

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Dermatologisches Zentrum des Elbe-Klinikum-Buxtehude
Leiter Dr. rer. nat. R. Greinert und Dr. rer. nat. B. Volkmer / Prof. Dr. med. E. Breitbart

Nachweis einer miRNA-basierten Klassifizierung für die Unterscheidung des Ansprechens und Nicht-Ansprechens von Melanompatienten auf Immun-Checkpoint-Inhibition- (ICI-) Therapie

*-Vergleich von einzelnen miRNAs (miR-34a) und
Multi-miRNA-Expressionsmustern-*

Dissertation

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

vorgelegt von:
Ramona Lawrenz aus Altdöbern

Hamburg 2022

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 13.03.2023**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:
Prof. Dr. Francis Ayuketang Ayuk**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:
Prof. Dr. Eckhard Breitbart**

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Malignes Melanom	4
1.1.1	BRAF in der Melanomgenese	6
1.1.2	PD-L1	8
1.1.3	CTLA-4	10
1.2	Biomarker	12
1.2.1	Biomarker im Bereich der PD-1 ICI-Therapien	13
1.3	Epigenetik	16
1.3.1	DNA Methylierung (Promotormethylierung)	16
1.3.2	Histonmodifikation	17
1.3.3	Micro-RNA (miRNA)	17
1.3.4	miRNA-Nomenklatur	21
1.3.5	miRNAs und Melanom (-Therapie)	21
1.3.6	miR-34 und PL-L1 Signalweg	22
1.3.7	miRNA-Netzwerk und PD-L1-Signalweg	24
1.4	Arbeitshypothese und Zielsetzung	26
2	Patienten, Flusszytometrie, Material und Methoden	28
2.1	Patienten	28
2.2	Flusszytometrie	33
2.2.1	FirePlex-Methode	33
2.2.2	Hypothesen-getriebene Auswahl von Kandidaten-miRNAs	34
2.3	Material und Methoden	36
2.3.1	Blutentnahme und Plasma-Präparation	36
2.3.2	Präparation der Proben für die Flusszytometrie und Auswertung der flusszytometrischen Messungen	36
2.3.3	Statistische, bioinformatische Methoden	38
2.3.4	miRNA Panel	39
2.3.5	Weitere Blutwerte, die im Rahmen dieser Arbeit als (mögliche) Biomarker getestet wurden	39
3	Ergebnisse	42
3.1	Nutzung der flusszytometrischen FirePlex®-Methode zur Detektion von miRNA-Expression im Plasma von Melanompatienten	42

3.2	Ergebnisse für miR-34a-5p	44
3.3	Bedeutung der Analyse von multiplen miRNA-Expressions-Mustern im Plasma von Melanompatienten in Bezug auf die Unterscheidung von respondern und non-respondern bei der Immuncheckpoint- Therapie.....	48
3.4	Das miRNA-Quintett.....	51
3.5	Statistische Analyse des miRNA-Quintetts für die Unterscheidung von respondern und non-respondern auf PD-1 Therapie.....	52
4	Diskussion.....	56
5	Zusammenfassung.....	66
6	Abkürzungsverzeichnis	68
7	Tabellenverzeichnis	71
8	Abbildungsverzeichnis	72
9	Literaturverzeichnis.....	75
10	Internetquellen	85
11	Danksagung.....	86
12	Lebenslauf	87
13	Eidesstattliche Erklärung.....	88

Gender Hinweis

In dieser Arbeit wird aus Gründen der besseren Lesbarkeit das generische Maskulinum verwendet. Weibliche und anderweitige Geschlechteridentitäten werden dabei ausdrücklich mitgemeint, soweit es für die Aussage notwendig ist.

1 Einleitung

Bis vor 10 Jahren galt das maligne Melanom noch als therapieresistent, jedoch gibt es neue Hoffnung für die Behandlung schwerer, fortgeschrittener Krebserkrankungen. Das erweiterte Verständnis der Ätiologie des malignen Melanoms (MM) und der Mechanismen der Deaktivierung der körpereigenen Immunantwort durch den Tumor haben in den letzten Jahren zur Entwicklung, hauptsächlich zweier, Erfolg versprechender Therapieverfahren für das MM beigetragen:

- der Einsatz von Inhibitoren im MAPK-Signalweg (vgl. Kap. 1.1.1, BRAF-, MEK-Inhibitoren)
- die Beeinflussung sog. Immun-Checkpoints durch gezielte Antikörper (vgl. Kap. 1.2.3, z.B. PD1- PD-L1-Antikörper)

Diese Therapieformen scheinen ausgesprochen zukunftssträchtig und erfolgreich. Allerdings sind sie immer noch mit einer Zahl von Nebenwirkungen verbunden und mit einer noch nicht genauen Bestimmung von Patienten verbunden, die auf die Therapie reagieren oder nicht.

Es bedarf daher der Erforschung und Entwicklung klinisch einfacher und schnell zugänglicher Biomarker, welche das Verständnis der Melanomgenese und der Therapiemöglichkeiten und des Therapieerfolges prognostizieren können.

Die Gewinnung von Biomarkern sollte dabei so wenig invasiv wie zeitaufwendig sein, um, individuell, im Bereich einer molekularen Diagnostik und der Präzisionsmedizin, klinisch, schnell reagieren zu können.

In den letzten Jahren haben sich MikroRNAs (miRNAs), welche in „liquid biopsies“ in vielen Körperflüssigkeiten (Vollblut, Plasma, Liquor, Speichel, etc.) nachgewiesen werden können, als leicht zugängliche Kandidaten für diagnostische, prognostische und evtl. prädiktive Biomarker herausgestellt.

In dieser Arbeit wird daher insbesondere untersucht, ob miRNA-Expressionsmuster im Plasma von Melanompatienten genutzt werden können, um Aussagen über ein Ansprechen auf eine Immuncheckpoint-Inhibition im Bereich der Melanomtherapie machen zu können.

1.1 Malignes Melanom

Das maligne Melanom ist der Hauttumor mit der größten Metastasierungsrate und für mehr als 90% der Sterbefälle bei Hauttumoren verantwortlich. Nach Hochrechnungen der Gesellschaft für epidemiologische Krebsregistrierung in Deutschland e.V. (GEKID) und Zentrum für Krebsregisterdaten aus dem Jahr 2021, lag die Inzidenz für das MM in Deutschland im Jahr 2018 bei rund 22.890 Personen. Inklusive melanoma in-situ lag die Anzahl bei 36.371 Neuerkrankungen.

Ca. 3000 Menschen verstarben am MM. Das mittlere Erkrankungsalter der Frauen liegt bei 62 Jahren vergleichsweise niedrig. Männer erkranken im Mittel 6 Jahre später.

Viele maligne Melanome können im Frühstadium detektiert und durch Exzision kuriert werden. Das 5-Jahre overall survival liegt bei 91 %. Patienten, die in einem frühen Stadium des MM diagnostiziert werden, besitzen sogar eine 5-Jahres-Überlebensrate von bis zu 98 %. Dieser Überlebensanteil sinkt aber drastisch auf 63% bzw. 16 % (oder niedriger) beim Vorliegen von regionalen oder Fernmetastasen (Riefolo et al. 2019). Das Stadium IV, das fernmetastasierte maligne Melanom, gilt als eine der aggressivsten Krebserkrankungen mit einer der schlechtesten Prognosen. Die Wahrscheinlichkeit, nach 5 Jahren noch zu leben, liegt bei lediglich 5-10 % und die Lebenserwartung umfasst häufig nur etwa 6 bis 10 Monate (Leung et al. 2013). Die therapeutischen Möglichkeiten sind begrenzt: Die einzigartige Biologie des Tumors macht es schwierig vorherzusagen, wohin er streuen wird.

Nach dem Robert-Koch-Institut versterben ca. 3000 Menschen jährlich an einem malignen Melanom. Die Zahl der jährlich neu aufgetretenen Fälle (Inzidenz) in Deutschland hat sich seit 1970 mehr als verfünffacht. Allerdings ist die Sterblichkeit an dieser Erkrankung im gleichen Zeitraum nur bei den Männern leicht angestiegen (1593 Sterbefälle im Jahr 2017 und 1789 Sterbefälle im Jahr 2019) (www.rki.de).

Es handelt sich beim MM um ein komplexes, heterogenes Krankheitsbild, indem Störungen unterschiedlicher molekularer Signalwege in die Tumorgenese involviert sind. Von Bedeutung sind genetische Veränderungen und epigenetische Modifikationen, welche im Zusammenspiel an der Entstehung, Promotion und

Progression des MM beteiligt sind (Shtivelman et al. 2014). Als Hauptrisikofaktor für die Entstehung des MM wird solare und künstliche (Solarien) UV-Exposition angesehen (Gandini et al. 2005a, 2005b, 2005c). Pleasance und Mitarbeiter katalogisierten 2010 zum ersten Mal das gesamte Spektrum somatischer Mutationen im Gesamt-Genom einer Melanom-Metastase (Pleasance et al. 2010). Dabei stellte sich heraus, dass die Mehrzahl (ca. 70 %) der detektierten Einzelbasen-Substitutionen vom Typ C→T und ca. 70 % der Dinukleotid-Substitutionen vom Typ CC→TT waren. Da bekannt ist, dass es sich hierbei um UV-spezifische Mutationen („signature-mutations“) handelt (siehe Kapitel 3.1.2), stellt dieser Befund eine starke Korrelation zwischen malignem Melanom und UV-Exposition her (Pfeifer und Besaratinia 2012).

Maligne Melanome erscheinen häufig als bräunlich bis rötlich-bläuliche, schwärzliche, grau-weißliche, häufig asymmetrische Hautveränderungen. Sie können aber auch völlig pigmentfrei sein. Das MM tritt in den unterschiedlichsten klinischen Erscheinungsformen auf und kann in allen Bereichen der menschlichen Haut, der behaarten Kopfhaut, den Schleimhäuten des Auges, Mund, Genitale, auch unter den Fußnägeln und den Fingernägeln vorkommen. Darüber hinaus in allen Organen ektodermalen Ursprungs wie z. B. den Hirnhäuten, der Galle etc. Die unterschiedlichen Formen, die häufige Asymmetrie, die aber nicht zwingend vorliegen muss, die Verfärbungen und sekundären Veränderungen wie Nässen, Krustenbildung, unterstreichen die außerordentliche Vielfalt dieses Tumors im klinischen Bild. Das maligne Melanom hat keine definierte Vorstufe. Die klinische Diagnosestellung erfordert auch deshalb langjährige Erfahrung, da eine außerordentliche hohe Anzahl an möglichen Differentialdiagnosen vorliegt. Gemäß ihres Wachstumsmusters werden klinisch vier Haupttypen unterschieden.

1. Das Lentigo maligne Melanom (LMM), das als Voraussetzung eine chronisch UV-geschädigte Haut benötigt und aus diesem Grunde auch in den UV-geschädigten Arealen vorkommt,
2. das superfiziell spreitende Melanom (SSM),
3. das knotige/noduläre Melanom (NM) und
4. das akrolentiginöse Melanom (ALM).

In Abhängigkeit von seinem vertikalen Tumorwachstum führt das MM sehr schnell zur Metastasierung und ist für die höchste Mortalitätsrate bei Hautkrebs verantwortlich.

Histopathologische Einteilung des malignen Melanoms:

(gemäß WHO 2006 histological classification of melanocytic tumours (LeBoit et al. 2006))

- Superfiziell spreitendes Melanom,
- Noduläres Melanom,
- Lentigo-maligna-Melanom,
- Akrolentiginöses Melanom,
- Desmoplastisches Melanom,
- Maligner blauer Nävus,
- Melanom auf großem kongenitalen Nävus,
- Nävoides Melanom,
- Spitzoides Melanom,
- Persistierendes Melanom.

Für das maligne Melanom wurde vom AJCC 2018 eine TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung vorgeschlagen, welche jetzt der Klassifikation des malignen Melanoms zugrunde liegt (AJCC, Gershenwald und Keung, 2017).

1.1.1 BRAF in der Melanomgenese

Mit der Tumorgenese des malignen Melanoms steht eine Vielzahl von mutierten Genen im Zusammenhang. Im Mittel liegt die Mutationsrate des malignen Melanoms höher als jene, die für andere aggressive Tumore berichtet wird. Eine Übersichtsarbeit von Shtivelman et. al. (2014) zeigt über 30 unterschiedliche Gene, deren Mutationsfrequenz zwischen 1-85% in unterschiedlichen untersuchten Melanomen liegt.

Das maligne Melanom zeigt bei ca. 50% eine BRAF Mutation. 90% dieser Mutationen führen zu einem Aminosäureaustausch von Valin (V) durch Glutamat (E) und zur Aminosäureänderung BRAF V600E. Andere Mutationen an der V600 Position führen zu anderen Aminosäuresubstitutionen (V600K, V600D, V600R).

Diese Veränderung treten weniger häufig auf (5-15%). BRAF- Mutationen treten relativ früh in der Melanomgenese auf und werden zu einem hohen Prozentsatz auch in benignen melanozytären Nävi gefunden. In diesen BRAF- mutierten Zellen wird ein Phenotyp induziert, der mit einem Zellzyklusarrest der V600E Zellen einhergeht. Dies wird als onkogen induzierte Senesenz bezeichnet. BRAF- Mutationen allein, können keine Melanome induzieren. Hierzu sind weitere Ereignisse in BRAF mutierten Melanozyten erforderlich, wie z.B. die Deletion im CDKN2A- oder im PTEN- Gen. Diese Mutationen zusammen führen zu einem vollständig kanzerogenen Phenotyp (Shtivelman et al. 2014, Flaherty et al. 2012a, Flaherty et al. 2012b).

Unabhängig von der vorgeschalteten EGFR/KRAS Kaskade führt die V600- Mutation im BRAF- Gen zu einer unkontrollierten Aktivierung des MAPK Signalwegs und somit zur unkontrollierten Zellproliferation. Die BRAF- Mutation ist ein molekulares Target der Therapie mittels Thyrosinaseinhibitoren (BRAF-Inhibitoren, (Vemurafenib (Zelboraf)). Die Melanome entwickeln nach kurzer Zeit eine Resistenz gegen BRAF- Inhibitoren. Die „downstream targets“ wie MEK und ERK liegen wieder aktiviert vor und stimulieren das unkontrollierte Zellwachstum. Sog. MEK- Inhibitoren (Tranetinib, EZ 05/2013 in den USA) hemmen einen weiteren Schritt im MAP- Kinase- Signalweg und wirken somit dieser Resistenz entgegen. BRAF- Mutationen treten häufiger in Melanomen auf, die sich auf intermittierend UV- exponierter Haut entwickeln. Seltener treten BRAF- Mutationen bei akralen und mukosalen Melanomen auf. Neben den BRAF-Mutationen treten beim malignen Melanom auch gehäuft aktivierende Mutationen in NRAS auf (in 20-30% der Melanome). Das Auftreten von NRAS-Mutationen schließt typischerweise eine Mutation in BRAF aus, so dass diese Mutationen immer exklusiv auftreten. Allerdings sind Mutationen in NRAS unter Therapie bei einem BRAF-mutierten Melanom als möglicherweise Resistenz-verursachende Mutation beschrieben. Trotz vielversprechender früher klinischer Daten profitieren nur wenige Patienten mit einem NRAS-mutierten Melanom von einer Therapie mit einem MEK-Inhibitor (Shtivelman et al. 2014).

1.1.2 PD-L1

Tumoren haben Mechanismen entwickelt, die sie in die Lage versetzen, sich aktiv einer Immunantwort zu entziehen („immune escape“), indem sie sich selbst z.B. vor einer tumorspezifischen T- Zell- Reaktion schützen (Christofi et al. 2019, Khair et al. 2019). Eine der Möglichkeiten ist dabei die Interaktion von Tumor-exprimiertem PD-L1 und T-Zell-ständigem PD-L1 Rezeptor PD-1. Normalerweise findet man den PD-L1-Liganden auf antigenpräsentierenden Zellen, um die periphere T-Zellantwort zu beenden, wenn diese nicht mehr gebraucht wird. Aber auch Tumorzellen sind in der Lage den PD-L1-Liganden zu exprimieren, wodurch die Tumorzelle in die Lage versetzt wird, der Immunantwort standzuhalten (Swart et al. 2016, Havel et al. 2019). Dieser, vom Tumor ausgehender Mechanismus (Tumor-Counterattack), bewirkt somit eine, auch als „tumor escape, tumor evasion“ bezeichnete Abwehr gegen eine Eliminierung durch das Immunsystem. Besonders häufig exprimieren „immunogene“ Tumorentitäten PD-L1. Hierzu gehören das maligne Melanom, das nicht- kleinzellige Lungen-, Urothel- und das Nierenzellkarzinom (Christofi et al. 2019).

Das Typ-I- Transmembranprotein PD-L1 (B7-H1, CD 274) ist ein T-Lymphozyten hemmendes Molekül. PD-L1 wird vom PDCD1L1-Gen (Chromosom: 9p24.1) codiert. PD-L1 findet man auf APC's, T- Zellen, B- Zellen, Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen (DC's) und setzt ein inhibitorisches Signal durch Bindung an den Rezeptor PD-1 tragende T- Zellen (die T-Zelle mit PD-1 wird gehemmt). Der PD-1/PD-L1 Komplex wirkt in beide Richtungen hemmend und induziert Apoptose in effector-T-Lymphozyten (Havel et al. 2019, Yang et al. 2013).

In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass PD-L1 in Tumorgewebe verschiedener Krebsarten exprimiert wird und als Hochrisikofaktor gilt (Wang X et al. 2015). Durch Erhöhung der inflammatorischen Zytokine wie IFN-Gamma, TNF- alpha und IL-2 wurde in soliden Tumoren eine erhöhte Expression von PD-L1 gemessen (Havel et al. 2019).

Neben PD-L1 existiert noch ein weiterer programmed cell death ligand, PD-L2 (B7-DC, CD273). Er stellt ebenfalls ein Typ I Transmembran-Protein dar und wird durch das Gen PDCD1LG (Chromosome 9p24.1) kodiert. PD-L2 zeigt eine deutliche verminderte Verbreitung auf als PD-L1. Es ist auf aktivierten Antigen-

präsentierenden Zellen (APC's) vermehrt vorhanden. Ebenso auf Monozyten, Makrophagen und DC's. PD-L2 trägt wie PD-L1 extrazellulär eine IgC- und IgV-Domäne. PD-L2 wird nach Stimulierung durch IL-4, NF- κ B, IFN- γ und GM-CSF (Granulocyte/ Monocyte Colony- Stimulating Factor) hochreguliert (Pentcheva-Hoang et al. 2007).

Das Programmed cell death 1 protein, kurz PD-1 (PDCD1-Gen, Chromosom 2q37.3), ist das Rezeptormolekül für PD-L1. Es spielt eine wichtige Rolle in der Down-Regulation des Immunsystems und Unterdrückung der T-Zell-Funktion. PD-1 wird von aktivierten T- Zellen exprimiert (Havel et al. 2019).

PD-1 ist ein Typ-I- Transmembranprotein, bestehend aus 288 Aminosäuren. Das kodierende Gen PDCD1 liegt auf Chromosom 2 und enthält 5 Exons. Die Struktur von PD-1 setzt sich aus einer extrazellulären IgV- ähnlichen Immunglobulin- Domäne, einer Verbindungsdomäne, einer Transmembran- Domäne und einer Intrazellulär- Domäne zusammen. Die Intrazellulärdomäne trägt 2 Tyrosin- gebundene Signalmotive, einmal das Immunoreceptor tyrosine- based inhibitory motif (ITIM) und sowie das Immunoreceptor tyrosine- based switch motif (ITSM) (Grenwald et al. 2005).

Wenn immunkompetente Zellen einen PD-1-Liganden, wie PD-L1, auf der Oberfläche von somatischen Zellen erkennen, wird dadurch das „Signal“ vermittelt, dass es sich um eine körpereigene Zelle handelt worauf das Immunsystem inhibierte, Eigen-Toleranz unterstützt und Autoimmunität unterdrückt wird. Der PD-1 checkpoint reguliert das Immunsystem, normalerweise, durch die Induktion von Apoptose in gereiften T-Zellen, die körpereigene Antigene in den Lymphknoten erkennen. Darüber hinaus unterdrückt PD-1 die Apoptose von regulativen T-Zellen (Treg), anti-inflammatorischen Zellen, die die Immunantwort auf körpereigene Zellen unterdrücken. Diese Mechanismen schützen, normalerweise, das Gewebe vor Schädigungen z.B. bei der anti-mikrobiellen Immunantwort.

In Tumoren, einschließlich des malignen Melanoms, ist nun aber PD-L1/2 häufig über-exprimiert, so das über Bindung an den PD1-Rezeptor die Tumoren in die Lage versetzt werden, die Immunantwort auf den Tumor effektiv „abzuschalten“ und so einer Zerstörung durch eine intakte Immunantwort zu entkommen (Christofi et al. 2019).

Experimentelle Untersuchungen und klinischen Studien belegen, dass für die „tumor immune evasion“ einer Vielzahl von unterschiedlichen Krebsentitäten die PD1-PD-L1-Achse genutzt wird, um eine effektive Eliminierung der (an sich) immunogenen Tumorzellen durch eine intakte Immunantwort zu verhindern (Havel et al. 2019, Davis et al. 2019, Passarelli et al. 2017, Topalian et al. 2015).

Nach der Aufklärung der Mechanismen, welche den PD-1/PD-L1 Immun-Checkpoint charakterisieren, gelang es in den letzten Jahren monoklonale Antikörper zu entwickeln, welche die Bindung von PD-L1 und PD-1 unterbinden und somit wieder eine gezielte Immunantwort auf das Vorhandensein von Tumorzellen erlauben

Die PD1Antikörper Nivolumab und Pembrolizumab sind jetzt für eine Zahl von Tumorentitäten (Shtivelman et al, 2014) für die „immune checkpoint inhibition“ (ICI) zugelassen. Für das nicht resektierbare maligne Melanom der Haut sogar als „first-line treatment“ in den USA und der EU (Swart et al. 2016). PD-L1-Antikörper (Atezolizumab) wurden für die Behandlung von Blasenkrebs zugelassen (Rosenberg et al. 2016). Auch wenn für die ICI gezeigt werden konnte, dass sie einen Gewinn für das Langzeit-Überleben darstellt (ca. 16% der Patienten waren 5-Jahres-Überlebende (Gettinger et al. 2018)), ist die Effizienz der ICI-Therapie immer noch gering. Die objektive Responserate (ORR) einer monoklonalen Antikörper-Therapie des PD1/PD-L1 Checkpoints liegt nur zwischen 10-40 % (Yang Q et al. 2018).

1.1.3 CTLA-4

Das zytotoxische T-Lymphozyten-assoziierte Protein 4 („cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4, CTLA-4) ist ein weiteres inhibitorisches Molekül, welches auf T-Zellen (auch auf regulatorischen T-Zellen, Treg) exprimiert wird und in die negative Regulation der T-Zell-Interaktion mit Antigen-präsentierenden Zellen (APC) involviert ist (Shtivelman et al. 2014). Die Expression von CTLA-4 auf der T-Zelloberfläche ist beim Vorliegen von Melanomen oft erhöht und führt zur sog. T-Lymphozyten Anergie, also der Unfähigkeit von T-Lymphozyten auf spezifische Antigene zu reagieren. CTLA-4 bindet kompetitiv zum CD28-Rezeptor (beide auf der Oberfläche von T-Zellen) und CD80 und CD86 Moleküle, die auf APCs präsentiert werden. Dabei bindet CTLA-4 mit viel höherer Affinität als CD28 an die

ko-stimulatorischen Moleküle (CD80/86), was zu einer Inaktivierung der T-Lymphozyten führt (Simiczyjew et al. 2020). Das führt zu einem immun-suppressiven Phänotyp der T-Lymphozyten im Tumor-Mikroenvironment. Wenn hingegen über Antikörper (z.B. Ipilimumab, vgl. Tabelle 1) die Bindung von CTLA-4 an APCs verhindert wird kann die Immunantwort auf den Tumor wieder erfolgen und stellt somit die Grundlage für eine weitere Immun-Checkpoint-Inhibition in der Therapie des Melanoms dar (Shtivelman et al. 2014, Swart et al. 2016, Simiczyjew et al. 2020)

Tabelle 1: Targetmoleküle und Antikörper, die bei der ICI des Melanoms eingesetzt werden

Target	Antikörper für die ICI
CTLA-4	Ipilimumab, Tremelimumab
PD-1	Nivolumab, Pembrolizumab, Cemiplimab
PD-L1	Atezulizumab, Avelumab

1.2 Biomarker

Eines der großen Ziele der modernen Felder der Präzisionsmedizin und der individualisierten Medizin ist es, leicht zugängliche genetische, molekulare und zelluläre Marker zu charakterisieren, welche Aufschlüsse über die, mit einem Krankheitsgeschehen einhergehenden, Veränderungen (Initiation von Krankheitsbildern, Progression, Metastasierung, Ansprechen auf Therapien, etc.) im Patienten zu entdecken und nachzuverfolgen. Diese Marker sollen für den Arzt/Wissenschaftler leicht (und möglichst minimal-invasiv) zugänglich sein und ihm schnell notwendige Indikatoren für eine Krankheit bzw. einen Krankheitsverlauf liefern. Marker, die diese Charakteristika erfüllen werden als Biomarker bezeichnet. Entsprechend einer Definition der WHO handelt es sich dabei um;

- „...any substance, structure or process that can be measured in the body or its products and that can influence or predict the incidence or outcome of disease.“
(WHO. International Program on Chemical Safety Biomarkers in Risk Assessment)

Die einfache und minimal-invasive Zugänglichkeit wird seit ca. 10 Jahren durch die Untersuchung und Analyse von Flüssigbiopsien („liquid biopsies“) aus unterschiedlichen Körperflüssigkeiten (Blut, Urin, Speichel, Liquor, etc.) gewährleistet (Reimers und Pantel 2019, Kalia 2015, Lianidou und Pantel 2019).

