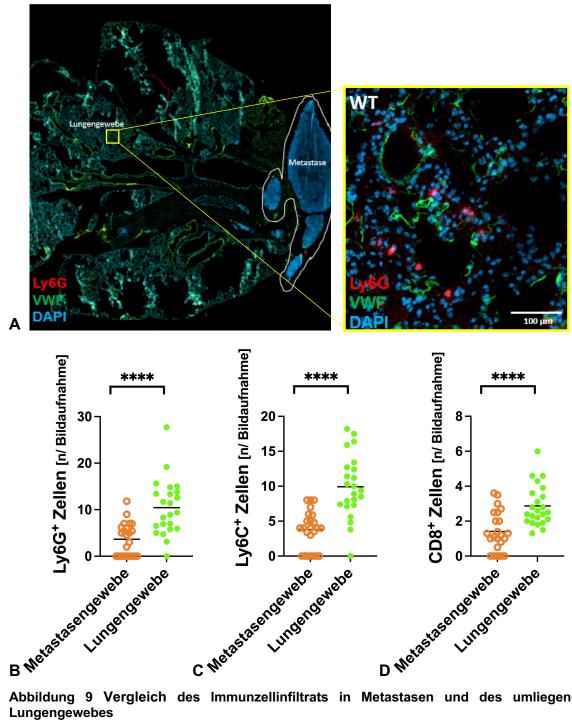


Abbildung 9 Vergleich des Immunzellinfiltrats in Metastasen und des umliegenden Lungengewebes

Zur Analyse der Rolle von HS bei der Infiltration von Immunzellen in das metastasierte Lungengewebe der Mäuse wurden Gewebsschnitte der Lungen generiert und jeweils Ly6G<sup>+</sup>, Ly6C<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>-Zellen durch die Färbung spezifischer Oberflächenproteine mittels indirekter IF sichtbar gemacht. Zur Bestimmung der Häufigkeit der Immunzellen im Gewebe wurden anschließend mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Übersichtsaufnahmen von jedem Präparat erstellt, die sich wiederum aus einer Vielzahl von einzelnen Bildaufnahmen (Fläche=301228,434µm²) für jedes Präparat zusammensetzten. A Abgebildet ist ein beispielhaftes Übersichtsbild, auf dem sowohl Lungen- als auch Metastasengewebe zu sehen ist. In der Nahaufnahme sind infolge der IF sowohl Ly6G<sup>+</sup> Zellen (rot), Zellkerne (blau) und durch den vWF (grün) auch kleine Blutgefäße zu erkennen. B Anhand jeweils 10 einzelner Bildaufnahmen von Lungen- bzw. Metastasengewebe wurde anschließend die gewebsspezifische Häufigkeit der Immunzellen berechnet. Dabei konnte eine signifikant größere Anzahl von B Ly6G<sup>+</sup> Zellen; C Ly6C<sup>+</sup> Zellen und D CD8<sup>+</sup> Zellen im Lungengewebe als innerhalb der Lungenmetastasen festgestellt werden. n=23, p=<0.0001

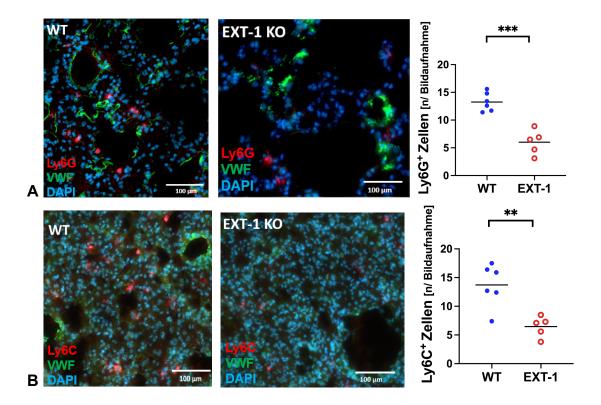
Im Hinblick auf das Ziel der vorliegenden Studie, die Rolle von HS bei der Infiltration von Immunzellen in das metastasierte Lungengewebe der Mäuse zu untersuchen, wurde das Immunzellinfiltrat in dem Lungengewebe der Mäuse für die Tiere mit injizierten B16F10 WT Zellen und für die Tiere mit ausgeschaltetem EXT-1 Gen im Anschluss getrennt voneinander analysiert. Aufgrund der signifikant geringeren Anzahl von Immunzellen innerhalb der Lungenmetastasen im Vergleich zu dem umgebenden Lungengewebe, haben wir uns in dem folgenden Experiment auf die Betrachtung von Immunzellen innerhalb des Lungengewebes konzentriert. Um einen Eindruck von dem gewöhnlichen Immunzellinfiltrat in einer gesunden Lunge zu erhalten, haben wir in 6 cryokonservierten unveränderten murinen Lungen die Anzahl von Ly6G+ und CD8+ Zellen bestimmt. Hier zeigten sich zwar insgesamt wenige Immunzellen, aber signifikant mehr Ly6G+ Zellen (Durchschnitt=3,400) als CD8+ (Durchschnitt= 0,500) Zellen im Lungengewebe der gesunden Mäuse (p=0,0031; n=6) (Abb 11d).

Eine Quantifizierung pro Bildaufnahme ergab in den mit EXT-1 KO Tumorzellen injizierten Tieren beider Versuchsgruppen eine signifikant geringere Anzahl an Immunzellen im Vergleich zu den WT Tieren. Für die Versuchsgruppe mit 750 000 injizierten Tumorzellen wurden in der Auswertung der Ly6G<sup>+</sup> Zellen in Folge der B16F10 WT Injektion durchschnittlich signifikant mehr (Durchschnitt=13,25, n=6) Zellen als nach B16F10 EXT-1 KO Injektion (Durchschnitt=6,020, n=5) gezählt. p=0,0002. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich nach B16F10 WT Injektion

(Durchschnitt=13,72, n=6) und B16F10 EXT-1 KO Injektion (Durchschnitt=6,46, n=5) für die Ly6C<sup>+</sup> Zellen. p=0,0033. Bei der Analyse der CD8<sup>+</sup> Zellen im Lungengewebe wurden im Vergleich zu den vorangehenden Immunzellen insgesamt weniger Zellen im Lungengewebe nachgewiesen, aber auch für die CD8<sup>+</sup> Zellen konnte in Folge der B16F10 WT Injektion (Durchschnitt=2,5 n=6) im Vergleich zu den Tieren nach B16F10 EXT-1 KO Injektion (Durchschnitt=1,74 n=5) eine größere Zellzahl festgestellt werden. p=0,0699 (**Abb. 11**). Die Ergebnisse unserer Versuchsgruppe mit 100 000 injizierten Tumorzellen zeigen ebenfalls eine größere Anzahl an rekrutierten Immunzellen im Lungengewebe der mit WT Tumorzellen injizierten Mäuse. Diese Daten sind im **Supplement 9** und **10** zu finden.

Abschließend wurde das Immunzellinfiltrat im Lungengewebe der gesunden, der mit WT und der mit EXT-1 KO Tumorzellen injizierten Mäuse verglichen.

Dabei konnten wir feststellen, dass sich die drei Versuchsgruppen deutlich voneinander unterscheiden. Auffällig war, dass die B16F10 WT Versuchsgruppe eine signifikant größere Anzahl sowohl an rekrutierten Ly6G<sup>+</sup> Zellen (gesund Durchschnitt=3,4, n=6; WT Durchschnitt=13,23, n=12; p=0,0001) als auch an CD8<sup>+</sup> T-Zellen (gesund Durchschnitt=0,5, n=6; WT Durchschnitt=3,22, n=12; p=0,0006) zeigte.



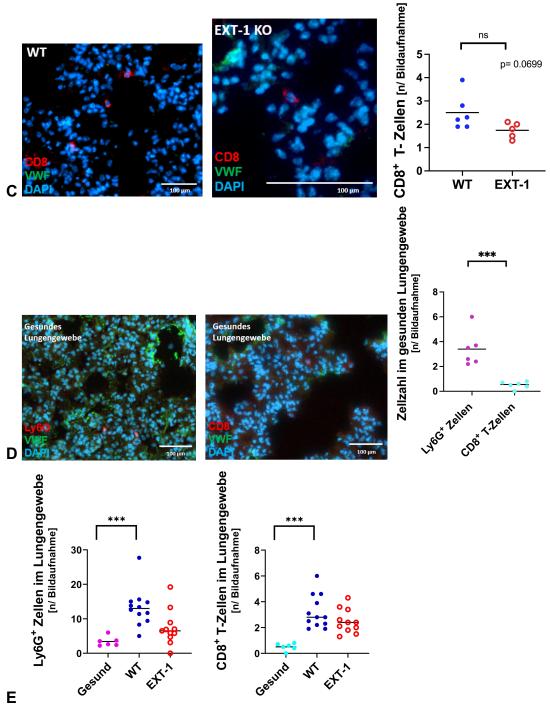


Abbildung 10 Die Anzahl der Immunzellen in dem metastasierten Lungengewebe

Gezeigt werden mit dem Fluoreszenzmikroskop hergestellt Nahaufnahmen von den immunfluoreszent gefärbten Gewebeschnitten der Mäuse. Im Folgenden ist Ly6G (Neutrophile), CD8 (CD8+ T-Zellen) und Ly6C (Monozyten und Neutrophile) jeweils rot, FITC (vWF) grün und DAPI (Zellkerne) blau dargestellt. Um die Auswirkung einer blockierten HS Biosynthese bei malignem Melanom in Bezug auf die Infiltration von Immunzellen in das metastasierte Lungengewebe zu untersuchen, wurde das Immunzellinfiltrat in dem Lungengewebe von Mäusen mit injizierten B16F10 WT Zellen und B16F10 EXT-1 KO Zellen analysiert. Zur quantitativen Auswertung der Immunzellen im Mikromilieu der Lunge wurde jeweils durch optische Auszählung die Anzahl der gezählten Immunzellen, anhand der mit dem Immunfluoreszenzmikroskop aufgenommenen Bilder, in Relation

zur untersuchten Fläche des Lungengewebes (Fläche= 301228,434μm²) ausgewertet. Dabei konnten in der Versuchsgruppe mit 750 000 injizierten Tumorzellen, in Folge einer B16F10 WT Injektion signifikant mehr **A** Ly6G<sup>+</sup> Zellen (Durchschnitt= 13,25 p= 0,0002) **B** Ly6C<sup>+</sup> Zellen (Durchschnitt= 13,72 p=0,0033) und **C** CD8<sup>+</sup> Zellen (Durchschnitt=2,5 p= 0,0699) im Lungengewebe der Mäuse gezählt werden, n=6. **D** Zum Vergleich mit dem Immunzellinfiltrat in einer gesunden Lunge, wurde das kryokonservierte Lungengewebe von 6 Mäusen im Hinblick auf Ly6G<sup>+</sup> (Durchschnitt= 3,400) und CD8<sup>+</sup> Zellen (Durchschnitt=0,500) untersucht, wobei signifikant mehr Ly6G<sup>+</sup> Zellen gezählt wurden(p=0,0031; n=6). **E** Im Vergleich des Immunzellinfiltrates im Lungengewebe der gesunden, der mit WT und der mit EXT-1 KO Tumorzellen injizierten Mäuse konnten wir feststellen, dass sich die drei Gruppen in der Anzahl an sowohl Ly6G<sup>+</sup> Zellen (p=0,0001; n=29) als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen (p=0,0006; n=29) signifikant unterscheiden.

#### 3.3. Ergebnisse der qPCR

Bei den oben beschriebenen Analysen wurde die Auswirkung einer blockierten HS Biosynthese, mittels IF der Gefrierschnitte der Mäuselungen, bereits auf Proteinebene untersucht. Um ebenfalls die Genexpression spezifischer Immunzellen und Cytokine untersuchen zu können, wurde RNA aus dem Lungengewebe der Mäuse extrahiert und bis zur weiteren Verwendung kryokonserviert.

Es sollte im Anschluss untersucht werden, ob eine Dysregulation in der HS Biosynthese mit einer veränderten Genexpression von Ly6G<sup>+</sup> (Neutrophile), Ly6C<sup>+</sup> (Neutrophile und Monozyten) oder CD8<sup>+</sup> Zellen (CD8<sup>+</sup> T-Zellen) einhergeht. Da die Rekrutierung von Immunzellen in das metastasierte Lungengewebe wahrscheinlich über die Wechselwirkung zwischen HS und Cytokinen gesteuert wird (siehe Kapitel 1), wurde daraufhin ebenfalls die Genexpression spezifischer Chemokine untersucht. So wurde die Genexpression von den Chemokinen CXCL9, CXCL10, CCL2 und Csf3, die für eine Rekrutierung von Leukozyten relevant sind, in Folge der Injektion von B16F10 WT und EXT-1 KO Zellen untersucht.

Um das Transkriptionsprofil der verschiedenen Gene zu untersuchen, wurde die zuvor kryokonservierte RNA isoliert, in eine stabilere cDNA umgeschrieben und anschließend mittels qPCR amplifiziert und quantifiziert. Die Spezifität der PCR Reaktion wurde mittels Gelelektrophorese der amplifizierten PCR Produkte kontrolliert (Supp. 5).

Die mithilfe der qPCR untersuchten mRNAs von Ly6G (Durchschnitt=0,0002611 vs. 0,0003338; p=0,7566), Ly6C (Durchschnitt=0,8936 vs. 1,074; p=0,8568) und

CD8 (Durchschnitt=0,009331 vs. 0,01324; p=0,7180) zeigen, dass sich die Expression der untersuchten Gene in Abhängigkeit von injizierten B16F10 WT vs. B16F10 EXT-1 KO Zellen zwar nicht signifikant unterscheidet, aber tendenzielle die Ergebnisse unserer IF wiederspiegelt (**Abb. 12**).

Im Zusammenhang mit der Expressionsanalyse der oben genannten Immunzellen haben wir anschließend die Genexpression der Cytokine, die für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und T-Zellen relevant sind, mittels qPCR analysiert. Die qPCR der Cytokine CXCL9 (Durchschnitt=0,009366 vs. 0,004895; p=0,1949), CXCL10 (Durchschnitt=0,04534 vs. 0,02691; p=0,3137), Csf3 (Durchschnitt=3,648e-006 vs. 3,207e-006; p=0,8226) und CCL2 (Durchschnitt=0,0008226 vs. 0,0003261; p=0.2081) zeigte ebenfalls eine tendenziell erhöhte Expression der untersuchten Gene nach Injektion von B16F10 WT Zellen, im Gegensatz zu den Zellen mit blockierter HS Synthese (EXT-1 KO) (**Abb. 13**).

Im Anschluss wurde untersucht, ob zwischen den Ergebnissen der IF auf Proteinebene und den Ergebnissen der qPCR auf mRNA Ebene eine Korrelation besteht, wobei wir einen positiven Trend beobachten konnten (**Supp. 6**).