Bei den Biomarkern kann man im Allgemeinen in 3 Kategorien unterscheiden (Lim et al. 2018):

1. Diagnostische Biomarker
2. Prognostische Biomarker
3. Prädiktive Biomarker

Die ersten helfen bei der Diagnose einer bestimmten Krankheit, die zweiten geben Auskunft über einen Krankheitsverlauf (z.B. die Progression einer Tumorerkrankung) und letztere sollen Vorhersagen über das Ansprechen bestimmter Therapien bei (Tumor-) Erkrankungen machen.

In den letzten 10 Jahren stellte sich nun heraus, dass neben anderen Biomarkern in „liquid biopsies“ (z.B. zirkulierende Tumorzellen, freie zirkulierende DNA,

bestimmte Proteine, etc.), den Mikro-RNAs (miRNAs), unter anderem wegen ihrer hohen Stabilität in unterschiedlichen Körperflüssigkeiten, eine ganz besondere Bedeutung als Biomarker zukommt.

1.2.1 Biomarker im Bereich der PD-1 ICI-Therapien

Wie bei vielen zielgerichteten Therapien stellt sich auch bei den Immun-Checkpoint-Inhibitoren die Frage nach geeigneten Biomarkern, die das Therapieansprechen voraussagen (Pagni et al. 2019, Tunger et al. 2019). Dabei unterscheidet man die sogenannte „Companion“-Diagnostik, als eine für die Stratifizierung obligate, von den Zulassungsbehörden vorgeschriebene Testung und die fakultative, sogenannte „Complementary“-Diagnostik, welche bei Behandlungsintention zur Entscheidungsfindung beiträgt (Baretton 2016).

Der höchste prädiktive Stellenwert sowohl bei Anti-PD1- als auch Anti-PD-L1-Therapien wird derzeit dem immunhistologischen Nachweis der PD-L1-Expression der Tumorzellen zugeschrieben. Auch die Bedeutung einer PD-L1-Expression auf tumorassoziierten Immunzellen (Makrophagen und Lymphozyten) muss im Kontext mit dem verwendeten Assay und der jeweiligen Tumorentität beurteilt werden. Unabhängig vom verwendeten Testsystem wird für die PD-L1-Expression nur eine membranöse Anfärbung unabhängig von der Färbeintensität gewertet. Somit muss die Auswertung bei hoher Vergrößerung erfolgen, um auch eine schwache Ausprägung zu erfassen. Eine zytoplasmatische Färbung ist ohne Bedeutung, gleiches gilt für abgeschilferte Tumorzellen und Nekroseareale. Das Ergebnis lautet „% PD-L1 positive Tumorzellen/TC“ und entspricht dem „PD-L1-Status“ (Baretton 2016). In einer Studie mit dem PD-L1-Inhibitor Atezolizumab fand sich außer für die PD-L1-Expression in Tumorzellen auch ein unabhängiger prädiktiver Wert in den Tumor-assoziierten Immunzellen (SP142 Assay) (Garon et al. 2015).

Die hohe Expression des PD-L1 Proteins in Tumor (-Gewebe) wurde daher als „logischer“ Biomarker für die Prädiktion der ICI-Therapie identifiziert (Patel et al. 2015, Reck et al. 2016, Wallis et al. 2020) und z.B. von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) als Marker für die Initiierung der Therapie solider Tumoren (inkl. des malignen Melanoms) zugelassen (Davis und Patel 2019). Andererseits

zeigt sich aber auch, dass Patienten mit niedriger PD-L1-Expression auch einen klinischen Benefit einer PD1/PD-L1 ICI-Therapie erfahren (Yang Q et al. 2018). So profitierten z.B. Patienten mit nicht kleinzelligem Lungenkrebs (NSCLC) von einer ICI-Therapie, trotz geringem „tumor proportion score“ (TPS) für PD-L1 (TPS<1%) (Borghaei et al. 2015).

Diese Befunde konnten auch für das maligne Melanom bestätigt werden. Melanompatienten mit hoher PD-L1 Expression ($\geq 5\%$) zeigten unter ICI-Therapie eine bessere ORR (Weber et al. 2013). Es wurde aber auch eine gute ICI-Therapie-Antwort für Patienten mit niedriger PD-L1 dokumentiert (Daud et al. 2016, Carlino et al. 2018). Es wird spekuliert, dass das Ansprechen auf eine PD1/PD-L1 ICI-Therapie, bei sowohl niedriger als auch hoher PD-L1-Expression, in einer zeitlichen Dynamik der PD-L1-Expression, die durch Faktoren, wie z.B. die Interferon- γ -Produktion durch infiltrierende T-Zellen beeinflusst wird, unterliegt (Shtivelman et al. 2014). In diesem Zusammenhang stellt die gewebebezogene Bestimmung der PD-L1-Expression also keinen eindeutigen prädiktiven Marker dar (Yang Q et al. 2018).

Neben der PD-L1 (oder CTLA-4) Expression wurden eine Reihe anderer Biomarker allein oder in Kombination ausgetestet und eingesetzt, um prognostisch oder prädiktive Aussagen für die Therapie des malignen Melanoms und anderer Krebs-Entitäten machen zu können.

Darunter befanden sich z.B. Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TILs), das IFN- γ -signaling, Neoantigene und die Tumor-Mutationslast, die Microsatelliten-Instabilität, die Defizienz im „mismatch-repair“, Microbiota, Biomarker im peripheren Blut, präklinische Mausmodelle und epigenetische Biomarker. In vielen der Untersuchungen konnten aber keine eindeutigen prädiktiven Hinweise gefunden werden und/oder die statistische Signifikanz der Ergebnisse erschien zu niedrig (Pagni et al. 2019, Shen et al. 2019, Topalian et al. 2016, Pires da Silva et al. 2020, Perez-Guijarro et al. 2020). In einer kürzlich erschienenen Übersichtsarbeit fassen Ren et al. die Ergebnisse zusammen, die bisher zur Identifizierung von prädiktiven Biomarkern bei einer Resistenz gegenüber PD1/PD-L1 Krebs-Immuntherapien gewonnen werden konnten. Dabei werden sowohl die PD-L1 Expression, die Mutationslast, die Immunzell-Infiltration und die Funktion bestimmter Immunzellen als mögliche Marker diskutiert (Ren et al. 2020).

In großen Studien zeigt sich jedoch immer noch, dass sowohl bei Melanompatienten mit hoher PD-L1-Expression, aber auch mit niedriger Expression eine dauerhafte Therapieantwort mit Immun-Checkpoint-Inhibition (ICI) erreicht werden kann (Daud et al. 2016).

Darüber hinaus ist die Immuncheckpoint-Therapie des malignen Melanoms, trotz der teilweise beeindruckenden Erfolge, häufig noch mit ernst zu nehmenden, teilweise lebensbedrohenden Nebeneffekten („immune-related adverse events, irAEs) assoziiert (Puzanov et al. 2017).

Die Suche nach geeigneten, prädiktiven Biomarkern für eine frühzeitige Einschätzung einer Tumorthherapie, im Speziellen der Immun-Checkpoint-Therapie des malignen Melanoms, ist also weiterhin eine relevante, besonders wichtige wissenschaftliche und klinische Fragestellung.

In den letzten Jahren hat sich nun gezeigt, dass epigenetische Biomarker, insbesondere Mikro-RNAs (miRNAs), in Verbindung mit ihrem Nachweis in Flüssigbiopsien („liquid biopsies“) aus einer Vielzahl von Körperflüssigkeiten, vielversprechende Ansätze liefern, prognostische und prädiktive Biomarker zu finden.

1.3 Epigenetik

Die Krebsforschung hat sich über viele Jahrzehnte auf die genetischen Defekte und deren Bedeutung für die zelluläre Fehlfunktion fokussiert. In den letzten Jahren stellte sich jedoch heraus, dass auch epigenetisch bedingte Fehlregulationen von immenser Bedeutung sind. Epigenetische Veränderungen sind nach einer gängigen, akzeptierten Definition wie folgt charakterisiert:

„stable heritable phenotype resulting from changes in a chromosome without modification of the DNA-sequence“ (Patel und Kurzrock 2015).

Epigenetisch bedingte Fehlregulation können Einfluss auf die „hallmarks of cancer“ nehmen, oder gehören selber zu diesen (Hanahan und Weinberg 2011, You und Jones 2012, Shen und Laird 2013, Yao et al. 2014, Nebbioso et al. 2018, Cheishvili et al. 2015, Pfeifer 2018).

Durch genomweite Analysetechniken wurden eindeutige Beweise dafür geliefert, dass Störungen von epigenetischen Regulationsmechanismen, mit der Entstehung von Krebs, inkl. des malignen Melanoms assoziiert sind (Strub et al. 2020). In der epigenetischen Landschaft können hauptsächlich 3 Regulationsmechanismen beschrieben werden. Die DNA-Methylierung, die Histon-Modifikationen und die post-transkriptionelle Regulation der Proteinsynthese durch miRNAs.

1.3.1 DNA Methylierung (Promotormethylierung)

Methylierung von „CpG- islands“ in der Promotorregion einer Vielzahl von Tumorsuppressorgenen verhindert deren Expression und greift somit in die zelluläre Proteinfunktion ein, die mit der Pathogenese des malignen Melanoms verbunden ist. Diese Methylierung in der Promotorregion kann durch gezielte Demethylierung wieder aufgehoben werden und zur Gen- Aktivierung beitragen. Bei gleichzeitiger Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen und zusätzlichen Hypomethylierung im Gesamtgenom wird mittlerweile als „hallmark of cancer“ angesehen (Jeltsch et al. 2018).

So konnten Sakar et al. im Jahr 2015 berichten, dass der CDKN2A- Promotor in 19% primäre Melanome und in 33% der Melanom-Metastasen hypermethyliert vorliegt. Das CDKN2A- Gen kodiert für den Tumorsuppressor p16 und spielt eine wichtige Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus (Sarkar et al. 2015).

1.3.2 Histonmodifikation

Bei den Histonmodifikationen handelt es sich z.B. um die Phosphorylierung, Methylierungen und Azetylierungen bestimmter Aminosäure-Reste in den Histonproteinen der DNA. Die so epigenetisch modifizierten Histone generieren einen „histone code“, der, je nach epigenetischer Modifikation der Histone, in die Genregulation eingreift, indem z.B. euchromatische (offene, transkriptionell aktive Chromatinstrukturen), oder heterochromatische (kompakte, geschlossene, transkriptionell inaktive Chromatinstrukturen) generiert werden (Sarkar et al. 2015, Jenuwein und Allis 2001, Zhao und Shilatifard 2019).

Histonmodifikationen spielen in unterschiedlichen Entwicklungsphasen des malignen Melanoms eine bedeutende Rolle (Sarkar et al. 2015, Orouji und Utikal 2018, Moran et al. 2018). So konnte gezeigt werden, dass die Histonmethyltransferase SETDB1 oft stark amplifiziert im Genom des MM vorliegt und die Tri-Methylierung (me^3) des Lysinrestes in Position 9 (K9) des Histons H3 (H3K9me^3) katalysiert. Das geht mit der Repression einer Reihe von Targetgenen einher. Die Methyltransferase „enhancer of zeste homologue 2“ (EZH2) ist ebenfalls von immenser Bedeutung für die Pathogenese des MM (Mahmoud et al. 2016). Es handelt sich bei dieser Methyltransferase um die katalytische Untergruppe des „polycomb repressor complex 2“ (PRC2) welcher die Tri-Methylierung von H3K27 (H3K27me^3) katalysiert und dadurch eine dichte Packung des Chromatins in den betroffenen Gen-Regionen induziert, welche die Repression von Target-Genen einleitet. Die Proteinlevel von EZH2 steigen vom benignen Nävus in der Haut bis zur Entstehung des MM an und vermehrte Expression von EZH2 ist im hohem Maße mit unkontrollierter Zellproliferation im malignem Melanom assoziiert (Sarkar et al. 2015).

Für die epigenetische Regulation in der Ätiologie des malignen Melanoms ist weiterhin wichtig, festzuhalten, dass ein „crosstalk“ zwischen DNA-Methylierung und Histonmodifikationen existiert (Tiffen et al. 2020).

1.3.3 Micro-RNA (miRNA)

Im Rahmen der epigenetischen Regulationsmechanismen zellulärer Funktion sind in den letzten Jahren, neben der Promotormethylierung und den

Histonmodifikationen, immer häufiger regulatorische micro-RNAs (miRNAs,) in den Mittelpunkt des Interesses gelangt (Pichler und Calin 2015), insbesondere im Zusammenhang mit ihrer Rolle bei der Entstehung und Entwicklung von Krankheiten, mit besonderen Schwerpunkten auf Krebserkrankungen (Condrat et al. 2020, Dragomir et al. 2018, Adams et al. 2015, Iorio und Croce 2012). MicroRNAs (miRNAs) sind kleine (19-22 Nukleotide), nicht- Protein codierende RNAs, welche die Genexpression post-transkriptionell regulieren (Bartel 2004). Sie binden an mRNA und können die Translation eines Gens behindern oder die mRNA insgesamt degradieren. Derzeit wird die Anzahl der humanen „true mature miRNAs“ mit ca. 2300 abgeschätzt (Alles et al. 2019).

Die Reifung der miRNAs ist ein mehrstufiger Prozess (Creugny et al. 2018). MiRNA codierende Gene werden zunächst im Zellkern durch RNA Polymerase II oder III in einen Primär-Transkript (pri-miRNA) transkribiert. Danach unterziehen sich pri-miRNAs ihrer ersten Teilung, welche durch die RNase III Enzyme Drosha in einem Komplex mit dsRNA bindendem Protein DGCR8 (genannt Pasha) durchgeführt wird. Das Ergebnis sind ca. 70 Nukleotide lange, als stem-loop strukturierte, Vorläufer- miRNAs (pre-miRNA). Diese pre- miRNAs werden durch das Enzym Exportin 5/ Ran-GTP in das Zytoplasma transportiert und erhalten dort ihre zweite und letzte Teilung durch eine RNase Dicer/TRBP (transaktivierbare RNA-bindendes Protein). Die reife miRNA + Antisense-Strang (Doppelstrang RNA) enthält 19-22 bp. Reife miRNAs sind an einen RNA- induced silencing complex (RISC) angebunden, welcher die miRNA- induzierte Bindung an die Ziel-mRNAs vermittelt (Yates et al. 2013). Der miR-RISC-Komplex bindet hauptsächlich an die 3' unübersetzten Regionen (UTRs) spezifischer Ziel-mRNAs und unterdrückt und verhindert somit die Translation in Protein (s.a. Abb. 1).

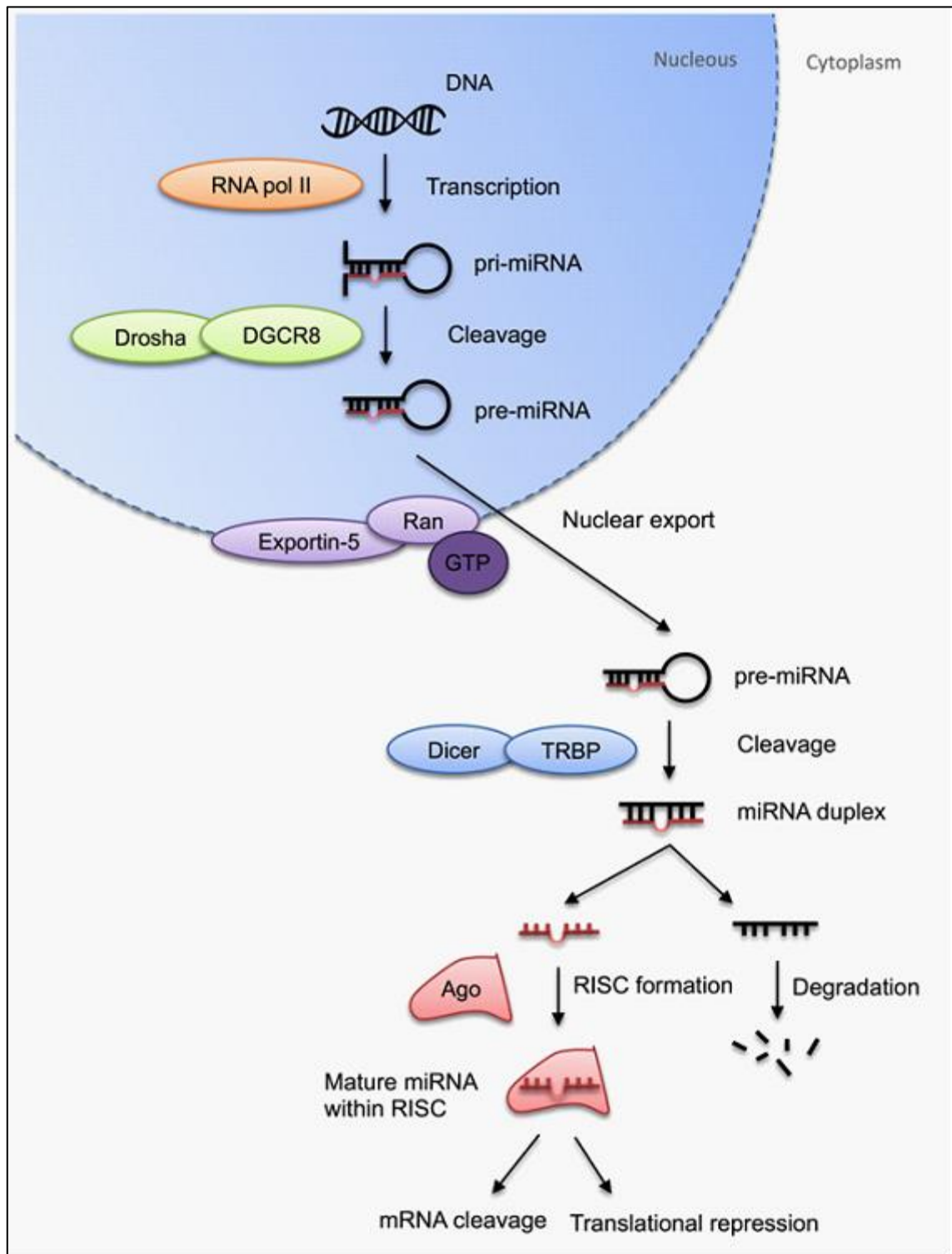


Abbildung 1: Der Weg der miRNA-Biogenese. MiRNA-Gene werden transkribiert von RNA-Polymerase II, die im Zellkern pri-miRNAs bildet. Pri-miRNAs werden von Drosha/DGCR8 (bildet eine kürzere zweite Prä-miRNA), die von Exportin-5/Ran-GTP, und dann von Dicer/TRBP zu miRNA duplex verarbeitet. Ein Strang miRNA-Duplex wird in den miRNA-RISC-Komplex eingebaut, was zur Unterdrückung der Proteinexpression führt. Förderung des Ziel-mRNA-Abbaus (Carpi et al. 2016)

Durch ihre Wirkungsweise greifen miRNAs dramatisch in die epigenetische Regulation der Genexpression ein, indem sie wichtige Gene in notwendigen zellulären Reaktionswegen kontrollieren. Es ist daher nicht verwunderlich, dass molekulare Fehler in der miRNA-Genom-Wechselwirkung mit dem Auftreten von zellulärer Fehlfunktion und der Transformation von normalen Zellen zu Krebszellen in Zusammenhang stehen (Dragomir et al. 2018). Man geht mittlerweile davon aus, dass ca. 60% des menschlichen Genoms (im Zusammenspiel mit anderen Faktoren) durch miRNAs reguliert werden (Friedman et al. 2009).

MicroRNAs können aus den Zellen, in denen sie produziert wurden, ausgeschleust werden, und gelangen so, z.B., in den Blutkreislauf, oder in andere Körperflüssigkeiten (Urin, Liquor, etc.). In Zirkulation sind sie stabil, da sie zuvor an Proteinaggregate gebunden werden (Villarroya-Beltri et al. 2014, Nik Mohamed Kamal und Shahidan 2019) oder in kleine (30-150nm) membran-umschlossene Vesikel überführt werden, sog. Exosomen (Jurj et al. 2020, Zhang et al. 2019). Letztere sind in den letzten Jahren in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses gelangt, da die ausgeschleusten Exosomen und ihr „Cargo“ (miRNAs, mRNAs, DNA-Fragmente, Proteine und andere) von anderen Zellen in der Mikro- und Makro-Umgebung der Ausgangszellen aufgenommen werden können (Wan et al. 2018). Dort entlassen die Exosomen ihren Inhalt und transportierte Bestandteile, wie z.B. miRNAs, können nun in den rezipienten Zellen ihre Wirkung entfalten (Maia et al. 2018). Dies ist von besonderer Bedeutung, da sich mittlerweile herausgestellt hat, dass die Cargo-Zusammensetzung in den Exosomen in der Ausgangszelle nicht zufällig erfolgt, sondern Exosomen gezielt so beladen werden, dass sie an spezielle, rezipiente Zellen andocken können und dort ihr Cargo „entlassen“ (Villarroya-Beltri et al. 2014, Jurj et al. 2020, O' Brian et al. 2018). Auf diese Weise kann eine Ausgangszelle (z.B. eine Krebszelle) „gezielt“ mit ihrer Umgebung in Kommunikation treten. Diese Prozesse sind von immenser Bedeutung für eine krebszellen-induzierte Modulation z.B. immun-kompetenter Zellen (Yi et al. 2020, Vignard et al. 2020).

Die Stabilität von miRNAs (durch ihren Einschluss in Exosomen oder Protein-Bindung) in Körperflüssigkeiten hat dazu geführt, dass diese mit unterschiedlichsten Methoden in Körperflüssigkeiten des Menschen nachgewiesen werden können. Sie werden daher als ideale Biomarker im Zusammenhang mit der

Entnahme von „liquid biopsies“ (z.B. Blut) angesehen (Boyer et al. 2020). Es konnte in einer Vielzahl von Untersuchungen gezeigt werden, dass der Nachweis spezifischer miRNAs (allein, oder in Kombination mit anderen Biomarkern (wie z.B. zirkulierenden Tumorzellen, zirkulierender freier DNA, Proteinen und anderen) in „liquid biopsies“ hoch evidente Hinweise auf das Vorliegen bestimmter Erkrankungen, die Progression von Krebserkrankungen und das Ansprechen auf bestimmte Therapeutika gibt (diagnostische, prognostische und prädiktive Biomarker (Valihrach et al. 2020, Pardini et al. 2019).

1.3.4 miRNA-Nomenklatur

Die Namensgebung der miRNAs erfolgt zunächst in der zeitlichen Reihenfolge ihrer Sequenzierung (also miRNA-7 zeitlich vor miRNA 203, etc. sequenziert). Vorstellung von 3 Buchstaben bezeichnet den Organismus (z.B. has: homo sapiens, oder mus: Maus).

Unterschiedlich Vorläufersequenzen und genomische Loci die zu identischen reifen miRNAs führen werden mit weiteren Ziffern charakterisiert (z.B. hsa-miR-31-1 und hsa-miR-31-2). Eng verwandte reife miRNA-Sequenzen werden durch das Anhängen von Buchstaben charakterisiert (z.B. hsa miR-31a und hsa miR-31-b). Oft können zwei miRNAs vom selben Vorläufer stammen. Wenn nicht ausreichend bekannt ist, welche miRNA-Sequenz die vorherrschende sein wird, werden Namen wie miRNA-34-3p (vom 3'-Arm der Vorläufer-Form stammend) und miR-34-5p (vom 5'-Arm stammend) vergeben.

Da in dieser Arbeit nur menschliche miRNAs untersucht wurden, wurde bei ihrer Benennung im Text auf das Vorausstellen von hsa verzichtet.

1.3.5 miRNAs und Melanom (-Therapie)

Bestimmte miRNAs sind für eine Vielzahl von Prozessen in der Melanomgenese verantwortlich (Lorusso et al. 2020). Sie können als oncomiRNAs (oncomirs) oder als tumorsuppressive miRNAs wirken (Iorio und Croce 2012). Sie können z.B. Signaltransduktionswege in der Proliferation aktivieren (miRNA-137, miRNA-221), Resistenzen gegen Apoptose vermitteln (miRNA-18b) oder die Invasion von Tumorzellen und die Metastasierung erleichtern (miRNA-214, miRNA-7a) (Sarkar et al. 2015) und eine Vielzahl weiterer melanom-assoziiierter Prozesse

beeinflussen (Latchana et al. 2016, Voller et al. 2013). Die Untersuchung des Nutzens von miRNAs als prädiktiven und/oder prognostischen Biomarkern (auch in liquid biopsies) unterliegt im Augenblick intensiver Forschung (Valentini et al. 2019, Varamo et al. 2017, Polini et al. 2019, Ross et al. 2018, Mannavola et al. 2016, Foth et al. 2016).

Im Zusammenhang mit Immuncheckpoint-Therapien unterschiedlicher Krebs-Entitäten werden im Augenblick die immunmodulatorischen Eigenschaften von miRNAs ausführlich untersucht (Omar et al. 2019, Cortez et al. 2019). Insbesondere gibt es erste Einblicke in die miRNA-Regulation im PD1/PD-L1 Reaktionsweg (Wang X et al. 2015, Yi et al. 2020, Kumar und Sharawat 2018, Ding et al. 2019). Es gibt erste Hinweise auf die Nutzung des Nachweises spezifischer miRNAs für die Beurteilung von Immuncheckpoint-Therapien (Smolle et al. 2019). Kürzlich wurden die Arbeiten zu dieser Thematik zusammengefasst (Danbaran et al. 2020). Für die Immuncheckpoint-Therapie des nicht-kleinzelligen Lungenkrebses konnte schon gezeigt werden, dass miRNAs als prädiktive Biomarker für die Einschätzung des Therapieerfolges eingesetzt werden können (Fan et al. 2020).