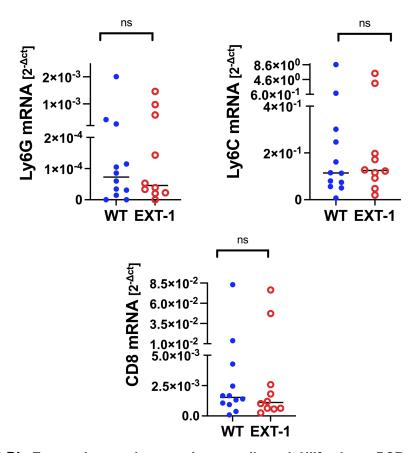


Abbildung 11 Die Expressionsanalyse von Immunzellen mit Hilfe einer qPCR

Dargestellt ist die Analyse der Genexpression verschiedener Immunzellen bei blockierter HS Biosynthese. Es wurde die RNA aus dem metastasierten Lungengewebe von Mäusen extrahiert, die mit B16f10 WT oder EXT-1 KO Zellen injiziert wurden. Anschließend wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die untersuchten Genabschnitte mittels qPCR amplifiziert und semiquantifiziert. Die Ergebnisse der qPCR zeigen zwar keinen signifikanten Unterschied in dem Transkriptionsprofil zwischen den B16F10 Zellen, sie stimmen jedoch trotzdem tendenziell mit den Ergebnissen der IF überein. Ly6G+ (p=0,7566), die Ly6C+ (p=0,8936), CD8+ Zellen (p=0,7180), WT n=12, EXT-1 n=10

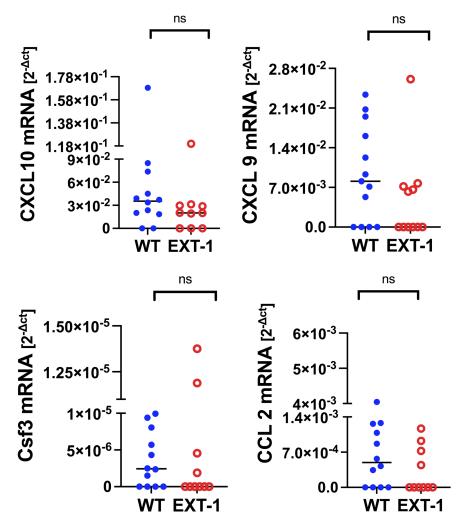


Abbildung 12 Die Expressionsanalyse von Cytokinen mit Hilfe einer qPCR

Um die Auswirkung einer blockierten HS Biosynthese auf die Genexpression verschiedener Cytokine zu untersuchen, wurde die RNA aus dem metastasierten Lungengewebe von Mäusen extrahiert, die mit B16f10 WT oder EXT-1 KO Zellen injiziert wurden. Anschließend wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die untersuchten Genabschnitte mittels qPCR amplifiziert und semiquantifiziert. Die Ergebnisse der qPCR zeigen zwar keinen signifikanten Unterschied in der Genexpression zwischen den B16F10 Zellen, sie stimmen jedoch trotzdem tendenziell mit den Ergebnissen der IF und der qPCR der Immunzellen überein. Es konnte weder für die Cytokine CXCL9(p=0,1949), CXCL10 (p=0,3137), Csf3 (p=0,8228) und noch für CCL2 (p=0,2081) ein signifikanter Unterschied in der Genexpression festgestellt werden. WT n=12, EXT-1 n=10

# 3.4. Analyse des Zusammenhangs zwischen der Anzahl der Immunzellen und der Anzahl von Metastasen

In früheren Arbeiten wurde bereits die tragende Rolle von HS bei der Interaktion mit Makromolekülen und Signalmolekülen wie z.B. Wachstumsfaktoren, Cytokinen, Adhäsionsmolekülen und Proteasen beschrieben, weshalb HS sowohl für die Zellmigration, die Angiogenese als auch für Chemotaxis von Immunzellen und wahrscheinlich auch für die Metastasierung relevant ist. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Unterstützung der Ergebnisse aus einer vorangehenden Studie (Wang et al. 2022) gezeigt, dass Tumorzellen mit einer blockierten HS Biosynthese zur Bildung von Metastasen neigen. Des Weiteren konnten wir in unserer Arbeit nach der Auswertung der Ergebnisse aus unserer IF und qPCR zeigen, dass im Falle einer blockierten HS Synthese die Rekrutierung von Immunzellen ins Gewebe und die Genexpression der Immunzellen deutlich geringer ausfällt als bei Mäusen nach der Injektion von WT Melanomzellen.

Im Anschluss wurde für alle Tiere, denen 750 000 Melanomzellen injiziert wurden, untersucht ob ein Zusammenhang zwischen der Menge der ins Lungengewebe infiltrierten Immunzellen und der Anzahl an Lungenmetastasen besteht. Besonders heraus stach eine signifikante inverse Korrelation der Anzahl von Ly6G<sup>+</sup> (Steigung=-0,03231; R<sup>2</sup>=0,5980; p=0,0052) und Ly6C<sup>+</sup> (Steigung=-0,02913; R<sup>2</sup>=0,3798; p=0,0435) Zellen mit der Anzahl von Metastasen bei den Mäuse (**Abb. 14**).

Dabei wurde ebenfalls die Tendenz einer inversen Korrelation sowohl für die Anzahl CD8<sup>+</sup> (Steigung=-0,002127; an Zellen  $R^2=0.09275$ : p=0.3625) und Lungenmetastasen als auch für die jeweilige Genexpression der Immunzellen und Lungenmetastasen gezeigt. Ly6G<sup>+</sup> (Steigung=-2,811e-007;  $R^2=0.09275$ : p=0,3625); Ly6C<sup>+</sup> (Steigung=-4,515e-005; R<sup>2</sup>=0,01320; p=0,7366); CD8<sup>+</sup> Zellen (Steigung=-3,087e-007; R<sup>2</sup>=0,003924; p=0,8548) (siehe **Abb. 14**).

Auch bei separater Analyse der Tiere mit intakter und blockierter HS Synthese, konnte der Trend einer inversen Korrelation auf Protein bzw. mRNA Level von Ly6G<sup>+</sup>, Ly6C<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit der Anzahl der Metastasen beobachtet werden (**Supp. 7, 8**).

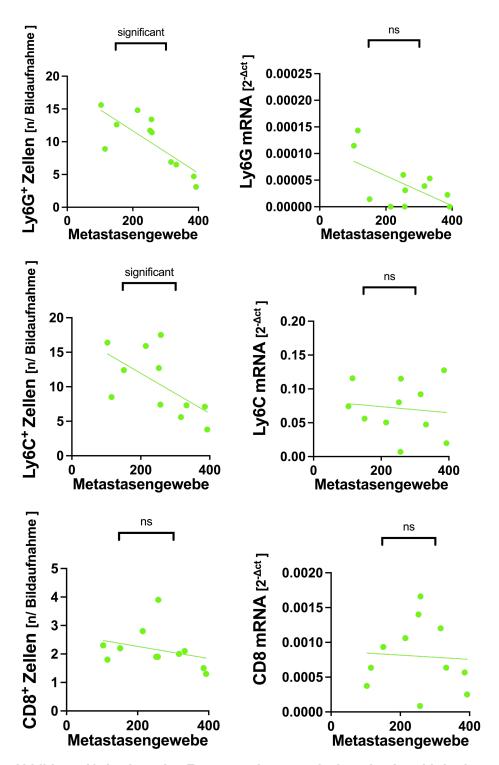


Abbildung 13 Analyse des Zusammenhangs zwischen der Anzahl der Immunzellen und der Anzahl der Metastasen

Um zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen den in das Lungengewebe infiltrierenden Immunzellen und der Anzahl von Lungenmetastasen besteht, wurden alle Tiere, denen 750 000 Melanomzellen injiziert wurden, dementsprechend beurteilt. Dabei zeigte sich eine signifikante inverse Korrelation der Anzahl von Ly6G<sup>+</sup> (p=0,0052) und Ly6C<sup>+</sup> (p=0,0435) Zellen mit der Anzahl der Metastasen. Es konnte ebenfalls für die Anzahl an CD8<sup>+</sup> Zellen (p=0,03625) und Lungenmetastasen, und auch für die jeweilige Genexpression der Immunzellen und

Lungenmetastasen (Ly6G<sup>+</sup> p=0,0532; Ly6C<sup>+</sup> p=0,7366; CD8<sup>+</sup> Zellen p=0,8548) die Tendenz einer inversen Korrelation bestätigt werden. n=11

#### 4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war zu bestätigen, ob das von Melanomzellen produzierte HS die Rekrutierung von Immunzellen in den Tumor bzw. das peritumorale Gewebe koordiniert. Um die Rolle von HS bei der Immunzellinfiltration in das Melanoma metastasierten Lungengewebes zu untersuchen, wurde das für die HS Biosynthese essenzielle Enzym EXT-1 ausgeschaltet.

Die Synthese von HS besteht aus zahlreichen aufeinander folgenden Reaktionen, die durch einen Komplex verschiedener Enzyme bzw. Enzym Isoformen katalysiert werden. Wie schon in vorangehender Literatur beschrieben, ist das GAG HS eines der am stärksten negativ geladenen Biopolymere, das auf der Oberfläche von Zellen oder in der Matrix Cytokine binden und immobilisieren kann (Fang et al. 2016, Vallet et al. 2021). Indem HS die Akkumulation von Cytokinen in hohen Konzentrationen an der entsprechenden Stelle fördert und einen Konzentrationsgradienten von Cytokinen erschafft, ermöglicht es ein Aufeinandertreffen mit ihren Zielzellen und verstärkt so deren Wirkung (Tanaka et al. 1998). So wird die Rekrutierung von Immunzellen in das metastasierte Lungengewebe wahrscheinlich über die Wechselwirkung zwischen HS und Cytokinen gesteuert.

Wie die Ergebnisse unserer IF zeigen, führt das Ausschalten des für die Biosynthese von HS essenziellen Enzyms EXT-1 via CRISPR/Cas9 zum Fehlen von HS im metastatischen Lungengewebe (**Supp. 11**) und einer signifikant geringeren Infiltration von Ly6G<sup>+</sup>, Ly6C<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen in das metastasierte Lungengewebe (**Abb.11**).

Am eindrucksvollsten zeigte sich der Unterschied zwischen den verwendeten B16F10 WT und B16F10 EXT-1 KO Zellen in der IF bei den Ly6G<sup>+</sup> Zellen. Ein ähnliches Bild war auch für die Ly6C<sup>+</sup> Zellen zu sehen. In der IF wurden insgesamt deutlich weniger CD8<sup>+</sup> Zellen detektiert. Zudem konnte gezeigt werden, dass sich das Immunzellinfiltrat im Lungengewebe gesunder Mäuse vom Immunzellinfiltrat im metastatischen Lungengewebe signifikant unterscheidet.

Im Anschluss wurde untersucht, ob eine Dysregulation in der HS Biosynthese mit einer veränderten Genexpression von Ly6G<sup>+</sup>, Ly6C<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> Zellen einhergeht. Da die Rekrutierung von Immunzellen in das metastasierte Lungengewebe wahrscheinlich über die Wechselwirkung zwischen HS und Cytokinen gesteuert wird, wurde im Anschluss ebenfalls die Genexpression spezifischer Chemokine untersucht. So wurde die Genexpression der Chemokine CXCL9, CXCL10, CCL2 und Csf3, die für eine Rekrutierung von Leukozyten relevant sind, in Folge der Injektion von B16F10 WT und EXT-1 KO Zellen untersucht. Auch wenn die Ergebnisse der qPCR weder für Ly6G<sup>+</sup>, Ly6C<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> Zellen noch für die Cytokine signifikant waren, konnte im Einklang mit den Ergebnissen der IF tendenziell eine höhere Genexpression Immunzellmarker und Chemokine in Folge einer Injektion von Melanomzellen mit intakter HS Biosynthese gezeigt werden (Abb. 12, 13).

Es ist möglich Subpopulationen von Immunzellen anhand von mehr oder weniger zellspezifischen Markern bzw. Antikörpern zu identifizieren und zu analysieren.

Der CD8 Antikörper wird ausschließlich auf der Oberfläche von zytotoxischen/ Suppressor T-Zellen exprimiert (Laurence Piriou-Guzylack 2008).

Es ist bekannt, dass der Antikörper Ly6C sowohl auf der Oberfläche von Makrophagen, Monozyten, Granulozyten, und verschiedenen Endothelzellen als auch auf Subpopulationen von B- und T-Lymphozyten exprimiert wird. Der Antikörper Ly6G wird überwiegend auf der Oberfläche von Neutrophilen exprimiert (Jean M Daley 2008). Die sehr ähnlichen Ergebnisse aus IF und qPCR der Ly6G<sup>+</sup> und Ly6C<sup>+</sup> Zellen legen nahe, dass das untersuchte Immunzellinfiltrat größtenteils aus Neutrophilen nicht aber aus Makrophagen oder Monozyten besteht.

Dies passt auch zu früheren Literaturen, nach denen Ly6G<sup>+</sup> Neutrophile der Hauptbestandteil des Immunzelleinfiltrats sind, das sich in den Lungen von Tumor tragenden Mäusen ansammelt, bevor Tumorzellen das Gewebe infiltrieren und ihre Anzahl während der Metastasierung weiter ansteigt (Donskov 2013, Doornebal et al. 2015, Fridlender et al. 2009). In vorangehenden

Studien wurde die Beteiligung der Neutrophilen im Tumorgeschehen bereits kontrovers analysiert, wobei der protumoröse Aspekt im Vordergrund stand. Neutrophile werden sowohl als Hauptbestandteil als auch als Antrieb der Initiation von Metastasen innerhalb der (prä-)metastatischen Mikroumgebung in entfernten Organen beschrieben. Sie können durch Produktion von Faktoren, die Tumorwachstum und -invasion, Angiogenese und Metastasenbildung fördern, protumorgen agieren aber auch immunosupressive Effekte direkt induzieren (Hans-Heinrich Oberg 2019). Ein Beitrag anderer Zellen, wie bspw. Monozyten, zu einem günstigen prämetastatischen Milieu wird dabei nicht ausgeschlossen (Elisa Peranzoni 2018, Hiratsuka et al. 2006). Im Gegensatz zu der vermeintlich tumor- und metastasierungsfördernden Wirkung von Neutrophilen, zeigen neue Arbeiten eine antimetastasierende Wirkung von Neutrophilen und NETs (Casanova-Acebes et al. 2018, Schedel et al. 2020). Beispielsweise erwies sich das Infiltrationsverhalten von Neutrophilen und B16F1 Zellen in das Lungengewebe im Tagesverlauf als konträr und zeigt somit eine mögliche antimetastatische Wirkung der Neutrophilen (Casanova-Acebes et al. 2018). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass NETs die Migration von Melanomzellen in vitro hemmen und einen zytotoxischen Effekt haben (Blenman et al. 2019, Schedel et al. 2020). Zudem gibt es Hinweise, dass die Menge an intratumoralen NETs nicht mit der Tumorprogression bei malignem Melanom korreliert (Schedel et al. 2020). Ein antitumoröser Effekt durch NETs konnte bspw. ebenfalls für Plattenepithelkarzinome im Kopf- und Halsbereich beobachtet werden (Millrud et al. 2017).

Unsere Daten, die in **Abbildung 8** und **11** gezeigt werden, stimmen mit vorheriger Literatur überein, die die antitumorgenen Eigenschaften von Neutrophilen hervorhebt. Wie zuvor beschrieben wird die Infiltration von Immunzellen wie Neutrophilen wahrscheinlich maßgeblich über das GAG HS gesteuert. Wir konnten mit unseren Versuchsgruppen zeigen, dass in den Mäusen, die B16F10 WT Zellen injiziert bekommen hatten und die ein deutliches Neutrophileninfiltrat in den Lungen zeigten, im Vergleich zu den Mäusen mit blockierter HS Synthese deutlich weniger Metastasen auffindbar waren.

Diese Ergebnisse sind im Einklang mit einer aktuellen Studie, in der durch die Analyse von Biopsien von Melanompatienten und der Analyse von öffentlichen Transkriptom Datensätzen bestätigt werden konnte, dass Melanomzellen, die weniger HS exprimieren, zur Metastasierung neigen (Wang et al. 2022).

Dass für die EXT-1 Gruppe mit signifikant geringerem Immunzellinfiltrat eine insgesamt höhere Metastasierungslast detektiert wurde, könnte zusätzlich darauf zurückzuführen sein, dass auch andere Faktoren zur Bildung von Metastasen beitragen könnten, wie zum Beispiel das lokale Tumormikromilieu oder die Stromasteifigkeit sowie die Produktion von Faktoren, die die Rekrutierung immunsuppressiver Subtypen begünstigen (Li et al. 2018, Mariathasan et al. 2018, Nywening et al. 2018).

Bei den von uns verwendeten Methoden, der IF und der gPCR, konnten wir feststellen, dass die Methoden nicht signifikant miteinander korrelieren. Angesichts der kurzen Lebensdauer neutrophiler Granulozyten von weniger als 24 Stunden (Bonilla et al. 2020, Kasari et al. 2014) wäre es möglich, dass die in der IF auf Proteinebene nachgewiesenen Ly6G+ Zellen bereits teilweise ein herunterreguliertes Transkriptionsprofil aufweisen oder einen beginnenden programmierten Zelltod, z.B. im Rahmen der NETose, durchlaufen. Möglicherweise korreliert aus diesem Grund die mit Hilfe der qPCR ermittelte Expressionsrate nicht signifikant mit der Ly6G<sup>+</sup> Zellzahl aus der IF. Somit würden beide Methoden eventuell Zellen in unterschiedlichen Zellstadien nachweisen. Nach Tumorantigen-Stimulation durchlaufen naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine massive klonale Expansion. Dies geschieht um eine große Anzahl von Teffektor -Zellen zu erzeugen, die in der Lage sind Zellen, die das Zielantigen tragen, zu eliminieren. Am Ende der primären Reaktion durchläuft die Mehrheit der CD8<sup>+</sup> T-Zellen einen programmierten Zelltod. Nur ein kleiner Bruchteil der aktivierten Zellen bleibt langfristig bestehen und baut eine Gedächtnis-T-Zellpopulation auf (Harty and Badovinac 2008). Dies stellt eine mögliche Erklärung dar, weshalb insgesamt wenige CD8<sup>+</sup> Zellen in der IF gezählt wurden und die Ergebnisse aus der IF in der darauffolgenden qPCR nicht in dem Ausmaß widergespiegelt wurden. Die IF erkennt CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf Proteinebene und somit auch Zellen, die bereit für den Zelltod sind. Es kann jedoch möglicherweise nur die kleine verbleibende Fraktion von Gedächtnis-T-Zellen mit aktiver Transkription in der qPCR nachgewiesen werden.