Für die Immuncheckpoint-Therapie des malignen Melanoms gibt es im Augenblick international verstärkte wissenschaftliche Bemühungen, prädiktive Biomarker für das Ansprechen einer Therapie, bzw. für das Auftreten möglicher Resistenzen zu finden (s.a. Kap. „PD-L1“). Erst kürzlich konnten Ugurel et al. zeigen, dass erhöhte PD-1 und PD-L1-Spiegel im Serum von metastasierten Melanompatienten, vor Beginn einer PD-1-Immuntherapie, mit einem schlechten Erfolg der Therapie verbunden sind (Ugurel et al. 2020).

Ob andere Biomarker, auch auf miRNA-Ebene ähnliche oder verbesserte prädiktive Ergebnisse ergeben, muss weiter überprüft werden.

1.3.6 miR-34 und PL-L1 Signalweg

Zur miRNA-34 Familie gehören miR-34a, miR-34b und miR34c. Das miRNA 34a-Gen befindet sich auf Chromosom 1(1p36.22) (Henrich et al. 2012). miRNA 34b und miRNA-34c teilen sich ein gemeinsames Gen auf dem Chromosom 11q23.1 (Rokavec et al. 2014). Beide Gene kodieren nicht für weitere nicht-kodierende

RNAs oder Proteine. Beide enthalten darüber hinaus TP53 sensible Sequenzen an denen der Tumorsuppressor p53 direkt binden kann und somit die Transkription dieser miRNAs aktivieren kann. Mehrere Studien zeigten, dass die Mitglieder der miRNA 34- Familie am häufigsten vom Tumorsuppressor p 53 reguliert werden (Hermeking 2010, 2007). Die miR-34-Familie trägt somit zu p53-Downstream-Effekten bei, indem sie z.B. auf c-MYC, CDK6 und c-MET abzielt (Misso et al. 2014).

Darüber hinaus induzieren die Transkriptionsfaktoren ELK1 und FoxO3a ebenfalls die Expression von miRNA 34, indem sie direkt an die Promotorregion binden (Christoffersen et al. 2010). Auf der anderen Seite unterdrücken STAT3 und EMT-TF die Transkription von miRNA-34- Genen. Alle miRNA-34 besitzen Tumorsuppressor-Eigenschaften welche durch p 53 induziert wird. Die Mitglieder der miRNA-34 Familie unterdrücken Tumorwachstum und die Metastasierung indem sie Prozesse hemmen, welche die Krebsentwicklung aktivieren. Hierzu gehören Zellzyklus, EMT und Metastasierung. Im Gegenzug aktivieren sie Prozesse, welche hemmend auf die Karzinogenese wirken, wie z.B. Apoptose und Seneszenz (Rokavec et al. 2014).

Interessanter Weise kann miR-34a bei AML-Patienten auch die PD-L1-Expression regulieren, indem sie an die 3'UTR-Region der PD-L1 mRNA bindet und somit die PD-L1-Bildung reguliert. Hieraus ergibt sich eine inverse Korrelation zwischen miRNA-34a und PD-L1 Expression. Die durch Chemotherapeutika induzierte Oberflächenexpression von PD-L1 konnte durch miR-34a rückgängig gemacht werden; außerdem wurde die PD-L1-spezifische T-Zell-Apoptose nach miR-34a-Transfektion reduziert. Eine Überexpression von miRNA-4a in HL-60 (menschliche lymphoide Zelllinie) und Kasumi-1 Zellen (Leukämie-Zelllinien die PD-L1 exprimieren) blockiert die PD-L1 Expression und reduziert die PD-L1 Oberflächenexpression (Wang X et al. 2015).

In einer weiteren Studie von Cortez et al. konnte für Lungenkrebs (NSCLC) gezeigt werden, dass ein Verlust und/oder Reduktion von PD-L1 mit einem vermehrten Vorhandensein von P53 einhergeht, was dahingehend gedeutet wurde, dass eine Induktion von p53 die Repression von PD-L1 fördert. Dieses wird bestärkt durch die reziproke Beziehung von miRNA34a und PD-L1 in NSCLC

Weitere Untersuchungen zeigen, dass neben miR-34 eine Reihe von anderen miRNAs ein Netzwerk aufspannen, welches direkt oder indirekt Reaktionswege beeinflusst, die mit der PD-L1-Expression einhergehen. 2017 fassten Wang et al. die Daten zusammen, die zeigen, dass neben miR-34a, ca. 50 weitere miRNAs in der Regulation von PD-L1 direkt oder indirekt involviert sind (s. Abbildung 2).

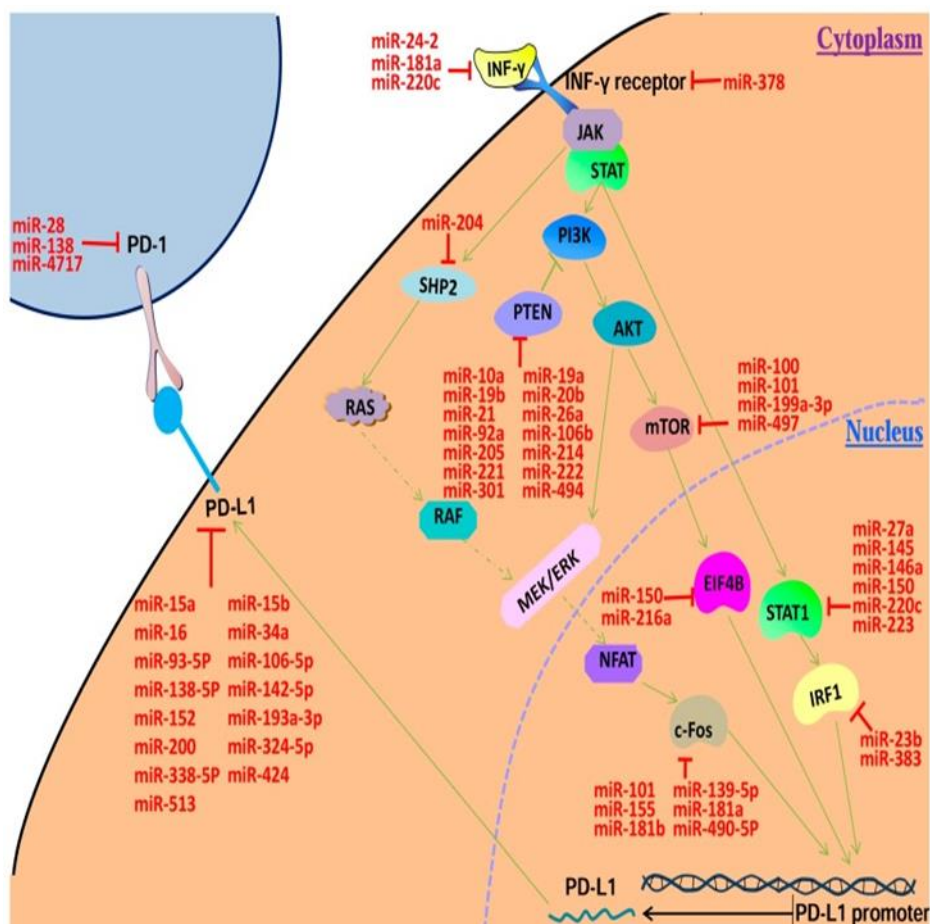


Abbildung 2: Induktion von PD-L1 durch den IFN- γ -Signalweg und miRNAs, die auf die Schlüsselgene in diesem Signalweg abzielen. Der grüne Pfeil bedeutet eine stimulierende Veränderung, das rote „T“-Symbol bedeutet eine hemmende Veränderung (Wang Q et al. 2017).

25 dieser 50 mRNAs finden sich auch in einem Panel von ca. 60 miRNAs, die im Labor für Molekulare Zellbiologie im Hautkrebszentrum Buxtehude, für die miRNA-Analyse in Liquid Biopsies (Blut-Plasma) in einer Discovery-Kohorte von Melanom-Patienten eingesetzt werden (vgl. Kap. Patienten, Flusszytometrie und Material und Methoden).

Diese miRNAs wurden nun, im Rahmen dieser Doktorarbeit, auf ihre Fähigkeit untersucht, zwischen Patienten zu diskriminieren, welche aufgrund klinischer Kriterien (RESCIST-Kriterien) auf eine PD-1 Immuntherapie positiv reagieren oder nicht (Eisenauer et al. 2009). Hierfür hat sich die Einteilung in responder und non-responder in der Medizin etabliert. Als non-responder wird ein Proband/Patient bezeichnet, der auf eine medizinische Maßnahme (Bsp. Impfung, Arzneimitteltherapie) nicht oder unzureichend anspricht.

Sollte diese Unterscheidung für eine oder mehrere miRNAs gelingen, könnten diese in zukünftigen Studien weiterhin darauf untersucht werden, ob sie als geeignete prädiktive Biomarker für ein Therapieansprechen eingesetzt werden können.

1.4 Arbeitshypothese und Zielsetzung

In den vergangenen Jahren wurde eine Vielzahl neuer Therapien für das maligne Melanom entwickelt. Dabei spielen sowohl sogenannte „small molecules“, die in Signaltransduktionswege der Krebszellen eingreifen, als auch Antikörper vermittelte Immuntherapien, die auf zentrale Regulationsmechanismen des Immunsystems wirken, eine große Rolle. Obwohl ein Teil der Patienten gut auf die Therapien anspricht, treten im Therapieverlauf häufig Resistenzen auf. Darüber hinaus gibt es auch Patienten, bei denen keine Wirkung erzielt werden kann. Allerdings können in allen Fällen die Nebenwirkungen der eingesetzten Therapien gravierend sein.

Um eine möglichst gezielte, effektive Therapie zu ermöglichen und unnötige Nebenwirkungen zu vermeiden, ist es notwendig prädiktive Biomarker zu entwickeln, die einen frühen Einblick auf das mögliche Ansprechen (responder) oder nicht-Ansprechen (non-responder) auf eine Immuncheckpoint-Therapie erlauben. Dazu ist es notwendig, zunächst „Classifier“ zu finden, die zwischen den beiden Gruppen (responder vs. non-responder) diskriminieren können, um diese dann später als mögliche prädiktive Biomarker einzusetzen. Ein großes Potenzial für solche „Classifier“ und mögliche zukünftige Biomarker besitzen zirkulierende microRNAs, die aus dem Blutplasma isoliert werden können.

Im Rahmen eines größeren Forschungsprojektes im Labor für Molekulare Zellbiologie der Dermatologie der Elbekliniken Stade/Buxtehude sollen daher in dieser Doktorarbeit folgende Arbeitshypothesen geprüft werden:

- *Zirkulierende miRNAs können mit einer speziellen flusszytometrischen Methode im Blut-Plasma von Melanompatienten nachgewiesen werden*
- *Eine einzelne, spezielle, zirkulierende Mikro-RNA (miR-34a-3p) kann in einem Patientenkollektiv unter PD-1 Immuncheckpoint-Therapie (Pembrolizumab, oder Kombinationen mit Pembrolizumab) zwischen respondern und non-respondern diskriminieren.*
- *Ein miRNA-Netzwerk von PD-L1-regulierenden und Melanom-assoziierten zirkulierenden miRNAs ist evtl. besser in der Lage (als ein „single miRNA approach“) in einem Patientenkollektiv unter Immuncheckpoint-Therapie zwischen respondern und non-respondern zu diskriminieren.*

Dazu wird eine Kohorte von 78 Melanompatienten (Discovery-Kohorte) zu Beginn oder während der Therapie mit Pembrolizumap (anti-PD-1-Therapie) auf das Vorhandensein von zirkulierenden miRNAs im Blutplasma untersucht. Hierzu wird eine durchflusszytometrische Methode (Abcam FirePlex) eingesetzt, um im Plasma von Melanompatienten die Expression spezieller miRNAs, die in der Regulation von PD-L1 und Melanomgenese eine Rolle spielen, zu bestimmen. Mit der Methode lassen sich bis zu 60 miRNAs, simultan, in einer Plasmaprobe detektieren. Mit bio-statistischen Methoden soll dann untersucht werden, ob eine einzelne miRNA oder ein Netzwerk von miRNAs in der Lage ist, einen „Classifier“ zu benennen, der in späteren Studien für das Therapieansprechen der Patienten eingesetzt werden kann (prädiktiver Biomarker).

Es ist das Ziel der Arbeit, erste Hinweise zu erbringen, ob eine Bestimmung von miRNA (-Mustern) in „liquid biopsies“ (Blutplasma) von Melanompatienten erste „classifier“ für das Therapieansprechen bei Immuncheckpoint-Therapie erfassen kann. Weitere Untersuchungen müssen dann ergeben, ob die detektierten miRNAs in Zukunft als prädiktive Biomarker eingesetzt werden können.

2 Patienten, Flusszytometrie, Material und Methoden

2.1 Patienten

Tabelle 2 zeigt die Zusammensetzung der Kohorte der Melanompatienten, die in unsere Untersuchungen einbezogen wurden („Discovery Kohorte“).

Tabelle 2: Patientenkohorte

	m (N=44)	w (N=34)	Overall (N=78)
Alter (Jahre)			
Mean (SD)	63.7 (17.5)	60.4 (13.5)	62.3 (15.9)
Median [Min, Max]	69.0 [33.0, 92.0]	62.0 [31.0, 79.0]	64.5 [31.0, 92.0]
Missing	5 (11.4%)	5 (14.7%)	10 (12.8%)
BRAF-Status			
mu	23 (52.3%)	19 (55.9%)	42 (53.8%)
nras	1 (2.3%)	3 (8.8%)	4 (5.1%)
wt	20 (45.5%)	12 (35.3%)	32 (41.0%)
AJCC Stadium			
IIIC	8 (18.2%)	4 (11.8%)	12 (15.4%)
IIIC/IV	1 (2.3%)	0 (0%)	1 (1.3%)
IV	31 (70.5%)	27 (79.4%)	58 (74.4%)
Anal-Ca	0 (0%)	1 (2.9%)	1 (1.3%)
IIIB	0 (0%)	1 (2.9%)	1 (1.3%)
Missing	4 (9.1%)	1 (2.9%)	5 (6.4%)
Therapie zur Zeit der Blutabnahme			
-	8 (18.2%)	6 (17.6%)	14 (17.9%)
Dabrafenib/Trametinib	5 (11.4%)	6 (17.6%)	11 (14.1%)
Elektrochemotherapie	1 (2.3%)	0 (0%)	1 (1.3%)
Encorafenib	1 (2.3%)	0 (0%)	1 (1.3%)
Encorafenib/Binimetinib	1 (2.3%)	0 (0%)	1 (1.3%)
Interferon alpha	1 (2.3%)	0 (0%)	1 (1.3%)

	m (N=44)	w (N=34)	Overall (N=78)
Interleukin	1 (2.3%)	0 (0%)	1 (1.3%)
Ipilimumab	1 (2.3%)	0 (0%)	1 (1.3%)
Ipilimumab+Nivolumab	5 (11.4%)	3 (8.8%)	8 (10.3%)
Nivolumab	3 (6.8%)	2 (5.9%)	5 (6.4%)
Pembrolizumab	17 (38.6%)	8 (23.5%)	25 (32.1%)
Bis 02/16 Pembro mit complete response	0 (0%)	1 (2.9%)	1 (1.3%)
Interferon	0 (0%)	1 (2.9%)	1 (1.3%)
Ipilimumab 2013 mit complete response	0 (0%)	1 (2.9%)	1 (1.3%)
MEK-Inhibitor	0 (0%)	1 (2.9%)	1 (1.3%)
Placebo i.R. einer Studie	0 (0%)	2 (5.9%)	2 (2.6%)
Roferon	0 (0%)	1 (2.9%)	1 (1.3%)
Temozolomid	0 (0%)	1 (2.9%)	1 (1.3%)
Vemurafenib + Cobimetinib	0 (0%)	1 (2.9%)	1 (1.3%)
Hirnmetastase			
ja	7 (15.9%)	12 (35.3%)	19 (24.4%)
nein	32 (72.7%)	16 (47.1%)	48 (61.5%)
Missing	5 (11.4%)	6 (17.6%)	11 (14.1%)
Ansprechen auf Immuntherapie			
ja	16 (36.4%)	11 (32.4%)	27 (34.6%)
nein	18 (40.9%)	16 (47.1%)	34 (43.6%)
Missing	10 (22.7%)	7 (20.6%)	17 (21.8%)

Tabelle 3: Patientencharakteristika und Blutwerte

ID	Geschlecht	BRAF	Stadium	Therapie	PD-1 re- sponse	CRP (mg/L)	LDH (U/L)	S100	Eosino- phile
1	w	nras	IV	Pembrolizumab	ja	2.3	179	0.05	2
2	m	mu	IV	Dabrafenib/Trametinib	nein	2.1	238	0.08	0.5
3	m	wt	IV	Elektrochemotherapie	nein	5	308	0.23	2
4	w	mu	IV	Pembrolizumab	nein	3.5	204	0.07	4.9
5	w	wt	IIIC	Interferon	NA	NA	NA	NA	NA
6	w	mu	IIIB	Placebo i.R. einer Studie	NA	NA	NA	NA	NA
7	w	wt	IV	MEK-Inhibitor	ja	1.2	276	0.11	2.2
8	w	mu	IV	Pembrolizumab	nein	0.6	185	0.04	2.4
9	m	mu	IIIC	-	NA	NA	NA	NA	NA
10	w	wt	IV	Pembrolizumab	ja	0.2	141	NA	0.3
11	m	wt	IIIC/IV	Pembrolizumab	ja	0.6	228	0.04	4.9
12	m	mu	IV	Pembrolizumab	nein	1.6	207	0.09	3
13	w	mu	IV	Placebo i.R. einer Studie	NA	NA	NA	NA	NA
14	m	wt	IV	Pembrolizumab	nein	71.3	478	0.56	0.3
15	w	mu	IV	Pembrolizumab	nein	11.6	218	0.02	1.8
16	m	wt	IIIC	Ipilimumab	nein	285	393	2.42	1.3
17	m	wt	IIIC	Pembrolizumab	nein	6.6	233	0.06	3
18	w	mu	IV	Dabrafenib/Trametinib	nein	3.6	233	0.1	0.2
19	w	mu	IIIC	-	ja	13.1	185	0.09	0.6
20	m	wt	IV	Pembrolizumab	ja	3.5	188	0.03	0.8
21	w	wt	IV	Nivolumab	ja	4.6	153	0.09	1.6
22	m	wt	IIIC	Ipilimumab+Nivolumab	ja	4	168	0.05	6.8
23	m	wt	IV	Pembrolizumab	ja	7.8	185	0.14	2
24	m	wt	IIIC	Interleukin	nein	NA	NA	NA	NA
25	m	mu	IV	Nivolumab	ja	0.4	160	0.07	5
26	m	mu	IV	Encorafenib/Binimetinib	nein	3.3	203	0.04	2.3
27	w	mu	IIIC	-	NA	NA	NA	NA	NA
28	m	mu	IV	Pembrolizumab	nein	10.2	399	NA	2.2
29	w	wt	IV	Pembrolizumab	ja	0.6	177	0.1	3.5
30	w	wt	Anal- Ca	-	ja	0.6	182	0.05	2.9
31	m	mu	IV	Dabrafenib/Trametinib	NA	NA	NA	NA	NA
32	m	wt	IV	Ipilimumab+Nivolumab	nein	1.3	188	0.78	2.7
33	m	mu	IV	Pembrolizumab	ja	10.4	157	0.03	5.2
34	m	mu	IV	Pembrolizumab	ja	1	166	0.04	10
35	m	wt	IV	Pembrolizumab	ja	NA	NA	NA	NA
36	w	mu	IV	Dabrafenib/Trametinib	nein	25.2	290	0.15	2.4
37	m	wt	IV	Pembrolizumab	ja	2	199	0.26	0.6
38	w	wt	IV	Nivolumab	ja	3.3	128	0.05	1.2

39	m	mu	IV	Encorafenib	nein	5.4	153	0.02	3.1
40	m	mu	IV	-	NA	NA	NA	NA	NA
41	w	mu	IV	Dabrafenib/Trametinib	NA	NA	NA	NA	NA
42	w	wt	IV	Ipilimumab 2013 mit CR	NA	NA	NA	NA	NA
43	m	mu	IIIC	Pembrolizumab	ja	3.6	184	0.1	6.3
44	w	wt	IV	Temozolomid	nein	16.9	237	0.13	2.9
45	w	mu	IV	-	nein	2.6	146	0.1	2.7
46	m	mu	IV	Pembrolizumab	nein	2.5	189	0.08	1.6
47	m	nras	IIIC	-	NA	NA	NA	NA	NA
48	w	wt	IIIC	Roferon	nein	0.6	213	0.07	0.4
49	m	wt	IV	-	ja	0.5	177	0.04	12.5
50	m	wt	IV	Ipilimumab+Nivolumab	nein	12.7	228	0.1	1.1
51	m	mu	IV	Ipilimumab+Nivolumab	nein	1.9	191	0.37	0.5
52	m	mu	IIIC	-	NA	NA	NA	NA	NA
53	m	wt	IV	-	nein	0.3	310	0.1	0.2
54	m	mu	IV	Dabrafenib/Trametinib	nein	3.4	241	0.04	2.9
55	w	mu	IV	Dabrafenib/Trametinib	nein	4.6	211	0.12	1.3
56	m	wt	IV	-	NA	NA	NA	NA	NA
57	m	mu	NA	Interferon alpha	NA	NA	NA	NA	NA
58	w	nras	IV	Ipilimumab+Nivolumab	nein	NA	NA	NA	NA
59	w	mu	IV	Bis 02/16 Pembro mit CR	ja	7.7	214	0.07	0.4
60	w	mu	IV	Dabrafenib/Trametinib	nein	4.5	188	0.06	2.3
61	w	mu	IV	Pembrolizumab	ja	0.6	169	0.04	5.9
62	w	nras	IV	Ipilimumab+Nivolumab	nein	47.2	2022	2.07	4.3
63	m	mu	IV	Nivolumab	nein	21.6	235	5.41	0.2
64	m	mu	IV	Dabrafenib/Trametinib	NA	NA	NA	NA	NA
65	w	wt	IV	-	ja	0.5	177	0.05	12.4
66	w	mu	IV	Pembrolizumab	nein	8.8	195	0.3	4.1
67	m	mu	IV	Dabrafenib/Trametinib	NA	NA	NA	NA	NA
68	w	mu	NA	Vemurafenib + Cobi- metinib	nein	29.7	409	0.13	1.1
69	w	wt	IV	-	NA	NA	NA	NA	NA
70	m	wt	NA	Pembrolizumab	ja	1.6	235	0.07	3.1
71	m	mu	IV	Nivolumab	ja	1.3	194	0.05	0
72	m	wt	IV	Pembrolizumab	ja	NA	NA	NA	NA
73	w	mu	IV	Ipilimumab+Nivolumab	nein	0.2	305	0.1	0.4
74	w	mu	IV	Dabrafenib/Trametinib	nein	2.4	161	0.23	6
75	m	wt	NA	-	NA	NA	NA	NA	NA
76	m	mu	NA	Pembrolizumab	ja	6.6	296	0.1	2.7
77	m	mu	IV	Ipilimumab+Nivolumab	nein	80.8	569	3.64	2.6
78	m	wt	IV	Pembrolizumab	ja	11	248	0.1	0.4

Für unsere Studie wählten wir Melanom-Patienten aus der Klinik für Dermatologie / Onkologie des Elbeklinikums Buxtehude. Zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit befanden sich $n=78$ Patienten in der Kohorte. Die Patienten befanden sich in unterschiedlichen Stadien des malignen Melanoms (hauptsächlich IV (58%) und Stadium III (26,8%), vgl. Tabelle 2) und unterzogen sich unterschiedlichen Therapien (inkl. PD-1 Inhibition, vgl. Tabelle 3).

Von den 78 Patienten in der vorliegenden Kohorte konnten 61 Patienten, bei Vorlage aller Daten, in die Untersuchung einbezogen werden ($n = 17$ „missing“, vgl. Tabelle 2). Von den 61 Patienten unterzogen sich 23 Patienten vor der Blutentnahme oder zu einem späteren Zeitpunkt nach Blutentnahme einer PD-1-Therapie. $n = 38$ Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme unter PD-1-Therapie oder PD-1 Kombinationen mit anderen ICI-Therapien.

Die Patienten wurden in regelmäßigen Abständen zur Nachuntersuchung einbestellt. Im Rahmen der Nachsorge-Untersuchung (Re-Staging) wird den Patienten Blut abgenommen, um laborchemische Veränderungen und somit das Auftreten von Nebenwirkungen zu dokumentieren und somit eine Behandlungsoptimierung durchführen zu können. Im Rahmen dieser Blutentnahme wurde den Patienten auch ein Citrat- Röhrchen (10ml) entnommen, welches für die Untersuchungen in dieser Arbeit genutzt wurde. Da eine standardisierte Blutentnahme im Rahmen der leitliniengerechten Nachsorge durchgeführt wurde, musste für unsere Zwecke keine zusätzliche Abnahme erfolgen. Alle Patientin wurden zeitgerecht vor Abnahme des Röhrchens von der behandelnden Ärztin über die Studie und die Verwendung der Patientendaten ausführlich mündlich und schriftlich informiert. Die Entnahme und Weiterleitung der Proben in das angeschlossene zellbiologische Forschungslabor des Elbe-Klinikums Buxtehude erfolgte nach schriftlicher Einwilligung der Patienten.

Alle durchgeführten Probeentnahmen erfolgten nach standardisierten Bedingungen (vgl. Material und Methoden). Die Blutentnahme wurde am Tag der Nachsorge, morgens, am nüchternen Patienten durchgeführt.

In Summe wurden diese $n = 23 + n = 38 = 61$ Patienten (vgl. o.) in die Analyse bzgl. respondern und non-respondern auf eine PD-1-Therapie entsprechen den klinischen Kriterien charakterisiert (Eisenhauer et al. 2009). Nach dieser Kategorisierung wurden 34,6% der Patienten als responder und 43% als non-responder

eingruppiert (alle prozentualen Angaben bezogen auf $n = 78$). Für dieses Patientenkollektiv wurde dann im weiteren Verlauf untersucht, ob sich diese Gruppierungen auch aufgrund von miRNA-Expressionswerten definieren lassen.