Außerdem legen frühere Arbeiten nahe, dass die Bildung von NETs im Kreislauf metastasierende Tumorzellen vor immunzellvermittelter Zytotoxizität schützen kann (DuPre and Hunter 2007, Kowanetz et al. 2010, Schmielau et al. 2001). Die Dichte der CD8+ T-Lymphozyten korreliert bspw. invers mit dem NET-Bereich bei Melanoma. Dies deutet darauf hin, dass NETs die CD8+-vermittelte Antitumorimmunität beeinträchtigen können (Carlos E de Andrea 2021, de Andrea et al. 2021). NETs könnten somit eine weitere Erklärung dafür bieten, dass die Zellzahl von CD8+ T-Zellen in unserer IF im Verhältnis zu der Zellzahl für Neutrophile relativ gering ist.

In aktuellen Arbeiten wird zunehmend eine antitumoröse Rolle von NETs bei malignem Melanom beschrieben (Blenman et al. 2019, Schedel et al. 2020). Im Zusammenhang mit unseren Ergebnissen aus Abbildung 14, die eine signifikant inverse Korrelation der Anzahl von Ly6G+ bzw. Ly6C+ Zellen mit der Metastasierungslast in den Mäuselungen zeigen, wäre es für nachfolgende Arbeiten interessant, eine Netose IF z.B. mit dem Histon H3 Primär AK durchzuführen. Wie in früherer Literatur schon beschrieben wurde, scheint ein Zusammenhang zwischen der Ansammlung von Neutrophilen, NETs und Lungenmetastasen bei Melanoma zu bestehen (Casanova-Acebes et al. 2018, Schedel et al. 2020). Sollte eine große Menge an NETs auf Proteinebene in der IF nachzuweisen sein, würde dies eine Erklärung sowohl für unsere Ergebnisse aus der IF und aus der qPCR als auch für die inverse Korrelation der Neutrophilen mit der Anzahl von Metastasen darstellen. Der Nachweis einer erhöhten Neutrophilenaktivität in Form von Netose würde die in vorangehenden Studien beschriebene anti-metastasierende Wirkung von Neutrophilen und NETs unterstützen (Casanova-Acebes et al. 2018, Schedel et al. 2020). Um die Korrelation zwischen der Anzahl bzw. der Genexpression von Immunzellen und der Metastasierungslast weiterführend zu untersuchen, wäre für nachfolgende Studien ein größeres Studienkollektiv von Interesse.

Immunzellen, wie Neutrophile und CD8<sup>+</sup>T-Zellen, können durch die Interaktion mit Cytokinen an spezifische Stellen im Gewebe rekrutiert werden und für die Verteilung von Cytokinen im Gewebe ist zu einem großen Teil wahrscheinlich HS verantwortlich. Aus diesem Grund haben wir mittels qPCR zusätzlich zu den Immunzellmarkern die Genexpression einiger Chemokine untersucht. In

vorangehender Literatur wurde gezeigt, dass Chemokine von mehreren Zelltypen sezerniert werden, darunter Monozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, entzündliche Makrophagen, dendritische Zellen und Tumorzellen selbst (de Mingo Pulido et al. 2018, Tokunaga et al. 2018). Dies bietet eine mögliche Erklärung dafür, warum sich die Genexpression der von uns untersuchten Cytokine zwischen den Mäusen mit injizierten WT- oder EXT-1 B16F10 Zellen nicht signifikant unterscheidet.

Laut früherer Literatur sind EXT-1/ EXT-2 Heterodimer für eine effiziente HS-Kettenelongation erforderlich (Fang et al. 2016). Aufgrund der ähnlichen Expressionsrate der Immunzellen und Cytokine im tumorassoziierten Gewebe von Mäuse mit B16F10 WT aber auch mit B16F10 EXT-1 Melanomzellen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass zusätzliche HS-Glykosyltransferasen existieren.

PCR- generierte Daten sind sehr genau für stark regulierte Gene (Rajeevan et al. 2001). Aufgrund der ähnlichen Ergebnisse beider Versuchsgruppen scheint das Verfahren der qPCR aber in diesem Fall nicht sensitiv genug zu sein, um einen signifikanten Unterschied zwischen WT- und EXT-1 Tumorzellen aufzudecken. Außerdem legt die qPCR somit zugleich unsere Hypothese nahe, dass die Rekrutierung von Immunzellen überwiegend durch die Bindung von Cytokinen an HS und aufgrund des hohen elektrostatischen Potentials geschieht und nicht nur durch eine erhöhte Genexpression.

Die Ergebnisse unserer Arbeit unterstützen somit unsere Hypothese. In früherer Literatur wurde schon beschrieben wie die Verfügbarkeit von Chemokinen durch ihre Bindungsaffinität zu GAGs reguliert wird (Migliorini et al. 2015). Das hohe elektrostatische Potential lässt sich durch die Cardin und Weintraub Sequenz erklären, wobei die Konsensussequenz in HS und verschiedenen Cytokinen gefunden werden kann (Vallet et al. 2021). Im Hinblick auf unsere Ergebnisse aus der IF und qPCR konnten wir somit zeigen, wie Gewebe mit einer reduzierten Menge an HS vor einer Bindung von Cytokinen und einer damit verbundenen Rekrutierung von Immunzellen geschützt ist. HS kann als eines der am stärksten negativ geladenen Biopolymere über ein elektrostatisches Potential zahlreiche Bindungsproteine binden. Es kann jedoch keinen ausschlaggebenden Einfluss auf die Expressionsrate seines Bindungsproteins ausüben deshalb unterscheidet sich das und

Expressionsprofil der Mäuse mit intakter HS Biosynthese nicht signifikant von dem der Mäuse mit intakter HS Biosynthese.

Für nachfolgende Studien wäre es interessant, die von uns analysierten Cytokine CXCL9, CXCL10, CCL2 und Csf3 ebenfalls auf Proteinebene zu untersuchen. Es könnte so untersucht werden, ob die Ergebnisse einer IF für diese Cytokine einen Gradienten bzw. eine Verteilung aufweisen, die im Hinblick auf die korrespondierenden Immunzellen für beide Versuchsgruppen entsprechend übereinstimmen.

In vorangehenden Studien wurden verschiedene Immunzellsubtypen untersucht und es konnte unter anderem gezeigt werden, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine Rolle bei der Behandlung des Melanoms spielen (Koliopanos et al. 2001, Mambetsariev et al. 2010).

Tumore, die stark von CD8<sup>+</sup> T-Zellen infiltriert sind und als entzündet bzw. klinisch als "heiß" bezeichnet werden, sprechen am günstigsten auf ICB an, im Gegensatz zu Tumoren mit geringem oder ohne Immunzellinfiltrat, welche klinisch als "kalt" bezeichnet werden.

Eine Limitation der ICB ist, dass sie hauptsächlich durch die Reaktivierung antigenspezifischer T-Zellen, die bereits in dem Tumormikromilieu präsent sind, aktiv ist (Spranger and Gajewski 2018).

Unsere Ergebnisse konnten zeigen, dass das Ausschalten von EXT-1 "heißes" Melanom metastasiertes Lungengewebe in "kaltes" mit geringer T-Zell-Infiltration verwandelt. Für nachfolgende Studien wäre es interessant zu prüfen, ob oder wie sich infolge einer ICB das Outcome zwischen den von uns untersuchten Versuchsgruppen unterscheidet. Im Falle eines eindeutigen Ergebnisses, hätte der Nachweis einer blockierten HS Biosynthese mittels Exom Sequenzierung das Potential, die klinische Prognose vorherzusagen.

Die Umwandlung von kalten in heiße Tumoren ist derzeit eines der Hauptziele zur Verbesserung der Behandlung von soliden Tumoren mit ICB.

Wir konnten mit der vorliegenden Studie unsere Hypopthese bestätigen, dass HS die Anzahl an rekrutierten Immunzellen in das melanommetastasierte Lungengewebe kontrolliert. Somit lässt sich schlussfolgern, dass die Menge an

HS im Tumor bzw. peritumoralen Gewebe das Ansprechen auf eine ICB determiniert.

Therapien, die darauf abzielen die HSPG/Cytokin-Interaktionen und Signalnetzwege zu modellieren, stellen potenzielle Ansätze für therapeutische Interventionen dar, die darauf abzielen unerwünschte oder ausbleibende Cytokinwirkungen bei verschiedenen Krankheitsprozessen vorzubeugen (Tanaka et al. 1998).

Es können posttranslational strukturelle Veränderungen von HS durch die Wirkung von Sulfotransferasen, Sulfatasen und Heparanasen erfolgen. Ebenso kann der Proteinkern von HSPG durch Matrix- Metalloproteasen und andere proteolytische Enzyme, wie bspw. Plasminogen modifiziert werden und so HSPG-abhängige Signalwege regulieren (Romero-Garcia et al. 2016, Whitelock et al. 1996).

In einer Studie von Liu et al. wurde demonstriert, wie die Spezifität der Enzyme darüber entscheidet, ob sich Tumore zurückbilden oder fortschreiten, je nach ihrer Interaktion mit HS (Liu et al. 2002). So konnte in einer vorangehenden Studie bspw. gezeigt werden, dass Heparanase sowohl maßgeblich an der Tumorprogression beim Myelom beteiligt ist als auch die Induktion von Heparanase mit einem reduzierten Spiegel von CXCL10 assoziiert und somit die tumorsuppressive und antiangiogenetische Wirkung von CXCL10 abgeschwächt ist (Barash et al. 2014).

Die Reparatur mutierter Enzyme innerhalb der HS Biosynthese könnte eine potenzielle Therapieoption darstellen.

Als neuer Therapieansatz könnte bspw. die Kombination von HS-Mimetika oder Heparanase-Inhibitoren mit einer ICB weiterverfolgt werden, da so mit einer größeren Menge an HS, im Tumor bzw. peritumoralen Gewebe, eine größere Anzahl an Immunzellen wie z.B. CD8<sup>+</sup> T-Zellen rekrutiert werden könnte. Dies würde eine bessere Ansprechrate auf die ICB bedeuten könnte.

Die HS-Mimetika, wie bspw. Muparfostat (PI-88) (Basche et al. 2006), Neuparanib (N-402) (O'Reilly et al. 2017) und Pixatimod (PG545) (Dredge et al. 2018), werden klinisch in der Therapie bei metastasiertem Melanom oder Pancreascarcinoma untersucht. In einer vorangehenden Studie konnte bspw. gezeigt werden, dass Pixatimod, das unter anderem Heparanase inhibiert, in

Kombination mit einer anti-PD1 Therapie sowohl zu einer Modulation angeborener Immunzellen als auch einer verstärkten T-Zell Infiltration führt und die Wirksamkeit der PD1-Inhibition in schwach immunogenen Tumormodellen verbessert (Hammond et al. 2018).

HS-Mimetika und Polysaccharid-Derivate werden jedoch durch ihr relativ hohes Molekulargewicht und eine eher heterogene Struktur eingeschränkt. Vorangehende Studien haben gezeigt, dass dies für niedermolekulare Inhibitoren der Heparanase, wie beispielsweise Benzimidazol-Benzoxazolderivate, nicht gilt (Courtney et al. 2005, Xu et al. 2006). Einen vielversprechenden Fortschritt bei diesen Derivaten bietet die Synthese symmetrischer Analoga. Diese symmetrischen Analoga haben sowohl die Fähigkeit Heparanase zu hemmen als auch mit HS interagierende Chemokine und Wachstumsfaktoren, die die Angiogenese modulieren, zu binden und zu sequestieren (Messore et al. 2018), was jedoch fortführender Forschung bedarf.

Zusammengefasst demonstriert unsere Studie, dass Melanomzellen mit einer blockierten HS Biosynthese zu der Bildung von Lungenmetastasen neigen. Wir konnten zeigen, dass der negativ geladene Biopolymer HS für die Infiltration und relativ erhöhte Genexpression von Neutrophilen und CD8+ T-Zellen in das metastasierte Lungengewege von Mäusen verantwortlich ist. Außerdem unterstützt unsere Studie die antimetastatische Wirkung von Neutrophilen im metastatischen Lungengewebe bei Malignem Melanom. Die Ergebnisse unserer Studie zeigen somit die Relevanz und den Bedarf fortführender Entwicklung therapeutischer Interventionen, wie HS-Mimetika und Polysaccharid-Derivaten, bei metastasiertem Melanom.

## 5. Zusammenfassung

Das maligne Melanom ist ein hochgradig maligner Tumor der Pigmentzellen, der sich in der Haut manifestiert und sich durch seine frühzeitige sowohl lymphogene als auch hämatogene Metastasierung auszeichnet. fortgeschrittenen Tumorstadien ist das Melanom die häufigste tödlich verlaufende Hauterkrankung und für mehr als 90% der Todesfälle aller Hautmalignome verantwortlich. Da die bisher eingesetzten Therapien noch wenig erfolgreich sind, wurde in den letzten Jahren intensiv an der Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten geforscht. Ein großer Fortschritt konnte durch die 2011 in das Therapieschema eingeführte ICB und durch sogenannte "targeted therapies" erzielt werden. Der Erfolg moderner Krebstherapien, wie z.B. der ICB, basiert entscheidend auf der Infiltration von Immunzellen in das Tumorgewebe. Aktuelle Arbeiten zum malignen Melanom zeigen, dass in Patienten, die nicht auf die ICB ansprechen, die Zahl von tumorinfiltrierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen geringer ist als in Patienten mit einer guten Ansprechrate. Die Rekrutierung von Immunzellen wird unter anderem durch Cytokine wie CXCL9 reguliert. Das GAG HS kann verschiedene Moleküle, wie Wachstumsfaktoren, Cytokine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle und Proteasen binden und daher ist HS für Zellmigration, Angiogenese und Chemotaxis der Immunzellen relevant. Die Menge an inflammatorischen Cytokinen im Tumor wird wahrscheinlich zu einem großen Teil über das extrazellulär vorkommende HS kontrolliert. Exom-Sequenzierung von humanen Melanomen weisen darauf hin, dass in ca. 40% der Patienten die Bildung des HS aufgrund von somatischen Mutationen gestört ist. Inwiefern eine Dysregulation der HS-Biosynthese die Rekrutierung von Immunzellen in das Tumorgewebe reguliert, ist bislang nur wenig verstanden und wurde daher in dieser Studie untersucht.

In einer vorangehenden Studie wurde bereits durch die Analyse von Biopsien von Melanompatienten und die Analyse von öffentlichen Transkriptom Datensätze bestätigt, dass Melanom Zellen, die weniger HS exprimieren, zur Metastasierung neigen (Wang et al. 2022). Die Auswertung unserer Versuchsgruppen zeigte im Einklang mit den Transkriptom Datensätzen, dass eine deutlich größere Anzahl an murinen Lungenmetastasen in Folge der

Injektion von Melanomzellen mit dysregulierter HS Biosynthese (EXT-1 KO) gebildet wurde.

Mit Hilfe einer inversen IF von Gefrierschnitten der kryokonservierten metastasierten Lungengewebe, konnten wir infolge der Injektion von B16F10 EXT-1 KO Zellen eine signifikant geringere Anzahl an rekrutierten Neutrophilen und CD8+ T-Zellen finden als nach der Injektion von B16F10 WT Zellen. Darüber hinaus wurde die Genexpression der Immunzellen und der für die Rekrutierung von Leukozyten relevanten Chemokine mittels qPCR sowohl nach Injektion von B16F10 WT als auch nach der Injektion von B16F10 EXT-1 KO Zellen untersucht. Die Ergebnisse zeigten im Einklang mit unseren Ergebnissen der IF eine geringere Genexpression in Folge einer Dysregulation der HS Biosynthese. Die Ergebnisse der IF und qPCR bestätigen somit die Hypothese, dass die Rekrutierung in das metastasierte Lungengewebe bei malignem Melanom über die Wechselwirkung zwischen dem negativ geladenen Biopolymer HS und Chemokinen reguliert wird.