Eingeschlossen in unsere Studie wurden Patienten mit einem Stadium III und IV (TNM- Klassifikation des malignen Melanoms). Alle Patienten werden in der Klinik für Dermatologie und Onkologie des Elbeklinikums Buxtehude betreut und behandelt. Haben die Patienten Therapien erhalten, so erfolgte dies unter standardisierten Bedingungen und wurde bei jedem dieser Patienten vergleichbar durchgeführt.

2.2 Flusszytometrie

Flusszytometrische Bestimmung der miRNA-Zusammensetzung im Plasma von Melanompatienten wurde mit der FirePlex-Methode (Abcam) durchgeführt.

2.2.1 FirePlex-Methode

Bei der FirePlex-Methode handelt es sich um eine flusszytometrische Methode, bei der die Konzentration von bis zu 60 miRNAs, gleichzeitig, in liquid biopsies (z.B. Blut-Plasma), lysierten Zellen, Zellkultur-Überständen, aber auch nach etablierter Präparation von Geweben und in Paraffinschnitten (FFPEs) gemessen werden kann. Das Prinzip der Probenherstellung für die Fireplex-Methode ist in Abbildung 3 wiedergegeben:

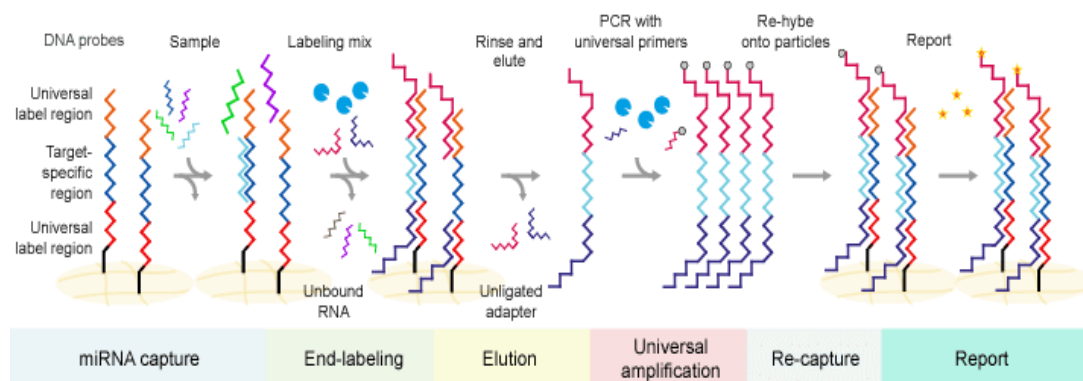


Abbildung 3: Schematische Darstellung der FirePlex-Methode (www.abcam.com/kits/how-does-the-multiplex-circulating-mirna-assay-work, abgerufen am 20.02.2022)

Komplementäre miRNA-Stränge in Hydrogelen werden in die zu untersuchende Probe gegeben und binden dort an die entsprechenden miRNA-Moleküle in der Probe („miRNA capture“, (s. Abbildung 4). Über ein „end-labeling“ werden die miRNA-Proben dann fluoreszenzmarkiert und durch weitere PCR-Amplifizierung für die (flusszytometrische) Messung vorbereitet.

Die Flusszytometrie erfolgt in speziell für die Methodik geeichten Flusszytometern (im Fall dieser Arbeit mit einem Guava easycyte 8HT Flusszytometer (Millipore)).

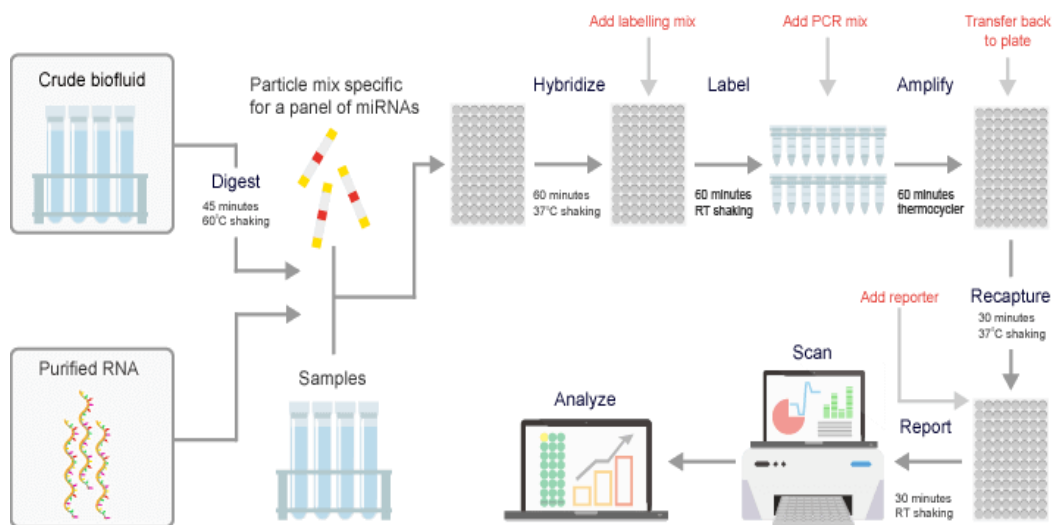


Abbildung 4: Schematischer Ablauf des FirePlex-Assays für die Flusszytometrie (www.abcam.com/kits/how-does-the-multiplex-circulating-mirna-assay-work, abgerufen am 20.02.2022)

2.2.2 Hypothesen-getriebene Auswahl von Kandidaten-miRNAs

Die Auswahl der miRNAs, die in dieser Arbeit untersucht wurden, erfolgte Hypothesen-getrieben. Dazu wurde die Literatur gesichtet und ermittelt, welche molekularen Reaktionswege für die Entstehung des malignen Melanoms, seine Promotion und Progression (Metastasierung) eine Rolle spielen und welche Reaktionswege bei einer Immuncheckpoint-Therapie involviert sind. Besonders wichtig waren hier Reaktionswege, die direkt oder indirekt bei der Regulation des PD-1, bzw. PD-L1-Gens beteiligt sind (vgl. Kap. 1.3.8, Abbildung 2).

Nach Auswahl der miRNAs wurde die Fa. Abcam (Abcam, Oxford) beauftragt, spezielle Reaktionskits herzustellen, welche die komplementären, fluoreszenzmarkierten miRNA-Sequenzen in Hydrogele einbettet. Diese wurden dann im

Plasma von Melanompatienten zur flusszytometrischen Messung der Konzentration der jeweiligen miRNAs genutzt (vgl. a. 2.2.1).

2.3 Material und Methoden

2.3.1 Blutentnahme und Plasma-Präparation

Die Bestimmung der spezifischen miRNAs wurde in Blutplasma von Melanompatienten durchgeführt. Mit dem schriftlichen Einverständnis der Patienten wurden zur routinemäßig durchgeführten Blutentnahme zusätzlich 3 ml Blut in Citrat-Röhrchen entnommen. Zum Abtrennen der Blutzellen und Gewinnen des Plasmas wurden die Blutproben anschließend bei 1800 x g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Plasma-Überstand wurde aliquotiert und bei -70°C bis zur weiteren Analyse gelagert.

2.3.2 Präparation der Proben für die Flusszytometrie und Auswertung der flusszytometrischen Messungen

Die Proben für die flusszytometrische Bestimmung der Konzentration von miRNAs im Plasma von Melanompatienten wurde nach Angaben des Herstellers (FirePlex®, Abcam) mit leichten Modifikationen durchgeführt und hier unverändert wiedergegeben.

a.) Hybridisierung von FirePlex Partikeln mit miRNAs

FirePlex Partikel (ab218611, 35 µl) in die Filterplatte transferieren. Puffer durch Vakuum-Absaugung entfernen. Trocknen der unteren Seite der Platte mit Papiertüchern. Hybridisierungspuffer (25 µl) dazugeben. Lyseproben (25 µl) dazugeben. Inkubation bei 37 °C, 60 min unter Schütteln, 750 rpm.

b.) Labelling der miRNAs mit universellen Adaptern

1x Rinse-A-Puffer (165 µl) dazugeben. Die Puffer durch Vakuum entfernen. 1x Rinse-A-Puffer (165 µl) nochmal dazugeben. Die Puffer durch Vakuum entfernen. Trocknen der unteren Seite der Platte mit Papiertüchern. Labelling-Mix (75 µl) dazugeben. Inkubation bei RT, 60 min unter Schütteln 750 rpm.

c.) PCR-Amplifikation von miRNAs

1x Rinse-B-Puffer (165 µl) dazugeben. Die Puffer durch Vakuum-Absaugung entfernen. 1x Rinse-B-Puffer (165 µl) nochmals dazugeben. Puffer wieder durch Vakuum-Absaugung entfernen. 1x Rinse-A-Puffer (165 µl) dazugeben. Die Puffer durch Vakuum-Absaugung entfernen. Trocknen der unteren Seite der Platte mit

Papiertüchern. H₂O (110 µl) dazugeben. Inkubation bei 55 °C, 30 min unter Schütteln, 750 rpm. Eine Catch-Platte unter die Filterplatte setzen. Vakuum einsetzen und das Eluat sammeln. 1x Rinse-A-Puffer (165 µl) dazugeben. Die Platte bei 4 °C aufbewahren.

20 µl PCR Master-Mix in ein PCR-Tub geben. 30 µl Eluat zu dem PCR Master-Mix geben.

PCR starten.

PCR-Program:

1 cycle	93 °C for 15 sec
32 cycles	93 °C for 5 sec
	57 °C for 30 sec
	68 °C for 60 sec
1 cycle	68 °C for 300 sec
1 cycle	94 °C for 240 sec
1 cycle	4 °C forever

d.) Bindung der amplifizierten miRNAs an die FirePlex Partikel

Die Puffer durch Vakuum-Absaugung entfernen. Trocknen der unteren Seite der Platte mit Papiertüchern. Hybridisierungspuffer (60 µl) dazugeben. PCR-Produkte (20 µl) dazugeben. Inkubation bei 37 °C, 30 min unter Schütteln, 750 rpm. 1x Rinse-B-Puffer (165 µl) dazugeben. Die Puffer durch Vakuum-Absaugung entfernen. 1x Rinse-B-Puffer (165 µl) nochmal dazugeben. Puffer durch Vakuum-Absaugung entfernen. Trocknen der unteren Seite der Platte mit Papiertüchern. 1x Rinse-A-Puffer (165 µl) dazugeben. Die Puffer durch Vakuum-Absaugung entfernen. Trocknen der unteren Seite der Platte mit Papiertüchern.

e.) Report der miRNAs mit Fluoreszenzfarbstoff

Reporter-Mix (75 µl) dazugeben. Inkubation bei RT, 15 min unter Schütteln 750 rpm. 1x Rinse-A-Puffer (165 µl) dazugeben. Die Puffer durch Vakuum entfernen. 1x Rinse-A-Puffer (165 µl) nochmal dazugeben. Die Puffer durch Vakuum-Absaugung entfernen. Trocknen der unteren Seite der Platte mit Papiertüchern.

f.) Scan der Fluoreszenz mittels Flusszytometrie

Es wird Run-Puffer (200 µl) dazugeben. Danach flusszytometrische Messung der Partikel mit einem Guava easycyte 8HT Flusszytometer (Millipore). Die Rohdaten wurde mit dem "FirePlex Analysis Workbench software", Abcam, decodiert und prozessiert. In jeder Probe werden gleichzeitig 63 miRNAs gemessen darunter 58 MM-relevante miRNAs, 3 House-Keeping miRNAs und je 1 Positiv- und Negativ-Kontrolle (siehe Abbildung 5). Für die Normalisierung wurde das geometrische Mittel von 3 House-Keeping miRNAs: Hsa-let-7d-5p, Hsa-let-7g-5p und Hsa-let-7i-5p ermittelt und die Expression der interessierenden miRNAs auf diesen Wert bezogen.

2.3.3 Statistische, bioinformatische Methoden

Statistische Analysen wurden in R 4.0.0 mithilfe der R packages „ggpubr“, „rstatix“ und „caret“ durchgeführt. Die Bestimmung der Verteilung der untersuchten Daten erfolgte mittels Shapiro-Wilk Test und visueller Inspektion mittels Quantil-Quantil-Diagrammen. Diese explorative Datenanalyse zeigte eine annähernde Normalverteilung nach log2-Transformation der Daten. Für anschließende Gruppenvergleiche wurden daher parametrische Methoden zur Bestimmung des Signifikanzlevels gewählt, da sie eine höhere statistische Trennschärfe als nicht-parametrische Methoden besitzen.

Beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde eine Welch-ANOVA mit anschließendem Games-Howell Post-hoc-Test durchgeführt, der Vergleich von zwei Gruppen erfolgte mittels Welch-Test, da die verglichenen Stichproben in einigen Fällen unterschiedliche Gruppengrößen und ungleiche Varianzen besaßen. Eine Korrektur für multiple statistische Tests wurde nicht durchgeführt, da es sich um eine explorative Studie handelte und die Kosten für falsch negative Ergebnisse höher eingeschätzt wurde als für falsch positive. Das Signifikanzniveau betrug $p < 0.05$.

Die Evaluierung von Modellen zur Unterscheidung zwischen respondern und non-respondern erfolgte mittels logistischer Regression. Als zu optimierendes Maß wurde die area under the curve (AUC) in einer receiver operating characteristic (ROC-) Analyse gewählt. Zur Optimierung von Sensitivität und Spezifität

wurde der Youden-Index genutzt (Youden 1950). Es kann mit Hilfe der ROC (Receiver operating characteristic) bestimmt werden, welcher Schwellenwert am besten geeignet ist, um bei einer Messung zwei Gruppen voneinander zu unterscheiden ($J = \text{Sensitivität} + \text{Spezifität} - 1$). Die statistische Analyse der miRNA-Expression zur Unterscheidung zwischen respondern und non-respondern auf eine Immuncheckpoint-Therapie wurde mittels p-Werte nach Welch's t-Test durchgeführt (Welch 1938).

2.3.4 miRNA Panel

hsa-mir-9-5p	hsa-mir-15a-5p	hsa-mir-15b-5p	hsa-mir-16-5p	hsa-mir-20a-5p	hsa-mir-20b-5p	hsa-mir-21-5p	hsa-mir-23a-3p	hsa-mir-23b-3p	hsa-mir-29a-3p
hsa-mir-29c-3p	hsa-mir-30d-5p	hsa-mir-31-3p	hsa-mir-31-5p	hsa-mir-33a-5p	hsa-mir-34a-3p	hsa-mir-34a-5p	hsa-mir-93-5p	hsa-mir-101-3p	hsa-mir-124-3p
hsa-mir-132-3p	hsa-mir-137	hsa-mir-142-3p	hsa-mir-142-5p	hsa-mir-145-5p	hsa-mir-146b-5p	hsa-mir-148a-3p	hsa-mir-150-5p	hsa-mir-155-5p	hsa-mir-182-5p
hsa-mir-185-5p	hsa-mir-192-5p	hsa-mir-193b-3p	hsa-mir-193b-5p	hsa-mir-197-3p	hsa-mir-199a-3p	hsa-mir-199a-5p	hsa-mir-200c-3p	hsa-mir-203a-3p	hsa-mir-204-5p
hsa-mir-205-5p	hsa-mir-210-3p	hsa-mir-211-5p	hsa-mir-214-3p	hsa-mir-221-3p	hsa-mir-222-3p	hsa-mir-301a-3p	hsa-mir-338-3p	hsa-mir-342-3p	hsa-mir-374b-3p
hsa-mir-425-5p	hsa-mir-509-3p	hsa-mir-514a-3p	hsa-mir-1246	hsa-mir-4487	hsa-mir-4706	hsa-mir-4731-5p	hsa-let-7d-5p	hsa-let-7g-5p	hsa-let-7i-5p
hsa-mir-29b-3p	x-control	blank							

Abbildung 5: Für die miRNA-Analyse in dieser Arbeit wurden oben dargestellte miRNAs ausgewählt.

2.3.5 Weitere Blutwerte, die im Rahmen dieser Arbeit als (mögliche) Biomarker getestet wurden

Den Patienten in der Kohorte, die in dieser Arbeit untersucht wurden, wurde im Laufe der Therapie routine-mäßig Blut abgenommen und auf unterschiedlichste Parameter getestet. Zu diesen gehörten unter anderen:

- LDH (Laktatdehydrogenase)
- S100 (Ca²⁺-Bindeprotein)
- CRP (C-reaktives Protein)
- Anzahl der Eosinophilen

Diese Faktoren wurden allein und in Kombination mit miRNA-Expressionswerten auf ihre Tauglichkeit getestet, zwischen respondern und non-respondern auf eine ICI-Therapie zu unterscheiden.

Die Messung der Lactatdehydrogenase-Konzentrationen (LDH) im Blut von Melanompatienten wird schon seit langem als prognostischer Marker eingesetzt. Neue Studien belegen, dass dies auch im Zusammenhang mit ICI-Therapien der Fall ist (Diem et al. 2016, Long et al. 2016). Van Zeijl et al. konnte vor kurzem in einer Übersichtsarbeit zeigen, dass eine Blutkonzentration von LDH > 500U/L mit einer schlechten Prognose von Melanompatienten einhergeht, obwohl ein Langzeit-Überleben der Patienten möglich ist (van Zeijl et al. 2020).

S100 (-Familie) ist ein Ca²⁺-bindendes Protein, dass in einer Vielzahl von zellulären Prozessen involviert ist, wie z.B. der Ca²⁺-Homöostase, der Proliferation, Apoptose, Differenzierung und Entzündungsreaktionen (Allgower et al. 2020). Die S100-Familie ist mit einer ganzen Reihe von Krankheitsbildern verbunden, unter anderem auch mit diversen Krebsentitäten (Bresnick et al. 2015).

Das Protein spielt eine bedeutende Rolle bei Entstehung und Progression von Krebs, auch beim malignen Melanom (Xiong et al. 2019). S100 ist als prädiktiver Marker bei der Melanom-Therapie mit Ipilimumab (CTLA-4 Antikörper) beschrieben (Gebhardt et al. 2015).

Das c-reaktive Protein (CRP) ist schon seit langem als Inflammationsmarker bekannt. Im Zusammenhang mit Melanomtherapien konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass erhöhte Werte von CRP bei ICI-Therapien mit einer schlechten Prognose und bei metastasierten Patienten mit einem kürzeren Gesamt-Überleben einhergehen (Awada et al. 2021, Nyakas et al. 2019, Laino et al. 2020).

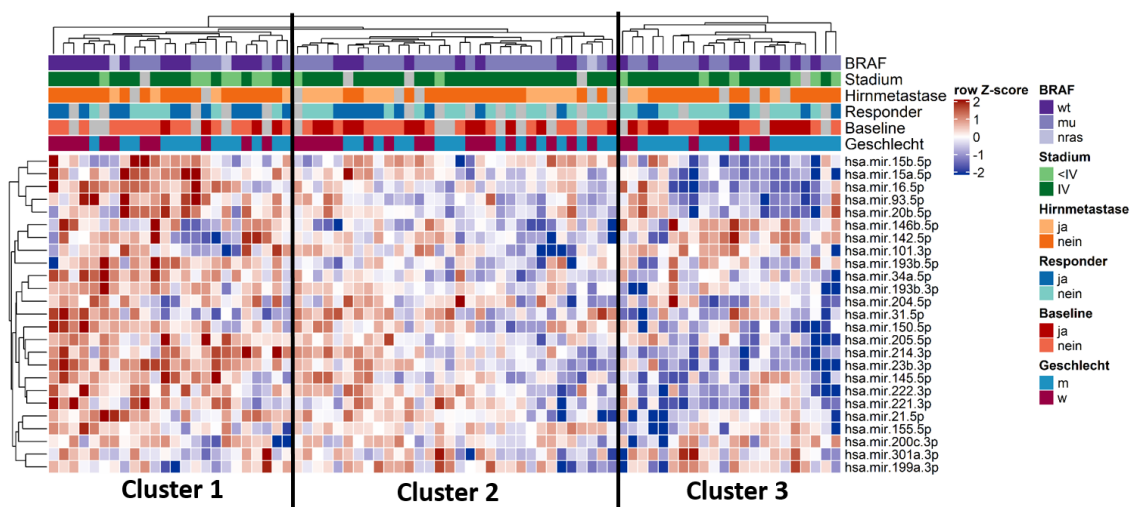
Neben der Zahl der Neutrophilen, Basophilen, Monozyten und Lymphozyten wird die Konzentration der Eosinophilen im Blut von Patienten, im Zusammenhang mit der Erhebung von Basis-Labordaten, oft als Marker für einen bestimmten Krankheitszustand oder zur Prognose eingesetzt. Neue Untersuchungen zeigen aber auch, dass bei Immuncheckpoint-Therapien des malignen Melanoms eine hohe Eosinophilenzahl mit einer besseren Therapieantwort verbunden ist, und dass ein Anstieg der Eosinophilenzahl in frühen Therapiephasen mit einem verbesserten Überleben der Melanompatienten einhergeht (Gebhardt et al. 2015, Varricchi et al. 2018, Simon et al. 2020).

3 Ergebnisse

3.1 Nutzung der flusszytometrischen FirePlex®-Methode zur Detektion von miRNA-Expression im Plasma von Melanompatienten

Als erstes sollte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die FirePlex®-Methode genutzt werden kann, um in einem Kollektiv von Melanompatienten die miRNA-Expression der Patienten gemessen werden kann.

Abbildung 6 zeigt, dass dies der Fall ist.



Cluster 1: hohe miRNA-Expression
 Cluster 2: gemischte miRNA-Expression
 Cluster 3: niedrige miRNA Expression

Abbildung 6: Heatmap für die differentielle Expression von 25 miRNAs

Die Abbildung 6 zeigt eine Heatmap für die miRNA-Expression bei den 78 in die Kohorte eingeschlossenen Patienten. Zur Analyse der von uns routinemäßig gemessenen miRNAs (ca. 50-60) wurden 25 miRNAs, die auch im Panel von Wang et al. vgl. a. Abb. 2 involviert sind, für die Analyse in Abbildung 6 eingeschlossen (Wang Q et al. 2017). Die Patienten konnten schon vor dieser Analyse aufgrund ihres BRAF-Mutationsstatus, dem Vorhandensein oder Fehlen von Hirnmetastasen, ihres Melanomstadiums, ihres Geschlechts und ihrer response auf eine PD-1 Immuncheckpoint-Therapie eingeteilt werden.

Wie die Heatmap in Abbildung 6 zeigt, konnten deutliche Unterschiede in der miRNA-Expression für unterschiedliche Patienten detektiert werden. Ein rötlich-

brauner Pixel beschreibt immer einen relativ hohen Expressionswert und ein weißlich-blauer eine niedrigere Expression der miRNA. Aufgrund dieser Gruppierung konnten auch schon Patienten- Cluster angegeben werden (Cluster 1, 2 und 3), die zunächst erst einmal durch hohe miRNA-Expression, mittlere und niedrige Expression charakterisiert sind.

3.2 Ergebnisse für miR-34a-5p

MiR-34a-5p war zunächst die Ziel-miRNA für die vorliegende Arbeit, da von ihr als einer der ersten miRNAs berichtet wurde, dass sie PD-L1 als direktes target besitzt.

Mit dem Fireplex-Assay wurde zunächst untersucht, ob das Vorhandensein von miR-34a-5p mit weiteren Patientencharakteristika (wie, Alter, Geschlecht, etc.) korreliert.

Abbildung 7 zeigt die miR-34a-5p-Expression im Plasma von Melanompatienten in Abhängigkeit vom Alter.

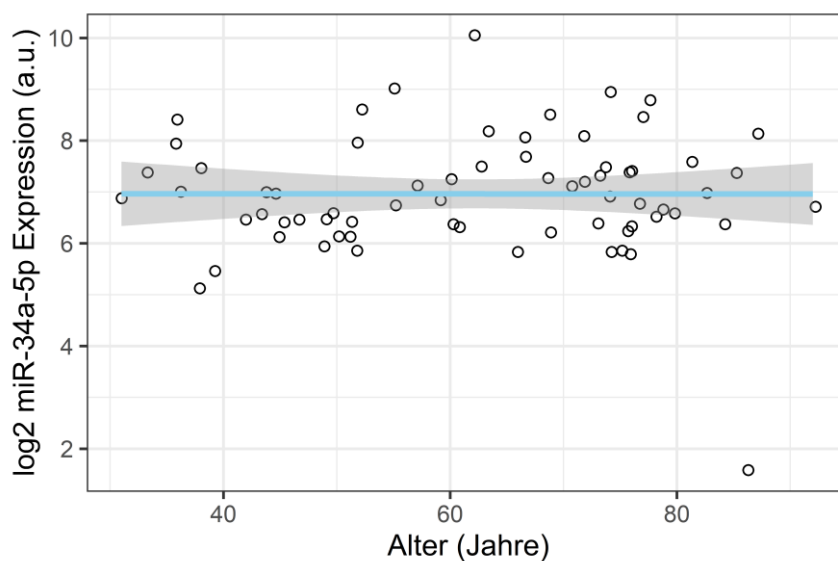


Abbildung 7: Altersabhängigkeit der miR-34a-5p Expression im Plasma von Melanompatienten in der in dieser Arbeit verwendeten Kohorte (n = 68).

Die Auswertung zeigt eine große Variabilität in Abhängigkeit vom Alter und die Werte variieren zwischen 32 und 1024 in willkürlichen Einheiten (arbitrary unit) aus der Fireplex-Messung. Im Mittel ist die Expression aber altersunabhängig (blaue Linie in Abbildung 7) mit einem Wert von ca. 128 (a.u.) (Regressionskoeffizient $r^2 = 9.8 \times 10^{-7}$).

Abb. 8 (1-3) fasst die Ergebnisse für die miR-34a-p5-Expression in Abhängigkeit Geschlecht der Patienten, dem Stadium des Melanoms und dem Vorliegen von Hirnmetastasen zusammen.

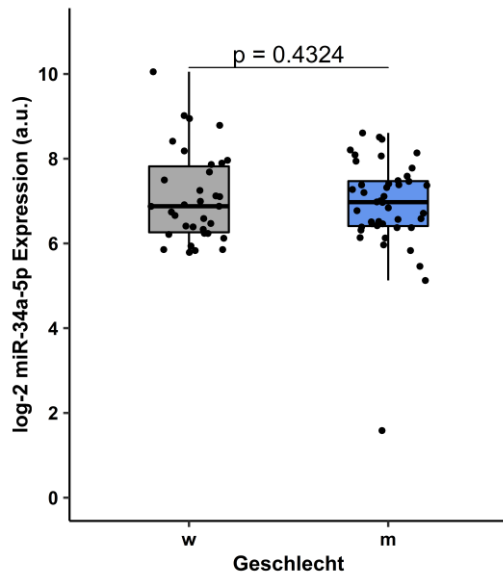


Abb. 8.1 (n=78)

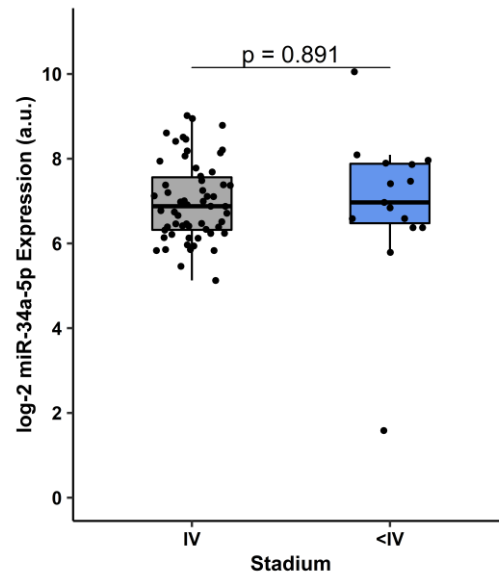


Abb. 8.2 (n=73)

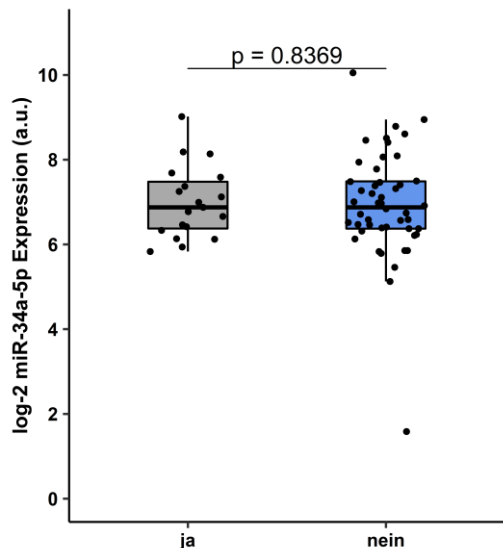


Abb. 8.3 (n=67)

Abbildung 8: miR-34a-5p Expression in Abhängigkeit vom Geschlecht der untersuchten Patienten, dem Melanomstadium und dem Vorliegen von Hirnmetastasen (n = Anzahl der jeweils inkludierten Patienten).

Wie Abb. 8 (1-3) zeigt, sind weder das Geschlecht, das Stadium des Melanoms (< IV vs. IV) oder das Vorliegen von Hirnmetastasen bei den untersuchten Melanompatienten (mit ausreichender statistischer Signifikanz, p-Werte im Bereich von 0.4 – 0.9) mit der Plasma-Expression von miR34a-5p korreliert.

Für die Kohorte von Melanompatienten, wurde weiterhin analysiert, ob aus einer Bestimmung der miR-34a-5p Expression im Plasma auf BRAF-mutierte oder BRAF-Wildtyp-Patienten geschlossen werden kann. Abb. 9 zeigt das Ergebnis der Analyse zu dieser Fragestellung.

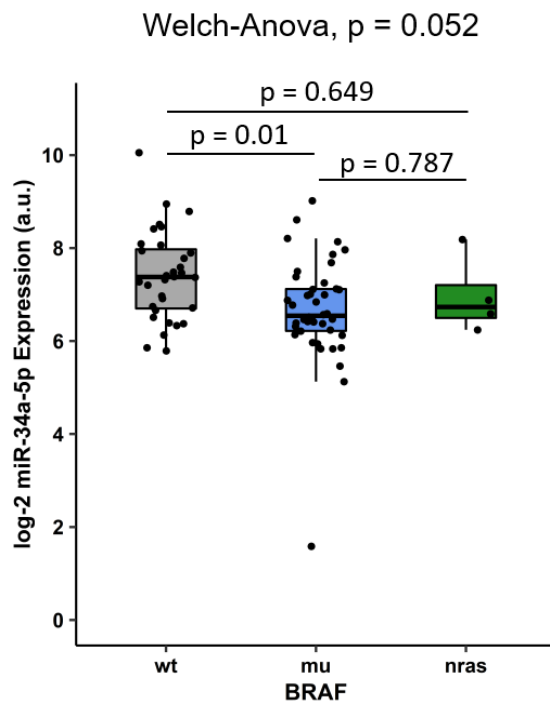


Abbildung 9: miR-34a-5p Expression im Plasma von Melanompatienten in Abhängigkeit vom BRAF-Mutationsstatus (BRAF^{V600} (mu) vs BRAF-Wildtyp (wt)) (n=78). Zum Vergleich sind noch einige Patienten mit NRAS-Mutationen analysiert worden (nras).

Wie aus Abbildung 9 zu ersehen ist, kann aufgrund der miR-34a-5p-Expression im Plasma von Melanompatienten, mit relativ guter statistischer Signifikanz ($p = 0.01$), auf das Vorliegen von BRAF-Mutationen geschlossen werden. Patienten mit dieser Mutation zeigen eine ca. 60% verringerte Expression von miR-34a-5p.

Im Zusammenhang mit der Zielsetzung dieser Arbeit wurde für diesen Abschnitt nun die Frage geklärt, ob die Expression von miR-34a-5p (allein) im Plasma von Melanompatienten zwischen respondern und non-respondern auf eine Immuncheckpoint-Therapie (PD-1-Therapie) diskriminieren kann.

Abbildung 10 zeigt die Auswertungen zu dieser Fragestellung für (n = 62) Patienten unserer Kohorte:

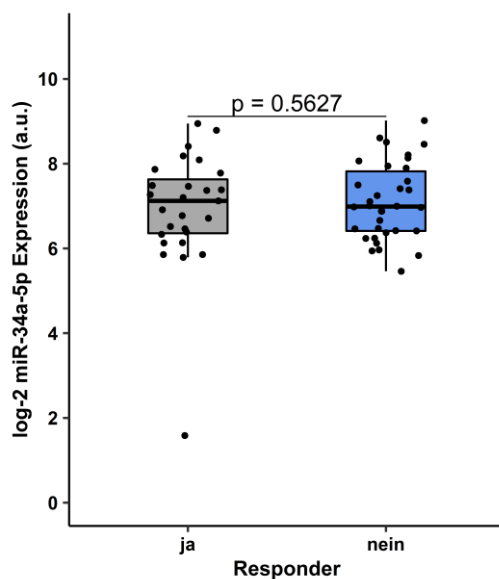


Abbildung 10: miR-34a-5p-Expression im Plasma von Melanompatienten, die auf eine Immuncheckpoint-Therapie (PD-1 ansprachen oder nicht (responder ja vs. nein, n=61, n_{res} = 27, n_{non-res} = 34). Ansprechen auf die Therapie wurde, klinisch, nach den RECIST-Kriterien bestimmt (Eisenhauer et al. 2009).

Wie Abbildung 10 zeigt können responder auf eine PD-1- Therapie, im Verlauf ihrer Therapie- Historie durch die (alleinige) Bestimmung der miR-34a-5p-Expression im Plasma von Melanompatienten nicht von non-respondern unterschieden werden.

3.3 Bedeutung der Analyse von multiplen miRNA-Expressions-Mustern im Plasma von Melanompatienten in Bezug auf die Unterscheidung von respondern und non-respondern bei der Immuncheckpoint-Therapie

Wie im letzten Kapitel gezeigt werden konnte, war aus der alleinigen Analyse der Expression von miRNA-34a-5p im Plasma von Melanompatienten keine Aussage darüber abzuleiten, ob es sich um responder oder non-responder in Bezug auf eine PD-1 Immuncheckpoint-Therapie handelt (vgl. Kap. 3.2, Abbildung 10).

Aus diesem Grund wurde die Analyse nun auf eine Gruppe von 25 miRNAs ausgeweitet. Bei diesen miRNAs handelt es sich um „überlappende“ miRNAs, die in der Übersichtsarbeit von Wang et al. (als direkt oder indirekt in die PD-L1-Expression involviert) beschrieben wurden und dem Panel von miRNAs (50-60, vgl. Material & Methoden), die im Labor für Molekulare Zellbiologie in Buxtehude für die Analyse von Plasmaproben von Melanompatienten verwendet werden.

Bei den 25 überlappenden miRNAs handelt es sich um:

miR-15b-5p, miR-15a-5p, miR-16-5p, miR-93-5p, miR-20b-5p,
miR-146b-5p, miR-142-5p, miR-101-3p, miR-193b-5p, miR34a-5p,
miR-193-3b, miR-204-5p, miR32-5p, miR-150-5p, miR-205-5p,
miR-214-3p, miR-23b-3p, miR-145-5p, miR-222-3p, miR-221-3p.
miR21-5p, miR-155-5p, miR-200c-3p, miR-301a-3p, miR199a-3p

(vgl. a. Abbildung 6 in Kap. 3.1).

Wie aus der Arbeit von Wang et al. zu entnehmen ist, spielen die oben aufgelisteten miRNAs wichtige direkte und indirekte Rollen in molekularen Signalketten, die für die Expression von PD-L1 verantwortlich sind (Wang Q et al. 2017). Sie sind damit mögliche Kandidaten für Biomarker in Bezug auf PD-L1-Expression. Anscheinend ergibt sich nach unserer Analyse aber kein Hinweis auf das Ansprechen auf die PD-1-Therapie bei den Melanompatienten unserer Kohorte.

Wenn diese 25 miRNAs im FirePlex-Assay auf differentielle Expression in Bezug auf das Ansprechen auf die Immuncheckpoint-Therapie untersucht wurden,

konnte hierfür jedoch kein signifikantes Ergebnis abgeleitet werden (s. Abbildung 11 und Abbildung 12).

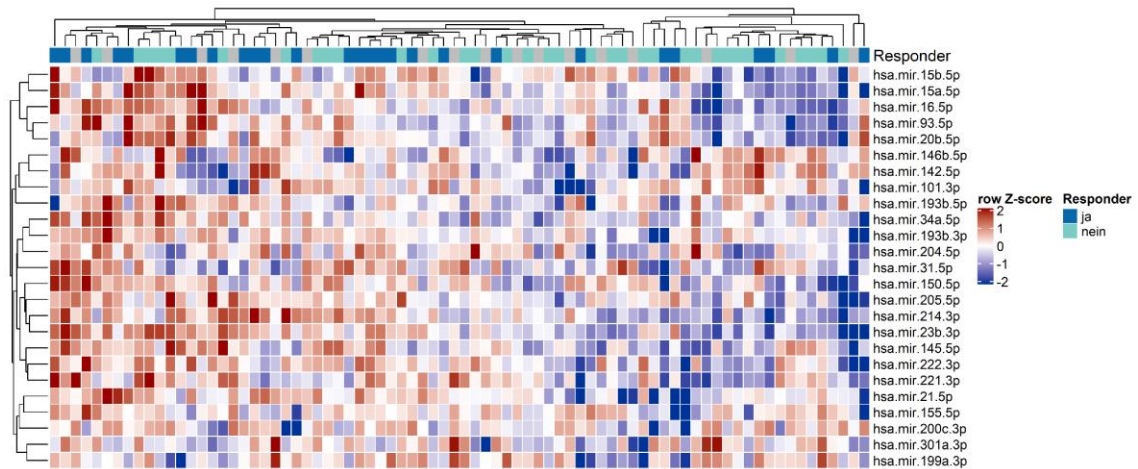


Abbildung 11: Heatmap für die miRNA-Expression bei respondern und non-respondern auf eine Immuncheckpoint-Therapie (PD-1)

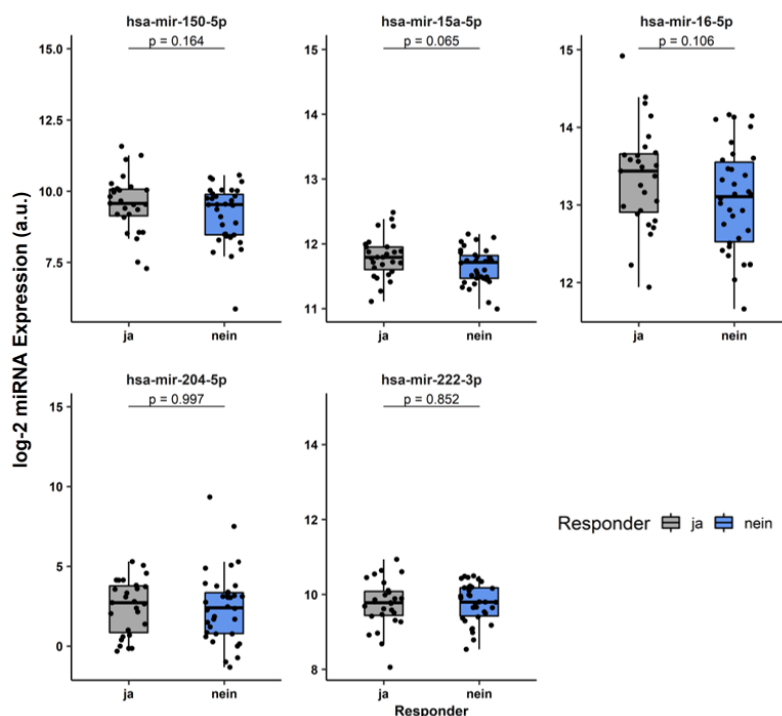


Abbildung 12: Exemplarische Darstellung der statistischen Analyse der miRNA-Expression zwischen respondern und non-respondern auf eine Immuncheckpoint-Therapie für 5 zufällig ausgewählte miRNAs aus Abb 6. (Heatmap). Welch Test. (n = 62).

Abbildung 12 zeigt exemplarisch für 5 ausgesuchte miRNAs, dass sich deren Expression (wie ebenfalls bei allen 25 miRNAs in der Heatmap aus Abbildung

11) nicht signifikant zwischen den respondern und non-respondern auf die Immuncheckpoint-Therapie unterschieden.

Um mögliche andere miRNA-Muster zu finden, die Hinweise auf das Vorliegen einer Therapierespons bzgl. PD-1-Immuntherapie in unserer Kohorte liefern können, wurde deshalb die Fireplex-Analyse auf dem gesamten Panel von miRNAs (vgl. Material und Methoden, Kapitel 2.3.2), der im Labor für die Analyse zur Verfügung steht (und welche die 25 miRNAs aus der Überlappung mit der Wang et al -Arbeit inkludieren), ausgeweitet. Insgesamt n=58 miRNAs.

Bei dieser Analyse konnte nun ein Satz von miRNAs gefunden werden, deren Expression für responder und non-responder auf die PD-1-Therapie signifikant unterscheidet.

3.4 Das miRNA-Quintett

Wie Abb. 13 zeigt, konnte in der FirePlex-Analyse zur miRNA-Expression im Plasma von Melanompatienten nun ein Satz aus 5 miRNAs identifiziert werden, der Therapieresponder von non-respondern unterscheidet. Diese miRNA-Gruppe setzt sich wie folgt zusammen:

miR-132-3p, miR-137, miR-197-3p, miR-214-3p und miR-514a-3p
 („miRNA-Quintett“)

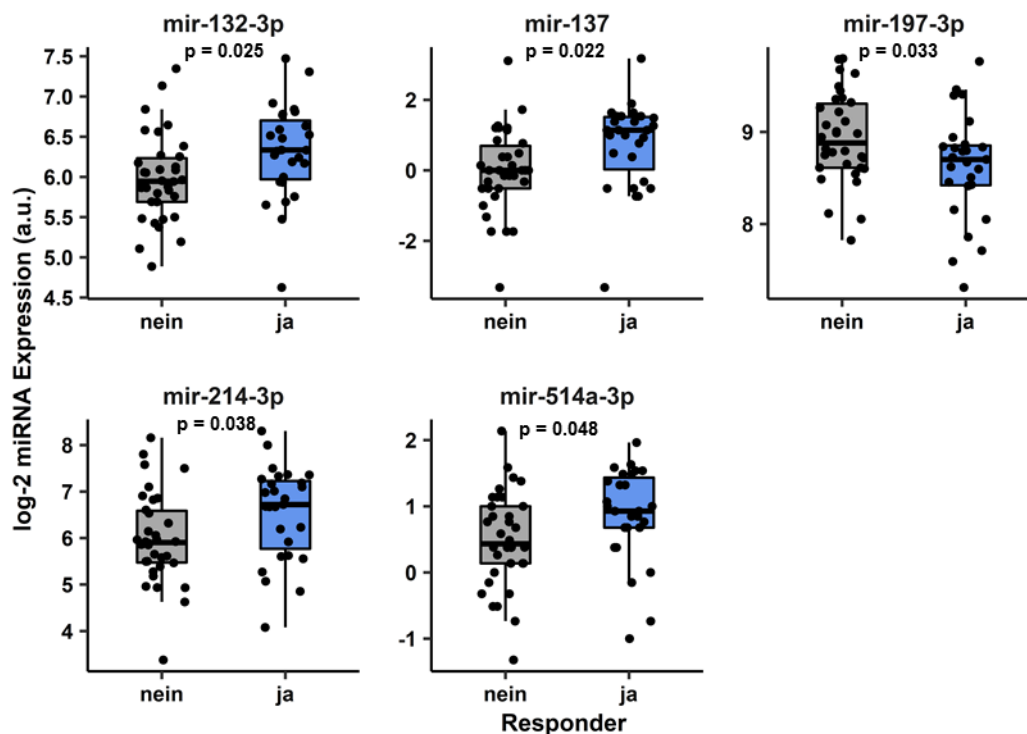


Abbildung 13: Differenziell exprimierte miRNAs im Plasma von Melanompatienten (n= 61), welche eine Unterscheidung in responder und non-responder (ja vs. nein) auf eine PD-1 Immuncheckpoint-Therapie ermöglichen (p-Werte nach Welch's t-Test, vgl. Material & Methoden, Kapitel 2.3.3)

Für 4 der 5 miRNAs ist die Expression im Fall der non-responder deutlich weniger ausgeprägt, wobei miRNA-137 die höchste Signifikanz für diesen Befund aufweist.

Nur miR-197-3p zeigt in dem miRNA-Quintett für non-responder eine höhere Expression als für die responder.

3.5 Statistische Analyse des miRNA-Quintetts für die Unterscheidung von respondern und non-respondern auf PD-1 Therapie

Um beurteilen zu können, mit welcher statistischen Güte das in Kap. 3.3 beschriebene miRNA-Quintett eine belastbare Unterscheidung von respondern und non-respondern auf die Immunscheckpoint-Therapie der Melanompatienten in unserer Kohorte ermöglicht, wurden die erhobenen Daten zur differentiellen Expression dieser miRNAs einer eingehenden statistischen Analyse unterzogen. Dazu wurden die miRNA-Werte einer ROC (receiver operating characteristics)-Analyse unterzogen (vgl. Kap. 2.3.3). Abb. 14 zeigt das Ergebnis dieser Analyse unter Berücksichtigung des gesamten miRNA Quintetts.

Die zur Bewertung der Unterscheidungs-Signifikanz zwischen responder und non-respondern wichtige AUC (area under the curve) ist relativ hoch ($AUC = 0.793$) und gibt einen starken Hinweis, dass das Expressionsmuster 5 miRNAs zur Unterscheidung von Therapierespondern und non-respondern bei Melanompatienten unter PD-1 Immuntherapie herangezogen werden kann.

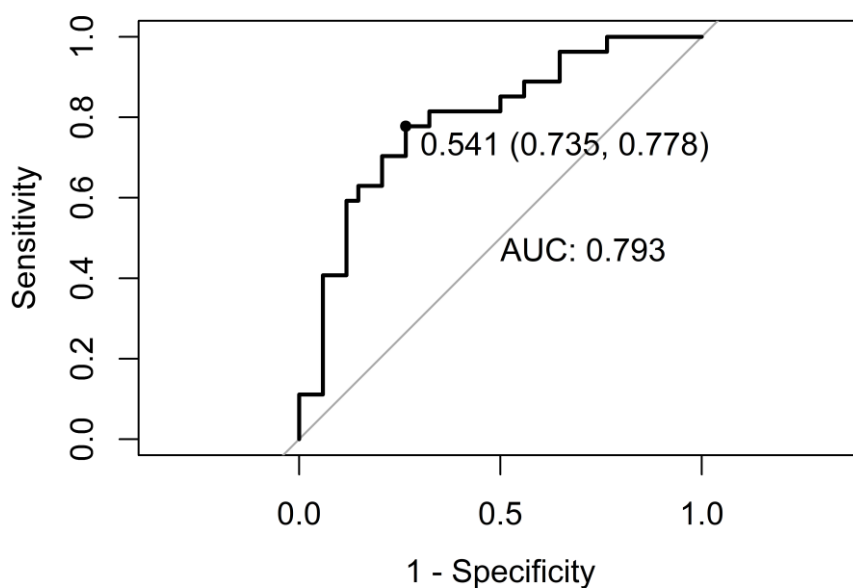


Abbildung 14: ROC Analyse zur Bewertung der Unterscheidungs-Qualität zwischen respondern und non-respondern auf Basis logistischer Regression mit miR-132-3p, miR-137, miR-197-3p, miR-214-3p und miR-514a-. AUC: area under the curve. Die Werte in Klammern geben die Spezifität bzw. Sensitivität für den besten cut-off an (berechnet mittels Youden-Index, der das Paar mit bester Sensitivität und Spezifität angibt, schwarzer Punkt in der Kurve.)

Selbst wenn nur 2 miRNAs (miR-137 und miR-514a-3p) zur ROC-Analyse herangezogen werden (vgl. Abb. 15) ist das Ergebnis vergleichsweise gut (AUC = 0.751).

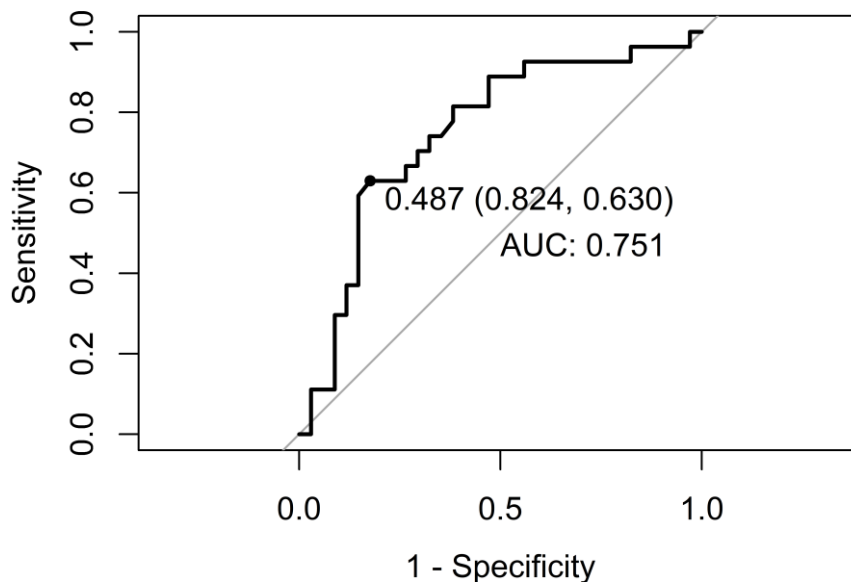


Abbildung 15: ROC Analyse zur Bewertung der Unterscheidungs-Qualität zwischen respondern und non-respondern auf Basis logistischer Regression mit miR-137, miR-514a-3p. AUC: area under the curve. Die Werte in Klammern geben die Spezifität bzw. Sensitivität für den besten cut-off an (berechnet mittels Youden-Index, der das Paar mit bester Sensitivität und Spezifität angibt, schwarzer Punkt in der Kurve.)

Um die Aussagekraft für die Unterscheidung einer respons oder non-respons auf die Immuntherapie in unserem Patientenkollektiv evtl. noch zu verbessern, wurde getestet, ob andere im Blut der Patienten (routinemäßig) gemessenen molekularen und zellulären Marker die ROC-Analyse verbessern können. Dazu wurde zunächst die Aussagekraft der einzelnen Marker CRP, S100, LDH und Eosinophilen-Zahl (vgl. Kap. 2.3.5) im Blut der Patienten getestet.