Die Rolle von Neutrophilen in der Tumorprogression und Metastasierung wurde in vorangehenden Studien kontrovers dargestellt, wobei der protumorgene Aspekt im Vordergrund stand. Wir konnten in unserer Studie zeigen, dass zwischen der Anzahl von Neutrophilen im metastasierten Lungengewebe und den Lungenmetastasen bei malignem Melanom eine inverse Korrelation besteht. Somit zeigen die Daten unserer Arbeit die antimetastasierende Wirkung von Neutrophilen.

Die Ergebnisse unserer Studie zeigen somit die Relevanz von HS bei der Rekrutierung von Immunzellen in das Melanom metastasierte Lungengewebe und unterstützen die Notwendigkeit für die fortführende Entwicklung therapeutischer Interventionen, die zur Verbesserung der Patientenergebnisse bei metastasiertem Melanom führen könnten.

## Summary

Malignant melanoma is a highly malignant tumor of pigment cells that manifests in the skin and is characterized by its early metastasis to both lymphogenic and hematogenic sites. In advanced tumor stages, melanoma is the most common fatal skin disease and is responsible for more than 90% of deaths from all skin malignancies. Since the therapies used to date have not been very successful, intensive research has been conducted in recent years to develop new therapeutic options. A great progress could be achieved by ICB, which was introduced into the therapy regimen in 2011, and by so-called "targeted therapies". The success of modern cancer therapies, such as ICB, is crucially based on the infiltration of immune cells into the tumor tissue. Recent work in malignant melanoma shows that in patients who do not respond to ICB, the number of tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> T cells is lower than in patients with a good response rate. Immune cell recruitment is regulated by cytokines such as CXCL9, among others. The GAG HS can bind various molecules, such as growth factors, cytokines, chemokines, adhesion molecules, and proteases, and therefore HS is relevant for cell migration, angiogenesis, and chemotaxis of immune cells. The amount of inflammatory cytokines in tumors is most likely controlled in large part by extracellular HS. Exome sequencing of human melanomas indicate that in approximately 40% of patients the formation of HS is impaired due to somatic mutations. The extent to which dysregulation of HS biosynthesis regulates immune cell recruitment to tumor tissue is poorly understood and was therefore investigated in this study.

In a previous study, analysis of biopsies from melanoma patients and analysis of public transcriptome datasets already confirmed that melanoma cells expressing less HS tend to metastasize (Wang et al. 2022). Consistent with the transcriptome datasets, evaluation of our experimental groups showed that a significantly greater number of murine lung metastases were formed as a result of the injection of melanoma cells with dysregulated HS biosynthesis (EXT-1 KO).

Using inverse IF of frozen sections of cryopreserved metastatic lung tissues, we found significantly lower numbers of recruited neutrophils and CD8<sup>+</sup> T cells as

a result of the injection of B16F10 EXT-1 KO cells than after the injection of B16F10 WT cells. In addition, gene expression of immune cells and chemokines relevant to leukocyte recruitment was examined by qPCR after both the injection of B16F10 WT and the injection of B16F10 EXT-1 KO cells. Consistent with our IF results, the results showed lower gene expression as a consequence of dysregulation of HS biosynthesis. Thus the IF and qPCR results confirm the hypothesis that recruitment to metastatic lung tissue in malignant melanoma is regulated by the interaction between the negatively charged biopolymer HS and chemokines.

The role of neutrophils in tumor progression and metastasis has been controversially presented in previous studies, focusing on the protumorgenic aspect. In our study, we demonstrated that there is an inverse correlation between the number of neutrophils in metastatic lung tissue and lung metastases in malignant melanoma. Thus the data of our work demonstrate the antimetastatic effect of neutrophils.

Thus the results of our study demonstrate the relevance of HS in the recruitment of immune cells to melanoma metastatic lung tissue and support the need for continued development of therapeutic interventions that could lead to improved patient outcomes in metastatic melanoma.

# 6. Supplement

Klassifikation des Primärtumors				
Stadium		Tumordicke nach Breslow	Ulzeration	
Tx		Kann nicht bestimmt werden	Keine Angaben	
T0		Kein Anhalt für einen Primärtumor		
Tis		Keine Angaben (Melanoma In-situ)		
	T1	≤1,0mm	Unbekannt/ nicht spezifisch	
T1	T1a	<0,8mm	Ohne Ulzeration	
11	T1b	<0,8mm	Mit Ulzeration	
		0,8mm-1,0mm	Mit/ ohne Ulzeration	
	T2		Unbekannt/ nicht spezifisch	
	T2a	>1,0-2,0mm	Ohne Ulzeration	
-	T2b	-	Mit Ulzeration	
	Т3		Unbekannt/ nicht spezifisch	
	ТЗа	>2,0–4,00mm	Ohne Ulzeration	
-	T3b	-	Mit Ulzeration	
<b>T4</b>	T4		Unbekannt/ nicht spezifisch	
	T4a	>4,00mm	Ohne Ulzeration	
	T4b	_	Mit Ulzeration	
	1	1		

Supplement 1 Klassifikation des Primärtumors nach TNM Klassifikation bei malignem Melanom (AJCC 2016) (Leitlinienprogramm-Onkologie 2020)

Klassifikation der regionären Lymphknoten				
Stadiı	um	Anzahl metastatisch befallener Lymphknoten	Intransit-, Satelliten, und/oder Mikrosateliten- Metastasen	
Nx		Regionale Lymphknoten wurden pathologisch nicht untersucht	Nein	
N0		Kein Befall		
	N1a	1 klinisch okkulter Lymphknoten		
N1	N1b	1 klinisch auffälliger Lymphknoten	Nein	
	N1c	Keine regionale Lymphknotenmetastasen	Ja	
	N2a	2-3 klinisch okkulte Lymphknoten		
N2	N2b	2-3 Lymphknoten, wobei mind. 1 klinisch aufgefallen ist	Nein	
	N2c	1 Lymphknoten	Ja	
	N3a	≥4 klinisch okkulte Lymphknoten		
N3	N3b	≥4 Lymphknoten, wobei mind. 1 klinisch aufgefallen ist	Nein	
	N3c	≥2 Lymphknoten	Ja	
_	1		I	

Supplement 2 Klassifikation der regionären Lymphknoten nach TNM Klassifikation bei malignem Melanom (AJCC) (Leitlinienprogramm-Onkologie 2020)

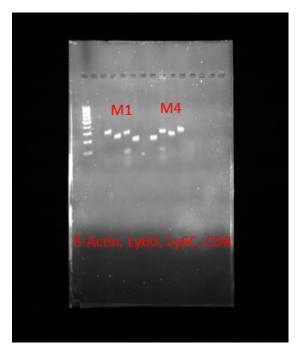
<sup>\*</sup> Als "klinisch okkult" bezeichnet man bspw. einen Lymphknoten, der nur mittels Wächterlymphknotenbiopsie entdeckt wurde.

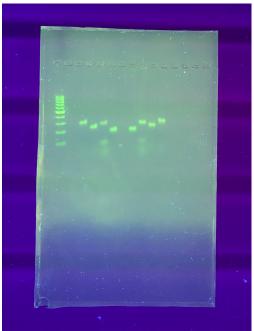
Klassifikation der Fernmetastasen				
Stadium		Lokalisation	LDH im Serum	
МО		Keine		
M1		Nachgewiesene Fernmetastasen		
M1a	M1a	Fernmetastasen in Haut, Weichteilen,	Nicht bestimmt/	
		Muskeln und/oder nicht-regionalen	dokumentiert	
	M1a(0)	Lymphknoten	Normal	
	M1a(1)		Erhöht	
M1b	M1b	Fernmetastasen der Lunge	Nicht bestimmt/	
			dokumentiert	
	M1b(0)		Normal	
	M1b(1)		Erhöht	
M1c	M1c	Andere viszerale Fernmetastasen ohne	Nicht bestimmt/	
		ZNS-Beteiligung	dokumentiert	
	M1c(0)		Normal	
	M1c(1)		Erhöht	
M1d	M1d	Fernmetastasen des ZNS	Nicht bestimmt/	
			dokumentiert	
	M1d(0)		Normal	
	M1d(1)		Erhöht	

Supplement 3 Klassifikation der Fernmetastasen nach TNM Klassifikation bei malignem Melanom (AJCC 2016) (Leitlinienprogramm-Onkologie 2020)

Stadieneinteilung				
Sta	dium	Primärtumor (pT)	Regionäre Lymphknoten-	Fern-
			metastasen (N)	metastasen (M)
0		Tis		
	IA	T1a		
I		T1b		
	IB	T2a		
	IIA	T2b	N0	
		Т3а		
I	IIB	T3b		
		T4a		MO
	IIC	T4b		IVIO
	IIIA	T1a/b-T2a	N1a oder N2a	
	IIIB	Т0	N1b/c	
		T1a/b-T2a	N1b/c oder N2b	
		T2b-T3a	N1a-N2b	
II	IIIC	ТО	N2b/c oder N3b/c	
		T1a-T3a	N2c oder N3a/b/c	
		T3b-T4a	Jedes N ≥ <i>N1</i>	
		T4b	N1a-N2c	
	IIID	T4b	N3a/b/c	
IV	1	Jedes T, Tis	Jedes N	M1

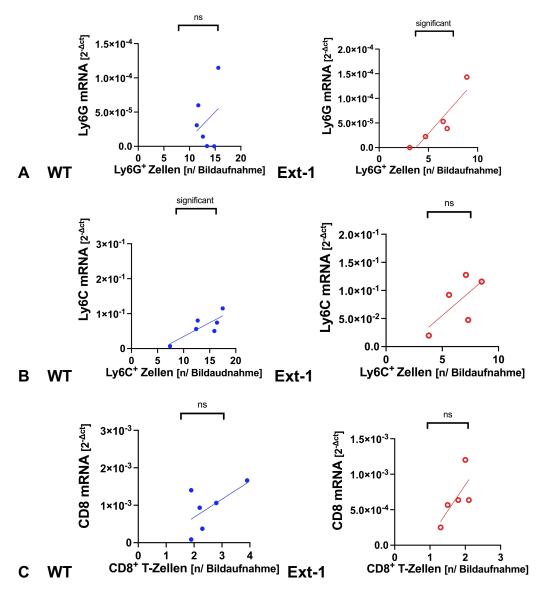
Supplement 4 Histopathologische Stadieneinteilung des malignen Melanoms (AJCC 2016) (Leitlinienprogramm-Onkologie 2020)





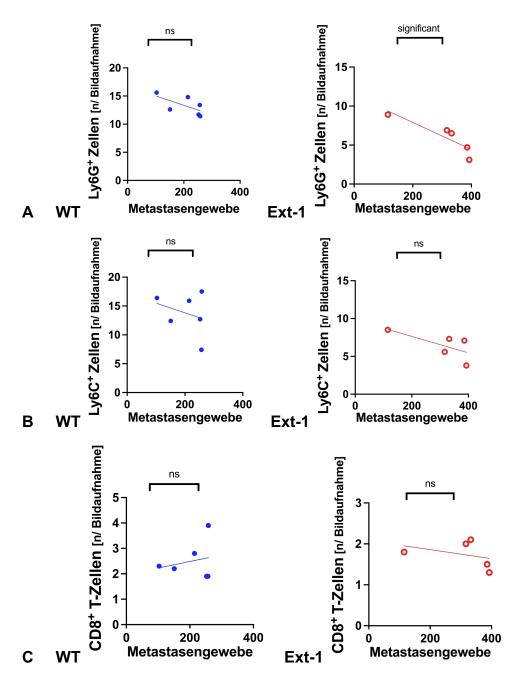
**Supplement 5 Gelelektrophorese** 

Um das Transkriptionsprofil der verschiedenen Gene zu untersuchen, wurde die zuvor kryokonservierte RNA isoliert, in eine stabilere cDNA umgeschrieben und anschließend mittels qPCR amplifiziert und quantifiziert. Anschließend an die qPCR konnten durch eine Gelelektrophorese die amplifizierten PCR Produkte anhand ihrer Größe auf dem Agarose-Gel aufgetrennt, nach einer Laufstrecke von ungefähr 4 cm wurde das Gel aus der Kammer entfernt und zur Dokumentation der Banden unter UV-Licht fotografiert. Somit konnten die amplifizierten PCR Produkte anhand ihrer Größe validiert werden.



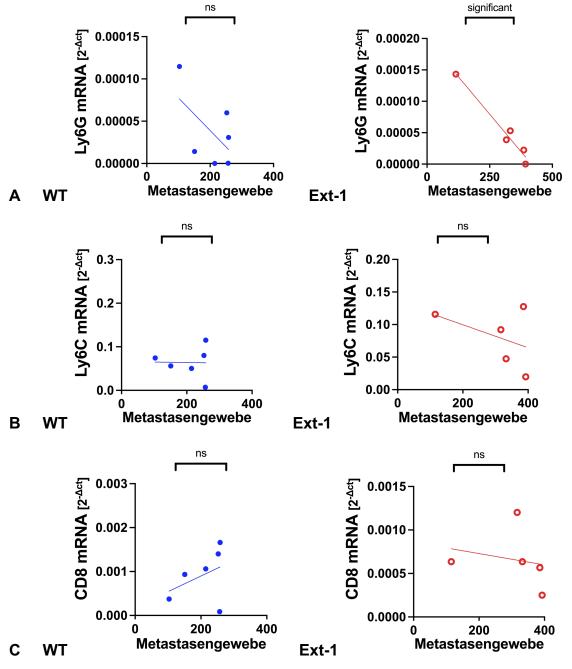
Supplement 6 Der Zusammenhang zwischen der Anzahl an Immunzellen und ihrer Genexpression

In einer Versuchsgruppe wurden entweder 750 000 B16F10 WT Zellen oder B16F10 EXT-1 KO Zellen injiziert. Es wurde im Anschluss mittels IF auf Proteinebene und mittels qPCR auf mRNA Ebene untersucht, welchen Einfluss eine blockierte HS Biosynthese auf die Rekrutierung von Immunzellen ins Lungengewebe ausübt. Hierbei zeigte sich eine tendenziell positive Korrelation zwischen der Genexpression und Anzahl der Immunzellen. A Ly6G+ Zellen (WT: Steigung=7,769e-006; R²=0,08708; p=0,5702) (EXT-1: Steigung=2,261e-005; R²=0,8287; p=0,0318) B Ly6C+ Zellen (WT: Steigung=0,007896; R²=0,6657; p=0,0477) (EXT-1: Steigung=0,01725; R²=0,4646; p=0,2050) C CD8+ Zellen (WT: Steigung=0,0004822; R²=0,3754; p=0,1959) (EXT-1: Steigung=0,0007367; R²=0,5206; p=0,1688)



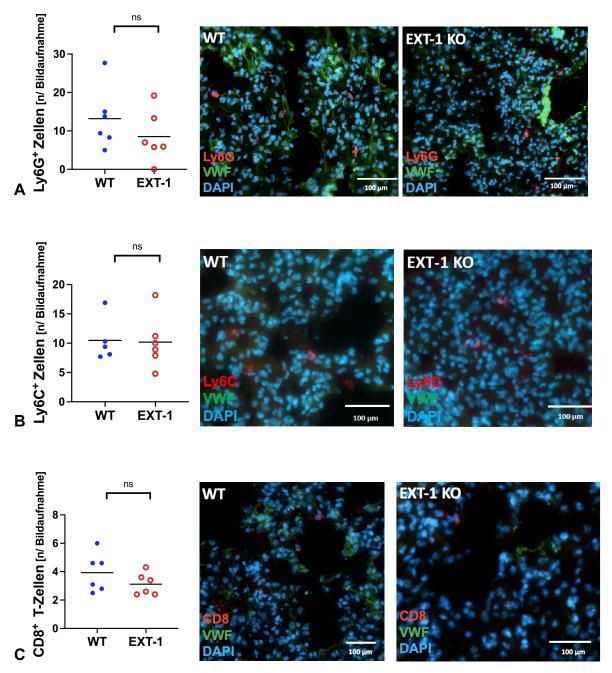
Supplement 7 Analyse des Zusammenhangs zwischen der Anzahl der Immunzellen und der Anzahl der Metastasen

Es wurde für alle Tiere, denen 750 000 Melanomzellen injiziert wurden, untersucht, ob in der Folge ein Zusammenhang zwischen der Anzahl von rekrutierten Immunzellen und den Metastasen im Lungengewebe besteht. Dafür wurden die Tiere mit intakter und blockierter HS Synthese separat voneinander analysiert. Hierbei konnte der Trend einer inversen Korrelation auf Protein Level von **A** Ly6G+ (WT: Steigung=-0,01669; R²=0,4152; p=0,1673) (EXT-1: Steigung=-0,01735; R²=0,7862; p=0,0450), **B** Ly6C+ (WT: Steigung=-0,01678; R²=0,08638; p=0,5718) (EXT-1: Steigung=-0,01088; R²=0,4624; p=0,2065), **C** CD8+ T-Zellen (WT: Steigung=0,002574; R²=0,04834; p=0,6755) (EXT-1: Steigung=-0,001107; R²=0,1387; p=0,5371) mit der Anzahl der Metastasen beobachtet werden.