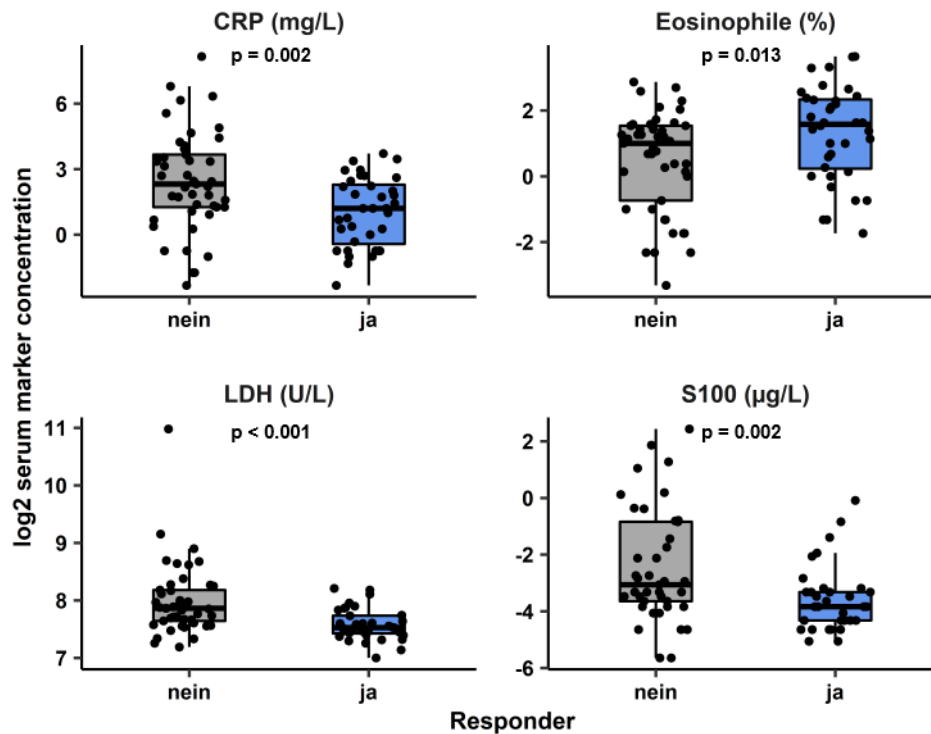


Abbildung 16: Boxplot Blutparameter

Wie Abb. 16 zeigt, unterscheiden diese gängigen Blutparameter schon gut zwischen respondern und non-respondern auf eine PD-1-Therapie.

Bezieht man die Analyse der Blutwerte weiterhin in eine ROC-Analyse des miRNA-Quintetts ein, ergibt sich eine ausgezeichnete Klassifikation (AUC = 0.914), die jetzt noch besser ist, als bei der Nutzung des miRNA-Quintetts allein (vgl. Abb. 14).

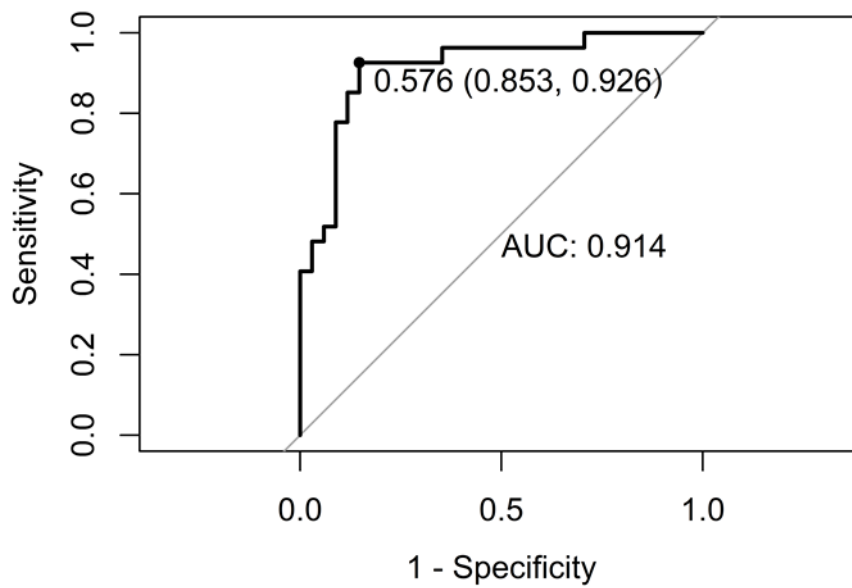


Abbildung 17: ROC Analyse zur Bewertung der Unterscheidungs-Qualität zwischen respondern und non-respondern auf Basis logistischer Regression mit miR-132-3p, miR-137, miR-197-3p, miR-214-3p, miR-514a-3p und CRP, LDH, S100, und Eosinophilen-Zahl. AUC: area under the curve. Die Werte in Klammern geben die Spezifität bzw. Sensitivität für den besten cut-off an (berechnet mittels Youden-Index, der das Paar mit bester Sensitivität und Spezifität angibt, schwarzer Punkt in der Kurve.)

4 Diskussion

Das maligne Melanom (MM) der Haut gehört zusammen mit dem Basalzellkarzinom und dem Plattenepithelkarzinom zur häufigsten Krebserkrankung weltweit. Die Inzidenz des MM liegt in Europa bei ca. 9/100.000/Jahr und in den USA gehen bei Männern ca. 5% und bei Frauen ca. 4% aller Tumorerkrankungen auf das MM zurück (Rossi et al. 2021). Allein in Europa liegt die Mortalitätsrate am MM einen Bereich von 2-3/100.000/Jahr. In den USA ist das maligne Melanom der Haut der 2.-häufigste Tumor bei Patienten unter 40 Jahren. In Deutschland erkranken nach Hochrechnungen des Krebsregisters in Schleswig-Holstein (im Jahr 2018, vgl. Kap. 1.1) mehr ca. 287.000 Menschen jedes Jahr neu an Hautkrebs. Dabei entfallen ca. 37.000 auf das maligne Melanom der Haut.

3.000 Menschen versterben an diesem Hautkrebs, jährlich. Das maligne Melanom der Haut stellt somit den Hautkrebs mit der höchsten Sterblichkeit dar.

Es gilt mittlerweile als erwiesen, dass UV-Strahlung der Sonne (aber auch aus künstlichen Quellen, wie z.B. Solarien) einen Haupt-Risikofaktor für die Entstehung (aber auch für die Progression) des malignen Melanoms darstellt, auch wenn sich die Bedeutung dieses Risikofaktors für Subtypen des malignen Melanoms (kutanes malignes Melanom, Schleimhautmelanom, akrales Melanom und uveales Melanom) unterscheidet, da bei diesen Subtypen jeweils andere, weitere ätiologische Faktoren eine Rolle spielen können (Rossi et al. 2021, Sun et al. 2020, Eddy und Chen 2020).

Lange Zeit galt das maligne Melanom als therapieresistent und das 5-Jahres-Überleben lag bei Patienten (im Spätstadium, mit Metastasierung) zwischen 15%-25% (Stark et al. 2015). Dies hat sich in den letzten 5-10 Jahren durch die Anwendung neuer moderner Therapieformen deutlich geändert. Der Einsatz spezieller Therapeutika gegen bestimmte Mutationen im Genom von Melanomzellen (sog. „targeted therapies“) und noch viel mehr die Nutzung der Immuncheckpoint-Inhibition (ICI) führt für viele Patienten zu deutlichen Gewinnen beim allgemeinen („overall survival, OS“) oder beim progressionsfreien („progression-free survival, PF“) Überleben und einer ganzen Palette weiterer Therapiegewinne (Eddy und Chen 2020).

Bei der Immuncheckpointtherapie des malignen Melanoms haben sich spezielle Antikörper gegen PD-1, PD-L1 und CTLA-4 als Monotherapie oder in

Kombination miteinander bei einer Zahl von Patienten als ausgesprochen erfolgreich erwiesen. Allerdings liegt das Ansprechen auf die Therapien im Bereich zwischen 30-50% der behandelten Patienten, je nach Stadium des malignen Melanoms, der verabreichten Therapieform und dem jeweilig betrachteten klinischen Endpunkt (OS, PF etc.) (Rossi et al. 2021, Eddy und Chen 2020). Es besteht also immer noch ein nachdrücklicher Bedarf an klinischen und molekularen Markern, welche den Verlauf einer bestimmten Therapie monitoren könnten und, im Idealfall, prädiktiv (also vor Beginn einer ICI) Vorhersagen über das mögliche Ansprechen des individuellen Patienten, im Sinne einer Präzisionsmedizin und individuellen Therapie, machen können (prädiktive Biomarker). Dies würde zu einer erheblichen Verminderung von unnötigen Nebenwirkungen beim Patienten, zur besseren Therapieplanung und zu enormen Einsparungen im Gesundheitswesen beitragen.

In den letzten Jahren ist schon intensiv in klinischen und experimentellen Studien zum Thema (prädiktive) Biomarker in der ICI-Therapie des malignen Melanoms geforscht worden (Shtivelman et al. 2014). Allerdings ist bisher noch kein validierter Biomarker charakterisiert worden, der in der Klinik zur prädiktiven Anwendung bei der Therapieentscheidung beitragen kann (Cordonnier et al. 2020, Sabari et al. 2018, Goodman et al. 2017).

In dieser Arbeit wurde daher der Fragestellung nachgegangen, ob auf der Basis von miRNA-Expressionsmustern in „liquid biopsies (Blut-Plasma) von Melanompatienten erste Hinweise liefern kann, ob bei ICI-Therapie Patienten in responder und non-responder unterschieden werden können („miRNA-Classifizierung“). Dies erfolgte in einem flusszytometrischen miRNA-Multiplex-Verfahren (Bestimmung von simultan bis zu 60 miRNAs im Plasma von Melanompatienten) in einer Kohorte von Melanompatienten, die retrospektiv nach, oder im Rahmen einer ICI-Therapie (und bei Kombination mit anderen Melanomtherapien) untersucht wurden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die zunächst aufgestellte Arbeitshypothese, dass die Expression einer alleinigen miRNA (miRNA-34a-3p), als Marker für das Ansprechen auf eine PD-1 Therapie nicht bestätigt werden kann. Allerdings scheint die Expression von miRNA-34a-3p, als „Nebenbefund“ dieser Arbeit, eine relativ gute Unterscheidung in Melanompatienten mit BRAF-Mutation und BRAF-wt-

Patienten zu ermöglichen (vgl. Abb.9). Diesem Befund wird in weiterführenden Untersuchungen nachgegangen.

Da die Untersuchung einer einzelnen miRNA (miR-34a-3p), welche die Expression von PD-L1 (als direktem target) inhibiert, anscheinend keinen Hinweis auf eine ICI-Therapieantwort von Melanompatienten liefert, wurde im weiteren Fortgang dieser Arbeit untersucht, ob eine multi-miRNA-Expressionsanalyse von miRNAs, die direkt oder indirekt mit der PD-L1-Expression in Verbindung gebracht werden können, einen besseren Einblick in die Unterscheidung von ICI-Therapie respondern oder non-respondern erlaubt. Hierzu wurden 25 miRNAs mit dem FirePlex-Assay untersucht, welche in der Literatur beschrieben worden waren (vgl. Kap. 3.1 und Wang X et al. 2015) und zu ca. 50 % mit den miRNAs überlappten, welche im „routinemäßig“ eingesetztem, hypothesengetriebenem Panel von miRNAs übereinstimmten, der üblicherweise im Labor für Molekulare Zellbiologie des Hautkrebszentrums Buxtehude zur miRNA-Analyse von Plasma-proben von Melanompatienten eingesetzt wird (vgl. Abb. 6 und Kap. 3.1)

Auch die Analyse dieser 25 miRNAs ergab keine statistisch signifikante Klassifizierung von Melanompatienten in Bezug auf eine positive oder negative Antwort auf eine ICI-Therapie (vgl. Kap. 3.3, Abb. 11).

Deshalb wurde die Analyse auf einem Panel von 61-miRNAs (vgl. Abb. 5) ausgedehnt, der in unserem Labor routinemäßig zur Charakterisierung von miRNA-Expression in liquid-biopsies (Plasma) von Melanompatienten eingesetzt wird.

Hier konnte nun, bioinformatisch, ein „miRNA-Quintett“ charakterisiert werden, welches deutlich, als Quintett, in einzelnen Kombinationen von weniger als 5 der miRNAs und in Kombination mit anderen, üblichen Blutmarkern von Melanompatienten, eine statistisch sehr gute Unterscheidung (ROC-Analyse) von Melanompatienten, die auf eine ICI-Therapie (bei teilweiser Kombination mit anderen Therapie-Formen) positiv oder negativ reagierten, ermöglicht (vgl. Kap. 3. 4). Klinisch wurde das Ansprechen nach den RECIST-Kriterien in der onkologischen Abteilung des Hautkrebs-Zentrum in Buxtehude bewertet. Danach wurde untersucht, ob die so erhaltene klinische Charakterisierung (ICI-Therapie-responder vs. non-responder) eine Entsprechung in miRNA-Expressionsmustern im Plasma von Melanompatienten entspricht.

Das miRNA-Quintett, welches für diese Unterscheidung genutzt werden kann, setzt sich aus den folgenden miRNAs zusammen:

miR-132-3p, miR-137, miR-197-3p, miR-214-3p und miR-514a-3p

Eine ROC-Analyse (vgl. Abb. 14) ergab, dass dieses miRNA-Quintett gut zwischen respondern und non-respondern unterscheidet (area under the curve, AUC = 0.793). Bezieht man in die Analyse noch weitere Blutwerte, wie LDH, S100, CRP und Eosinophilen-Anzahl, mit ein, so verbessert sich die Unterscheidungs-Qualität noch weiter (vgl. Abb. 17, AUC = 0.914). Ganz unabhängig von der zellulären Bedeutung der 5 miRNAs und der Reaktionswege, in die sie eingebunden sind, kann also, im Sinne eines Biomarkers, ein miRNA-Expressionsmuster gefunden werden, welches in responder und non-responder auf ICI-Therapien (Pembrolizumab, Ipilimumab oder Kombinationen wie Ipilimumab + Nivolumab) unterteilt.

Darüber hinaus kann aber auch durch Literaturabgleich gezeigt werden, dass die 5 miRNAs (jede einzeln für sich) in wichtigen Reaktionswegen der Melanomgenese, Progression und Metastasierung involviert sind:

miR-132-3p

In einer Arbeit zur MikroRNA Expression in BRAF wildtyp und BRAF mutierten Patienten mit metastasiertem Melanom und ihrer Korrelation mit der Ansprechzeit gegenüber BRAF-Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass eine niedrige Expression von miR-132-3p mit einer signifikant verkürzten Zeit bis zur Progression einhergeht (Pinto et al. 2015).

miR-137

Studien haben gezeigt, dass miR-137 als Tumorsuppressor agiert, indem sie die Proliferation und Invasion von Melanomzellen durch Bindung an multiple mRNAs inhibiert (Luo et al. 2013, Chang et al. 2016, Lv et al. 2018).

Qi et al. konnten weiterhin zeigen, dass miR-137 beim malignen Melanom die Migration und Invasion von Melanomzellen verhindert, indem sie die Expression der regulatorischen Untereinheit 3 der Phosphoinosid-3-Kinase (als direktem Target) unterbindet (Qi et al. 2018). Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass

Melanompatienten mit niedriger Expression von miR-137 eine höhere Sterblichkeit aufweisen, als solche mit höherer Expression. Ein Hinweis darauf, dass niedrige Expressionswerte von miR-137 bei Melanompatienten mit einer schlechten Prognose einhergehen (Luo et al. 2013, Li 2016). Wichtige Targetgene, die in der Melanomgenese eine bedeutende Rolle spielen (unter ihnen c-Met, YB1, EZH2 und MITF) konnten als direkte miR-137 Targets identifiziert werden.

miR-197-3p

miR-197-3p wurde bei einer Zahl verschiedener Krebsentitäten (darunter Leberkrebs) als geeigneter prognostischer Biomarker nachgewiesen (Ni et al. 2019). Für diese spezielle miRNA liegen jedoch keine Befunde im Zusammenhang mit dem malignen Melanom vor.

Allerdings legt eine einzelne Studie nahe, dass der Mikrophthalemie assoziierte Transkriptionsfaktor (MITF), der ein Hauptregulator der Melanozytenproliferation Melanomentstehung angesehen wird, für die Expression von miR-197 von Bedeutung ist. So konnte in MITF-knock-down Melanozyten nachgewiesen werden, dass, neben anderen miRNAs, auch miR-197 herunterreguliert war und daher in der MITF-Regulierung von Tyrosinasen und Tyrosinase verwandten Proteinen involviert ist (Wang P et al. 2012).

miR-214-3p

Lunavat et al. konnten bei einem „miRNA deep sequencing“ (total 1014 miRNAs) zeigen, dass miR-214-3p in extrazellulären Vesikeln (EV), die von Melanomzellen aus Melanomzelllinien sezerniert werden, zu einer Gruppe von EV-angereicherter miRNAs (miR-214-3p, miR-199a-3p und mir-155-5p) gehörte (Lunavat et al. 2015).

miR-514a-3p

In einer einzelnen Arbeit aus dem Jahr 2015 wurde beschrieben, dass miR-514a den Tumorsuppressor (NF1) als direktes Target besitzt und über seine Runter-Regulierung die Sensitivität gegenüber einer BRAF^{V600}-Inhibition in Melanomzelllinien moduliert (Stark et al. 2015).

Insgesamt zeigt diese kurze Übersicht, dass die im „miRNA-Quintett“ auftretenden miRNAs bei wichtigen Prozessen in der Melanomentstehung und Progression von Bedeutung sind und damit auch, im mechanistischen Sinn, gute Kandidaten bei der Unterscheidung zwischen respondern und non-respondern auf eine ICI-Therapie des malignen Melanoms darstellen könnten. Im Augenblick wird in weiterführenden (bioinformatischen) Untersuchungen auch der Frage nachgegangen, inwieweit die 5 miRNAs auch in einem „funktionellen“ Netzwerk interagieren.

Zurückliegende Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen haben schon gezeigt, dass eine Vielzahl von miRNAs das Potenzial besitzen, als diagnostische, prognostische oder prädiktive Biomarker eingesetzt zu werden. Allerdings liefern die Arbeiten noch kein konsistentes Bild in Bezug auf die nachgewiesenen miRNAs. Unter Nutzung von *in silico* Analysen (Nutzung von Gene Expression Omnibus, GEO und Daten aus dem Cancer Genome Atlas (TCGA)) konnten Lu et al. zeigen, dass eine 5-miRNA-Signatur (miR-25, -204, -211, -510 und -513) in der Lage ist, Tumorproben des malignen Melanoms von Gewebe aus benignen Nävi zu unterscheiden und deren hohe Expression mit einem verbesserten Überleben von Melanompatienten einhergeht (Lu et al. 2019).

In einer vergleichenden Analyse von 5 zurückliegenden Arbeiten konnten weiterhin Jayawardana et al. ebenfalls eine 5-miRNA-Signatur identifizieren, die reproduzierbar mit der Prognose von Melanom-Erkrankten assoziiert war (miR-142-5p, -150-5p, -342-3p, -155-5p und -146-5p (Jayawardana et al. 2016).

Im Zusammenhang mit ICI-Therapien des malignen Melanoms waren Huber et al. vor kurzem in der Lage zu zeigen, dass eine Tumor-assoziierte miRNA-Signatur (miRNA-146a, -155, -125b, -100, -125a, -146b, -99b und let-7c) myeloide Suppressor-Zellen („myeloid-derived suppressor cells, MDSCs) induziert und die Resistenz von Melanompatienten gegenüber einer Immuntherapie vorhersagt (Huber et al. 2018). Darüber hinaus waren Nakahara et al., in der Lage zu zeigen, dass eine hohe Konzentration der miRNA-Signatur aus miR-16-5p, miR-17-5p und miR-20a5p im Serum von Melanompatienten anzeigt, dass die Patienten positiv auf eine anti-PD-1-Therapie, im Vergleich zu therapieresistenten Patienten, reagierten (Nakahara et al. 2020).

Langfristig ist das Ziel vieler Untersuchungen, zirkulierende miRNAs in „liquid biopsies“ von Melanompatienten als tumorspezifisch zu charakterisieren. Gelingen kann das, indem man melanomspezifische Exosomen (melanoma tumor derived exosomes, MTEX) über melanomspezifische Antigene, welche auf der Membranoberfläche der Exosomen dargeboten werden, isoliert. Hier sind bisher Chondroitin-Sulfat-Proteoglycan 4 (CSPG4) und melanomassoziierten Antigene MAGE 3 und 4 zum Einsatz gekommen (Sharma et al. 2020, Ferrone und Whiteside 2020, Sharma et al. 2018, Wieckowski et al. 2009).

Das (miRNA-) Cargo solcher melanomspezifisch isolierten Exosomen kann dann auch als tumorspezifisch angesehen werden.

Die meisten Untersuchungen zu MTEX wurden allerdings *in-vitro* an Zelllinien durchgeführt. Hier gibt es immer noch wenig Übereinstimmung zwischen den miRNA-Mustern, die in ihnen nachgewiesen werden konnten. Dies liegt sicherlich an den unterschiedlichen analysierten Zelllinien, den Isolationsmethoden für die MTEX und den Nachweismethoden für die miRNAs, wenn man nach diagnostischen, prognostischen oder prädiktiven Biomarkern sucht. Insgesamt waren aber, unter anderen, häufig auftretende miRNAs:

let-7a, let-7c, miR-17, -21, -23b, -25, -27a, -34a, -125b, -130b, -138, 146a, -149, -196a, -199a, -205, -222, -613 und miR-1246 (Zebrowska et al. 2020).

Trotz fehlender Übereinstimmung im miRNA-Muster der unterschiedlichen Studien konnte gezeigt werden, dass fast alle miRNAs Targets (target-mRNAs) besitzen und in Reaktionswege involviert sind, die mit Melanomgenese und Progression des malignen Melanoms verbunden sind.

Eine Reihe von Studien werden seit Kurzem aber auch an MTEX und ihrem (miRNA-) Cargo im Serum/Plasma von Melanompatienten durchgeführt ((Zebrowska et al. 2020). In diesen Studien gibt es aufgrund der zugrunde gelegten Modelle und Analysemethoden noch keine große Konsistenz. Es existieren aber einige Übereinstimmungen für MTEX-assoziierte miRNAs, die in mehr als einer Studie detektiert wurden. Dazu gehören die hochregulierten miR-494, miR-690, miR-17 und let-7c und die runter-regulierte miR-125b (Li et al. 2019, Wozniak et al. 2017, Bland et al. 2018, Pfeffer et al. 2015, Alegre et al. 2014).

All diesen miRNAs ist gemein, dass sie in Prozesse wie Invasion, Migration, Proliferation und Tumor-Progression und Inflammation involviert sind (Zebrowska et al. 2020).

In der Literatur existieren darüber hinaus viele Untersuchungen, die andere Marker heranziehen, um den Progress von Tumorerkrankungen und das Ansprechen auf ICI-Therapien zu detektieren und zu prädictieren. Hier spielen häufig Parameter eine Rolle, welche die Interaktion des Tumors mit seiner Mikro-Umgebung (tumor microenvironment, TME) vermitteln, da das TME eine entscheidende Rolle für Tumorprogression und Metastasierung, als auch für das Ansprechen oder Nicht-Ansprechen auf ICI-Therapien darstellt. Ein immunsuppressives TME wird in diesem Zusammenhang als indikativ für das mögliche Versagen einer ICI-Therapie herangezogen (Petrova et al. 2020). Die Immunsuppression des TME kann dabei durch eine Zahl unterschiedlicher Zelltypen und löslicher Faktoren (z.B. Zytokine) induziert werden. Zu den unterschiedlichen Zelltypen gehören, z.B.:

„myeloid-derived suppressor cell“ (MDSC), Neutrophile („tumor associated neutrophil“s, TAN), krebsassoziierte Fibroblasten („cancer associated fibroblasts“, CAF), tumorassoziierte Macrophagen (TAM) und regulative T-Zellen (Petrova et al. 2020).

So konnte z.B. gezeigt werden, dass die Akkumulation von CAFs, welche die zelluläre Hauptkomponente des Tumor-Stromas darstellen und die zur Produktion von bestimmten Zytokinen beitragen, mit einer geringen Effektivität von anti-PD-1-Therapien, auch beim malignen Melanom verbunden sind (Kalluri 2016, Paraiso und Smalley 2013, Wong et al. 2019).

Eine Vielzahl augenblicklicher Ansätze, die Antwort auf eine ICI-Therapie des malignen Melanoms vorherzusagen, beruhen auf Methoden der Radiologie und Untersuchungen von Tumor-Biopsien und Flüssig-Biopsien (Buder-Bakhaya und Hassel 2018, Kambayashi et al. 2019).

Seit längerer Zeit wird versucht, die Höhe der PD-L1-Expression auf Tumorzellen als prädictiven Biomarker für die Antwort auf eine ICI-Therapie heranzuziehen. Problematisch erweist sich dabei jedoch, dass, obwohl eine PD-L1

Überexpression mit einer verbesserten ICI-Antwort einhergehen kann, auch anhaltend positive Antworten bei PD-L1-negativen Tumoren beobachtet werden (Petrova et al. 2020, Xu-Monette et al. 2017).

Es sind also andere Ansätze notwendig, um den prognostischen oder prädiktiven Wert von PD-L1-Expression assoziierten Endpunkten zu evaluieren.

Hier kommt in letzter Zeit der Messung von PD-L1 (sowohl in löslicher als auch exosomal gebundener Form) in „liquid biopsies“ vermehrt Bedeutung zu. So konnte gezeigt werden, dass hohe Werte für die Konzentration löslichen PD-L1 (eine splice-Variante ohne Transmembran-Domäne) im Plasma von Melanompatienten mit einem progressiven Verlauf der Krankheit einhergehen (Mahoney et al. 2019, Zhou et al. 2017). Auch andere Arbeiten in „liquid biopsies“ konnten für das maligne Melanom auf die prognostische und prädiktive Signifikanz von löslichem PD-1/PD-L1 als Biomarker hinweisen (Zhou et al. 2017, Zhu und Lang 2017). So konnten vor Kurzem Ugurel et al. eindrucksvoll nachweisen, dass erhöhte Serumkonzentrationen von PD-1 oder PD-L1 bei therapienaiven Melanompatienten einen schlechten Erfolg einer PD-1 Inhibitions-Therapie prädiktieren (Ugurel et al. 2020).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Nachweis von PD-L1 auf der Membran von (im Serum/Plasma) zirkulierenden Exosomen als potentiell starker Biomarker für die Antwort auf eine ICI-Therapie beim malignen Melanom angesehen werden kann (Cordonnier et al. 2020). Melanompatienten, die positiv auf eine Therapie mit Pembrolizumab (anti-PD-1-Therapie) reagierten, konnten (mit hoher Signifikanz und Spezifität) von non-respondern durch erhöhte Werte von exosomalem PD-L1, 3-6 Wochen nach Therapie-Beginn, unterschieden werden (Chen et al. 2018).

Der exosomalen PD-L1 Expression (in Tumor-spezifischen Exosomen, TEX) in „liquid biopsies“, zusammen mit der Analyse des luminalen Cargos der Exosomen (besonders miRNAs) wird daher in Zukunft erhöhte Aufmerksamkeit bei der Suche nach z.B. prädiktiven Biomarkern für die Antwort auf ICI-Therapien des malignen Melanoms zukommen.

Zum jetzigen Zeitpunkt der Untersuchungen zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass in einer „discovery-Kohorte“ mit der Messung der miRNA-Expression im

Plasma von Melanompatienten, mittels eines klinisch sehr schnell einsetzbaren (analysierbaren) und stabilen miRNA-Multiplex-Assays (FirePlex-Assay) eine Unterscheidung in responder und non-responder auf ICI-Therapien vorgenommen werden kann.

Allerdings muss in Bezug auf die Respons der Patienten angesprochen werden, dass es sich bei der untersuchten Kohorte um eine retrospektive Kohorte handelte, bei der kein Einfluss mehr auf die verabreichte(n) Therapieform(en) genommen werden konnte. Von der eingeschlossenen Kohorte unterzogen sich Patienten sowohl vor der Blutentnahme als auch zu einem späteren Zeitpunkt nach Blutentnahme einer PD-1-Therapie (und hatten auch schon andere MM-Therapien erhalten). Andere Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme unter PD-1-Therapie oder PD-1 Kombinationen mit anderen ICI-Therapien. Es ist also schwierig, die Therapieantwort auf eine einzige, alleinige ICI-Therapie zu evaluieren, obwohl, entsprechend der RECIST-Kriterien, die Antwort auf PD-1-Therapie in jedem Behandlungsschema erfasst wurde.

Es müssen also weitere Untersuchungen, an prospektiven Kohorten, unter definierten Therapiebedingungen zeigen, inwieweit das miRNA-Expressionsmuster (miRNA-Quintett), welches in dieser Arbeit gefunden wurde, in Zukunft auch als prädiktiver Biomarker genutzt werden kann, der bei therapienaiven Patienten, vor Beginn einer bestimmten ICI-Therapie, das Ansprechen auf die jeweilige Therapieform vorhersagen kann. Dann sollte auch die Messung der miRNA-Expression in melanomspezifischen Exosomen herangezogen werden.

Das in dieser Arbeit beschriebene miRNA-Quintett stellt aber schon einen ersten „Classifier“ dar, der bei späteren Untersuchungen zur Benennung von prädiktiven Biomarkern für das Ansprechen auf ICI-Therapien des malignen Melanoms herangezogen werden kann. Es ist jedoch zu betonen, dass bis zum Einsatz eines miRNA-basierten Biomarkers, die Ergebnisse in größeren Kohorten validiert werden müssen.

5 Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Dissertation ist die Messung der miRNA Expressionen im Plasma von Melanompatienten, um die Unterscheidung in *responder* und *non-responder* auf Immuncheckpoint Therapien vornehmen zu können.

Es konnte gezeigt werden, dass – nicht wie initial angenommen – die miR-34a-5p im Plasma von Melanompatienten nicht zwischen *respondern* und *non-respondern* auf eine Immuncheckpoint-Therapie unterscheiden kann. Gleichzeitig konnte festgestellt werden, dass mit der Expression der miR-34a-5p im Plasma von Melanompatienten, mit relativ guter statistischer Signifikanz, auf das Vorliegen von BRAF- Mutationen geschlossen werden kann. Weitere Analysen mit einer größeren Kohorte werden sich anschließen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein miRNA-Quintett (miR-132-3p, miR-137, miR-197-3p, miR-214-3p und miR-514a-3p) identifiziert werden, deren Expression im Plasma von Melanompatienten zwischen *respondern* und *non-respondern* bei ICI Therapie, signifikant unterscheidet. Weitere Untersuchungen an prospektiven Kohorten unter definierten Bedingungen müssen zeigen, ob in Zukunft dieses miRNA- Quintett als prädiktiver Biomarker genutzt werden kann.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurden zusätzlich zum miRNA Quintett molekulare und zelluläre Marker (LDH, S100, CRP, Eosinophile) ergänzt, welche die Aussagekraft für die Unterscheidung in *responder* und *non-responder* deutlich verbesserten als die Nutzung des miRNA-Quintetts allein.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass miRNA-basierte Expressionsmuster in Liquid Biopsies (Plasma) von Melanompatienten geeignete Kandidaten für zukünftige diagnostische, prognostische und prädiktive Biomarker darstellen. Die klinische Relevanz muss in geplanten größeren klinischen Studien validiert werden, um diese Verfahren für den klinischen Alltag anwendbar zu machen.

The subject of this dissertation is the measurement of miRNA expressions in the plasma of melanoma patients in order to be able to differentiate between responders and non-responders on immune checkpoint therapies.

It could be shown that – not as initially assumed – the miR-34a-5p in the plasma of melanoma patients cannot distinguish between responders and non-responders to an immune checkpoint therapy. At the same time, it was found that with the

expression of miR-34a-5p in the plasma of melanoma patients the presence of BRAF mutations can be inferred with relatively good statistical significance. Further analyses with a larger cohort will follow.

Within the scope of this work, a miRNA quintet (miR-132-3p, miR-137, miR-197-3p, miR-214-3p and miR-514a-3p) could be identified, whose expression in the plasma of melanoma patients significantly distinguishes between responders and non-responders in ICI therapy. Further investigations on prospective cohorts under defined conditions must show whether this miRNA quintet can be used as a predictive bio-marker in the future.

In the third part of this work, in addition to the miRNA quintet, molecular and cellular markers (LDH, S100, CRP, eosinophils) were added, which significantly improved the power for distinguishing between responders and non-responders than the use of the miRNA quintet alone.

In summary, it has been shown that miRNA-based expression patterns in liquid biopsies (plasma) of melanoma patients are suitable candidates for future diagnostic, prognostic and predictive biomarkers. The clinical relevance needs to be validated in planned larger clinical studies in order to make these procedures applicable to everyday clinical practice.

6 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
*	signifikant
*P	p-Wert
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AML	akute myeloische Leukämie
ATM	ataxia- telangiectasia- mutated- Kinase
ATR	ataxia- telangiectasia and Rad3 related
a. u.	arbitrary unit
AUC	Area under the curve
BCC	Basal Cell Carcinoma
BRAF	V- raf murine sarcoma virus oncogene homolog B1
bspw	beispielsweise
bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa
CAF	cancer associated fibroblasts
c-MET	tyrosine-protein kinase Met
CRP	c- reaktives Protein
CSPG4	Chondroitin-Sulfat-Proteoglycan 4
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4
DC	dendritische Zellen
E	Glutamat
EGFR	epidermal growth factor receptor
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
engl.	Englisch
ERK	extracellularsignal-regulated kinase
et al.	Et alii/ et aliae
etc.	et cetera
EV	extrazelluläre Vesikel
FDA	Food and Drug Administration
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded tissue

g	Gramm
GEO	Gene Expressions Omnibus
GM-CSF	granulocyte- macrophage colony-stimulating factor
H ₂ O	Wasser
ICI	Immunecheckpoint- Inhibitoren
IFN-Gamma	Interferon-Gamma
IgC	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITIM	Immunoreceptor tyrosine- based inhibitory motif
ITSM	Immunoreceptor tyrosine- based switch motif
Kap	Kapitel
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene
L	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
MAGE	Melanomassoziierten Antigene
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MDSC	myeloid-derived suppressor cell
MEK	MAP/ERK= MAPKK, Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mg	Milligramm
min	Minute
MITF	Mikrophthalmie assoziierter Transkriptionsfaktor
miR/miRNA	microRNA
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MM	malignes Melanom
mRNA	messenger RNA
MTEX	melanoma tumor derived exosomes
Myc	Transkriptionsfaktor
NF-kb	Nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells
NRAS	neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog
ORR	objektive Response rate

OS	overall survival
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
PD-1	programmed cell death protein 1
PDL-1/2	programmed cell death ligand 1/2
pH	potential Hydrogenii
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
rel.	relativ
PF	progression-free survival
ROC	Receiver- Operating- Characteristics
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
s	siehe
s.a.	siehe auch
S100	Calcium- Bindeprotein
sog.	sogenannt
TAM	Tumor-assoziierte Macrophagen
TAN	tumor associated neutrophils
TCGA	The cancer genom Atlas
TEX	tumorspezifische Exosome
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor alpha
TME	tumor microenvironment
TPS	tumor proportion score
V	Valin
vgl. a.	vergleichend auch
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
µL	Mikroliter

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Targetmoleküle und Antikörper, die bei der ICI des Melanoms eingesetzt werden	11
Tabelle 2: Patientenkohorte	28
Tabelle 3: Patientencharakteristika und Blutwerte	30

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der Weg der miRNA-Biogenese. MiRNA-Gene werden transkribiert von RNA-Polymerase II, die im Zellkern pri-miRNAs bildet. Pri-miRNAs werden von Drosha/DGCR8 (bildet eine kürzere zweite Prä-miRNA), die von Exportin-5/Ran-GTP, und dann von Dicer/TRBP zu miRNA duplex verarbeitet. Ein Strang miRNADuplex wird in den miRNA-RISC-Komplex eingebaut, was zur Unterdrückung der Proteinexpression führt. Förderung des Ziel-mRNA-Abbaus (Carpri et al. 2016).....	19
Abbildung 2: Induktion von PD-L1 durch den IFN- γ -Signalweg und miRNAs, die auf die Schlüsselgene in diesem Signalweg abzielen. Der grüne Pfeil bedeutet eine stimulierende Veränderung, das rote „T“-Symbol bedeutet eine hemmende Veränderung (Wang Q et al. 2017).	24
Abbildung 3: Schematische Darstellung der FirePlex-Methode (www.abcam.com/kits/how-does-the-multiplex-circulating-mirna-assay-work , abgerufen am 20.02.2022)	33
Abbildung 4: Schematischer Ablauf des FirePlex-Assays für die Flusszytometrie (www.abcam.com/kits/how-does-the-multiplex-circulating-mirna-assay-work , abgerufen am 20.02.2022)	34
Abbildung 5: Für die miRNA-Analyse in dieser Arbeit wurden oben dargestellte miRNAs ausgewählt.....	39
Abbildung 6: Heatmap für die differentielle Expression von 25 miRNAs	42
Abbildung 7: Altersabhängigkeit der miR-34a-5p Expression im Plasma von Melanompatienten in der in dieser Arbeit verwendeten Kohorte (n = 68).	44
Abbildung 8: miR-34a-5p Expression in Abhängigkeit vom Geschlecht der untersuchten Patienten, dem Melanomstadium und dem Vorliegen von Hirnmetastasen (n = Anzahl der jeweils inkludierten Patienten).	45
Abbildung 9: miR-34a-5p Expression im Plasma von Melanompatienten in Abhängigkeit vom BRAF-Mutationsstatus (BRAF ^{V600} (mu) vs BRAF-	

Wildtyp (wt)) (n=78). Zum Vergleich sind noch einige Patienten mit NRAS-Mutationen analysiert worden (nras).	46
Abbildung 10: miR-34a-5p-Expression im Plasma von Melanompatienten, die auf eine Immuncheckpoint-Therapie (PD-1 ansprachen oder nicht (responder ja vs. nein, n=61, n _{res} = 27, n _{non-res} = 34). Ansprechen auf die Therapie wurde, klinisch, nach den RECIST-Kriterien bestimmt (Eisenhauer et al. 2009).	47
Abbildung 11: Heatmap für die miRNA-Expression bei respondern und non-respondern auf eine Immuncheckpoint-Therapie (PD-1)	49
Abbildung 12: Exemplarische Darstellung der statistischen Analyse der miRNA-Expression zwischen respondern und non-respondern auf eine Immuncheckpoint-Therapie für 5 zufällig ausgewählte miRNAs aus Abb 6. (Heatmap). Welch Test. (n = 62).	49
Abbildung 13: Differentiell exprimierte miRNAs im Plasma von Melanompatienten (n= 61), welche eine Unterscheidung in responder und non-responder (ja vs. nein) auf eine PD-1 Immuncheckpoint-Therapie ermöglichen (p-Werte nach Welch's t-Test, vgl. Material & Methoden, Kapitel 2.3.3).	51
Abbildung 14: ROC Analyse zur Bewertung der Unterscheidungs-Qualität zwischen respondern und non-respondern auf Basis logistischer Regression mit miR-132-3p, miR-137, miR-197-3p, miR-214-3p und miR-514a-. AUC: area under the curve. Die Werte in Klammern geben die Spezifität bzw. Sensitivität für den besten cut-off an (berechnet mittels Youden-Index, der das Paar mit bester Sensitivität und Spezifität angibt, schwarzer Punkt in der Kurve.)	52
Abbildung 15: ROC Analyse zur Bewertung der Unterscheidungs-Qualität zwischen respondern und non-respondern auf Basis logistischer Regression mit miR-137, miR-514a-3p. AUC: area under the curve. Die Werte in Klammern geben die Spezifität bzw. Sensitivität für den besten cut-off an (berechnet mittels Youden-Index, der das Paar mit bester Sensitivität und Spezifität angibt, schwarzer Punkt in der Kurve.)	53

Abbildung 16: Boxplot Blutparameter.....54

Abbildung 17: ROC Analyse zur Bewertung der Unterscheidungs-Qualität zwischen respondern und non-respondern auf Basis logistischer Regression mit miR-132-3p, miR-137, miR-197-3p, miR-214-3p, miR-514a-3p und CRP, LDH, S100, und Eosinophilen-Zahl. AUC: area under the curve. Die Werte in Klammern geben die Spezifität bzw. Sensitivität für den besten cut-off an (berechnet mittels Youden-Index, der das Paar mit bester Sensitivität und Spezifität angibt, schwarzer Punkt in der Kurve.).....55

9 Literaturverzeichnis

Adams BD, Anastasiadou E, Esteller M, He L, Slack FJ: The Inescapable Influence of Noncoding RNAs in Cancer. *Cancer Res* 2015, 75(24):5206-5210.

Alegre E, Sanmamed MF, Rodriguez C, Carranza O, Martin-Algarra S, Gonzalez A: Study of circulating microRNA-125b levels in serum exosomes in advanced melanoma. *Arch Pathol Lab Med* 2014, 138(6):828-832.

Alles J, Fehlmann T, Fischer U, Backes C, Galata V, Minet M, Hart M, Abu-Halima M, Grasser FA, Lenhof HP et al: An estimate of the total number of true human miRNAs. *Nucleic Acids Res* 2019, 47(7):3353-3364.

Allgower C, Kretz AL, von Karstedt S, Wittau M, Henne-Bruns D, Lemke J: Friend or Foe: S100 Proteins in Cancer. *Cancers (Basel)* 2020, 12(8).

Awada G, Jansen Y, Schwarze JK, Tijtgat J, Hellinckx L, Gondry O, Vermeulen S, Warren S, Schats K, van Dam PJ et al: A Comprehensive Analysis of Baseline Clinical Characteristics and Biomarkers Associated with Outcome in Advanced Melanoma Patients Treated with Pembrolizumab. *Cancers (Basel)* 2021, 13(2).

Baretton G: PD-L1 als neuer Biomarker. *Diagnostik im Dialog* 2016.

Bartel DP: MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004, 116(2):281-297.

Bland CL, Byrne-Hoffman CN, Fernandez A, Rellick SL, Deng W, Klink DJ, 2nd: Exosomes derived from B16F0 melanoma cells alter the transcriptome of cytotoxic T cells that impacts mitochondrial respiration. *Febs J* 2018, 285(6):1033-1050.

Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, Chow LQ, Vokes EE, Felip E, Holgado E et al: Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2015, 373(17):1627-1639.

Boyer M, Cayrefourcq L, Dereure O, Meunier L, Becquart O, Alix-Panabieres C: Clinical Relevance of Liquid Biopsy in Melanoma and Merkel Cell Carcinoma. *Cancers (Basel)* 2020, 12(4).
Bresnick AR, Weber DJ, Zimmer DB: S100 proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 2015, 15(2):96-109.

Buder-Bakhaya K, Hassel JC: Biomarkers for Clinical Benefit of Immune Checkpoint Inhibitor Treatment-A Review From the Melanoma Perspective and Beyond. *Front Immunol* 2018, 9:1474.

Carlino MS, Long GV, Schadendorf D, Robert C, Ribas A, Richtig E, Nyakas M, Caglevic C, Tarhini A, Blank C et al: Outcomes by line of therapy and programmed death ligand 1 expression in patients with advanced melanoma treated with pembrolizumab or ipilimumab in KEYNOTE-006: A randomised clinical trial. *Eur J Cancer* 2018, 101:236-243.

Carpi, S, Polini, B, Fogli, S. Circulating microRNAs in cutaneous melanoma. *Diagnosis and Prognosis. Management of Malignant Melanoma* 2016; 1: 12.

Chang X, Zhang H, Lian S, Zhu W: miR-137 suppresses tumor growth of malignant melanoma by targeting aurora kinase A. *Biochem Biophys Res Commun* 2016, 475(3):251-256.

Cheishvili D, Boureau L, Szyf M: DNA demethylation and invasive cancer: implications for therapeutics. *Br J Pharmacol* 2015, 172(11):2705-2715.

Chen G, Huang AC, Zhang W, Zhang G, Wu M, Xu W, Yu Z, Yang J, Wang B, Sun H et al: Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature* 2018, 560 (7718):382-386.

Christoffersen NR, Shalgi R, Frankel LB, Leucci E, Lees M, Klausen M, Pilpel Y, Nielsen FC, Oren M, Lund AH: p53-independent upregulation of miR-34a during oncogene-induced senescence represses MYC. *Cell Death Differ* 2010, 17(2):236-245.

Christofi T, Baritaki S, Falzone L, Libra M, Zaravinos A: Current Perspectives in Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel)* 2019, 11(10).

Condrat CE, Thompson DC, Barbu MG, Bugnar OL, Boboc A, Cretoiu D, Suciu N, Cretoiu SM, Voinea SC: miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. *Cells* 2020, 9(2).

Cordonnier M, Nardin C, Chanteloup G, Derangere V, Algros MP, Arnould L, Garrido C, Aubin F, Gobbo J: Tracking the evolution of circulating exosomal-PD-L1 to monitor melanoma patients. *J Extracell Vesicles* 2020, 9(1):1710899.

Cortez MA, Anfossi S, Ramapriyan R, Menon H, Atalar SC, Aliru M, Welsh J, Calin GA: Role of miRNAs in immune responses and immunotherapy in cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2019, 58(4):244-253.

Cortez MA, Ivan C, Valdecanas D, Wang X, Peltier HJ, Ye Y, Araujo L, Carbone DP, Shilo K, Giri DK et al: PDL1 Regulation by p53 via miR-34. *J Natl Cancer Inst* 2016, 108(1).
Creugny A, Fender A, Pfeffer S: Regulation of primary microRNA processing. *FEBS Lett* 2018, 592(12):1980-1996.

Danbaran GR, Aslani S, Sharafkandi N, Hemmatzadeh M, Hosseinzadeh R, Azizi G, Jadidi-Niaragh F, Babaie F, Mohammadi H: How microRNAs affect the PD-L1 and its synthetic pathway in cancer. *Int Immunopharmacol* 2020, 84:106594.

Daud AI, Wolchok JD, Robert C, Hwu WJ, Weber JS, Ribas A, Hodi FS, Joshua AM, Kefford R, Hersey P et al: Programmed Death-Ligand 1 Expression and Response to the Anti-Programmed Death 1 Antibody Pembrolizumab in Melanoma. *J Clin Oncol* 2016, 34(34):4102-4109.

Davis AA, Patel VG: The role of PD-L1 expression as a predictive biomarker: an analysis of all US Food and Drug Administration (FDA) approvals of immune checkpoint inhibitors. *J Immunother Cancer* 2019, 7(1):278.

Davis LE, Shalin SC, Tackett AJ: Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer Biol Ther* 2019, 20(11):1366-1379.

Diem S, Kasenda B, Spain L, Martin-Liberal J, Marconcini R, Gore M, Larkin J: Serum lactate dehydrogenase as an early marker for outcome in patients treated with anti-PD-1 therapy in metastatic melanoma. *Br J Cancer* 2016, 114(3):256-261.

Ding L, Lu S, Li Y: Regulation of PD-1/PD-L1 Pathway in Cancer by Noncoding RNAs. *Pathol Oncol Res* 2019.

Dragomir M, Mafra ACP, Dias SMG, Vasilescu C, Calin GA: Using microRNA Networks to Understand Cancer. *Int J Mol Sci* 2018, 19(7).

Eddy K, Chen S: Overcoming Immune Evasion in Melanoma. *Int J Mol Sci* 2020, 21(23).

Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M et al: New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009, 45(2):228-247.

Fan J, Yin Z, Xu J, Wu F, Huang Q, Yang L, Jin Y, Yang G: Circulating microRNAs predict the response to anti-PD-1 therapy in non-small cell lung cancer. *Genomics* 2020, 112(2):2063-2071.

Ferrone S, Whiteside TL: Targeting CSPG4 for isolation of melanoma cell-derived exosomes from body fluids. *Hno* 2020, 68(2):100-105.

Flaherty KT, Hodi FS, Fisher DE: From genes to drugs: targeted strategies for melanoma. *Nat Rev Cancer* 2012, 12(5):349-361.

Flaherty KT, Infante JR, Daud A, Gonzalez R, Kefford RF, Sosman J, Hamid O, Schuchter L, Cebon J, Ibrahim N et al: Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med* 2012, 367(18):1694-1703.

Foth M, Wouters J, de Chaumont C, Dynoodt P, Gallagher WM: Prognostic and predictive biomarkers in melanoma: an update. *Expert Rev Mol Diagn* 2016, 16(2):223-237.

Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP: Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009, 19(1):92-105.

Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, Melchi CF: Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer* 2005, 41(1):28-44.

Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Boyle P, Melchi CF: Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer* 2005, 41(1):45-60.

Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Zanetti R, Masini C, Boyle P, Melchi CF: Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur J Cancer* 2005, 41(14):2040-2059.

Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP, Patnaik A, Aggarwal C, Gubens M, Horn L et al: Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015, 372(21):2018-2028.

Gebhardt C, Sevko A, Jiang H, Lichtenberger R, Reith M, Tarnanidis K, Holland-Letz T, Umansky L, Beckhove P, Sucker A et al: Myeloid Cells and Related Chronic Inflammatory Factors as Novel Predictive Markers in Melanoma Treatment with Ipilimumab. *Clin Cancer Res* 2015, 21(24):5453-5459.

Gettinger S, Horn L, Jackman D, Spigel D, Antonia S, Hellmann M, Powderly J, Heist R, Sequist LV, Smith DC et al: Five-Year Follow-Up of Nivolumab in Previously Treated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Results From the CA209-003 Study. *J Clin Oncol* 2018, 36(17):1675-1684.

Goodman AM, Kato S, Bazhenova L, Patel SP, Frampton GM, Miller V, Stephens PJ, Daniels GA, Kurzrock R: Tumor Mutational Burden as an Independent Predictor of Response to Immunotherapy in Diverse Cancers. *Mol Cancer Ther* 2017, 16(11):2598-2608.

Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH: The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 2005, 23:515-548.

Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011, 144(5):646-674. Havel JJ, Chowell D, Chan TA: The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2019, 19(3):133-150.

Henrich KO, Schwab M, Westermann F: 1p36 tumor suppression--a matter of dosage? *Cancer Res* 2012, 72(23):6079-6088.

Hermeking H: p53 enters the microRNA world. *Cancer Cell* 2007, 12(5):414-418.

Hermeking H: The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ* 2010, 17(2):193-199.

- Huber V, Vallacchi V, Fleming V, Hu X, Cova A, Dugo M, Shahaj E, Sulsenti R, Vergani E, Filipazzi P et al: Tumor-derived microRNAs induce myeloid suppressor cells and predict immunotherapy resistance in melanoma. *J Clin Invest* 2018, 128(12):5505-5516.
- Iorio MV, Croce CM: MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med* 2012, 4(3):143-159.
- Jayawardana K, Schramm SJ, Tembe V, Mueller S, Thompson JF, Scolyer RA, Mann GJ, Yang J: Identification, Review, and Systematic Cross-Validation of microRNA Prognostic Signatures in Metastatic Melanoma. *J Invest Dermatol* 2016, 136(1):245-254.
- Jeltsch A, Broche J, Bashtrykov P: Molecular Processes Connecting DNA Methylation Patterns with DNA Methyltransferases and Histone Modifications in Mammalian Genomes. *Genes (Basel)* 2018, 9(11).
- Jenuwein T, Allis CD: Translating the histone code. *Science* 2001, 293(5532):1074-1080.
- Jurj A, Zanoaga O, Braicu C, Lazar V, Tomuleasa C, Irimie A, Berindan-Neagoe I: A Comprehensive Picture of Extracellular Vesicles and Their Contents. Molecular Transfer to Cancer Cells. *Cancers (Basel)* 2020, 12(2).
- Kalia M: Biomarkers for personalized oncology: recent advances and future challenges. *Metabolism* 2015, 64(3 Suppl 1):S16-21.
- Kalluri R: The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2016, 16(9):582-598.
- Kambayashi Y, Fujimura T, Hidaka T, Aiba S: Biomarkers for Predicting Efficacies of Anti-PD1 Antibodies. *Front Med (Lausanne)* 2019, 6:174.
- Khair DO, Bax HJ, Mele S, Crescioli S, Pellizzari G, Khiabany A, Nakamura M, Harris RJ, French E, Hoffmann RM et al: Combining Immune Checkpoint Inhibitors: Established and Emerging Targets and Strategies to Improve Outcomes in Melanoma. *Front Immunol* 2019, 10:453.
- Kumar S, Sharawat SK: Epigenetic regulators of programmed death-ligand 1 expression in human cancers. *Transl Res* 2018, 202:129-145.
- Laino AS, Woods D, Vassallo M, Qian X, Tang H, Wind-Rotolo M, Weber J: Serum interleukin-6 and C-reactive protein are associated with survival in melanoma patients receiving immune checkpoint inhibition. *J Immunother Cancer* 2020, 8(1).
- Latchana N, Ganju A, Howard JH, Carson WE, 3rd: MicroRNA dysregulation in melanoma. *Surg Oncol* 2016, 25(3):184-189.
- LeBoit PE, Burg G, Weedon D, Sarasain A (eds.): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Skin Tumours. Lyon: IARC Press; 2006.
- Leung AM, Morton DL, Ozao-Choy J, Hari DM, Shin-Sim M, Difronzo AL, Faries MB: Staging of regional lymph nodes in melanoma: a case for including nonsentinel lymph node positivity in the American Joint Committee on Cancer staging system. *JAMA Surg* 2013, 148(9):879-884.
- Li J, Chen J, Wang S, Li P, Zheng C, Zhou X, Tao Y, Chen X, Sun L, Wang A et al: Blockage of transferred exosome-shuttled miR-494 inhibits melanoma growth and metastasis. *J Cell Physiol* 2019.
- Li N: Low Expression of Mir-137 Predicts Poor Prognosis in Cutaneous Melanoma Patients. *Med Sci Monit* 2016, 22:140-144.
- Lianidou E, Pantel K: Liquid biopsies. *Genes Chromosomes Cancer* 2019, 58(4):219-232.