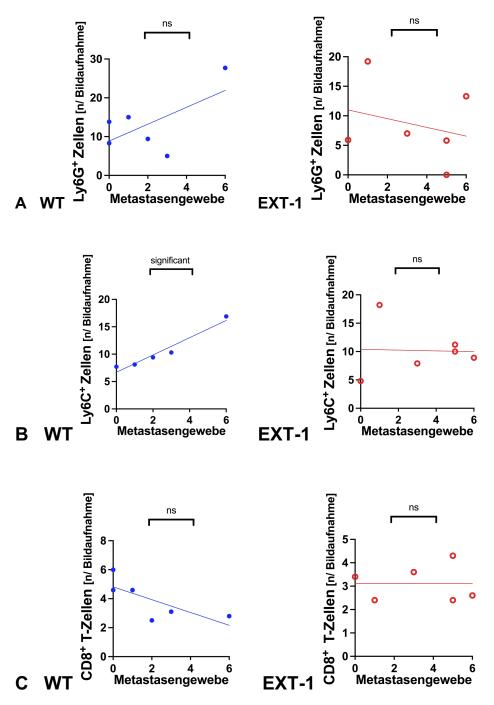
Supplement 8 Analyse des Zusammenhangs zwischen der Genexpression der Immunzellen und der Anzahl der Metastasen

Es wurde für alle Tiere, denen 750 000 Melanomzellen injiziert wurden untersucht, ob in der Folge ein Zusammenhang zwischen der Anzahl von rekrutierten Immunzellen und den Metastasen im Lungengewebe besteht. Dafür wurden die Tiere mit intakter und blockierter HS Synthese separat voneinander analysiert. Hierbei konnte der Trend einer inversen Korrelation auf mRNA Level von **A** Ly6G<sup>+</sup> (WT: Steigung=2,812e-007; R<sup>2</sup>=0,3198; p=0,2421) (EXT-1: Steigung=-4,769e-007; R<sup>2</sup>=0,9638; p=0,0030), **B** Ly6C<sup>+</sup> (WT: Steigung=-1,032e-005; R<sup>2</sup>=0,0003486; p=0,9720) (EXT-1: Steigung=-0,0001762; R<sup>2</sup>=0,1893; p=0,7004), **C** CD8<sup>+</sup> T-Zellen (WT: Steigung=3,550e-006; R<sup>2</sup>=0,1485; p=0,0,4506) (EXT-1: Steigung=-6,496e-007; R<sup>2</sup>=0,04579; p=0,7296) mit der Anzahl der Metastasen beobachtet werden.



Supplement 9 Anzahl der Immunzellen im metastasieren Lungengewebe

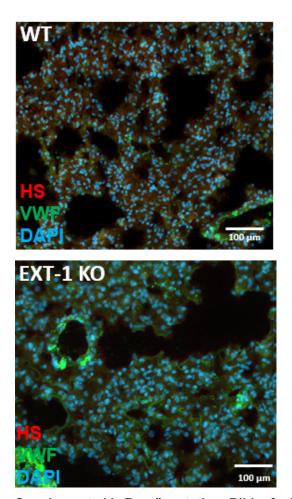
Gezeigt werden mit dem Fluoreszenzmikroskop hergestellte Nahaufnahmen von den immunfluoreszent gefärbten Gewebeschnitten der Mäuse. Im Folgenden ist Ly6G (Neutrophile), CD8 (CD8+ T-Zellen) und Ly6C (Monozyten und Neutrophile) jeweils rot, vWF als Gefäßmarker in grün und DAPI gefärbte Zellkerne in blau dargestellt. Um die Auswirkung einer blockierten HS Biosynthese bei malignem Melanom in Bezug auf die Infiltration von Immunzellen in das metastasierte Lungengewebe zu untersuchen, wurde das Immunzellinfiltrat in dem Lungengewebe von Mäusen mit 100 000 injizierten B16F10 WT Zellen und B16F10 EXT-1 KO Zellen analysiert. Zur quantitativen Auswertung der Immunzellen im Mikromilieu der Lunge wurde, jeweils durch optische Auszählung, die Anzahl der gezählten Immunzellen, anhand der mit dem Immunfluoreszenzmikroskop aufgenommenen Bilder in Relation zur untersuchten Fläche des Lungengewebes (Fläche= 301228,434µm²) ausgewertet. Dabei konnten in der Versuchsgruppe mit 100 000 injizierten Tumorzellen, in Folge einer B16F10 WT Injektion deutlich mehr **A** Ly6G<sup>+</sup> Zellen (Durchschnitt=13,20 p=0,2995) **B** Ly6C<sup>+</sup> Zellen (Durchschnitt=10,48 p=0,9041) und **C** CD8<sup>+</sup> Zellen (Durchschnitt=3,933 p=0,2293) im Lungengewebe der Mäuse gezählt werden. n=6



Supplement 10 Analyse des Zusammenhangs der Anzahl der Immunzellen und der Anzahl der Metastasen

Es wurde für alle Tiere, denen 100 000 Melanomzellen injiziert wurden, untersucht ob in der Folge ein Zusammenhang zwischen der Anzahl von rekrutierten Immunzellen und den Metastasen im Lungengewebe bestand. Dafür wurden die Tiere mit intakter und blockierter HS Synthese separat voneinander analysiert. Hierbei konnte größtenteils der Trend einer inversen Korrelation auf Protein

Level von **A** Ly6G $^+$  (WT: Steigung=2,177; R $^2$ =0,3856; p=0,1883) (EXT-1: Steigung=-0,7386; R $^2$ =0,07079; p=0,6103), **B** Ly6C $^+$  (WT: Steigung=1,577; R $^2$ =0,9451; p=0,0055) (EXT-1: Steigung=-0,6932; R $^2$ =0,001393; p=0,9440), **C** CD8 $^+$  T-Zellen (WT: Steigung=-0,4423; R $^2$ =0,5533; p=0,0900) (EXT-1: Steigung=-0,001136; R $^2$ =1,259e-005; p=0,9947) mit der Anzahl der Metastasen beobachtet werden.



Supplement 11 Repräsentative Bildaufnahmen bei einer intakten bzw. blockierten HS Biosynthese

Hier beispielhaft gezeigt sind mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommene Bildaufnahmen des Lungengewebes von Mäusen nach der Injektion von B16F10 WT (A) oder B16F10 EXT-1 KO (B) Melanomzellen. Dabei ist HS rot, Gefäße mit Hilfe des vWF grün und DAPI gefärbte Zellkerne blau dargestellt. Die bei der EXT-1 KO Versuchsgruppe blockierte HS Biosynthese und das daraus resultierende Fehlen von HS im Lungengewebe dieser Mäuse, konnten wir anhand der IF und representativer Bilder bestätigen.

#### 7. Literaturverzeichnis

- 1. Abbasi N.R., Shaw H.M., Rigel D.S., Friedman R.J., McCarthy W.H., Osman I., Kopf A.W. and Polsky D. Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria. JAMA. 2004;292(22):2771-6.
- 2. Abusaif S., Jradi Z., Held L., Pflugfelder A., Weide B., Meier F., Garbe C. and Eigentler T.K. S100B and lactate dehydrogenase as response and progression markers during treatment with vemurafenib in patients with advanced melanoma. Melanoma Res. 2013;23(5):396-401.
- 3. Agarwala S.S. Novel immunotherapies as potential therapeutic partners for traditional or targeted agents: cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 blockade in advanced melanoma. Melanoma Res. 2010;20(1):1-10.
- 4. Ahmed O.A. and Kelly C. Head and neck melanoma (excluding ocular melanoma): United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. J Laryngol Otol. 2016;130(S2):S133-S41.
- 5. Allen S.J., Crown S.E. and Handel T.M. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. Annu Rev Immunol. 2007;25:787-820.
- 6. Anthony B.A. and Link D.C. Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. Trends Immunol. 2014;35(1):32-7.
- 7. Armstrong B.K. and Cust A.E. Sun exposure and skin cancer, and the puzzle of cutaneous melanoma: A perspective on Fears et al. Mathematical models of age and ultraviolet effects on the incidence of skin cancer among whites in the United States. American Journal of Epidemiology 1977; 105: 420-427. Cancer Epidemiol. 2017;48:147-56.
- 8. Bafounta M.L., Beauchet A., Chagnon S. and Saiag P. Ultrasonography or palpation for detection of melanoma nodal invasion: a meta-analysis. Lancet Oncol. 2004;5(11):673-80.
- 9. Balch C.M., Buzaid A.C., Soong S.J., Atkins M.B., Cascinelli N., Coit D.G., Fleming I.D., Gershenwald J.E., Houghton A., Jr., Kirkwood J.M., McMasters K.M., Mihm M.F., Morton D.L., Reintgen D.S., Ross M.I., Sober A., Thompson J.A. and Thompson J.F. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. J Clin Oncol. 2001;19(16):3635-48.
- 10. Balch C.M., Gershenwald J.E., Soong S.J., Thompson J.F., Atkins M.B., Byrd D.R., Buzaid A.C., Cochran A.J., Coit D.G., Ding S., Eggermont A.M.,

- Flaherty K.T., Gimotty P.A., Kirkwood J.M., McMasters K.M., Mihm M.C., Jr., Morton D.L., Ross M.I., Sober A.J. and Sondak V.K. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. J Clin Oncol. 2009;27(36):6199-206.
- 11. Balch C.M., Murad T.M., Soong S.J., Ingalls A.L., Halpern N.B. and Maddox W.A. A multifactorial analysis of melanoma: prognostic histopathological features comparing Clark's and Breslow's staging methods. Ann Surg. 1978;188(6):732-42.
- 12. Balch C.M., Soong S.J., Gershenwald J.E., Thompson J.F., Reintgen D.S., Cascinelli N., Urist M., McMasters K.M., Ross M.I., Kirkwood J.M., Atkins M.B., Thompson J.A., Coit D.G., Byrd D., Desmond R., Zhang Y., Liu P.Y., Lyman G.H. and Morabito A. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. J Clin Oncol. 2001;19(16):3622-34.
- 13. Barash U., Zohar Y., Wildbaum G., Beider K., Nagler A., Karin N., Ilan N. and Vlodavsky I. Heparanase enhances myeloma progression via CXCL10 downregulation. Leukemia. 2014;28(11):2178-87.
- 14. Barbierato M., Argentini C. and Skaper S.D. Indirect immunofluorescence staining of cultured neural cells. Methods Mol Biol. 2012;846:235-46.
- 15. Barger B.O., Acton R.T., Soong S.J., Roseman J. and Balch C. Increase of HLA-DR4 in melanoma patients from Alabama. Cancer Res. 1982;42(10):4276-9.
- 16. Basche M., Gustafson D.L., Holden S.N., O'Bryant C.L., Gore L., Witta S., Schultz M.K., Morrow M., Levin A., Creese B.R., Kangas M., Roberts K., Nguyen T., Davis K., Addison R.S., Moore J.C. and Eckhardt S.G. A phase I biological and pharmacologic study of the heparanase inhibitor PI-88 in patients with advanced solid tumors. Clin Cancer Res. 2006;12(18):5471-80.
- 17. Bauer J. and Garbe C. Acquired melanocytic nevi as risk factor for melanoma development. A comprehensive review of epidemiological data. Pigment Cell Res. 2003;16(3):297-306.
- 18. Becker C.M., Farnebo F.A., Iordanescu I., Behonick D.J., Shih M.C., Dunning P., Christofferson R., Mulligan R.C., Taylor G.A., Kuo C.J. and Zetter B.R. Gene therapy of prostate cancer with the soluble vascular endothelial growth factor receptor Flk1. Cancer Biol Ther. 2002;1(5):548-53.
- 19. Bishop J.R., Schuksz M. and Esko J.D. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. Nature. 2007;446(7139):1030-7.

- 20. Blenman K.R.M., Wang J., Cowper S. and Bosenberg M. Pathology of spontaneous and immunotherapy-induced tumor regression in a murine model of melanoma. Pigment Cell Melanoma Res. 2019;32(3):448-57.
- 21. Bonilla M.C., Fingerhut L., Alfonso-Castro A., Mergani A., Schwennen C., von Kockritz-Blickwede M. and de Buhr N. How Long Does a Neutrophil Live?-The Effect of 24 h Whole Blood Storage on Neutrophil Functions in Pigs. Biomedicines. 2020;8(8).
- 22. Breitbart E.W., Waldmann A., Nolte S., Capellaro M., Greinert R., Volkmer B. and Katalinic A. Systematic skin cancer screening in Northern Germany. J Am Acad Dermatol. 2012;66(2):201-11.
- 23. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. Ann Surg. 1970;172(5):902-8.
- 24. Broxmeyer H.E. Chemokines and chemokine receptors in hematopoiesis and immunology. Exp Hematol. 2006;34(8):965-6.
- 25. Burkhardt A.M., Tai K.P., Flores-Guiterrez J.P., Vilches-Cisneros N., Kamdar K., Barbosa-Quintana O., Valle-Rios R., Hevezi P.A., Zuniga J., Selman M., Ouellette A.J. and Zlotnik A. CXCL17 is a mucosal chemokine elevated in idiopathic pulmonary fibrosis that exhibits broad antimicrobial activity. J Immunol. 2012;188(12):6399-406.
- 26. Burnet F.M. The concept of immunological surveillance. Prog Exp Tumor Res. 1970;13:1-27.
- 27. Cardin A.D. and Weintraub H.J. Molecular modeling of proteinglycosaminoglycan interactions. Arteriosclerosis. 1989;9(1):21-32.
- 28. Carlos E de Andrea M.C.O., María Villalba-Esparza, Álvaro Teijeira, Kurt A Schalper, Marta Abengozar-Muela, Iñaki Eguren-Santamaría, Cristina Sainz, Sandra Sánchez-Gregorio, Saray Garasa, Mikel Ariz, Carlos Ortiz-de-Solorzano, María E Rodriguez-Ruiz, Jose L Perez-Gracia, María D Lozano, José I Echeveste, Miguel F Sanmamed, Ignacio Melero. Heterogenous presence of neutrophil extracellular traps in human solid tumours is partially dependent on IL-8. The Journal of Pathology. 2021;255(2):190-201.
- 29. Casanova-Acebes M., Nicolas-Avila J.A., Li J.L., Garcia-Silva S., Balachander A., Rubio-Ponce A., Weiss L.A., Adrover J.M., Burrows K., N A.G., Ballesteros I., Devi S., Quintana J.A., Crainiciuc G., Leiva M., Gunzer M., Weber C., Nagasawa T., Soehnlein O., Merad M., Mortha A., Ng L.G., Peinado H. and

- Hidalgo A. Neutrophils instruct homeostatic and pathological states in naive tissues. J Exp Med. 2018;215(11):2778-95.
- 30. Caterson B. and Melrose J. Keratan sulfate, a complex glycosaminoglycan with unique functional capability. Glycobiology. 2018;28(4):182-206.
- 31. Cedervall J., Zhang Y. and Olsson A.K. Tumor-Induced NETosis as a Risk Factor for Metastasis and Organ Failure. Cancer Res. 2016;76(15):4311-5.
- 32. Cerami E., Gao J., Dogrusoz U., Gross B.E., Sumer S.O., Aksoy B.A., Jacobsen A., Byrne C.J., Heuer M.L., Larsson E., Antipin Y., Reva B., Goldberg A.P., Sander C. and Schultz N. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. Cancer Discov. 2012;2(5):401-4.
- 33. Chang Y.M., Barrett J.H., Bishop D.T., Armstrong B.K., Bataille V., Bergman W., Berwick M., Bracci P.M., Elwood J.M., Ernstoff M.S., Gallagher R.P., Green A.C., Gruis N.A., Holly E.A., Ingvar C., Kanetsky P.A., Karagas M.R., Lee T.K., Le Marchand L., Mackie R.M., Olsson H., Osterlind A., Rebbeck T.R., Sasieni P., Siskind V., Swerdlow A.J., Titus-Ernstoff L., Zens M.S. and Newton-Bishop J.A. Sun exposure and melanoma risk at different latitudes: a pooled analysis of 5700 cases and 7216 controls. Int J Epidemiol. 2009;38(3):814-30.
- 34. Chavez-Galan L., Arenas-Del Angel M.C., Zenteno E., Chavez R. and Lascurain R. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. Cell Mol Immunol. 2009;6(1):15-25.
- 35. Coffelt S.B., Wellenstein M.D. and de Visser K.E. Neutrophils in cancer: neutral no more. Nat Rev Cancer. 2016;16(7):431-46.
- 36. Courtney S.M., Hay P.A., Buck R.T., Colville C.S., Phillips D.J., Scopes D.I., Pollard F.C., Page M.J., Bennett J.M., Hircock M.L., McKenzie E.A., Bhaman M., Felix R., Stubberfield C.R. and Turner P.R. Furanyl-1,3-thiazol-2-yl and benzoxazol-5-yl acetic acid derivatives: novel classes of heparanase inhibitor. Bioorg Med Chem Lett. 2005;15(9):2295-9.
- 37. de Andrea C.E., Ochoa M.C., Villalba-Esparza M., Teijeira A., Schalper K.A., Abengozar-Muela M., Eguren-Santamaria I., Sainz C., Sanchez-Gregorio S., Garasa S., Ariz M., Ortiz-de-Solorzano C., Rodriguez-Ruiz M.E., Perez-Gracia J.L., Lozano M.D., Echeveste J.I., Sanmamed M.F. and Melero I. Heterogenous presence of neutrophil extracellular traps in human solid tumours is partially dependent on IL-8. J Pathol. 2021;255(2):190-201.

- 38. de Mingo Pulido A., Gardner A., Hiebler S., Soliman H., Rugo H.S., Krummel M.F., Coussens L.M. and Ruffell B. TIM-3 Regulates CD103(+) Dendritic Cell Function and Response to Chemotherapy in Breast Cancer. Cancer Cell. 2018;33(1):60-74 e6.
- 39. de Visser K.E., Eichten A. and Coussens L.M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. Nat Rev Cancer. 2006;6(1):24-37.
- 40. Demers M., Krause D.S., Schatzberg D., Martinod K., Voorhees J.R., Fuchs T.A., Scadden D.T. and Wagner D.D. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(32):13076-81.
- 41. Demers M., Wong S.L., Martinod K., Gallant M., Cabral J.E., Wang Y. and Wagner D.D. Priming of neutrophils toward NETosis promotes tumor growth.

  Oncoimmunology. 2016;5(5):e1134073.
- 42. Deng X., Xu M., Yuan C., Yin L., Chen X., Zhou X., Li G., Fu Y., Feghali-Bostwick C.A. and Pang L. Transcriptional regulation of increased CCL2 expression in pulmonary fibrosis involves nuclear factor-kappaB and activator protein-1. Int J Biochem Cell Biol. 2013;45(7):1366-76.
- 43. Denis C., Deiteren K., Mortier A., Tounsi A., Fransen E., Proost P., Renauld J.C. and Lambeir A.M. C-terminal clipping of chemokine CCL1/I-309 enhances CCR8-mediated intracellular calcium release and anti-apoptotic activity. PLoS One. 2012;7(3):e34199.
- 44. DeVries M.E., Kelvin A.A., Xu L., Ran L., Robinson J. and Kelvin D.J. Defining the origins and evolution of the chemokine/chemokine receptor system. J Immunol. 2006;176(1):401-15.
- 45. Dimberg A. Chemokines in angiogenesis. Curr Top Microbiol Immunol. 2010;341:59-80.
- 46. Dimitriou F., Frauchiger A.L., Urosevic-Maiwald M., Naegeli M.C., Goldinger S.M., Barysch M., Franzen D., Kamarachev J., Braun R., Dummer R. and Mangana J. Sarcoid-like reactions in patients receiving modern melanoma treatment. Melanoma Res. 2018;28(3):230-6.
- 47. Dinnes J., Deeks J.J., Chuchu N., Ferrante di Ruffano L., Matin R.N., Thomson D.R., Wong K.Y., Aldridge R.B., Abbott R., Fawzy M., Bayliss S.E., Grainge M.J., Takwoingi Y., Davenport C., Godfrey K., Walter F.M., Williams H.C. and Cochrane Skin Cancer Diagnostic Test Accuracy G. Dermoscopy, with and

- without visual inspection, for diagnosing melanoma in adults. Cochrane Database Syst Rev. 2018;12:CD011902.
- 48. Donskov F. Immunomonitoring and prognostic relevance of neutrophils in clinical trials. Semin Cancer Biol. 2013;23(3):200-7.
- 49. Doornebal C.W., Vrijland K., Hau C.S., Coffelt S.B., Ciampricotti M., Jonkers J., de Visser K.E. and Hollmann M.W. Morphine does not facilitate breast cancer progression in two preclinical mouse models for human invasive lobular and HER2(+) breast cancer. Pain. 2015;156(8):1424-32.
- 50. Dredge K., Brennan T.V., Hammond E., Lickliter J.D., Lin L., Bampton D., Handley P., Lankesheer F., Morrish G., Yang Y., Brown M.P. and Millward M. A Phase I study of the novel immunomodulatory agent PG545 (pixatimod) in subjects with advanced solid tumours. Br J Cancer. 2018;118(8):1035-41.
- 51. Dubrac A., Quemener C., Lacazette E., Lopez F., Zanibellato C., Wu W.G., Bikfalvi A. and Prats H. Functional divergence between 2 chemokines is conferred by single amino acid change. Blood. 2010;116(22):4703-11.
- 52. DuPre S.A. and Hunter K.W., Jr. Murine mammary carcinoma 4T1 induces a leukemoid reaction with splenomegaly: association with tumor-derived growth factors. Exp Mol Pathol. 2007;82(1):12-24.
- 53. Eigentler T.K., Radny P., Hauschild A., Gutzmer R., Linse R., Pfohler C., Wagner S.N., Schadendorf D., Ellwanger U., Garbe C. and German Dermatologic Cooperative Oncology G. Adjuvant treatment with vindesine in comparison to observation alone in patients with metastasized melanoma after complete metastasectomy: a randomized multicenter trial of the German Dermatologic Cooperative Oncology Group. Melanoma Res. 2008;18(5):353-8.
- 54. Elisa Peranzoni J.L., Lene Vimeux, Vincent Feuillet, Sarah Barrin, Chahrazade Kantari-Mimoun, Nadège Bercovici, Marion Guérin, Jérôme Biton, Hanane Ouakrim, Fabienne Régnier, Audrey Lupo, Marco Alifano, Diane Damotte, and Emmanuel Donnadieu. Macrophages impede CD8 T cells from reaching tumor cells and limit the efficacy of anti–PD-1 treatment. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2018;115(17):E4041-E50.
- 55. Elwood J.M. Screening for melanoma and options for its evaluation [see comment]. J Med Screen. 1994;1(1):22-38.

- 56. Elwood J.M. and Jopson J. Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. Int J Cancer. 1997;73(2):198-203.
- 57. Esko J.D. and Lindahl U. Molecular diversity of heparan sulfate. J Clin Invest. 2001;108(2):169-73.
- 58. Fallahian F., Ghanadian M., Aghaei M. and Zarei S.M. Induction of G2/M phase arrest and apoptosis by a new tetrahydroingenol diterpenoid from Euphorbia erythradenia Bioss. in melanoma cancer cells. Biomed Pharmacother. 2017;86:334-42.
- 59. Fang J., Song T., Lindahl U. and Li J.P. Enzyme overexpression an exercise toward understanding regulation of heparan sulfate biosynthesis. Sci Rep. 2016;6:31242.
- 60. Fang W.B., Yao M., Jokar I., Alhakamy N., Berkland C., Chen J., Brantley-Sieders D. and Cheng N. The CCL2 chemokine is a negative regulator of autophagy and necrosis in luminal B breast cancer cells. Breast Cancer Res Treat. 2015;150(2):309-20.
- 61. Forsberg E. and Kjellen L. Heparan sulfate: lessons from knockout mice. J Clin Invest. 2001;108(2):175-80.
- 62. Fridlender Z.G., Sun J., Kim S., Kapoor V., Cheng G., Ling L., Worthen G.S. and Albelda S.M. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. Cancer Cell. 2009;16(3):183-94.
- 63. Friedman R.J., Rigel D.S. and Kopf A.W. Early detection of malignant melanoma: the role of physician examination and self-examination of the skin. CA Cancer J Clin. 1985;35(3):130-51.
- 64. Fritsch P. and Schwarz T. Dermatologie Venerologie. Berlin Heidelberg: Springer; 2018.
- 65. Fuster M.M. and Esko J.D. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. Nat Rev Cancer. 2005;5(7):526-42.
- 66. Gallagher J. Fell-Muir Lecture: Heparan sulphate and the art of cell regulation: a polymer chain conducts the protein orchestra. Int J Exp Pathol. 2015;96(4):203-31.
- 67. Gandini S., Montella M., Ayala F., Benedetto L., Rossi C.R., Vecchiato A., Corradin M.T., V D.E.G., Queirolo P., Zannetti G., Giudice G., Borroni G., Forcignano R., Peris K., Tosti G., Testori A., Trevisan G., Spagnolo F., Ascierto

- P.A. and Clinical National Melanoma Registry G. Sun exposure and melanoma prognostic factors. Oncol Lett. 2016;11(4):2706-14.
- 68. Ganley C.J., Paget S.A. and Reidenberg M.M. Increased renal tubular cell excretion by patients receiving chronic therapy with gold and with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Clin Pharmacol Ther. 1989;46(1):51-5.
- 69. Gao J., Aksoy B.A., Dogrusoz U., Dresdner G., Gross B., Sumer S.O., Sun Y., Jacobsen A., Sinha R., Larsson E., Cerami E., Sander C. and Schultz N. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. Sci Signal. 2013;6(269):pl1.
- 70. Garantziotis S. and Savani R.C. Hyaluronan biology: A complex balancing act of structure, function, location and context. Matrix Biol. 2019;78-79:1-10.
- 71. Garbe C. and Blum A. Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol. 2001;14(5):280-90.
- 72. Garner O.B., Bush K.T., Nigam K.B., Yamaguchi Y., Xu D., Esko J.D. and Nigam S.K. Stage-dependent regulation of mammary ductal branching by heparan sulfate and HGF-cMet signaling. Dev Biol. 2011;355(2):394-403.
- 73. Geller R.L., Ihrcke N.S., Maines J., Lindman B.J. and Platt J.L. Loss of heparan sulfate proteoglycan as a manifestation of cellular immunity in vivo and in vitro. Transplant Proc. 1993;25(1 Pt 1):144-5.
- 74. Gilchrest B.A., Eller M.S., Geller A.C. and Yaar M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. N Engl J Med. 1999;340(17):1341-8.
- 75. Hamid O., Robert C., Daud A., Hodi F.S., Hwu W.J., Kefford R., Wolchok J.D., Hersey P., Joseph R.W., Weber J.S., Dronca R., Gangadhar T.C., Patnaik A., Zarour H., Joshua A.M., Gergich K., Elassaiss-Schaap J., Algazi A., Mateus C., Boasberg P., Tumeh P.C., Chmielowski B., Ebbinghaus S.W., Li X.N., Kang S.P. and Ribas A. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. N Engl J Med. 2013;369(2):134-44.
- 76. Hammond E., Haynes N.M., Cullinane C., Brennan T.V., Bampton D., Handley P., Karoli T., Lanksheer F., Lin L., Yang Y. and Dredge K. Immunomodulatory activities of pixatimod: emerging nonclinical and clinical data, and its potential utility in combination with PD-1 inhibitors. J Immunother Cancer. 2018;6(1):54.

- 77. Hans-Heinrich Oberg D.W., Shirin Kalyan and Dieter Kabelitz. Regulatory Interactions Between Neutrophils, Tumor Cells and T Cells. Frontiers in Immunology Cancer Immunity and Immunotherapy. 2019.
- 78. Harty J.T. and Badovinac V.P. Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory. Nat Rev Immunol. 2008;8(2):107-19.
- 79. Hausmann D., Jochum S., Utikal J., Hoffmann R.C., Zechmann C., Neff K.W., Goerdt S., Schoenberg S.O. and Dinter D.J. Comparison of the diagnostic accuracy of whole-body MRI and whole-body CT in stage III/IV malignant melanoma. J Dtsch Dermatol Ges. 2011;9(3):212-22.
- 80. Hiratsuka S., Watanabe A., Aburatani H. and Maru Y. Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. Nat Cell Biol. 2006;8(12):1369-75.
- 81. Hohnheiser A.M., Gefeller O., Gohl J., Schuler G., Hohenberger W. and Merkel S. Malignant melanoma of the skin: long-term follow-up and time to first recurrence. World J Surg. 2011;35(3):580-9.
- 82. House I.G., Savas P., Lai J., Chen A.X.Y., Oliver A.J., Teo Z.L., Todd K.L., Henderson M.A., Giuffrida L., Petley E.V., Sek K., Mardiana S., Gide T.N., Quek C., Scolyer R.A., Long G.V., Wilmott J.S., Loi S., Darcy P.K. and Beavis P.A. Macrophage-Derived CXCL9 and CXCL10 Are Required for Antitumor Immune Responses Following Immune Checkpoint Blockade. Clin Cancer Res. 2020;26(2):487-504.
- 83. Izraely S., Klein A., Sagi-Assif O., Meshel T., Tsarfaty G., Hoon D.S. and Witz I.P. Chemokine-chemokine receptor axes in melanoma brain metastasis. Immunol Lett. 2010;130(1-2):107-14.
- 84. Jayson G.C., Hansen S.U., Miller G.J., Cole C.L., Rushton G., Avizienyte E. and Gardiner J.M. Synthetic heparan sulfate dodecasaccharides reveal single sulfation site interconverts CXCL8 and CXCL12 chemokine biology. Chem Commun (Camb). 2015;51(72):13846-9.
- 85. Jean M Daley A.A.T., Michael D Connolly, Jonathan S Reichner, Jorge E Albina. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. Journal of Leukocyte Biology. 2008;83(1):64-70.
- 86. Jemth P., Kreuger J., Kusche-Gullberg M., Sturiale L., Gimenez-Gallego G. and Lindahl U. Biosynthetic oligosaccharide libraries for identification of protein-binding heparan sulfate motifs. Exploring the structural diversity by screening for

- fibroblast growth factor (FGF)1 and FGF2 binding. J Biol Chem. 2002;277(34):30567-73.
- 87. Johnson Z., Kosco-Vilbois M.H., Herren S., Cirillo R., Muzio V., Zaratin P., Carbonatto M., Mack M., Smailbegovic A., Rose M., Lever R., Page C., Wells T.N. and Proudfoot A.E. Interference with heparin binding and oligomerization creates a novel anti-inflammatory strategy targeting the chemokine system. J Immunol. 2004;173(9):5776-85.
- 88. Kaatsch P., Spix C., Katalinic A., Hentschel S., Luttmann S., Stegmaier C., Caspritz S., Christ M., Ernst A., Folkerts J., Hansmann J. and Klein S. Krebs in Deutschland 2007/2008. In: Robert-Koch-Institut, V. GdeKiDe, editors. 2012. p. 13.
- 89. Kaatsch P., Spix C., Katalinic A., Hentschel S., Luttmann S., Stegmaier C., Caspritz S., Christ M., Ernst A., Folkerts J., Hansmann J. and Klein S. Krebs in Deutschland 2011/2012. In: Robert-Koch-Institut, V. GdeKiDe, editors. 2015.
- 90. Kalagara T., Moutsis T., Yang Y., Pappelbaum K.I., Farken A., Cladder-Micus L., Vidal Y.S.S., John A., Bauer A.T., Moerschbacher B.M., Schneider S.W. and Gorzelanny C. The endothelial glycocalyx anchors von Willebrand factor fibers to the vascular endothelium. Blood Adv. 2018;2(18):2347-57.
- 91. Kalderen C., Stadler C., Forsgren M., Kvastad L., Johansson E., Sydow-Backman M. and Svensson Gelius S. CCL2 mediates anti-fibrotic effects in human fibroblasts independently of CCR2. Int Immunopharmacol. 2014;20(1):66-73.
- 92. Karlsson-Lindahl L., Schmidt L., Haage D., Hansson C., Taube M., Egecioglu E., Tan Y.X., Admyre T., Jansson J.O., Vlodavsky I., Li J.P., Lindahl U. and Dickson S.L. Heparanase affects food intake and regulates energy balance in mice. PLoS One. 2012;7(3):e34313.
- 93. Kasari C., Shire S., Factor R. and McCracken C. Psychosocial treatments for individuals with autism spectrum disorder across the lifespan: new developments and underlying mechanisms. Curr Psychiatry Rep. 2014;16(11):512.
- 94. Kittler H., Pehamberger H., Wolff K. and Binder M. Diagnostic accuracy of dermoscopy. Lancet Oncol. 2002;3(3):159-65.
- 95. Koliopanos A., Friess H., Kleeff J., Shi X., Liao Q., Pecker I., Vlodavsky I., Zimmermann A. and Buchler M.W. Heparanase expression in primary and metastatic pancreatic cancer. Cancer Res. 2001;61(12):4655-9.

- 96. Kowanetz M., Wu X., Lee J., Tan M., Hagenbeek T., Qu X., Yu L., Ross J., Korsisaari N., Cao T., Bou-Reslan H., Kallop D., Weimer R., Ludlam M.J., Kaminker J.S., Modrusan Z., van Bruggen N., Peale F.V., Carano R., Meng Y.G. and Ferrara N. Granulocyte-colony stimulating factor promotes lung metastasis through mobilization of Ly6G+Ly6C+ granulocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(50):21248-55.
- 97. Kumar A.V., Katakam S.K., Urbanowitz A.K. and Gotte M. Heparan sulphate as a regulator of leukocyte recruitment in inflammation. Curr Protein Pept Sci. 2015;16(1):77-86.
- 98. Kusche-Gullberg M. and Kjellen L. Sulfotransferases in glycosaminoglycan biosynthesis. Curr Opin Struct Biol. 2003;13(5):605-11.
- 99. Laurence Piriou-Guzylack H.S. Membrane markers of the immune cells in swine: an update. Veterinary Research. 2008;39(6):28.
- 100. Le Jan S., Hayashi M., Kasza Z., Eriksson I., Bishop J.R., Weibrecht I., Heldin J., Holmborn K., Jakobsson L., Soderberg O., Spillmann D., Esko J.D., Claesson-Welsh L., Kjellen L. and Kreuger J. Functional overlap between chondroitin and heparan sulfate proteoglycans during VEGF-induced sprouting angiogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012;32(5):1255-63.
- 101. LeBoit P.E., Cancer E.O.f.R.o.T.o., Pathologie U.t.Z.D., Pathology I.A.o., Organization W.H. and Cancer I.A.f.R.o. Pathology and genetics of skin tumours: Lyon: IARC Press; 2006.
- 102. Leitlinienprogramm-Onkologie. S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms [Leitlinien (Langversion]. Leitlinienprogramm-Onkologie; 2020.
- 103. Leitlinienprogramm-Onkologie. S3-Leitlinie Prävention von Hautkrebs, Langversion 2.1 [Leitlinien (Langversion)]. Leitlinienprogramm-Onkologie; 2021. 104. Li J., Byrne K.T., Yan F., Yamazoe T., Chen Z., Baslan T., Richman L.P., Lin J.H., Sun Y.H., Rech A.J., Balli D., Hay C.A., Sela Y., Merrell A.J., Liudahl S.M., Gordon N., Norgard R.J., Yuan S., Yu S., Chao T., Ye S., Eisinger-Mathason T.S.K., Faryabi R.B., Tobias J.W., Lowe S.W., Coussens L.M., Wherry E.J., Vonderheide R.H. and Stanger B.Z. Tumor Cell-Intrinsic Factors Underlie Heterogeneity of Immune Cell Infiltration and Response to Immunotherapy. Immunity. 2018;49(1):178-93 e7.

- 105. Li J.P., Gong F., Hagner-McWhirter A., Forsberg E., Abrink M., Kisilevsky R., Zhang X. and Lindahl U. Targeted disruption of a murine glucuronyl C5-epimerase gene results in heparan sulfate lacking L-iduronic acid and in neonatal lethality. J Biol Chem. 2003;278(31):28363-6.
- 106. Li J.P. and Kusche-Gullberg M. Heparan Sulfate: Biosynthesis, Structure, and Function. Int Rev Cell Mol Biol. 2016;325:215-73.
- 107. Lindahl U., Kusche-Gullberg M. and Kjellen L. Regulated diversity of heparan sulfate. J Biol Chem. 1998;273(39):24979-82.
- 108. Lisignoli G., Toneguzzi S., Piacentini A., Cristino S., Grassi F., Cavallo C. and Facchini A. CXCL12 (SDF-1) and CXCL13 (BCA-1) chemokines significantly induce proliferation and collagen type I expression in osteoblasts from osteoarthritis patients. J Cell Physiol. 2006;206(1):78-85.
- 109. Liu D., Shriver Z., Venkataraman G., El Shabrawi Y. and Sasisekharan R. Tumor cell surface heparan sulfate as cryptic promoters or inhibitors of tumor growth and metastasis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(2):568-73.
- 110. Luke J.J., Callahan M.K., Postow M.A., Romano E., Ramaiya N., Bluth M., Giobbie-Hurder A., Lawrence D.P., Ibrahim N., Ott P.A., Flaherty K.T., Sullivan R.J., Harding J.J., D'Angelo S., Dickson M., Schwartz G.K., Chapman P.B., Wolchok J.D., Hodi F.S. and Carvajal R.D. Clinical activity of ipilimumab for metastatic uveal melanoma: a retrospective review of the Dana-Farber Cancer Institute, Massachusetts General Hospital, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, and University Hospital of Lausanne experience. Cancer. 2013;119(20):3687-95.
- 111. Mackiewicz J. and Mackiewicz A. BRAF and MEK inhibitors in the era of immunotherapy in melanoma patients. Contemp Oncol (Pozn). 2018;22(1A):68-72. 112. Mambetsariev N., Mirzapoiazova T., Mambetsariev B., Sammani S., Lennon F.E., Garcia J.G. and Singleton P.A. Hyaluronic Acid binding protein 2 is a novel regulator of vascular integrity. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010;30(3):483-90.
- 113. Mariathasan S., Turley S.J., Nickles D., Castiglioni A., Yuen K., Wang Y., Kadel E.E., III, Koeppen H., Astarita J.L., Cubas R., Jhunjhunwala S., Banchereau R., Yang Y., Guan Y., Chalouni C., Ziai J., Senbabaoglu Y., Santoro S., Sheinson D., Hung J., Giltnane J.M., Pierce A.A., Mesh K., Lianoglou S., Riegler J., Carano R.A.D., Eriksson P., Hoglund M., Somarriba L., Halligan D.L., van der Heijden

- M.S., Loriot Y., Rosenberg J.E., Fong L., Mellman I., Chen D.S., Green M., Derleth C., Fine G.D., Hegde P.S., Bourgon R. and Powles T. TGFbeta attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells. Nature. 2018;554(7693):544-8.
- 114. Mendenhall W.M., Amdur R.J., Morris C.G., Kirwan J., Shaw C. and Dziegielewski P.T. Adjuvant postoperative radiotherapy for cutaneous melanoma. Acta Oncol. 2017;56(3):495-6.
- 115. Merry C.L., Bullock S.L., Swan D.C., Backen A.C., Lyon M., Beddington R.S., Wilson V.A. and Gallagher J.T. The molecular phenotype of heparan sulfate in the Hs2st-/- mutant mouse. J Biol Chem. 2001;276(38):35429-34.
- 116. Messore A., Madia V.N., Pescatori L., Saccoliti F., Tudino V., De Leo A., Bortolami M., De Vita D., Scipione L., Pepi F., Costi R., Rivara S., Scalvini L., Mor M., Ferrara F.F., Pavoni E., Roscilli G., Cassinelli G., Milazzo F.M., Battistuzzi G., Di Santo R. and Giannini G. Novel Symmetrical Benzazolyl Derivatives Endowed with Potent Anti-Heparanase Activity. J Med Chem. 2018;61(23):10834-59.
- 117. Migliorini E., Thakar D., Kuhnle J., Sadir R., Dyer D.P., Li Y., Sun C., Volkman B.F., Handel T.M., Coche-Guerente L., Fernig D.G., Lortat-Jacob H. and Richter R.P. Cytokines and growth factors cross-link heparan sulfate. Open Biol. 2015;5(8).
- 118. Millrud C.R., Kagedal A., Kumlien Georen S., Winqvist O., Uddman R., Razavi R., Munck-Wikland E. and Cardell L.O. NET-producing CD16(high) CD62L(dim) neutrophils migrate to tumor sites and predict improved survival in patients with HNSCC. Int J Cancer. 2017;140(11):2557-67.
- 119. Mocellin S., Pasquali S., Rossi C.R. and Nitti D. Interferon alpha adjuvant therapy in patients with high-risk melanoma: a systematic review and meta-analysis. J Natl Cancer Inst. 2010;102(7):493-501.
- 120. Moll I. Dermatologie. 8 ed. Moll I, editor. Stuttgart: Thieme; 2016.
- 121. Monneau Y., Arenzana-Seisdedos F. and Lortat-Jacob H. The sweet spot: how GAGs help chemokines guide migrating cells. J Leukoc Biol. 2016;99(6):935-53.
- 122. Monteagudo C., Ramos D., Pellin-Carcelen A., Gil R., Callaghan R.C., Martin J.M., Alonso V., Murgui A., Navarro L., Calabuig S., Lopez-Guerrero J.A., Jorda E. and Pellin A. CCL27-CCR10 and CXCL12-CXCR4 chemokine ligand-

- receptor mRNA expression ratio: new predictive factors of tumor progression in cutaneous malignant melanoma. Clin Exp Metastasis. 2012;29(6):625-37.
- 123. Morvan M.G. and Lanier L.L. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. Nat Rev Cancer. 2016;16(1):7-19.
- 124. Muller K., Ehlers S., Solbach W. and Laskay T. Novel multi-probe RNase protection assay (RPA) sets for the detection of murine chemokine gene expression. J Immunol Methods. 2001;249(1-2):155-65.
- 125. Nagai Y., Watanabe K., Aso H., Ohwada S., Muneta Y. and Yamaguchi T. Cellular localization of IL-18 and IL-18 receptor in pig anterior pituitary gland. Domest Anim Endocrinol. 2006;30(2):144-54.
- 126. Nakamura K., Yoshikawa N., Yamaguchi Y., Kagota S., Shinozuka K. and Kunitomo M. Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. Life Sci. 2002;70(7):791-8.
- 127. Nalcaci S., Palamar M., Yaman B., Akalin T. and Mentes J. Choroidal malignant melanoma with no extraocular extension presenting as orbital cellulitis. Orbit. 2016;35(5):285-7.
- 128. Nelemans P.J., Groenendal H., Kiemeney L.A., Rampen F.H., Ruiter D.J. and Verbeek A.L. Effect of intermittent exposure to sunlight on melanoma risk among indoor workers and sun-sensitive individuals. Environ Health Perspect. 1993;101(3):252-5.
- 129. Nonaka M. and Kawasaki T. Functional assay using lectin gene targeting technologies (over-expression). Methods Mol Biol. 2014;1200:389-99.
- 130. Nywening T.M., Belt B.A., Cullinan D.R., Panni R.Z., Han B.J., Sanford D.E., Jacobs R.C., Ye J., Patel A.A., Gillanders W.E., Fields R.C., DeNardo D.G., Hawkins W.G., Goedegebuure P. and Linehan D.C. Targeting both tumourassociated CXCR2(+) neutrophils and CCR2(+) macrophages disrupts myeloid recruitment and improves chemotherapeutic responses in pancreatic ductal adenocarcinoma. Gut. 2018;67(6):1112-23.
- 131. O'Reilly E.M., Roach J., Miller P., Yu K.H., Tjan C., Rosano M., Krause S., Avery W., Wolf J., Flaherty K., Nix D. and Ryan D.P. Safety, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Antitumor Activity of Necuparanib Combined with Nab-Paclitaxel and Gemcitabine in Patients with Metastatic Pancreatic Cancer: Phase I Results. Oncologist. 2017;22(12):1429-e139.

- 132. Owen J.L., Criscitiello M.F., Libreros S., Garcia-Areas R., Guthrie K., Torroella-Kouri M. and Iragavarapu-Charyulu V. Expression of the inflammatory chemokines CCL2, CCL5 and CXCL2 and the receptors CCR1-3 and CXCR2 in T lymphocytes from mammary tumor-bearing mice. Cell Immunol. 2011;270(2):172-82.
- 133. Pantel K. and Brakenhoff R.H. Dissecting the metastatic cascade. Nat Rev Cancer. 2004;4(6):448-56.
- 134. Pastore S., Mascia F., Mariotti F., Dattilo C. and Girolomoni G. Chemokine networks in inflammatory skin diseases. Eur J Dermatol. 2004;14(4):203-8.
- 135. Pflugfelder A., Kochs C., Blum A., Capellaro M., Czeschik C., Dettenborn T., Dill D., Dippel E., Eigentler T., Feyer P., Follmann M., Frerich B., Ganten M.K., Gärtner J., Gutzmer R., Hassel J., Hauschild A., Hohenberger P., Hübner J., Kaatz M., Kleeberg U.R., Kölbl O., Kortmann R.D., Krause-Bergmann A., Kurschat P., Leiter U., Link H., Loquai C., Löser C., Mackensen A., Meier F., Mohr P., Möhrle M., Nashan D., Reske S., Rose C., Sander C., Satzger I., Schiller M., Schlemmer H.P., Strittmatter G., Sunderkötter C., Swoboda L., Trefzer U., Voltz R., Vordermark D., Weichenthal M., Werner A., Wesselmann S., Weyergraf A.J., Wick W., Garbe C. and Schadendorf D. S3-Guideline "Diagnosis, therapy and follow-up of melanoma" short version. Journal of the German Society of Dermatology. 2013;11(6):563-602.
- 136. Pflugfelder A., Kochs C., Blum A., Capellaro M., Czeschik C., Dettenborn T., Dill D., Dippel E., Eigentler T., Feyer P., Follmann M., Frerich B., Ganten M.K., Gartner J., Gutzmer R., Hassel J., Hauschild A., Hohenberger P., Hubner J., Kaatz M., Kleeberg U.R., Kolbl O., Kortmann R.D., Krause-Bergmann A., Kurschat P., Leiter U., Link H., Loquai C., Loser C., Mackensen A., Meier F., Mohr P., Mohrle M., Nashan D., Reske S., Rose C., Sander C., Satzger I., Schiller M., Schlemmer H.P., Strittmatter G., Sunderkotter C., Swoboda L., Trefzer U., Voltz R., Vordermark D., Weichenthal M., Werner A., Wesselmann S., Weyergraf A.J., Wick W., Garbe C., Schadendorf D. and German Society of D. S3-guideline "diagnosis, therapy and follow-up of melanoma" -- short version. J Dtsch Dermatol Ges. 2013;11(6):563-602.
- 137. Pflugfelder A., Welter A.K., Leiter U., Weide B., Held L., Eigentler T.K., Dirschka T., Stockfleth E., Nashan D., Garbe C. and German Dermatologic Cooperative Oncology G. Open label randomized study comparing 3 months vs. 6

- months treatment of actinic keratoses with 3% diclofenac in 2.5% hyaluronic acid gel: a trial of the German Dermatologic Cooperative Oncology Group. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2012;26(1):48-53.
- 138. Pieterse E., Rother N., Garsen M., Hofstra J.M., Satchell S.C., Hoffmann M., Loeven M.A., Knaapen H.K., van der Heijden O.W.H., Berden J.H.M., Hilbrands L.B. and van der Vlag J. Neutrophil Extracellular Traps Drive Endothelial-to-Mesenchymal Transition. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2017;37(7):1371-9.
- 139. Plewig G., Ruzicka T., Kaufmann R. and Hertl M. Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie: Springer, Berlin, Heidelberg; 2018.
- 140. Pomin V.H. Keratan sulfate: an up-to-date review. Int J Biol Macromol. 2015;72:282-9.
- 141. Powell D.R. and Huttenlocher A. Neutrophils in the Tumor Microenvironment. Trends Immunol. 2016;37(1):41-52.
- 142. Prins M., Dutta R., Baselmans B., Breve J.J., Bol J.G., Deckard S.A., van der Valk P., Amor S., Trapp B.D., de Vries H.E., Drukarch B. and van Dam A.M. Discrepancy in CCL2 and CCR2 expression in white versus grey matter hippocampal lesions of Multiple Sclerosis patients. Acta Neuropathol Commun. 2014;2:98.
- 143. Proudfoot A.E., Handel T.M., Johnson Z., Lau E.K., LiWang P., Clark-Lewis I., Borlat F., Wells T.N. and Kosco-Vilbois M.H. Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(4):1885-90.
- 144. Proudfoot A.E., Power C.A., Rommel C. and Wells T.N. Strategies for chemokine antagonists as therapeutics. Semin Immunol. 2003;15(1):57-65.
- 145. Proudfoot A.E.I., Johnson Z., Bonvin P. and Handel T.M.
- Glycosaminoglycan Interactions with Chemokines Add Complexity to a Complex System. Pharmaceuticals (Basel). 2017;10(3).
- 146. Rajeevan M.S., Vernon S.D., Taysavang N. and Unger E.R. Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR. J Mol Diagn. 2001;3(1):26-31.
- 147. Ramani V.C., Purushothaman A., Stewart M.D., Thompson C.A., Vlodavsky I., Au J.L. and Sanderson R.D. The heparanase/syndecan-1 axis in cancer: mechanisms and therapies. FEBS J. 2013;280(10):2294-306.

- 148. Rao N.C., Barsky S.H., Terranova V.P. and Liotta L.A. Isolation of a tumor cell laminin receptor. Biochem Biophys Res Commun. 1983;111(3):804-8.
- 149. Redmer T. Deciphering mechanisms of brain metastasis in melanoma the gist of the matter. Mol Cancer. 2018;17(1):106.
- 150. Ringvall M., Ledin J., Holmborn K., van Kuppevelt T., Ellin F., Eriksson I., Olofsson A.M., Kjellen L. and Forsberg E. Defective heparan sulfate biosynthesis and neonatal lethality in mice lacking N-deacetylase/N-sulfotransferase-1. J Biol Chem. 2000;275(34):25926-30.
- 151. Roblek M., Protsyuk D., Becker P.F., Stefanescu C., Gorzelanny C., Glaus Garzon J.F., Knopfova L., Heikenwalder M., Luckow B., Schneider S.W. and Borsig L. CCL2 Is a Vascular Permeability Factor Inducing CCR2-Dependent Endothelial Retraction during Lung Metastasis. Mol Cancer Res. 2019;17(3):783-93.
- 152. Romero-Garcia V., Theocharis G., Richoux O., Merkel A., Tournat V. and Pagneux V. Perfect and broadband acoustic absorption by critically coupled subwavelength resonators. Sci Rep. 2016;6:19519.
- 153. Rops A.L., Loeven M.A., van Gemst J.J., Eversen I., Van Wijk X.M., Dijkman H.B., van Kuppevelt T.H., Berden J.H., Rabelink T.J., Esko J.D. and van der Vlag J. Modulation of heparan sulfate in the glomerular endothelial glycocalyx decreases leukocyte influx during experimental glomerulonephritis. Kidney Int. 2014;86(5):932-42.
- 154. Rutkowski P. and Blank C. Dabrafenib for the treatment of BRAF V600-positive melanoma: a safety evaluation. Expert Opin Drug Saf. 2014;13(9):1249-58.
- 155. Sadir R., Imberty A., Baleux F. and Lortat-Jacob H. Heparan sulfate/heparin oligosaccharides protect stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12 against proteolysis induced by CD26/dipeptidyl peptidase IV. J Biol Chem. 2004;279(42):43854-60.
- 156. Samuel E., Moore M., Voskoboynik M., Shackleton M. and Haydon A. An update on adjuvant systemic therapies in melanoma. Melanoma Manag. 2019;6(3):MMT28.
- 157. Santin A.D., Bellone S., Palmieri M., Bossini B., Dunn D., Roman J.J., Pecorelli S., Cannon M. and Parham G.P. Effect of blood transfusion during

- radiotherapy on the immune function of patients with cancer of the uterine cervix: role of interleukin-10. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2002;54(5):1345-55.
- 158. Santin A.D., Zhan F., Bellone S., Palmieri M., Cane S., Bignotti E., Anfossi S., Gokden M., Dunn D., Roman J.J., O'Brien T.J., Tian E., Cannon M.J., Shaughnessy J., Jr. and Pecorelli S. Gene expression profiles in primary ovarian serous papillary tumors and normal ovarian epithelium: identification of candidate molecular markers for ovarian cancer diagnosis and therapy. Int J Cancer. 2004;112(1):14-25.
- 159. Sarvaiya P.J., Guo D., Ulasov I., Gabikian P. and Lesniak M.S. Chemokines in tumor progression and metastasis. Oncotarget. 2013;4(12):2171-85.
- 160. Schedel F., Mayer-Hain S., Pappelbaum K.I., Metze D., Stock M., Goerge T., Loser K., Sunderkotter C., Luger T.A. and Weishaupt C. Evidence and impact of neutrophil extracellular traps in malignant melanoma. Pigment Cell Melanoma Res. 2020;33(1):63-73.
- 161. Schenauer M.R., Yu Y., Sweeney M.D. and Leary J.A. CCR2 chemokines bind selectively to acetylated heparan sulfate octasaccharides. J Biol Chem. 2007;282(35):25182-8.
- 162. Schmielau J., Nalesnik M.A. and Finn O.J. Suppressed T-cell receptor zeta chain expression and cytokine production in pancreatic cancer patients. Clin Cancer Res. 2001;7(3 Suppl):933s-9s.
- 163. Schultz S. and Mastrangelo M.J. The pathophysiology and staging of cutaneous malignant melanoma. Semin Oncol. 1989;16(1 Suppl 1):27-33.
- 164. Shankaran V., Ikeda H., Bruce A.T., White J.M., Swanson P.E., Old L.J. and Schreiber R.D. IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. Nature. 2001;410(6832):1107-11.
- 165. Sheng G.J., Oh Y.I., Chang S.K. and Hsieh-Wilson L.C. Tunable heparan sulfate mimetics for modulating chemokine activity. J Am Chem Soc. 2013;135(30):10898-901.
- 166. Sierra-Filardi E., Nieto C., Dominguez-Soto A., Barroso R., Sanchez-Mateos P., Puig-Kroger A., Lopez-Bravo M., Joven J., Ardavin C., Rodriguez-Fernandez J.L., Sanchez-Torres C., Mellado M. and Corbi A.L. CCL2 shapes macrophage polarization by GM-CSF and M-CSF: identification of CCL2/CCR2-dependent gene expression profile. J Immunol. 2014;192(8):3858-67.

- 167. Siska P.J., Beckermann K.E., Mason F.M., Andrejeva G., Greenplate A.R., Sendor A.B., Chiang Y.J., Corona A.L., Gemta L.F., Vincent B.G., Wang R.C., Kim B., Hong J., Chen C.L., Bullock T.N., Irish J.M., Rathmell W.K. and Rathmell J.C. Mitochondrial dysregulation and glycolytic insufficiency functionally impair CD8 T cells infiltrating human renal cell carcinoma. JCI Insight. 2017;2(12).
- 168. Siveen K.S. and Kuttan G. Role of macrophages in tumour progression. Immunol Lett. 2009;123(2):97-102.
- 169. Spranger S. and Gajewski T.F. Impact of oncogenic pathways on evasion of antitumour immune responses. Nat Rev Cancer. 2018;18(3):139-47.
- 170. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A. and Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin. 2021;71(3):209-49.
- 171. Swerdlow A.J., English J., MacKie R.M., O'Doherty C.J., Hunter J.A., Clark J. and Hole D.J. Benign melanocytic naevi as a risk factor for malignant melanoma. Br Med J (Clin Res Ed). 1986;292(6535):1555-9.
- 172. Tanaka Y., Kimata K., Adams D.H. and Eto S. Modulation of cytokine function by heparan sulfate proteoglycans: sophisticated models for the regulation of cellular responses to cytokines. Proc Assoc Am Physicians. 1998;110(2):118-25.
- 173. Thomas N.E., Kricker A., Waxweiler W.T., Dillon P.M., Busman K.J., From L., Groben P.A., Armstrong B.K., Anton-Culver H., Gruber S.B., Marrett L.D., Gallagher R.P., Zanetti R., Rosso S., Dwyer T., Venn A., Kanetsky P.A., Orlow I., Paine S., Ollila D.W., Reiner A.S., Luo L., Hao H., Frank J.S., Begg C.B., Berwick M., Genes E. and Melanoma Study G. Comparison of clinicopathologic features and survival of histopathologically amelanotic and pigmented melanomas: a population-based study. JAMA Dermatol. 2014;150(12):1306-314.
- 174. Tokunaga T., Ando T., Suzuki-Karasaki M., Ito T., Onoe-Takahashi A., Ochiai T., Soma M. and Suzuki-Karasaki Y. Plasma-stimulated medium kills TRAIL-resistant human malignant cells by promoting caspase-independent cell death via membrane potential and calcium dynamics modulation. Int J Oncol. 2018;52(3):697-708.
- 175. Tran K.T., Wright N.A. and Cockerell C.J. Biopsy of the pigmented lesion-when and how. J Am Acad Dermatol. 2008;59(5):852-71.

- 176. Tumorzentrum-München. Maligne Melanome, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge: Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München; 2011.
- 177. Vallet S.D., Clerc O. and Ricard-Blum S. Glycosaminoglycan-Protein Interactions: The First Draft of the Glycosaminoglycan Interactome. J Histochem Cytochem. 2021;69(2):93-104.
- 178. Vanheule V., Boff D., Mortier A., Janssens R., Petri B., Kolaczkowska E., Kubes P., Berghmans N., Struyf S., Kungl A.J., Teixeira M.M., Amaral F.A. and Proost P. CXCL9-Derived Peptides Differentially Inhibit Neutrophil Migration In Vivo through Interference with Glycosaminoglycan Interactions. Front Immunol. 2017;8:530.
- 179. Veldkamp C.T., Peterson F.C., Pelzek A.J. and Volkman B.F. The monomer-dimer equilibrium of stromal cell-derived factor-1 (CXCL 12) is altered by pH, phosphate, sulfate, and heparin. Protein Sci. 2005;14(4):1071-81.
- 180. Voit C., Proebstle T.M., Winter H., Kimmritz J., Kron M., Sterry W. and Schwurzer M. Presurgical ultrasound-guided anchor-wire marking of soft tissue metastases in stage III melanoma patients. Dermatol Surg. 2001;27(2):129-32.
- 181. von Luettichau I., Segerer S., Wechselberger A., Notohamiprodjo M., Nathrath M., Kremer M., Henger A., Djafarzadeh R., Burdach S., Huss R. and Nelson P.J. A complex pattern of chemokine receptor expression is seen in osteosarcoma. BMC Cancer. 2008;8:23.
- 182. von Palubitzki L., Wang Y., Hoffmann S., Vidal Y.S.S., Zobiak B., Failla A.V., Schmage P., John A., Osorio-Madrazo A., Bauer A.T., Schneider S.W., Goycoolea F.M. and Gorzelanny C. Differences of the tumour cell glycocalyx affect binding of capsaicin-loaded chitosan nanocapsules. Sci Rep. 2020;10(1):22443.
- 183. Wang Y., Liu X., Obser T., Bauer A.T., Heyes M., Starzonek S., Zulal M., Opitz K., Ott L., Riethdorf S., Lange T., Pantel K., Bendas G., Schneider S.W., Kusche-Gullberg M. and Gorzelanny C. Heparan sulfate dependent binding of plasmatic von Willebrand factor to blood circulating melanoma cells attenuates metastasis. Matrix Biol. 2022.
- 184. Watson H.A., Holley R.J., Langford-Smith K.J., Wilkinson F.L., van Kuppevelt T.H., Wynn R.F., Wraith J.E., Merry C.L. and Bigger B.W. Heparan sulfate inhibits hematopoietic stem and progenitor cell migration and engraftment in mucopolysaccharidosis I. J Biol Chem. 2014;289(52):36194-203.

- 185. Wculek S.K. and Malanchi I. Neutrophils fan cancer's flames. EMBO J. 2015;34(17):2211-2.
- 186. Whitelock J.M., Murdoch A.D., Iozzo R.V. and Underwood P.A. The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. J Biol Chem. 1996;271(17):10079-86.
- 187. Wick M.M. Levodopa and dopamine analogs as DNA polymerase inhibitors and antitumor agents in human melanoma. Cancer Res. 1980;40(5):1414-8.
- 188. Wu W., Zhang X., Qin H., Peng W., Xue Q., Lv H., Zhang H., Qiu Y., Cheng H., Zhang Y., Yu Z. and Shen W. Modulation of tumor cell migration, invasion and cell-matrix adhesion by human monopolar spindle-one-binder 2. Oncol Rep. 2015;33(5):2495-503.
- 189. Xu Y.J., Miao H.Q., Pan W., Navarro E.C., Tonra J.R., Mitelman S., Camara M.M., Deevi D.S., Kiselyov A.S., Kussie P., Wong W.C. and Liu H. N-(4-{[4-(1H-Benzoimidazol-2-yl)-arylamino]-methyl}-phenyl)-benzamide derivatives as small molecule heparanase inhibitors. Bioorg Med Chem Lett. 2006;16(2):404-8.
- 190. Yagerman S. and Marghoob A.A. Melanoma at the periphery of a congenital melanocytic nevus. J Am Acad Dermatol. 2013;69(5):e227-e8.
- 191. Yang Z., Luo W., Wang J., Tan Y., Fu R. and Fang B. Chemokine ligand 2 in the trigeminal ganglion regulates pain induced by experimental tooth movement. Angle Orthod. 2014;84(4):730-6.
- 192. Yoshida K., Yang B., Yang W., Zhang Z., Zhang J. and Huang X. Chemical synthesis of syndecan-3 glycopeptides bearing two heparan sulfate glycan chains. Angew Chem Int Ed Engl. 2014;53(34):9051-8.
- 193. Zeng T., Tu F., Ma L., Yan C., Yang N., Zhang X., Yue B. and Ran J. Complete mitochondrial genome of blood pheasant (Ithaginis cruentus). Mitochondrial DNA. 2013;24(5):484-6.
- 194. Zlotnik A., Burkhardt A.M. and Homey B. Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. Nat Rev Immunol. 2011;11(9):597-606.
- 195. Zou Y.R., Kottmann A.H., Kuroda M., Taniuchi I. and Littman D.R. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. Nature. 1998;393(6685):595-9.

## 8. Danksagung

Mein Dank gilt zahlreichen Personen, die am guten Gelingen der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Zunächst möchte ich meinen besonderen Dank meinem Doktorvater, Prof. Stefan W. Schneider aussprechen, der mir die Möglichkeit gab, meine Dissertation unter seiner Leitung zu schreiben. Ich bedanke mich für die Gelegenheit in der Forschungsgruppe der Abteilung für experimentelle Dermatologie an dem Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf zu arbeiten und für die Unterstützung während der gesamten Zeit meiner Arbeit.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Christian Gorzelanny, der mich stets mit hilfreichen Diskussionen, wertvollen Ratschlägen und kreativen Vorschlägen unterstützt hat. Danke für deine Gelassenheit und deinen Humor während der gesamten Zeit und vor allem für deine verständnisvolle Unterstützung und deine Ermutigung.

Darüber hinaus danke ich Dr. Alexander T. Bauer, Dr. Volker Huck und Christian Meß für ihre wissenschaftliche Unterstützung und viele hilfreiche Anregungen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Sabine Vidal-Sy und Ewa Wladykowski dafür bedanken, dass ich methodisch viel von ihnen lernen konnte, ihre Arbeitsorganisation und Struktur kennenlernen und ihre Freude an der Arbeit und an guten Ergebnissen teilen durfte.

Danke an die Yuanyuan Wang und Xiaobo Liu für ihre große Hilfe und technische Unterstützung.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und Freunden für ihre bedingungslose Unterstützung und Ermutigung bedanken.

Danke euch allen!

## 9. Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

## 10. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift:	
---------------	--