- Lim SY, Lee JH, Diefenbach RJ, Kefford RF, Rizos H: Liquid biomarkers in melanoma: detection and discovery. *Mol Cancer* 2018, 17(1):8.
- Long GV, Weber JS, Infante JR, Kim KB, Daud A, Gonzalez R, Sosman JA, Hamid O, Schuchter L, Cebon J et al: Overall Survival and Durable Responses in Patients With BRAF V600-Mutant Metastatic Melanoma Receiving Dabrafenib Combined With Trametinib. *J Clin Oncol* 2016, 34(8):871-878.
- Lorusso C, De Summa S, Pinto R, Danza K, Tommasi S: miRNAs as Key Players in the Management of Cutaneous Melanoma. *Cells* 2020, 9(2).
- Lu T, Chen S, Qu L, Wang Y, Chen HD, He C: Identification of a five-miRNA signature predicting survival in cutaneous melanoma cancer patients. *PeerJ* 2019, 7:e7831.
- Lunavat TR, Cheng L, Kim DK, Bhadury J, Jang SC, Lasser C, Sharples RA, Lopez MD, Nilsson J, Ghos YS et al: Small RNA deep sequencing discriminates subsets of extracellular vesicles released by melanoma cells--Evidence of unique microRNA cargos. *RNA Biol* 2015, 12(8):810-823.
- Luo C, Tetteh PW, Merz PR, Dickes E, Abukiwan A, Hotz-Wagenblatt A, Holland-Cunz S, Sinnberg T, Schitteck B, Schadendorf D et al: miR-137 inhibits the invasion of melanoma cells through downregulation of multiple oncogenic target genes. *J Invest Dermatol* 2013, 133(3):768-775.
- Lv N, Hao S, Luo C, Abukiwan A, Hao Y, Gai F, Huang W, Huang L, Xiao X, Eichmuller SB et al: miR-137 inhibits melanoma cell proliferation through downregulation of GLO1. *Sci China Life Sci* 2018, 61(5):541-549.
- Mahmoud F, Shields B, Makhoul I, Hutchins LF, Shalin SC, Tackett AJ: Role of EZH2 histone methyltransferase in melanoma progression and metastasis. *Cancer Biol Ther* 2016, 17(6):579-591.
- Mahoney KM, Shukla SA, Patsoukis N, Chaudhri A, Browne EP, Arazi A, Eisenhaure TM, Pendergraft WF, 3rd, Hua P, Pham HC et al: A secreted PD-L1 splice variant that covalently dimerizes and mediates immunosuppression. *Cancer Immunol Immunother* 2019, 68(3):421-432.
- Maia J, Caja S, Strano Moraes MC, Couto N, Costa-Silva B: Exosome-Based Cell-Cell Communication in the Tumor Microenvironment. *Front Cell Dev Biol* 2018, 6:18.
- Mannavola F, Tucci M, Felici C, Stucci S, Silvestris F: miRNAs in melanoma: a defined role in tumor progression and metastasis. *Expert Rev Clin Immunol* 2016, 12(1):79-89.
- Misso G, Di Martino MT, De Rosa G, Farooqi AA, Lombardi A, Campani V, Zarone MR, Gulla A, Tagliaferri P, Tassone P et al: Mir-34: a new weapon against cancer? *Mol Ther Nucleic Acids* 2014, 3:e194.
- Moran B, Silva R, Perry AS, Gallagher WM: Epigenetics of malignant melanoma. *Semin Cancer Biol* 2018, 51:80-88.
- Nakahara S, Fukushima S, Okada E, Morinaga J, Kubo Y, Tokuzumi A, Matsumoto S, Tsuruta-Kadohisa M, Kimura T, Kuriyama H et al: MicroRNAs that predict the effectiveness of anti-PD-1 therapies in patients with advanced melanoma. *J Dermatol Sci* 2020, 97(1):77-79.
- Nebbioso A, Tambaro FP, Dell'Aversana C, Altucci L: Cancer epigenetics: Moving forward. *PLoS Genet* 2018, 14(6):e1007362.
- Ni JS, Zheng H, Huang ZP, Hong YG, Ou YL, Tao YP, Wang MC, Wang ZG, Yang Y, Zhou WP: MicroRNA-197-3p acts as a prognostic marker and inhibits cell invasion in hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett* 2019, 17(2):2317-2327.

Nik Mohamed Kamal N, Shahidan WNS: Non-Exosomal and Exosomal Circulatory MicroRNAs: Which Are More Valid as Biomarkers? *Front Pharmacol* 2019, 10:1500.

Nyakas M, Aamdal E, Jacobsen KD, Guren TK, Aamdal S, Hagene KT, Brunsvig P, Yndestad A, Halvorsen B, Tasken KA et al: Prognostic biomarkers for immunotherapy with ipilimumab in metastatic melanoma. *Clin Exp Immunol* 2019, 197(1):74-82.

O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C: Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018, 9:402.

Omar HA, El-Serafi AT, Hersi F, Arafa EA, Zaher DM, Madkour M, Arab HH, Tolba MF: Immunomodulatory MicroRNAs in cancer: targeting immune checkpoints and the tumor microenvironment. *Febs J* 2019, 286(18):3540-3557.

Orouji E, Utikal J: Tackling malignant melanoma epigenetically: histone lysine methylation. *Clin Epigenetics* 2018, 10(1):145.

Pagni F, Guerini-Rocco E, Schultheis AM, Grazia G, Rijavec E, Ghidini M, Lopez G, Venetis K, Croci GA, Malapelle U et al: Targeting Immune-Related Biological Processes in Solid Tumors: We do Need Biomarkers. *Int J Mol Sci* 2019, 20(21).

Paraiso KH, Smalley KS: Fibroblast-mediated drug resistance in cancer. *Biochem Pharmacol* 2013, 85(8):1033-1041.

Pardini B, Sabo AA, Birolo G, Calin GA: Noncoding RNAs in Extracellular Fluids as Cancer Biomarkers: The New Frontier of Liquid Biopsies. *Cancers (Basel)* 2019, 11(8).

Passarelli A, Mannavola F, Stucci LS, Tucci M, Silvestris F: Immune system and melanoma biology: a balance between immunosurveillance and immune escape. *Oncotarget* 2017, 8(62):106132-106142.

Patel SP, Kurzrock R: PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer Ther* 2015, 14(4):847-856.

Pentcheva-Hoang T, Chen L, Pardoll DM, Allison JP: Programmed death-1 concentration at the immunological synapse is determined by ligand affinity and availability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104(45):17765-17770.

Perez-Guijarro E, Yang HH, Araya RE, El Meskini R, Michael HT, Vodnala SK, Marie KL, Smith C, Chin S, Lam KC et al: Multimodal preclinical platform predicts clinical response of melanoma to immunotherapy. *Nat Med* 2020.

Petrova V, Arkhypov I, Weber R, Groth C, Altevogt P, Utikal J, Umansky V: Modern Aspects of Immunotherapy with Checkpoint Inhibitors in Melanoma. *Int J Mol Sci* 2020, 21(7).

Pfeffer SR, Grossmann KF, Cassidy PB, Yang CH, Fan M, Kopelovich L, Leachman SA, Pfeffer LM: Detection of Exosomal miRNAs in the Plasma of Melanoma Patients. *J Clin Med* 2015, 4(12):2012-2027.

Pfeifer GP, Besaratinia A: UV wavelength-dependent DNA damage and human non-melanoma and melanoma skin cancer. *Photochem Photobiol Sci* 2012, 11(1):90-97.

Pfeifer GP: Defining Driver DNA Methylation Changes in Human Cancer. *Int J Mol Sci* 2018, 19(4).

Pichler M, Calin GA: MicroRNAs in cancer: from developmental genes in worms to their clinical application in patients. *Br J Cancer* 2015, 113(4):569-573.

Pinto R, Strippoli S, De Summa S, Albano A, Azzariti A, Guida G, Popescu O, Lorusso V, Guida M, Tommasi S: MicroRNA expression in BRAF-mutated and wild-type metastatic melanoma and its correlation with response duration to BRAF inhibitors. *Expert Opin Ther Targets* 2015, 19(8):1027-1035.

Pires da Silva I, Lo S, Quek C, Gonzalez M, Carlino MS, Long GV, Menzies AM: Site-specific response patterns, pseudoprogression, and acquired resistance in patients with melanoma treated with ipilimumab combined with anti-PD-1 therapy. *Cancer* 2020, 126(1):86-97.

Pleasance ED, Cheetham RK, Stephens PJ, McBride DJ, Humphray SJ, Greenman CD, Varela I, Lin ML, Ordonez GR, Bignell GR et al: A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature* 2010, 463(7278):191-196.

Polini B, Carpi S, Romanini A, Breschi MC, Nieri P, Podesta A: Circulating cell-free microRNAs in cutaneous melanoma staging and recurrence or survival prognosis. *Pigment Cell Melanoma Res* 2019, 32(4):486-499.

Puzanov I, Diab A, Abdallah K, Bingham CO, 3rd, Brogdon C, Dadu R, Hamad L, Kim S, Lacouture ME, LeBoeuf NR et al: Managing toxicities associated with immune checkpoint inhibitors: consensus recommendations from the Society for Immunotherapy of Cancer (SITC) Toxicity Management Working Group. *J Immunother Cancer* 2017, 5(1):95.

Qi J, Wang WW, Chen W, Lu WY, Shang AQ: Mechanism of miR-137 regulating migration and invasion of melanoma cells by targeting PIK3R3 gene. *J Cell Biochem* 2018.

Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csoszi T, Fulop A, Gottfried M, Peled N, Tafreshi A, Cuffe S et al: Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2016, 375(19):1823-1833.

Reimers N, Pantel K: Liquid biopsy: novel technologies and clinical applications. *Clinical chemistry and laboratory medicine* 2019, 57(3):312-316.

Ren D, Hua Y, Yu B, Ye X, He Z, Li C, Wang J, Mo Y, Wei X, Chen Y et al: Predictive biomarkers and mechanisms underlying resistance to PD1/PD-L1 blockade cancer immunotherapy. *Mol Cancer* 2020, 19(1):19.

Riefolo M, Porcellini E, Dika E, Broseghini E, Ferracin M: Interplay between small and long non-coding RNAs in cutaneous melanoma: a complex jigsaw puzzle with missing pieces. *Mol Oncol* 2019, 13(1):74-98.

Rokavec M, Li H, Jiang L, Hermeking H: The p53/miR-34 axis in development and disease. *J Mol Cell Biol* 2014, 6(3):214-230.

Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, van der Heijden MS, Balar AV, Necchi A, Dawson N, O'Donnell PH, Balmanoukian A, Loriot Y et al: Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet* 2016, 387(10031):1909-1920.

Ross CL, Kaushik S, Valdes-Rodriguez R, Anvekar R: MicroRNAs in cutaneous melanoma: Role as diagnostic and prognostic biomarkers. *J Cell Physiol* 2018, 233(7):5133-5141.

Rossi E, Schinzari G, Maiorano BA, Indelicati G, Di Stefani A, Pagliara MM, Fragomeni SM, De Luca EV, Sammarco MG, Garganese G et al: Efficacy of immune checkpoint inhibitors in different types of melanoma. *Hum Vaccin Immunother* 2021, 17(1):4-13.

Sabari JK, Leonardi GC, Shu CA, Umeton R, Montecalvo J, Ni A, Chen R, Dienstag J, Mrad C, Bergagnini I et al: PD-L1 expression, tumor mutational burden, and response to immunotherapy in patients with MET exon 14 altered lung cancers. *Ann Oncol* 2018, 29(10):2085-2091.

Sarkar D, Leung EY, Baguley BC, Finlay GJ, Askarian-Amiri ME: Epigenetic regulation in human melanoma: past and future. *Epigenetics* 2015, 10(2):103-121.

Sharma P, Diergaarde B, Ferrone S, Kirkwood JM, Whiteside TL: Melanoma cell-derived exosomes in plasma of melanoma patients suppress functions of immune effector cells. *Sci Rep* 2020, 10(1):92.

Sharma P, Ludwig S, Muller L, Hong CS, Kirkwood JM, Ferrone S, Whiteside TL: Immunoaffinity-based isolation of melanoma cell-derived exosomes from plasma of patients with melanoma. *J Extracell Vesicles* 2018, 7(1):1435138.

Shen H, Laird PW: Interplay between the cancer genome and epigenome. *Cell* 2013, 153(1):38-55.

Shen H, Yang ES, Conry M, Fiveash J, Contreras C, Bonner JA, Shi LZ: Predictive biomarkers for immune checkpoint blockade and opportunities for combination therapies. *Genes Dis* 2019, 6(3):232-246.

Shtivelman E, Davies MQ, Hwu P, Yang J, Lotem M, Oren M, Flaherty KT, Fisher DE: Pathways and therapeutic targets in melanoma. *Oncotarget* 2014, 5(7):1701-1752.

Simiczyjew A, Dratkiewicz E, Mazurkiewicz J, Zietek M, Matkowski R, Nowak D: The Influence of Tumor Microenvironment on Immune Escape of Melanoma. *Int J Mol Sci* 2020, 21(21).

Simon SCS, Hu X, Panten J, Grees M, Renders S, Thomas D, Weber R, Schulze TJ, Utikal J, Umansky V: Eosinophil accumulation predicts response to melanoma treatment with immune checkpoint inhibitors. *Oncoimmunology* 2020, 9(1):1727116.

Smolle MA, Prinz F, Calin GA, Pichler M: Current concepts of non-coding RNA regulation of immune checkpoints in cancer. *Mol Aspects Med* 2019, 70:117-126.

Stark MS, Bonazzi VF, Boyle GM, Palmer JM, Symmons J, Lanagan CM, Schmidt CW, Herington AC, Ballotti R, Pollock PM et al: miR-514a regulates the tumour suppressor NF1 and modulates BRAFi sensitivity in melanoma. *Oncotarget* 2015, 6(19):17753-17763.

Stark MS, Klein K, Weide B, Haydu LE, Pflugfelder A, Tang YH, Palmer JM, Whiteman DC, Scolyer RA, Mann GJ et al: The Prognostic and Predictive Value of Melanoma-related MicroRNAs Using Tissue and Serum: A MicroRNA Expression Analysis. *EBioMedicine* 2015, 2(7):671-680.

Strub T, Ballotti R, Bertolotto C: The "ART" of Epigenetics in Melanoma: From histone "Alterations, to Resistance and Therapies". *Theranostics* 2020, 10(4):1777-1797.

Sun X, Zhang N, Yin C, Zhu B, Li X: Ultraviolet Radiation and Melanomagenesis: From Mechanism to Immunotherapy. *Front Oncol* 2020, 10:951.

Swart M, Verbrugge I, Beltman JB: Combination Approaches with Immune-Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *Front Oncol* 2016, 6:233.

Tiffen J, Gallagher S, Filipp F, Gunatilake D, Al Emran A, Cullinane C, Dutton-Register K, Aoude L, Hayward N, Chatterjee A et al: EZH2 cooperates with DNA methylation to downregulate key tumour suppressors and interferon gene signatures in melanoma. *J Invest Dermatol* 2020.

Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM: Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell* 2015, 27(4):450-461.

Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM: Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2016, 16(5):275-287.

Tunger A, Sommer U, Wehner R, Kubasch AS, Grimm MO, Bachmann MP, Platzbecker U, Bornhauser M, Baretton G, Schmitz M: The Evolving Landscape of Biomarkers for Anti-PD-1 or Anti-PD-L1 Therapy. *J Clin Med* 2019, 8(10).

Ugurel S, Schadendorf D, Horny K, Sucker A, Schramm S, Utikal J, Pfohler C, Herbst R, Schilling B, Blank C et al: Elevated baseline serum PD-1 or PD-L1 predicts poor outcome of PD-1 inhibition therapy in metastatic melanoma. *Ann Oncol* 2020, 31(1):144-152.

Valentini V, Zelli V, Gaggiano E, Silvestri V, Rizzolo P, Bucalo A, Calvieri S, Grassi S, Frascione P, Donati P et al: MiRNAs as Potential Prognostic Biomarkers for Metastasis in Thin and Thick Primary Cutaneous Melanomas. *Anticancer Res* 2019, 39(8):4085-4093.

Valihrach L, Androvic P, Kubista M: Circulating miRNA analysis for cancer diagnostics and therapy. *Mol Aspects Med* 2020, 72:100825.

van Zeijl MCT, Ismail RK, de Wreede LC, van den Eertwegh AJM, de Boer A, van Dartel M, Hilarius DL, Aarts MJB, van den Berkmortel F, Boers-Sonderen MJ et al: Real-world outcomes of advanced melanoma patients not represented in phase III trials. *International journal of cancer* 2020, 147(12):3461-3470.

Varamo C, Occelli M, Vivenza D, Merlano M, Lo Nigro C: MicroRNAs role as potential biomarkers and key regulators in melanoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2017, 56(1):3-10.

Varricchi G, Galdiero MR, Loffredo S, Lucarini V, Marone G, Mattei F, Schiavoni G: Eosinophils: The unsung heroes in cancer? *Oncoimmunology* 2018, 7(2):e1393134.

Vignard V, Labbe M, Marec N, Andre-Gregoire G, Jouand N, Fonteneau JF, Labarriere N, Fradin D: MicroRNAs in Tumor Exosomes Drive Immune Escape in Melanoma. *Cancer Immunol Res* 2020, 8(2):255-267.

Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Gutierrez-Vazquez C, Sanchez-Madrid F, Mittelbrunn M: Sorting it out: regulation of exosome loading. *Semin Cancer Biol* 2014, 28:3-13.

Voller D, Ott C, Bosserhoff A: MicroRNAs in malignant melanoma. *Clin Biochem* 2013, 46(10-11):909-917.

Wallis CJD, Lawson K, Butaney M, Satkunasivam R, Parikh J, Freedland SJ, Patel SP, Hamid O, Pal SK, Klaassen Z: Association between PD-L1 status and immune checkpoint inhibitor response in advanced malignancies: a systematic review and meta-analysis of overall survival data. *Jpn J Clin Oncol* 2020.

Wan Z, Gao X, Dong Y, Zhao Y, Chen X, Yang G, Liu L: Exosome-mediated cell-cell communication in tumor progression. *Am J Cancer Res* 2018, 8(9):1661-1673.

Wang P, Li Y, Hong W, Zhen J, Ren J, Li Z, Xu A: The changes of microRNA expression profiles and tyrosinase related proteins in MITF knocked down melanocytes. *Mol Biosyst* 2012, 8(11):2924-2931.

Wang Q, Lin W, Tang X, Li S, Guo L, Lin Y, Kwok HF: The Roles of microRNAs in Regulating the Expression of PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint. *Int J Mol Sci* 2017, 18(12).

Wang X, Li J, Dong K, Lin F, Long M, Ouyang Y, Wei J, Chen X, Weng Y, He T et al: Tumor suppressor miR-34a targets PD-L1 and functions as a potential immunotherapeutic target in acute myeloid leukemia. *Cell Signal* 2015, 27(3):443-452.

Weber JS, Kudchadkar RR, Yu B, Gallenstein D, Horak CE, Inzunza HD, Zhao X, Martinez AJ, Wang W, Gibney G et al: Safety, efficacy, and biomarkers of nivolumab with vaccine in ipilimumab-refractory or -naïve melanoma. *J Clin Oncol* 2013, 31(34):4311-4318.

Welch BL: The significance of the difference between two means when the population variances are unequal. *Biometrika* 193, 29: 350–362.

Wieckowski EU, Visus C, Szajnik M, Szczepanski MJ, Storkus WJ, Whiteside TL: Tumor-derived microvesicles promote regulatory T cell expansion and induce apoptosis in tumor-reactive activated CD8⁺ T lymphocytes. *J Immunol* 2009, 183(6):3720-3730.

William J. Youden: Index for rating diagnostic tests. *Cancer* 3, Nr 1, 1950, S. 32-35.

Wong PF, Wei W, Smithy JW, Acs B, Toki MI, Blenman KRM, Zeltermann D, Kluger HM, Rimm DL: Multiplex Quantitative Analysis of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Immunotherapy Outcome in Metastatic Melanoma. *Clin Cancer Res* 2019, 25(8):2442-2449.

Wozniak M, Peczek L, Czernek L, Duchler M: Analysis of the miRNA Profiles of Melanoma Exosomes Derived Under Normoxic and Hypoxic Culture Conditions. *Anticancer Res* 2017, 37(12):6779-6789.

Xiong TF, Pan FQ, Li D: Expression and clinical significance of S100 family genes in patients with melanoma. *Melanoma Res* 2019, 29(1):23-29.

Xu-Monette ZY, Zhang M, Li J, Young KH: PD-1/PD-L1 Blockade: Have We Found the Key to Unleash the Antitumor Immune Response? *Front Immunol* 2017, 8:1597.

Yang Q, Xu Z, Zheng L, Zhang L, You Q, Sun J: Multimodal detection of PD-L1: reasonable biomarkers for immune checkpoint inhibitor. *Am J Cancer Res* 2018, 8(9):1689-1696.

Yang W, Song Y, Lu YL, Sun JZ, Wang HW: Increased expression of programmed death (PD)-1 and its ligand PD-L1 correlates with impaired cell-mediated immunity in high-risk human papillomavirus-related cervical intraepithelial neoplasia. *Immunology* 2013, 139(4):513-522.

Yao Y, Des Marais TL, Costa M: Chromatin Memory in the Development of Human Cancers. *Gene Technol* 2014, 3(2):114.

Yates LA, Norbury CJ, Gilbert RJ: The long and short of microRNA. *Cell* 2013, 153(3):516-519.
Yi M, Xu L, Jiao Y, Luo S, Li A, Wu K: The role of cancer-derived microRNAs in cancer immune escape. *J Hematol Oncol* 2020, 13(1):25.

You JS, Jones PA: Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? *Cancer Cell* 2012, 22(1):9-20.

Zebrowska A, Widlak P, Whiteside T, Pietrowska M: Signaling of Tumor-Derived sEV Impacts Melanoma Progression. *Int J Mol Sci* 2020, 21(14).

Zhang Y, Liu Y, Liu H, Tang WH: Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell Biosci* 2019, 9:19.

Zhao Z, Shilatifard A: Epigenetic modifications of histones in cancer. *Genome Biol* 2019, 20(1):245.

Zhou J, Mahoney KM, Giobbie-Hurder A, Zhao F, Lee S, Liao X, Rodig S, Li J, Wu X, Butterfield LH et al: Soluble PD-L1 as a Biomarker in Malignant Melanoma Treated with Checkpoint Blockade. *Cancer Immunol Res* 2017, 5(6):480-492.

Zhu X, Lang J: Soluble PD-1 and PD-L1: predictive and prognostic significance in cancer. *Onco-target* 2017, 8(57):97671-97682.

10 Internetquellen

Statistisches Bundesamt, Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut: Datenbankabfrage mit Schätzung der Inzidenz, Prävalenz und des Überlebens von Krebs in Deutschland auf Basis der epidemiologischen Landeskrebsregisterdaten (DOI: 10.18444 / 5.03.01.0005.0016.0001). www.krebsdaten.de/abfrage. Letzte Aktualisierung: 21.12.2021. Abrufdatum: 20.2.2022

Gesellschaft für epidemiologische Krebsregistrierung in Deutschland e.V. Krebs in Deutschland für 2017/2018, Malignes Melanom der Haut. www.gekid.de/wp-content/uploads/2022/01/krebs_in_deutschland_2021.pdf. Abrufdatum: 20.02.2022

Robert Koch Institut. https://krebsdaten.de/Krebs/SiteGlobals/Forms/Datenbankabfrage/EN/datenbankabfrage_stufe1_form.html. Abrufdatum 25.09.2022

WHO. International Program on Chemical Safety Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation 2001. <https://incchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm>. Abrufdatum: 14.09.2022

11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Eckhard Breitbart, Herrn Dr. rer. nat. Rüdiger Greinert und Frau Dr. rer. nat. Beate Volkmer für die Vergabe der Promotionsarbeit sowie der allzeit sehr guten Betreuung während des gesamten Promotionsprozesses.

Außerdem geht ein großer Dank an Frau Leonie Bluhm für die gute Zusammenarbeit während der Datenerhebung. Herrn Dr. I-Peng Chen danke ich für die Unterstützung im Labor und Herrn Marc Bender für die statistische Auswertung. Frau Dr. rer. nat. Christine Lawrenz danke ich für die Durchsicht und Formatierung der Arbeit.

Abschließend danke ich meiner Familie für die Unterstützung während des gesamten Zeitraumes.

12 Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

13 Eidesstattliche Erklärung

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: