

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Innere Medizin, Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie

Prof. Dr. med. Stefan W Schneider

Die Rolle von S100A8/A9 und neutrophilen Granulozyten im Serum sowie deren Wirkung in der Tumor- Mikroumgebung beim malignen Melanom

Dissertation

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

vorgelegt von:

Yasmin Fede Schwietzer
aus Hamburg

Hamburg 2023

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 25.06.2024**

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

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Christoph Seidel

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Christoffer Gebhardt

Mit größtem Respekt für ihr wissenschaftliches Engagement
meinen beiden Schwestern Ysabel und Mariel gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	4
1.1	Das maligne Melanom	4
1.1.1	Epidemiologie, Ätiologie und Formen	4
1.1.2	Pathogenese und Tumorprogression.....	5
1.1.3	Erstdiagnostik und Staging	6
1.1.4	Therapiekonzepte in Abhängigkeit vom Staging.....	10
1.1.4.1	Chirurgische Eingriffe, adjuvante Radio- und Interferontherapie	10
1.1.4.2	Chemotherapie.....	11
1.1.4.3	Antiangiogene Therapie	12
1.1.4.4	BRAF/MEK-Inhibition	13
1.1.4.5	Immuntherapie	14
1.2	Therapieansprechen auf Checkpointinhibition	19
1.3	DAMPs in der Tumormikroumgebung.....	20
1.3.1	S100A8/A9 und seine Interaktionen im Tumorbett	21
1.4	Immunzell-Infiltration des Tumors	23
1.5	Der neutrophile Granulozyt	25
1.5.1	Morphologie	25
1.5.2	Funktionen bei Entzündung und malignen Tumoren	26
1.6	Ziele der Dissertation	27
2	Material und Methoden.....	28
2.1	Studienkonzept	28
2.1.1	Systemische Analyse.....	28
2.1.2	Gewebestudie	29
2.1.3	Ethikvoten	33
2.2	Material	34
2.2.1	Geräte	34
2.2.2	Software und Datenbanken	35
2.2.3	Verbrauchsmaterialien	36
2.2.4	Chemikalien und Reagenzien	36
2.2.5	Puffer und Lösungen.....	37
2.2.6	Kit für ELISA-Messungen.....	39
2.2.7	Primärer Antikörper.....	39

2.2.8	Sekundärer Antikörper	39
2.3	Methoden	39
2.3.1	Bestimmung der S100A8/A9-Konzentrationen im Patientenserum	39
2.3.2	Immunfluoreszenz-Färbungen von Gewebeschnitten	41
2.3.3	Mikroskopie und Auswertung der Melanom-TMAs	42
2.3.4	Statistische Berechnungen	43
3	Ergebnisse	45
3.1	Systemische Analyse	45
3.1.1	S100A8/A9.....	45
3.1.1.1	Univariate Survivalanalyse.....	45
3.1.1.2	Responder vs. Non-Responder: ANOVA-Analysen und kinetische Analyse	51
3.1.2	Neutrophile Granulozyten	55
3.1.2.1	Univariate Survivalanalyse.....	55
3.1.2.2	Responder vs. Non-Responder: ANOVA-Analysen und kinetische Analyse	65
3.2	Gewebeanalyse	74
3.2.1	Bildanalyse.....	75
3.2.2	Vergleich der Neutrophileninfiltration zwischen den Gewebearten.....	77
3.2.3	Univariate Survivalanalyse.....	80
3.2.4	Vergleich der Neutrophileninfiltration im Krankheitsverlauf	82
4	Diskussion	85
4.1	Die Rolle von zirkulierendem S100A8/A9 bei der Tumorprogression	85
4.2	Der Einfluss von Serum-Neutrophilen auf das Tumorwachstum	87
4.3	Die Effekte von Tumor infiltrierenden Neutrophilen auf die Tumorprogression.....	90
4.3.1	Neutrophilenheterogenität.....	93
4.3.2	Neutrophilenpolarisierung: N1 und N2.....	97
4.3.3	Förderung der Tumorprogression durch N2-Neutrophile	99
4.3.4	Neutrophile NETose.....	100
4.3.5	Modulation der T-Zell-Antwort durch Neutrophile	101
4.3.6	Charakteristika einer protumoralen Tumormikroumgebung.....	102
4.4	Ausblick.....	105
4.4.1	Therapieansätze hinsichtlich S100A8/A9	107

4.4.2	Therapeutische Eingriffe bezüglich NETs, Neutrophilen-Rekrutierung und Neutrophilen induzierter T-Zell-Blockade	107
4.4.3	Die Rolle der Kombinationstherapien	109
4.4.4	Therapieeffizienz-Monitoring mittels sequentieller Liquid Biopsy	110
5	Zusammenfassung/Summary	111
6	Anhang	112
7	Abbildungsverzeichnis	117
8	Tabellenverzeichnis	119
9	Abkürzungsverzeichnis	120
10	Literaturverzeichnis	124
11	Lebenslauf	143
12	Eigene Veröffentlichungen	144
13	Danksagung	145
14	Eidesstattliche Versicherung	147

1 Einleitung

1.1 *Das maligne Melanom*

1.1.1 *Epidemiologie, Ätiologie und Formen*

Das maligne Melanom der Haut geht von den Pigmentzellen der Epidermis aus. Verglichen mit anderen Hauttumorerkrankungen verkürzt es durch sein aggressives Fortschreiten das Leben der Betroffenen am stärksten (Jennings and Murphy, 2009). Für 90% aller Sterbefälle an Hauttumoren ist das maligne Melanom verantwortlich (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019). Vor allem bei der hellhäutigen Bevölkerung verläuft die Erkrankung mit am häufigsten tödlich und nimmt weltweit in ihrer Inzidenz stark zu: Es treten jährlich 10 bis 15 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner in Mitteleuropa sowie 10 bis 25 Fälle pro 100.000 Einwohner in den Vereinigten Staaten und 50 bis 60 neue Krankheitsfälle pro 100.000 Einwohner in Australien auf. Das Lebenszeitrisko, am Melanom zu erkranken, betrug im Jahr 1960 1:600, im Jahr 2010 1:53 und steigt aufgrund eines besonders mit Sonnenexposition verbundenen Freizeit- und Urlaubsverhaltens seit den letzten 50 bis 60 Jahren und im Zusammenhang mit erhöhter UV-Belastung durch den Klimawandel rasant weiter an (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019). Die jährliche Wachstumsrate der Erkrankungswahrscheinlichkeit beträgt 4 bis 8 % (Fritsch, 2018). Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen. Es wird von einer Verdopplung der Inzidenzraten bei Männern in den nächsten 20 Jahren und bei Frauen in den nächsten 30 Jahren ausgegangen. 2012 lag die Melanom-assoziierte Sterberate in Deutschland bei Männern mit 4,1 pro 100.000 Einwohner höher als die Mortalitätsrate der Frauen (3 pro 100.000 Einwohner). Die Ursache hierfür besteht unter anderem darin, dass Männer vor allem im höheren Alter an Maßnahmen der Sekundärprävention weniger häufig teilnehmen (Duschek et al., 2013, El Sharouni et al., 2019). Im Vergleich zu den stark steigenden Inzidenzraten stabilisieren sich die Sterberaten, was auf die Zunahme von im Jahr 2008 gesetzlich eingeführten Hautkrebs-Screenings und verbesserte Frühdiagnostik zurückzuführen sein mag (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019). Zwei Drittel aller Melanome werden im frühen Tumorstadium entdeckt. Die meisten sogenannten „schwarzen“ Hauttumoren treten zwischen dem 30. und dem

70. Lebensjahr auf. Die Tumorentstehung basiert auf strahlungsbedingten DNA-Schäden. Da die Kapazität der DNA, sich zu reparieren, im Alter sinkt, steigt das Erkrankungsrisiko im Laufe des Lebens exponentiell (Sample and He, 2018). Hinzu kommt, dass die Dysfunktionalität des Immunsystems im Alter zunimmt und dies mit einer reduzierten Tumorabwehr korreliert (Jackaman et al., 2017). Durchschnittlich manifestiert sich das Melanom bei Frauen im Alter von 60 Jahren und bei Männern mit 68 Jahren. Wie beschrieben ist der hauptsächliche Risikofaktor die UV-Strahlung, wobei die kumulative UV-Exposition der „Sonnenterrassen“ des Körpers (Gesicht, Unterarme, Handrücken) nur mit dem Auftreten des Lentigo-maligna-Melanoms (5% der Melanome) zusammenfällt. Die anderen Unterarten (superfiziell-spreitendes (65%), noduläres (15%), akral-lentiginöses (5%) und amelanotisches Melanom) finden sich vorwiegend an nur intermittierend UV-exponierten Körperteilen (Rumpf, Unterschenkel häufig bei Frauen). Die Inzidenz dieser Tumore steht Studien zufolge vor allem mit der Anzahl abgelaufener schwerer Sonnenbrände im Zusammenhang (Fritsch, 2018).

1.1.2 Pathogenese und Tumorprogression

Melanome entwickeln sich überwiegend aus klinisch unauffälliger Haut oder seltener, in 25-50% der Fälle, aus Melanomvorläufern wie melanozytären Naevi. Dabei handelt es sich um eine Anhäufung von Melanozyten in der Basalzellschicht. Ein Naevus ist eine gutartige Fehlbildung der Haut oder Schleimhaut (Fritsch, 2018). Der UV-Strahlung kommt als Mutagen bei der Entartung der Zellen die größte Bedeutung bei (Sample and He, 2018, Rastrelli et al., 2014). Sie kann den ersten Gendefekt auslösen, der als „Initiation“ bezeichnet wird. Überdies wird durch UV-Strahlung Angiotropismus und somit auch die Progression und Metastasierung des Melanoms gefördert (Bald et al., 2014b). Verschiedenste Mutationen sind in mehreren Signaltransduktionswegen beim malignen Melanom beschrieben worden (Lugovic-Mihic et al., 2019). Die Multiple-Hit-Theorie der Karzinogenese, bei der mehr als ein Mutationsereignis nötig ist, um die Tumorentstehung auszulösen, liegt auch beim Melanom zugrunde (Fritsch, 2018). In **Abbildung 1** ist dargestellt, in welchen Schritten sich eine Hautläsion mit UV-Signatur in ein metastasiertes Melanom umwandelt. Ausgangspunkt ist wahrscheinlich ein einziger neoplastischer Zellklon (Fritsch, 2018). Ein intraepidermal gelegenes Melanoma *in situ* wird invasiv, indem

es die Basallamina durchbricht. Der Tumor breitet sich horizontal aus und weist durch vertikale Invasion eine knotige Struktur auf. Je höher die Mutationslast, desto unkontrollierter erfolgt das Wachstum. Da sich die Metastasierung aus vertikalem Eindringen ergibt, korreliert die Prognose der Erkrankung mit der Tumordicke. Vom Primärtumor ausgehend kommt es zur lymphogenen Aussaat in einem Umkreis bis 2 cm als Satellitenmetastasen, und in einer Distanz > 2 cm in die ableitenden Lymphwege als In-Transit-Metastasen. Anschließend werden die Lymphknotenstationen und möglicherweise die Haut oder das subkutane Gewebe infiltriert. Subkutane Metastasen können auch durch hämatogene Aussaat entstehen. Im Rahmen der Fernmetastasierung streut der Tumor hämatogen in innere Organe, wie die Leber, die Lunge und das Gehirn (Elder, 2016).

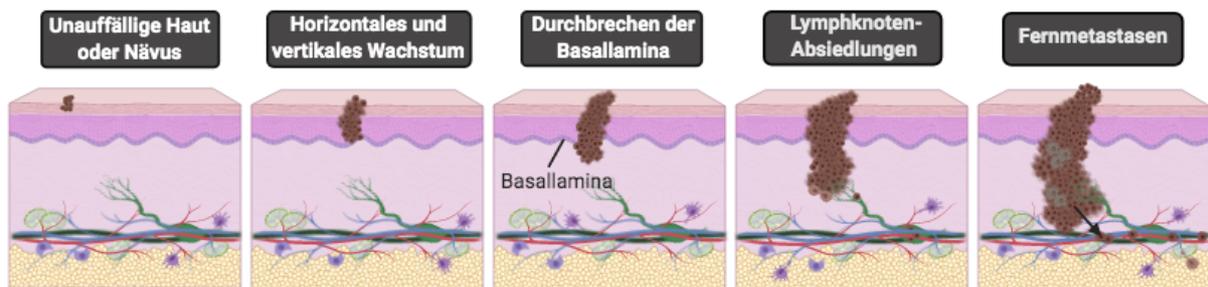
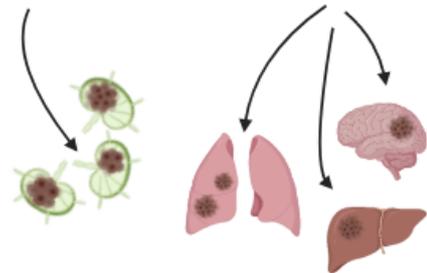


Abbildung 1: Tumorprogression des malignen Melanoms.

Der Entwicklung eines malignen Melanoms liegt die Entartung der Melanozyten zugrunde. Ausgangspunkt kann sowohl ein Nävus wie auch unauffällige Haut sein. Falls maligne Melanomzellen in tiefere Hautschichten eindringen, die Basallamina durchbrechen und lymphogen in Lymphknoten und hämatogen in innere Organe wie Lunge, Leber und Gehirn metastasieren, so verschlechtert sich die Prognose der Erkrankung zusehends (Elder, 2016).



1.1.3 Erstdiagnostik und Staging

Bei Verdacht auf ein malignes Melanom der Haut erfolgt die klinische Untersuchung mittels eines Dermatoskops, wobei es sich um ein Auflichtmikroskop handelt, welches die diagnostische Genauigkeit im Vergleich zur Inspektion ohne Hilfsmittel verbessert (Argenziano et al., 2006). Verdächtige Pigmentmale werden zunächst mit kleinem Sicherheitsabstand komplett exzidiert oder es wird eine Probeexzision durchgeführt. Die Untersuchung des Exzidats erfolgt durch einen Histopathologen. Ist eine maligne Entartung der Pigmentzellen feststellbar, wird ein Staging der

Tumorerkrankung durchgeführt. Das Melanom-Klassifikationssystem des American Joint Committee on Cancer (AJCC), veröffentlicht 2009, besteht aus der TNM-Einteilung (T: Tumorgroße, N: Nodus (Lymphknotenbefall), M: (Fern-)Metastasen) sowie einer Stadieneinteilung in Stadium 0-IV.

Als wichtigster prognostischer Faktor im frühen Erkrankungsstadium gilt die Tumordicke nach Breslow (Breslow, 1970). Es sind durch das AJCC in 2001 vier „T-Klassen“ definiert worden ($\leq 1,0$ mm; 1,01 – 2,0 mm; 2,01 – 4,0 mm; $> 4,0$ mm), die in der untenstehenden **Tabelle 1** aufgeführt sind. Im Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Gewebeschnitt werden die Ulzeration und Mitoserate des Primarius bestimmt, welche insbesondere bei Tumordicken < 1 mm prognostisch eine Rolle spielen (Azzola et al., 2003). Aus dem Ulzerationsstatus sowie dem mitotischen Index ergibt sich die Zusatzbezeichnung a oder b, wie unten tabellarisch aufgelistet (**Tabelle 1**). In Abhängigkeit vom T-Stadium wird der Sicherheitsabstand bei der Nachexzision bemessen. In den Stadien pT1 und pT2 soll dieser 1 cm und in den Stadien pT3 und pT4 2 cm betragen.

T-Klassifikation	Tumordicke	Weitere prognostische Parameter
Tis		Melanoma <i>In-situ</i> , keine Tumorinvasion
Tx	Keine Angabe	Stadium nicht bestimmbar, z.B. unbekannter Primarius
T1	$\leq 1,0$ mm	a: ohne Ulzeration, Mitosen $< 1/\text{mm}^2$ b: mit Ulzeration oder Mitoserate $\geq 1/\text{mm}^2$
T2	1,01 – 2,0 mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration
T3	2,01 – 4,0 mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration
T4	$> 4,0$ mm	a: ohne Ulzeration b: mit Ulzeration

Tabelle 1: T-Klassifikation des Primärtumors beim malignen Melanom.

Entscheidend für die T-Klassifikation ist die Tumordicke nach Breslow. Die Zusatzbezeichnung a oder b erfolgt je nach Ulzerationsstatus des Tumors. (AJCC 2009)

Des Weiteren besteht die TNM-Einteilung aus der Angabe zum tumorösen Lymphknotenbefall (N-Klassifikation, siehe **Tabelle 2**). Wenn klinisch kein Metastasierungsverdacht besteht, bei einer Tumordicke von $> 1,0$ mm, ulzeriertem Tumor, erhöhten Mitoseraten oder Patienten unter 40 Jahren soll eine

Wächterlymphknoten-Biopsie durchgeführt werden. Ca. 50 % der Melanome metastasieren in regionale Lymphknoten, ca. 25 % breiten sich lokal aus (Satellitenmetastasen und In-Transit-Metastasen).

N-Klassifikation	Zahl metastatisch befallener Lymphknoten (LK)	Ausmaß der Lymphknoten-metastasierung
N1	1 LK	a: nur mikroskopische Metastase (klinisch okkult) b: nur makroskopische Metastase (klinisch nachweisbar)
N2	2 – 3 LK	a: nur mikroskopische Metastase(n) (klinisch okkult) b: nur makroskopische Metastase(n) (klinisch nachweisbar) c: Satelliten- oder In-Transit-Metastase(n) ohne regionäre LK-Metastasen
N3	≥ 4 LK, oder verbackene LKs oder Satelliten- oder In-Transit-Metastasen mit regionärer LK-Beteiligung	

Tabelle 2: N-Klassifikation der regionären Lymphknoten beim malignen Melanom.

Je nach Anzahl metastatisch befallener Lymphknoten wird eine Einteilung in N1 bis N3 mit dem möglichen Zusatz a bis c vorgenommen. Letzterer richtet sich nach dem Ausmaß der Lymphknoten-metastasierung. (AJCC 2009)

Als drittes spezifiziert die TNM-Klassifikation das Ausmaß der (Fern-)Metastasierung (M-Klassifikation, siehe **Tabelle 3**), welche bei 25% der Melanome auftritt. Die häufigsten Zielorgane der hämatogenen Fernmetastasierung sind Haut, Leber, Skelett, ZNS und Lunge. In diesem Zusammenhang ist als Tumormarker das Serum-Level der Laktatdehydrogenase (LDH) prognostisch relevant. Eine erhöhte Serum-LDH zeigt Zellmembranschädigung und Zelluntergang an, für die aber nicht spezifisch ein Tumorgeschehen ursächlich sein muss. Dennoch hat sich erwiesen, dass die LDH im fernmetastasierten Melanom positiv mit der Tumorlast korreliert. In der Klinik findet sie somit als serologischer Biomarker und Indikator für die Tumorprogression Beachtung (Wang et al., 2004, Karagiannis et al., 2014).

M-Klassifikation	Art der Fernmetastasierung	LDH
M1a	Metastasen in Haut,	Normal

	Subkutis oder Lymphknoten jenseits der regionären Lymphknoten	
M1b	Lungenmetastase(n)	Normal
M1c	Fernmetastase(n) anderer Lokalisation oder Fernmetastase(n) jeder Lokalisation mit erhöhten Serumwerten der LDH	Normal Erhöht

Tabelle 3: M-Klassifikation der Fernmetastasen beim malignen Melanom.

In der M-Klassifikation wird der Tumor nach Art der Fernmetastasierung in Verbindung mit dem LDH-Serum-Level des Patienten kategorisiert. (AJCC 2009)

Die Festlegung des Tumorstadiums in 0-IV nach AJCC basiert auf der TNM-Klassifikation (siehe **Tabelle 4**). In den nicht-metastasierten Stadien 0-IIc wird der Tumor vor allem nach der T-Klasse eingeteilt, bei regionärer Lymphknotenmetastasierung (Stadium III) nach der N-Klasse und alle Tumore mit Organmetastasen (Zusatz M1x) werden im Stadium IV zusammengefasst.

Stadium	Primärtumor (pT)	Regionäre Lymphknotenmetastasen (N)	Fernmetastasen (M)
0	<i>In situ</i> -Tumor	Keine	Keine
IA	< 1,0 mm, keine Ulzeration	Keine	Keine
IB	< 1,0 mm mit Ulzeration oder Mitoserate $\geq 1/\text{mm}^2$	Keine	Keine
	1,01 - 2,0 mm, keine Ulzeration	Keine	Keine
IIA	1,01 - 2,0 mm mit Ulzeration	Keine	Keine
	2,01 - 4,0 mm, keine Ulzeration	Keine	Keine
IIB	2,01 - 4,0 mm mit Ulzeration	Keine	Keine
	> 4,0 mm, keine Ulzeration	Keine	Keine
IIC	> 4,0 mm mit Ulzeration	Keine	Keine
IIIA	Jede Tumordicke, keine Ulzeration	Mikroskopische Metastasen (klinisch okkult) in bis zu 3 LK	Keine
IIIB	Jede Tumordicke	Mikroskopische	Keine

	mit Ulzeration	Metastasen (klinisch okkult) in bis zu 3 LK	
	Jede Tumordicke, keine Ulzeration	Bis zu 3 makroskopische nodale Metastasen	Keine
	Jede Tumordicke, keine Ulzeration	Keine, aber Satelliten- und/oder In-Transit-Metastasen	Keine
IIIC	Jede Tumordicke mit Ulzeration	Bis zu 3 makroskopische nodale Metastasen oder Satellit(en) oder In-Transit-Metastasen ohne regionäre LK-Metastasen	Keine
	Jede Tumordicke ± Ulzeration	4 oder mehr makroskopische nodale Metastasen oder verbackene Lymphknoten oder Satelliten und/oder In-Transit-Metastasen mit regionären Lymphknotenmetastasen	Keine
IV			Fernmetastasen

Tabelle 4: Stadieneinteilung des malignen Melanoms.

Die Stadieneinteilung umfasst grob vier Stadien bzw. zehn verschiedene Kategorien. Bis zum Stadium IIC spielt die T-Klassifikation eine entscheidende Rolle. Hier liegen weder regionäre Metastasen noch Fernmetastasen vor. Beginnend mit Stadium IIIA kommt der N-Klassifikation die größte Bedeutung bei, während im Stadium IV alle fernmetastasierten Tumore mit dem Zusatz M1x zusammengefasst werden. (AJCC 2009)

Aus dem exakten Staging des Melanoms zu Beginn oder im Verlauf der Tumorerkrankung wird die adäquate Behandlungsstrategie abgeleitet.

1.1.4 Therapiekonzepte in Abhängigkeit vom Staging

1.1.4.1 Chirurgische Eingriffe, adjuvante Radio- und Interferontherapie

Die kurative Behandlung des Melanoms ist insbesondere durch die chirurgische Exzision („R0“: mikroskopisch kein nachgewiesener Residualtumor) möglich. Bei von

Vornherein inoperablen und auch bei inoperablen R1 und R2 resezierten Tumoren (R1: mikroskopisch nachgewiesener Residualtumor, R2: makroskopische Residuen) besteht die Möglichkeit einer Radiotherapie (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019). Ab Stadium IB wird eine Lymphknoten-sonografie empfohlen. Patienten, die dem Stadium IIA zugeordnet werden, können mit Interferon alpha behandelt werden, welches sowohl antiangiogen, immunregulatorisch, antiproliferativ und proapoptotisch wirkt (Tarhini et al., 2012). Bei Patienten im Stadium IIB und IIC wird eine deutliche Empfehlung für die Interferongabe ausgesprochen. Wurde ein Stadium IIC oder III diagnostiziert, ist eine weitergehende Ausbreitungsdiagnostik indiziert. Wenn zytologisch, histologisch, sonografisch, im CT (Computertomografie) oder PET/CT (Kombination von Positronen-Emissions-Tomografie und CT) eine lokoregionale Metastasierung nachgewiesen wird (Stadien IIIA, IIIB, IIIC), ist die Therapieintention in der Regel noch immer kurativ (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019). Es ist eine therapeutische Lymphadenektomie (LAD) angezeigt. Werden bestimmte Kriterien erfüllt, kann eine komplettierende Lymphknotendisektion (Complete Lymph Node Dissection, CLND) vorgenommen werden. Auch eine postoperative adjuvante Radiotherapie nach LAD kommt in Betracht. Diese kann zur regionalen Tumorkontrolle beitragen, hat aber keine lebensverlängernde Wirkung gezeigt (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019). Im Stadium IV sollte die Metastasektomie als R0 unter bestimmten Voraussetzungen angestrebt werden. Zur Behandlung von beispielsweise Knochen- oder Hirnmetastasen ist eine Bestrahlung üblich (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019).

1.1.4.2 Chemotherapie

Für Hochrisikopatienten gab es bis zur Einführung der Chemotherapie in den 1970er Jahren keine medikamentösen Therapieoptionen (Mattia et al., 2018). Die alleinige Chemotherapie spielt heute nur noch eine untergeordnete Rolle (Wu and Singh, 2011). In der Historie der adjuvanten medikamentösen Therapie wurden zunächst Zytostatika wie Cisplatin (*Cis*-Diamminedichloridoplatinum, CDDP) und 5-Fluoruracil (5FU) eingesetzt, welche proapoptotische Medikamente sind. CDDP generiert irreparable DNA-Schäden und induziert einen proliferativen Arrest oder führt die Zielzelle in die Apoptose, indem es die entsprechenden mitochondrialen Signalwege aktiviert. Die Ansprechraten wurden bei Gabe von konventionellen Dosierungen auf

nicht mehr als 10% beziffert (Glover et al., 1987). 5FU hemmt die Thymidilat-Synthase und stört somit die DNA-Replikation und -Reparatur, woraus DNA-Schädigung und wiederum ein Zellzyklusarrest resultieren. Im Melanom wird bei Gabe von 5FU und anderen Thymidilat-Synthase-Inhibitoren das Zielenzym reaktiv überexprimiert. Die Ansprechrate von lediglich 10-15% ist hierauf zurückzuführen (Mattia et al., 2018, Christensen et al., 2019).

Die Alkylantien Temozolamid (TMZ) und Dacarbazin (Dimethyl-Trizeno-Imidazol-Carboxamid, DTIC) galten als Standard-Therapeutikum beim Melanom, konnten aber Studien zufolge das progressionsfreie Überleben (Progression-Free Survival, PFS) und Gesamtüberleben (Overall Survival, OS) nicht verbessern (Robert et al., 2011). Die vermehrte Expression des Reparaturproteins MGMT (O6-Methylguanin-DNA Methyltransferase) kann in vielen Fällen die Resistenz des Melanoms gegenüber Alkylantien erklären. Zytotoxische Wirkungen von TMZ und DTIC beziehen sich vor allem auf Tumorzellen und andere sich schnell teilenden gesunden Zellen der Schleimhäute, des Knochenmarks, der Hoden und Ovarien (Mattia et al., 2018). Unerwünschte Arzneimittelwirkungen sind hämatologischer und nicht-hämatologischer Art und umfassen Anämien, Neutropenien, Thrombozytopenien und Lymphopenien (Teimouri et al., 2013). Hinzu kommt die inhärent kanzerogene Natur der Substanzen, sodass die Entwicklung von Zweitumoren keine Seltenheit darstellt. Sind Metastasen im Stadium IV nicht resezierbar, bietet die Monochemotherapie mit Dacarbazin heutzutage noch eine etablierte Option. Alternativ kann eine Polychemotherapie mit Dacarbazin und Cisplatin vorgenommen werden. Diese bringt jedoch wahrscheinlich keine Vorteile hinsichtlich des Gesamtüberlebens mit sich und kommt daher nur als letzter Therapieversuch bei Patienten im Endstadium in Frage (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019).

1.1.4.3 Antiangiogene Therapie

Anstatt alle sich schnell teilenden Zellen im Körper zu attackieren, wie es unter TMZ und DTIC-Therapie erfolgt, sollen unter heutigem besseren Verständnis über die molekularen Mechanismen mithilfe der sog. „zielgerichteten“ Therapie lediglich Zielmoleküle angegriffen werden, die mit Tumorwachstum, Progression und Metastasierung in Verbindung stehen (Kudchadkar, 2010). Die Metastasierung des Melanoms über die Blutbahn wird dadurch ermöglicht, dass der Tumor mittels

Gefäßneubildungen Anschluss an das Blutgefäßsystem erhält. Antiangiogene Therapieansätze sollen die Invasion von Tumoren verhindern, indem sie das „Einsprießen“ neuer Gefäße unterbinden (Folkman, 2002). Der Wachstumsfaktor Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ist ein Angiogenese- und Gefäßpermeabilitätsfaktor, der von Endothelzellen ausgeschüttet wird und an physiologischen angiogenen Reaktionen beteiligt ist. In Tumoren führt die Sekretion großer Mengen VEGF zur Ausbildung irregulärer und heterogener Tumorgefäße (Weis and Cheresch, 2005, Carmeliet, 2005). Medikamente, deren Angriffspunkt der VEGF-Signalweg ist, wie der an den Liganden VEGF-A bindende humanisierte monoklonale Antikörper Bevacizumab oder die VEGF-Rezeptor-Tyrosinkinase-inhibitoren Sorafenib und Sunitinib, werden bei metastasierten Tumoren verschiedener Entitäten eingesetzt (Ohm and Carbone, 2001, Vasudev and Reynolds, 2014). Für die Behandlung des Melanoms ist die Medikation jedoch nicht zugelassen, da in Studien keine Verlängerung des Gesamtüberlebens daraus resultierte (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019).

1.1.4.4 BRAF/MEK-Inhibition

Im Jahre 2012 wurde mit dem selektiven BRAF-Kinase-Inhibitor Vemurafenib ein Mittel gegen Melanome zugelassen, in denen das Protoonkogen B-Raf (genannt BRAF, Raf=rapidly accelerated fibrosarcoma) mutiert ist. Da im Codon des BRAF-Gens 600 die Aminosäure Valin ausgetauscht ist, wird die Mutation als V600 bezeichnet. Sie bewirkt eine Steigerung der Zellproliferation und tritt bei 40 bis 60% der Patienten mit kutanen Melanomen auf (Fritsch, 2018). Leider wurden häufig nach wenigen Monaten der BRAF-Inhibitor-Therapie mit z.B. Vemurafenib bereits Rezidive aufgrund von Resistenzen beobachtet (siehe **Abbildung 2**). Das 1-Jahres-Gesamtüberleben liegt lediglich bei 56% (vergleiche **Abbildung 4** unten). Zusätzlich zur Hemmung des mutierten und damit konstitutiv aktivierten BRAF hat sich die Inhibition der MEK-Kinase (MAPK/ERK-Kinase, ERK: Extracellular Signal-Regulated-Kinase) als sinnvoll erwiesen. Ein Medikament, das die Mutation der MEK-Kinase, also eine zweite Mutation im Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg (MAPK-Signalweg) behandelt, ist z.B. Trametinib (siehe **Abbildung 2**). Die kombinierte Gabe der beiden Hemmstoffe konnte das Überleben der Patienten verbessern, Rezidive aber nicht verhindern. Resistenzen, die sich entwickeln, sind zum Teil reversibel und die

Kombinationsmedikation aus BRAF-Inhibitor Dabrafenib und MEK-Inhibitor Trametinib, eingesetzt seit 2014, kann ein erneutes Ansprechen der Patienten bewirken. Das 1-Jahres-Gesamtüberleben war mit Einführung dieser Kombinationstherapie auf 74% zu steigern (Long et al., 2017). Entsprechend der Leitlinie soll beginnend ab Stadium IIIB eine Testung auf Mutationen, zunächst auf eine BRAF-Mutation, durchgeführt werden. Bei Vorliegen einer BRAF V600-Mutation können ein BRAF- und ein MEK-Inhibitor verabreicht werden (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019).

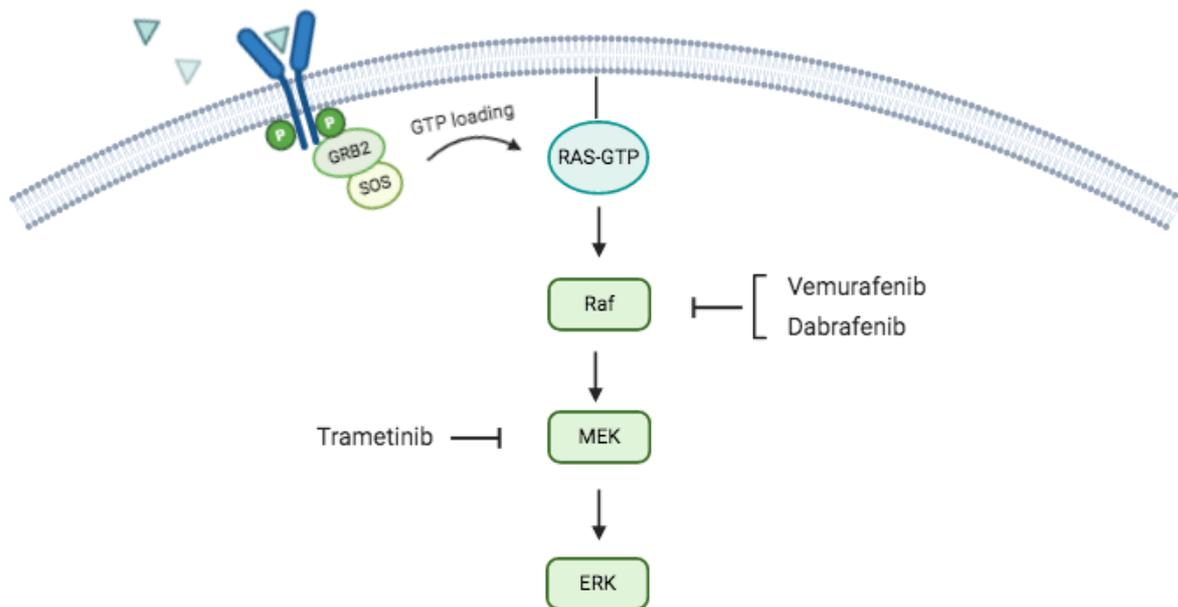


Abbildung 4: Der Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg als therapeutisches Target beim Melanom.

Die BRAF-Inhibitoren Vemurafenib und Dabrafenib und der MEK-Hemmstoff Trametinib (des Weiteren Cobimetinib) beheben die Überaktivierung des Ras-Raf-MEK-ERK-Signalwegs, welche durch Mutationen herbeigeführt wird und in gesteigerter Zellproliferation und damit in Tumorwachstum resultiert (Yuan et al., 2020).

Abkürzungen: GRB2: Growth Factor Receptor-Bound Protein 2, SOS: Son Of Sevenless, GTP: Guanosine-5'-Triphosphate, Ras: Rat sarcoma, Raf: Rapidly accelerated fibrosarcoma, MEK: MAPK/ERK-Kinase, ERK: Extracellular Signal-Regulated-Kinase.

1.1.4.5 Immuntherapie

Vier Dekaden der Erforschung von molekularen Mechanismen, an denen Immunzellen in der Tumormikroumgebung beteiligt sind, konnten einen Durchbruch in der Melanombehandlung erbringen, denn es wurde bekannt, dass Tumorzellen ihrer Vernichtung durch das angeborene und erworbene Immunsystem entkommen können (Mattia et al., 2018). Indem sie mittels Liganden an Rezeptoren auf der Membran von T-Lymphozyten binden, wird die Immunantwort gedämpft. Diese

Rezeptoren auf T-Zellen werden antiinflammatorische Immun-Checkpoints genannt und ihre physiologische Funktion ist es, körpereigene Zellen vor Angriffen des Immunsystems zu schützen (siehe **Abbildung 3**) (Mahoney et al., 2015). Um die antitumorale Antwort des Körpers zu reaktivieren, wurden Immuntherapien entwickelt, welche an Checkpoints binden und sie inhibieren, damit die Immunevasion der Tumorzellen verhindert wird. Einen solchen Checkpoint stellt der Co-Rezeptor-Inhibitor CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein-4) dar, welcher im gesunden Menschen die T-Zell-Aktivierung bei Überreaktionen des Immunsystems und Autoimmunität herunterreguliert (Chikuma, 2017). CTLA-4 konkurriert mit dem auf antigenpräsentierenden Zellen vorliegenden Cluster of Differentiation (CD) 28 um die Bindung an CD80 und CD86 auf T-Zellen (siehe **Abbildung 3**) (Rowshanravan et al., 2018). Bindet CD28 an CD80 oder CD86, wird intrazellulär die Bildung von Interleukin-2 (IL-2) über den Nukleären Faktor-kappa B (NF- κ B)-Weg stimuliert. IL-2 stellt das entscheidende Zytokin für die Aktivierung und Vermehrung von T-Zellen dar (Macian, 2005). Da CTLA-4 eine höhere Affinität zu CD80 und CD86 als zu CD28 aufweist, wird in der Folge die IL-2 Expression blockiert (Mattia et al., 2018). Konsekutiv kommt es bei verminderter IL-2-Bildung zur Hemmung der T-Zell-Aktivierung und -Proliferation (Abbas et al., 2018). Wenn der CTLA-4-Ligand auf Tumorzellen exponiert ist, kann die Immunantwort über den beschriebenen Mechanismus gestört werden und der Tumor einer Erkennung durch das Immunsystem entgehen. Ein Therapieansatz ist die CTLA-4 Blockade durch Antikörper, mithilfe derer ein supprimierter Zustand von T-Zellen aufgehoben werden kann (siehe **Abbildung 3**) (Leach et al., 1996).

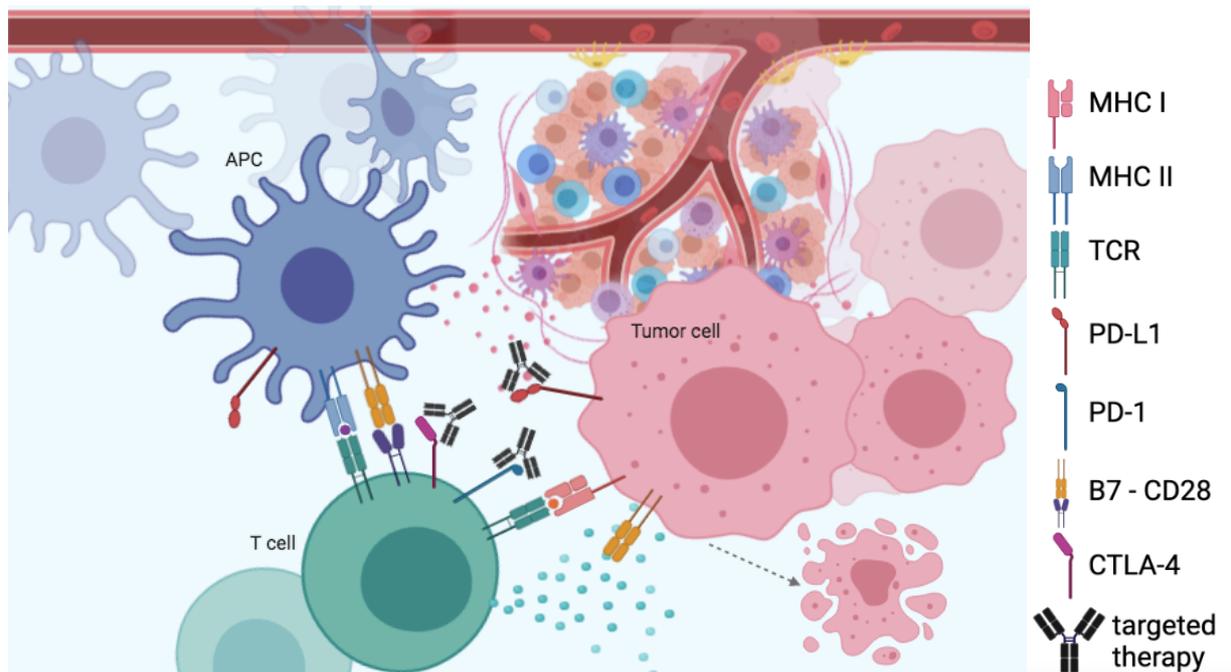


Abbildung 5: Die Mechanismen der Immuncheckpoint-Therapie.

Die Blockade von Immuncheckpoints (CTLA-4, siehe oben, und PD-1/PD-L1, unten erläutert) bewirkt, dass Tumorzellen sich nicht maskieren und Angriffen des Immunsystems nicht entgehen können. Abkürzungen: APC: Antigen-Presenting Cell, MHC: Major Histocompatibility Complex, TCR: T-Cell-Receptor, B7: Lymphozyten-Aktivierungsantigen CD80/86, CTLA-4: Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein-4, PD-1: Programmed Death-1, PD-L1: Programmed Death Ligand-1.

Im Jahre 2011 wurde der monoklonale Antikörper Ipilimumab für die Therapie des nicht-resezierbaren metastasierten Melanoms zugelassen, welcher als CTLA-4 Antagonist fungiert (siehe **Abbildung 3 und 4**). Studien haben gezeigt, dass die Gabe dieser Anti-CTLA-4 Therapie das Gesamtüberleben signifikant verbessert (Ascierto et al., 2017, Maverakis et al., 2015, Hodi et al., 2010). **Abbildung 4** ist zu entnehmen, dass das 5-Jahres-Gesamtüberleben von unter 5% bei Dacarbazin-Gabe auf 18-20% unter Ipilimumab-Therapie gestiegen ist.

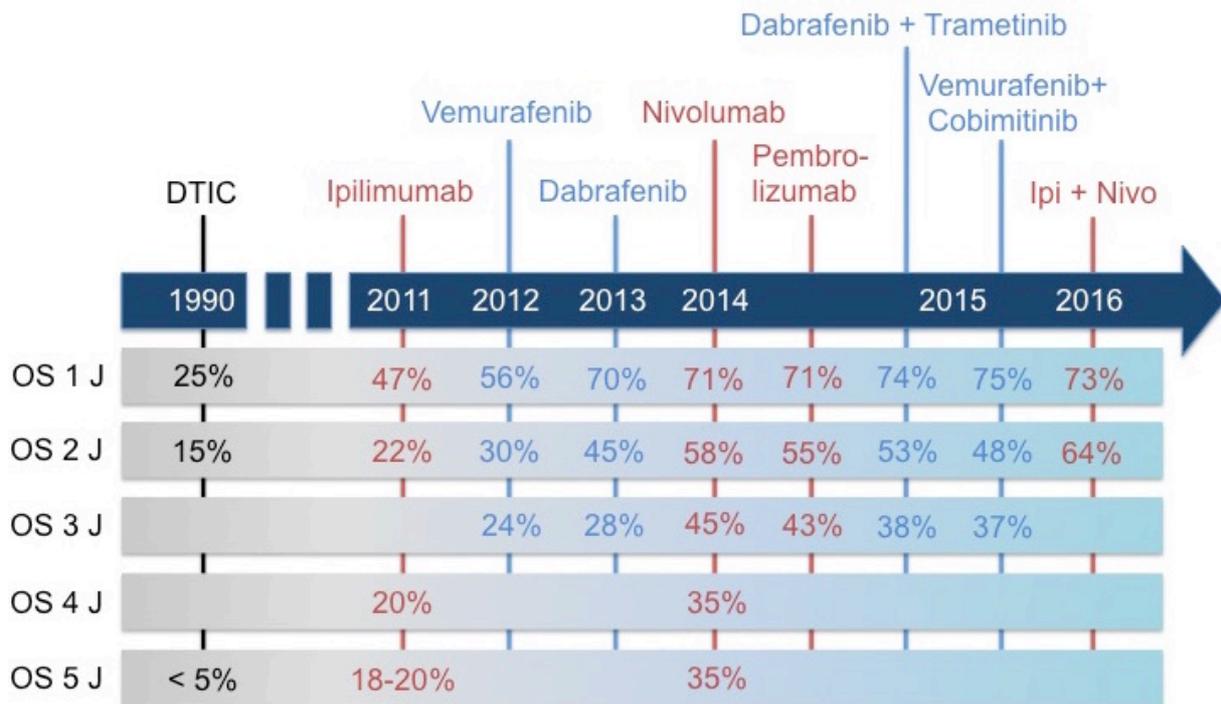


Abbildung 6: Overall Survival bei adjuvanten medikamentösen Melanomtherapien.

Seit den 1990er Jahren ist das 1- bis 5-Jahres-Gesamtüberleben von Melanompatienten unter dem Einsatz der zielgerichteten Therapien (blau) und Immuntherapien (rot) signifikant gestiegen. (Adaptiert nach Georgina V. Long)

Abkürzungen: OS: Overall Survival, J: Jahre, DTIC: Dimethyl-Trizeno-Imidazol-Carboxamid (Dacarbazin), Ipi: Ipilimumab, Nivo: Nivolumab.

Auch der von T-Zellen exprimierte Checkpoint PD-1 (Programmed Death-1) stellt ein Target der Immuntherapie dar. PD-1 ist ein Transmembranprotein, das als Apoptose-assoziiertes Molekül identifiziert wurde. Sein Ligand PD-L1 (Programmed Death Ligand-1) ist auf hämatopoetischen Zellen, Endothelzellen, Fibroblasten, Neuronen, Mesenchymzellen und Keratinozyten zu finden (Mattia et al., 2018). Ein zweiter Ligand, PD-L2, wird von aktivierten dendritischen Zellen und B-Zellen sowie Makrophagen und Mastzellen exprimiert. T-Zell-Anergie ist die Folge der PD-1/PD-L1/2 Interaktion. Tumorzellen sind ebenfalls in der Lage, die PD-Liganden auf ihrer Oberfläche zu exponieren (siehe **Abbildung 3**). Dadurch wird die Toleranz von Tumor-infiltrierenden T-Zellen gegenüber Tumorzellen herbeigeführt (sog. „adaptive Immunresistenz“) (Ribas, 2015). Über den PD-1-Checkpoint-Mechanismus, der normalerweise die Funktion hat, Gewebsschädigung beim Wirt zu verhindern, erfährt die Antitumorimmunität eine Abschwächung. PD-1 blockierende Antikörper (siehe **Abbildung 3**) wie Nivolumab wurden sowohl im Nierenzellkarzinom (RCC), im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) wie auch im Melanom getestet und zeigten einen deutlicheren Benefit und weniger toxische Wirkungen verglichen mit CTLA-4-

Therapeutika (Topalian et al., 2012). Seit 2014 ist Nivolumab für die Behandlung vom fortgeschrittenen Melanom zugelassen. Das 5-Jahres-Gesamtüberleben beträgt unter Nivolumab 35% versus 18-20% unter Ipilimumab (siehe **Abbildung 4**). Die Kombination des CTLA-4-Antagonisten Ipilimumab mit dem PD-1-Inhibitor Nivolumab konnte das progressionsfreie Überleben im Vergleich zur Ipilimumab-Monotherapie signifikant verlängern (11,5 versus 2,9 Monate) (Larkin et al., 2015). Ein zweiter PD-1-Checkpoint-Inhibitor ist Pembrolizumab, der ebenfalls im Jahr 2014 zugelassen wurde. Er hat sich bezüglich des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens im fortgeschrittenen Melanom der CTLA-4-Therapie überlegen gezeigt (Mattia et al., 2018). In **Abbildung 4** ist unter anderem dargestellt, dass die Wahrscheinlichkeit, nach Therapiebeginn mit Pembrolizumab ein Jahr zu überleben 71% beträgt. Unter Ipilimumab bemisst sie sich auf lediglich 47%.

Laut Leitlinie besteht die adjuvante medikamentöse Therapie bei den Stadien IIIA-D in der Gabe eines PD-1-Antikörpers. Patienten im Tumorstadium IV werden adjuvant entweder mit BRAF- und MEK-Inhibitor, oder mit einem PD-1-Antikörper, oder mit einer Kombination aus PD-1- und CTLA-4-Antikörper behandelt (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019). Die 5-Jahres-Überlebensrate ist seit dem Einsatz von revolutionären Therapien zur Bekämpfung des malignen Melanoms signifikant gestiegen. Insbesondere seit der Anwendung der Immuntherapie im Jahr 2011 wurde sie verzehnfacht. Aktuell liegt die 5-Jahres-Überlebensrate in Deutschland für Frauen bei 93 % und für Männer bei 91 % (Fritsch, 2018). Betrachtet man Patienten mit fernmetastasiertem Melanom, so liegt die relative 5-Jahres-Überlebensrate für Frauen allerdings nur bei 23 % und für Männer nur bei 15 % (Robert Koch Institut, 2019).

Die Hypothese, dass das Melanom ein stark immunogener Tumortyp ist, stellt die Basis für Erfolgchancen von Immuntherapien dar und soll im Folgenden erläutert werden. Für diese Annahme sprechen erhebliche lymphozytäre Infiltrate, die in Primarien und Metastasen aufgefunden wurden (Mattia et al., 2018). Des Weiteren manifestiert sich der immunogene Charakter des Melanoms darin, dass der Primärtumor nach seiner Dissemination aufgrund von Immunabwehr oftmals nicht mehr aufzufinden ist. Außerdem konnte gezeigt werden, dass T-Lymphozyten spezielle Melanom-Antigene erkennen. Deutliche Hinweise gibt schließlich die Tatsache, dass die Immuntherapie beim Melanom relativ erfolgreich eingesetzt wird

(Haanen, 2013). Entscheidend für die Wirkung der Immuntherapie ist der Aufbau der Mikroumgebung des Tumors.

1.2 Therapieansprechen auf Checkpointinhibition

Etwa die Hälfte der Melanompatienten spricht langfristig auf Immuncheckpoint-Therapien an, aber bei der anderen Hälfte der Patienten ist dies nicht der Fall (Luke et al., 2017). Bei den meisten Patienten der letzteren Gruppe zeigen sich primäre Resistenzen (Nowicki et al., 2018). Diese Erkrankten machen beim Melanom unter PD-1-Blockade etwa 60% aus und werden „Never-Responders“ genannt. Sie erfahren unter Therapie eine Progression der Erkrankung („Progressive Disease“, PD, klassifiziert gemäß RECIST=Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) (O'Donnell et al., 2017, Schwartz et al., 2016). 40% der Melanompatienten mit PD-1-Monotherapie und 60% derer mit Checkpointinhibitor (CPI)-Kombinationstherapie reagieren initial Therapie-sensibel („Early Responders“) und erreichen eine komplette oder partielle Remission („Complete Response“, CR oder „Partial Response“, PR nach RECIST) oder befanden sich in einem stabilen Erkrankungszustand („Stable Disease“, SD nach RECIST). Bei einigen Patienten aus dieser Gruppe treten jedoch erworbene Resistenzen und Rezidive auf („Progressive Disease“) (O'Donnell et al., 2017).

Tumore, die reich an PD-1-exprimierenden infiltrierenden T-Lymphozyten (sog. Tumor Infiltrating Lymphocytes, TILs) sind und deren Mikroumgebung inflammatorische Charakteristika aufweist, werden „hot tumors“ oder „infiltrated-inflamed“ genannt und zeigen das beste Ansprechen auf Immuntherapien (Maleki Vareki, 2018, Binnewies et al., 2018, Tumei et al., 2014). Das starke Immunzell-Infiltrat kann die Anti-Tumor-Antwort der T-Zellen modulieren.

CD8⁺ T-Zellen, die ein Tumorantigen erkannt haben, produzieren Interferon gamma (IFN γ), welches eine große Bedeutung für die Tumorabwehr hat. Es erhöht die Major Histocompatibility Complex (MHC)-Expression, rekrutiert T-Zellen in den Tumor und wirkt antiproliferativ sowie proapoptotisch auf maligne Zellen. Auch die Induktion von PD-L1 auf Tumorzellen erfolgt unter dem Einfluss des Zytokins. Mutationen in den von IFN γ angestoßenen Signaltransduktionswegen sind die Ursache dafür, dass Tumorzellen gegen IFN γ resistent werden. Dieses Phänomen spielt sowohl für

primäre als auch sekundäre Resistenzen gegenüber der Anti-PD-1-Therapie eine Rolle (Benci et al., 2016).

Trotz adäquater T-Zell-Infiltration und Tumorzell-IFN-Response kann das Ansprechen auf Checkpointinhibition eingeschränkt sein. Ursächlich ist die Interaktion der zytotoxischen T-Zellen mit immunsuppressiven myeloiden Suppressorzellen (Myeloid-Derived Suppressor Cells, MDSCs) und regulatorische T-Zellen (Tregs) im Mikromilieu (Nowicki et al., 2018).

Kommt es zu Beginn zu einem Ansprechen, können daraufhin solche Tumorklone selektiert werden, die sich unter anderem durch Antigenverlust oder mutationsbedingt heruntergeregelte MHC I Expression auszeichnen. Es handelt sich hierbei um Tumorstammzellen, die besonders resistent gegen T-Zell-Angriffe sind. Sie gehören zur sog. „minimal residual disease“ (Rambow et al., 2018).

Des Weiteren kann die unter ICT wiederhergestellte T-Zell-Funktion im Laufe der Therapie verloren gehen, wenn T-Zellen permanent durch Tumorantigene stimuliert werden und erschöpfen („exhausted T-cells“, T_{EX}) (Wherry and Kurachi, 2015).

Wenn die Signaltransduktion für T-Zell-Aktivierung und -Proliferation wie oben beschrieben unterdrückt ist, werden T-Effektorzellen (Teffs) aus dem Tumorparenchym ausgeschlossen. Teffs verbleiben dann im Stroma, welches den Tumor umgibt (Mariathasan et al., 2018). Liegt ein immunzellarmes Tumorparenchym vor, ist der Erfolg von Checkpointblockaden eingeschränkt (Havel et al., 2019). Handelt es sich überdies um Phänotypen, bei denen auch im Stroma des Tumors eine Abwesenheit von TILs herrscht, sog. „cold tumors“ oder „infiltrated-excluded“, sind die geringsten Ansprechraten auf Checkpointinhibition zu verzeichnen (Galon and Bruni, 2019, Binnewies et al., 2018).

1.3 DAMPs in der Tumormikroumgebung

Das Tumorbett zeichnet sich durch einen persistierenden Entzündungszustand aus und wurde daher auch als „nicht-heilende Wunde“ bezeichnet (Dvorak, 1986). Primäre Melanome weisen ebenso wie Metastasen unterschiedliche Kompositionen in der Tumormikroumgebung auf. Wichtige Player im Mikromilieu sind lösliche Faktoren wie inflammatorische Zytokine. Zu dieser Gruppe gehören sog. Damage- oder Danger-Associated Molecular Patterns (DAMPs).

In den 1990er Jahren entwickelte Polly Matzinger das immunologische „Gefahren-Modell“, demzufolge das Immunsystem nicht zwischen „körpereigen“ und „-fremd“ unterscheidet, sondern zwischen „ungefährlich“ und „gefährlich“. Die Einordnung als „gefährlich“ erfolgt laut der Theorie anhand von Pathogenen oder Alarmsignalen, welche durch gestresste oder verletzte Zellen ausgeschüttet werden (Matzinger, 1994). DAMPs sind Moleküle, die mit „Gefahr“ assoziiert werden. Zu dieser Gruppe der Alarmine zählen neben S100A8/A9 auch andere S100 Proteine, HMGB1, DNA und RNA. Sie liegen intrazellulär vor und werden bei Schädigung der Zelle freigesetzt und in diesem Zuge für das Immunsystem sichtbar. DAMPs werden von Mustererkennungsrezeptoren (Pattern Recognition Receptors, PRRs) erkannt; sie initiieren und prolongieren die nichtinfektiöse Entzündungsreaktion durch proinflammatorische Signalkaskaden (Huang et al., 2015).

1.3.1 S100A8/A9 und seine Interaktionen im Tumorbett

Der Heterodimer S100A8/A9, auch Calprotectin genannt, setzt sich aus den Homodimeren S100A8 (MRP8, Myeloid-Related Protein 8) und S100A9 (MRP14, Myeloid-Related Protein 14) zusammen, die calciumbindende Proteine der S100-Familie sind. S100-Moleküle wurden erstmals im Jahr 1965 aus Rinderhirn extrahiert und tragen ihren Namen, da sie in 100% gesättigtem Ammoniumsulfat löslich sind. Die heterodimere Form ist wesentlich stabiler und kommt daher häufiger vor. S100A8/A9 hat sowohl intra- als auch extrazelluläre Funktionen. Es wird bei entzündlichen Prozessen und autoimmunen Reaktionen von Myeloidzellen und anderen Gefäßzellen stark exprimiert und bindet an PRRs wie die Rezeptoren Toll-Like-Rezeptor 4 (TLR4) und RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts). Im Entzündungszustand werden Leukozyten durch S100A8/A9 rekrutiert und Zytokine freigesetzt. Calprotectin ist in Neutrophilen und Monozyten enthalten und spielt als Calcium-Sensor für die Umlagerung des Zytoskeletts und den Arachidonsäuremetabolismus eine Rolle (Wang et al., 2018). S100A8/A9 macht ca. 45% der zytosolischen Proteine in Neutrophilen aus (Srikrishna, 2012). Die in Neutrophilen enthaltenen inflammatorischen DAMPs wurden mit Tumorprogression in Verbindung gebracht (Hernandez et al., 2016). Sie sind mit Zellstress assoziiert und können von apoptotischen Neutrophilen, also beispielsweise im Rahmen der Freisetzung von Neutrophil Extracellular Traps (NETs), der NETose, ausgeschüttet

werden (Ausführung siehe **Abschnitt 1.5.2 und 4.3.4**) (Greenlee-Wacker, 2016, Brostjan and Oehler, 2020). Es wurde gezeigt, dass Neutrophile S100A8/A9 in hyperglykämischer Stoffwechsellage sezernieren. Durch Interaktion von S100A8/A9 mit RAGE kommt es zur Ausschüttung von Granulozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (Granulocyte Colony Stimulating Factor, G-CSF) aus Makrophagen und Granulozyten-Monozyten-Progenitorzellen (GMPs) (Kraakman et al., 2017). In Studien wurde gezeigt, dass die auf das G-CSF-Signal hin neu entstandenen Neutrophilen Reactive Oxygen Species (ROS) freisetzen und NETs bilden (Wong et al., 2015). Des Weiteren gilt S100A8/A9 als Chemoattractant („Lockstoff“) für Neutrophile. Wurden letztere an einen Ort der Entzündung gelockt, bewirkt S100A8/A9 überdies, dass Neutrophile dort verbleiben (Ryckman et al., 2003). S100A8/A9 kann zudem zur Migration von MDSCs über den NF- κ B-Signalweg führen und sie über denselben auch aktivieren (siehe **Abbildung 6**) (Sinha et al., 2008). MDSCs verhindern die Aktivierung von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und T-Zellen und ermöglichen dadurch das Fortschreiten von Tumorerkrankungen (siehe **Abbildung 6**). Es entsteht eine positive Feedbackschleife, da MDSCs S100A8/A9 selbst sezernieren (Sinha et al., 2008). Außerdem stimulieren S100A8 und S100A9 die Expression von Matrix-Metalloproteinase (MMP) 2 und MMP9 in Tumorzellen, woraufhin diese ins Gewebe migrieren (Lim et al., 2016). Inwiefern S100A8/A9 über diese und weitere proinflammatorische Mechanismen für Tumorprogression und Metastasierung eine Rolle spielt, soll in der vorliegenden Studie beleuchtet und experimentell untermauert werden.

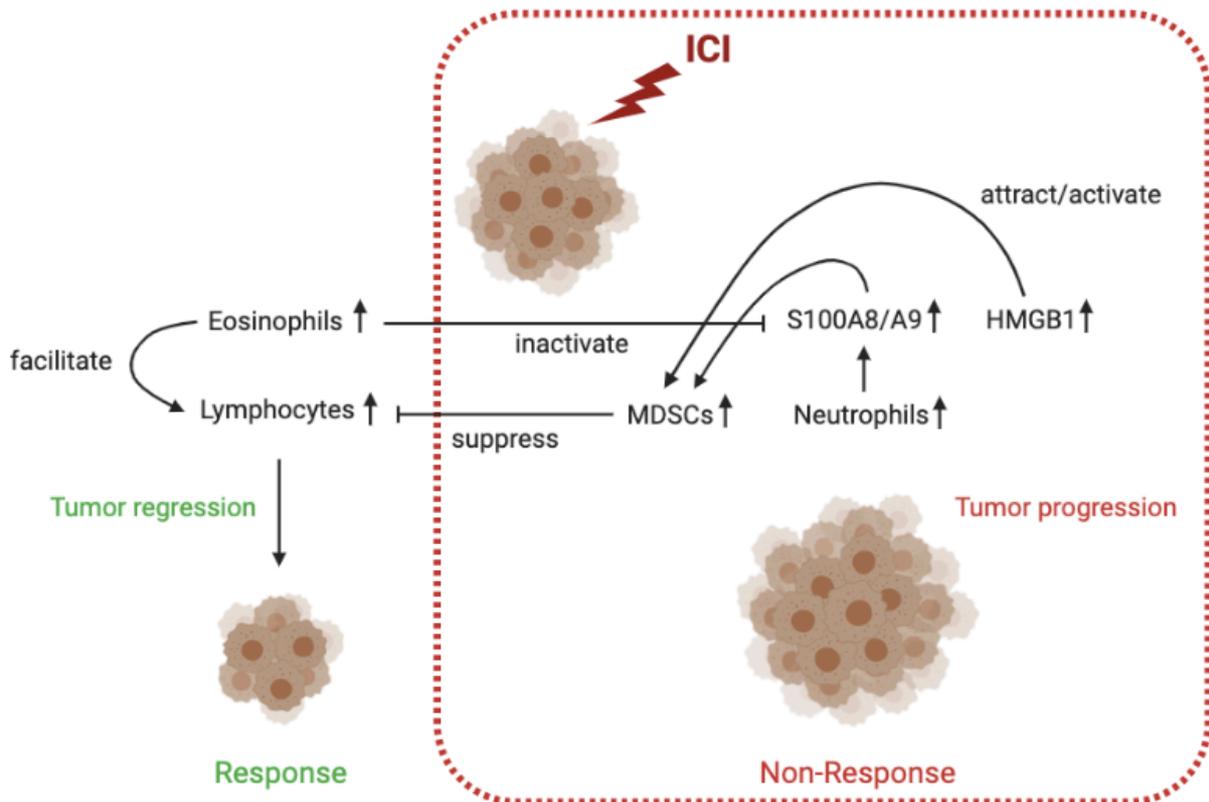


Abbildung 7: S100A8/A9 und Neutrophile unter Immuntherapie des malignen Melanoms.

Unter Immuncheckpoint-Blockade erreicht ein Teil der Patienten eine Remission der Tumorerkrankung; ein anderer Teil spricht nicht auf die Therapie an. Bei diesen Patienten konnten erhöhte Neutrophilen- und S100A8/A9-Level festgestellt werden. S100A8/A9 lockt MDSCs ins Tumorbett, welche dort T-Lymphozyten inhibieren und dadurch die Tumorprogression fördern (Umansky et al., 2016, Gebhardt et al., 2015).

Abkürzungen: ICI: Immune-Checkpoint-Inhibition, MDSCs: Myeloid-Derived Suppressor Cells, HMGB1: High Mobility Group Box 1.

1.4 Immunzell-Infiltration des Tumors

DAMPs werden von Tumorzellen selbst und von Immunzellen wie Myeloid- und anderen Gefäßzellen sowie Monozyten wie auch neutrophilen Granulozyten sezerniert und können diese rekrutieren (Kerkhoff et al., 1998). Somit kommen in der Tumormikroumgebung entscheidende zellvermittelte Mechanismen zum Tragen. Beteiligt sind hier neben T-Zellen unter anderem Makrophagen, Thrombozyten und neutrophile Granulozyten, deren Funktionen durch Immuncheckpoint-Therapien beeinflusst werden können (siehe **Abbildung 5**).

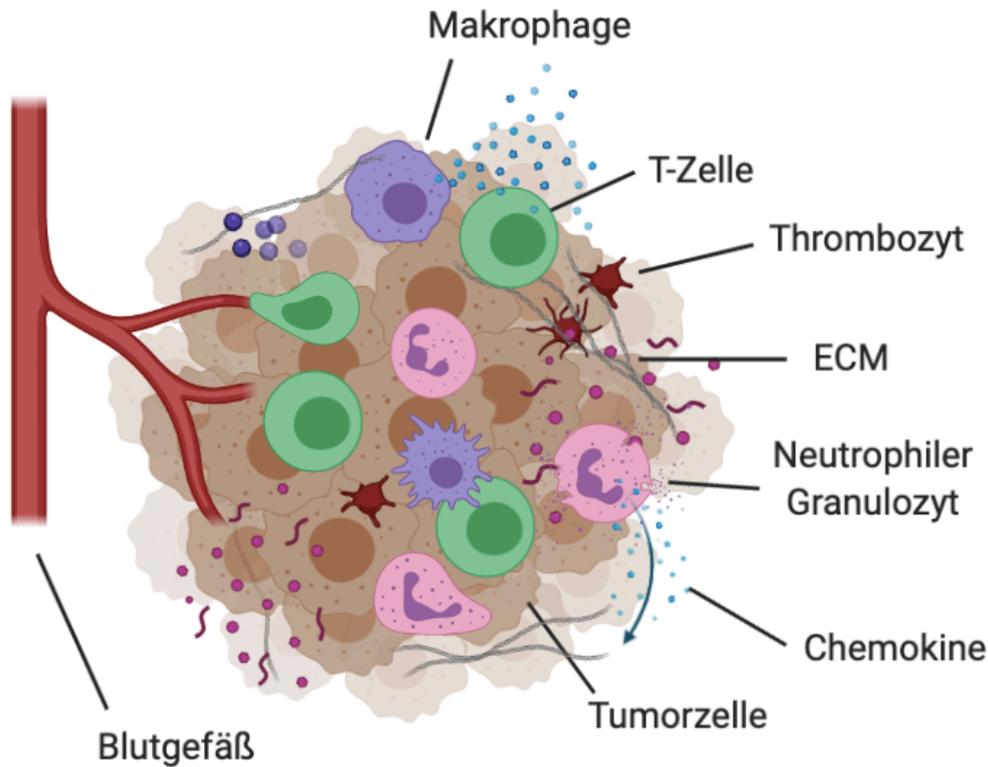


Abbildung 8: Immunzellen in der Tumormikroumgebung.

T-Zellen (grün), Makrophagen (lila), Thrombozyten (rot) und neutrophile Granulozyten (rosé) gehören zu den Zellen, die im Tumorbett zu finden sind.

Abkürzungen: ECM: Extracellular Matrix.

Weitere wichtige Akteure in der Mikroumgebung sind Tregs und MDSCs. Tregs gehören zu den CD4⁺ T-Lymphozyten und regulieren im physiologischen Zustand die Selbsttoleranz des Immunsystems. In Malignomen fördern sie jedoch die Tumorprogression, indem sie Anti-Tumor-Immunantworten unterdrücken (Takeuchi and Nishikawa, 2016). Im Mausmodell wurde gezeigt, dass ein Nicht-Ansprechen auf Immuntherapie mit einer niedrigen Ratio von Teffs zu Tregs korreliert (Simpson et al., 2013). Tregs hemmen die Aktivierung und Vermehrung der lokalen CD8⁺ T-Zellen. MDSCs sind myeloische Zellen, welche einen heterogenen Phänotyp aufweisen. Sie umfassen entdifferenzierte Makrophagen und dendritische Zellen sowie Monozyten, die sich in entzündetem Gewebe in Makrophagen und dendritische Zellen differenzieren. Granulozytische Myeloidzellen bezeichnen Eosinophile, Basophile, Mastzellen und polymorphkernige Neutrophile. MDSCs sind in der Lage, Immunantworten zu unterdrücken und begünstigen daher die Tumorprogression (Gabrilovich, 2017). Ihre Anwesenheit im Tumorgewebe ist mit Immunevasion, Angiogenese, Metastasierung und schlechtem Ansprechen auf Checkpointinhibition assoziiert (Meyer et al., 2014). Insbesondere bei Neutrophilen konnte ein

Zusammenhang mit der Tumorprogression sowie deren Modulation der T-Zell-Antwort gezeigt werden (Jensen et al., 2012, Muller et al., 2009, Tazzyman et al., 2009). Unter neutrophilen Granulozyten sind jedoch pro- und antitumorale Subtypen zu unterscheiden. Auf der einen Seite hat man beobachtet, dass bestimmte Neutrophile in der Lage sind, Apoptose in Tumorzellen zu initiieren und das Tumorstadium einzudämmen. Auf der anderen Seite verursachen Neutrophile maligne Entartung, fördern Tumorstadium und Angiogenese, sind an der Bildung prämetastatischer Nischen beteiligt und verhelfen Tumorzellen zur Immunevasion, indem sie NK-Zellen und T-Zellen inhibieren (Mukaida et al., 2020).

1.5 Der neutrophile Granulozyt

Neutrophile Granulozyten zählen zu der Gruppe der Leukozyten myeloider Herkunft und sind Teil des angeborenen Immunsystems. Der Anteil Neutrophiler an den Gesamtleukozyten beträgt 50 bis 70%. Pro Tag werden im Knochenmark etwa 10^{11} Neutrophile gebildet (Dancey et al., 1976).

1.5.1 Morphologie

Bei Neutrophilen handelt es sich um Zellen mit einem Durchmesser von 7 bis 10 μm . Sie verfügen über einen segmentierten Zellkern von drei bis fünf Kompartimenten. Morphologisch kann man stabkernige und segmentkernige Phänotypen unterscheiden. Neutrophile beherbergen fünf Arten von Granula, welche mit verschiedenen Peptiden und Enzymen gefüllt sind, darunter saure Hydrolasen, Defensine, Myeloperoxidase (MPO), Lysozyme, Serinproteasen wie Kathepsin G, Kollagenase, Gelatinase, Neutrophile Elastase (NE) und Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) sowie Katalase und alkalische Phosphatase.

Granulozyten werden durch die Sichtbarmachung der enthaltenen basophilen sowie eosinophilen Stoffe charakterisiert. Bei Neutrophilen ergibt sich in der Summe ein schwacher, rosafarbener Ton in der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung. Diese „neutrale“ Farbe der Granula ist namensgebend (Liew and Kubes, 2019).

1.5.2 Funktionen bei Entzündung und malignen Tumoren

Neutrophile sind sehr beweglich und migrieren mit am schnellsten zu Orten der Infektion und Gewebeschädigung. Sie sind in der Lage, unspezifische Antigene zu detektieren, Pathogene zu phagozytieren sowie Erreger mittels bakterizider Substanzen zu eliminieren. Ebenso wie Makrophagen ist es Neutrophilen möglich, einen „Respiratory Burst“ zu erzeugen, indem sie ROS wie Peroxide bilden und freisetzen, die zytotoxisch wirksam sind (Powell and Huttenlocher, 2016). Zu ihren Funktionen gehört auch, dass sie nukleäres Material in Form von NETs auswerfen, um Mikroorganismen „einzufangen“ (Rosales, 2018). Bei diesem Vorgang, der als NETose bezeichnet wird, kann der neutrophile Granulozyt untergehen. NETs setzen sich aus nukleärer DNA und Mitochondrien-DNA zusammen, welche an Histone und anti-bakterielle Substanzen wie NE und MPO gebunden sind (Cedervall et al., 2018). Im Rahmen einer Tumorerkrankung steigt die Zahl der Neutrophilen in der Zirkulation an. Ins Tumorbett rekrutiert werden sie unter anderem über Zytokine wie Interleukine und Chemokine. Sie exprimieren die C-X-C Chemokin Rezeptortypen 1 und 2 (CXCR1 und CXCR2), die für Chemotaxis bedeutsam sind (Powell and Huttenlocher, 2016). Die von Tumoren ausgeschütteten C-X-C Chemokin Liganden 8, 5 und 6 (CXCL8, CXCL5 und CXCL6) locken Neutrophile in die Tumormikroumgebung (Viola et al., 2012). Neutrophilie wird in malignen Erkrankungen auch durch Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), G-CSF, IL-1 und IL-6 induziert (Rosales, 2018, Moore et al., 1999, Lechner et al., 2010). Im Tumorgewebe setzen neutrophile Granulozyten wiederum selbst Zytokine frei (Tecchio et al., 2014). Ebenso wie durch Antigenpräsentation über MHC II steuern sie dadurch andere Zellen der angeborenen und adaptiven Immunantwort wie B- und T-Zellen (Kolaczkowska and Kubes, 2013). Sie fungieren als Immunsuppressoren, da sie die Proliferation und Aktivierung von T-Zellen hemmen können, indem sie unter anderem die in ihren Granula gespeicherte Arginase 1 einem CXCL8-Signal folgend ausschütten und ROS produzieren (Liew and Kubes, 2019, Czystowska-Kuzmicz et al., 2019, Kruger et al., 2015, Powell and Huttenlocher, 2016). Im Allgemeinen wird überdies angenommen, dass sie Tumorzellproliferation, Angiogenese und Metastasierung fördern, da sie Einfluss auf die MDSC-Besiedlung des Tumors nehmen (Gregory and Houghton, 2011). Letztere wurden als die am stärksten immunsuppressiv wirkenden Myeloidzellen im metastasierten Melanom beschrieben (Umansky and Sevko, 2012).

Neutrophile verstärken Angiogenese auch via VEGF durch Sezernieren von MMP9 (Powell and Huttenlocher, 2016). Matrixmetallopeptidasen sind bedeutsam bei der Tumorzellmigration und -Invasion (Nabeshima et al., 2002).

1.6 Ziele der Dissertation

Die Immuncheckpoint-Blockade hat die Melanomtherapie revolutioniert, aber es sprechen wie beschrieben nur etwa 50% der behandelten Patienten auf die Therapie an. Dabei treten einige entzündliche Nebenwirkungen auf (Jenkins et al., 2018). Neutrophile Granulozyten modifizieren inflammatorische Signalwege und interagieren mit T-Zellen (Rosales, 2018, Minns et al., 2019, Leliefeld et al., 2015). Das DAMP-Molekül S100A8/A9, welches proentzündlich wirkt, wird unter anderem von Neutrophilen sezerniert (Hernandez et al., 2016, Wang et al., 2018). Diverse Arbeiten haben gezeigt, dass Neutrophile und S100A8/A9 für die Tumorprogression eine Rolle spielen (Templeton et al., 2014, Ding et al., 2018, Gebhardt et al., 2006, Wagner et al., 2019). Um zu evaluieren, inwiefern Therapiekonzepte sinnvoll wären, die auf Neutrophilenpopulationen und S100A8/A9 abzielen, wurden in dieser Studie zwei Untersuchungen angestellt. Zum einen wurde eine systemische Messung des DAMP S100A8/A9 vorgenommen (ELISA-Experiment), um dieses als prognostischen und prädiktiven Biomarker für ein Ansprechen auf Immuncheckpoint-Therapie zu testen. Routinemäßig in der Klinik erhobene Neutrophilen-Serumkonzentrationen der Patienten wurden miteinbezogen. Die Ergebnisse wurden sodann mit der Prognose der Patienten korreliert. Zum anderen wurde die lokale Gewebeeinfiltration von neutrophilen Granulozyten in Naevi, Primärmelanomen und Metastasen quantifiziert (TMA-Analyse) und mit der Prognose der Patienten in Beziehung gesetzt. Grundlegend für die Erwägung von Kombinationstherapien war die Zusammenschau der Ergebnisse aus der systemischen sowie der lokalen Analyse, um den prognosemodulierenden Effekt von S100A8/A9 und Neutrophilen risikoprofilgerecht charakterisieren zu können. Schließlich sollten Therapieoptionen diskutiert werden, die das Potenzial besitzen, die Ansprechraten von Melanompatienten im fortgeschrittenen Stadium zu erhöhen und deren Prognose zu verbessern.

2 Material und Methoden

2.1 Studienkonzept

2.1.1 Systemische Analyse

Für die systemische Analyse erfolgten Blutuntersuchungen per Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) in einem Kollektiv aus 45 Patienten mit metastasiertem Melanom (4 Patienten in Tumorstadium IIIC, 40 Patienten in Tumorstadium IV, 1 Patient im Tumorstadium IVA, siehe **Tabelle 5 und 6**) aus der Biobank der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE). Der Altersdurchschnitt in der Kohorte liegt bei 61 Jahren. 67% der Patienten sind männlichen Geschlechts, 33% sind weiblich (siehe **Tabelle 5**). Sie erhielten eine Immuntherapie mit Pembrolizumab, Nivolumab oder Ipilimumab kombiniert mit Nivolumab. Untersucht wurden Serumwerte von S100A8/A9 vor Therapie („BE“ für „Baseline“) und vor der 4. Gabe des Immuntherapeutikums (genannt „C4“ für „Cycle 4“).

Parameter	CR (N=11)	PR (N=16)	SD (N=6)	PD (N=12)	Total (N=45)
Geschlecht					
N	11	16	6	12	45
w	5 (45.5%)	5 (31.2%)	1 (16.7%)	4 (33.3%)	15 (33.3%)
m	6 (54.5%)	11 (68.8%)	5 (83.3%)	8 (66.7%)	30 (66.7%)
Alter					
N	11	16	6	12	45
Mittelwert (SD)	63.8 (22.1)	56.2 (20.6)	72.2 (10.0)	59.5 (12.9)	61.1 (18.3)
AJCC Stadium					
N	11	16	6	12	45
IIIC	1 (9.1%)	2 (12.5%)	0 (0.0%)	1 (8.3%)	4 (8.9%)
IV	10 (90.9%)	13 (81.2%)	6 (100.0%)	11 (91.7%)	40 (88.9%)

Parameter	CR (N=11)	PR (N=16)	SD (N=6)	PD (N=12)	Total (N=45)
IVA	0 (0.0%)	1 (6.2%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (2.2%)

Tabelle 5: Systemische Analyse: Deskriptive Statistik.

Abkürzungen: CR: complete response, PR: partial response, SD: stable disease / standard deviation, PD: progressive disease, N: number, w: weiblich, m: männlich, AJCC: American Joint Committee on Cancer.

2.1.2 Gewebestudie

Die vorliegende Studie basiert des Weiteren auf Daten einer retrospektiven Untersuchung von Tissue Micro Arrays (TMAs). Durch das TMA-Verfahren können bis zu mehrere hundert 0,3 bis 2 mm durchmessende zylinderförmige Gewebestanzungen aus histologisch definierten Arealen eines Tumors in einen einzigen Paraffinblock eingebracht werden. Zlobek und Kollegen haben gezeigt, dass der Zellstatus in den Gewebestanzungen für denjenigen des gesamten Tumors repräsentativ ist (Zlobec et al., 2013). Aus ausgewählten Melanomgeweberegionen („Regions of Interest“) wurden je zwei Zylinder herausgestanzt und semiautomatisiert (mittels eines Systems von Becher Instruments, Silver Spring, MD) in einen Paraffinblock eingeordnet. Anschließend wurden von dem TMA-Block an einem Weichschnitt-Mikrotom Schnitte von 1 µm Dicke angefertigt, auf Objektträger gebracht und getrocknet. Die schachbrettmusterartige Anordnung der Stanzen ist in **Abbildung 6** nachvollziehbar. Die Histonummern der Stanzen wurden dementsprechend tabellarisch in Microsoft Excel dokumentiert.



Abbildung 9: Lichtmikroskopische Übersichtsdarstellung von TMA 2.3 (HE-Färbung).

Zu sehen ist hier eine Übersichtsaufnahme des HE-gefärbten TMA 2.3 (Erläuterung siehe unten). Die Größe der Gewebestanden bemisst sich auf etwa 1 mm². Der Block ist in eine linke und eine rechte Seite zu unterteilen, links oben befinden sich jeweils zwei Muskelstanzen, die der Orientierung dienen sollen.

Abkürzungen: HE: Hämatoxylin-Eosin.

Im Rahmen des vorliegenden Dissertationsprojekts wurden 44 Naevi, 86 Primären und 162 Metastasen, also insgesamt 292 Gewebestanden (Größe: 0,3 mm² (TMA 1), 1 mm² (TMA 2) und 0,5 mm² (TMA 3)) von 113 Patienten und Patientinnen der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universitätsklinik Mannheim untersucht. Sieben Jahre lang wurde die Kohorte überwacht und Krankheitsverläufe wurden dokumentiert. Kam es zur Metastasierung, so entnahm man eine Biopsie aus dem metastasierten Gewebe und bereitete die Probe auf. Im Fokus standen vor allem Proben von Patienten, die mehrere primäre Melanome, Naevi oder Melanommetastasen besaßen, da es von besonderem Interesse war, diese miteinander zu vergleichen. Patienten, die diesen Kriterien entsprechen, sind extrem selten. Es fanden sich jedoch insgesamt 40 Patienten, die jene Charakteristika aufweisen.

Zwei Dermatohistopathologen des Zentrums haben jede Gewebeprobe unabhängig voneinander bezüglich Tumorart („Typing“) und Tumorausbreitung („Staging“) beurteilt. Des Weiteren wurde für jede Probe die Tumordicke nach Breslow bestimmt. Das Vorliegen von Ulzeration und die Mitoserate wurden dokumentiert. Schließlich wurden die Daten aller Patienten bezüglich Erstdiagnose, Exzisionsstelle, Datum der

Exzision, Dauer der Erkrankung, eventuellem Rezidiv, Labordiagnostik, Therapien, Nebendiagnosen und Tod registriert.

Parameter	(N=113)
Alter	
Mittelwert (SD)	65.1 (13.0)
Geschlecht	
m	73 (64.0%)
w	41 (36.0%)
AJCC Stadium	
I	14 (12.6%)
II	60 (54.1%)
III	29 (26.1%)
IV	8 (7.2%)
BRAF-Mutation	
V600E	10 (55.6%)
WT	8 (44.4%)

Tabelle 6: TMA Patientenstatistik: Diverse deskriptive Parameter.

Abkürzungen: N: number, w: weiblich, m: männlich, d: delta, SD: standard deviation, AJCC: American Joint Committee on Cancer, BRAF: B Rapidly Accelerated Fibrosarcoma, WT: Wild Type, V: Valin, E (Einbuchstabencode): Glutaminsäure.

Parameter	Naevus (N=44)	Primarius (N=86)	Metastase (N=162)	Total (N=292)
Breslow-Gruppe				
N	9	62	31	102
<=1mm	0 (0.0%)	8 (12.9%)	0 (0.0%)	8 (7.8%)
1-2mm	0 (0.0%)	11 (17.7%)	0 (0.0%)	11 (10.8%)
2-4mm	6 (66.7%)	33 (53.2%)	15 (48.4%)	54 (52.9%)
>4mm	3 (33.3%)	10 (16.1%)	16 (51.6%)	29 (28.4%)
Ulzeration				
N	5	62	20	87
ja	3 (60.0%)	27 (43.5%)	8 (40.0%)	38 (43.7%)
nein	2 (40.0%)	35 (56.5%)	12 (60.0%)	49 (56.3%)
Tumorlokalisation				
N	44	85	160	289
Stamm	36 (81.8%)	65 (76.5%)	N/A	101 (34.9%)
Extremität	8 (18.2%)	20 (23.5%)	N/A	28 (9.7%)
Lokoregionär	N/A	N/A	144 (90.0%)	144 (49.8%)
Fernmetastase	N/A	N/A	16 (10.0%)	16 (5.5%)

Parameter	Naevus (N=44)	Primarius (N=86)	Metastase (N=162)	Total (N=292)
BRAF				
N	1	21	67	89
V600E	1 (100.0%)	6 (28.6%)	48 (71.6%)	55 (61.8%)
WT	0 (0.0%)	15 (71.4%)	19 (28.4%)	34 (38.2%)

Tabelle 7: TMA Gewebestatistik: Diverse deskriptive Parameter.

Abkürzungen: N: number, N/A: not applicable, SD: standard deviation, BRAF: B Rapidly Accelerated Fibrosarcoma, WT: Wild Type, V: Valin, E (Einbuchstabencode): Glutaminsäure.

Metastasenlokalisierung	(N=162)
N	160
Kutan/subkutan	72 (45.0%)
Lymphknoten	72 (45.0%)
Fernmetastase	16 (10.0%)

Tabelle 8: TMA Gewebestatistik: Metastasenlokalisierung.

Abkürzungen: N: number.

Primarien-Tumortyp	(N=86)
N	56
ALM	8 (14.3%)
LMM	6 (10.7%)
Melanom auf kongenitalem Naevus	2 (3.6%)
Melanoma in situ	2 (3.6%)
MM	4 (7.1%)
MM der Lid- und Bindehaut	2 (3.6%)
Mucosa Melanom	1 (1.8%)
NMM	9 (16.1%)
Sonstige	2 (3.6%)
SSM	18 (32.1%)
Uvea MM	2 (3.6%)

Tabelle 9: TMA Gewebestatistik: Primarien-Tumortyp.

Abkürzungen: N: number, ALM: amelanotisches Melanom, LMM: Lentigo-Maligna-Melanom, MM: malignes Melanom, NMM: primär noduläres malignes Melanom, SSM: Superfiziell spreitendes Melanom.

Die neun in dieser Arbeit herangezogenen TMAs wurden im Rahmen zweier Dissertationsprojekte der Arbeitsgruppe Gebhardt der Klinik für Dermatologie an der Universitätsmedizin Mannheim in Zusammenarbeit mit der NCT Gewebebank des Pathologischen Instituts am Universitätsklinikum Heidelberg erstellt. Sie wurden für diese Arbeit zwecks Immuninfiltrat-Analyse mit Schwerpunkt der Zellzählung von neutrophilen Granulozyten zur Verfügung gestellt. Mittels Immunfluoreszenz erfolgte die Untersuchung der Gewebestanden nachdem das mit Neutrophilen assoziierte Protein CD15 markiert war (Pillay et al., 2013). Das fukosylierte CD15 Kohlenhydrat-Epitop, das auch die Bezeichnung Lewis x oder Le^x trägt, wird vor allem von reifen Neutrophilen, Monozyten und Promyelozyten exprimiert (Oriol et al., 1986, Hanjan et al., 1982, Civin et al., 1981). Bei Neutrophilen spielt es für die Zell-Zell-Interaktion, Phagozytose, beim Respiratory Burst und der Stimulation von Degranulierung eine Rolle (Nakayama et al., 2001). Es dient als Oberflächenmarker.

Die gefärbten TMAs wurden mithilfe von Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert und mittels einer hochauflösenden Mikroskopkamera digitalisiert. Daraufhin erfolgte die weitergehende Analyse der gefärbten Gewebeproben durch händische Auszählung nach zuvor festgelegten Kriterien unter Verwendung des Programms *Image J*. Schließlich wurden die daraus resultierenden Rohdaten einer statistischen Auswertung bezüglich Korrelation der Expressionsdaten mit klinischen Parametern wie Diagnose und Risikofaktoren unterzogen.

2.1.3 Ethikvoten

Die Genehmigung von Studien an Blutproben der Patienten aus der systemischen Analyse ist unter der Kennzeichnung PV5392 zu finden. Im Rahmen des Ethikvotums 2010-318N-MA gab jeder Patient der Gewebestudie mit einer Unterschrift sein Einverständnis zur Verwendung seiner Proben und klinischer Daten für Forschungszwecke.

2.2 Material

2.2.1 Geräte

Bezeichnung	Bezugsquelle	Artikelnummer
37°C Inkubationsschrank T6030	Heraeus Instruments, Hanau	51009072
Axiophot 2 Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena	20980029
Axiostar Durchlichtmikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena	36143
Zeiss Axio Observer.Z1 Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena	491912-0049-000
Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau	10355052
Centrifuge 5910 R	Eppendorf AG, Hamburg	5942HL401125
GFL 1052 Paraffin-Streckbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel	10354098 B
HT 50 Controller Microscope Warming Heating Plate Stage	Minitüb GmbH, Tiefenbach	DE54390403
Kühleinheit TES 99.410	MEDITE Medical GmbH, Burgdorf	02-9941-00
Kühlschrank -20°C G5216-21	Liebherr-International S.A, Bulle FR, Schweiz	A160016918-0
Kühlschrank -80°C TSX600V	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	164VT0C01M
Kühlschrank 4°C	Liebherr-International S.A, Bulle FR, Schweiz	CBNes 6256-25
Macro-Pipettierhelfer	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim	10L69896
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach	079829232
Mehrkanal-Pipette Repeater E3 1µl -50mL	Eppendorf AG, Hamburg	N26111H
Mikrotiterplatten Reader PowerWave XS2	BioTek Instruments Inc., Winooski, USA	240462
Mikrotom Leica RM 2165	Leica Instruments GmbH, Nussloch	050331621
Mikrowelle	Bosch GmbH, Stuttgart	HMT84M421
MS2 Minishaker	IKA Works Inc., Wilmington, USA	28405
Observer Z1 Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena	491912-0049-000
Perfect Spin 24 Plus Microcentrifuge	Peqlab Biotechnologie GmbH,	P402054

	Erlangen	
Pipette Research plus 10µl	Eppendorf AG, Hamburg	EP3121000015
Pipetten Reference 100µl, 1000µl	Eppendorf AG, Hamburg	4910000.069
Pipetten Research 10µl, 200µl, 5000µl	Eppendorf AG, Hamburg	3112000.010 3112000.061 3120000.070
Pippettierhilfe pipetus standard	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt	9907200
Präzisionswaage Entris II	Sartorius AG, Göttingen	BCE223I-1CEU
Vortexer Paramix 3	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach	9129046182
Wärmeschrank U10	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach	3634
Zeiss Axio Scan.Z1 Slide Scanner	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena	10355052

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Geräte.

2.2.2 Software und Datenbanken

Bezeichnung	Bezugsquelle
Adobe Illustrator (Version 26.0.1)	Adobe Systems Software Ireland Limited, IRL
BioRender	BioRender Software, Toronto, Canada
EndNote X9 (Version 3.3)	Adept Scientific GmbH, Frankfurt
Gen5 (Version 1.10)	BioTek Instruments Inc., Winooski, USA
Google	Google Inc., Mountain View, CA, USA
GraphPad PRISM (Version 9)	GraphPad Software, Inc., San Diego, USA
Image J (Version 1.53c)	Image J Software, Jena
Microsoft Office 365 Pro Plus (Version 14.7.7)	Microsoft, Redmond, WA, USA
netScope Viewer (Version 2019)	Net-Base Software GmbH, Freiburg
PubMed	National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, Rockville Pike, Bethesda, MD, USA
R (Version 4.1.1)	Free Software Foundation, Boston, USA
ZEN 2012 (blue edition, Version 1.1.2.0)	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena

Tabelle 11: Auflistung verwendeter Software und Datenbanken.

2.2.3 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung (Artikelnummer)	Bezugsquelle	Artikelnummer
Combitips advanced 5 mL	Eppendorf AG, Hamburg	0030089.669
Deckgläser 24x60mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen	0101242
EUKITT Mounting medium	ORSAtec GmbH, Bobingen	6.00.01.0001.06.01.01
Fluoromount-G	Invitrogen AG, Carlsbad, USA	00-4958-02
Handschuhe Gentle Skin classic	Meditrade GmbH, Kiefersfelden	8092M/1000
Mehrkanalpipettenaufsatz	Eppendorf AG, Hamburg	3122606006
Pipettenspitzen 0,1-10µl	Eppendorf AG, Hamburg	0030000.810
Pipettenspitzen 2-200µl	Eppendorf AG, Hamburg	0030000.870
Pipettenspitzen 50-1000µl	Eppendorf AG, Hamburg	0030000.919
Pipettenspitzen mit Filter 0,1-10µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht	70.1130.215
Pipettenspitzen mit Filter 2-200µl	Eppendorf AG, Hamburg	0030077.547
Pipettenspitzen mit Filter 50-1000µl	Eppendorf AG, Hamburg	0030077.571
Reaktionsgefäße 15ml	Falcon, Corning B.V. Life Science, Amsterdam, Niederlande	352095
Safe-Lock Tubes 0,5 mL	Eppendorf AG, Hamburg	0030123.301
Safe-Lock Tubes 1,5 mL	Eppendorf AG, Hamburg,	0030123.328
Safe-Lock Tubes 2,0 mL	Eppendorf AG, Hamburg	0030123.344
Serologische Einwegpipetten 10ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht	86.1254.001
Serologische Einwegpipetten 25ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht	357525
Serologische Einwegpipetten 5ml	Falcon, Corning B.V. Life Science, Amsterdam, NL	356543
SuperFrost Plus Objektträger	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen	03-0060

Tabelle 12: Auflistung von Verbrauchsmaterialien.

2.2.4 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Bezugsquelle	Artikelnummer
Destilliertes Wasser (Aqua dest.)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen	0082479E
Dako REAL Antibody Diluent	Dako, Glostrup, Dänemark	S2022

4',6-diamidino-2-phenylindone (DAPI)	Roche Diagnostics, Mannheim	10236276001
Eosin 0,2%	Medite GmbH, Burgdorf	41-6670-00
Ethanol 70%	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen	2202.5000
Ethanol 80%	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen	2203.5000
Ethanol 96%	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen	2209.5000
Ethanol 99%	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen	2212.5000
Hämatoxylin Mayer	Medite GmbH, Burgdorf	41-5131-00
Negative Control Rabbit Immunoglobulin Fraction (Normal)	Dako, Glostrup, Dänemark	X0903
PAP PEN Immunostaining Pen	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt	MKP-1
Protein Block Serum-Free	Dako, Glostrup, Dänemark	X0909
Trypsin	Biochrom GmbH, Berlin	L 2103-20G
Tween 20	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim	9005-64-5
Vollentsalztes Wasser (VE-Wasser)	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg	-
Xylol z.A. (zur Analyse)	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen	326.2500

Tabelle 13: Auflistung von Chemikalien und Reagenzien.

2.2.5 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
0,02% DAPI	40µl DAPI 200mL Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung, PBS)
0,5 mol Tris-Hydrochloride (Tris-HCl)	60,57g Tris (M=121,14g/mol) 500 mL Aqua dest. pH auf 7,4 eingestellt mit ca. 400 – 500 mL 1N HCl Aqua dest. ad 1 L
10x PBS	160,00g Natriumchlorid (NaCl) 4,00g Kaliumchlorid (KCl) 23,20g Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) 4,00g Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)

	<p>Aqua dest. ad 2 L</p> <p>Nach 1:10 Verdünnung für 1x PBS pH auf 7,3-7,5 eingestellt</p>
<p>10x Tris-hydroxymethylaminomethan (Tris) Buffered Saline mit Tween 20 (Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20, TBS-T)</p>	<p>121,10g Tris (Trizma-Base) 175,32g NaCl Aqua dest. ad 1,5 L 10 mL Tween 20</p> <p>pH auf 7,6 eingestellt mit 90 mL 25% HCl Aqua dest. ad 2 L</p>
<p>Zitratpuffer</p>	<p>Stammlösung A 10,5 g Zitronensäuremonohydrat ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) Aqua dest. ad 500 mL</p> <p>Stammlösung B 14,7 g Tri-Natriumzitratedihydrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2 H_2O$) Aqua dest. ad 500 mL</p> <p>Gebrauchslösung 9 mL Stammlösung A 41 mL Stammlösung 450 mL Aqua dest.</p> <p>pH der Gebrauchslösung auf 6,0 eingestellt</p>
<p>Tris-gepufferte Salzlösung (TBS-) Spülpuffer</p>	<p>53g NaCl 12g Tris Aqua dest. ad 800 mL</p> <p>pH auf 7,4-7,5 eingestellt mit 1N HCl Aqua dest. ad 1 L</p>
<p>Trypsin 0,01%</p>	<p>1 mL Tris-HCl 0,5 mol 9 mL Aqua dest.</p> <p>100µl entnommen und durch 100µl Trypsin 0,1% ersetzt</p>
<p>Trypsin 0,1%</p>	<p>1 mL Tris-HCl 0,5 mol 9 mL Aqua dest. 0,01g Trypsin (4°C) 0,011g Calciumchlorid + Wasser ($CaCl_2 \cdot H_2O$)</p>

Tabelle 14: Auflistung von Puffern und Lösungen.

2.2.6 Kit für ELISA-Messungen

Bezeichnung	Bezugsquelle	Artikelnummer
MRP8/14 (S100A8/A9) ELISA Kit	Bühlmann, Schönenbuch, Schweiz	EK-MRP8/14

Tabelle 15: Dokumentation des ELISA-Kits.

2.2.7 Primärer Antikörper

Bezeichnung	Bezugsquelle	Artikelnummer
Rat Recombinant Anti- CD15 (Species independent) (Neutrophilen-Marker) Clone SP159	Abcam, Cambridge, GB	ab135377

Tabelle 16: Auflistung des primären Antikörpers.

2.2.8 Sekundärer Antikörper

Bezeichnung	Bezugsquelle	Artikelnummer
Goat-Anti-Rabbit Alexa Flour 594 IgG (H+L) AB_2534116	Invitrogen AG, Carlsbad, USA	A-11072

Tabelle 17: Auflistung des sekundären Antikörpers.

2.3 Methoden

2.3.1 Bestimmung der S100A8/A9-Konzentrationen im Patientenserum

Die Blutuntersuchungen wurden mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein Antikörper-basiertes Nachweisverfahren für Proteine, Viren, Hormone, Toxine oder Pestizide aus Blut, Milch oder Urin (Lequin, 2005). S100A8/A9-Level wurden in dieser Studie mit einem kommerziell erhältlichen ELISA-Kit in mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) antikoaguliertem Patientenserum bestimmt. Der Test misst mithilfe eines Sandwichverfahrens selektiv das MRP8/14-Antigen, welches wie beschrieben S100A8/A9 markiert. Namensgebend für die Methode ist die Tatsache, dass

Antigenkonzentrationen zwischen zwei Lagen von Antikörpern detektiert werden. Nach Beschichten der Küvetten der Mikrotiterplatte mit einem monoklonalen Fangantikörper („Capture Antibody“), der hochgradig spezifisch an heterodimere und -polymere MRP8/14-Moleküle bindet, erfolgt ein Waschschrift, um alle ungebundenen und somit unerwünschten Antigene zu entfernen. Anschließend wird ein zweiter monoklonaler Antikörper hinzugegeben (sog. „Detektionsantikörper“). Letzterer wurde zuvor mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert und bindet an die am Fangantikörper gebundenen MRP-8/14 Komplexe. Das Antikörperpaar aus Fang- und Detektionsantikörper umgibt nun das Antigen (in diesem Fall S100A8/A9) und es entsteht ein „Sandwich“ aus Antikörper – Antigen – Antikörper. Nach Inkubation und einem Waschschrift wird Tetra-Methyl-Benzidine (TMB) in die Küvetten der Mikrotiterplatte pipettiert. Es ergibt sich aus der ablaufenden Enzymreaktion eine blaue Färbung. Die Reaktion wird sodann mittels einer sauren Stopplösung (Schwefelsäure, H_2SO_4) beendet und es erfolgt ein Farbumschlag nach Gelb. Schließlich wird bei 450 nm die optische Dichte gemessen, welche zur MRP8/14-Konzentration direkt proportional ist.

Pro Patient wurden 10 μ l Serum benötigt. Zur Gewinnung von Serum wurde den Patienten der Kohorte Blut abgenommen. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 1000 g (d.h. 1000 x Erdbeschleunigung) ohne Bremse, konnte der Überstand, das Serum, von den festen Blutbestandteilen separiert und bei -80 Grad Celsius in der Biobank des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf tiefgefroren werden. Das Serum wurde zum Zweck des ELISA-Experiments aus der Biobank entnommen und erstmals wieder aufgetaut. Vor Beginn des Versuchs wurden alle Reagenzien auf Raumtemperatur äquilibriert. Zuerst wurden die Patientenproben mit dem im Kit enthaltenen Inkubationspuffer im Verhältnis 1:100 verdünnt und gut gemischt. Vor weiterem Gebrauch sollten die Proben 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen werden. Als Nächstes wurden die Mikroküvetten der Mikrotiterplatte 2 x mit jeweils 300 μ l Waschpuffer gespült; die Platte wurde dann dekantiert und auf einem saugfähigen Papier durch Ausschlagen sorgfältig getrocknet. Dann wurden jeweils 100 μ l Inkubationspuffer als „Blank“ (Leerprobe) und die mitgelieferten Kalibratoren zur späteren Erstellung der Eichkurve in Duplikaten in die Mikroküvetten pipettiert. Ebenso wurde mit den vom Hersteller zur Verfügung gestellten Kontrollen („Hoch“ und „Tief“) verfahren. Des Weiteren wurden je 100 μ l der verdünnten Serumproben als Duplikate in die nächsten Küvetten pipettiert. Die Platte wurde mit einer

Abdeckfolie beklebt und auf einem Platten-Schüttler bei 500 rpm („revolutions per minute“, Umdrehungen pro Minute) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten ein Waschschrift und die Zugabe von jeweils 100 µl des Enzym-Markers. Die Mikrotiterplatte wurde dann erneut mit einer Folie abgedeckt und auf dem Platten-Schüttler bei 500 rpm für etwa 30 Minuten inkubiert. Nach dem Entleeren der Mikroküvetten wurden 5 Waschschriffe vorgenommen und die Platte wurde durch Ausschlagen auf saugfähigem Papier getrocknet. Dann wurden jeweils 100 µl des TMB-Substrats zu jeder Küvette gegeben. Die Platte wurde ein letztes Mal abgedeckt und etwa 15 Minuten vor Licht geschützt bei Raumtemperatur auf dem Platten-Schüttler (500 rpm) inkubiert. Als letztes wurde je 100 µl der Stopp-Lösung in die Küvetten pipettiert, Luftbläschen wurden mit einer Pipettenspitze entfernt und innerhalb der nächsten 30 Minuten erfolgte die Messung der optischen Dichte in einem Platten-Photometer bei 450 nm.

2.3.2 Immunfluoreszenz-Färbungen von Gewebeschnitten

Die formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten humanen Melanom-Schnitte (9 TMAs: 1, 2.1, 2.2, 2.3, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 und 3.5 aus Mannheim und 3 Positiv-/Negativ-Kontrollen aus den Melanomgewebe-Archiven des Instituts am UKE, jeweils 1 µm Paraffin-Schnitte) wurden zunächst in Xylol entparaffiniert (2 x 20 min 100% Xylol) und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (1-2 min 100% Ethanol, 5 min 100% Ethanol, 3-5 mal schwenken in 90% Ethanol, 3-5 mal schwenken in 80% Ethanol, ebenso in 70% Ethanol, 5 min Aqua dest.). Anschließend wurden sie in der Mikrowelle bei 360 Watt 2 x 10 min in Zitratpuffer in verschlossenen Plastikkuvetten gekocht, um die maskierten Antigen-Epitope freizulegen. Nach dem Abkühlen bei offenem Deckel (30 min) folgten zwei Waschschriffe in 1x TBS-T (jeweils 3 min). Dann erfolgte die Inkubation der Schnitte mit 0,001% Trypsin bei 37 Grad Celsius (10 min). Die Schnitte wurden kurz in Aqua dest. gespült und anschließend in 1x PBS gesammelt. Daraufhin wurden die einzelnen Gewebeschnitte auf den Objektträgern mit einem wasserabweisenden Stift (Delimiting Pen) umkreist, um die einzusetzende Antikörpermenge zu minimieren. Es folgen zwei weitere Waschschriffe mit 1x TBS-T (jeweils 3 min). Um unspezifische Bindungen durch die verwendeten Antikörper zu verhindern, wurden die Schnitte danach für 30 Minuten mit je einem Tropfen DAKO Blocking Solution bei

Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert. Die Schnitte wurden dann durch Abklopfen auf einem saugfähigen Tuch von der Lösung befreit und anschließend mit dem in 1x PBS verdünnten Primärantikörper SP159 (Anti-CD15, Verdünnung 1:75) benetzt (siehe **Tabelle 19**). Auf die für die Negativkontrolle bestimmten Schnitte der gesondert mitgelaufenen Melanome aus Archiven wurde der Isotyp-Kontrollantikörper Negative Control Rabbit Immunoglobulin Fraction (Normal), verdünnt 1:260 in 1x PBS, pipettiert. Dieser soll das Ausmaß an unspezifischer Bindung des Primärantikörpers (sog. „Hintergrundsignal“) aufzeigen. Nach dem Auftragen aller Antikörper erfolgte dann die Inkubation über Nacht bei 4 Grad Celsius in der Feuchtkammer. Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte zunächst 3 x für je 3 Minuten mit 1x TBS-T gewaschen und im nächsten Schritt mit dem Sekundärantikörper Alexa Flour 594 IgG (H+L), verdünnt 1:400 in 1x PBS für 45 Minuten bei RT im Dunkeln in der Feuchtkammer inkubiert (siehe **Tabelle 19**). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Schnitte nun 5 Minuten mit 1x PBS gespült und anschließend wurde die Kerngegenfärbung mit DAPI durchgeführt (Verdünnung 1:5000 für 5 min bei RT). Schließlich wurden die Schnitte 2 x 5 min in PBS und 2 x 3 min in Aqua dest. gespült und mit Eindeckmedium (Mounting Medium Fluoromount G) eingedeckt. Besonders wichtig war hierbei die Vermeidung von Luftblasen.

Primärantikörper, Verdünnung	Sekundärantikörper, Verdünnung
SP159 (Anti-CD15) 1:75 in PBS	Alexa 594 (rot) 1:400 in PBS

Tabelle 18: Verwendete Antikörper für die CD15-Färbung.

Aufgelistet ist die Kombination aus Primär- und Sekundärantikörper für die Sichtbarmachung des Neutrophilenmarkers CD15. Genannt werden auch die Konzentrationen im Verdünnungsmedium. Detaillierte Bezeichnungen der Produkte sind in den Materiallisten aufgeführt (siehe **Tabelle 17 und 18**).

2.3.3 Mikroskopie und Auswertung der Melanom-TMAs

Die mitgelaufenen, oben beschriebenen Kontrollen, die 3x je eine Positivkontrolle mit Primär- und Sekundärantikörper sowie 3x je eine Negativkontrolle mit Isotyp-Kontrolle und Sekundärantikörper umfassten, wurden noch im feuchten Zustand unter einem Lichtmikroskop auf Funktionieren der Färbung und spezifische Signale hin überprüft („wie im Etablierungsprozess gesehen“). Alle gefärbten Gewebeschnitte wurden dann nach dem Trocknen (am übernächsten Tag) für die Immunfluoreszenzmikroskopie an einem Lichtmikroskop mikroskopiert und es

wurden mithilfe einer Mikroskopkamera Übersichtsaufnahmen der einzelnen Stenzen in 40-facher Vergrößerung mit Immersionsöl angefertigt. Diese wurden in das Programm *Image J* überführt. Die Stenzen wurden einzeln vermessen und die in der Färbung markierten Zellen mithilfe eines Nummerierungstools ausgezählt. Von den insgesamt 292 Gewebestücken der Melanom-TMAs waren 44 Naevi, 86 Primärmelanome und 162 Metastasen für die Analyse geeignet. Die restlichen Proben wurden aufgrund unzureichender Gewebemengen aus der statistischen Wertung herausgenommen. Die klinischen Parameter wurden tabellarisch mit den in dieser Studie erhobenen Zellzahlen pro Stanzfläche zusammengeführt.

2.3.4 Statistische Berechnungen

Die ELISA-Messdaten wurden aus dem Programm *Gen 5* exportiert und in Microsoft Excel übertragen sowie mittels Tabellenkalkulation ausgewertet. Alle statistischen Berechnungen wurden mit R (Version 4.1.1) und GraphPad PRISM (Version 6) durchgeführt. Als statistisch signifikant wurden p-Werte <0.05 interpretiert.

Um die Expression von Neutrophilen in der lokalen Analyse zu quantifizieren, wurden positiv gewertete Signale auf die Stanzfläche normiert (siehe **Abbildung 23** sowie **Tabelle 20**). Unterschiedlich große Gewebestücken wurden durch die Angabe Zellzahl pro mm^2 somit vergleichbar gemacht. Mittels one way-ANOVA Test konnten die Zellzahlen der Gewebearten einander gegenübergestellt werden. Bei der ANOVA handelt es sich um ein Verfahren zum Mittelwert-Vergleich zwischen mehr als zwei Gruppen. Der p-Wert wurde mit dem Kruskal-Wallis Test errechnet. Die unabhängige Variable war die Gewebeherkunft. Die abhängige Variable bestand in der normierten Zellzahl. Für den Vergleich jeweils zweier Gruppen wurden der Mann-Whitney-U Test und der Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests durchgeführt.

Univariate Überlebenszeitanalysen dienten dazu, herauszufinden, ob die Serum-S100A8/A9- oder Serum-Neutrophilenlevel bzw. die Neutrophileninfiltration sich auf die Prognose der Patienten auswirkte. Der Beobachtungszeitraum wurde folgendermaßen definiert: Zeitpunkt der Erstdiagnose bzw. Registrierung der Studienpatienten bis zum ersten Krankheitsprogress, oder bis zum Versterben des Patienten. Berechnungen des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens und wurden anhand von Kaplan-Meier-Kurven und LogRang-Tests analysiert.

Die Survival-Analysen der Gewebestudie wurden auf Patientenbasis pro Tumorart (Naevus, Primarius, Metastase) angefertigt. Standen von einem Patienten mehrere Gewebeproben einer Tumorart zur Verfügung, so wurde der Mittelwert gebildet. In Analysen des Krankheitsverlaufs wurde das arithmetische Mittel aller Proben einer Tumorart berechnet und sodann die Differenz zum Mittelwert der anderen Tumorart desselben Patienten ermittelt.

Die Überlebenszeitanalysen der systemischen Analyse wurden ebenfalls auf Patientenbasis durchgeführt und es wurden zwei Zeitpunkte einbezogen („Baseline“ und „C4“). Analysen, die sich auf den individuellen Serumgradienten bezogen, bedienten sich der absoluten Differenz zwischen dem „C4“-Messwert und der „Baseline“-Serumkonzentration pro Patient.

Die Korrelationen zwischen Parametern aus der systemischen Analyse wurden anhand des Kendall'schen Rangkorrelationskoeffizienten (Kendall-Tau) berechnet. Dabei handelt es sich um eine lineare Korrelationsbestimmung, welche vergleichsweise robust gegenüber Ausreißern ist. Ein Kendall-Tau-Korrelationskoeffizient (R) von $<0,3$ spricht für eine schwache, ein R zwischen 0,3 und 0,5 für eine moderate und ein $R>0,5$ für eine starke Korrelation.

Um herauszufinden, ob S100A8/A9-Serum-Level, Neutrophilen-Serumkonzentrationen oder die Neutrophileninfiltration im Tumorgewebe es ermöglichen, Patienten mit verkürztem OS bzw. PFS zu identifizieren, wurden die Patienten anhand der gemessenen Serumkonzentrationen bzw. Neutrophilenzellzahlen in je zwei Gruppen eingeteilt. Hierfür wurde jeweils automatisiert ein Cut-Off-Wert generiert, welcher auf Basis des p-Werts der Survival-Analyse optimiert wurde.

Für die one way-ANOVA Tests und die kinetischen Analysen der Systemstudie erfolgte eine Unterteilung in Responder und Non-Responder – je nach Ansprechen auf ICT. Dazu wurde die radiologische Bildgebung aller Stagings, die für den einzelnen Patienten durchgeführt worden waren, basierend auf den aktuellen RECIST-Kriterien beurteilt. Es wurde das beste dokumentierte Ansprechen für die Datenauswertung genutzt.

3 Ergebnisse

3.1 Systemische Analyse

3.1.1 S100A8/A9

Proentzündliche Faktoren, zu denen unter anderen LDH, CRP und DAMPs gehören, können als Marker für eine inflammatorische Dysregulation bei Tumorerkrankungen dienen (Wagner et al., 2018, Fang et al., 2015, Boone and Lotze, 2014). Insbesondere bezüglich einer vermehrten Sekretion von DAMPs hat sich in Studien ein Zusammenhang mit Tumorentstehung und beschleunigter Tumorprogression gezeigt (Pandey et al., 2015, Gebhardt et al., 2002). In dieser Arbeit wurde eine Untersuchung des zirkulierenden S100A8/A9 zu zwei Zeitpunkten („Baseline“ und „C4“, d.h. vor der vierten Infusion der Immuncheckpoint-Inhibitoren) in einer Kohorte aus Patienten durchgeführt, die unter einer Melanomerkkrankung im fortgeschrittenen Stadium litten. Die erhobenen S100A8/A9-Serumwerte wurden sodann mit der Prognose der Patienten, speziell mit zwei Endpunkten, dem progressionsfreien Überleben und dem Gesamtüberleben, korreliert, um die prognostischen Eigenschaften von S100A8/A9 weitergehend zu erforschen.

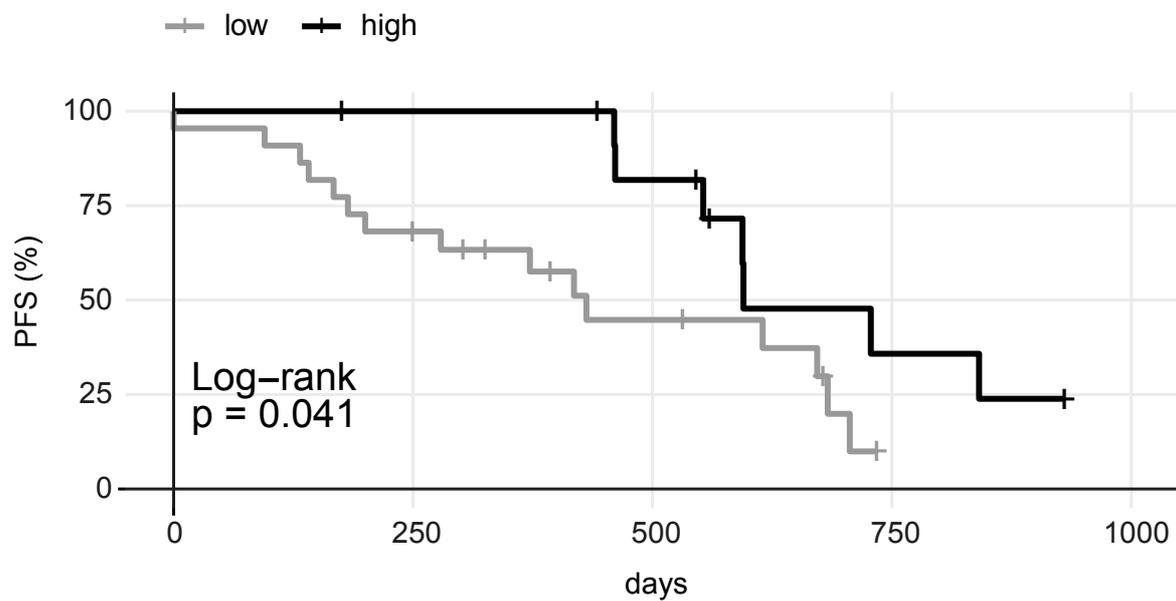
3.1.1.1 Univariate Survivalanalyse

Zur Überprüfung der Hypothese bezüglich der Auswirkungen von S100A8/A9 auf die Tumorprogression wurden sowohl mittels der „Baseline“-Werte als auch basierend auf den Daten vom Zeitpunkt vor der vierten Infusion der Immuntherapeutika („C4“) Überlebenszeitanalysen vorgenommen. Diese sollen, beginnend mit den Analysen der „Baseline“, im Folgenden erörtert werden.

In der in **Abbildung 8A** dargestellten univariaten Survival-Analyse zeigte sich ein signifikanter positiver Effekt von S100A8/A9 auf das progressionsfreie Überleben (Progression-Free Survival, PFS): Größere Mengen von im Blut zirkulierendem S100A8/A9 waren mit einem späteren Tumorprogress assoziiert ($p=0,041$). Der Cut-Off-Wert in dieser Analyse betrug rechnerisch 3905 ng/ml.

Im Gegensatz zur PFS-Analyse zeigte sich ein signifikanter negativer Effekt für hohe Baseline-S100A8/A9-Serum-Level in der Analyse mit dem Endpunkt „Gesamtüberleben“ (Overall Survival, OS) (siehe **Abbildung 8B**). Melanompatienten mit einem hohen „Baseline“-S100A8/A9-Serum-Level von mehr als 5000 ng/ml erreichten lediglich ein verkürztes Gesamtüberleben vergleichen mit Patienten, die vor ICT-Beginn ein niedriges Level aufwiesen. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war signifikant ($p=0,011$).

A PFS-Analyse: S100A8/A9-Baseline-Serum-Level



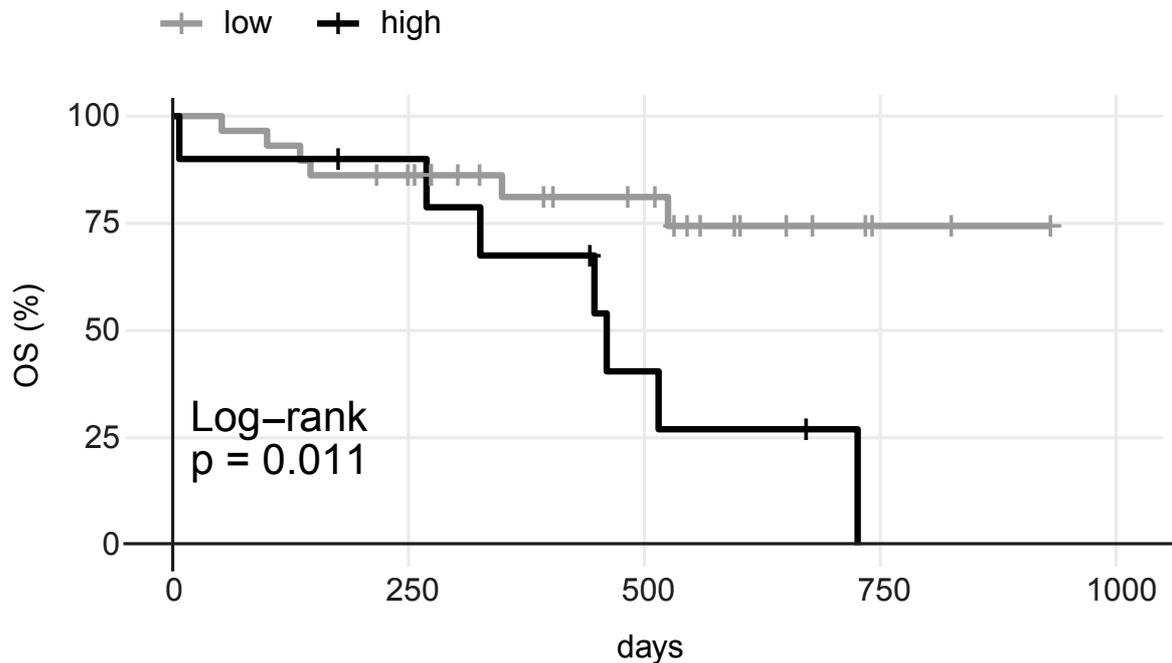
B OS-Analyse: S100A8/A9-Baseline-Serum-Level

Abbildung 10: Univariate Überlebenszeitanalyse: Korrelation zwischen "Baseline"-S100A8/A9-Serumspiegeln und progressionsfreiem Überleben bzw. Gesamtüberleben.

A) Für die Melanompatienten der systemischen Studie sind Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie Überleben dargestellt. Die Patienten wurden nach hohen und niedrigen S100A8/A9-Serumkonzentrationen stratifiziert. Erhöhte S100A8/A9-Serumkonzentrationen vor ICT-Beginn („Baseline“) konnten mit einem verlängerten progressionsfreien Überleben assoziiert werden. In der PFS-Analyse war die „Number at risk“ an Tag 0 für S100A8/A9-Serumkonzentrationen über 3905 ng/ml 13 Patienten und für Level unter 3905 ng/ml 22 Patienten. **B)** Für die Melanompatienten der systemischen Studie sind Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben dargestellt. Erhöhte S100A8/A9-Serumkonzentrationen vor ICT-Beginn („Baseline“) konnten mit einem verkürzten Gesamtüberleben assoziiert werden. Die „Number at risk“ betrug in der OS-Analyse an Tag 0 für S100A8/A9-Serumkonzentrationen über 5000 ng/ml 10 Patienten und für Level unter 5000 ng/ml 29 Patienten.

Abkürzungen: p: p-Wert, PFS: Progression Free Survival, OS: Overall Survival.

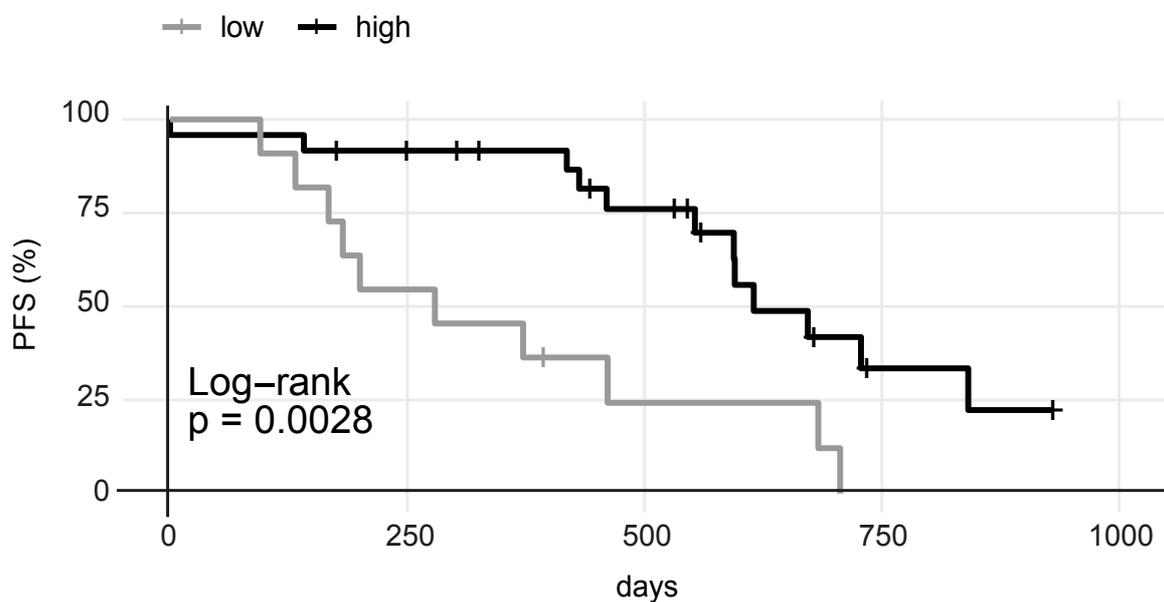
Zusammenfassend zeigte sich ein positiver Effekt von hohen „Baseline“-Serumspiegeln des DAMP S100A8/A9 auf das progressionsfreie Überleben (siehe **Abbildung 8A**). Hohe „Baseline“-S100A8/A9-Serum-Level beeinflussten jedoch die Prognose von Stadium III- und IV-Melanompatienten unter Immuntherapie negativ bezüglich ihres Gesamtüberlebens (siehe **Abbildung 8B**). Die beobachteten Effekte waren also gegensätzlich: Hohe S100A8/A9-„Baseline“-Level führten somit zwar zu einem späterem Krankheitsprogress, aber zum früheren Versterben am Melanom.

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der „C4“-Analyse hinzugezogen werden (siehe **Abbildung 9**). Bezüglich des progressionsfreien Überlebens war ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit hohen bzw. niedrigen S100A8/A9-„C4“-

Serumkonzentrationen zu verzeichnen: Hohe S100A8/A9-„C4“-Level konnten wiederum mit einem verlängerten progressionsfreien Überleben assoziiert werden (Cut-Off-Wert: 2271 ng/ml, $p=0,0028$) (siehe **Abbildung 9A**).

Die Auswertung der S100A8/A9-„C4“-Serumkonzentrationen mittels Survival-Analysen ergab jedoch bezüglich des Gesamtüberlebens erneut eine signifikant schlechtere Prognose für Patienten mit hohen S100A8/A9-„C4“-Konzentrationen (Cut-Off-Wert: 3770 ng/ml, $p=0,036$) (siehe **Abbildung 9B**).

A PFS-Analyse: S100A8/A9-C4-Serum-Level



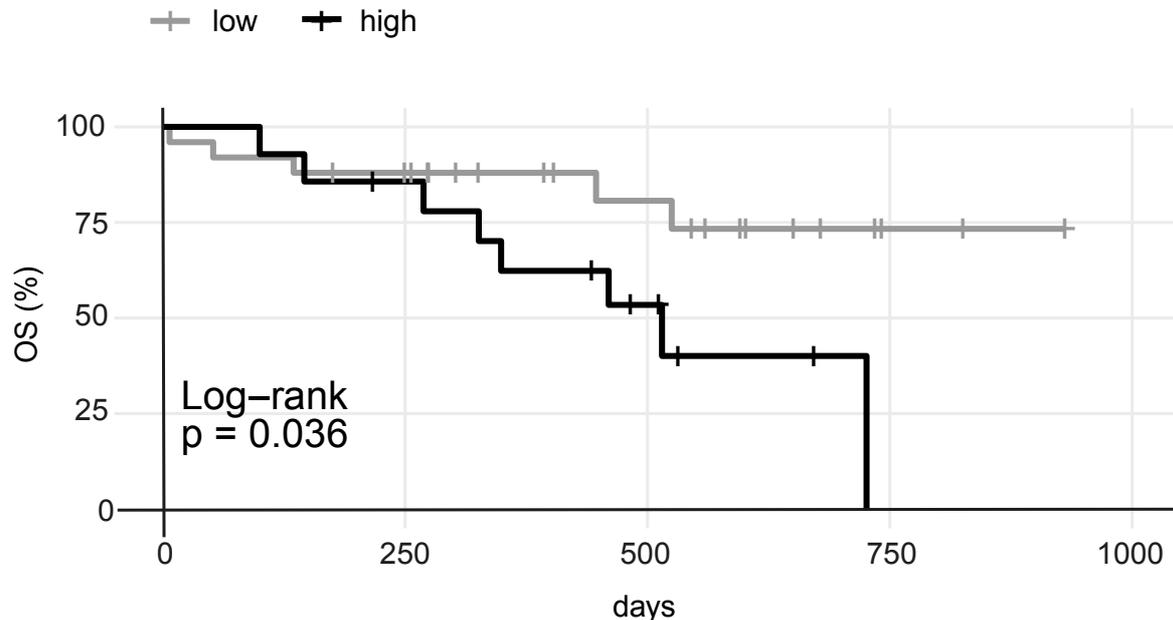
B OS-Analyse: S100A8/A9-C4-Serum-Level

Abbildung 11: Univariate Überlebenszeitanalyse: Korrelation zwischen S100A8/A9-„C4“-Serumspiegeln und progressionsfreiem Überleben bzw. Gesamtüberleben.

A) Für die Melanompatienten der systemischen Analysen sind Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie Überleben dargestellt. Die Patienten wurden nach hohen und niedrigen S100A8/A9-Serumkonzentrationen stratifiziert. Hohe S100A8/A9-Serum-Level vor der vierten Gabe der Immuntherapeutika („C4“) zeigten einen positiven Effekt auf das progressionsfreie Überleben der Patienten. In der PFS-Analyse war die „Number at risk“ an Tag 0 für S100A8/A9-Serumkonzentrationen über 2271 ng/ml 24 Patienten und für Level unter 2271 ng/ml 11 Patienten. **B)** Für die Melanompatienten der systemischen Studie sind Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben dargestellt. Hohe S100A8/A9-Serumkonzentrationen vor der vierten Infusion der Immuntherapeutika („C4“) konnten mit einem verkürzten Gesamtüberleben assoziiert werden. Die „Number at risk“ betrug an Tag 0 in der OS-Analyse für S100A8/A9-Serumkonzentrationen über 3770 ng/ml 14 Patienten und für Level unter 3770 ng/ml 25 Patienten.

Abkürzungen: p: p-Wert, PFS: Progression Free Survival, OS: Overall Survival.

In der Zusammenschau zeigten sich sowohl in der „Baseline“- wie auch in der „C4“-Analyse dieselben gegeneinander gerichteten Effekte von S100A8/A9-Serumkonzentrationen auf die Prognose von Stadium III- und IV-Melanompatienten bezüglich der Endpunkte „progressionsfreies Überleben“ und „Gesamtüberleben“. Das progressionsfreie Überleben wurde bei hohen S100A8/A9-Serumkonzentrationen zu beiden untersuchten Zeitpunkten positiv beeinflusst (siehe **Abbildung 8A und 9A**), wobei jeweils eine Verkürzung des Gesamtüberlebens festgestellt werden konnte (siehe **Abbildung 8B und 9B**).

Ergänzend wurde die absolute Änderung der S100A8/A9-Serum-Level zwischen den beiden Zeitpunkten „Baseline“ und „C4“ errechnet sowie mit der Prognose der Patienten korreliert. In der in **Abbildung 10** dargestellten univariaten Survival-

Analyse wurde die Patientengruppe mit höherer Konzentrationsdifferenz im S100A8/A9-Serum-Level der Patientengruppe mit vergleichsweise geringerer Differenz zwischen den Messzeitpunkten gegenübergestellt. Der errechnete Cut-Off-Wert betrug -1239 ng/ml. Als Endpunkt diente das progressionsfreie Überleben. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen: War das „C4“-Serum-Level deutlich geringer als der Basalwert (C4 minus Baseline=low), führte dies zu einem verlängerten progressionsfreien Überleben ($p=0,047$). Eine analog durchgeführte Analyse mit dem Endpunkt „Gesamtüberleben“ ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Die Kaplan-Meier-Kurve ist im Anhang abgebildet (siehe **Abbildung 1 im Anhang**).

PFS-Analyse: Differenz des S100A8/A9-Serum-Levels zwischen C4 und Baseline

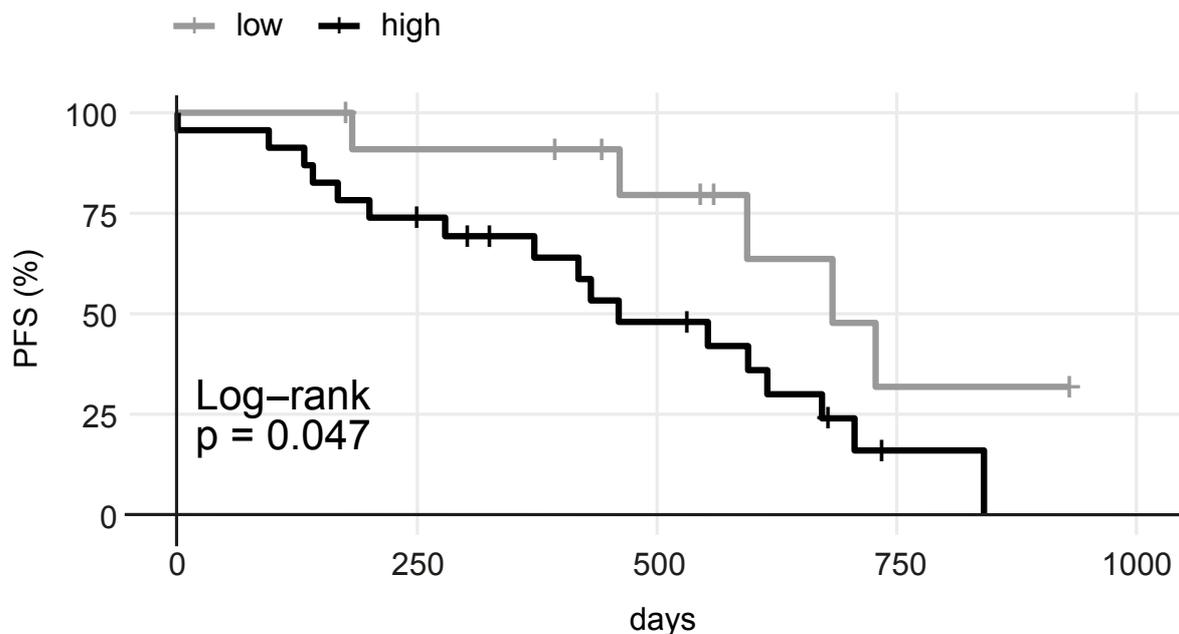


Abbildung 12: Univariate Überlebenszeitanalyse: Korrelation zwischen der absoluten Änderung der S100A8/A9-Serumspiegel zwischen den Zeitpunkten „Baseline“ und „C4“ mit dem progressionsfreien Überleben.

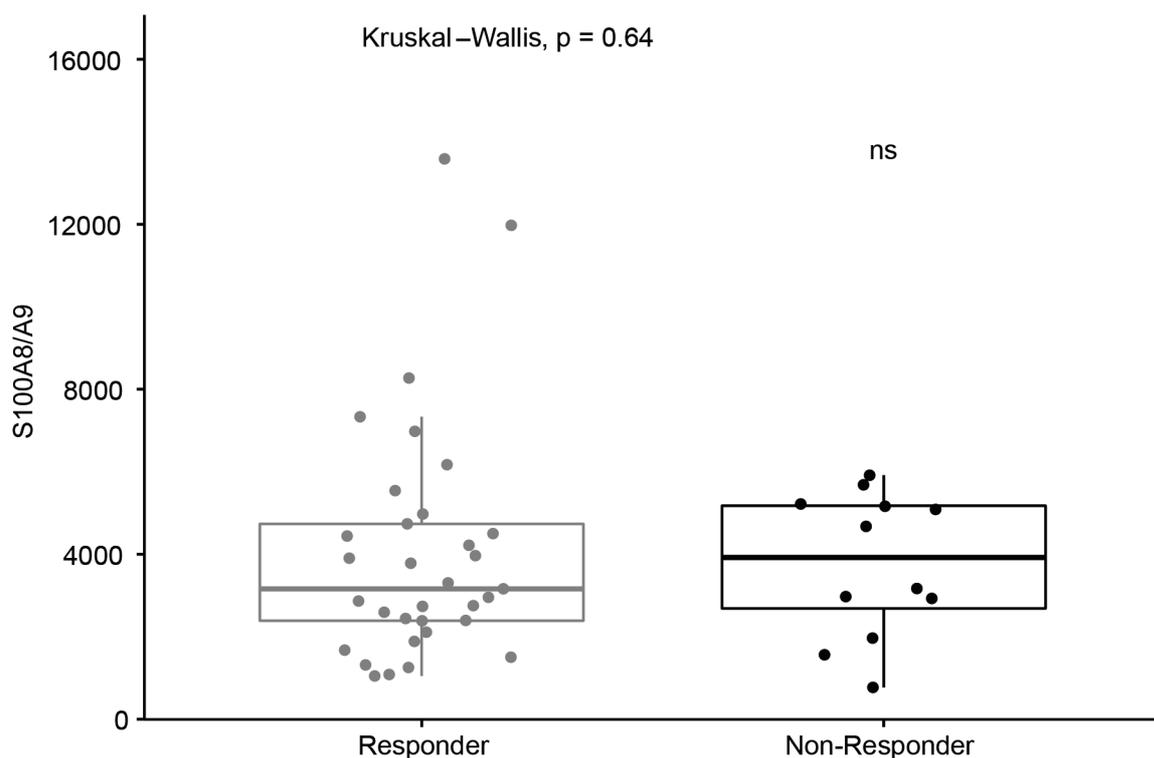
Für die Melanompatienten der systemischen Studie sind Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie Überleben dargestellt. Für eine vergleichsweise höhere Abnahme der S100A8/A9-Serum-Level zwischen Blutentnahme vor Therapiebeginn („Baseline“) und Blutentnahme vor der vierten Gabe der Immuntherapeutika („C4“) zeigte sich ein positiver Effekt auf das progressionsfreie Überleben der Melanompatienten. In der PFS-Analyse war die „Number at risk“ an Tag 0 für die Differenz C4 minus Baseline=low 12 Patienten und für C4 minus Baseline=high 23 Patienten. Abkürzungen: p: p-Wert, PFS: Progression Free Survival.

Eine starke Abnahme des S100A8/A9-Serum-Levels im Verlauf der Therapie wirkte sich somit positiv auf das progressionsfreie Überleben aus.

3.1.1.2 Responder vs. Non-Responder: ANOVA-Analysen und kinetische Analyse

Als letztes wurden die Patienten der systemischen Kohorte aufgrund von Staging-Befunden, jeweils bezogen auf das beste Ansprechen („Best Response“) den Gruppen „Complete Response“ (CR), „Partial Response“ (PR), „Stable Disease“ (SD) und „Progressive Disease“ (PD) zugeordnet (vgl. **Abschnitt 1.2**). Dabei sollten Patienten mit CR, PR und SD („Responder“) getrennt von Patienten mit PD („Non-Responder“) betrachtet werden. Es wurden zunächst für die Zeitpunkte „Baseline“ und „C4“ ANOVA-Analysen angefertigt, um Unterschiede bezüglich der absoluten S100A8/A9-Serumkonzentrationen zwischen Respondern und Non-Respondern zu evaluieren (siehe **Abbildung 11**). Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gezeigt werden.

A ANOVA-Analyse: S100A8/A9-Baseline-Serum-Level Responder vs. Non-Responder



B AVOVA-Analyse: S100A8/A9-C4-Serum-Level
Responder vs. Non-Responder

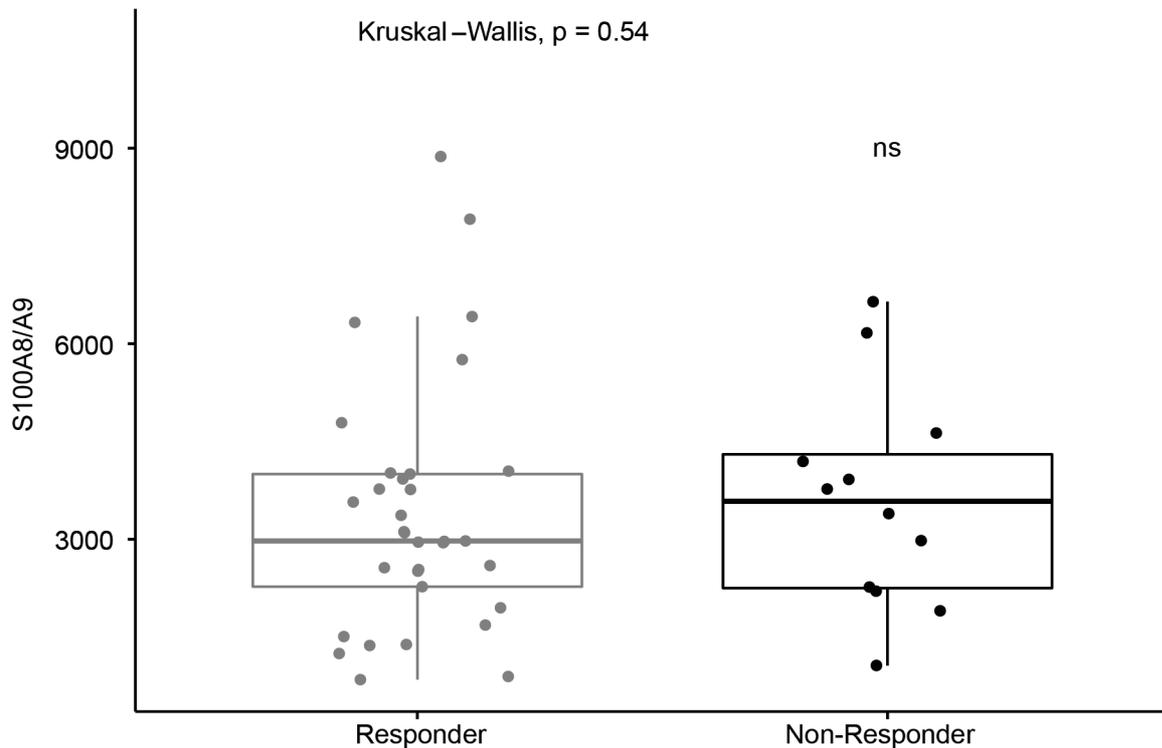


Abbildung 13: ANOVA-Analysen der S100A8/A9-Serumkonzentrationen zum „Baseline“- und „C4“-Zeitpunkt in Respondern (CR,PR,SD) bzw. Non-Respondern (PD).

Dargestellt sind ANOVA-Auswertungen bezüglich der S100A8/A9-Serum-Level (in ng/ml) bei Respondern im Vergleich zu Non-Respondern (Einteilung gemäß des besten Ansprechens = „Best Response“). **A)** Zum Zeitpunkt „Baseline“ zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. **B)** Zum Zeitpunkt „C4“ zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Abkürzungen: p: p-Wert.

Für eine Übersicht über die im Serum gemessenen S100A8/A9-Level sind die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen pro Gruppe (CR, PR, SD, PD) zum Baseline- und C4-Zeitpunkt in **Tabelle 19** aufgelistet. Zusätzlich sind die Level der gebräuchlichen Prognosemarker S100B, LDH sowie CRP angegeben.

Parameter	CR (N=11)	PR (N=16)	SD (N=6)	PD (N=12)	Total (N=45)
S100A8/A9 (BE)					
N	11	16	6	12	45
Mittelwert (SD)	2612.5 (1375.6)	5350.3 (3566.6)	3248.4 (1212.7)	3758.4 (1749.2)	3976.3 (2633.5)
S100A8/A9 (C4)					
N	11	16	6	12	45

Parameter	CR (N=11)	PR (N=16)	SD (N=6)	PD (N=12)	Total (N=45)
Mittelwert (SD)	2831.4 (1395.2)	4052.3 (2230.2)	2663.9 (1329.6)	3594.7 (1675.4)	3446.7 (1832.5)
d.s100a8a9.abs (BE – C4)					
N	11	16	6	12	45
Mittelwert (SD)	218.9 (1533.9)	-1298.0 (3256.1)	-584.5 (1276.5)	-163.7 (1634.6)	-529.6 (2322.5)
S100B (BE)					
N	9	14	5	9	37
Mittelwert (SD)	0.3 (0.4)	1.2 (1.4)	0.3 (0.5)	0.5 (0.6)	0.7 (1.0)
S100B (C4)					
N	10	10	4	11	35
Mittelwert (SD)	0.1 (0.1)	0.5 (0.9)	0.1 (0.1)	0.6 (0.6)	0.4 (0.6)
LDH (BE)					
N	10	15	5	10	40
Mittelwert (SD)	253.7 (40.8)	492.6 (363.4)	332.8 (190.3)	243.1 (31.0)	350.5 (254.8)
LDH (C4)					
N	10	12	4	11	37
Mittelwert (SD)	285.9 (51.2)	362.3 (118.3)	239.0 (50.2)	302.1 (113.2)	310.4 (101.8)
CRP (BE)					
N	10	14	5	10	39
Mittelwert (SD)	5.1 (0.3)	25.4 (33.3)	12.2 (13.4)	8.4 (8.4)	14.2 (22.2)
CRP (C4)					
N	7	10	4	10	31
Mittelwert (SD)	4.6 (1.2)	11.4 (7.7)	3.8 (1.2)	17.1 (13.5)	10.7 (10.1)

Tabelle 19: Systemische Analyse: Deskriptive Parameter – Baseline- und C4-Werte; Best Response.

Abkürzungen: BE: Baseline, C4: Cycle 4, CR: complete response, PR: partial response, SD: stable disease / standard deviation, PD: progressive disease, N: number, d: delta, LDH: Laktatdehydrogenase, CRP: C-reaktives Protein, abs: absolut.

Es wurde sodann eine „kinetische Analyse“ angestellt, in welcher der Anstieg bzw. Abfall der S100A8/A9-Serum-Level zwischen den Zeitpunkten „Baseline“ und „C4“ für jeden einzelnen Patienten grafisch veranschaulicht wurde (siehe **Abbildung 12**). Es erfolgte auch hier die Gruppenzuordnung zu Respondern bzw. Non-Respondern basierend auf dem besten Ansprechen. Dabei war festzustellen, dass die S100A8/A9-Serumkonzentration durchschnittlich zwischen „Baseline“ und „C4“ sank

– sowohl bei Respondern wie auch bei Non-Respondern, wobei sie bei Respondern, von einem initial höheren Ausgangslevel kommend, stärker abfiel.

Kinetische-Analyse: S100A8/A9-Serum-Level
Baseline (BE) und C4 / Responder vs. Non-Responder

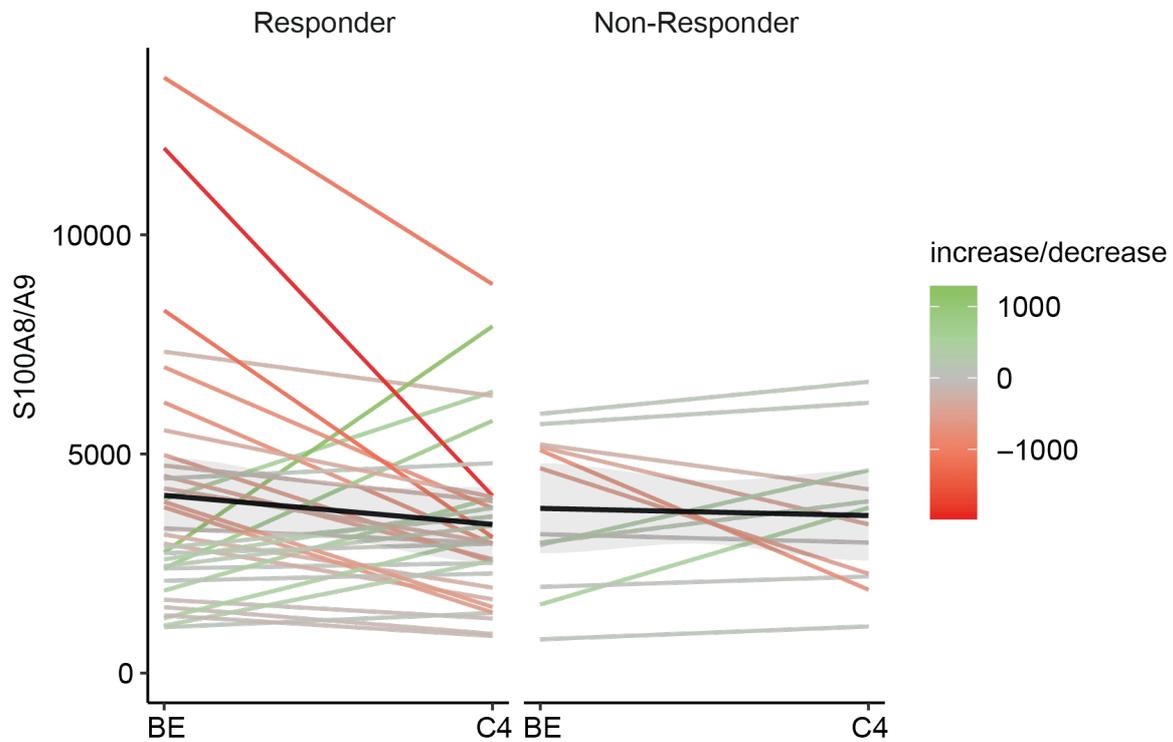


Abbildung 14: Kinetische Analyse der S100A8/A9-Serum-Level zu den Zeitpunkten „Baseline“ und „C4“ unter Aufteilung der Patienten in die Gruppen „Responder“ (CR,PR,SD) und „Non-Responder“ (PD).

Dargestellt ist für jeden einzelnen Patienten die Entwicklung der S100A8/A9-Serumkonzentration zwischen den beiden Zeitpunkten (1 Patient = 1 Linie, Abnahme: rot, Zunahme: grün, Gesamtdurchschnitt: schwarz). Die S100A8/A9-Serumkonzentration sank durchschnittlich zwischen „Baseline“ und „C4“ – sowohl bei Respondern wie auch bei Non-Respondern, wobei sie bei Respondern, von einem initial höheren Ausgangslevel kommend, stärker abfiel.

Abkürzungen: BE: Baseline (Blutentnahme vor Therapiebeginn), C4: Zyklus 4 (Blutentnahme vor der 4. Infusion der ICT), CR,PR,SD: Complete Response, Partial Response, Stable Disease, PD: Progressive Disease.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass bei Respondern die Gabe der Immuntherapeutika durchschnittlich mit einem stärkeren Abfall der S100A8/A9-Serum-Level einherging als bei Non-Respondern.

3.1.2 *Neutrophile Granulozyten*

Als Quellen von DAMPs wie S100A8/A9-Molekülen sind neben Tumorzellen, Myeloid- und anderen Gefäßzellen sowie Monozyten auch neutrophile Granulozyten zu nennen (Kerkhoff et al., 1998, Hessian et al., 1993). Anschließend an die S100A8/A9-Analyse sollte die Serum-Neutrophilenkonzentration, welche bei den Patienten der systemischen Analyse zu den Zeitpunkten „Baseline“ und „C4“ routinemäßig erhoben worden war, miteinbezogen werden, um einen eventuellen Zusammenhang zwischen S100A8/A9 und neutrophilen Granulozyten zu prüfen. Es wurden dazu Überlebenszeitanalysen, ANOVA-Analysen und kinetische Analysen angestellt, sodass die generierten Ergebnisse den für S100A8/A9 aufbereiteten Daten gegenübergestellt werden konnten.

3.1.2.1 *Univariate Survivalanalyse*

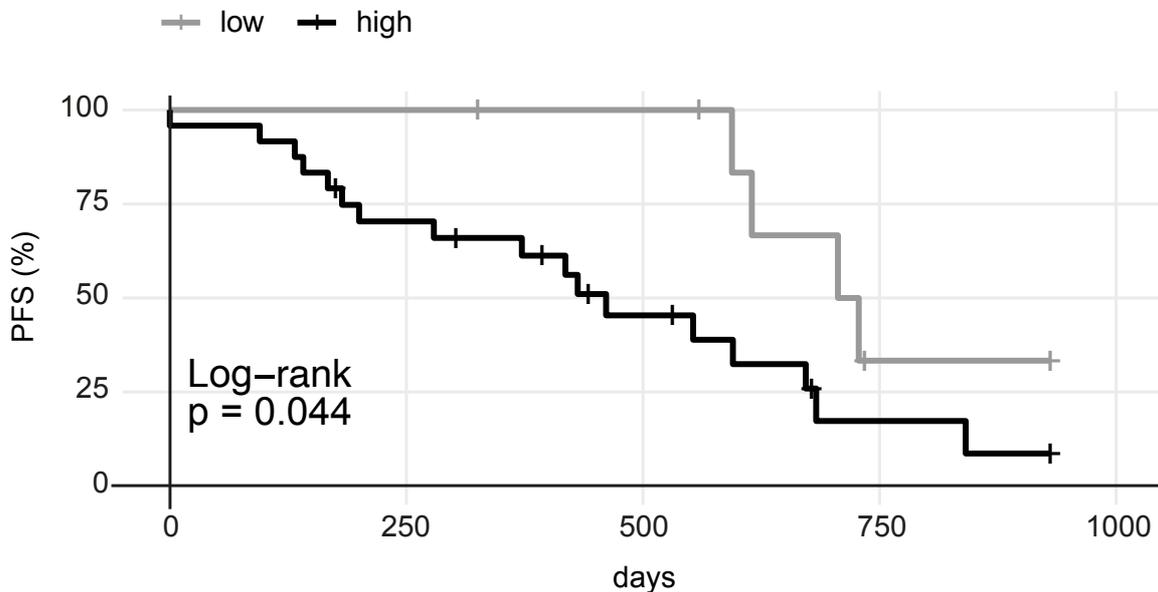
Neutrophile Granulozyten können große Mengen an S100A8/A9 in ihren Granula speichern und sezernieren (Stroncek et al., 2005). Um zu prüfen, ob die Einflüsse von zirkulierenden Neutrophilen und S100A8/A9-Molekülen gleichgerichtet sind, wurden sowohl die Neutrophilenkonzentration vor Immuntherapie („Baseline“), wie auch das Serum-Level vor der vierten Gabe der Therapeutika („C4“) mit der Prognose der Melanompatienten anhand univariater Überlebenszeitanalysen korreliert. Beginnend mit den Datenanalysen auf Basis der „Baseline“-Serumkonzentrationen in **Abbildung 13** sollen die Betrachtungen zu beiden Zeitpunkten im Folgenden dargelegt werden.

Die in **Abbildung 13A** dargestellte Kaplan-Meier-Kurve bezüglich des progressionsfreien Überlebens zeigt, dass Patienten mit hoher „Baseline“-Neutrophilenkonzentration im Vergleich zu Patienten mit niedrigem Basalwert nur ein verkürztes progressionsfreies Überleben erreichten. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war signifikant ($p=0,044$). Der Cut-Off-Wert betrug 4,34/nl für hohe versus niedrige systemische Neutrophilenkonzentrationen vor ICT-Beginn.

Im Gegensatz zur PFS-Analyse erreichten Patienten mit hoher „Baseline“-Neutrophilenkonzentration in der OS-Analyse ein verlängertes Überleben (siehe **Abbildung 13B**). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war hoch

signifikant ($p=0,00097$). Für die dargestellte Survival-Analyse bezüglich des Gesamtüberlebens ergab sich ein Cut-Off-Wert von 3,45/nl.

A PFS-Analyse: Neutrophilen-Baseline-Serum-Level



B OS-Analyse: Neutrophilen-Baseline-Serum-Level

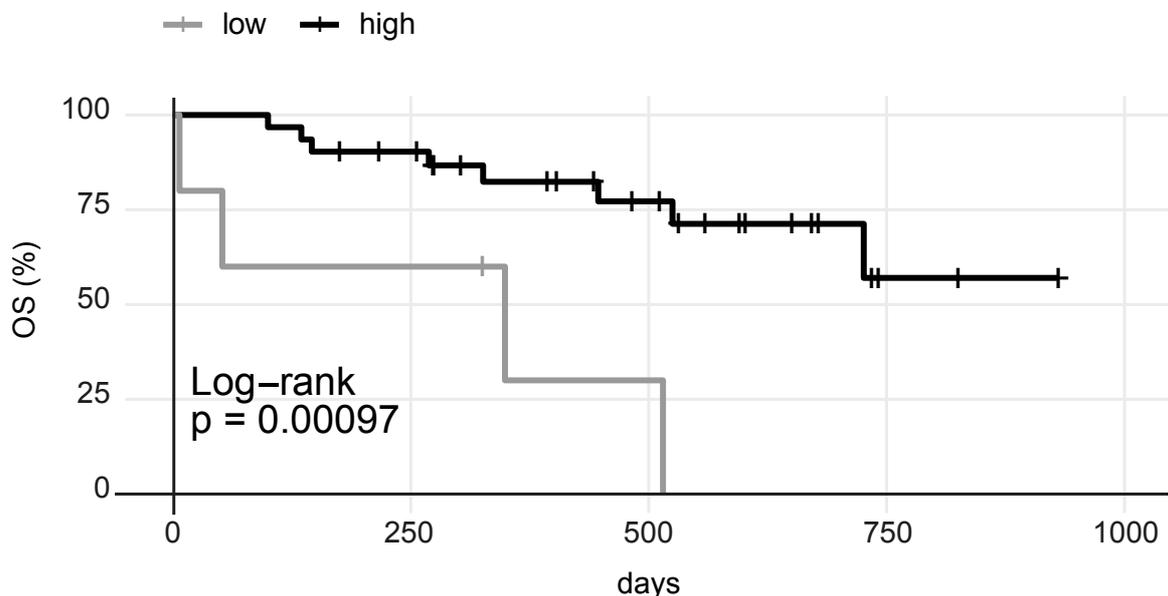


Abbildung 15: Univariate Überlebenszeitanalyse: Korrelation zwischen „Baseline“-Neutrophilen-Serumkonzentrationen und progressionsfreiem Überleben bzw. Gesamtüberleben.

A) Für die Patienten der systemischen Analyse sind Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie Überleben dargestellt. Die Patienten wurden nach hohen und niedrigen Neutrophilenkonzentrationen im Blut stratifiziert. Hohe Neutrophilenkonzentrationen vor ICT-Beginn konnten mit einem verkürzten progressionsfreien Überleben der Patienten assoziiert werden. In der PFS-Analyse war die „Number at risk“ an Tag 0 für hohe Neutrophilenkonzentrationen 24 Patienten und für niedrige 8 Patienten. **B)** Für die Patienten der systemischen Studie sind Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben dargestellt. Hohe Neutrophilenkonzentrationen vor ICT-Beginn konnten mit einem verlängerten

Gesamtüberleben der Patienten assoziiert werden. Die „Number at risk“ betrug in der OS-Analyse an Tag 0 für hohe Neutrophilen-Level 31 Patienten und für niedrige Level 5 Patienten.
Abkürzungen: p: p-Wert, N: PFS: Progression Free Survival, OS: Overall Survival.

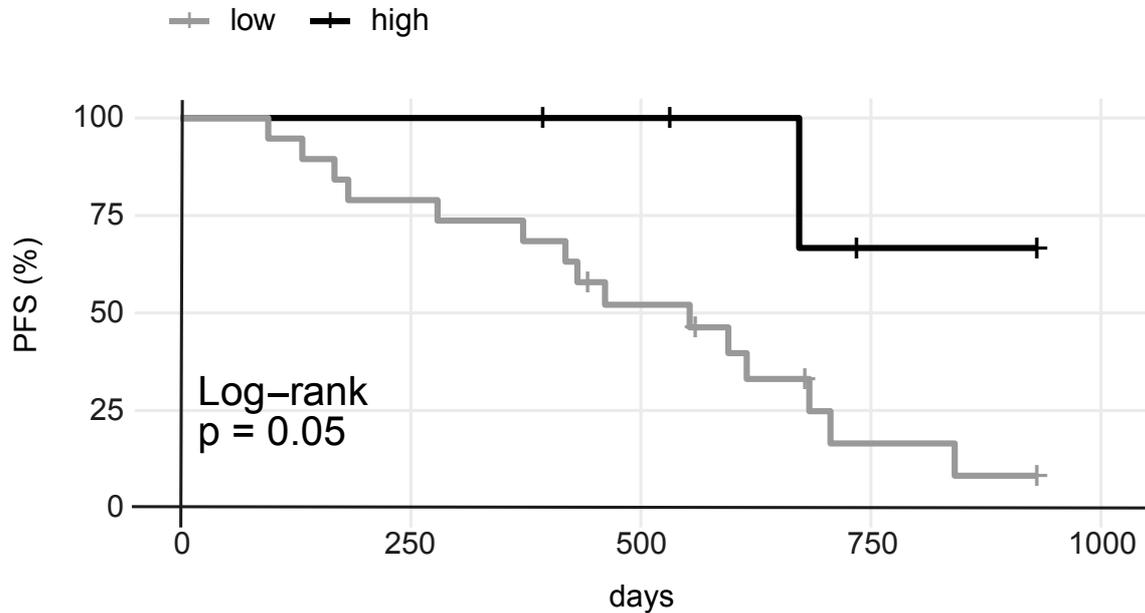
Es lässt sich zusammenfassend konstatieren, dass hohe Neutrophilenkonzentrationen im Serum zum Zeitpunkt „Baseline“ zwar mit einem verkürzten progressionsfreien Überleben (siehe **Abbildung 13A**), jedoch mit einem verlängerten Gesamtüberleben (siehe **Abbildung 13B**) assoziiert werden konnten.

Die anschließende Auswertung der Neutrophilen-„C4“-Serum-Level mittels Survival-Analysen ergab weder bezüglich des progressionsfreien Überlebens noch hinsichtlich des Gesamtüberlebens einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen mit hohen bzw. niedrigen Neutrophilen-„C4“-Serumkonzentrationen. Die zugehörigen Kaplan-Meier-Kurven sind im Anhang abgebildet (siehe **Abbildung 2 im Anhang**).

Zusätzlich wurde die absolute Änderung der Neutrophilen-Serum-Level zwischen den beiden Zeitpunkten „Baseline“ und „C4“ errechnet sowie mit der Prognose der Patienten korreliert. In der Analyse aus **Abbildung 14A** war der Endpunkt das progressionsfreie Überleben. Die Unterschiede zwischen den definierten Gruppen waren knapp nicht signifikant (Cut-Off 2,56/nl, $p=0,05$). Es lassen sich lediglich Tendenzen vermuten: War das „C4“-Serum-Level deutlich höher als der Basalwert (C4 minus Baseline = high), so wurde ein verlängertes progressionsfreies Überleben beobachtet. Die Patientengruppe mit einer Abnahme, einem unverändertem Serum-Level oder einer geringen Zunahme im Neutrophilen-Serum-Level (C4 minus Baseline = low), erreichte nur ein verkürztes PFS.

In der in **Abbildung 14B** dargestellten univariaten Survival-Analyse diente als Endpunkt das Gesamtüberleben. Wenn das „C4“-Serum-Level der Melanompatienten deutlich geringer war als der Basalwert (C4 minus Baseline=low), zeigte sich ein verlängertes OS (Cut-Off-Wert -1,75/nl, $p=0,047$). Die Gruppe mit geringer Abnahme, unverändertem Serum-Level oder einer Zunahme der Neutrophilenkonzentration (C4 minus Baseline=high) erreichte hingegen nur ein verkürztes Gesamtüberleben.

A PFS-Analyse: Differenz des Neutrophilen-Serum-Levels zwischen C4 und Baseline



B OS-Analyse: Differenz des Neutrophilen-Serum-Levels zwischen C4 und Baseline

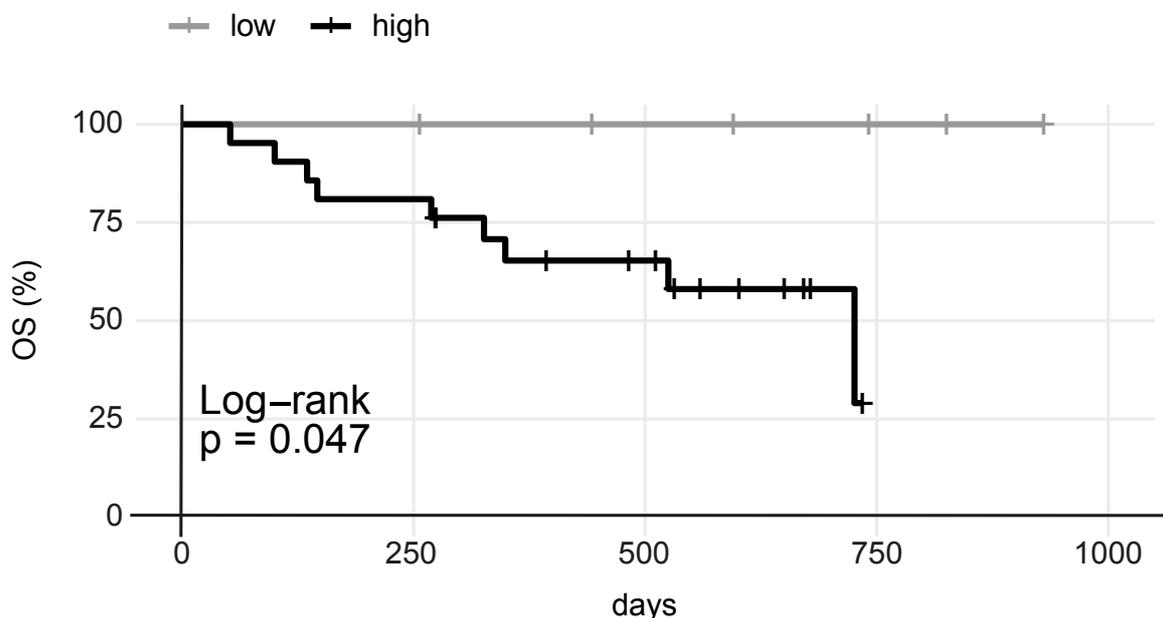


Abbildung 16: Univariate Überlebenszeitanalyse: Korrelation zwischen der absoluten Änderung der Neutrophilen-Serumspiegel zwischen den Zeitpunkten „Baseline“ und „C4“ mit dem progressionsfreien Überleben bzw. Gesamtüberleben.

A) Für die Melanompatienten der systemischen Studie sind Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie Überleben dargestellt. Für eine Abnahme, ein unverändertes Serum-Level oder eine geringe Zunahme der Neutrophilen-Serum-Level zwischen dem Zeitpunkt vor Therapiebeginn („Baseline“) und vor der vierten Gabe der Immuntherapeutika („C4“) zeigte sich ein negativer Effekt auf das progressionsfreie Überleben der Melanompatienten. In der PFS-Analyse war die „Number at risk“ an Tag 0 für die Differenz C4 minus Baseline=low 19 Patienten und für C4 minus Baseline=high 5 Patienten. **B)** Für die Melanompatienten der systemischen Studie sind Kaplan-Meier-Kurven für das

Gesamtüberleben dargestellt. Eine geringe Abnahme, ein unverändertes Serum-Level oder eine Zunahme der Neutrophilen-Serum-Level zwischen dem Zeitpunkt vor Therapiebeginn („Baseline“) und vor der vierten Gabe der Immuntherapeutika („C4“) hatte einen negativen Effekt auf das Gesamtüberleben der Melanompatienten. In der OS-Analyse war die „Number at risk“ an Tag 0 für die Differenz C4 minus Baseline=low 6 Patienten und für C4 minus Baseline=high 21 Patienten. Abkürzungen: p: p-Wert, PFS: Progression Free Survival, OS: Overall Survival.

Zusammenfassend wurde eine starke Zunahme der Neutrophilen-Serum-Level im Therapieverlauf mit einem späteren Krankheitsprogress in Verbindung gebracht. Eine starke Abnahme der Neutrophilen-Serumkonzentration konnte mit einem verlängerten Gesamtüberleben assoziiert werden. Daraus geht eine positive Wirkung hoher Neutrophilen-Level auf das progressionsfreie Überleben und eine negative Wirkung hoher Neutrophilenkonzentrationen auf das Gesamtüberleben hervor.

Überdies zeigte sich in einer Korrelation des Neutrophilen-Serumgradienten (C4 minus Baseline) mit dem Gesamtüberleben, dass ein Anstieg der Neutrophilenkonzentration zwischen „Baseline“ und „C4“ mit einem verkürzten Überleben einherging (siehe **Abbildung 15**). Es handelte sich um eine signifikante moderate negative Korrelation ($R=-0,4$; $p=0,037$). Dieses Ergebnis ist kongruent mit dem protumoralen Einfluss von Neutrophilen, welcher in den **Abbildungen 13A und 14B** ersichtlich ist.

Pearson-Korrelation: Differenz des Neutrophilen-Serum-Levels zwischen C4 und Baseline versus Überleben

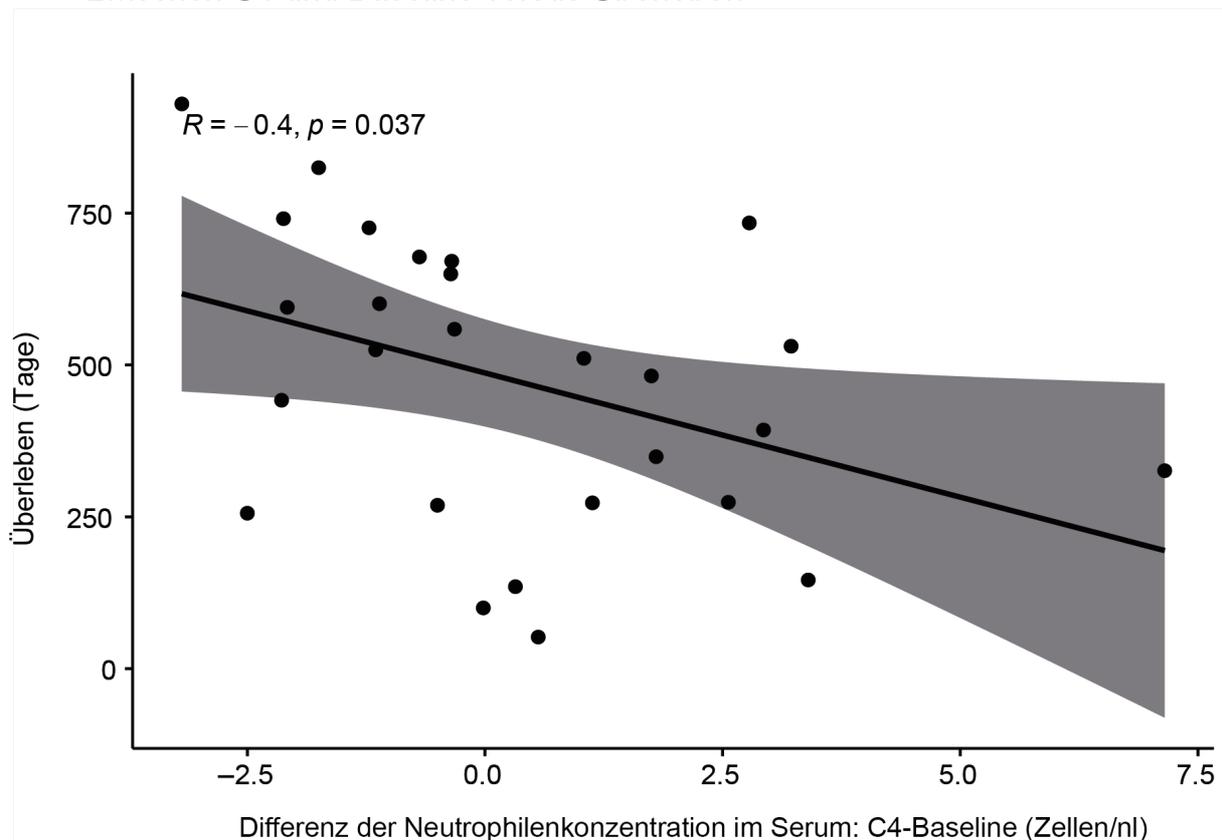
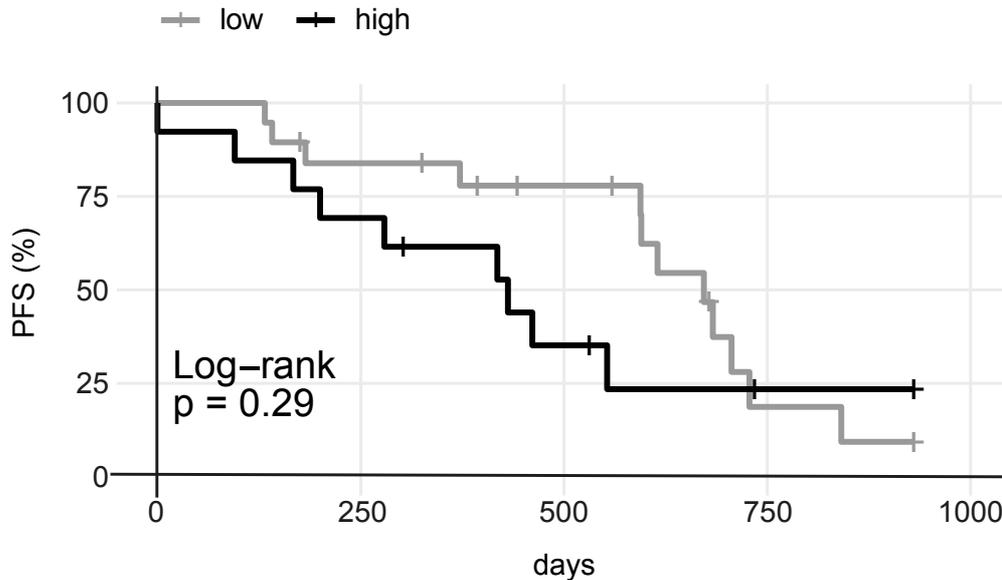
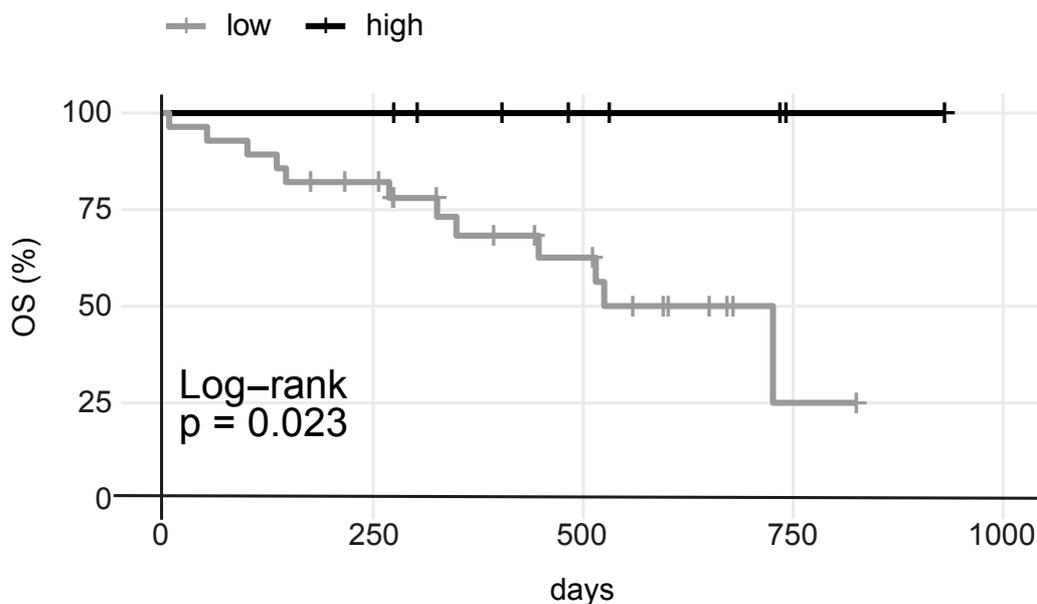


Abbildung 17: Pearson-Korrelation zwischen dem Neutrophilen-Serumgradienten (C4 minus Baseline) und dem Überleben der Melanompatienten.

In der Grafik sieht man, dass eine Zunahme des Neutrophilen-Serum-Levels zwischen Baseline und C4, welche einer positiven Differenz zwischen C4 und Baseline entspricht, mit einem reduzierten Überleben assoziiert werden konnte.

Abkürzungen: R: Rangkorrelationskoeffizient (Pearson-Korrelationskoeffizient), p: p-Wert.

Im Weiteren wurde für den Zeitpunkt „Baseline“ der Anteil Neutrophiler an den Leukozyten herangezogen. Die Serum-Gesamtleukozyten-Konzentrationen waren ebenfalls routinemäßig bei Blutentnahmen erhoben worden. Aus der Survival-Analyse bezüglich des progressionsfreien Überlebens in **Abbildung 16A** geht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe mit hohem und derjenigen mit geringem Neutrophilen/Leukozyten-Verhältnis hervor (Cut-Off-Wert: 0,68, $p > 0,05$). In **Abbildung 16B** ist eine univariate Überlebenszeitanalyse mit dem Endpunkt „Gesamtüberleben“ dargestellt. Die Patientengruppe mit hoher Neutrophilen/Leukozyten-Ratio erreichte ein signifikant längeres Gesamtüberleben im Vergleich zur Patientengruppe mit niedriger Neutrophilen/Leukozyten-Ratio (Cut-Off-Wert: 0,71; $p = 0,023$).

A PFS-Analyse: Baseline-Neutrophilen/Leukozyten-Ratio im Serum**B** OS-Analyse: Baseline-Neutrophilen/Leukozyten-Ratio im Serum**Abbildung 18: Univariate Überlebenszeitanalyse: Korrelation zwischen „Baseline“-Neutrophilen/Leukozyten-Verhältnis im Serum und progressionsfreiem Überleben bzw. Gesamtüberleben.**

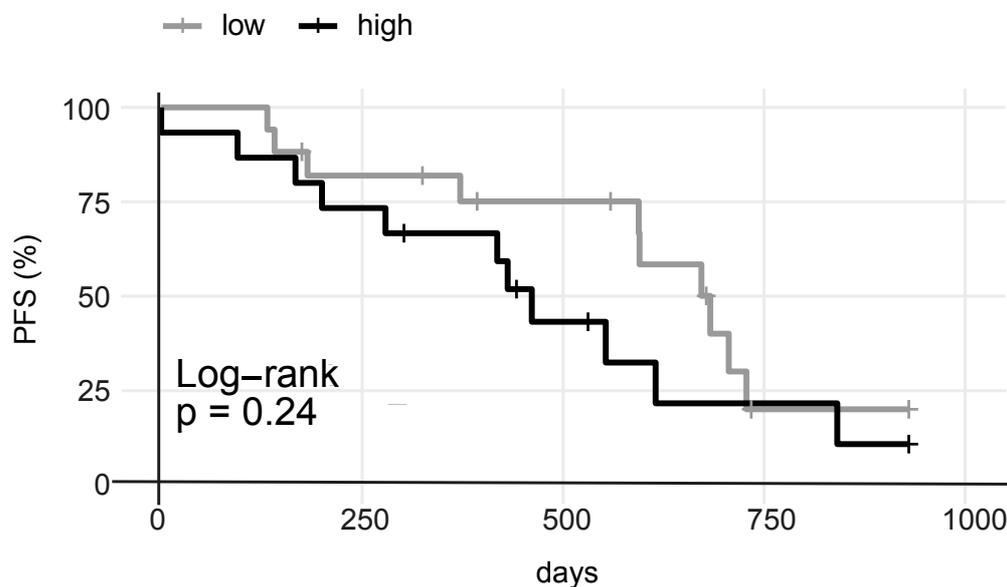
A) Für die Patienten der systemischen Analyse sind Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie Überleben dargestellt. Aus der Analyse bezüglich des progressionsfreien Überlebens ging kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Patientengruppe mit hoher und derjenigen mit niedriger Neutrophilen/Leukozyten-Ratio hervor. In der PFS-Analyse war die „Number at risk“ an Tag 0 für hohe Neutrophilen/Leukozyten-Quotienten 13 Patienten und für niedrige 19 Patienten. **B)** Für die Melanompatienten der systemischen Studie sind Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben dargestellt. Ein hoher Anteil von Neutrophilen an der Leukozytenkonzentration im Serum vor ICT-Beginn („Baseline“) zeigte einen positiven Effekt auf das Gesamtüberleben der Patienten. In der OS-Analyse war die „Number at risk“ an Tag 0 für Neutrophilen/Leukozyten-Ratios im Serum über 0,71/nl 8 Patienten und für Ratios unter 0,71/nl 28 Patienten.

Abkürzungen: p: p-Wert, PFS: Progression-Free Survival, OS: Overall Survival.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass ein hoher Anteil Neutrophiler an den Gesamtleukozyten zum Zeitpunkt „Baseline“ einen antitumoralen Effekt besaß, da das Gesamtüberleben der Patienten mit hoher Neutrophilen/Leukozyten-Ratio verlängert war. Dieses Ergebnis ist deckungsgleich mit dem in **Abbildung 13B** gezeigten positiven Effekt einer hohen „Baseline“-Neutrophilenkonzentration auf das Gesamtüberleben.

Zudem wurde die Neutrophilen/Lymphozyten-Ratio (NLR) zu beiden Messzeitpunkten betrachtet. Die Serum-Gesamtlymphozyten-Konzentrationen der Patienten wurden in den Routine-Blutuntersuchungen bestimmt. Aus der PFS-Analyse in **Abbildung 17A** geht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den definierten Gruppen hervor (Cut-Off-Wert: 3,19, $p > 0,05$). In **Abbildung 17B** ist die dazugehörige OS-Analyse dargestellt. Die Patientengruppe mit hoher NLR erreichte ein signifikant längeres Gesamtüberleben im Vergleich zur Patientengruppe mit niedriger NLR (Cut-Off-Wert: 3,58; $p = 0,019$).

A PFS-Analyse: Baseline-Neutrophilen/Lymphozyten-Ratio im Serum



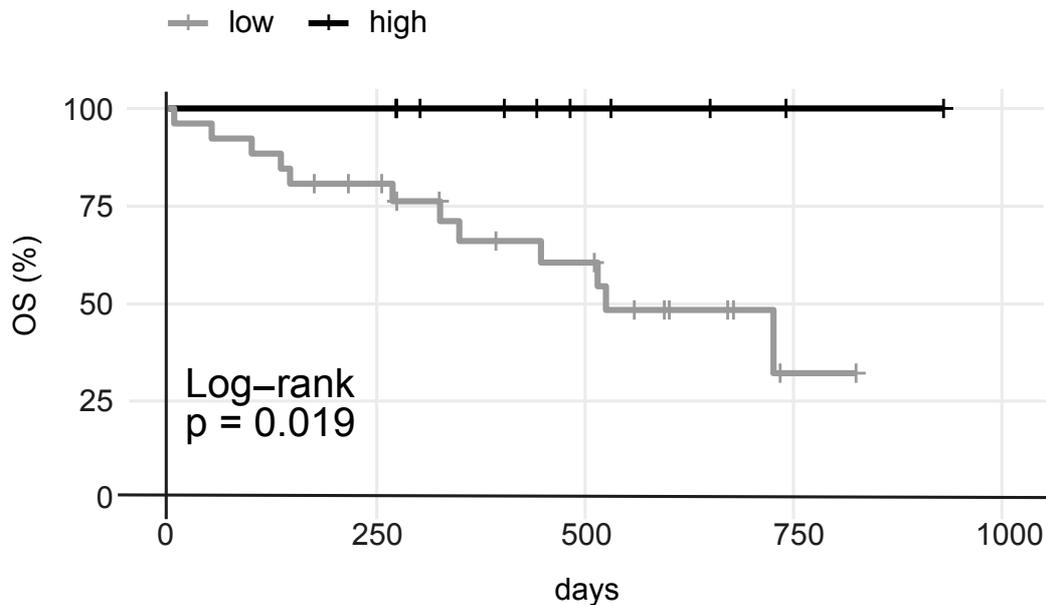
B OS-Analyse: Baseline-Neutrophilen/Lymphozyten-Ratio im Serum

Abbildung 19: Univariate Überlebenszeitanalyse: Korrelation zwischen „Baseline“-Neutrophilen/Lymphozyten-Ratio (NLR) im Serum und progressionsfreiem Überleben bzw. Gesamtüberleben.

A) Für die Patienten der systemischen Analyse sind Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie Überleben dargestellt. Aus der Analyse bezüglich des progressionsfreien Überlebens ging kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Patientengruppe mit hoher und derjenigen mit niedriger NLR hervor. In der PFS-Analyse war die „Number at risk“ an Tag 0 für hohe Neutrophilen-Lymphozyten-Quotienten 15 Patienten und für niedrige 17 Patienten. **B)** Für die Patienten der systemischen Studie sind Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben dargestellt. Eine hohe NLR im Serum vor ICT-Beginn („Baseline“) zeigte einen positiven Effekt auf das Gesamtüberleben der Melanompatienten. In der OS-Analyse war die „Number at risk“ an Tag 0 für hohe Neutrophilen/Lymphozyten-Ratios im Serum 10 Patienten und für niedrige Ratios 26 Patienten. Abkürzungen: p: p-Wert, PFS: Progression-Free Survival, OS: Overall Survival.

Zusammenfassend soll das Ergebnis herausgestellt werden, dass Patienten mit einer hohen NLR zum Zeitpunkt „Baseline“ ein verlängertes Gesamtüberleben erreichten. Dieses Ergebnis ist kongruent mit den in **Abbildung 13B und 16B** gezeigten positiven Effekten von hohen „Baseline“-Neutrophilenkonzentration auf das Gesamtüberleben.

Als letztes wurde die absolute Änderung der NLR im Serum zwischen den beiden Zeitpunkten „Baseline“ und „C4“ errechnet und mit der Prognose der Melanompatienten korreliert. Die PFS-Analyse lieferte keine signifikanten Ergebnisse und ist nicht abgebildet. In der Analyse in **Abbildung 18** war der Endpunkt das Gesamtüberleben. Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den definierten Gruppen (Cut-Off-Wert: $-0,77/\text{nl}$; $p=0,022$): War die NLR bei „C4“ deutlich

höher als der Basalwert (C4 minus Baseline=high), resultierte ein verkürztes Gesamtüberleben.

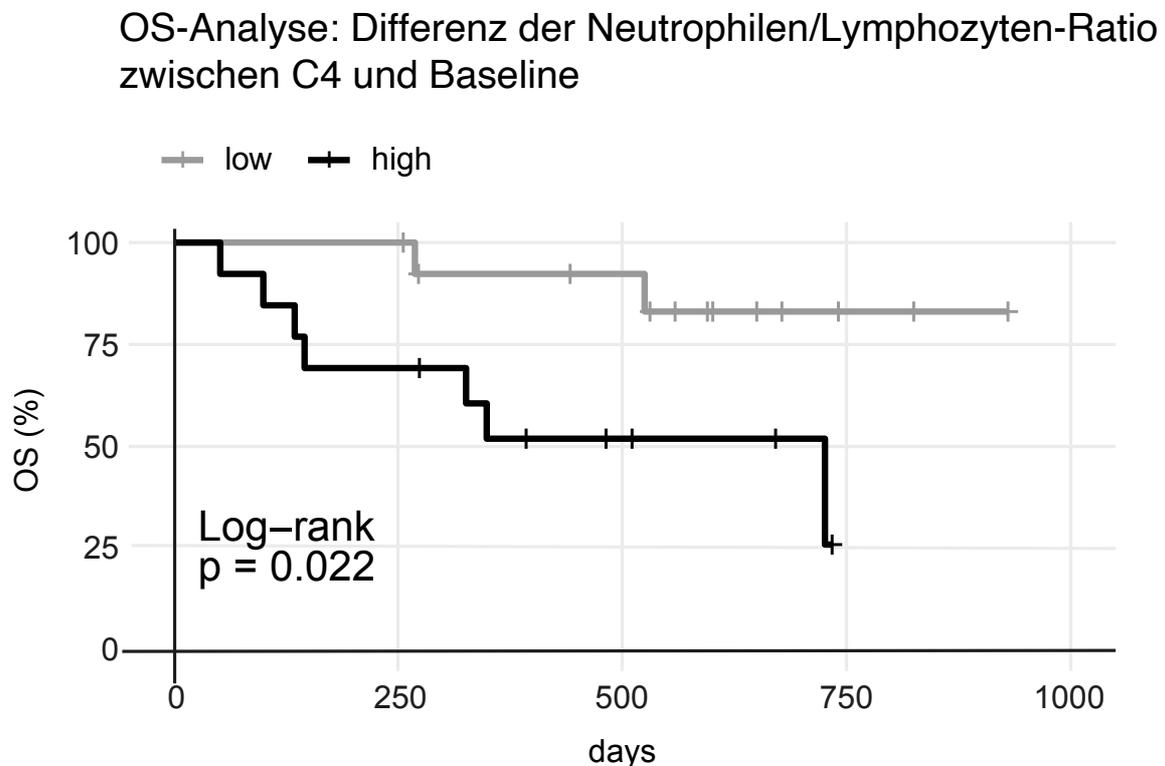


Abbildung 20: Univariate Überlebenszeitanalyse: Korrelation zwischen der absoluten Änderung der Neutrophilen/Lymphozyten-Ratio (NLR) im Serum zwischen den Zeitpunkten „Baseline“ und „C4“ mit dem Gesamtüberleben.

Für die Patienten der systemischen Studie sind Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben dargestellt. Für eine Zunahme, ein unverändertes Serum-Level oder eine geringe Abnahme der NLR zum Zeitpunkt vor Therapiebeginn („Baseline“) und vor der vierten Gabe der Immuntherapeutika („C4“) zeigte sich ein negativer Effekt auf das Gesamtüberleben der Melanompatienten. Die „Number at risk“ an Tag 0 war für die Differenz C4 minus Baseline=low 14 Patienten und für C4 minus Baseline=high 13 Patienten.

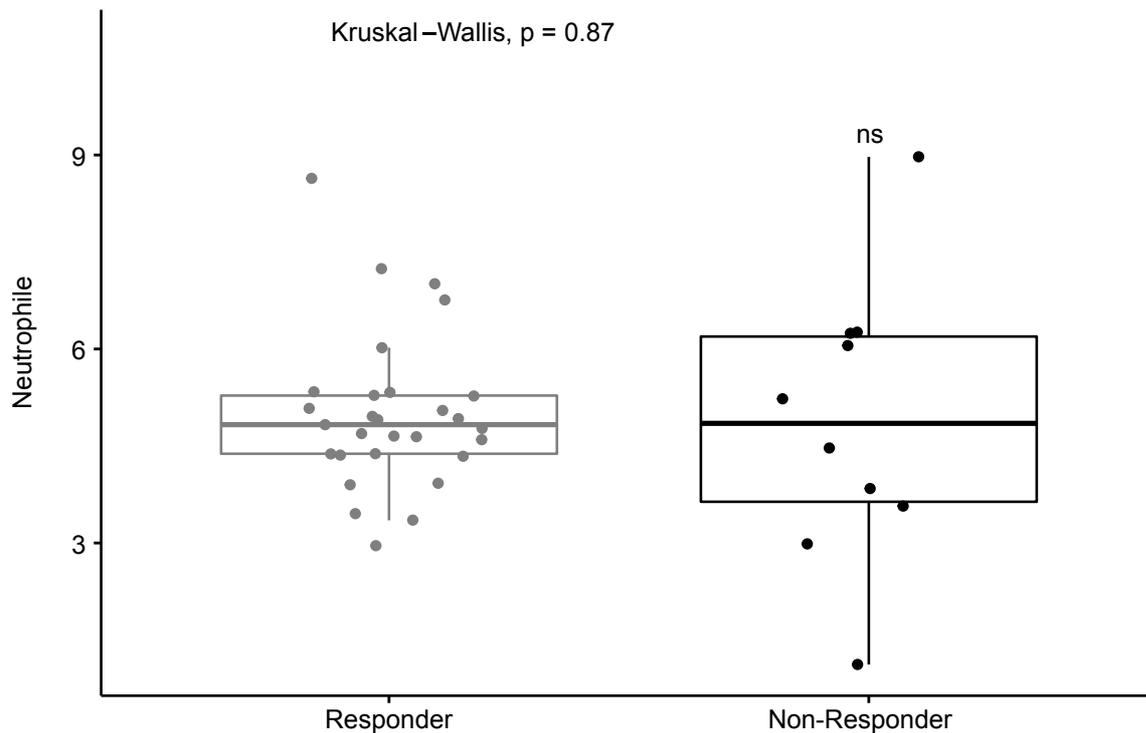
Abkürzungen: p: p-Wert, OS: Overall Survival.

Zusammenfassend konnte ein ungünstiger Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten festgestellt werden, wenn sie zum Messzeitpunkt „C4“ eine höhere NLR aufwiesen als vor Therapiebeginn. Dieses Ergebnis stimmt nicht mit dem Resultat aus **Abbildung 17B** überein, denn hier wurde eine hohe NLR zum Zeitpunkt „Baseline“ mit einem verlängerten Gesamtüberleben der Melanompatienten assoziiert.

3.1.2.2 Responder vs. Non-Responder: ANOVA-Analysen und kinetische Analyse

Die Patienten der systemischen Kohorte wurden für die folgenden Analysen, wie oben beschrieben, basierend auf dem besten ICT-Ansprechen den Gruppen „Complete Response“ (CR), „Partial Response“ (PR), „Stable Disease“ (SD) und „Progressive Disease“ (PD) zugeordnet (vgl. **Abschnitt 1.2 und 3.1.1.1**). Patienten mit CR, PR und SD („Responder“) sollten getrennt von Patienten mit PD („Non-Responder“) betrachtet werden. Es wurden zunächst für die Zeitpunkte „Baseline“ und „C4“ ANOVA-Analysen angefertigt, um Unterschiede bezüglich der absoluten Neutrophilen-Serumkonzentrationen zwischen Respondern und Non-Respondern zu evaluieren (siehe **Abbildung 19**). Es konnten jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gezeigt werden.

A ANOVA-Analyse: Neutrophilen-Baseline-Serum-Level Responder vs. Non-Responder



B AVOVA-Analyse: Neutrophilen-C4-Serum-Level
Responder vs. Non-Responder

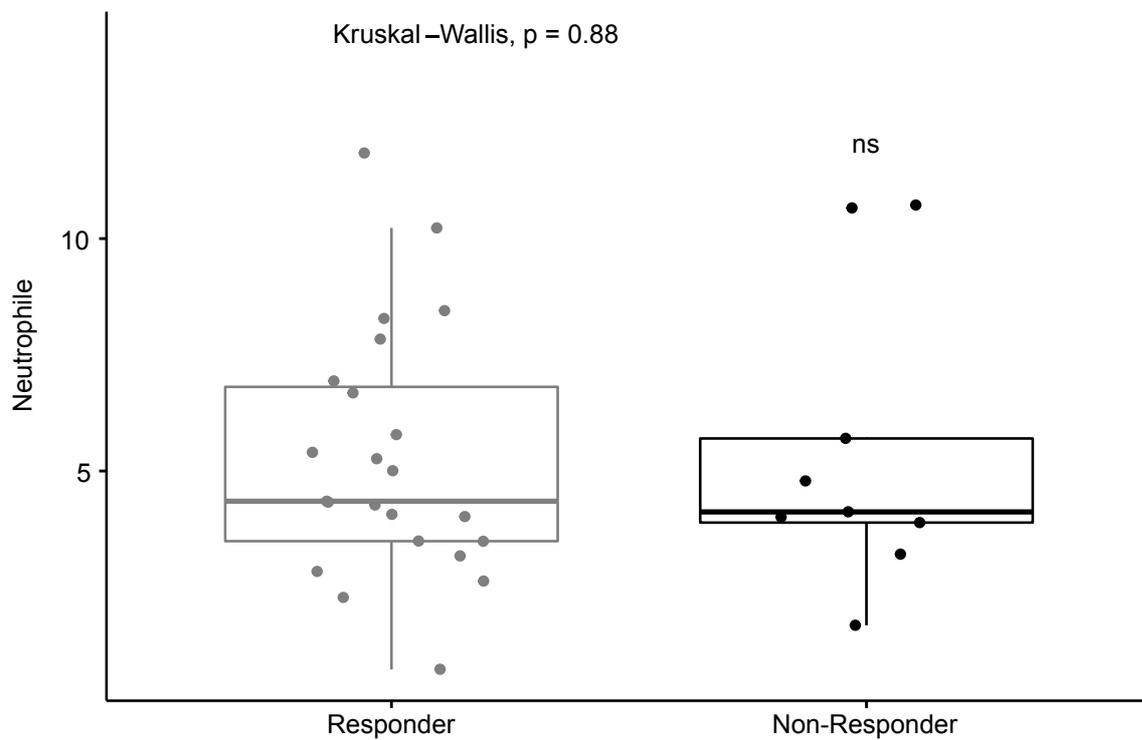


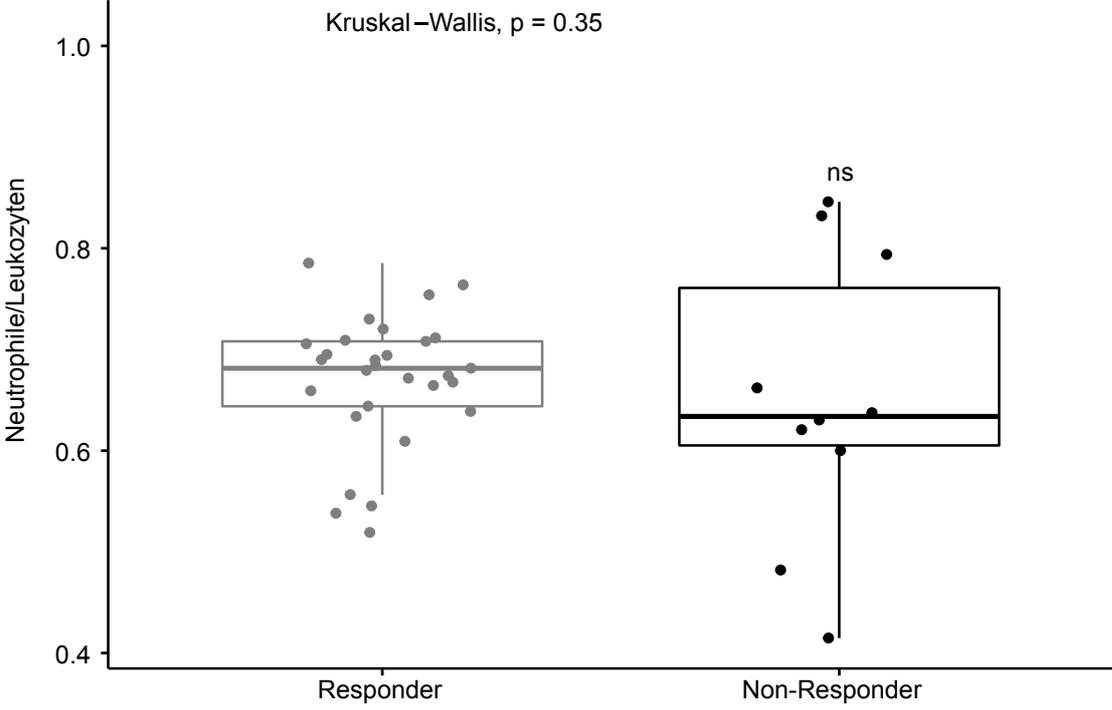
Abbildung 21: ANOVA-Analysen der Neutrophilen-Serumkonzentrationen zum „Baseline“- und „C4“-Zeitpunkt in Respondern (CR,PR,SD) bzw. Non-Respondern (PD).

Dargestellt sind ANOVA-Auswertungen bezüglich der Neutrophilen-Serum-Level bei Respondern im Vergleich zu Non-Respondern. **A)** Zum Zeitpunkt „Baseline“ zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. **B)** Zum Zeitpunkt „C4“ zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Abkürzungen: p: p-Wert.

Überdies wurden Unterschiede bezüglich der Neutrophilen/Leukozyten-Ratio im Serum zwischen Respondern und Non-Respondern zu beiden Zeitpunkten mittels ANOVA-Analysen untersucht (siehe **Abbildung 20**). Auch hier konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gezeigt werden.

A AVOVA-Analyse: Baseline-Neutrophilen/Leukozyten-Ratio
Responder vs. Non-Responder



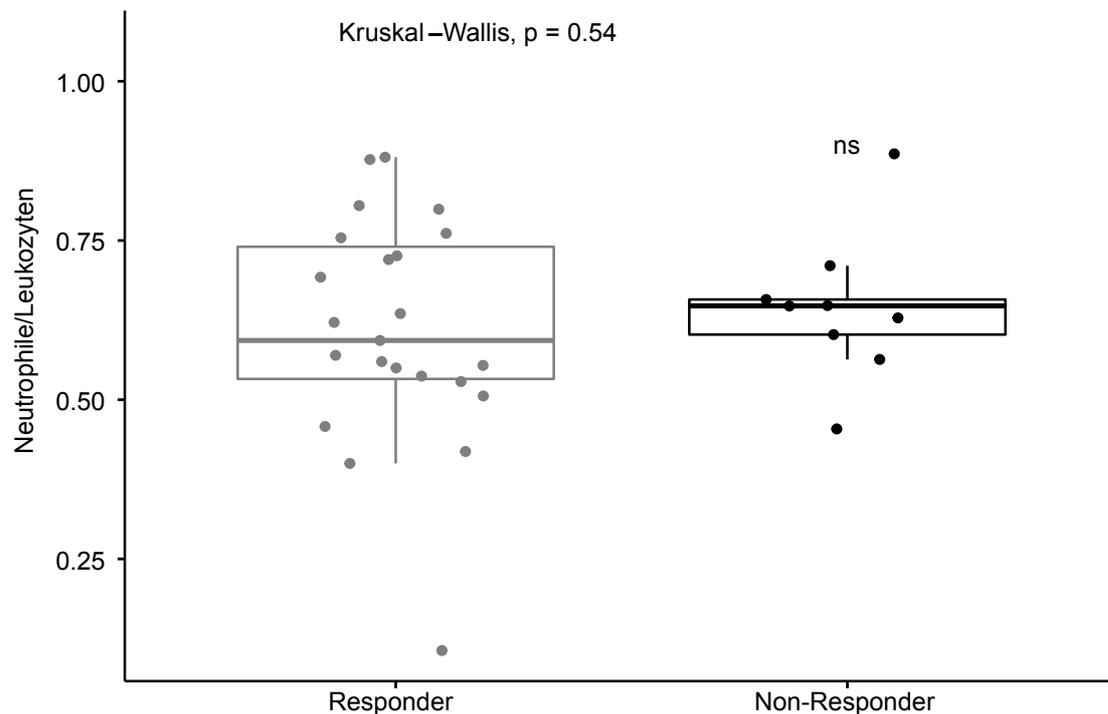
B AVOVA-Analyse: C4-Neutrophilen/Leukozyten-Ratio
Responder vs. Non-Responder

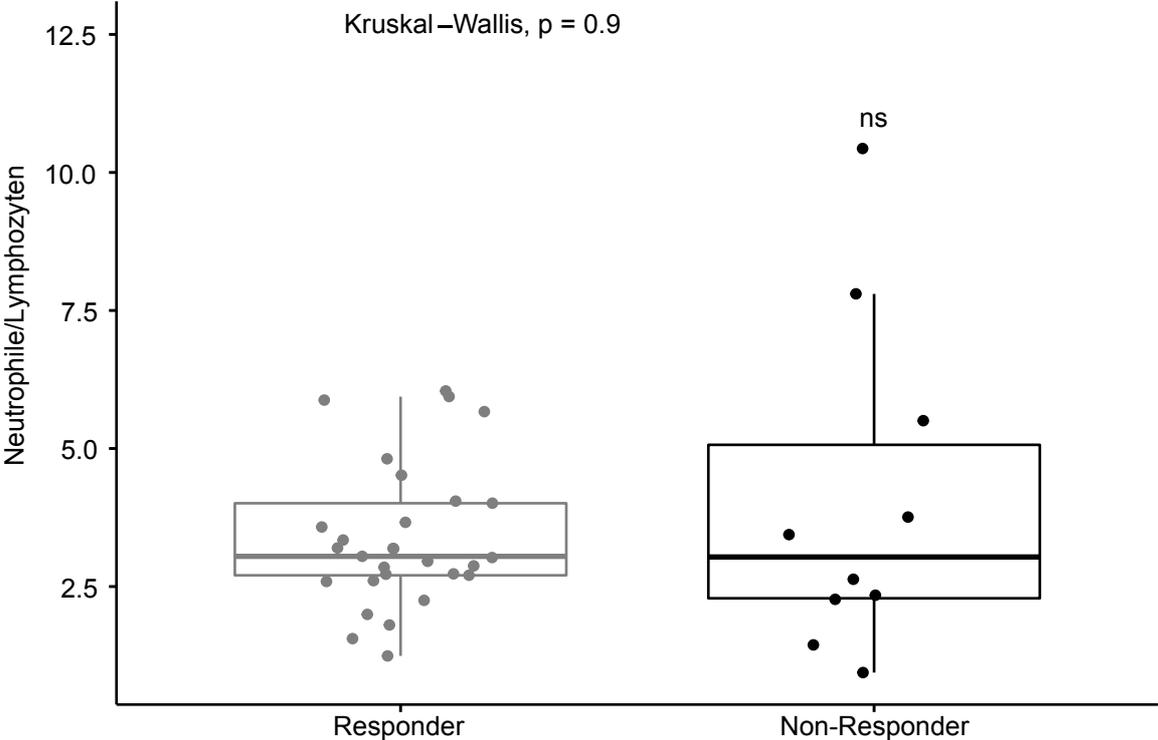
Abbildung 22: ANOVA-Analysen der Neutrophilen/Leukozyten-Ratio im Serum zum „Baseline“- und „C4“-Zeitpunkt in Respondern (CR,PR,SD) bzw. Non-Respondern (PD).

Dargestellt sind ANOVA-Auswertungen bezüglich der Neutrophilen/Leukozyten-Ratio bei Respondern im Vergleich zu Non-Respondern. **A)** Zum Zeitpunkt „Baseline“ zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. **B)** Zum Zeitpunkt „C4“ zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Abkürzungen: p: p-Wert.

Als Nächstes wurde die Neutrophilen/Lymphozyten-Ratio (NLR) im Serum zwischen Respondern und Non-Respondern zu den zwei Zeitpunkten mithilfe von ANOVA-Analysen verglichen (siehe **Abbildung 21**). Wiederum ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

A AVOVA-Analyse: Baseline-Neutrophilen/Lymphozyten-Ratio
Responder vs. Non-Responder



B AVOVA-Analyse: C4-Neutrophilen/Lymphozyten-Ratio
Responder vs. Non-Responder

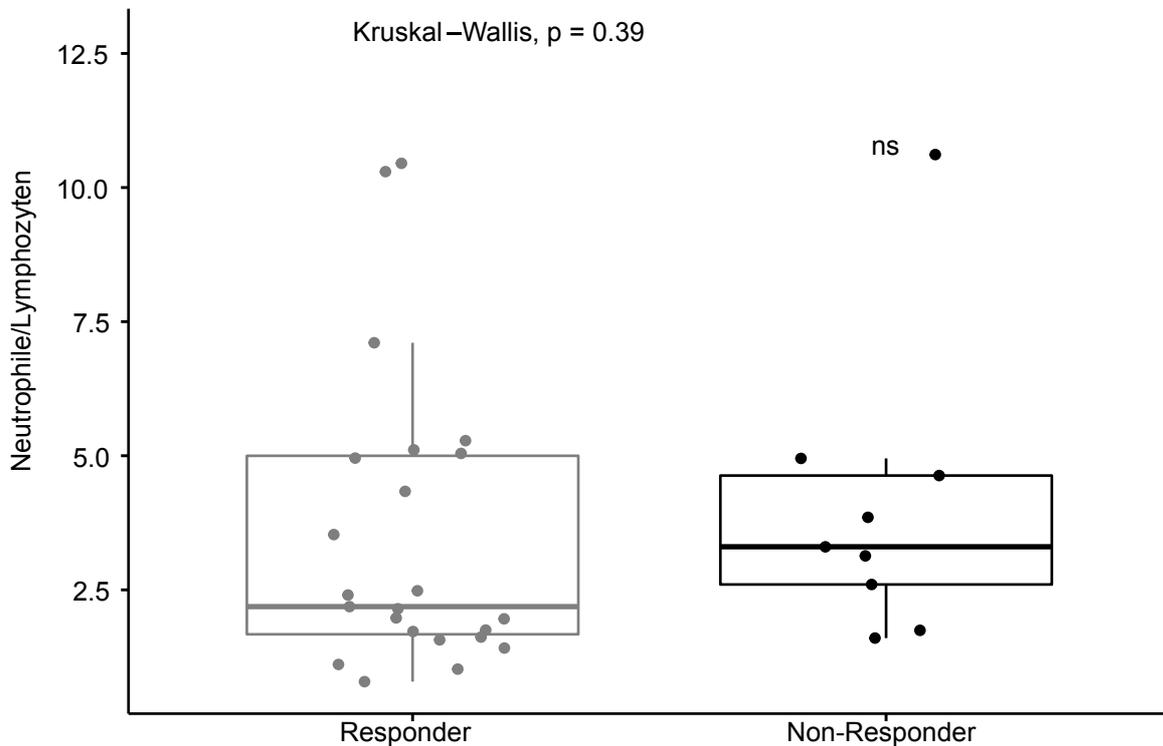


Abbildung 23: ANOVA-Analysen der Neutrophilen/Lymphozyten-Ratio (NLR) im Serum zum „Baseline“- und „C4“-Zeitpunkt in Respondern (CR,PR,SD) bzw. Non-Respondern (PD).

Dargestellt sind ANOVA-Auswertungen bezüglich der NLR bei Respondern im Vergleich zu Non-Respondern. **A)** Zum Zeitpunkt „Baseline“ zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. **B)** Zum Zeitpunkt „C4“ zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Abkürzungen: p: p-Wert.

Übersichtshalber sind die im Serum gemessenen Neutrophilen-Level sowie die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen pro Gruppe (CR, PR, SD, PD) zum Baseline- und C4-Zeitpunkt in **Tabelle 20** aufgelistet. Zusätzlich sind die Level von Leukozyten und Lymphozyten angegeben.

Parameter	CR (N=11)	PR (N=16)	SD (N=6)	PD (N=12)	Total (N=45)
Neutrophile (BE)					
N	11	13	5	10	39
Mittelwert (SD)	4.8 (0.9)	5.0 (1.2)	5.6 (1.7)	4.9 (2.2)	5.0 (1.5)
Neutrophile (C4)					
N	8	10	5	9	32
Mittelwert (SD)	5.5 (3.8)	5.5 (2.3)	4.5 (1.2)	5.4 (3.2)	5.3 (2.8)

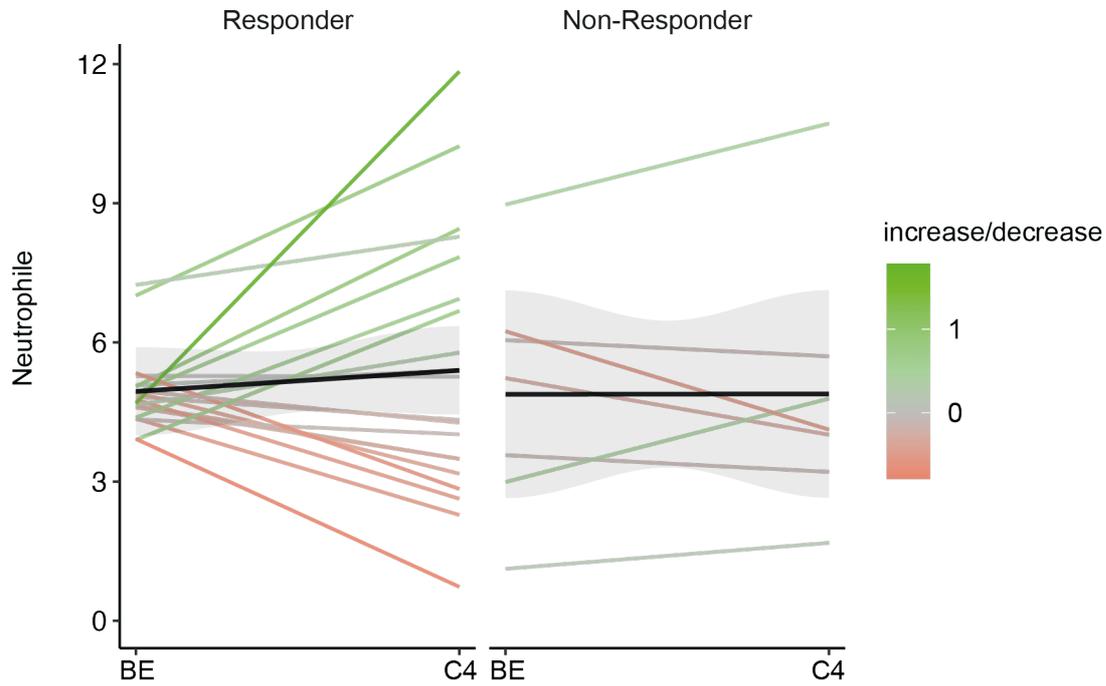
Parameter	CR (N=11)	PR (N=16)	SD (N=6)	PD (N=12)	Total (N=45)
d.neutrophils.abs (BE – C4)					
N	8	8	4	7	27
Leukozyten (BE)					
N	11	14	5	12	42
Mittelwert (SD)	7.0 (1.2)	7.4 (1.8)	7.9 (1.8)	7.5 (2.5)	7.4 (1.9)
Leukozyten (C4)					
N	10	13	5	11	39
Mittelwert (SD)	8.1 (2.9)	8.3 (2.1)	7.9 (1.4)	7.8 (3.9)	8.0 (2.8)
Lymphozyten (BE)					
N	11	13	5	10	39
Mittelwert (SD)	1.4 (0.4)	1.8 (0.6)	1.5 (0.3)	1.5 (0.6)	1.6 (0.5)
Lymphozyten (C4)					
N	8	10	5	9	32
Mittelwert (SD)	2.6 (3.1)	1.8 (0.7)	2.1 (0.4)	1.6 (1.0)	2.0 (1.7)

Tabelle 20: Systemische Analyse: Deskriptive Parameter – Baseline- und C4-Werte; Best Response.

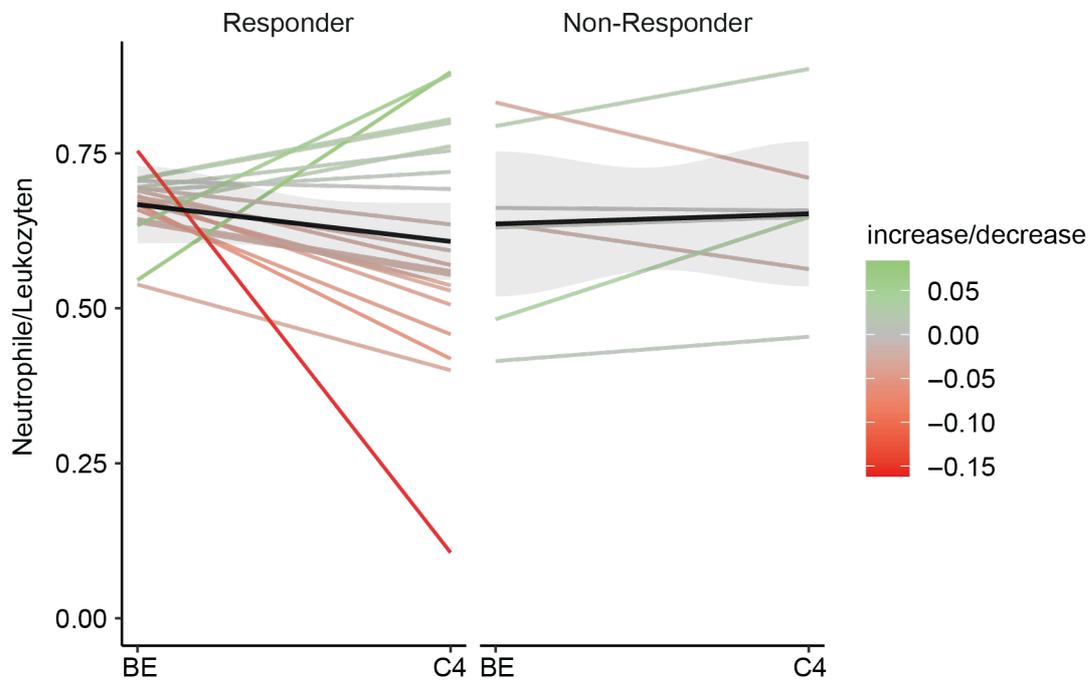
Abkürzungen: BE: Baseline, C4: Cycle 4, CR: complete response, PR: partial response, SD: stable disease / standard deviation, PD: progressive disease, N: number, d: delta, abs: absolut.

Schließlich wurde in „kinetischen Analysen“ der Anstieg bzw. Abfall der Neutrophilenkonzentrationen, des Neutrophilen/Leukozyten-Verhältnisses und der NLR zwischen den Zeitpunkten „Baseline“ und „C4“ dargestellt (siehe **Abbildung 22**). Dabei war festzustellen, dass die Neutrophilen-Serumkonzentration bei Respondern durchschnittlich zwischen „Baseline“ und „C4“ anstieg, wobei sie bei Non-Respondern im Mittel konstant blieb (siehe **Abbildung 22A**). Das Verhältnis zwischen Neutrophilen und Leukozyten befand sich zum Zeitpunkt „Baseline“ bei Respondern durchschnittlich auf einem höheren Level als bei Non-Respondern und sank zum Zeitpunkt „C4“ unter das Niveau der Non-Responder. Bei Non-Respondern stieg die untersuchte Ratio zwischen „Baseline“ und „C4“ im Durchschnitt marginal an (siehe **Abbildung 22B**). Die NLR war bei Non-Respondern vor Therapiebeginn höher als bei Respondern und stieg im Therapieverlauf stärker an (siehe **Abbildung 22C**). Es gab in allen Gruppen deutliche Ausreißer verglichen mit den Mittelwerten (als schwarze Linien dargestellt).

A Kinetische-Analyse: Neutrophilen-Serum-Level
Baseline (BE) und C4 / Responder vs. Non-Responder



B Kinetische-Analyse: Neutrophilen/Leukozyten-Ratio im Serum
Baseline (BE) und C4 / Responder vs. Non-Responder



C Kinetische-Analyse: Neutrophilen/Lymphozyten-Ratio im Serum
Baseline (BE) und C4 / Responder vs. Non-Responder

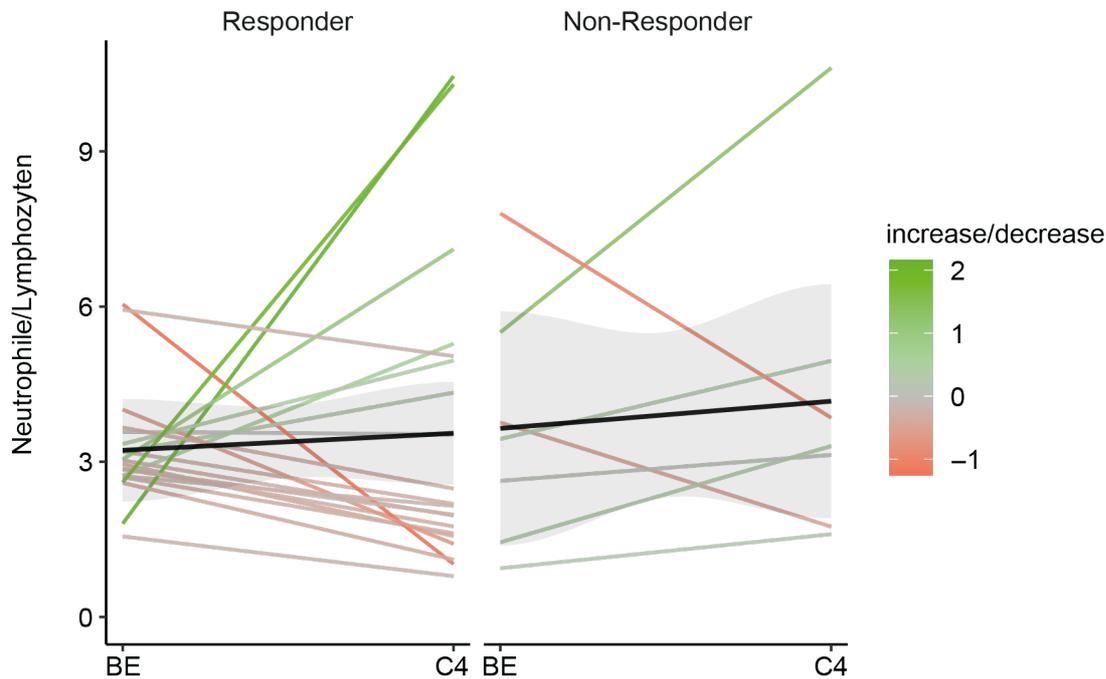


Abbildung 24: Kinetische Analysen der Neutrophilen-Serum-Level, der Neutrophilen/Leukozyten-Ratios und der Neutrophilen/Lymphozyten-Ratios zu den Zeitpunkten „Baseline“ und „C4“ unter Aufteilung der Patienten in die Gruppen „Responder“ (CR,PR,SD) und „Non-Responder“ (PD).

Dargestellt ist für jeden einzelnen Patienten die Entwicklung der Neutrophilen-Serumkonzentration bzw. Neutrophilen/Leukozyten-Ratio zwischen den beiden Zeitpunkten (1 Patient = 1 Linie, Abnahme: rot, Zunahme: grün, Gesamtdurchschnitt: schwarz). **A)** Die Neutrophilen-Serumkonzentration stieg bei Respondern durchschnittlich zwischen „Baseline“ und „C4“ an, wobei sie bei Non-Respondern nahezu konstant blieb. **B)** Die Neutrophilen/Leukozyten-Ratio befand sich zum Zeitpunkt „Baseline“ bei Respondern durchschnittlich auf einem höheren Level als bei Non-Respondern und sank zum Zeitpunkt „C4“ unter das Niveau der Non-Responder. Bei Non-Respondern stieg der Anteil der Neutrophilen an den Leukozyten zwischen „Baseline“ und „C4“ im Durchschnitt minimal an. **C)** Die Neutrophilen/Lymphozyten-Ratio war bei Non-Respondern vor Therapiebeginn höher als bei Respondern und stieg im Therapieverlauf stärker an. In allen Gruppen sind deutliche Ausreißer festzustellen.

Abkürzungen: CR,PR,SD: Complete Response, Partial Response, Stable Disease, PD: Progressive Disease.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass bei Respondern die Gabe der Immuntherapeutika durchschnittlich mit einem Anstieg der Neutrophilen-Serum-Level einherging. Non-Responder wiesen im Durchschnitt konstant niedrigere Neutrophilen-Serumkonzentrationen auf. Der Anteil Neutrophiler an den Gesamtleukozyten sank bei Respondern, von einem hohen Ausgangsniveau kommend, im Verlauf der Therapie stark ab, während der Messwert bei Non-Respondern durchschnittlich minimal anstieg. Die NLR stieg in beiden Gruppen an, bemaß sich aber bei Non-Respondern auf höhere Niveaus.

Der Tumor fördernde Effekt, welcher sich in einer der systemischen „Baseline“-Neutrophilen-Analysen gezeigt hat, deckt sich mit dem beschriebenen protumoralen Einfluss von S100A8/A9 (siehe **Abbildungen 13A, 8B und 9B**). Insbesondere stimmen die Ergebnisse dahingehend überein, als dass eine starke Abnahme der Neutrophilen-Serumkonzentration mit einem verlängerten Überleben assoziiert werden konnte (siehe **Abbildungen 14B und 15**) und sich eine starke Abnahme des S100A8/A9-Serum-Levels im Verlauf der Therapie positiv auf das progressionsfreie Überleben auswirkte (siehe **Abbildung 10**). Die Population der neutrophilen Granulozyten ist jedoch durch eine hohe Heterogenität gekennzeichnet und die antitumoralen Einflüsse von Neutrophilen, welche aus einem Teil der durchgeführten Analysen, insbesondere der „Baseline“-Untersuchung mit dem Endpunkt „Gesamtüberleben“ hervorgeht, zeugen von diesem Aspekt (siehe **Abbildung 13B**). Der Effekt von Neutrophilen auf die Tumorprogression und Prognose von Melanompatienten sollte davon ausgehend mittels einer Gewebeanalyse tiefergehend erforscht werden.

3.2 Gewebeanalyse

Die vorausgehenden Ergebnisse haben gezeigt, dass die Neutrophilenkonzentration im Blut die Prognose von Stadium III- und IV-Melanompatienten signifikant beeinflusste. Im lokalen Tumorbett sind neutrophile Granulozyten, wie einleitend erläutert, eine bedeutsame inflammatorische Zellpopulation und als solche mutmaßlich an der Tumorprogression beteiligt (Treffers et al., 2016, Powell and Huttenlocher, 2016, Liang and Ferrara, 2016). Es gibt jedoch auch Evidenz für einen Tumor hemmenden Effekt von Tumor-assoziierten neutrophilen Granulozyten (Berry et al., 2017, Galdiero et al., 2016). Um die systemische Studie zu erweitern, sollte im Anschluss die Rolle von lokal vorkommenden Neutrophilen in Naevi, Primärmelanomen und Metastasen, welche in Form von TMAs asserviert worden waren, charakterisiert werden.

Ein besonderes Merkmal der folgenden Arbeit ist es, dass eine Studienkohorte herangezogen werden konnte, innerhalb derer sowohl Naevus- als auch Primarius- und Metastasen-Gewebe der jeweiligen Patienten zu Analyse Zwecken verfügbar waren. In ihren Gewebeproben verschiedenen Ursprungs sollten mittels einer Immunfluoreszenzfärbung neutrophile Granulozyten detektiert werden. Von den

hierfür zur Verfügung stehenden TMA-Gewebestanden waren 44 Naevi, 86 Primären und 162 Metastasen für die Quantifizierung der Neutrophileninfiltration geeignet und wurden in die Analyse einbezogen (siehe **Tabelle 22** unten). Um den Einfluss von Neutrophilen auf den Tumorprogress zu evaluieren, wurden Patienten ausgewählt, von denen korrespondierende Proben gesammelt worden waren, da es von besonderer großer Bedeutung schien, diese untereinander zu vergleichen. Es fanden sich 46 zusammenhängende Dubletten und 3 Tripletts. Darunter waren 16 Dubletten aus melanozytärem Naevusgewebe und Primärmelanomprobe, 25 Dubletten aus Primärmelanom und Metastase und 5 Dubletten aus Naevus und Metastase. Durch die Analyse der Probenpärchen sollte die Melanomerkrankung eines Patienten im Verlauf beurteilt und die Neutrophileninfiltration verschiedener Erkrankungsstadien untersucht sowie mit der Prognose korreliert werden. Den prognostischen Einfluss der Neutrophileninfiltration galt es schließlich mit den oben beschriebenen Ergebnissen aus den systemischen Analysen abzugleichen.

3.2.1 Bildanalyse

Zur Bildanalyse der Gewebestanden, welche mit dem Neutrophilen-spezifischen CD15-Antikörper und einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbt und anschließend mikroskopiert worden waren, kam das Programm *Image J* zum Einsatz. Es wurde jeweils die Stanzfläche vermessen sowie die Anzahl positiver CD15-Signale gezählt und dokumentiert.

Um die Differenzierung zwischen positiven, d.h. spezifischen bzw. negativen (als unspezifisch gewerteten) farblichen Zell-Signalen nachvollziehbar zu machen, sind unten Beispielbilder aus der Neutrophilenfärbung abgebildet (siehe **Abbildung 23**).

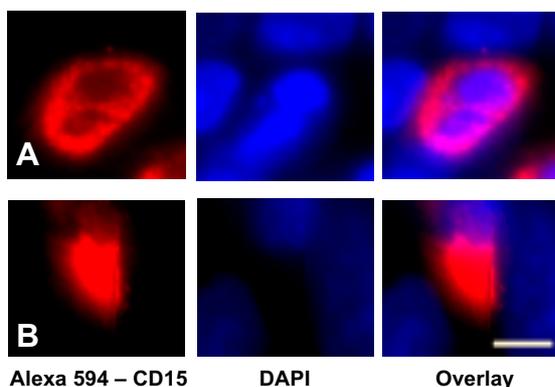


Abbildung 25: Beispielbilder aus der Neutrophilenfärbung. A) Neutrophiler Granulozyt in Melanomgewebe auf einem TMA (Positivkontrolle). Die TMAs wurden mittels Immunfluoreszenz gefärbt und die neutrophilen Granulozyten mit einem Anti-CD 15-Antikörper in Kombination mit dem Sekundärantikörper Alexa 594 rot markiert. Die Kerngegenfärbung erfolgte mit DAPI (blau). Das CD15-Signal erschien hier in Verbindung mit der Kerngegenfärbung spezifisch und wurde als solches positiv gewertet.

B) Unspezifisches CD15-Signal in Melanomgewebe auf einem TMA (Negativkontrolle). Das rote

Ergebnisse

Farbsignal (Alexa 594) erschien hier flächig-diffus und stand in keiner eindeutigen Verbindung zu einem Zellkern (Kerngegenfärbung mit DAPI=blau). Größenbalken: 5µm.

Die folgende **Tabelle 21** beschreibt das Scoring-Modell, welches mit dem Ziel, eine konsistente Analyse zu gewährleisten, der Auswertung zugrunde gelegt wurde.

Kriterium	Beschreibung
Zellkern	In der Regel deutlich segmentiert (polymorphkernig)
Signalbezug zu einem Zellkern	V.a. bei starken, grellen Signalen nur als positiv gewertet, wenn ein Zellkern sichtbar war.
Signalstärke	Abhebung des Signals vom "Hintergrund"
Signalfarbe	Häufig pink, seltener rot
Signalform	"Umrandung" der Zelle (flächig oder flächig-granuliert)

Tabelle 21: Bewertungsmodell für Zell-Signale in der Neutrophilenfärbung mit Anti-CD15. Hier sind die Kriterien der Signalbeurteilung beschrieben.

Für eine Übersicht über die pro Flächeneinheit gezählten CD15-Signale sind die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen pro Gewebearart (Naevus, Primarius, Metastase) in **Tabelle 22** aufgelistet. Überdies sind die Level der gebräuchlichen Prognosemarker S100B und LDH sowie das PFS angegeben.

Parameter	Naevus (N=44)	Primarius (N=86)	Metastase (N=162)	Total (N=292)
CD15 (normiert)				
N	44	86	162	292
Mean (SD)	7.0 (26.0)	81.2 (249.7)	28.0 (129.7)	40.4 (168.3)
S100B				
N	31	33	42	106
Mean (SD)	0.1 (0.1)	0.3 (1.4)	0.4 (1.2)	0.3 (1.1)
LDH				
N	35	38	43	116
Mean (SD)	214.6 (89.6)	249.6 (207.1)	272.0 (267.5)	247.3 (207.0)
PFS				
N	0	56	78	134
Mean (SD)	N/A	552.3 (552.1)	275.9 (655.0)	391.4 (627.0)

Tabelle 22: TMA Gewebestatistik: Deskriptive Parameter.

Abkürzungen: N: number, N/A: not applicable, SD: standard deviation, CD: Cluster of Differentiation, LDH: Laktatdehydrogenase, PFS: progression-free survival.

3.2.2 Vergleich der Neutrophileninfiltration zwischen den Gewebearten

Zum Vergleich der Neutrophileninfiltration in den jeweiligen Gewebearten sind in **Abbildung 24** repräsentative Beispielaufnahmen aus den untersuchten Naevi, Primarien und Metastasen, sowie die korrespondierende statistische Aufbereitung abgebildet.

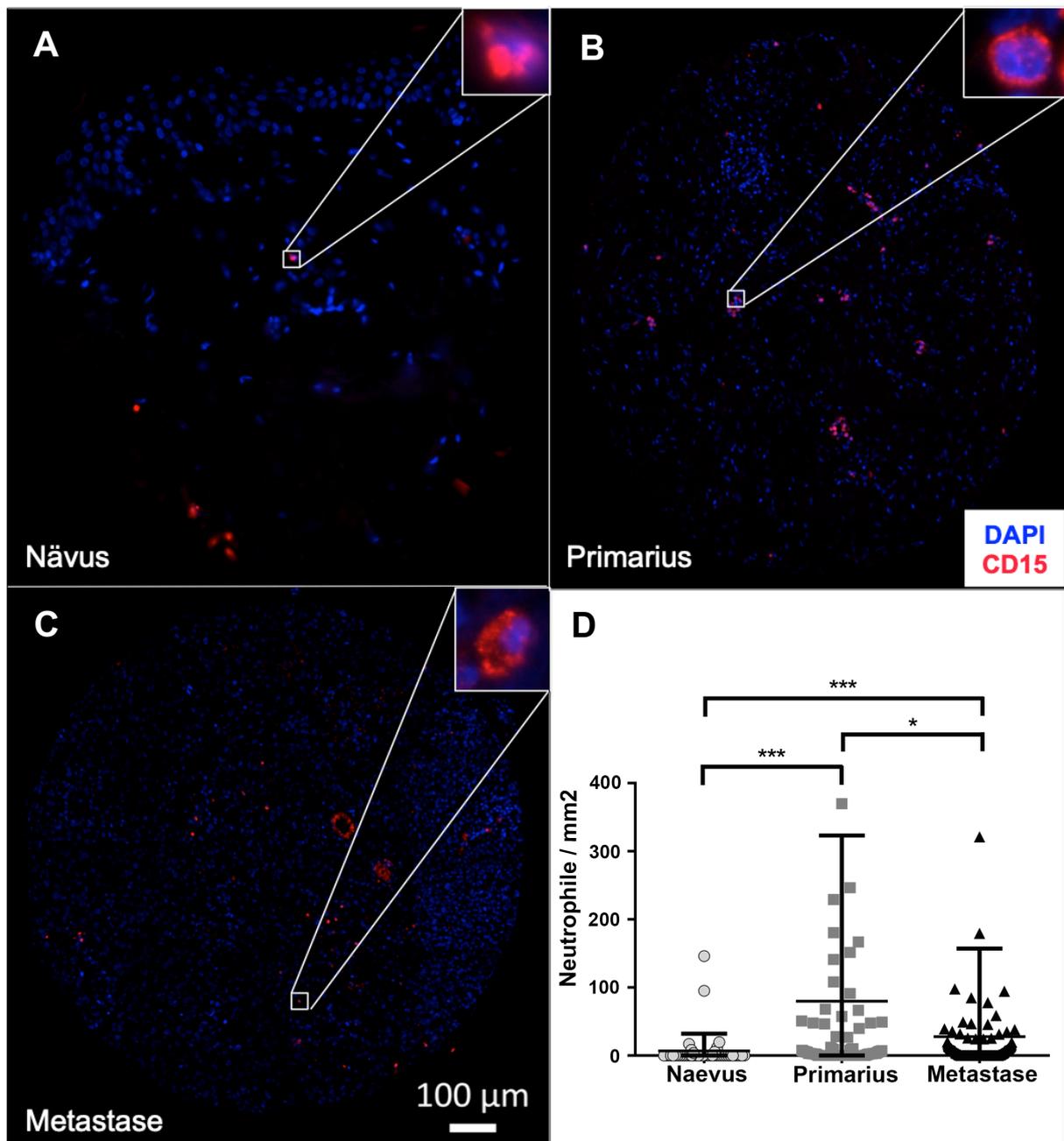


Abbildung 26: Übersichtsaufnahmen und Analysen eines durchschnittlich gering neutrophileninfiltrierten Naevus (A) sowie eines durchschnittlich stark infiltrierten Primarius (B) und einer Metastase (C). Statistische Auswertung aller erhobenen Zellzahlen (D).

Abgebildet sind für die jeweiligen Gewebearten repräsentative mikroskopische Übersichtsaufnahmen der Stenzen eines Naevus (TMA 1, Stanze L17), eines Primarius (TMA 2.1, Stanze A11) und einer Metastase (TMA 2.2, Stanze E8). Die Färbung der Proben erfolgte mit einem Anti-CD15-Antikörper in Verbindung mit dem Sekundärantikörper Alexa 594, um die neutrophilen Granulozyten rot sichtbar zu

machen. Ein einzelner Neutrophiler aus der jeweiligen Stanze ist vergrößert dargestellt. Es wurde eine blaue Kerngegenfärbung mit DAPI durchgeführt. Grafisch sind zudem die Neutrophilenzahlen der insgesamt untersuchten 44 Naevi, 86 Primarien und 162 Metastasen aufgeführt (D). Signifikanzniveaus: *: $p=0,05$; ***: $p=0,001$.

In Naevi waren durchschnittlich 6 Neutrophile und in Primarien 68 Neutrophile zu finden (Angaben jeweils normiert auf die Stanzfläche). Das bedeutet, dass mehr als 11x mehr Neutrophile in Primarien vorkamen als in Naevi (siehe **Abbildung 24A, B, D**). In Metastasen befanden sich im Durchschnitt 23 Neutrophile und somit etwa 4x mehr neutrophile Granulozyten als in Naevi (siehe **Abbildung 24A, C, D**). Primarien enthielten durchschnittlich rund 3x mehr Neutrophile als Metastasen (siehe **Abbildung 24B, C, D**).

Die Durchführung von ANOVA-Analysen stützte die These, dass die Anzahl von Neutrophilen in Naevi versus in Primarien hoch signifikant geringer war ($p<0,001$). Zwischen Naevi und Metastasen war die Neutrophilenzahl ebenfalls hoch signifikant unterschiedlich ($p<0,001$) und zwar geringer in den Naevi. Die Anzahl der Neutrophilen in Primarien versus in Metastasen war signifikant kleiner in Metastasen ($p<0,05$).

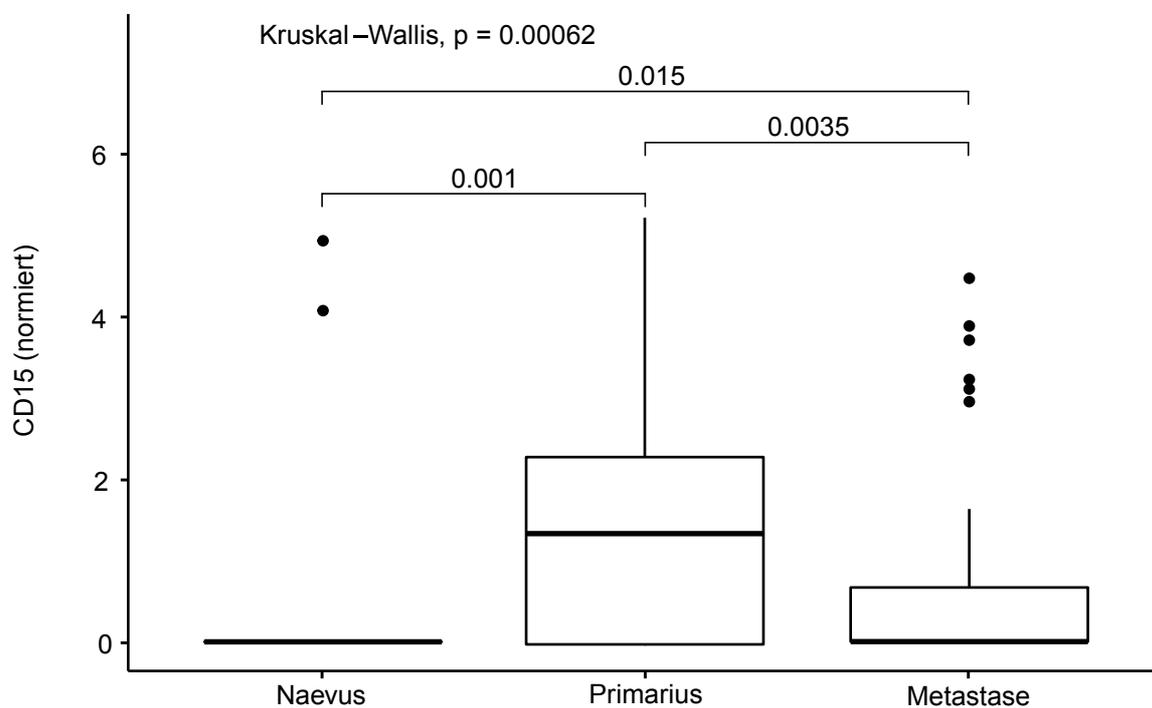
Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass sich in Naevi verglichen mit Primärmelanomen und Metastasen signifikant weniger Neutrophile anfärben ließen. So wurden in der betrachteten Patientenkohorte durchschnittlich die wenigsten Neutrophilen in Naevi gezählt und in Primarien kamen im Durchschnitt die meisten neutrophilen Granulozyten vor.

Des Weiteren wurden die Gewebestanden gemäß des Grads ihrer Neutrophileninfiltration gruppiert. Dadurch konnten solche Naevi, Primarien und Metastasen, die eine geringe Neutrophileninfiltration aufwiesen, getrennt von Stanzen mit hoher Infiltration betrachtet werden. Der errechnete Cut-Off-Wert zwischen der „Low“- und der „High“-Gruppe betrug 5,1781 Neutrophile / mm^2 . Dabei wurde die „High“-Gruppe mittels eines Scoring-Modells für die Auswertung doppelt gewichtet, da die Analyse und der Effekt hoher Neutrophileninfiltrationen in dieser Studie grundsätzlich im Vordergrund stehen sollten. In **Abbildung 25** sind die ANOVA-Analysen für die „Low“- und die „High“-Gruppe dargestellt. In Primarien der „Low“-Gruppe fanden sich mehr Neutrophile im Vergleich zu Naevi und Metastasen

dieser Gruppe (siehe **Abbildung 25A**). Die Unterschiede zwischen den Tumorarten waren jeweils hoch signifikant ($p < 0,01$).

In Primarien der „High“-Gruppe kamen ebenfalls mehr Neutrophile vor als in Metastasen dieser Gruppe ($p = 0,0067$, siehe **Abbildung 25B**). Die Unterschiede zwischen den Neutrophileninfiltrationen in den anderen Tumorarten (Naevus vs. Primarius und Naevus vs. Metastase) waren in der „High“-Gruppe statistisch nicht signifikant.

A ANOVA-Analyse: Neutrophileninfiltration in den Gewebearten (CD15, normiert)
„Low“-Gruppe: Stenzen mit geringer Neutrophileninfiltration ($< 5.1781/\text{mm}^2$)



B ANOVA-Analyse: Neutrophileninfiltration in den Gewebearten (CD15, normiert)
 „High“-Gruppe: Stanzeln mit hoher Neutrophileninfiltration ($> 5.1781/\text{mm}^2$)

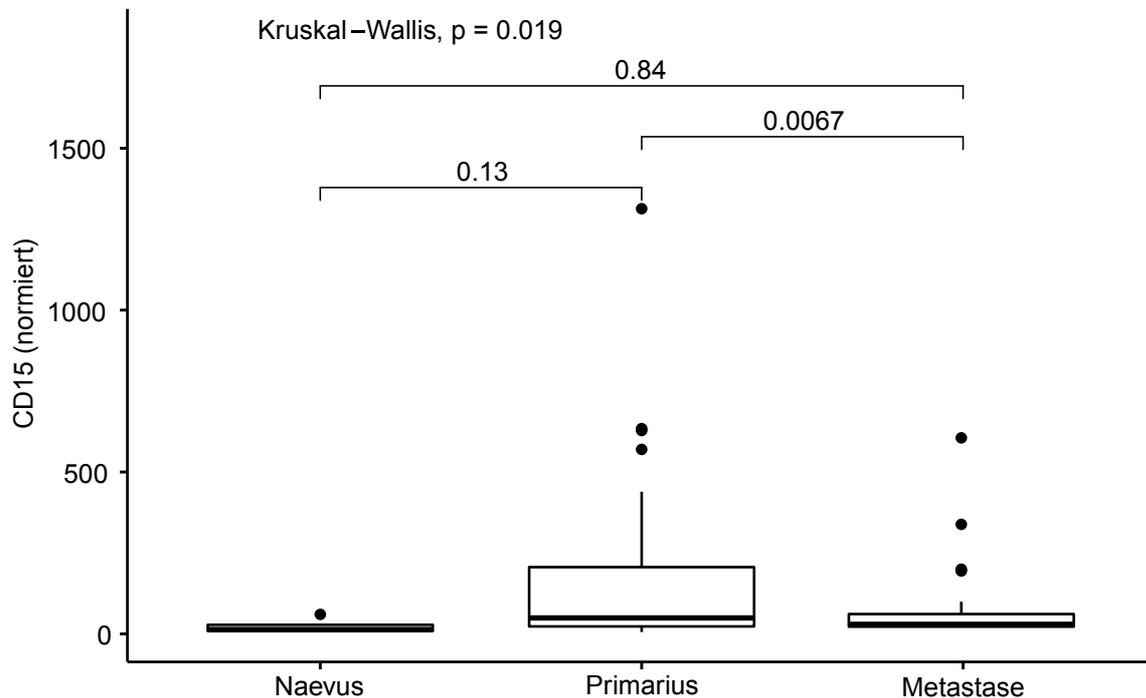


Abbildung 27: ANOVA-Analysen der Neutrophileninfiltrationen in den Tumorarten – gruppiert nach Stanzeln mit hohen und solchen mit niedrigen Neutrophileninfiltrationen.

Dargestellt sind ANOVA-Auswertungen für die Tumorarten der „Low“- und der „High“-Gruppe. **A)** In der „Low“-Gruppe zeigten sich höhere Neutrophilenzahlen in „Primarius versus Naevus“ und „Primarius versus Metastase“. **B)** In der „High“-Gruppe ließen sich signifikante Unterschiede zwischen Primarien und Metastasen beobachten. In Primarien waren auch hier höhere Neutrophileninfiltrationen als in Metastasen nachweisbar.

Abkürzungen: p: p-Wert, CD: Cluster of Differentiation.

Zusammenfassend konnte hier demonstriert werden, dass auch bei getrennter Betrachtung von neutrophilenreichen und neutrophilenarmen Gewebestanzeln die stärkste Neutrophileninfiltration in Primärmelanomen zu finden war.

3.2.3 Univariate Survivalanalyse

Im Folgenden sollte der Einfluss von Neutrophilen im tumoralen Gewebe mittels Survival-Analysen untersucht werden. Die Wahl des Gesamtüberlebens als Endpunkt der Survival-Analysen war für die TMA-Auswertung ungeeignet, da es während des Beobachtungszeitraums im Patientenkollektiv kaum zu Todesfällen kam. Daher wurde in der Auswertung lediglich das progressionsfreie Überleben betrachtet.

Zunächst erfolgte eine Untersuchung innerhalb der jeweiligen Gewebeart. Die Auswertung der Naevi zeigte keine signifikanten Unterschiede in puncto progressionsfreiem Überleben zwischen Patienten mit stark durch Neutrophile infiltrierte Naevi und Patienten mit gering infiltrierte Naevi ($p > 0,05$). Die dazugehörige Kaplan-Meier-Kurve ist im Anhang abgebildet (siehe **Abbildung 3 im Anhang**). Des Weiteren wurde die Neutrophileninfiltration in Primarien mit dem progressionsfreien Überleben korreliert (siehe **Abbildung 26**). Hohe Neutrophileninfiltrationen in Primarien konnten mit einem verkürzten progressionsfreien Überleben assoziiert werden. Fanden sich im Primärmelanom eines Patienten viele Neutrophile, trat die Tumorprogression mit hoher Wahrscheinlichkeit rascher ein als bei Patienten, deren Primarius von weniger neutrophilen Granulozyten infiltrierte war. Der Cut-Off-Wert betrug $0,99/\text{mm}^2$. Der Unterschied zwischen den Gruppen war signifikant ($p = 0,022$).

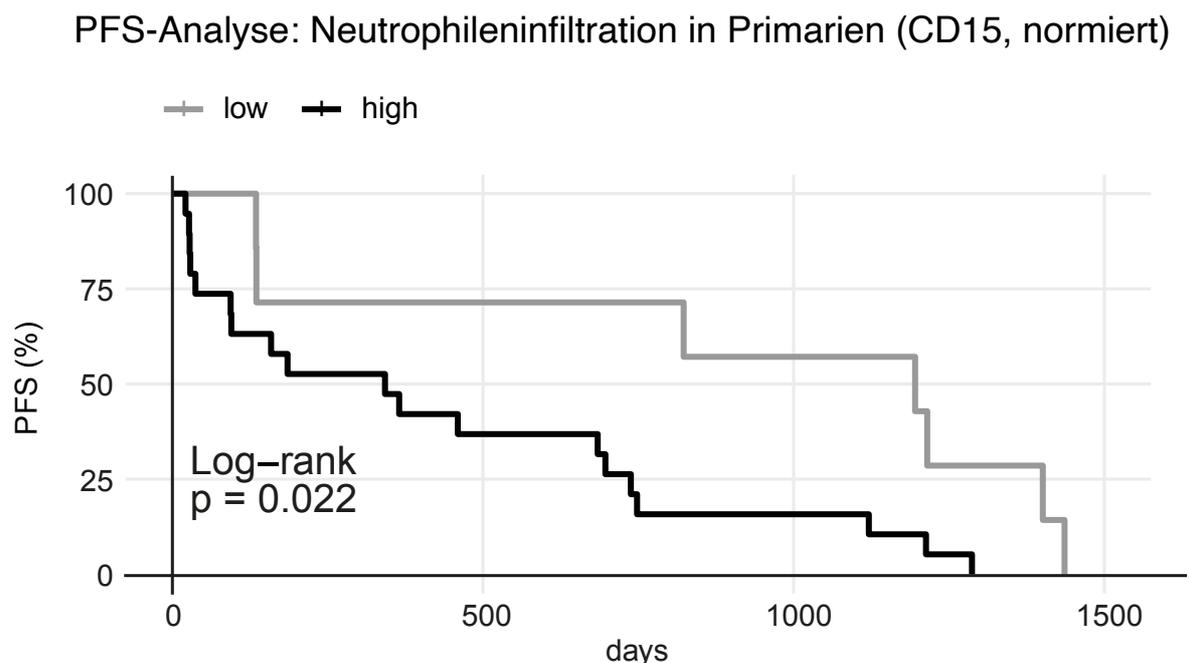


Abbildung 28: Hohe Neutrophileninfiltrationen in Primarien konnten mit einem verkürzten progressionsfreien Überleben assoziiert werden.

Für die Patienten der Gewebestudie sind Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie Überleben dargestellt. Die Patienten wurden nach hohen und niedrigen Neutrophileninfiltrationen im Primarius stratifiziert. Die „Number at risk“ betrug an Tag 0 für CD15=low 7 Patienten; für CD15=high 19 Patienten.

Abkürzungen: p: p-Wert, PFS: Progression Free Survival.

Schließlich erfolgte die Auswertung innerhalb der Gruppe der Metastasen, in welcher sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des progressionsfreien Überlebens

zwischen der Gruppe mit hoher und derjenigen mit geringer Neutrophileninfiltration in der Metastase ergaben ($p > 0,05$). Die dazugehörige Kaplan-Meier-Kurve ist im Anhang abgebildet (siehe **Abbildung 4 im Anhang**).

Zusammenfassend soll die prognostische Bedeutung einer hohen lokalen Neutrophileninfiltration in Primärmelanomen hervorgehoben werden. Diese konnte mit einem verkürzten progressionsfreien Überleben der Patienten assoziiert werden und spiegelt damit Tumor fördernde Effekte von Neutrophilen im Tumormikromilieu wider.

3.2.4 Vergleich der Neutrophileninfiltration im Krankheitsverlauf

Insbesondere erschien auch die Veränderung der Infiltration zwischen Naevus, Primarius und Metastase innerhalb eines Patienten und die Korrelation dieser Daten mit der individuellen Prognose interessant. Eine erste relevante Analyse bezog sich auf die Differenz in der Neutrophileninfiltration zwischen dem Primarius und dem Naevus desselben Patienten (P-N) (siehe **Abbildung 27**). Bei Patienten, in deren Primarius verglichen mit dem Naevus bedeutend mehr Neutrophile zu finden waren (P-N=high), kam es schneller zur Tumorprogression. Der Cut-Off-Wert betrug $-4,69/\text{mm}^2$. Die Differenz zwischen den beiden definierten Gruppen war signifikant ($p=0,022$).

PFS-Analyse: Differenz der Neutrophileninfiltration im Primarius verglichen mit dem Nävus eines Patienten (P-N, CD15, normiert)

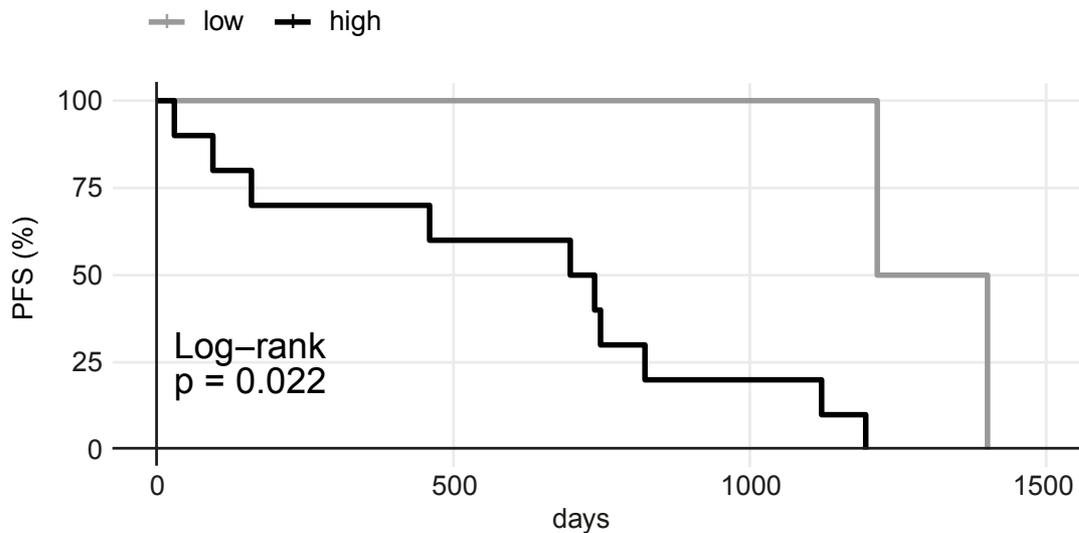


Abbildung 29: Je stärker die Neutrophileninfiltration im Primarius verglichen mit der im Naevus eines Melanompatienten, desto kürzer das progressionsfreie Überleben.

Für die Patienten der Gewebestudie sind Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie Überleben dargestellt. Die Patienten wurden nach großen versus kleinen Neutrophileninfiltrationsdifferenzen zwischen dem Primarius und dem Naevus stratifiziert (P-N=high versus low). Die „Number at risk“ betrug an Tag 0 für die Differenz P-N=low 2 Patienten; für P-N=high 10 Patienten.

Abkürzungen: p: p-Wert, PFS: Progression Free Survival, P: Primarius, N: Naevus.

Als zweites wurde die Differenz zwischen Primarius und Metastase analysiert. Die in **Abbildung 28** dargestellte univariate Überlebenszeitanalyse bezog sich auf das progressionsfreie Überleben beim Vorliegen hoher bzw. niedriger Differenzen in der Neutrophileninfiltration zwischen Primarius und Metastase (P-M). Waren im Primarius eines Patienten bedeutend weniger Neutrophile zu finden als in seiner Metastase (P-M=low), erreichte der jeweilige Patient ein verlängertes progressionsfreies Überleben (siehe **Abbildung 28**). Der Cut-Off-Wert betrug 22,14/mm². Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war signifikant (p=0,029).

PFS-Analyse: Differenz der Neutrophileninfiltration im Primarius verglichen mit der Metastase eines Patienten (P-M, CD15, normiert)

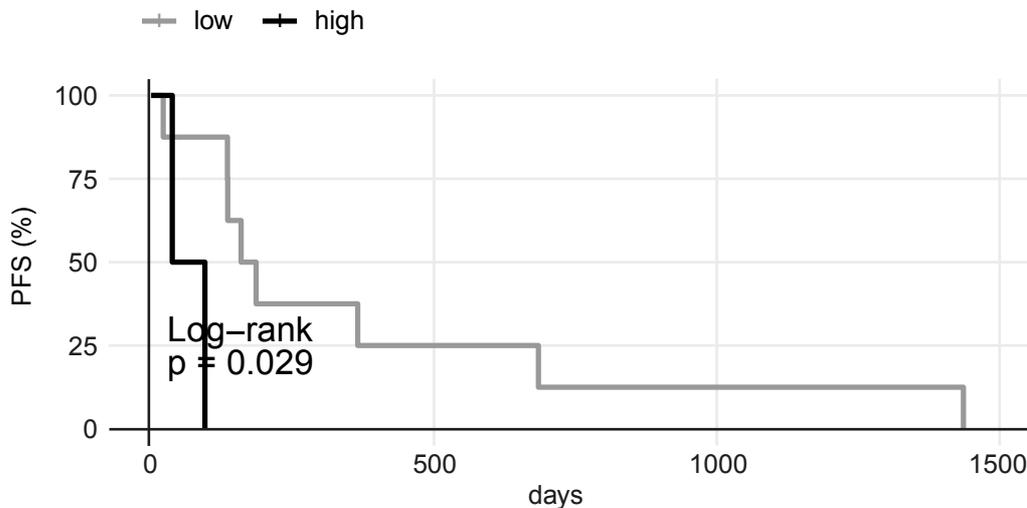


Abbildung 30: Je geringer die Neutrophileninfiltration im Primarius verglichen mit der Metastase eines Melanompatienten, desto länger das progressionsfreie Überleben.

Für die Patienten der Gewebestudie sind Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie Überleben dargestellt. Die Patienten wurden nach großen und kleinen Unterschieden der Neutrophileninfiltrationen in Primarius versus in der Metastase stratifiziert (P-M=high versus low). Die „Number at risk“ betrug an Tag 0 für die Differenz P-M=low 8 Patienten; für P-M=high 2 Patienten. Abkürzungen: p: p-Wert, PFS: Progression Free Survival, P: Primarius, M: Metastase.

Die Analyse für den Unterschied in der Neutrophileninfiltration zwischen Metastase und Naevus konnte aufgrund zu geringer Anzahl des „paarweisen“ vorhandenen Probenmaterials nicht durchgeführt werden.

Zusammenfassend lässt sich als Tendenz festhalten, dass in der ersten vorliegenden Krankheitsverlaufsuntersuchung ein protumoraler Effekt von lokal infiltrierenden Neutrophilen im Primarius beobachtet wurde. Je mehr Neutrophile im Primarius eines Patienten verglichen mit dessen Naevus detektierbar waren, desto ungünstiger wirkte sich dies auf den Krankheitsfortschritt aus. Je stärker jedoch die Neutrophileninfiltration in der Metastase eines Patienten verglichen mit seinem Primarius war, desto später kam es zum Progress der Erkrankung. Dieses Ergebnis spricht für einen antitumoralen Effekt von Neutrophilen in Metastasen. Leider war die Gruppengröße in diesen Analysen sehr klein. Die Ergebnisse können daher lediglich als erste Indizien gewertet werden und es bedarf größer angelegter Studien, um sie zu verifizieren.

4 Diskussion

4.1 Die Rolle von zirkulierendem S100A8/A9 bei der Tumorprogression

Wie einleitend erläutert wurde, kann nicht nur das Immunsystem des Menschen die Tumorprogression hemmen, indem es sich entwickelnde Tumorzellen zerstört, sondern der Tumor verfügt auch über Mechanismen, um die Immunabwehr für Tumorwachstum und Metastasierung zu instrumentalisieren (Gutkin and Shurin, 2014). In dieser Studie sollte unter anderem die Funktion und Bedeutung von S100A8/A9 für die Progression des Melanoms und das Therapieansprechen unter Checkpointinhibition beleuchtet werden. Die Bestimmung von DAMPs wie S100A8/A9 im Patientenserum oder -plasma mittels schneller, unkomplizierter, kostengünstiger und komplikationsarmer Liquid Biopsy (Blutanalyse) könnte die Aussagen bereits routinemäßig bei Melanompatienten gemessener Parameter wie Laktatdehydrogenase (LDH) und S100B ergänzen (Wagner et al., 2019). Es ließen sich dadurch möglicherweise die individuellen Chancen der Gabe von Immuntherapeutika abschätzen. Zudem ist es im Therapieverlauf zu jedem Zeitpunkt von großem Interesse, Aussagen darüber zu treffen, wie sich die Tumorerkrankung eines Patienten bezüglich Metastasierung und - davon abhängig - seine Prognose mutmaßlich entwickeln wird. Diese Frage könnte S100A8/A9 als Serum-Biomarker beantworten.

In Vorarbeiten zeigte sich bei Stadium IV-Melanompatienten ein negativer Einfluss von zirkulierendem S100A8/A9 auf das Ansprechen unter Ipilimumab- und Pembrolizumab-Gabe (Gebhardt et al., 2015, Wagner et al., 2019, Weide et al., 2016). Unter anderem wurden in den genannten Studien die erhobenen S100A8/A9-Serum-Level mit der Therapieeffizienz (basierend auf einem CT/MRT/PET-CT-Staging) und dem klinischen Ansprechen der Patienten (nach immune-related Response-Criteria, irRC) zu verschiedenen Zeitpunkten vor und während der Immuntherapie korreliert (Wolchok et al., 2009). Die in der vorliegenden Analyse analog durchgeführten Untersuchungen lieferten diesbezüglich keine signifikanten Ergebnisse.

Für S100A8/A9-Moleküle bestätigte sich in diversen Forschungsprojekten ein Zusammenhang mit der Progression des malignen Melanoms (Gebhardt et al., 2006,

Gebhardt et al., 2015, Hibino et al., 2013). Wagner und Kollegen haben einen negativen Einfluss von hohen Serum-S100A8/A9-Konzentrationen auf das progressionsfreie Überleben von Melanompatienten festgestellt (Wagner et al., 2019). Bezüglich des Effekts systemischer S100A8/A9-Konzentrationen auf die Prognose von Melanompatienten im fortgeschrittenen Stadium mit ICT zeigte sich in der vorliegenden Arbeit jedoch, dass hohe systemische „Baseline“- und „C4“-S100A8/A9-Level mit einem verlängerten progressionsfreien Überleben assoziiert waren (siehe **Abbildung 8A und 9A**). Das hier überraschenderweise beobachtete verlängerte PFS hat sich auf das Gesamtüberleben der Patienten nicht ausgewirkt, denn es zeigte sich im Weiteren ein Zusammenhang zwischen hohen S100A8/A9-Leveln und einem verkürzten Gesamtüberleben (**und Abbildung 8B und 9B**). Wagner et al. haben ebenfalls einen negativen Einfluss von hohen Serum-S100A8/A9-Konzentrationen auf das Gesamtüberleben beobachtet. Der in der vorliegenden Arbeit für die Analyse des Gesamtüberlebens zum Zeitpunkt „Baseline“ determinierte Cut-Off-Wert von 5000 ng/ml ist in etwa kongruent mit demjenigen, welcher von Wagner und Kollegen nach einem speziellen Algorithmus berechnet wurde (5500 ng/ml) (Wagner et al., 2019, Hothorn, 2003). Der vom ELISA-Kit-Hersteller Bühlmann angegebene Median in einem Kollektiv von 93 gesunden, asymptomatischen Blutspendern liegt bei 1140 ng/ml und die 95. Perzentile bei 2900 ng/ml. Vor diesem Hintergrund ist der in dieser Arbeit gewählte Cut-Off-Wert von 5000 ng/ml als deutlich erhöhtes S100A8/A9-Serum-Level zu bewerten.

Da Verlaufparameter zur Beurteilung des Krankheitsfortschritts und für Therapieentscheidungen in der klinischen Praxis von großer Bedeutung sind, erschien die Untersuchung der Entwicklung von S100A8/A9-Spiegeln im Therapieverlauf besonders relevant. Bei Betrachtung der generierten Ergebnisse fiel auf, dass eine starke Zunahme der S100A8/A9-Serumkonzentration zwischen den zwei Messzeitpunkten (vor Therapiebeginn und vor der vierten Gabe der ICT) verkürzend auf das progressionsfreie Überleben wirkte (siehe **Abbildung 10**). Dieses Resultat deckt sich mit der Hypothese, dass S100A8/A9 einen protumoralen Effekt innehat. Gebhardt und Kollegen haben bei Stadium IV-Melanompatienten festgestellt, dass Ipilimumab-Non-Responder nach der ersten Gabe des Immuntherapeutikums erhöhte S100A8/A9-Serumkonzentrationen aufwiesen, die zur Akkumulation von MDSCs und deren Aktivierung führten (Gebhardt et al., 2015). MDSCs haben durch ihre vermehrte Produktion von NO und Expression von PD-L1

immense immunsuppressive Effekte im Kontext der Melanomerkrankung gezeigt (Kiessling et al., 2014). Sowohl S100A8/A9-Moleküle (als lösliche Entzündungsfaktoren) wie auch MDSCs, insbesondere monozytische MDSCs (als Zellen des angeborenen Immunsystems mit immunsuppressiven Eigenschaften im Tumorbett) wurden mit aggressivem Tumorwachstum in Verbindung gebracht (Gebhardt et al., 2006, Jiang et al., 2015). Da mögliche zelluläre Quellen von S100A8/A9 neben Tumorzellen selbst, Myeloid- und anderen Gefäßzellen sowie Monozyten auch neutrophile Granulozyten sind, soll im Weiteren der Einfluss dieser Leukozyten auf die Tumorprogression diskutiert werden.

4.2 Der Einfluss von Serum-Neutrophilen auf das Tumorwachstum

Neutrophile Granulozyten könnten als Serum-Biomarker ebenso wie S100A8/A9 geeignet sein, um prognostische Aussagen über den Tumorprogress bei Melanompatienten zu treffen und prädiktiv das Therapieansprechen vorherzusagen. Klinische Studien haben gezeigt, dass eine Vielzahl von im Blut zirkulierenden Neutrophilen ebenso wie hohe S100A8/A9-Level mit einer verschlechterten Prognose bei Melanompatienten korrelieren (Gebhardt et al., 2015, Weide et al., 2016, Rosner et al., 2018, Shaul and Fridlender, 2018, Schmidt et al., 2005). Gebhardt und Kollegen sowie Donskov und Kollegen konnten negative prognostische Eigenschaften einer hohen systemischen Neutrophilenkonzentration vor Therapiebeginn („Baseline“) beim metastasierten Melanom demonstrieren (Gebhardt et al., 2015, Donskov, 2013). Im Hinblick auf den Einfluss systemischer Neutrophilenkonzentrationen bezüglich der Prognose von Melanompatienten im fortgeschrittenen Stadium mit ICT geht aus den hier durchgeführten Experimenten ebenfalls hervor, dass hohe Serum-Konzentrationen neutrophiler Granulozyten vor Therapiebeginn eine verkürzende Wirkung auf das progressionsfreie Überleben hatten (siehe **Abbildung 13A**). Der Cut-Off-Wert betrug 4,34/nl (Norm: 2,0-7,0/nl) für hohe versus niedrige systemische Neutrophilenkonzentrationen vor ICT-Beginn (=“Baseline“, BE) (Lewis et al., 2006). Der Referenzbereich, den das Labor des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf angibt, in dem das Patientenblut untersucht wurde, bemisst sich auf 1,5-7,7 Mrd./l = 1,5-7,7/nl (Klinische Chemie, UKE). Gebhardt und Kollegen sind in ihren Analysen von einem ähnlichen Referenzbereich ausgegangen (2200-6300/ μ l = 2,2-6,3/nl) (Gebhardt et al., 2015).

In unserer Studie fanden sich auf der anderen Seite jedoch auch Hinweise dafür, dass zirkulierende Neutrophile gegen den Tumor gerichtet sein könnten, anstatt seine Progression zu fördern. So erreichten die Patienten mit hohen Neutrophilenkonzentrationen vor Therapiebeginn („Baseline“) ein verlängertes Gesamtüberleben (siehe **Abbildung 13B**). In Vorarbeiten zeigte sich jedoch ein verkürztes Gesamtüberleben, wenn die Neutrophilenzahl vor der Immuncheckpoint-Blockade (zum Zeitpunkt „Baseline“ bei Ipilimumab- bzw. Nivolumab-Therapie) erhöht war (Valpione et al., 2015, Nakamura et al., 2016, Ferrucci et al., 2016). Interessanter noch erscheint die Dynamik der Neutrophilen-Serum-Spiegel im Therapieverlauf. Im Falle einer starken Zunahme der systemischen Neutrophilenkonzentration zwischen „Baseline“ und „C4“ ergab sich überraschenderweise ein verlängertes progressionsfreies Überleben (siehe **Abbildung 14A**). Allerdings wirkte sich der Effekt nicht auf das Gesamtüberleben aus: Dem Kaplan-Meier-Schätzer zufolge war bei einer Zunahme der Neutrophilenkonzentration im Therapieverlauf das Gesamtüberleben verkürzt (siehe **Abbildung 14B**). Diese Beobachtung schien von herausragender Bedeutung und eine anschließend durchgeführte Pearson-Korrelation bestätigte den negativen Effekt hoher Neutrophilen-Spiegel: War das „C4“-Neutrophilen-Serum-Level höher als der Basalwert, korrelierte dies mit einem kürzeren Überleben (siehe **Abbildung 15**). Einige der aufgezeigten Resultate sind somit deckungsgleich mit dem protumoralen Effekt von S100A8/A9 (siehe **Abschnitt 4.1**). In der oben bereits erwähnten Vorarbeit von Gebhardt und Kollegen wurden in Ipilimumab-Non-Respondern neben erhöhten Zahlen von monozytischen MDSCs und Monozyten auch hohe „Baseline“-Neutrophilenzahlen festgestellt (Gebhardt et al., 2015). DAMPs wie S100A8/A9 wurden dabei als Mediatoren der Chemotaxis und Aktivierung von Neutrophilen identifiziert. Im Zytoplasma von aktivierten Neutrophilen wie auch in MDSCs wurden große Mengen an S100A8/A9 gefunden (Sinha et al., 2008, Vedder et al., 2020). Der enge Zusammenhang zwischen S100A8/A9 und neutrophilen Granulozyten erscheint durch die gezeigten gleichgerichteten Effekte im Tumorgeschehen sehr plausibel. Es gilt zu begründen, warum nicht in allen Analysen ein Zusammenhang zwischen zirkulierenden Neutrophilen und S100A8/A9 gefunden werden konnte. Diesbezüglich sollte berücksichtigt werden, dass möglicherweise nicht alle Subtypen von Neutrophilen S100A8/A9 in ihren Granula beherbergen und sezernieren (Ausführung siehe **Abschnitt 4.3.1**). Die Sekretion scheint außerdem mit dem

Aktivierungszustand der Neutrophilen verknüpft zu sein (Stroncek et al., 2005). Perego et al. haben sich mit der Reaktivierung einer Tumorerkrankung nach längerer Remission befasst und konnten zeigen, dass für die S100A8/A9-Freisetzung aus Neutrophilen Stresshormone verantwortlich waren (Ausführung vgl. **Abschnitt 4.3.1**) (Perego et al., 2020).

In weiteren Analysen dieser Arbeit wurden Quotienten herangezogen, wie z.B. die Neutrophilen/Leukozyten-Ratio, und sodann mit der Prognose korreliert. Ein hoher Anteil Neutrophiler an den Gesamtleukozyten zum Zeitpunkt „Baseline“ besaß einen antitumoralen Effekt, da das Gesamtüberleben der Patienten mit hoher Neutrophilen/Leukozyten-Ratio verlängert war (siehe **Abbildung 16B**). Wie andere ähnliche Ergebnisse, die oben beschrieben wurden, lässt sich dieses Resultat dahingehend einordnen, dass bereits in den 1970er Jahren (zunächst im Mausmodell) neutrophile Granulozyten als Anti-Tumor-Effektorzellen mit zytotoxischen Eigenschaften identifiziert wurden (Pickaver et al., 1972). Unter bestimmten Umständen, nämlich bei einer hochakuten Entzündungsreaktion, könnten andernfalls protumorale Neutrophile zur Tumorabwehr beitragen (Souto et al., 2011, Brandau et al., 2013). Ein Zusammenhang zwischen Neutrophilie und Tumorchemmung bestätigte sich beispielsweise in murinen Lungen-Prämetastasen und daraufhin auch bei Patientinnen mit Mammakarzinom (Granot et al., 2011, Lopez-Lago et al., 2013). Vermutlich können die vom Tumor sezernierten Chemokine IL-8, CXCL5, CCL2 und CCL5 Neutrophile zur Tumorabwehr aktivieren. Diese neutrophilen Granulozyten in der Zirkulation und in Prämetastasen wurden daraufhin als „Tumor-Entrained Neutrophils“ (TENs) bezeichnet (Granot et al., 2011).

In der Literatur ist breite Evidenz für die auch in dieser Arbeit berechnete NLR als negativer prognostischer Marker zu finden (Shen et al., 2014, Masucci et al., 2019, Mollinedo, 2019). Speziell wurde eine hohe NLR im Magen-, Pankreas- und kolorektalen Karzinom, aber auch im metastasierten Melanom mit einem verkürzten Überleben in Verbindung gebracht (Cho et al., 2014, Stotz et al., 2013, Walsh et al., 2005, Capone et al., 2018). Da eine niedrige NLR in univariaten und multivariaten Überlebenszeitanalysen mit einem verkürzten progressionsfreien Überleben und Gesamtüberleben der Melanompatienten assoziiert werden konnte, schlugen Capone und Kollegen die NLR als Biomarker vor. Bezüglich einer hohen NLR vor

Therapiebeginn ergab sich in der vorliegenden Arbeit jedoch ein verlängertes Gesamtüberleben (siehe **Abbildung 17B**). Der Betrachtung der Differenz zwischen „Baseline“ und „C4“ kann wie bereits erwähnt eine höhere Aussagekraft für die Beurteilung des Krankheitsverlaufs sowie Therapieentscheidungen beigemessen werden. Die selbst angefertigten Analysen offenbarten einen ungünstigen Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten, wenn sie zum Messzeitpunkt „C4“ eine höhere NLR aufwiesen als vor Therapiebeginn (siehe **Abbildung 18**). Insbesondere wenn man die Entwicklung der Level im Therapieverlauf beobachtete, gab die NLR also Hinweise auf einen Tumor fördernden Einfluss der im Serum vorkommenden Neutrophilen.

Die Dichotomie der Neutrophilenfunktion und der augenscheinliche Widerspruch zwischen überwiegend negativen, aber auch positiven Einflüssen von Neutrophilen auf das Überleben, lassen sich gegebenenfalls dadurch erklären, dass abhängig vom Zellreifestadium eine ausgeprägte Neutrophilenheterogenität im Blut besteht (Ausführung siehe **Abschnitte 4.3.1 und 4.3.2**) (Brandau, 2013). Um dem bisher unzureichend geklärten Effekt von Neutrophilen im Tumorgeschehen auf den Grund zu gehen, sollte mittels der Immunfluoreszenzfärbungen von Tumorgewebe die Neutrophileninfiltration quantifiziert sowie mit der Prognose der Melanompatienten in Beziehung gesetzt werden.

4.3 Die Effekte von Tumor infiltrierenden Neutrophilen auf die Tumorprogression

Neutrophile und andere Immunzellen können bis zu 90% der Tumormasse ausmachen (Sionov et al., 2015b). Es liegt nahe, dass sie abhängig von den Signalen, die sie im Tumormikromilieu aussenden und empfangen, in erheblichem Maße Einfluss auf die Tumoreindämmung bzw. die Tumorausbreitung nehmen können (Fridman et al., 2012). In der Analyse von 292 Tumorgewebeproben einer Kohorte aus 113 Melanompatienten mit sämtlichen Tumorstadien (14 Stadium I-, 60 Stadium II-, 29 Stadium III- und 8 Stadium IV-Patienten) ergab sich, dass zwischen der Neutrophileninfiltration in den drei Tumorarten (Naevi, Primarien und Metastasen) signifikante Unterschiede bestanden: In Naevi waren die wenigsten Neutrophilen zu detektieren und in Primarien die meisten neutrophilen Granulozyten (siehe **Abbildung 24**). Auch bei separierter Betrachtung von neutrophilenreichen und

neutrophilenarmen Gewebestanden war die stärkste Neutrophileninfiltration in Primärmelanomen zu finden (siehe **Abbildung 25**).

In der Literatur wird davon ausgegangen, dass die Zahl Tumor infiltrierender Neutrophiler im Laufe der Progression des Melanoms ansteigt (Simiczyjew et al., 2020). Demzufolge wäre zu erwarten gewesen, dass die Metastasen unserer Expressionsanalyse eine stärkere (und keine geringere) Neutrophileninfiltration als Primarien aufweisen. Es erscheint jedoch stimmig, dass sich in Metastasen weniger intakte Neutrophile anfärben ließen, weil bei zunehmender Aktivierung von Neutrophilen diese im Rahmen von NETose untergehen können (Erläuterung der NETose siehe **Abschnitt 4.3.4**). Aktivierte Neutrophile hätten somit Einfluss auf das Tumorbett und die Tumorprogression nehmen können, ohne als intakte Zellen noch nachweisbar zu sein.

Hinsichtlich der Wirkung lokaler Neutrophileninfiltration auf die Prognose der 113 inkludierten Melanompatienten stand unter den Ergebnissen dieser Arbeit im Vordergrund, dass eine ausgeprägte Neutrophileninfiltration im Primarius mit einem reduzierten progressionsfreien Überleben einherging (siehe **Abbildung 26**). Eine starke Infiltration solider Tumore durch Neutrophile und die Konsequenz der verschlechterten Prognose ist in der Literatur, auch beim Melanom, häufig beschrieben worden (Yazdani et al., 2019, Simiczyjew et al., 2020). In diversen publizierten Studien wurde demonstriert, dass eine erhöhte Anzahl von neutrophilen Granulozyten im Tumorbett mit einer deutlich schlechteren Prognose einherging (Gebhardt et al., 2015, Jensen et al., 2012, Powell and Huttenlocher, 2016, Templeton et al., 2014, Queen et al., 2005). Mechanistisch haben Bald und Kollegen die Auswirkungen von UV-Strahlung auf das Tumormikromilieu untersucht und festgestellt, dass Neutrophile via Toll-Like Receptor 4 (TLR4) von DAMPs (wie bspw. auch High Mobility Group Box 1, HMGB1) rekrutiert und aktiviert werden (Bald et al., 2014b). DAMPs werden bei UV-Schädigung von epidermalen Keratinozyten freigesetzt. Die UV-induzierte Neutrophileninfiltration geht mit einem Entzündungszustand einher, in dem es vermehrt zu Angiogenese kommt und Angiotropismus gefördert wird. In der Forschung zur Sepsis konnte ebenfalls gezeigt werden, dass DAMPs (wie z.B. S100A8/A9) Makrophagen und andere Immunzellen dazu anregen, Zytokine und Chemokine zu produzieren. Dadurch werden wiederum große Zahlen Neutrophiler ins Gewebe gelockt. Es stellte sich heraus, dass aktivierte Neutrophile Gewebsentzündung fördern, indem sie ROS, iNOS und NETs

produzieren und freisetzen (Denning et al., 2019). Dadurch steigt beim Melanom das Metastasierungsrisiko erheblich (Bald et al., 2014b). Dieses gilt insbesondere für ulzerierte maligne Hauttumore, denn Neutrophile konnten im Falle von Ulzeration in sehr großer Zahl im Tumorbett vorgefunden werden (Mandala and Massi, 2014). Aus diesem Kontext ergibt sich, dass das Kriterium des ulzerierten Tumors für die Prognose der Melanomerkrankung eine bedeutende Rolle spielt (Bonnelykke-Behrndtz and Steiniche, 2017). In der vorliegenden Arbeit wurde zwischen exulzerierenden und nicht-ulzerierten Tumoren nicht unterschieden. Eine histologische Begutachtung des UV-Schadens („photodamage“) der entnommenen Proben würde sich für folgende Forschungsprojekte anbieten.

Eine Besonderheit dieser Arbeit stellte die Möglichkeit dar, den Krankheitsverlauf von Melanompatienten zu analysieren. Es ergab sich entsprechend der oben zitierten Literatur ein verkürztes progressionsfreies Überleben, wenn im Primarius eines Patienten verglichen mit seinem Naevus deutlich mehr Neutrophile detektierbar waren (siehe **Abbildung 27**). Wenn in der Metastase eines Patienten im Vergleich zu dessen Primarius sehr viel mehr Neutrophile zu finden waren, wurde hingegen ein verlängertes progressionsfreies Überleben gemessen (siehe **Abbildung 28**). Dies würde für den antitumoralen Einfluss einer vergleichsweise starken Neutrophileninfiltration in Metastasen sprechen. Bei diesen Neutrophilen handelt es sich womöglich um nicht-aktivierte Zellen. Leider war die Patientenkohorte in der Krankheitsverlaufs-analyse sehr klein und hieraus ergibt sich eindeutig eine Limitation der vorliegenden Arbeit. Zudem würde es weiterer Untersuchungen bedürfen, welche sich auf Kohorten mit Immuntherapie beziehen und welche sodann Patientengruppen mit Ansprechen versus ohne Ansprechen auf ICT getrennt voneinander betrachten.

Um sowohl die Effekte von Gewebeneutrophilen differenzierter zu untersuchen, als auch die in **Abschnitt 4.2** beschriebene ambivalente Rolle von zirkulierenden Neutrophilen zu erklären, sollen im Folgenden Unterschiede zwischen systemisch und lokal vorkommenden Neutrophilenpopulationen, deren Heterogenität und Polarisierung erörtert werden.

4.3.1 Neutrophilenheterogenität

Bis heute konnten 19 verschiedene Subtypen unter den Neutrophilen nachgewiesen werden (Garley and Jablonska, 2018). Im Blut von Tumorpatienten wurden primär drei Populationen neutrophiler Granulozyten gefunden. Zum einen handelt es sich um große unreife Granulozyten-artige myeloide Suppressorzellen niedriger Dichte (Granulocyte-like Myeloid Suppressor Cells, G-MDSCs, immature Low-Density Neutrophils, LDN), zum zweiten um reife Neutrophile niedriger Dichte (mature LDN). Beide haben protumorale Funktionen. Zum dritten wurden kleine ausgereifte Neutrophile hoher Dichte (mature High-Density Neutrophils, HDN) mit antitumoraler Wirkung identifiziert (siehe **Abbildung 29**) (Sagiv et al., 2015, Sionov et al., 2015a). Vor diesem Hintergrund ließe sich der scheinbare Widerspruch zwischen den negativen und den positiven Einflüssen zirkulierender Neutrophiler auf den Tumorprogress lösen. Die Zusammensetzung der im Blut gemessenen neutrophilen Granulozyten kann stark variieren. In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass sich protumorale unreife LDN sowohl in protumorale reife LDN als auch in antitumorale reife HDN verwandeln können (siehe **Abbildung 29**) (Shaul and Fridlender, 2018).

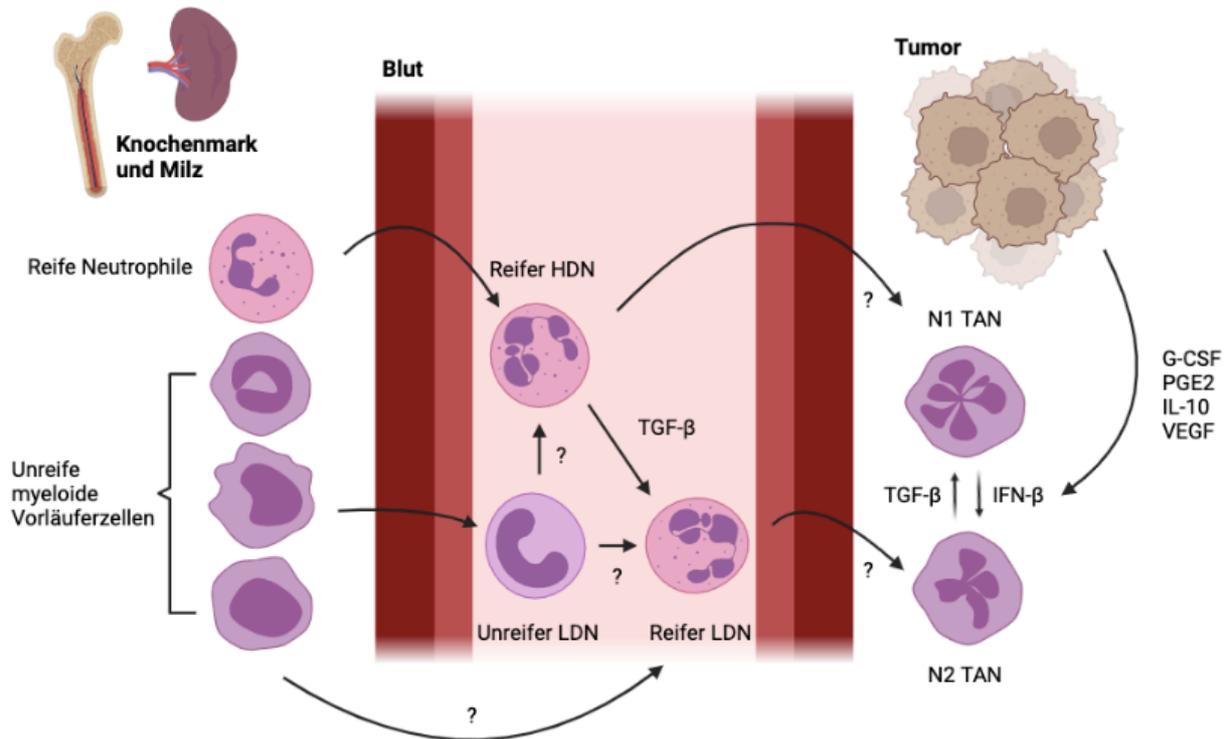


Abbildung 31: Mögliche Herkunft der Neutrophilen-Subgruppen.

Hypothesen zufolge stammen im Blut vorkommende unreife Neutrophile niedriger Dichte (immature Low-Density Neutrophils, LDN) aus dem Knochenmark oder der Milz. Aus der reifen Fraktion hoher Dichte (High-Density Neutrophils, HDN) könnte der reife Subtyp niedriger Dichte hervorgehen. Da sich in frühen Mastumoren gegen das Malignom gerichtete zytotoxische Tumor-assoziierte Neutrophile (TANs) fanden, während diese in fortgeschrittenen Tumoren nicht detektiert wurden, steht ein N1-N2-Switch von TANs zur Diskussion (Shaul and Fridlender, 2018).

Abkürzungen: LDN: Low-Density Neutrophils, HDN: High-Density Neutrophils, TGF- β : Transforming Growth Factor Beta, IFN- β : Interferon beta, IL-10: Interleukin 10, TAN: Tumor-Associated Neutrophil, N1: Neutrophilen-Subtyp 1, N2: Neutrophilen-Subtyp 2, PGE2: Prostaglandin E2, VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor.

Tumore können die Freisetzung von Neutrophilen aus dem Knochenmark sowie die Entwicklung der Zellen beeinflussen (Coffelt et al., 2016). Vom Tumor direkt oder indirekt – beispielsweise über das von den Gamma-Delta-T-Zellen sezernierte G-CSF oder GM-CSF sorgen dafür, dass reife, aber auch vermehrt unreife Neutrophile in die Zirkulation gelangen und proliferieren (siehe **Abbildung 30**). Der Prozess, in dem große Zahlen Neutrophiler im Tumor befallenen System verbraucht und nachgebildet werden, wurde als „emergency granulopoiesis“ bezeichnet (Manz and Boettcher, 2014). Ein hoher Zellumsatz innerhalb bestimmter Neutrophilen-Subsets könnte mit einem vermehrten S100A8/A9-Release verbunden sein. Die protumorale Funktion unreifer Neutrophiler mag auch damit zusammenhängen, dass in diesen Vorläuferzellen Tumor abwehrende neutrophile Granula noch nicht synthetisiert sind (Hager et al., 2010). Allerdings können auch reife Neutrophile Granula enthalten, die dem Tumor helfen, sich auszubreiten. Dazu gehören beispielsweise solche Granula

mit einem hohen Gehalt an Matrixmetalloproteasen, welche die extrazelluläre Matrix verändern und Angiogenese ermöglichen (Ardi et al., 2007). Im Blutstrom detektierte, mit einem positiven Einfluss auf das Überleben assoziierte Neutrophile könnten als reife HDN antitumorale Granula beinhalten, einem weniger rapiden Zellumsatz unterliegen und somit weniger S100A8/A9 sezernieren. Studien haben S100A8/A9 im Zytosol von Neutrophilen sowie in deren sekundären Granula nachgewiesen und gezeigt, dass S100A8/A9 insbesondere von aktivierten Neutrophilen bei „Zellstress“ (wie z.B. NETose) aus sog. „spezifischen Granula“ freigesetzt wird (Stroncek et al., 2005). Anhand dieser Argumentationskette wäre nachvollziehbar, warum die Effekte von zirkulierenden, gegebenenfalls nicht aktivierten bzw. nicht „gestressten“ neutrophilen Granulozyten und S100A8/A9 auf das Überleben in der hier unternommenen Messung nicht gleichgerichtet waren. Im Rahmen zukünftiger Forschungsprojekte erscheint es sehr sinnvoll, die Granulazusammensetzung bei Neutrophilen zu adressieren und genauer zu untersuchen. Urban und Kollegen beispielsweise haben in einem anderen Kontext für den Nachweis und die Quantifizierung von S100A8/A9 in neutrophilen NETs die Methode der hochauflösenden Elektronenmikroskopie genutzt (Urban et al., 2009). Auch die Durchführung einer Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie käme für die Erforschung neutrophiler Granula in Betracht (Bjornsdottir et al., 2016, Depreester et al., 2017).

Gewebeneutrophile (sog. Tumor-assoziierte Neutrophile, TANs) werden unter anderem von Signalen, die Tumorzellen aussenden, ins Tumorbett gelockt. Hier spielt auch S100A8/A9 eine Rolle. TANs unterscheiden sich bezüglich ihres Transkriptionsprofils von naiven Neutrophilen aus dem Knochenmark sowie von G-MDSCs (siehe **Abbildung 30**) (Fridlender et al., 2012, Mishalian et al., 2013).

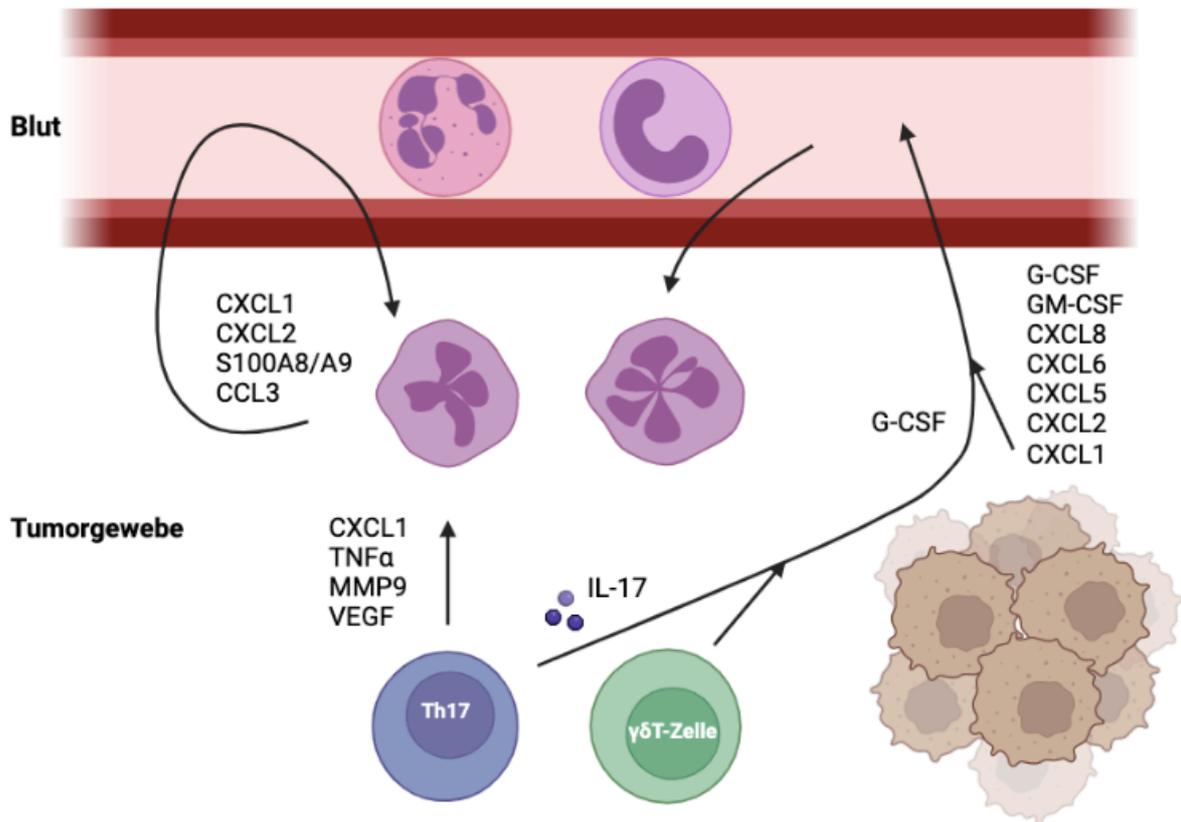


Abbildung 32: Rekrutierung von Neutrophilen ins Tumorbett: Tumor-assoziierte Neutrophile.

Von Tumorzellen freigesetztes S100A8/A9, CXCL1 und CXCL2 fördern die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten (rosé) aus dem Knochenmark über den Blutstrom in die Tumormikroumgebung. Die autokrine Sekretion von CXCL1 und CXCL2 bildet einen positiven Feedbackmechanismus und es werden weitere Neutrophile ins Tumorbett gelockt. Th17-Zellen und Gamma-Delta-T-Zellen führen über IL-17 und G-CSF zur weiteren Expansion der neutrophilen Granulozyten (Shaul and Fridlender, 2018).

Abkürzungen: CXCL-: C-X-C Chemokin Ligand, GM-CSF: Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor, G-CSF: Granulocyte Colony Stimulating Factor, IL-: Interleukin, CCL-: C-C Motif Chemokin Ligand, TNF α : Tumornekrosefaktor alpha, MMP-: Matrixmetallopeptidase, VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor.

Neutrophile aus dem Tumorgewebe und aus drainierenden Lymphknoten exprimieren immunsuppressive Gene wie Nos2/iNOS (Nitric Oxide Synthase 2, inducible), Arginase 1 (Arg1) und CD274/PD-L1 (Gabrilovich et al., 2012). Aus der immunsuppressiven Wirkung von Neutrophilen in der Tumormikroumgebung erschließt sich die Tumor fördernde Rolle, welche auch durch die in dieser Studie generierten Ergebnisse in Primärmelanomen vermutet werden kann. Es sind allerdings zwei unterschiedliche Populationen von TANs bekannt (Subtypen N1 und N2, siehe **Abbildung 29**). In der Literatur finden sich somit ebenso valide Messungen eines antitumoralen Einflusses von gewebeständigen Neutrophilen (Grecian et al., 2018, Fridlender et al., 2009, Giese et al., 2019). Protumorale reife LDN können sich Hypothesen zufolge in protumorale N2-Neutrophile verwandeln und antitumorale reife HDN können zu antitumoralen N1-Neutrophilen werden – N1 und

N2 sind aber auch in der Lage, unter der Steuerung durch die Zytokine Transforming Growth Factor beta (TGF- β) und Interferon beta (INF- β) einen Switch zu vollführen (siehe **Abbildung 29**) (Shaul and Fridlender, 2018, Pylaeva et al., 2016, Jablonska et al., 2010). Da Eingriffe in die Wirkweise der womöglich mehrheitlich in dieser Studie nachgewiesenen N2-Neutrophilen, oder eine Umwandlung von N2-Neutrophilen in N1-Neutrophile, für die Tumorthherapie von großem Interesse wären, soll als Nächstes die Polarisierung von Neutrophilen noch näher beleuchtet werden (Andzinski et al., 2016).

4.3.2 Neutrophilenpolarisierung: N1 und N2

Im Weiteren wird die Phänotypplastizität und duale Rolle von Neutrophilen im Tumorgewebe detaillierter aufgezeigt. Hypothesen zufolge finden sich Neutrophile in frühen Tumorerkrankungen vermehrt in der Peripherie und sind antitumoral wirksam (Singhal et al., 2016, Eruslanov et al., 2014). In fortschreitenden Tumoren akkumulieren sie im Parenchym und haben protumorale Effekte (Patel et al., 2018, Sagiv et al., 2015). Ebenso wie Makrophagen können Neutrophile in zwei Typen unterteilt werden (Mills et al., 2000). Antitumorale Typ 1 Neutrophile (N1) produzieren die proinflammatorischen Zytokine IL-12 und CCL3 (Yang et al., 2017). Sie können Tumorzellen einiger Tumorzelllinien direkt eliminieren (Gerrard et al., 1981, Yan et al., 2014). Mechanistisch ist Hydrogenperoxid (H_2O_2) beteiligt. Zudem wurden Neutrophile als Mediatoren der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity, ADCC) identifiziert (Fridlender and Albelda, 2012). Ihre Funktion in diesem Zusammenhang wird als „Trogoptose“ bezeichnet und beschreibt die Nekrose Antigen-opsonierter Tumorzellen über Fc-Rezeptoren (Matlung et al., 2018). Die zytotoxische Wirkung auf den Tumor und die Metastasierungshemmung durch naive Neutrophile im frühen Tumorstadium sowie ihre Fähigkeit, potente T-Zell-Antworten zu stimulieren, wurden unter anderem in mehreren Studien zu Lungentumoren postuliert (Granot et al., 2011, Eruslanov et al., 2014). Somit verfügen N1-Neutrophile über diverse Funktionen, mittels derer sie den Tumor direkt angreifen und andere Zellen der Immunabwehr mobilisieren können. Insofern erscheint die Vermehrung von N1-Neutrophilen von großer therapeutischer Relevanz zu sein.

Andererseits fördern N2-Neutrophile das lokale Tumorwachstum und die Metastasierung über eine Vielzahl von Mechanismen (Zhang et al., 2016). Typ 2 Neutrophile bilden die Immuntoleranz induzierenden Faktoren IL-10, CCL2 und Arginase-1 (Yang et al., 2017). N2-polarisierte TANs fördern die Tumorprogression außerdem, indem sie Entzündungsfaktoren wie neutrophile Elastase und Prostaglandin E₂ ausschütten und indem sie NETs bilden (siehe **Abschnitt 4.3.4**) (Oberg et al., 2019). Sie sezernieren überdies die proangiogenen Faktoren MMP9 und VEGF (Treffers et al., 2016, Zhang et al., 2016). TGF- β ist im Tumorbett für die Polarisierung der Neutrophilen zu Typ 2 verantwortlich (Fridlender et al., 2009). Einen möglichen therapeutischen Angriffspunkt stellt also TGF- β dar (Ausführung siehe **Abschnitt 4.3.6**). Im Magenkarzinom wurde beobachtet, dass Neutrophile im Tumormikromilieu auf ein GM-CSF-Signal folgend verstärkt PD-L1 exprimieren, welcher mit PD-1 auf T-Zellen interagiert und die Anti-Tumor-Aktivität und Vermehrung der T-Lymphozyten hemmt (Zhang and Xu, 2017). Dieses Phänomen stellt prognostisch einen großen Nachteil dar, da T-Zell-depletierte Tumore ein besonders schlechtes Ansprechen auf ICT zeigten (Zhang et al., 2019). Im hepatozellulären Karzinom konnte beobachtet werden, dass auch Tumor-assoziierte Fibroblasten (Cancer-Associated Fibroblasts, CAFs) die PD-L1-Expression auf Neutrophilen induzieren (Cheng et al., 2018). Zudem rekrutieren Neutrophile Tregs und Typ 2 Makrophagen (M2), welche die zytotoxische Aktivität von CD8⁺ T-Zellen inhibieren (Giese et al., 2019). Die Typ 2-Teilpopulation von Makrophagen modifiziert die Tumorumgebung überdies dahingehend, dass sie die Motilität von Tumorzellen erhöht und die Angiogenese begünstigt (Quatromoni and Eruslanov, 2012). Somit konnte man unter Inhibition der M2-Makrophagen-Vermehrung Resistenzen bei Immuntherapie im Mausmodell vermindern (Zhu et al., 2014). Zusammenfassend wirken N2-Neutrophile selbst wie auch die von ihnen induzierten Zellpopulationen und Signalkaskaden auf vielfältige Weise protumoral, und Typ 2-Neutrophile können andere Zellen der Tumorabwehr, vor allem T-Lymphozyten, in ihrer Funktion behindern. Die Inhibition der N2-Vermehrung erscheint therapeutisch von großem Interesse.

Eine getrennte Anfärbung der beiden Populationen, N1 und N2, wäre für die vorliegende Arbeit interessant gewesen. Tatsächlich wurde bisher aber kein Oberflächenmarker gefunden, durch welchen sich N1- und N2-Neutrophile

voneinander unterscheiden ließen (Fridlender et al., 2009). Nabizadeh und Kollegen unterstützten die Hypothesen einer differenzierten Rolle von Neutrophilen je nach ihrem Aktivierungsstatus (Nabizadeh et al., 2016). Hier könnte ein Ansatzpunkt für zukünftige Forschung liegen.

Geht der Entzündungsstatus im Tumorbett von einem akuten in einen chronischen über, so verändert sich auch die Zytokinexpression und es könnten bis dato antitumoral wirksame N1-Neutrophile aktiviert werden und sich in Pro-Tumor-Zellen verwandeln (Souto et al., 2011, Korniluk et al., 2017). Speziell das Melanom wird mit einem chronischen Entzündungszustand assoziiert (Gebhardt et al., 2015). Unter dieser Voraussetzung ließe sich erklären, dass TANs im Melanom bei Krankheitsfortschritt in großer Zahl aktiviert werden und insbesondere eine protumorale Wirkung haben könnten, wie sie in der Primärieanalyse nachgewiesen wurde (siehe **Abschnitt 4.3 und Abbildung 26**). Im Folgenden sollen die Mechanismen der Tumor fördernden Wirkung von N2-Neutrophilen im Hinblick auf mögliche therapeutische Angriffspunkte im Einzelnen erörtert werden.

4.3.3 Förderung der Tumorprogression durch N2-Neutrophile

N2-Neutrophile treiben wie beschrieben mittels diverser Mechanismen die Tumorausbreitung voran. Sie sekretieren diverse Wachstumsfaktoren, darunter VEGF, PDGF und TGF- β , welche unter anderem die Angiogenese fördern. Indem sie zudem die Adhäsion zirkulierender Tumorzellen ermöglichen, können sich Metastasen entwickeln (Granot et al., 2011). Lokale Tumorprogression, Angiogenese und Migrationskapazität bzw. Metastasierung sowie Tumor-assoziierte Thrombose werden auch durch NETose beschleunigt (Huang et al., 2020). Die protumorale Rolle der NETose wurde in diversen Studien, unter anderem im Melanom und speziell im fortgeschrittenen, ulzerierten Tumor beschrieben (Erpenbeck and Schon, 2017, Cools-Lartigue et al., 2013, Schedel et al., 2020). Da die NETose eine Besonderheit unter den Neutrophilen-Funktionen dargestellt, soll diesem Phänomen ein eigenes Kapitel gewidmet werden.

4.3.4 Neutrophile NETose

Neutrophile haben die einzigartige Fähigkeit zur NETose, einer speziellen Form des programmierten Zelltodes (Fuchs et al., 2007). Werden polymorphkernige neutrophile Granulozyten aktiviert, können sie NETs ausbilden. Diese sind Protein-umhüllte Stränge, bestehend aus Proteinen der Granula und DNA, welche netzartig ausgeworfen werden und Pathogene immobilisieren können (siehe **Abbildung 31**) (Brinkmann et al., 2004). Man kann zwischen den zwei Formen „suizidale“ und „vitale“ NETose unterscheiden. Ersteres Phänomen läuft langsamer ab und es kommt zum Reißen der Plasmamembran, wodurch die Zelle untergeht, während die schnell erfolgende vitale NETose sich dadurch auszeichnet, dass ein DNA-gefülltes Vesikel bei intakter Zellmembran exozytiert wird und der neutrophile Granulozyt trotz fehlender DNA weiterhin Mikroorganismen phagozytiert und abtötet (Yipp and Kubes, 2013). NETs fördern die intravasale Blutgerinnung. Durch eine lokal fokussierte Entzündungsreaktion bleiben gesunde Körperzellen jedoch vor Schädigung geschützt (Powell and Huttenlocher, 2016).

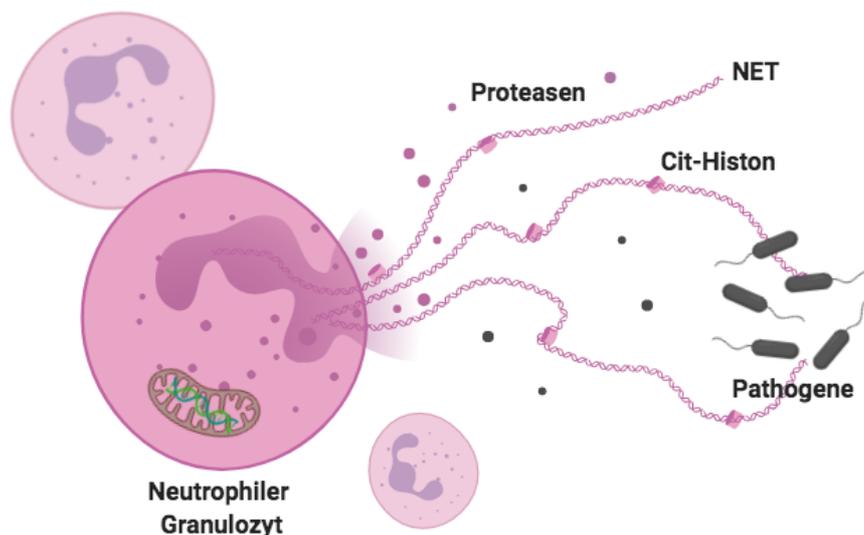


Abbildung 33: NETose des neutrophilen Granulozyten.

Aktivierte polymorphkernige neutrophile Granulozyten können Protein-umhüllte Stränge, bestehend aus Proteinen der Granula und DNA netzartig auswerfen, welche Pathogene immobilisieren.
Abkürzungen: NET: Neutrophil Extracellular Traps, Cit: Citrullin.

NETs enthalten immunmodulierende Faktoren, die das proinflammatorische Mikromilieu prägen sowie Tumorzellen zur Proliferation anregen (Wu et al., 2019a, Minns et al., 2019). Überdies können NETs Tumorzellen die Extravasation

ermöglichen und tragen auf diese Weise zur Metastasierung bei (Cools-Lartigue et al., 2013). NET-DNA wurde sogar als chemotaktischer Faktor beschrieben, welcher Tumorzellen anlocken kann (Yang et al., 2020). DNA und Histone, die in Form von NETs freigesetzt werden, binden an von Willebrand Faktor (VWF), Transkriptions- sowie Komplementfaktoren wie Complement 3a (C3a) und 5a (C5a) (Merle et al., 2015, Reis et al., 2019). Letztere wiederum verursachen Thrombosen durch eine Aktivierung der Thrombozyten und behindern insbesondere die T-Zell-Zytotoxizität (siehe auch **Abschnitt 4.4.2**). Es hat sich gezeigt, dass Complement 3 (C3) die IL-10-Produktion hemmt und auf diesem Wege eine suffiziente Antwort der CD8⁺ T-Zellen unterdrückt wird (Peng et al., 2016). Der direkte Zusammenhang inflammatorischer und thrombotischer Vorgänge bei Tumorgeschehen kann als „Immunothrombose“ bezeichnet werden (Engelmann and Massberg, 2013). Im Weiteren soll es speziell um die Interaktion zwischen Neutrophilen und T-Zellen gehen.

4.3.5 Modulation der T-Zell-Antwort durch Neutrophile

Neutrophile können sowohl positive als auch negative Einflüsse auf die T-Zell-Aktivierung nehmen. Im Entzündungszustand werden MHC II und beispielsweise das ko-stimulatorische Molekül CD86 auf Neutrophilen hochreguliert und letztere fungieren dann ähnlich wie dendritische Zellen (Dendritic Cells, DCs) als Antigen-präsentierende Zellen (Antigen-Presenting Cells, APCs) (Takashima and Yao, 2015). Auf der anderen Seite verhindern G-MDSCs die T-Zell-Aktivierung mittels ROS (Hock et al., 2012). In der Folge wird der T-Zell-Rezeptor (T-Cell Receptor, TCR) vermindert auf T-Zellen exprimiert (Loeuillard et al., 2020). Die Sekretion von Serinproteasen und Arginase-1 aus neutrophilen Granula führt zur Inaktivierung von Zytokinen und Zytokinrezeptoren, die an der T-Zell-Aktivierung beteiligt sind (Treffers et al., 2016). Auch wird die T-Zell-Aktivierung dadurch gehemmt, dass Neutrophile IL-10 ausschütten (Yang et al., 2017). Neutrophile können die Zytotoxizität von T-Zellen blockieren, da sie iNOS exprimieren und NO produzieren (Coffelt et al., 2015). Bemerkenswerterweise wird in T-Zellen sogar Apoptose induziert: Der durch Neutrophile exhibierte PD-1-Ligand kann INF- γ -abhängig den Zelltod von T-Zellen initiieren, indem diese an PD-L1 binden (de Kleijn et al., 2013). In der Zusammenschau dieser Mechanismen erscheint es sinnvoll, die Infiltration von T-

Zell-Populationen im Tumor und deren Interaktion mit Neutrophilen genauer zu untersuchen. Hierfür käme eine Immunfluoreszenzfärbung von T-Zellen sowie eine Ko-Färbung von T-Zellen und Neutrophilen infrage. Durch diese Experimente ließe sich der bedeutsame Link zwischen T-Zellen und Neutrophilen genauer beleuchten. Mit Blick auf eine mögliche Therapie ist die zeitliche Komponente der Medikamentengaben von übergeordnetem Interesse: Tumore, die reich an N2-Neutrophilen und dadurch bereits zu T-Zell-armen Geweben geworden sind, zeigen wie bereits erwähnt ein besonders schlechtes Ansprechen auf ICT. Es wäre therapeutisch denkbar, die Anti-T-Zell-Aktivität von Neutrophilen zu hemmen, bevor Immuncheckpoint-Inhibitoren (ICI) verabreicht werden. Letztere könnten sodann effektiver wirken und es würden verbesserte Ansprechraten erreicht. Die PD-L1/PD-1-Interaktion zwischen Neutrophilen und T-Zellen zu verhindern, stellt das Zentrum dieser Überlegung dar (Ausführung siehe **Abschnitt 4.4.2 und Abbildung 33**). Im Folgenden soll beschrieben werden, welche weiteren Aspekte für die T-Zell-Depletion und ein protumorales Mikromilieu von Bedeutung sind sowie ICT-Resistenzen verursachen können.

4.3.6 Charakteristika einer protumoralen Tumormikroumgebung

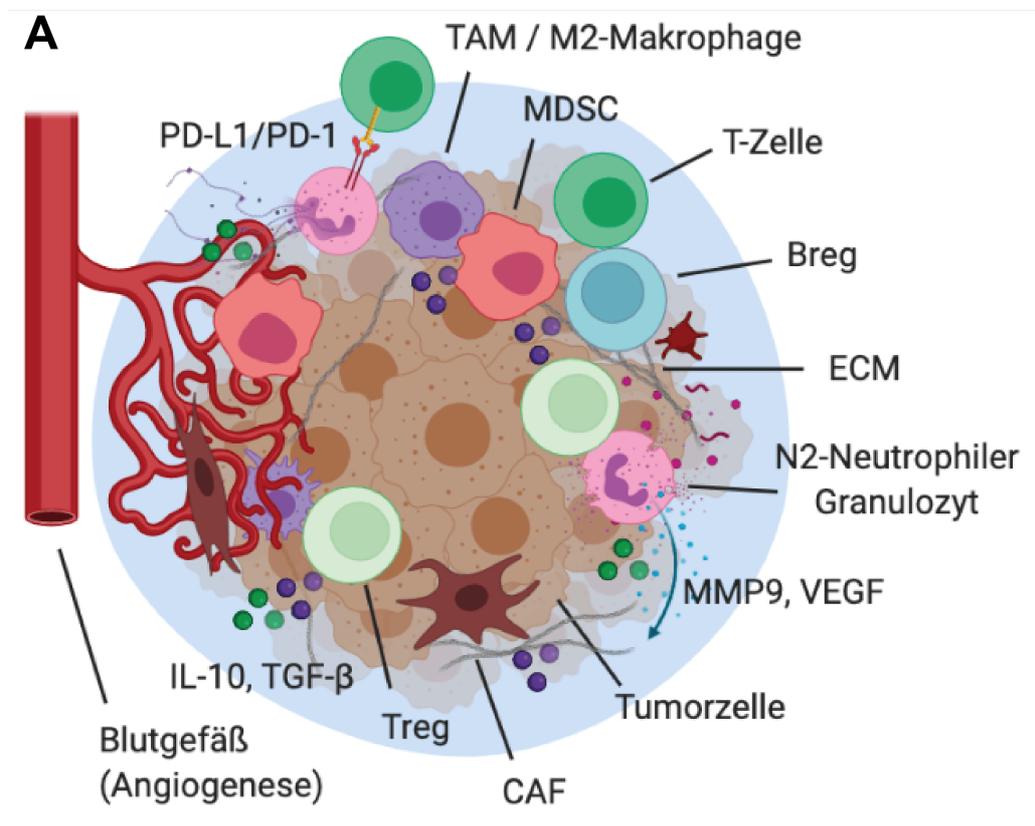
Die permanente Expression von PD-1 auf tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) ist mit einer schlechten Prognose und Rezidiven assoziiert (Thommen et al., 2015). TGF- β hat multiple Funktionen in der Tumormikroumgebung und trägt dazu bei, dass PD-1 auf T-Zellen hochreguliert wird (Park et al., 2016). Von Tumorstammzellen, Tregs, Regulator-B-Zellen (Bregs), Tumor-assoziierten Makrophagen (TAMs), Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs) sowie in großen Mengen auch von MDSCs sezerniertes TGF- β spielt eine entscheidende Rolle für den immunsuppressiven Charakter des Tumormikromilieus (siehe **Abbildung 33A**) (Ahmadi et al., 2019, Gabilovich and Nagaraj, 2009). Die Proliferation von CD8⁺ T-Zellen wird durch TGF- β gehemmt, indem es über bestimmte Signalwege eine Herunterregulierung von IL-2 bewirkt (Wolfrum et al., 2004). Auch die zytotoxische Wirkung von T-Zellen kann direkt beeinträchtigt werden (Zhang and Bevan, 2012). TGF- β -Überexpression steht außerdem mit Hypoxie im Zusammenhang (Hatfield et al., 2015). Intratumoral ist Hypoxie vorherrschend. Geringe Sauerstoffkonzentrationen erhöhen das Metastasierungspotenzial der Tumorzellen (Vaupel and Multhoff, 2018). Der

Hypoxie-Induzierte Faktor 1 alpha (HIF-1 α) bestimmt den Effektor-Status von CD8+ T-Zellen, indem er das zytolytische Molekül Granzym B, ko-stimulatorische Moleküle sowie Checkpointrezeptoren auf T-Zellen kontrolliert (Palazon et al., 2017). Zudem wird die Differenzierung und Reifung von dendritischen Zellen behindert, wodurch es zur verminderten Aktivierung der T-Zellen kommt (Corcoran and O'Neill, 2016). Auch besteht eine Wirkung auf CD4+ T-Zellen, deren Konversion zu Tregs über die Induktion von Forkhead Box P3 (FOXP3) gesteigert wird (Hsu and Lai, 2018). Tregs werden über CCL28 ins hypoxische Milieu gelockt. HIF-1 α regt in MDSCs die Transaktivierung von PD-L1 an. Im Tumormikromilieu ergibt sich daraus eine erhöhte T-Zell-Toleranz und damit eine immunsupprimierte Umgebung (Noman et al., 2014). Im Übrigen tritt im hypoxischen Gewebe eine Resistenz der Tumorzellen gegen T-Zell-Angriffe auf (Noman et al., 2009). Ein weiteres Charakteristikum des Tumorgewebes ist der kompartimentierte pH-Wert. Es häufen sich saure metabolische Abfallprodukte wie Laktat und Kohlenstoffdioxid (CO₂) an (Parks et al., 2017). Ein Grund dafür ist die hohe metabolische Aktivität im Tumor. Eine weitere Ursache ist die geringe Perfusion. Tumorzellen sind an einen extrazellulären pH-Wert im sauren Bereich adaptiert. Melanomzellen reagieren auf Azidose mit MMP-9- und MMP-2-Produktion und setzen die proangiogenen Faktoren VEGF und IL-8 frei (Bohme and Bosserhoff, 2016).

Neben PD-1 und CTLA-4 wurden weitere Immuncheckpoints identifiziert, die das protumorale Mikromilieu aufrechterhalten und ursächlich für ein Nicht-Ansprechen auf ICT sein können. Dazu gehören beispielsweise das Lymphozyten-Aktivierungsgen 3 (LAG-3) mit seinem Liganden MHC II sowie das T-Zell-Immunglobulin und die Muzin-enthaltende Domäne 3 (TIM-3) mit seinen löslichen Liganden Galectin-9 und HMGB1 (Joller and Kuchroo, 2017, Pardoll, 2012). Es gibt bereits Ansätze, diese weiteren Checkpoints neben PD-1 und CTLA-4 mit Antikörpern zu blockieren (Russell et al., 2021). Als Beispiel ist die Behandlung mit dem Anti-LAG-3-Antikörper LBL-007 zu nennen, der an aktivierte T-Zellen bindet und die Sekretion von IL-2 unterstützt (Yu et al., 2019). Auch bi-spezifische Antikörper wie LY3415244 gegen TIM-3 und PD-L1 wurden jüngst als Kombinationstherapie in klinischen Studien bei fortgeschrittenen Tumoren getestet (Hellmann et al., 2021).

Zusammenfassend führen die in diesem Kapitel erörterten Bedingungen dazu, dass Tumore „erkalten“, das heißt, dass sie arm an infiltrierenden Immunzellen sind und diverse in der Theorie mögliche Immuncheckpoint-Blockaden das Tumorwachstum

nicht aufhalten können (siehe **Abbildung 32A**) (Bonaventura et al., 2019). Patienten mit „kalten“, T-Zell-armen Tumoren zeigten kein gutes Ansprechen auf Immuntherapien (Gajewski et al., 2013). Neben Antikörper-basierten Checkpointblockaden spielen ergänzend inzwischen Gen-Silencing und Small-Molecule-Inhibitoren eine Rolle (Wu et al., 2019b). Erstere Methode bedient sich z.B. small interfering RNA (siRNA) oder microRNA (miRNA), um einen „Knockdown“ von Checkpoints wie PD-1 zu erreichen (Perrier et al., 2020). Zweitens wird die Checkpoint-Expression über Signalwege reguliert, in die man mit chemischen Inhibitoren eingreifen kann (Wu et al., 2021). Diese Ansätze bieten die Möglichkeit, „kalte“ Tumore wieder zu „heißen“ Tumoren werden zu lassen, indem die Immunabwehr remobilisiert wird (siehe **Abbildung 32B**).



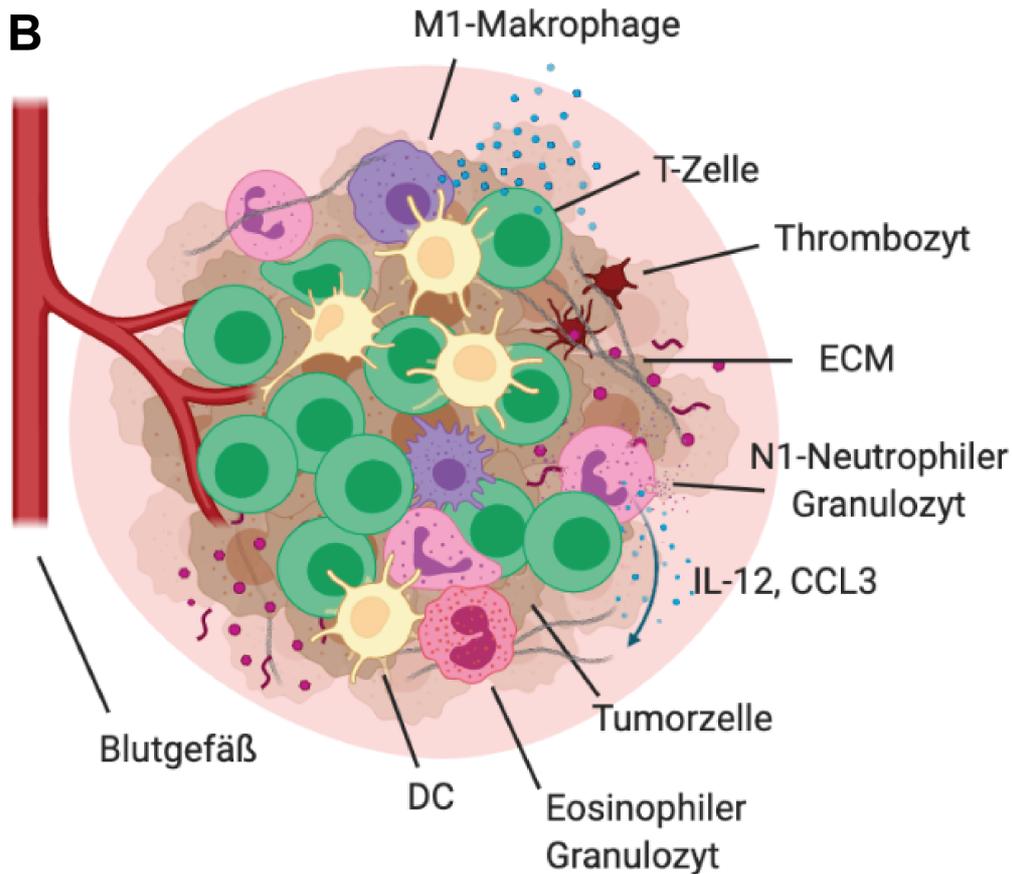


Abbildung 34: „Kalter“ Tumor und Tumorprogression – „Heißer“ Tumor und ausgeprägte Tumorabwehr.

A) Dargestellt ist ein kalter Tumor mit einem immunsuppressiven Tumormikromilieu, das von regulatorischen T- und B-Lymphozyten, Typ 2 Makrophagen, MDSCs und Typ 2 Neutrophilen infiltriert wird. Hervorgehoben werden soll die Rolle der Zytokine IL-10 und TGF- β für die Tumorprogression sowie die Bedeutung der Angiogenese fördernden Faktoren MMP9 und VEGF. Auch die Hemmung von T-Zellen durch Neutrophile über eine PD-L1/PD-1-Interaktion wirkt sich negativ auf die Tumorabwehr aus. **B)** Es ist ein heißer Tumor mit einem inflammatorischen Mikromilieu abgebildet. Die Infiltration von T-Lymphozyten, dendritischen Zellen und Typ 1 Makrophagen sowie Typ 1 Neutrophilen sorgt für eine gezielte Tumorabwehr.

Abkürzungen: PD-L1/PD-1: Programmed Cell Death Protein (Ligand) 1, TAM: Tumor-Associated Macrophage, M1: Typ 1 Makrophage, M2: Typ 2 Makrophage, MDSC: Myeloid Derived Suppressor Cell, ECM: Extracellular Matrix, Breg: regulatorische B-Zelle, Treg: regulatorische T-Zelle, N1: Typ 1 Neutrophiler Granulozyt, N2: Typ 2 Neutrophiler Granulozyt, MMP9: Matrixmetalloprotease 9, VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor, CAF: Cancer-Associated Fibroblast, IL-12: Interleukin 12, IL-10: Interleukin 10, TGF- β : Transforming Growth Factor Beta, CCL3: C-C Motif Chemokin Ligand 3, DC: Dendritic Cell.

4.4 Ausblick

Es soll das Ziel gegenwärtiger und zukünftiger Immuntherapien und vor allem multimodaler Ansätze sein, die verschiedensten identifizierten und noch zu erforschenden Immunevasionswege in synergistischer Weise zu unterbinden, sodass eine Therapieresistenz unter ICT verringert werden kann (Galon and Bruni, 2019). In diesem Zuge braucht es neue Behandlungsstrategien zur Reduktion von Melanom-

assoziierter Morbidität und Mortalität sowie unerwünschter Arzneimittelwirkungen, um ein besseres klinisches Ergebnis für Melanompatienten zu gewährleisten. Ein grundlegender Ansatz besteht, wie bereits erwähnt, darin, „kalte“ Tumore wieder „heiß“ zu machen (siehe **Abbildung 32**) (Duan et al., 2020). Bald und Kollegen haben einem solchen Ansatz folgend Experimente durchgeführt, welche darauf basieren, dass die T-Zell-Infiltration z.B. mit spontaner Typ I Interferon (IFN)-Aktivierung korreliert. Die Autoren untersuchten im Mausmodell, ob gezielte Typ I IFN-Aktivierung mittels immunstimulatorischer RNA-Injektionen die Wirksamkeit der PD-1 Blockade erhöht und dies konnte in der Tat gezeigt werden (Bald et al., 2014a). Diese Methode repräsentiert ein Ergebnis der Suche nach Möglichkeiten, „heiße“ Tumore zu erzeugen und die Ansprechrate auf Immuntherapien zu erhöhen. In diesem Sinne haben auch Glodde und Kollegen Experimente durchgeführt, in denen die Rezeptor-Tyrosinkinase c-MET blockiert wurde, an welche der Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) bindet und wodurch unter anderem Tumorentstehung gefördert werden kann (Glodde et al., 2017). Im Mausmodell sahen die Autoren infolge der c-MET-Blockade eine erhöhte Infiltration von Effektor-T-Zellen im Tumor und erklärten diese Beobachtung dadurch, dass vermindert Neutrophile in Tumorbett und Lymphknoten rekrutiert und somit immunsuppressive Wirkungen gesenkt wurden. Eine Checkpointblockade erwies sich im c-MET-inhibierten Setting sowohl bei c-MET-abhängigen und -unabhängigen Tumoren als effektiver.

Die Immuncheckpoint-Blockade hat große Erfolge für die Therapie diverser Tumorentitäten mit sich gebracht. Es wurde vor allem der Ansatz verfolgt, antitumorale T-Zellen zu (re)aktivieren – die Rolle der neutrophilen Granulozyten beispielsweise wurden dabei bisher weitestgehend übersehen (Ustyanovska Avtenyuk et al., 2020). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützen die große Bedeutung von Neutrophilen für den Progress des Melanoms sowie den Zusammenhang zwischen Neutrophilen und S100A8/A9 – gleichzeitig ist weiterer Forschungsbedarf ersichtlich. Therapeutisch sind diverse Eingriffe denkbar, durch die eine Modulation der Neutrophilenaktivität und der Interaktion mit T-Zellen erfolgen würde, und begleitende immunsuppressive Wirkweisen von S100A8/A9 gemindert werden könnten.

4.4.1 Therapieansätze hinsichtlich S100A8/A9

Melanozyten und Melanomzellen produzieren kein bzw. kaum S100A8/A9 (Shirley et al., 2014). Sie exprimieren aber Rezeptoren für das Protein, z.B. TLR-4, RAGE, das „Melanoma Cell Adhesion Molecule“ (MCAM), das „Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule“ (ALCAM) oder den „Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer“ (EMMPRIN) (Ruma et al., 2016, Hibino et al., 2013). Keratinozyten hingegen setzen S100A8/A9 in der Folge eines UV-Stimulus frei und das proinflammatorische Zytokin kann Melanozyten und Tumorzellen parakrin aktivieren (Shirley et al., 2014). Ein denkbarer Therapieansatz, um die Wirkung von S100A8/A9 zu unterbinden, wäre eine Rezeptorblockade. Da jedoch wie beschrieben diverse Rezeptoren in Betracht kommen, haben Kinoshita und Kollegen im Mausmodell mittels eines Zellmigrations-Assays einen chimären monoklonalen Antikörper (Ab45) getestet, der den Liganden S100A8/A9 neutralisieren sollte. Die Metastasierung des malignen Melanoms in die Lunge konnte dadurch verhindert werden (Kinoshita et al., 2019). Es besteht also ein vielversprechender Therapieansatz darin, S100A8/A9 antikörperbasiert zu blockieren und die Interaktion mit Neutrophilen, d.h. deren Anlockung und Aktivierung zu verhindern (siehe **Abbildung 33**). Auf diesem Feld erscheint weitere Forschung nötig, ebenso in puncto der Zell-Kompartiment-spezifischen, genregulatorischen Rolle von lokal vorkommendem S100A8/A9: Interessanterweise wurde nukleär vorkommendes S100A8/A9 mit der C3-Genexpression in Verbindung gebracht (Schonthaler et al., 2013). Dieser Mechanismus und ähnliche intrazelluläre Funktionen von S100A8/A9 wurden in der vorliegenden Arbeit nicht aufgeklärt, bieten aber spannende Ansätze für zukünftige Projekte.

4.4.2 Therapeutische Eingriffe bezüglich NETs, Neutrophilen-Rekrutierung und Neutrophilen induzierter T-Zell-Blockade

Mit dem Ziel, von Neutrophilen gebildete NETs zu destabilisieren oder deren Formation zu blockieren, gibt es zum einen die Möglichkeit, rekombinante DNase 1 einzusetzen, welche NETs degradiert. Zum anderen kann der Inhibitor GSK484 (GlaxoSmithKline 484) verabreicht werden, welcher über PAD4 (Peptidyl-Arginine Deiminase 4) die Ausbildung von NETs hemmt (siehe **Abbildung 33**) (Cedervall et

al., 2017, van der Giessen et al., 2007). Auch Eingriffe in das Komplementsystem sind denkbar. Das Komplementsystem ist daran beteiligt, ein protumorales Mikromilieu aufrechtzuerhalten, Leukozyten anzulocken und ihren Phänotyp zu verändern (Roumenina et al., 2019). Eine Komplementinhibition resultiert in einer Modulation der T-Zell-Antwort. Um C5 zu blockieren, kommt bei Myasthenia Gravis Eculizumab zum Einsatz (Dhillon, 2018). Zur Blockade des C5a-Rezeptors ist der Antikörper Avdoralimab (IPH5401) in der Lage (siehe **Abbildung 33**) (Afshar-Kharghan, 2017). Bezüglich der Anwendung der genannten Substanzen beim Melanom bedarf es weiterer Forschung.

Für die Neutrophilenrekrutierung ist wie oben beschrieben VWF mitverantwortlich. Das Protein ADAMTS13 (Akronym für "A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombo-Spondin-1-like domains") ist eine zinkhaltige Metalloprotease und spaltet sowie inaktiviert VWF sekundenschnell (Zhang et al., 2009). Daher stellt die Gabe von rekombinantem ADAMTS13 (rADAMTS13) einen weiteren Therapieansatz dar (siehe **Abbildung 33**). Auch der humanisierte monoklonale Antikörper Caplacizumab, der üblicherweise beim Krankheitsbild einer erworbenen thrombotisch-thrombozytopenischer Purpura eingesetzt wird, targetiert eine Domäne von VWF und kann von Nutzen sein, um die Neutrophileninfiltration zu hemmen (Scully et al., 2019). Darüber hinaus blockiert Capmatinib die Neutrophilenrekrutierung ins Tumorbett. Bei Capmatinib handelt es sich um einen Small-Molecule c-MET Inhibitor, durch dessen Gabe eine gesteigerte T-Zell-Infiltration gewährleistet und ein besseres Ansprechen auf ICT ermöglicht wird (Glodde et al., 2017).

Um die T-Zell-Inhibition zu verhindern, welche durch neutrophile Granulozyten verursacht werden kann, steht die Verabreichung eines gegen PD-1 und TGF- β gerichteten Fusionsproteins (M7824) als Therapieoption zur Verfügung (siehe **Abbildung 33**) (Gatti-Mays and Gulley, 2018, Strauss et al., 2018).

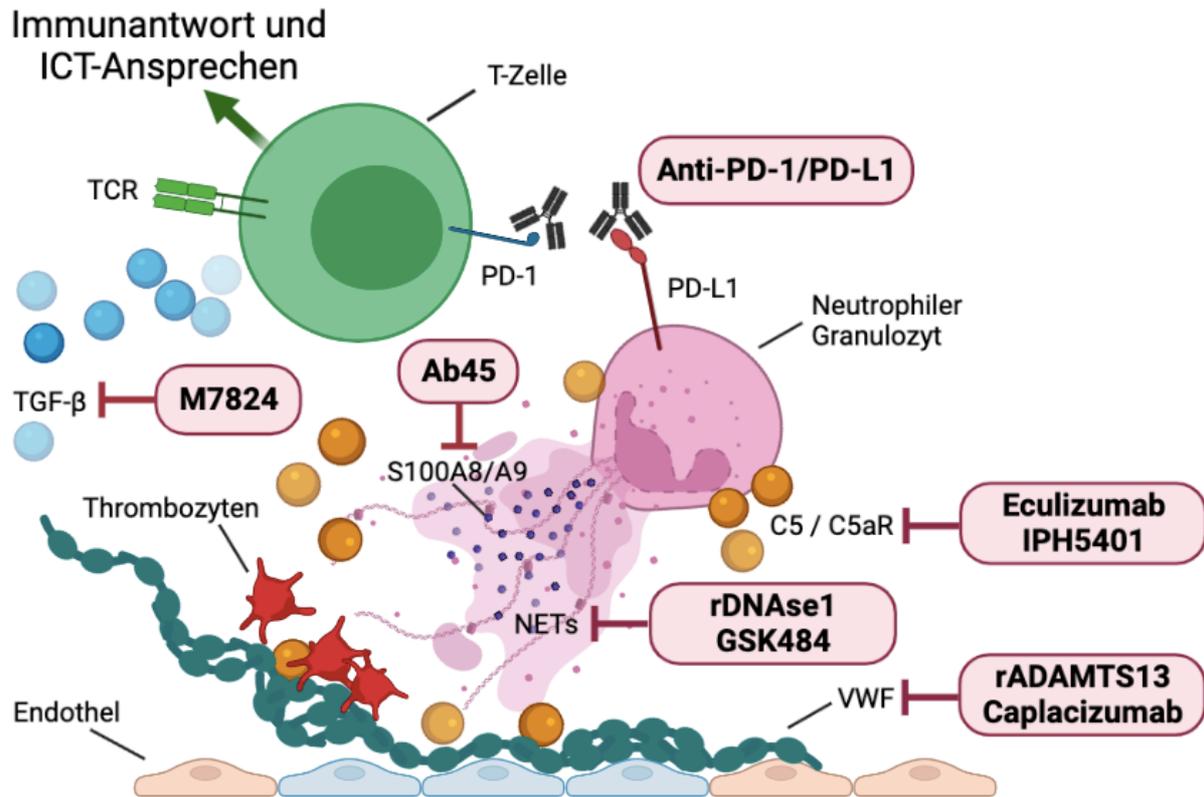


Abbildung 35: Therapieoptionen, um die Entstehung von „kalten“ Tumoren zu verhindern, damit im Folgenden verabreichte Immuntherapeutika effektiver wirken können.

Dargestellt sind Mechanismen, welche infolge einer tumorbedingten Aktivierung des Endothels ablaufen: Aktivierte, durch VWF rekrutierte Neutrophile bilden NETs und interagieren über PD-1/PD-L1 mit T-Zellen, wodurch die Tumorbewehr gehemmt wird und „kalte“ Tumore entstehen. Therapeutische Angriffspunkte stellen die Verhinderung der PD-1/PD-L1-Interaktion durch entsprechende Antikörpergabe, sowie die Verabreichung des Fusionsproteins M7824 gegen TGF-β und PD-1 dar. Überdies sind rADAMTS13 gegen Thrombozytenaggregation, und Nanoantikörper gegen VWF (Calacizumab) dazu in der Lage, die Neutrophilenrekrutierung im Vorhinein zu unterbinden. Komplementfaktoren und ihre Rezeptoren können durch Eculizumab und IPH5401 gehemmt werden. In der Folge wird die T-Zell-Antwort moduliert und „heiße“ Tumore entstehen. Bei NETose freigesetztes S100A8/A9 kann durch Ab45 gebunden und der immunsuppressive Charakter der Tumormikroumgebung gemindert werden.

Abkürzungen: PD-1/PD-L1: Programmed Cell Death Protein (Ligand) 1, TGF-β: Transforming Growth Factor Beta, TCR: T-Cell-Rezeptor, ICT: Immuncheckpoint-Therapie, C5: Complement 5, C5aR: Complement 5a Receptor, rDNase 1: rekombinante DNase 1, rADAMTS13: rekombinantes ADAMTS13, NETs: Neutrophil Extracellular Traps, VWF: von Willebrand Faktor, Ab45: Antibody 45.

4.4.3 Die Rolle der Kombinationstherapien

Alle in den vorherigen Kapiteln erläuterten therapeutischen Optionen verfolgen das Ziel, „kalte“ Tumore in „heiße“ Tumore zu verwandeln, indem sie die Immunabwehr im Tumormikromilieu (wieder)herstellen. Da die molekularen Signalwege, welche der Interaktion und dem Crosstalk von Tumorzellen, Immunzellen und plasmatischer Koagulation zugrunde liegen, ausgesprochen vielfältig und komplex sind, könnten erfolgreiche Therapiekonzepte multimodaler Natur sein. Es ist denkbar, dass

zielgerichtete Kombinationstherapien den bisher angewandten Therapieschemata in einigen Fällen überlegen wären. Überdies ist zu erwägen, Kombinationstherapien im Melanom bereits adjuvant für Stadium I und II-Patienten einzusetzen. Auch relativ kleine Melanome können trotz kompletter Exzision ein großes Metastasierungspotenzial aufweisen (Abbas et al., 2014, Poklepovic and Luke, 2020). Insbesondere konnte herausgearbeitet werden, dass eine Verhinderung der T-Zell-Depletion von Tumoren im Vorfeld der ICT-Gabe die Ansprechraten der Patienten steigern könnte. Der Ansatz dieser vorangestellten Therapien sollte in zukünftigen Forschungsprojekten weiterverfolgt werden.

4.4.4 Therapieeffizienz-Monitoring mittels sequentieller Liquid Biopsy

Um eine Kosten-Nutzen-Abwägung der Therapie zu ermöglichen, und herauszufinden, welcher Patient von Kombinationstherapien profitieren kann, ist es von großer Bedeutung, das Stadium der Tumorerkrankung möglichst genau zu charakterisieren. Ein Ziel der Erhebung von Serumkonzentrationen wie S100A8/A9- und Neutrophilen-Leveln besteht für klinisch tätige Dermato-Onkologen darin, die individuelle Prognose jedes Patienten besser abzuschätzen. Mittels Liquid Biopsy könnte man zudem idealerweise das (Nicht-)Ansprechen des einzelnen Patienten auf die verabreichte Medikation frühzeitig erkennen und gegebenenfalls die Indikation für gezielte Kombinationstherapien stellen, um die Ansprechraten auf ICT zu erhöhen. Eine S100A8/A9-Serumkonzentration von über 5000 ng/ml korrelierte in dieser Studie prognostisch mit einem verkürzten Gesamtüberleben und entspricht etwa dem Fünffachen der Durchschnittskonzentration in einer Kohorte aus gesunden Patienten (siehe **Abschnitt 4.1**). Der S100A8/A9-Referenzbereich sollte anhand eines größeren Kollektivs überprüft werden. Darüber hinaus steht die Definition von bestimmten S100A8/A9- und Neutrophilen-Serum-Leveln und kritischen Verlaufswerten, welche direkt auf Response bzw. Non-Response hinweisen können, noch aus. Es bedarf größer angelegter Studien, um den prädiktiven Wert der vorgeschlagenen Biomarker statistisch hinreichend zu validieren.

5 Zusammenfassung

Immuntherapien haben die Behandlungsoptionen für das maligne Melanom seit etwa einer Dekade revolutioniert. Aufgrund zum Teil geringer Ansprechraten und schwerer unerwünschter Arzneimittelwirkungen ist es das Ziel der dermatologisch-onkologischen Forschung, die Mechanismen der Resistenzbildung umfassend zu verstehen und Melanompatienten mittels im klinischen Alltag anwendbarer Tests der für sie optimalen Therapie zuzuführen. Studien belegen, dass neutrophile Granulozyten inflammatorische Signalwege modifizieren und mit T-Zellen interagieren. Das DAMP-Molekül S100A8/A9 wird unter anderem von Neutrophilen sezerniert und wirkt proentzündlich. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mittels einer systemischen Messung von S100A8/A9 in einer Kohorte aus 45 Patienten, dieses als prognostischen und prädiktiven Biomarker für ein Ansprechen auf Immuncheckpoint-Therapie zu testen (ELISA-Experiment). Die Serumkonzentrationen von Neutrophilen wurden in die Betrachtung miteinbezogen. Es wurde sodann die lokale Neutrophileninfiltration in 44 Naevi, 86 Primärmelanomen und 162 Metastasen quantifiziert und mit der Prognose der 113 inkludierten Patienten korreliert (TMA-Analyse). Bei einem Vergleich von „Baseline“- und „C4“-Serumwerten wirkte sich eine Zunahme von S100A8/A9-Leveln negativ auf das PFS aus. Für einen Anstieg der Serum-Neutrophilenkonzentrationen im Therapieverlauf zeigten sich positive Effekte bezüglich des PFS; das OS der Patienten war allerdings verkürzt. Eine Zunahme des Neutrophilen/Lymphozyten-Quotienten war ebenfalls mit einem verkürzten OS assoziiert. In der lokalen Analyse Tumor infiltrierender Neutrophiler konnten hohe Neutrophilenzahlen im Primarius eindeutig mit einer früheren Tumorprogression assoziiert werden. Es gibt bereits einige Ansätze, mittels Kombinationstherapien die vielfältigen protumoralen Wirkweisen von Neutrophilen, und den immunsupprimierenden Einfluss von S100A8/A9 zu unterbinden. Bei der Verhinderung der T-Zell-Depletion von Tumoren wurde die Rolle der Neutrophilen bisher weitestgehend übersehen und letztere sollten zukünftig als therapeutisches Target erwogen werden. Eine Aufgabe zukünftiger Forschungsprojekte wird es sein, die Response von Melanompatienten beim Einsatz kombinierter ICT-Optionen zu untersuchen, ihren Benefit zu quantifizieren, statistisch zu validieren und neuartige Therapieschemata mithilfe von sequentiellen Liquid Biopsies effektiv zu monitoren.

Summary

Immunotherapies have revolutionised treatment options for malignant melanoma for about a decade. Due to sometimes low response rates and severe adverse drug reactions, the goal of dermato-oncological research is to comprehensively understand the mechanisms of resistance and to guide melanoma patients to their optimal therapy by developing tests that can be applied in clinical practice. Studies show that neutrophil granulocytes modify inflammatory signaling pathways and interact with T cells. The DAMP molecule S100A8/A9 is secreted by neutrophils and has pro-inflammatory effects. The aim of the present study was to test S100A8/A9 as a prognostic and predictive biomarker for response to immune checkpoint therapy. For this purpose, systemic measurement was conducted in a cohort of 45 patients (ELISA experiment). Serum concentrations of neutrophils were incorporated into the analysis. Additionally, local neutrophil infiltration was quantified in 44 nevi, 86 primary melanomas and 162 metastases and correlated with the prognosis of the 113 patients examined (TMA analysis). When comparing "baseline" and "C4" serum levels, an increase in S100A8/A9 concentrations had a negative impact on PFS. For an increase in serum neutrophil levels over the course of therapy, there were positive effects on PFS to be observed; however, the patients' OS was shortened. An increase in the neutrophil/lymphocyte ratio was also associated with shorter OS. In the local analysis of tumor infiltrating neutrophils, high neutrophil counts in primary melanomas were clearly associated with earlier tumor progression. There already do exist some approaches, by means of combination therapies, to prevent the multiple protumoral modes of action neutrophils can perform, as well as the immunosuppressive influence of S100A8/A9. In preventing T cell depletion of tumors, the role of neutrophils has been largely overlooked but should be considered as a therapeutic target in the future. It should be the purpose of future research projects to investigate the response of melanoma patients when using combined ICT options. Their benefit should be quantified and statistically validated. Ultimately, novel therapy regimens might be effectively monitored by using sequential liquid biopsies.

6 Anhang

OS-Analyse: Differenz des S100A8/A9-Serum-Levels zwischen C4 und Baseline

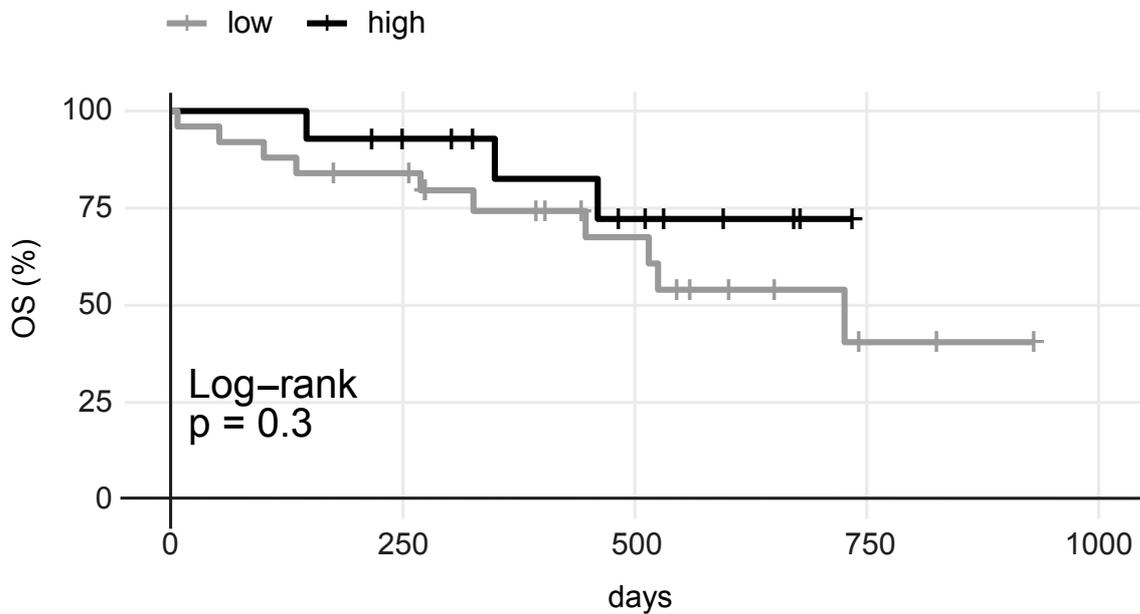
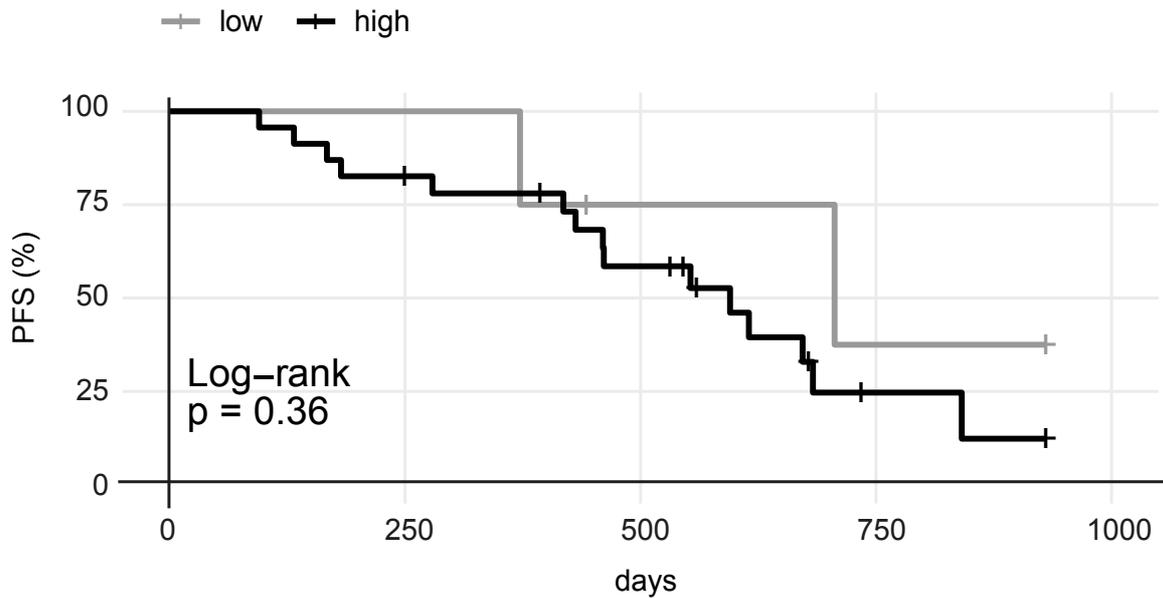


Abbildung 1: Univariate Überlebenszeitanalyse: Korrelation zwischen der absoluten Änderung der S100A8/A9-Serumspiegel zwischen den Zeitpunkten „Baseline“ und „C4“ mit dem Gesamtüberleben.

In der Analyse mit dem Endpunkt „Gesamtüberleben“ zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit einer starken Zunahme der S100A8/A9-Serum-Level zwischen den zwei untersuchten Zeitpunkten und solchen Melanompatienten, die eine weniger starke Zunahme oder Abnahme aufwiesen. Der Cut-Off-Wert betrug 294,02 ng/ml. In der OS-Analyse war die „Number at risk“ an Tag 0 für die Differenz C4 minus Baseline=low 25 Patienten und für C4 minus Baseline=high 14 Patienten.

Abkürzungen: p: p-Wert, OS: Overall Survival.

A PFS-Analyse: Neutrophilen-C4-Serum-Level



B OS-Analyse: Neutrophilen-C4-Serum-Level

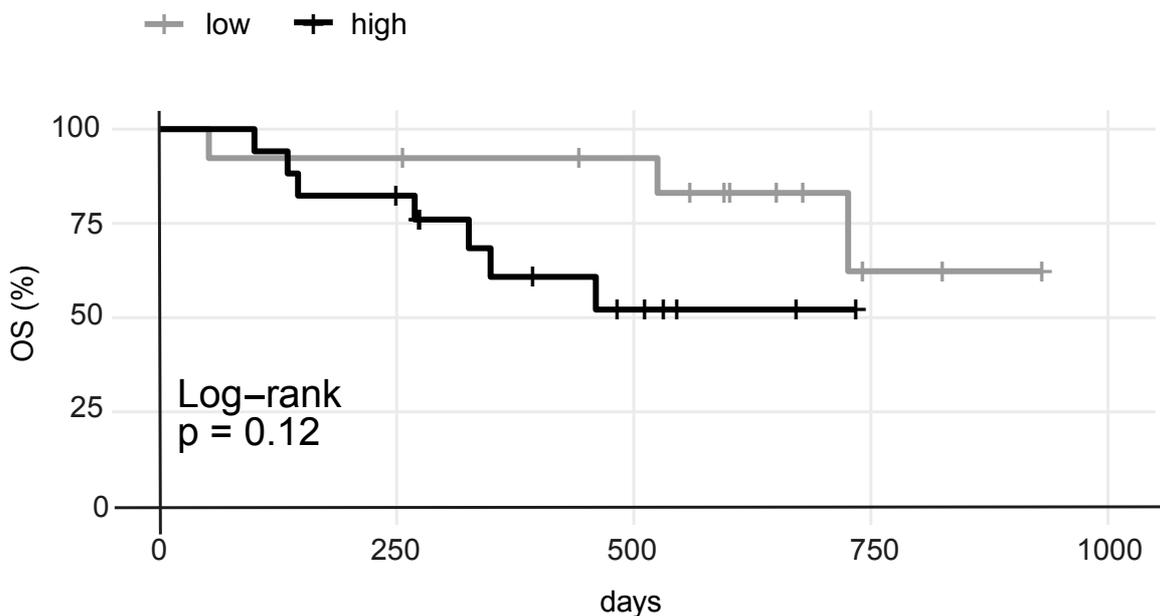


Abbildung 2: Univariate Überlebenszeitanalyse: Korrelation zwischen „C4“-Neutrophilen-Serumkonzentrationen und progressionsfreiem Überleben bzw. Gesamtüberleben.

A) Für die Patienten der systemischen Analyse sind Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie Überleben dargestellt. Es zeigte sich für niedrige versus hohe Neutrophilenkonzentrationen zum Zeitpunkt „C4“ kein Unterschied bezüglich des progressionsfreien Überlebens. Der Cut-Off-Wert betrug 2,63/nl. In der PFS-Analyse war die „Number at risk“ an Tag 0 für hohe Neutrophilenkonzentrationen 23 Patienten und für niedrige 4 Patienten. **B)** Für die Patienten der systemischen Studie sind Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben dargestellt. Die Patienten wurden nach hohen und niedrigen Neutrophilenkonzentrationen im Blut stratifiziert. Der Cut-Off-Wert betrug 4,27/nl. Es zeigte sich für niedrige versus hohe Neutrophilenkonzentrationen zum Zeitpunkt „C4“ kein Unterschied bezüglich des Gesamtüberlebens. Die „Number at risk“ betrug in der OS-Analyse an Tag 0 für hohe Neutrophilen-Level 17 Patienten und für niedrige Level 13 Patienten.

Abkürzungen: p: p-Wert, N: PFS: Progression Free Survival, OS: Overall Survival.

PFS-Analyse: Neutrophileninfiltration in Naevi (CD15, normiert)

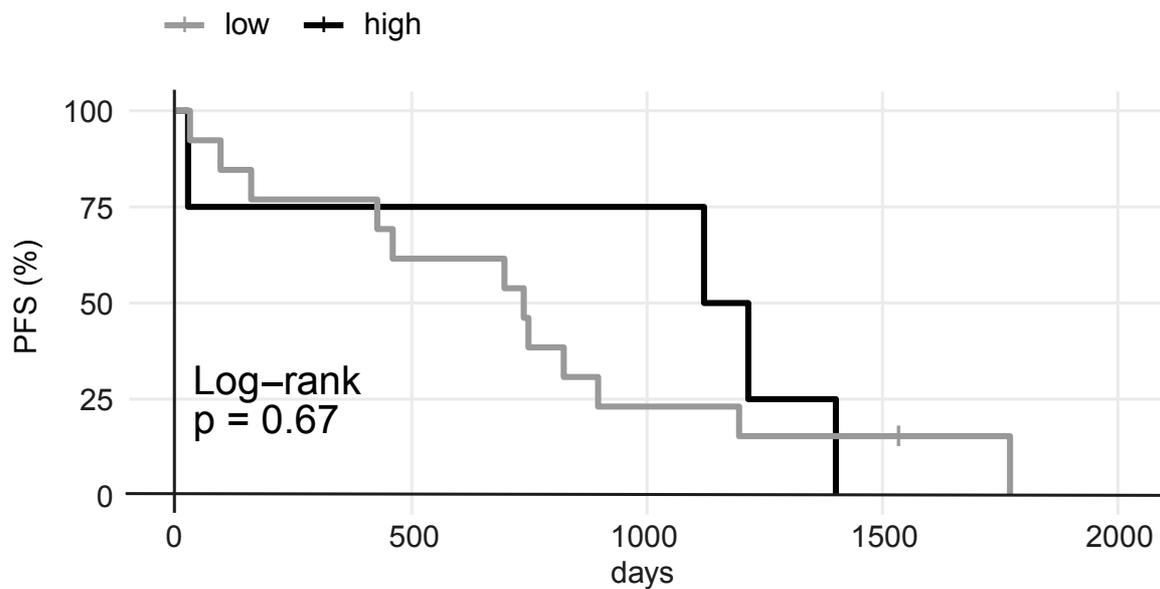


Abbildung 3: Bei hohen bzw. geringen Neutrophileninfiltrationen in Naevi konnte kein signifikanter Unterschied in puncto progressionsfreiem Überleben gezeigt werden.

Für die Patienten der Gewebestudie sind Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie Überleben dargestellt. Die Patienten wurden nach hohen und niedrigen Neutrophileninfiltrationen im Naevus stratifiziert. Der Cut-Off-Wert betrug $0/\text{mm}^2$. Die „Number at risk“ betrug an Tag 0 für CD15=low 13 Patienten; für CD15=high 4 Patienten.

Abkürzungen: p: p-Wert, PFS: Progression Free Survival.

PFS-Analyse: Neutrophileninfiltration in Metastasen (CD15, normiert)

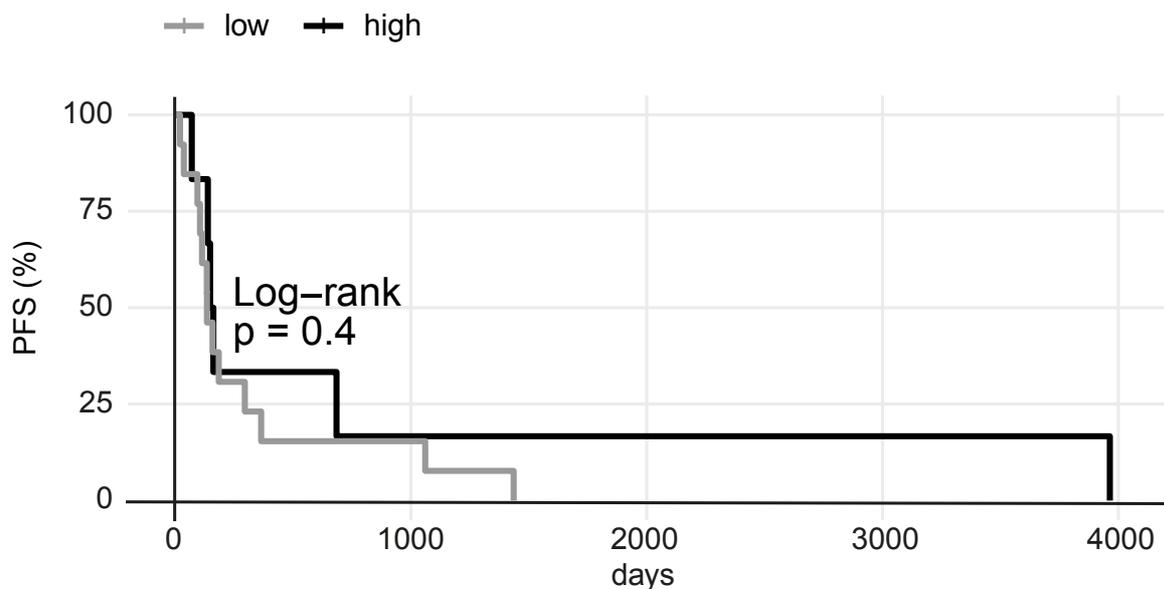


Abbildung 4: Bei hohen bzw. geringen Neutrophileninfiltrationen in Metastasen konnte kein signifikanter Unterschied in puncto progressionsfreiem Überleben gezeigt werden.

Für die Patienten der Gewebestudie sind Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie Überleben dargestellt. Die Patienten wurden nach hohen und niedrigen Neutrophileninfiltrationen in der

Metastase stratifiziert. Der Cut-Off-Wert betrug 6,27/mm². Die „Number at risk“ betrug an Tag 0 für CD15=low 13 Patienten; für CD15=high 6 Patienten.
Abkürzungen: p: p-Wert, PFS: Progression Free Survival.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Tumorprogression des malignen Melanoms.	6
Abbildung 2: Der Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg als therapeutisches Target beim Melanom.....	14
Abbildung 3: Die Mechanismen der Immuncheckpoint-Therapie.....	16
Abbildung 4: Overall Survival bei adjuvanten medikamentösen Melanomtherapien.	17
Abbildung 5: S100A8/A9 und Neutrophile unter Immuntherapie des malignen Melanoms.....	23
Abbildung 6: Immunzellen in der Tumormikroumgebung.	24
Abbildung 7: Lichtmikroskopische Übersichtsdarstellung von TMA 2.3 (HE-Färbung).	30
Abbildung 8: Univariate Überlebenszeitanalyse: Korrelation zwischen "Baseline"-S100A8/A9-Serumspiegeln und progressionsfreiem Überleben bzw. Gesamtüberleben.....	47
Abbildung 9: Univariate Überlebenszeitanalyse: Korrelation zwischen S100A8/A9-„C4“-Serumspiegeln und progressionsfreiem Überleben bzw. Gesamtüberleben.	49
Abbildung 10: Univariate Überlebenszeitanalyse: Korrelation zwischen der absoluten Änderung der S100A8/A9-Serumspiegel zwischen den Zeitpunkten „Baseline“ und „C4“ mit dem progressionsfreien Überleben.	50
Abbildung 11: ANOVA-Analysen der S100A8/A9-Serumkonzentrationen zum „Baseline“- und „C4“-Zeitpunkt in Respondern (CR,PR,SD) bzw. Non-Respondern (PD).	52
Abbildung 12: Kinetische Analyse der S100A8/A9-Serum-Level zu den Zeitpunkten „Baseline“ und „C4“ unter Aufteilung der Patienten in die Gruppen „Responder“ (CR,PR,SD) und „Non-Responder“ (PD).....	54
Abbildung 13: Univariate Überlebenszeitanalyse: Korrelation zwischen „Baseline“-Neutrophilen-Serumkonzentrationen und progressionsfreiem Überleben bzw. Gesamtüberleben.....	56
Abbildung 14: Univariate Überlebenszeitanalyse: Korrelation zwischen der absoluten Änderung der Neutrophilen-Serumspiegel zwischen den Zeitpunkten „Baseline“ und „C4“ mit dem progressionsfreien Überleben bzw. Gesamtüberleben.	58
Abbildung 15: Pearson-Korrelation zwischen dem Neutrophilen-Serumgradienten (C4 minus Baseline) und dem Überleben der Melanompatienten.	60
Abbildung 16: Univariate Überlebenszeitanalyse: Korrelation zwischen „Baseline“-Neutrophilen/Leukozyten-Verhältnis im Serum und progressionsfreiem Überleben bzw. Gesamtüberleben.....	61
Abbildung 17: Univariate Überlebenszeitanalyse: Korrelation zwischen „Baseline“-Neutrophilen/Lymphozyten-Ratio (NLR) im Serum und progressionsfreiem Überleben bzw. Gesamtüberleben.....	63
Abbildung 18: Univariate Überlebenszeitanalyse: Korrelation zwischen der absoluten Änderung der Neutrophilen/Lymphozyten-Ratio (NLR) im Serum zwischen den Zeitpunkten „Baseline“ und „C4“ mit dem Gesamtüberleben.	64

Abbildung 19: ANOVA-Analysen der Neutrophilen-Serumkonzentrationen zum „Baseline“- und „C4“-Zeitpunkt in Respondern (CR,PR,SD) bzw. Non-Respondern (PD).	66
Abbildung 20: ANOVA-Analysen der Neutrophilen/Leukozyten-Ratio im Serum zum „Baseline“- und „C4“-Zeitpunkt in Respondern (CR,PR,SD) bzw. Non-Respondern (PD).	68
Abbildung 21: ANOVA-Analysen der Neutrophilen/Lymphozyten-Ratio (NLR) im Serum zum „Baseline“- und „C4“-Zeitpunkt in Respondern (CR,PR,SD) bzw. Non-Respondern (PD).	70
Abbildung 22: Kinetische Analysen der Neutrophilen-Serum-Level, der Neutrophilen/Leukozyten-Ratios und der Neutrophilen/Lymphozyten-Ratios zu den Zeitpunkten „Baseline“ und „C4“ unter Aufteilung der Patienten in die Gruppen „Responder“ (CR,PR,SD) und „Non-Responder“ (PD).	73
Abbildung 23: Beispielbilder aus der Neutrophilenfärbung.	75
Abbildung 24: Übersichtsaufnahmen und Analysen eines durchschnittlich gering Neutrophilen-infiltrierten Naevus (A) sowie eines durchschnittlich stark infiltrierten Primarius (B) und einer Metastase (C). Statistische Auswertung aller erhobenen Zellzahlen (D).	77
Abbildung 25: ANOVA-Analysen der Neutrophileninfiltrationen in den Tumorarten – gruppiert nach Stanzen mit hohen und solchen mit niedrigen Neutrophileninfiltrationen.	80
Abbildung 26: Hohe Neutrophileninfiltrationen in Primarien konnten mit einem verkürzten progressionsfreien Überleben assoziiert werden.	81
Abbildung 27: Je stärker die Neutrophileninfiltration im Primarius verglichen mit der im Naevus eines Melanompatienten, desto kürzer das progressionsfreie Überleben.	83
Abbildung 28: Je geringer die Neutrophileninfiltration im Primarius verglichen mit der Metastase eines Melanompatienten, desto länger das progressionsfreie Überleben.	84
Abbildung 29: Mögliche Herkunft der Neutrophilen-Subgruppen.	94
Abbildung 30: Rekrutierung von Neutrophilen ins Tumorbett: Tumor-assoziierte Neutrophile.	96
Abbildung 31: NETose des neutrophilen Granulozyten.	100
Abbildung 32: „Kalter“ Tumor und Tumorprogression – „Heißer“ Tumor und ausgeprägte Tumorabwehr.	105
Abbildung 33: Therapieoptionen, um die Entstehung von „kalten“ Tumoren zu verhindern, damit im Folgenden verabreichte Immuntherapeutika effektiver wirken können.	109

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: T-Klassifikation des Primärtumors beim malignen Melanom.....	7
Tabelle 2: N-Klassifikation der regionären Lymphknoten beim malignen Melanom....	8
Tabelle 3: M-Klassifikation der Fernmetastasen beim malignen Melanom.	9
Tabelle 4: Stadieneinteilung des malignen Melanoms.	10
Tabelle 5: Systemische Analyse: Deskriptive Statistik.	29
Tabelle 6: TMA Patientenstatistik: Diverse deskriptive Parameter.....	31
Tabelle 7: TMA Gewebestatistik: Diverse deskriptive Parameter.....	32
Tabelle 8: TMA Gewebestatistik: Metastasenlokalisierung.	32
Tabelle 9: TMA Gewebestatistik: Primären-Tumortyp.	32
Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Geräte.	35
Tabelle 11: Auflistung verwendeter Software und Datenbanken.....	35
Tabelle 12: Auflistung von Verbrauchsmaterialien.	36
Tabelle 13: Auflistung von Chemikalien und Reagenzien.	37
Tabelle 14: Auflistung von Puffern und Lösungen.....	38
Tabelle 15: Dokumentation des ELISA-Kits.	39
Tabelle 16: Auflistung des primären Antikörpers.....	39
Tabelle 17: Auflistung des sekundären Antikörpers.	39
Tabelle 18: Verwendete Antikörper für die CD15-Färbung.	42
Tabelle 19: Systemische Analyse: Deskriptive Parameter.....	53
Tabelle 20: Systemische Analyse: Deskriptive Parameter.....	71
Tabelle 21: Bewertungsmodell für Zell-Signale in der Neutrophilenfärbung.	76
Tabelle 22: TMA Gewebestatistik: Deskriptive Parameter.	76

9 Abkürzungsverzeichnis

5FU	5-Fluoruracil
ADAMTS13	Akronym für "A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombo-Spondin-1-like domains"
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALCAM	Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule
APCs	Antigen Presenting Cells
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
Arg1	Arginase 1
B7	CD80/86
BE	Baseline
BRAF	B Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
Bregs	Regulatory B-Cells
C4	Cycle 4
CAFs	Cancer-Associated Fibroblasts
CCL-	C-C Motif Chemokin Ligand
CD	Cluster of Differentiation
CD	Complete Response
CDDP	<i>Cis</i> -Diamminedichloridoplatinum (Cisplatin)
CLND	Complete Lymph Node Dissection
cm	Centimeter
cMET	Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor, „codiert im MET-Gen“
CO ₂	Carbon Dioxide
CT	Computertomografie
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein-4
CXCL-	C-X-C Chemokin Ligand
CXCR-	C-X-C Chemokin Rezeptortyp
DAMPs	Damage-/Danger-Associated Molecular Patterns
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindone
DCs	Dendritic Cells
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DTIC	Dimethyl-Trizeno-Imidazol-Carboxamid (Dacarbazin)
ECM	Extracellular Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMMPRIN	Extracellular Matrix Metalloproteinase

ERK	Inducer
FITC	Extracellular Signal-Regulated-Kinase
FOXP3	Fluoresceinisothiocyanat (Fluorescein)
G-CSF	Forkhead Box P3
GM-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
GMPs	Granulozyten-Monozyten-Progenitorzellen
GRB2	Growth Factor Receptor-Bound Protein 2
GTP	Guanosine-5'-Triphosphate
H+L	Heavy + Light Chain
H2O2	Hydrogen Peroxide
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGF	Hepatozyte Growth Factor
HMGB1	High Mobility Group Box 1
HRP	Horseradish Peroxidase
ICI	Immunecheckpoint-Inhibitoren
ICT	Immunecheckpoint-Therapie
IFN	Interferon
IFN γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
LAD	Lymphadenektomie
LDH	Laktatdehydrogenase
LK	Lymphknoten
M	(Fern-)Metastasen
M1	Typ 1 Makrophagen
M2	Typ 2 Makrophagen
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MCAM	Melanoma Cell Adhesion Molecule
MDSCs	Myeloid-Derived Suppressor Cells
MEK	MAPK/Extracellular Signal-Regulated-Kinase (ERK)-Kinase
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MHC I/II	Major Histocompatibility Complex I/II
Min.	Minuten
mm	Millimeter
MMP	Matrixmetallopeptidase
MPO	Myeloperoxidase
MRP	Myeloid-Related Protein
N	Nodus (regionäre Lymphknotenmetastasen)

N/A	not applicable
N1	Typ 1 Neutrophile
N2	Typ 2 Neutrophile
NCT	Nationales Centrum für Tumorerkrankungen
NE	Neutrophile Elastase
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
NF-κB	Nukleärer Faktor kappa B
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nl	Nanoliter
NLR	Neutrophilen-Lymphozyten-Ratio
nm	Nanometer
Nos2/iNOS	Nitric Oxide Synthase 2, Inducible
NSCLC	Non Small Cell Lung Carcinoma
OS	Overall Survival
PAD4	Peptidyl-Arginine Deiminase 4
PBS	Phosphate Buffered Saline
PD	Progressive Disease
PD-1	Programmed Cell Death Protein 1
PD-L1/2	Programmed Cell Death Protein Ligand 1/2
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PET	Positronen-Emissions-Tomografie
PFS	Progression-Free Survival
PGE2	Prostaglandin E2
PR	Partial Response
PRRs	Pattern Recognition Receptors
pT	Primary Tumor
rADAMTS13	rekombinantes ADAMTS13
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma
RAGE	Receptor for Advanced Glycation Endproducts
Ras	Rat sarcoma
RCC	Renal Cell Carcinoma
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
RNA	Ribonucleic Acid
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	Revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
SD	Stable Disease
sog.	sogenannten
SOS	Son Of Sevenless
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3

TAMs	Tumor-Associated Macrophages
TANs	Tumor-Associated Neutrophils
TBS-T	Tris-hydroxymethylaminomethan Buffered Saline with Tween 20
TCR	T-Cell Receptor
TD	Tumordicke
Teffs	Effector-T-Cells
TENs	Tumor-Entrained Neutrophils
T _{EX}	Exhausted T-Cells
TGF- β	Transforming Growth Factor Beta
TILs	Tumor Infiltrating Lymphocytes
TLR	Toll-Like Receptor
TLS	Tertiäre Lymphoide Strukturen
TMA	Tissue Micro Array
TMB	Tetramethylbenzidine
TMZ	Temozolamid
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TNM	Tumor, Nodus, Metastasen
Tregs	Regulatory T-Cells
Tris-HCl	Tris-Hydrochloride
UKE	Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf
UV	Ultra Violett
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VWF	von Willebrand Faktor
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
μ l	Mikroliter

10 Literaturverzeichnis

Monographien

FRITSCH P., SCHWARZ T. 2018. Dermatologie Venerologie. Grundlagen, Klinik, Atlas. Springer Verlag, 782-805.

Internetquellen

LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms, Langversion 3.2, 2019, AWMF Registernummer: 032/024OL [Online im Internet.] URL: <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/melanom/> [Stand: 18.06.2020, 07:48].

ROBERT KOCH INSTITUT. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Krebs in Deutschland. 2019. Malignes Melanom der Haut ICD-10 C43, 66. [Online im Internet.] URL: <https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/> [Stand: 12.12.2021, 09:45].

Zeitschriftenartikel

ABBAS, A. K., TROTTA, E., D, R. S., MARSON, A. & BLUESTONE, J. A. 2018. Revisiting IL-2: Biology and therapeutic prospects. *Sci Immunol*, 3.

ABBAS, O., MILLER, D. D. & BHAWAN, J. 2014. Cutaneous malignant melanoma: update on diagnostic and prognostic biomarkers. *Am J Dermatopathol*, 36, 363-79.

AFSHAR-KHARGHAN, V. 2017. The role of the complement system in cancer. *J Clin Invest*, 127, 780-789.

AHMADI, A., NAJAFI, M., FARHOOD, B. & MORTEZAEI, K. 2019. Transforming growth factor-beta signaling: Tumorigenesis and targeting for cancer therapy. *J Cell Physiol*, 234, 12173-12187.

ANDZINSKI, L., KASNITZ, N., STAHNKE, S., WU, C. F., GEREKE, M., VON KOCKRITZ-BLICKWEDE, M., SCHILLING, B., BRANDAU, S., WEISS, S. & JABLONSKA, J. 2016. Type I IFNs induce anti-tumor polarization of tumor associated neutrophils in mice and human. *Int J Cancer*, 138, 1982-93.

ARDI, V. C., KUPRIYANOVA, T. A., DERYUGINA, E. I. & QUIGLEY, J. P. 2007. Human neutrophils uniquely release TIMP-free MMP-9 to provide a potent catalytic stimulator of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 20262-7.

ARGENZIANO, G., PUIG, S., ZALAUDEK, I., SERA, F., CORONA, R., ALSINA, M., BARBATO, F., CARRERA, C., FERRARA, G., GUILABERT, A., MASSI, D., MORENO-ROMERO, J. A., MUNOZ-SANTOS, C., PETRILLO, G., SEGURA, S., SOYER, H. P., ZANCHINI, R. & MALVEHY, J. 2006. Dermoscopy improves accuracy of primary care physicians to triage lesions suggestive of skin cancer. *J Clin Oncol*, 24, 1877-82.

ASCIERTO, P. A., DEL VECCHIO, M., ROBERT, C., MACKIEWICZ, A., CHIARION-SILENI, V., ARANCE, A., LEBBE, C., BASTHOLT, L., HAMID, O., RUTKOWSKI, P., MCNEIL, C., GARBE, C., LOQUAI, C., DRENO, B., THOMAS, L., GROB, J. J., LISZKAY, G., NYAKAS, M., GUTZMER, R.,

- PIKIEL, J., GRANGE, F., HOELLER, C., FERRARESI, V., SMYLLIE, M., SCHADENDORF, D., MORTIER, L., SVANE, I. M., HENNICKEN, D., QURESHI, A. & MAIO, M. 2017. Ipilimumab 10 mg/kg versus ipilimumab 3 mg/kg in patients with unresectable or metastatic melanoma: a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 18, 611-622.
- AZZOLA, M. F., SHAW, H. M., THOMPSON, J. F., SOONG, S. J., SCOLYER, R. A., WATSON, G. F., COLMAN, M. H. & ZHANG, Y. 2003. Tumor mitotic rate is a more powerful prognostic indicator than ulceration in patients with primary cutaneous melanoma: an analysis of 3661 patients from a single center. *Cancer*, 97, 1488-98.
- BALD, T., LANDSBERG, J., LOPEZ-RAMOS, D., RENN, M., GLODDE, N., JANSEN, P., GAFFAL, E., STEITZ, J., TOLBA, R., KALINKE, U., LIMMER, A., JONSSON, G., HOLZEL, M. & TUTING, T. 2014a. Immune cell-poor melanomas benefit from PD-1 blockade after targeted type I IFN activation. *Cancer Discov*, 4, 674-87.
- BALD, T., QUAST, T., LANDSBERG, J., ROGAVA, M., GLODDE, N., LOPEZ-RAMOS, D., KOHLMAYER, J., RIESENBERG, S., VAN DEN BOORN-KONIJNENBERG, D., HOMIG-HOLZEL, C., REUTEN, R., SCHADOW, B., WEIGHARDT, H., WENZEL, D., HELFRICH, I., SCHADENDORF, D., BLOCH, W., BIANCHI, M. E., LUGASSY, C., BARNHILL, R. L., KOCH, M., FLEISCHMANN, B. K., FORSTER, I., KASTENMULLER, W., KOLANUS, W., HOLZEL, M., GAFFAL, E. & TUTING, T. 2014b. Ultraviolet-radiation-induced inflammation promotes angiotropism and metastasis in melanoma. *Nature*, 507, 109-13.
- BENCI, J. L., XU, B., QIU, Y., WU, T. J., DADA, H., TWYMAN-SAINT VICTOR, C., CUCOLO, L., LEE, D. S. M., PAUKEN, K. E., HUANG, A. C., GANGADHAR, T. C., AMARAVADI, R. K., SCHUCHTER, L. M., FELDMAN, M. D., ISHWARAN, H., VONDERHEIDE, R. H., MAITY, A., WHERRY, E. J. & MINN, A. J. 2016. Tumor Interferon Signaling Regulates a Multigenic Resistance Program to Immune Checkpoint Blockade. *Cell*, 167, 1540-1554 e12.
- BERRY, R. S., XIONG, M. J., GREENBAUM, A., MORTAJI, P., NOFCHISSEY, R. A., SCHULTZ, F., MARTINEZ, C., LUO, L., MORRIS, K. T. & HANSON, J. A. 2017. High levels of tumor-associated neutrophils are associated with improved overall survival in patients with stage II colorectal cancer. *PLoS One*, 12, e0188799.
- BINNEWIES, M., ROBERTS, E. W., KERSTEN, K., CHAN, V., FEARON, D. F., MERAD, M., COUSSENS, L. M., GABRILOVICH, D. I., OSTRAND-ROSENBERG, S., HEDRICK, C. C., VONDERHEIDE, R. H., PITTET, M. J., JAIN, R. K., ZOU, W., HOWCROFT, T. K., WOODHOUSE, E. C., WEINBERG, R. A. & KRUMMEL, M. F. 2018. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med*, 24, 541-550.
- BJORNSDOTTIR, H., WELIN, A., DAHLGREN, C., KARLSSON, A. & BYLUND, J. 2016. Quantification of heterotypic granule fusion in human neutrophils by imaging flow cytometry. *Data Brief*, 6, 386-93.
- BOHME, I. & BOSSERHOFF, A. K. 2016. Acidic tumor microenvironment in human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*, 29, 508-23.
- BONAVENTURA, P., SHEKARIAN, T., ALCAZER, V., VALLADEAU-GUILEMOND, J., VALSESIA-WITTMANN, S., AMIGORENA, S., CAUX, C. & DEPIL, S. 2019. Cold Tumors: A Therapeutic Challenge for Immunotherapy. *Front Immunol*, 10, 168.

- BONNELYKKE-BEHRNDTZ, M. L. & STEINICHE, T. 2017. Ulcerated Melanoma: Aspects and Prognostic Impact. *In: WARD, W. H. & FARMA, J. M. (eds.) Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy.* Brisbane (AU).
- BOONE, B. A. & LOTZE, M. T. 2014. Targeting damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs) and DAMP receptors in melanoma. *Methods Mol Biol*, 1102, 537-52.
- BRANDAU, S. 2013. The dichotomy of neutrophil granulocytes in cancer. *Semin Cancer Biol*, 23, 139-40.
- BRANDAU, S., DUMITRU, C. A. & LANG, S. 2013. Protumor and antitumor functions of neutrophil granulocytes. *Semin Immunopathol*, 35, 163-76.
- BRESLOW, A. 1970. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg*, 172, 902-8.
- BRINKMANN, V., REICHARD, U., GOOSMANN, C., FAULER, B., UHLEMANN, Y., WEISS, D. S., WEINRAUCH, Y. & ZYCHLINSKY, A. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303, 1532-5.
- BROSTJAN, C. & OEHLER, R. 2020. The role of neutrophil death in chronic inflammation and cancer. *Cell Death Discov*, 6, 26.
- CAPONE, M., GIANNARELLI, D., MALLARDO, D., MADONNA, G., FESTINO, L., GRIMALDI, A. M., VANELLA, V., SIMEONE, E., PAONE, M., PALMIERI, G., CAVALCANTI, E., CARACO, C. & ASCIERTO, P. A. 2018. Baseline neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) and derived NLR could predict overall survival in patients with advanced melanoma treated with nivolumab. *J Immunother Cancer*, 6, 74.
- CARMELIET, P. 2005. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*, 69 Suppl 3, 4-10.
- CEDERVALL, J., DRAGOMIR, A., SAUPE, F., ZHANG, Y., ARNLOV, J., LARSSON, E., DIMBERG, A., LARSSON, A. & OLSSON, A. K. 2017. Pharmacological targeting of peptidylarginine deiminase 4 prevents cancer-associated kidney injury in mice. *Oncoimmunology*, 6, e1320009.
- CEDERVALL, J., HAMIDI, A. & OLSSON, A. K. 2018. Platelets, NETs and cancer. *Thromb Res*, 164 Suppl 1, S148-S152.
- CHENG, Y., LI, H., DENG, Y., TAI, Y., ZENG, K., ZHANG, Y., LIU, W., ZHANG, Q. & YANG, Y. 2018. Cancer-associated fibroblasts induce PDL1+ neutrophils through the IL6-STAT3 pathway that foster immune suppression in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis*, 9, 422.
- CHIKUMA, S. 2017. CTLA-4, an Essential Immune-Checkpoint for T-Cell Activation. *Curr Top Microbiol Immunol*, 410, 99-126.
- CHO, I. R., PARK, J. C., PARK, C. H., JO, J. H., LEE, H. J., KIM, S., SHIM, C. N., LEE, H., SHIN, S. K., LEE, S. K. & LEE, Y. C. 2014. Pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio as a prognostic marker to predict chemotherapeutic response and survival outcomes in metastatic advanced gastric cancer. *Gastric Cancer*, 17, 703-10.
- CHRISTENSEN, S., VAN DER ROEST, B., BESSELINK, N., JANSSEN, R., BOYMANS, S., MARTENS, J. W. M., YASPO, M. L., PRIESTLEY, P., KUIJK, E., CUPPEN, E. & VAN HOECK, A. 2019. 5-Fluorouracil treatment induces characteristic T>G mutations in human cancer. *Nat Commun*, 10, 4571.
- CIVIN, C. I., MIRRO, J. & BANQUERIGO, M. L. 1981. My-1, new myeloid-specific antigen identified by a mouse monoclonal antibody. *Blood*, 57, 842-5.
- COFFELT, S. B., KERSTEN, K., DOORNEBAL, C. W., WEIDEN, J., VRIJLAND, K., HAU, C. S., VERSTEGEN, N. J. M., CIAMPRICOTTI, M., HAWINKELS, L., JONKERS, J. & DE VISSER, K. E. 2015. IL-17-producing gammadelta T cells

- and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature*, 522, 345-348.
- COFFELT, S. B., WELLENSTEIN, M. D. & DE VISSER, K. E. 2016. Neutrophils in cancer: neutral no more. *Nat Rev Cancer*, 16, 431-46.
- COOLS-LARTIGUE, J., SPICER, J., MCDONALD, B., GOWING, S., CHOW, S., GIANNIAS, B., BOURDEAU, F., KUBES, P. & FERRI, L. 2013. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J Clin Invest*.
- CORCORAN, S. E. & O'NEILL, L. A. 2016. HIF1alpha and metabolic reprogramming in inflammation. *J Clin Invest*, 126, 3699-3707.
- CZYSTOWSKA-KUZMICZ, M., SOSNOWSKA, A., NOWIS, D., RAMJI, K., SZAJNIK, M., CHLEBOWSKA-TUZ, J., WOLINSKA, E., GAJ, P., GRAZUL, M., PILCH, Z., ZERROUQI, A., GRACZYK-JARZYNSKA, A., SOROCZYNSKA, K., CIERNIAK, S., KOKTYSZ, R., ELISHAEV, E., GRUCA, S., STEFANOWICZ, A., BLASZCZYK, R., BOREK, B., GZIK, A., WHITESIDE, T. & GOLAB, J. 2019. Small extracellular vesicles containing arginase-1 suppress T-cell responses and promote tumor growth in ovarian carcinoma. *Nat Commun*, 10, 3000.
- DANCEY, J. T., DEUBELBEISS, K. A., HARKER, L. A. & FINCH, C. A. 1976. Neutrophil kinetics in man. *J Clin Invest*, 58, 705-15.
- DE KLEIJN, S., LANGEREIS, J. D., LEENTJENS, J., KOX, M., NETEA, M. G., KOENDERMAN, L., FERWERDA, G., PICKKERS, P. & HERMANS, P. W. 2013. IFN-gamma-stimulated neutrophils suppress lymphocyte proliferation through expression of PD-L1. *PLoS One*, 8, e72249.
- DENNING, N. L., AZIZ, M., GURIEN, S. D. & WANG, P. 2019. DAMPs and NETs in Sepsis. *Front Immunol*, 10, 2536.
- DEPREESTER, E., MEYER, E., DEMEYERE, K., VAN EETVELDE, M., HOSTENS, M. & OPSOMER, G. 2017. Flow cytometric assessment of myeloperoxidase in bovine blood neutrophils and monocytes. *J Dairy Sci*, 100, 7638-7647.
- DHILLON, S. 2018. Eculizumab: A Review in Generalized Myasthenia Gravis. *Drugs*, 78, 367-376.
- DING, Y., ZHANG, S. & QIAO, J. 2018. Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in melanoma: Evidence from a PRISMA-compliant meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 97, e11446.
- DONSKOV, F. 2013. Immunomonitoring and prognostic relevance of neutrophils in clinical trials. *Semin Cancer Biol*, 23, 200-7.
- DUAN, Q., ZHANG, H., ZHENG, J. & ZHANG, L. 2020. Turning Cold into Hot: Firing up the Tumor Microenvironment. *Trends Cancer*, 6, 605-618.
- DUSCHEK, N., SKVARA, H., KITTLER, H., DELIR, G., FINK, A., PINKOWICZ, A. & WALDHOR, T. 2013. Melanoma epidemiology of Austria reveals gender-related differences. *Eur J Dermatol*, 23, 872-8.
- DVORAK, H. F. 1986. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*, 315, 1650-9.
- EL SHAROUNI, M. A., WITKAMP, A. J., SIGURDSSON, V., VAN DIEST, P. J., LOUWMAN, M. W. J. & KUKUTSCH, N. A. 2019. Sex matters: men with melanoma have a worse prognosis than women. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 33, 2062-2067.
- ELDER, D. E. 2016. Melanoma progression. *Pathology*, 48, 147-54.
- ENGELMANN, B. & MASSBERG, S. 2013. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 13, 34-45.

- ERPENBECK, L. & SCHON, M. P. 2017. Neutrophil extracellular traps: protagonists of cancer progression? *Oncogene*, 36, 2483-2490.
- ERUSLANOV, E. B., BHOJNAGARWALA, P. S., QUATROMONI, J. G., STEPHEN, T. L., RANGANATHAN, A., DESHPANDE, C., AKIMOVA, T., VACHANI, A., LITZKY, L., HANCOCK, W. W., CONEJO-GARCIA, J. R., FELDMAN, M., ALBELDA, S. M. & SINGHAL, S. 2014. Tumor-associated neutrophils stimulate T cell responses in early-stage human lung cancer. *J Clin Invest*, 124, 5466-80.
- FANG, S., WANG, Y., SUI, D., LIU, H., ROSS, M. I., GERSHENWALD, J. E., CORMIER, J. N., ROYAL, R. E., LUCCI, A., SCHACHERER, C. W., GARDNER, J. M., REVEILLE, J. D., BASSETT, R. L., WANG, L. E., WEI, Q., AMOS, C. I. & LEE, J. E. 2015. C-reactive protein as a marker of melanoma progression. *J Clin Oncol*, 33, 1389-96.
- FERRUCCI, P. F., ASCIERTO, P. A., PIGOZZO, J., DEL VECCHIO, M., MAIO, M., ANTONINI CAPPELLINI, G. C., GUIDOBONI, M., QUEIROLO, P., SAVOIA, P., MANDALA, M., SIMEONE, E., VALPIONE, S., ALTOMONTE, M., SPAGNOLO, F., COCOROCCHIO, E., GANDINI, S., GIANNARELLI, D. & MARTINOLI, C. 2016. Baseline neutrophils and derived neutrophil-to-lymphocyte ratio: prognostic relevance in metastatic melanoma patients receiving ipilimumab. *Ann Oncol*, 27, 732-8.
- FOLKMAN, J. 2002. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol*, 29, 15-8.
- FRIDLENDER, Z. G. & ALBELDA, S. M. 2012. Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis*, 33, 949-55.
- FRIDLENDER, Z. G., SUN, J., KIM, S., KAPOOR, V., CHENG, G., LING, L., WORTHEN, G. S. & ALBELDA, S. M. 2009. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell*, 16, 183-94.
- FRIDLENDER, Z. G., SUN, J., MISHALIAN, I., SINGHAL, S., CHENG, G., KAPOOR, V., HORNG, W., FRIDLENDER, G., BAYUH, R., WORTHEN, G. S. & ALBELDA, S. M. 2012. Transcriptomic analysis comparing tumor-associated neutrophils with granulocytic myeloid-derived suppressor cells and normal neutrophils. *PLoS One*, 7, e31524.
- FRIDMAN, W. H., PAGES, F., SAUTES-FRIDMAN, C. & GALON, J. 2012. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*, 12, 298-306.
- FRITSCH, P. S., T. 2018. *Dermatologie Venerologie. Grundlagen, Klinik, Atlas.*, Springer Verlag.
- FUCHS, T. A., ABED, U., GOOSMANN, C., HURWITZ, R., SCHULZE, I., WAHN, V., WEINRAUCH, Y., BRINKMANN, V. & ZYCHLINSKY, A. 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*, 176, 231-41.
- GABRILOVICH, D. I. 2017. Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol Res*, 5, 3-8.
- GABRILOVICH, D. I. & NAGARAJ, S. 2009. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*, 9, 162-74.
- GABRILOVICH, D. I., OSTRAND-ROSENBERG, S. & BRONTE, V. 2012. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol*, 12, 253-68.
- GAJEWSKI, T. F., SCHREIBER, H. & FU, Y. X. 2013. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol*, 14, 1014-22.

- GALDIERO, M. R., BIANCHI, P., GRIZZI, F., DI CARO, G., BASSO, G., PONZETTA, A., BONAVIDA, E., BARBAGALLO, M., TARTARI, S., POLENTARUTTI, N., MALESCI, A., MARONE, G., RONCALLI, M., LAGHI, L., GARLANDA, C., MANTOVANI, A. & JAILLON, S. 2016. Occurrence and significance of tumor-associated neutrophils in patients with colorectal cancer. *Int J Cancer*, 139, 446-56.
- GALON, J. & BRUNI, D. 2019. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nat Rev Drug Discov*, 18, 197-218.
- GARLEY, M. & JABLONSKA, E. 2018. Heterogeneity Among Neutrophils. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 66, 21-30.
- GATTI-MAYS, M. E. & GULLEY, J. L. 2018. M7824: A promising new strategy to combat cancer immune evasion. *Oncoscience*, 5, 269-270.
- GEBHARDT, C., BREITENBACH, U., TUCKERMANN, J. P., DITTRICH, B. T., RICHTER, K. H. & ANGEL, P. 2002. Calgranulins S100A8 and S100A9 are negatively regulated by glucocorticoids in a c-Fos-dependent manner and overexpressed throughout skin carcinogenesis. *Oncogene*, 21, 4266-76.
- GEBHARDT, C., NEMETH, J., ANGEL, P. & HESS, J. 2006. S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer. *Biochem Pharmacol*, 72, 1622-31.
- GEBHARDT, C., SEVKO, A., JIANG, H., LICHTENBERGER, R., REITH, M., TARNANIDIS, K., HOLLAND-LETZ, T., UMANSKY, L., BECKHOVE, P., SUCKER, A., SCHADENDORF, D., UTIKAL, J. & UMANSKY, V. 2015. Myeloid Cells and Related Chronic Inflammatory Factors as Novel Predictive Markers in Melanoma Treatment with Ipilimumab. *Clin Cancer Res*, 21, 5453-9.
- GERRARD, T. L., COHEN, D. J. & KAPLAN, A. M. 1981. Human neutrophil-mediated cytotoxicity to tumor cells. *J Natl Cancer Inst*, 66, 483-8.
- GIESE, M. A., HIND, L. E. & HUTTENLOCHER, A. 2019. Neutrophil plasticity in the tumor microenvironment. *Blood*, 133, 2159-2167.
- GLODDE, N., BALD, T., VAN DEN BOORN-KONIJNENBERG, D., NAKAMURA, K., O'DONNELL, J. S., SZCZEPANSKI, S., BRANDES, M., EICKHOFF, S., DAS, I., SHRIDHAR, N., HINZE, D., ROGAVA, M., VAN DER SLUIS, T. C., RUOTSALAINEN, J. J., GAFFAL, E., LANDSBERG, J., LUDWIG, K. U., WILHELM, C., RIEK-BURCHARDT, M., MULLER, A. J., GEBHARDT, C., SCOLYER, R. A., LONG, G. V., JANZEN, V., TENG, M. W. L., KASTENMULLER, W., MAZZONE, M., SMYTH, M. J., TUTING, T. & HOLZEL, M. 2017. Reactive Neutrophil Responses Dependent on the Receptor Tyrosine Kinase c-MET Limit Cancer Immunotherapy. *Immunity*, 47, 789-802 e9.
- GLOVER, D., GLICK, J. H., WEILER, C., FOX, K. & GUERRY, D. 1987. WR-2721 and high-dose cisplatin: an active combination in the treatment of metastatic melanoma. *J Clin Oncol*, 5, 574-8.
- GRANOT, Z., HENKE, E., COMEN, E. A., KING, T. A., NORTON, L. & BENEZRA, R. 2011. Tumor entrained neutrophils inhibit seeding in the premetastatic lung. *Cancer Cell*, 20, 300-14.
- GRECIAN, R., WHYTE, M. K. B. & WALMSLEY, S. R. 2018. The role of neutrophils in cancer. *Br Med Bull*, 128, 5-14.
- GREENLEE-WACKER, M. C. 2016. Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. *Immunol Rev*, 273, 357-70.
- GREGORY, A. D. & HOUGHTON, A. M. 2011. Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. *Cancer Res*, 71, 2411-6.

- GUTKIN, D. W. & SHURIN, M. R. 2014. Clinical evaluation of systemic and local immune responses in cancer: time for integration. *Cancer Immunol Immunother*, 63, 45-57.
- HAANEN, J. B. 2013. Immunotherapy of melanoma. *EJC Suppl*, 11, 97-105.
- HAGER, M., COWLAND, J. B. & BORREGAARD, N. 2010. Neutrophil granules in health and disease. *J Intern Med*, 268, 25-34.
- HANJAN, S. N., KEARNEY, J. F. & COOPER, M. D. 1982. A monoclonal antibody (MMA) that identifies a differentiation antigen on human myelomonocytic cells. *Clin Immunol Immunopathol*, 23, 172-88.
- HATFIELD, S. M., KJAERGAARD, J., LUKASHEV, D., SCHREIBER, T. H., BELIKOFF, B., ABBOTT, R., SETHUMADHAVAN, S., PHILBROOK, P., KO, K., CANNICI, R., THAYER, M., RODIG, S., KUTOK, J. L., JACKSON, E. K., KARGER, B., PODACK, E. R., OHTA, A. & SITKOVSKY, M. V. 2015. Immunological mechanisms of the antitumor effects of supplemental oxygenation. *Sci Transl Med*, 7, 277ra30.
- HAVEL, J. J., CHOWELL, D. & CHAN, T. A. 2019. The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 19, 133-150.
- HELLMANN, M. D., BIVI, N., CALDERON, B., SHIMIZU, T., DELAFONTAINE, B., LIU, Z. T., SZPURKA, A. M., COPELAND, V., HODI, F. S., ROTTEY, S., AFTIMOS, P., PIAO, Y., GANDHI, L., GALVAO, V. R., LEOW, C. C. & DOI, T. 2021. Safety and Immunogenicity of LY3415244, a Bispecific Antibody Against TIM-3 and PD-L1, in Patients With Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res*, 27, 2773-2781.
- HERNANDEZ, C., HUEBENER, P. & SCHWABE, R. F. 2016. Damage-associated molecular patterns in cancer: a double-edged sword. *Oncogene*, 35, 5931-5941.
- HESSIAN, P. A., EDGEWORTH, J. & HOGG, N. 1993. MRP-8 and MRP-14, two abundant Ca(2+)-binding proteins of neutrophils and monocytes. *J Leukoc Biol*, 53, 197-204.
- HIBINO, T., SAKAGUCHI, M., MIYAMOTO, S., YAMAMOTO, M., MOTOYAMA, A., HOSOI, J., SHIMOKATA, T., ITO, T., TSUBOI, R. & HUH, N. H. 2013. S100A9 is a novel ligand of EMMPRIN that promotes melanoma metastasis. *Cancer Res*, 73, 172-83.
- HOCK, B. D., TAYLOR, K. G., CROSS, N. B., KETTLE, A. J., HAMPTON, M. B. & MCKENZIE, J. L. 2012. Effect of activated human polymorphonuclear leucocytes on T lymphocyte proliferation and viability. *Immunology*, 137, 249-58.
- HODI, F. S., O'DAY, S. J., MCDERMOTT, D. F., WEBER, R. W., SOSMAN, J. A., HAANEN, J. B., GONZALEZ, R., ROBERT, C., SCHADENDORF, D., HASSEL, J. C., AKERLEY, W., VAN DEN EERTWEGH, A. J., LUTZKY, J., LORIGAN, P., VAUBEL, J. M., LINETTE, G. P., HOGG, D., OTTENSMEIER, C. H., LEBBE, C., PESCHEL, C., QUIRT, I., CLARK, J. I., WOLCHOK, J. D., WEBER, J. S., TIAN, J., YELLIN, M. J., NICHOL, G. M., HOOS, A. & URBA, W. J. 2010. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 363, 711-23.
- HOTHORN, T. L., B. 2003. On the exact distribution of maximally selected rank statistics. *Computational Statistics & Data Analysis*, 43, 121-137.
- HSU, T. S. & LAI, M. Z. 2018. Hypoxia-inducible factor 1alpha plays a predominantly negative role in regulatory T cell functions. *J Leukoc Biol*, 104, 911-918.

- HUANG, H., ZHANG, H., ONUMA, A. E. & TSUNG, A. 2020. Neutrophil Elastase and Neutrophil Extracellular Traps in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol*, 1263, 13-23.
- HUANG, J., XIE, Y., SUN, X., ZEH, H. J., 3RD, KANG, R., LOTZE, M. T. & TANG, D. 2015. DAMPs, ageing, and cancer: The 'DAMP Hypothesis'. *Ageing Res Rev*, 24, 3-16.
- JABLONSKA, J., LESCHNER, S., WESTPHAL, K., LIENENKLAUS, S. & WEISS, S. 2010. Neutrophils responsive to endogenous IFN-beta regulate tumor angiogenesis and growth in a mouse tumor model. *J Clin Invest*, 120, 1151-64.
- JACKAMAN, C., TOMAY, F., DUONG, L., ABDOL RAZAK, N. B., PIXLEY, F. J., METHAROM, P. & NELSON, D. J. 2017. Aging and cancer: The role of macrophages and neutrophils. *Ageing Res Rev*, 36, 105-116.
- JENKINS, R. W., THUMMALAPALLI, R., CARTER, J., CANADAS, I. & BARBIE, D. A. 2018. Molecular and Genomic Determinants of Response to Immune Checkpoint Inhibition in Cancer. *Annu Rev Med*, 69, 333-347.
- JENNINGS, L. & MURPHY, G. M. 2009. Predicting outcome in melanoma: where are we now? *Br J Dermatol*, 161, 496-503.
- JENSEN, T. O., SCHMIDT, H., MOLLER, H. J., DONSKOV, F., HOYER, M., SJOEGREN, P., CHRISTENSEN, I. J. & STEINICHE, T. 2012. Intratumoral neutrophils and plasmacytoid dendritic cells indicate poor prognosis and are associated with pSTAT3 expression in AJCC stage I/II melanoma. *Cancer*, 118, 2476-85.
- JIANG, H., GEBHARDT, C., UMANSKY, L., BECKHOVE, P., SCHULZE, T. J., UTIKAL, J. & UMANSKY, V. 2015. Elevated chronic inflammatory factors and myeloid-derived suppressor cells indicate poor prognosis in advanced melanoma patients. *Int J Cancer*, 136, 2352-60.
- JOLLER, N. & KUCHROO, V. K. 2017. Tim-3, Lag-3, and TIGIT. *Curr Top Microbiol Immunol*, 410, 127-156.
- KARAGIANNIS, P., FITTALL, M. & KARAGIANNIS, S. N. 2014. Evaluating biomarkers in melanoma. *Front Oncol*, 4, 383.
- KERKHOFF, C., KLEMPT, M. & SORG, C. 1998. Novel insights into structure and function of MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9). *Biochim Biophys Acta*, 1448, 200-11.
- KIESSLING, R., MAO, Y. & PICO DE COANA, Y. 2014. Myeloid suppressors decrease melanoma survival by abating tumor-fighting T cells. *Clin Cancer Res*, 20, 1401-3.
- KINOSHITA, R., SATO, H., YAMAUCHI, A., TAKAHASHI, Y., INOUE, Y., SUMARDIKA, I. W., CHEN, Y., TOMONOBU, N., ARAKI, K., SHIEN, K., TOMIDA, S., TORIGOE, H., NAMBA, K., KURIHARA, E., OGOSHI, Y., MURATA, H., YAMAMOTO, K. I., FUTAMI, J., PUTRANTO, E. W., RUMA, I. M. W., YAMAMOTO, H., SOH, J., HIBINO, T., NISHIBORI, M., KONDO, E., TOYOOKA, S. & SAKAGUCHI, M. 2019. Newly developed anti-S100A8/A9 monoclonal antibody efficiently prevents lung tropic cancer metastasis. *Int J Cancer*, 145, 569-575.
- KOLACZKOWSKA, E. & KUBES, P. 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 13, 159-75.
- KORNILUK, A., KOPER, O., KEMONA, H. & DYMICKA-PIEKARSKA, V. 2017. From inflammation to cancer. *Ir J Med Sci*, 186, 57-62.
- KRAAKMAN, M. J., LEE, M. K., AL-SHAREA, A., DRAGOLJEVIC, D., BARRETT, T. J., MONTENONT, E., BASU, D., HEYWOOD, S., KAMMOUN, H. L., FLYNN,

- M., WHILLAS, A., HANSSSEN, N. M., FEBBRAIO, M. A., WESTEIN, E., FISHER, E. A., CHIN-DUSTING, J., COOPER, M. E., BERGER, J. S., GOLDBERG, I. J., NAGAREDDY, P. R. & MURPHY, A. J. 2017. Neutrophil-derived S100 calcium-binding proteins A8/A9 promote reticulated thrombocytosis and atherogenesis in diabetes. *J Clin Invest*, 127, 2133-2147.
- KRUGER, P., SAFFARZADEH, M., WEBER, A. N., RIEBER, N., RADSACK, M., VON BERNUTH, H., BENARAFI, C., ROOS, D., SKOKOWA, J. & HARTL, D. 2015. Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS Pathog*, 11, e1004651.
- KUDCHADKAR, R. 2010. Novel targeted therapies for the treatment of metastatic melanoma. *Ochsner J*, 10, 117-24.
- LARKIN, J., CHIARION-SILENI, V., GONZALEZ, R., GROB, J. J., COWEY, C. L., LAO, C. D., SCHADENDORF, D., DUMMER, R., SMYLLIE, M., RUTKOWSKI, P., FERRUCCI, P. F., HILL, A., WAGSTAFF, J., CARLINO, M. S., HAANEN, J. B., MAIO, M., MARQUEZ-RODAS, I., MCARTHUR, G. A., ASCIERTO, P. A., LONG, G. V., CALLAHAN, M. K., POSTOW, M. A., GROSSMANN, K., SZNOL, M., DRENO, B., BASTHOLT, L., YANG, A., ROLLIN, L. M., HORAK, C., HODI, F. S. & WOLCHOK, J. D. 2015. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med*, 373, 23-34.
- LEACH, D. R., KRUMMEL, M. F. & ALLISON, J. P. 1996. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*, 271, 1734-6.
- LECHNER, M. G., LIEBERTZ, D. J. & EPSTEIN, A. L. 2010. Characterization of cytokine-induced myeloid-derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol*, 185, 2273-84.
- LELIEFELD, P. H., KOENDERMAN, L. & PILLAY, J. 2015. How Neutrophils Shape Adaptive Immune Responses. *Front Immunol*, 6, 471.
- LEQUIN, R. M. 2005. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem*, 51, 2415-8.
- LEWIS, S. M., BAIN, B. J., BATES, I., DACIE, J. V. & DACIE, J. V. 2006. *Dacie and Lewis practical haematology*, Philadelphia, Churchill Livingstone/Elsevier.
- LIANG, W. & FERRARA, N. 2016. The Complex Role of Neutrophils in Tumor Angiogenesis and Metastasis. *Cancer Immunol Res*, 4, 83-91.
- LIEW, P. X. & KUBES, P. 2019. The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiol Rev*, 99, 1223-1248.
- LIM, S. Y., YUZHALLIN, A. E., GORDON-WEEKS, A. N. & MUSCHEL, R. J. 2016. Tumor-infiltrating monocytes/macrophages promote tumor invasion and migration by upregulating S100A8 and S100A9 expression in cancer cells. *Oncogene*, 35, 5735-5745.
- LOEUILLARD, E., YANG, J., BUCKARMA, E., WANG, J., LIU, Y., CONBOY, C., PAVELKO, K. D., LI, Y., O'BRIEN, D., WANG, C., GRAHAM, R. P., SMOOT, R. L., DONG, H. & ILYAS, S. 2020. Targeting tumor-associated macrophages and granulocytic myeloid-derived suppressor cells augments PD-1 blockade in cholangiocarcinoma. *J Clin Invest*, 130, 5380-5396.
- LONG, G. V., HAUSCHILD, A., SANTINAMI, M., ATKINSON, V., MANDALA, M., CHIARION-SILENI, V., LARKIN, J., NYAKAS, M., DUTRIAU, C., HAYDON, A., ROBERT, C., MORTIER, L., SCHACHTER, J., SCHADENDORF, D., LESIMPLE, T., PLUMMER, R., JI, R., ZHANG, P., MOOKERJEE, B., LEGOS, J., KEFFORD, R., DUMMER, R. & KIRKWOOD, J. M. 2017. Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in Stage III BRAF-Mutated Melanoma. *N Engl J Med*, 377, 1813-1823.

- LOPEZ-LAGO, M. A., POSNER, S., THODIMA, V. J., MOLINA, A. M., MOTZER, R. J. & CHAGANTI, R. S. 2013. Neutrophil chemokines secreted by tumor cells mount a lung antimetastatic response during renal cell carcinoma progression. *Oncogene*, 32, 1752-60.
- LUGOVIC-MIHIC, L., CESIC, D., VUKOVIC, P., NOVAK BILIC, G., SITUM, M. & SPOLJAR, S. 2019. Melanoma Development: Current Knowledge on Melanoma Pathogenesis. *Acta Dermatovenerol Croat*, 27, 163-168.
- LUKE, J. J., FLAHERTY, K. T., RIBAS, A. & LONG, G. V. 2017. Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. *Nat Rev Clin Oncol*, 14, 463-482.
- MACIAN, F. 2005. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol*, 5, 472-84.
- MAHONEY, K. M., FREEMAN, G. J. & MCDERMOTT, D. F. 2015. The Next Immune-Checkpoint Inhibitors: PD-1/PD-L1 Blockade in Melanoma. *Clin Ther*, 37, 764-82.
- MALEKI VAREKI, S. 2018. High and low mutational burden tumors versus immunologically hot and cold tumors and response to immune checkpoint inhibitors. *J Immunother Cancer*, 6, 157.
- MANDALA, M. & MASSI, D. 2014. Tissue prognostic biomarkers in primary cutaneous melanoma. *Virchows Arch*, 464, 265-81.
- MANZ, M. G. & BOETTCHER, S. 2014. Emergency granulopoiesis. *Nat Rev Immunol*, 14, 302-14.
- MARIATHASAN, S., TURLEY, S. J., NICKLES, D., CASTIGLIONI, A., YUEN, K., WANG, Y., KADEL, E. E., III, KOEPPEN, H., ASTARITA, J. L., CUBAS, R., JHUNJHUNWALA, S., BANCHEREAU, R., YANG, Y., GUAN, Y., CHALOUNI, C., ZIAI, J., SENBABA OGLU, Y., SANTORO, S., SHEINSON, D., HUNG, J., GILTNANE, J. M., PIERCE, A. A., MESH, K., LIANOGLU, S., RIEGLER, J., CARANO, R. A. D., ERIKSSON, P., HOGLUND, M., SOMARRIBA, L., HALLIGAN, D. L., VAN DER HEIJDEN, M. S., LORIOT, Y., ROSENBERG, J. E., FONG, L., MELLMAN, I., CHEN, D. S., GREEN, M., DERLETH, C., FINE, G. D., HEGDE, P. S., BOURGON, R. & POWLES, T. 2018. TGFbeta attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells. *Nature*, 554, 544-548.
- MASUCCI, M. T., MINOPOLI, M. & CARRIERO, M. V. 2019. Tumor Associated Neutrophils. Their Role in Tumorigenesis, Metastasis, Prognosis and Therapy. *Front Oncol*, 9, 1146.
- MATLUNG, H. L., BABES, L., ZHAO, X. W., VAN HOUTD, M., TREFFERS, L. W., VAN REES, D. J., FRANKE, K., SCHORNAGEL, K., VERKUIJLEN, P., JANSSEN, H., HALONEN, P., LIEFTINK, C., BEIJERSBERGEN, R. L., LEUSEN, J. H. W., BOELENS, J. J., KUHNLE, I., VAN DER WERFF TEN BOSCH, J., SEEGER, K., RUTELLA, S., PAGLIARA, D., MATOZAKI, T., SUZUKI, E., MENKE-VAN DER HOUVEN VAN OORDT, C. W., VAN BRUGGEN, R., ROOS, D., VAN LIER, R. A. W., KUIJPERS, T. W., KUBES, P. & VAN DEN BERG, T. K. 2018. Neutrophils Kill Antibody-Opsonized Cancer Cells by Trophoptosis. *Cell Rep*, 23, 3946-3959 e6.
- MATTIA, G., PUGLISI, R., ASCIONE, B., MALORNI, W., CARE, A. & MATARRESE, P. 2018. Cell death-based treatments of melanoma: conventional treatments and new therapeutic strategies. *Cell Death Dis*, 9, 112.
- MATZINGER, P. 1994. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol*, 12, 991-1045.

- MAVERAKIS, E., CORNELIUS, L. A., BOWEN, G. M., PHAN, T., PATEL, F. B., FITZMAURICE, S., HE, Y., BURRALL, B., DUONG, C., KLOXIN, A. M., SULTANI, H., WILKEN, R., MARTINEZ, S. R. & PATEL, F. 2015. Metastatic melanoma - a review of current and future treatment options. *Acta Derm Venereol*, 95, 516-24.
- MERLE, N. S., CHURCH, S. E., FREMEAUX-BACCHI, V. & ROUMENINA, L. T. 2015. Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front Immunol*, 6, 262.
- MEYER, C., CAGNON, L., COSTA-NUNES, C. M., BAUMGAERTNER, P., MONTANDON, N., LEYVRAZ, L., MICHIELIN, O., ROMANO, E. & SPEISER, D. E. 2014. Frequencies of circulating MDSC correlate with clinical outcome of melanoma patients treated with ipilimumab. *Cancer Immunol Immunother*, 63, 247-57.
- MILLS, C. D., KINCAID, K., ALT, J. M., HEILMAN, M. J. & HILL, A. M. 2000. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*, 164, 6166-73.
- MINNS, D., SMITH, K. J. & FINDLAY, E. G. 2019. Orchestration of Adaptive T Cell Responses by Neutrophil Granule Contents. *Mediators Inflamm*, 2019, 8968943.
- MISHALIAN, I., BAYUH, R., LEVY, L., ZOLOTAROV, L., MICHAELI, J. & FRIDLENDER, Z. G. 2013. Tumor-associated neutrophils (TAN) develop pro-tumorigenic properties during tumor progression. *Cancer Immunol Immunother*, 62, 1745-56.
- MOLLINEDO, F. 2019. Neutrophil Degranulation, Plasticity, and Cancer Metastasis. *Trends Immunol*, 40, 228-242.
- MOORE, R. J., OWENS, D. M., STAMP, G., ARNOTT, C., BURKE, F., EAST, N., HOLDSWORTH, H., TURNER, L., ROLLINS, B., PASPARAKIS, M., KOLLIAS, G. & BALKWILL, F. 1999. Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis. *Nat Med*, 5, 828-31.
- MUKAIDA, N., SASAKI, S. I. & BABA, T. 2020. Two-Faced Roles of Tumor-Associated Neutrophils in Cancer Development and Progression. *Int J Mol Sci*, 21.
- MULLER, I., MUNDER, M., KROPF, P. & HANSCH, G. M. 2009. Polymorphonuclear neutrophils and T lymphocytes: strange bedfellows or brothers in arms? *Trends Immunol*, 30, 522-30.
- NABESHIMA, K., INOUE, T., SHIMAO, Y. & SAMESHIMA, T. 2002. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol Int*, 52, 255-64.
- NABIZADEH, J. A., MANTHEY, H. D., STEYN, F. J., CHEN, W., WIDIAPRADJA, A., MD AKHIR, F. N., BOYLE, G. M., TAYLOR, S. M., WOODRUFF, T. M. & ROLFE, B. E. 2016. The Complement C3a Receptor Contributes to Melanoma Tumorigenesis by Inhibiting Neutrophil and CD4+ T Cell Responses. *J Immunol*, 196, 4783-92.
- NAKAMURA, Y., KITANO, S., TAKAHASHI, A., TSUTSUMIDA, A., NAMIKAWA, K., TANESE, K., ABE, T., FUNAKOSHI, T., YAMAMOTO, N., AMAGAI, M. & YAMAZAKI, N. 2016. Nivolumab for advanced melanoma: pretreatment prognostic factors and early outcome markers during therapy. *Oncotarget*, 7, 77404-77415.
- NAKAYAMA, F., NISHIHARA, S., IWASAKI, H., KUDO, T., OKUBO, R., KANEKO, M., NAKAMURA, M., KARUBE, M., SASAKI, K. & NARIMATSU, H. 2001. CD15 expression in mature granulocytes is determined by alpha 1,3-

- fucosyltransferase IX, but in promyelocytes and monocytes by alpha 1,3-fucosyltransferase IV. *J Biol Chem*, 276, 16100-6.
- NOMAN, M. Z., BUART, S., VAN PELT, J., RICHON, C., HASMIM, M., LELEU, N., SUCHORSKA, W. M., JALIL, A., LECLUSE, Y., EL HAGE, F., GIULIANI, M., PICHON, C., AZZARONE, B., MAZURE, N., ROMERO, P., MAMI-CHOUAIB, F. & CHOUAIB, S. 2009. The cooperative induction of hypoxia-inducible factor-1 alpha and STAT3 during hypoxia induced an impairment of tumor susceptibility to CTL-mediated cell lysis. *J Immunol*, 182, 3510-21.
- NOMAN, M. Z., DESANTIS, G., JANJI, B., HASMIM, M., KARRAY, S., DESSEN, P., BRONTE, V. & CHOUAIB, S. 2014. PD-L1 is a novel direct target of HIF-1alpha, and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *J Exp Med*, 211, 781-90.
- NOWICKI, T. S., HU-LIESKOVAN, S. & RIBAS, A. 2018. Mechanisms of Resistance to PD-1 and PD-L1 Blockade. *Cancer J*, 24, 47-53.
- O'DONNELL, J. S., LONG, G. V., SCOLYER, R. A., TENG, M. W. & SMYTH, M. J. 2017. Resistance to PD1/PDL1 checkpoint inhibition. *Cancer Treat Rev*, 52, 71-81.
- BERG, H. H., WESCH, D., KALYAN, S. & KABELITZ, D. 2019. Regulatory Interactions Between Neutrophils, Tumor Cells and T Cells. *Front Immunol*, 10, 1690.
- OHM, J. E. & CARBONE, D. P. 2001. VEGF as a mediator of tumor-associated immunodeficiency. *Immunol Res*, 23, 263-72.
- ORIOLO, R., LE PENDU, J. & MOLLICONE, R. 1986. Genetics of ABO, H, Lewis, X and related antigens. *Vox Sang*, 51, 161-71.
- PALAZON, A., TYRAKIS, P. A., MACIAS, D., VELICA, P., RUNDQVIST, H., FITZPATRICK, S., VOJNOVIC, N., PHAN, A. T., LOMAN, N., HEDENFALK, I., HATSCHEK, T., LOVROT, J., FOUKAKIS, T., GOLDRATH, A. W., BERGH, J. & JOHNSON, R. S. 2017. An HIF-1alpha/VEGF-A Axis in Cytotoxic T Cells Regulates Tumor Progression. *Cancer Cell*, 32, 669-683 e5.
- PANDEY, S., SINGH, S., ANANG, V., BHATT, A. N., NATARAJAN, K. & DWARAKANATH, B. S. 2015. Pattern Recognition Receptors in Cancer Progression and Metastasis. *Cancer Growth Metastasis*, 8, 25-34.
- PARDOLL, D. M. 2012. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 12, 252-64.
- PARK, B. V., FREEMAN, Z. T., GHASEMZADEH, A., CHATTERGOON, M. A., RUTEBEMBERWA, A., STEIGNER, J., WINTER, M. E., HUYNH, T. V., SEBALD, S. M., LEE, S. J., PAN, F., PARDOLL, D. M. & COX, A. L. 2016. TGFbeta1-Mediated SMAD3 Enhances PD-1 Expression on Antigen-Specific T Cells in Cancer. *Cancer Discov*, 6, 1366-1381.
- PARKS, S. K., CORMERAIS, Y. & POUYSSEGUR, J. 2017. Hypoxia and cellular metabolism in tumour pathophysiology. *J Physiol*, 595, 2439-2450.
- PATEL, S., FU, S., MASTIO, J., DOMINGUEZ, G. A., PUROHIT, A., KOSSENKOV, A., LIN, C., ALICEA-TORRES, K., SEHGAL, M., NEFEDOVA, Y., ZHOU, J., LANGUINO, L. R., CLENDENIN, C., VONDERHEIDE, R. H., MULLIGAN, C., NAM, B., HOCKSTEIN, N., MASTERS, G., GUARINO, M., SCHUG, Z. T., ALTIERI, D. C. & GABRILOVICH, D. I. 2018. Unique pattern of neutrophil migration and function during tumor progression. *Nat Immunol*, 19, 1236-1247.
- PENG, W., MCKENZIE, J. A. & HWU, P. 2016. Complementing T-cell Function: An Inhibitory Role of the Complement System in T-cell-Mediated Antitumor Immunity. *Cancer Discov*, 6, 953-5.

- PEREGO, M., TYURIN, V. A., TYURINA, Y. Y., YELLETS, J., NACARELLI, T., LIN, C., NEFEDOVA, Y., KOSSENKOV, A., LIU, Q., SREEDHAR, S., PASS, H., ROTH, J., VOGL, T., FELDSER, D., ZHANG, R., KAGAN, V. E. & GABRILOVICH, D. I. 2020. Reactivation of dormant tumor cells by modified lipids derived from stress-activated neutrophils. *Sci Transl Med*, 12.
- PERRIER, A., DIDELOT, A., LAURENT-PUIG, P., BLONS, H. & GARINET, S. 2020. Epigenetic Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors. *Biomolecules*, 10.
- PICKAVER, A. H., RATCLIFFE, N. A., WILLIAMS, A. E. & SMITH, H. 1972. Cytotoxic effects of peritoneal neutrophils on a syngeneic rat tumour. *Nat New Biol*, 235, 186-7.
- PILLAY, J., TAK, T., KAMP, V. M. & KOENDERMAN, L. 2013. Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences. *Cell Mol Life Sci*, 70, 3813-27.
- POKLEPOVIC, A. S. & LUKE, J. J. 2020. Considering adjuvant therapy for stage II melanoma. *Cancer*, 126, 1166-1174.
- POWELL, D. R. & HUTTENLOCHER, A. 2016. Neutrophils in the Tumor Microenvironment. *Trends Immunol*, 37, 41-52.
- PYLAEVA, E., LANG, S. & JABLONSKA, J. 2016. The Essential Role of Type I Interferons in Differentiation and Activation of Tumor-Associated Neutrophils. *Front Immunol*, 7, 629.
- QUATROMONI, J. G. & ERUSLANOV, E. 2012. Tumor-associated macrophages: function, phenotype, and link to prognosis in human lung cancer. *Am J Transl Res*, 4, 376-89.
- QUEEN, M. M., RYAN, R. E., HOLZER, R. G., KELLER-PECK, C. R. & JORCYK, C. L. 2005. Breast cancer cells stimulate neutrophils to produce oncostatin M: potential implications for tumor progression. *Cancer Res*, 65, 8896-904.
- RAMBOW, F., ROGIERS, A., MARIN-BEJAR, O., AIBAR, S., FEMEL, J., DEWAELE, M., KARRAS, P., BROWN, D., CHANG, Y. H., DEBIEC-RYCHTER, M., ADRIAENS, C., RADAELLI, E., WOLTER, P., BECHTER, O., DUMMER, R., LEVESQUE, M., PIRIS, A., FREDERICK, D. T., BOLAND, G., FLAHERTY, K. T., VAN DEN OORD, J., VOET, T., AERTS, S., LUND, A. W. & MARINE, J. C. 2018. Toward Minimal Residual Disease-Directed Therapy in Melanoma. *Cell*, 174, 843-855 e19.
- RASTRELLI, M., TROPEA, S., ROSSI, C. R. & ALAIBAC, M. 2014. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo*, 28, 1005-11.
- REIS, E. S., MASTELLOS, D. C., HAJISHENGALLIS, G. & LAMBRIS, J. D. 2019. New insights into the immune functions of complement. *Nat Rev Immunol*, 19, 503-516.
- RIBAS, A. 2015. Adaptive Immune Resistance: How Cancer Protects from Immune Attack. *Cancer Discov*, 5, 915-9.
- ROBERT, C., THOMAS, L., BONDARENKO, I., O'DAY, S., WEBER, J., GARBE, C., LEBBE, C., BAURAIN, J. F., TESTORI, A., GROB, J. J., DAVIDSON, N., RICHARDS, J., MAIO, M., HAUSCHILD, A., MILLER, W. H., JR., GASCON, P., LOTEM, M., HARMANKAYA, K., IBRAHIM, R., FRANCIS, S., CHEN, T. T., HUMPHREY, R., HOOS, A. & WOLCHOK, J. D. 2011. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 364, 2517-26.
- ROSALES, C. 2018. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Front Physiol*, 9, 113.

- ROSNER, S., KWONG, E., SHOUSHARI, A. N., FRIEDMAN, C. F., BETOF, A. S., BRADY, M. S., COIT, D. G., CALLAHAN, M. K., WOLCHOK, J. D., CHAPMAN, P. B., PANAGEAS, K. S. & POSTOW, M. A. 2018. Peripheral blood clinical laboratory variables associated with outcomes following combination nivolumab and ipilimumab immunotherapy in melanoma. *Cancer Med*, 7, 690-697.
- ROUMENINA, L. T., DAUGAN, M. V., PETITPREZ, F., SAUTES-FRIDMAN, C. & FRIDMAN, W. H. 2019. Context-dependent roles of complement in cancer. *Nat Rev Cancer*, 19, 698-715.
- ROWSHANRAVAN, B., HALLIDAY, N. & SANSOM, D. M. 2018. CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood*, 131, 58-67.
- RUMA, I. M., PUTRANTO, E. W., KONDO, E., MURATA, H., WATANABE, M., HUANG, P., KINOSHITA, R., FUTAMI, J., INOUE, Y., YAMAUCHI, A., SUMARDIKA, I. W., YOUYI, C., YAMAMOTO, K., NASU, Y., NISHIBORI, M., HIBINO, T. & SAKAGUCHI, M. 2016. MCAM, as a novel receptor for S100A8/A9, mediates progression of malignant melanoma through prominent activation of NF-kappaB and ROS formation upon ligand binding. *Clin Exp Metastasis*, 33, 609-27.
- RUSSELL, B. L., SOOKLAL, S. A., MALINDISA, S. T., DAKA, L. J. & NTWASA, M. 2021. The Tumor Microenvironment Factors That Promote Resistance to Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Front Oncol*, 11, 641428.
- RYCKMAN, C., VANDAL, K., ROULEAU, P., TALBOT, M. & TESSIER, P. A. 2003. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J Immunol*, 170, 3233-42.
- SAGIV, J. Y., MICHAELI, J., ASSI, S., MISHALIAN, I., KISOS, H., LEVY, L., DAMTI, P., LUMBROSO, D., POLYANSKY, L., SIONOV, R. V., ARIEL, A., HOVAV, A. H., HENKE, E., FRIDLENDER, Z. G. & GRANOT, Z. 2015. Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. *Cell Rep*, 10, 562-73.
- SAMPLE, A. & HE, Y. Y. 2018. Mechanisms and prevention of UV-induced melanoma. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 34, 13-24.
- SCHEDER, F., MAYER-HAIN, S., PAPPELBAUM, K. I., METZE, D., STOCK, M., GOERGE, T., LOSER, K., SUNDERKOTTER, C., LUGER, T. A. & WEISHAUPT, C. 2020. Evidence and impact of neutrophil extracellular traps in malignant melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*, 33, 63-73.
- SCHMIDT, H., BASTHOLT, L., GEERTSEN, P., CHRISTENSEN, I. J., LARSEN, S., GEHL, J. & VON DER MAASE, H. 2005. Elevated neutrophil and monocyte counts in peripheral blood are associated with poor survival in patients with metastatic melanoma: a prognostic model. *Br J Cancer*, 93, 273-8.
- SCHONTHALER, H. B., GUINEA-VINIEGRA, J., WCULEK, S. K., RUPPEN, I., XIMENEZ-EMBUN, P., GUIO-CARRION, A., NAVARRO, R., HOGG, N., ASHMAN, K. & WAGNER, E. F. 2013. S100A8-S100A9 protein complex mediates psoriasis by regulating the expression of complement factor C3. *Immunity*, 39, 1171-81.
- SCHWARTZ, L. H., LITIERE, S., DE VRIES, E., FORD, R., GWYTHYER, S., MANDREKAR, S., SHANKAR, L., BOGAERTS, J., CHEN, A., DANCEY, J., HAYES, W., HODI, F. S., HOEKSTRA, O. S., HUANG, E. P., LIN, N., LIU, Y., THERASSE, P., WOLCHOK, J. D. & SEYMOUR, L. 2016. RECIST 1.1-Update and clarification: From the RECIST committee. *Eur J Cancer*, 62, 132-7.

- SCULLY, M., CATALAND, S. R., PEYVANDI, F., COPPO, P., KNOBL, P., KREMER HOVINGA, J. A., METJIAN, A., DE LA RUBIA, J., PAVENSKI, K., CALLEWAERT, F., BISWAS, D., DE WINTER, H., ZELDIN, R. K. & INVESTIGATORS, H. 2019. Caplacizumab Treatment for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *N Engl J Med*, 380, 335-346.
- SHAUL, M. E. & FRIDLENDER, Z. G. 2018. Cancer-related circulating and tumor-associated neutrophils - subtypes, sources and function. *FEBS J*, 285, 4316-4342.
- SHEN, M., HU, P., DONSKOV, F., WANG, G., LIU, Q. & DU, J. 2014. Tumor-associated neutrophils as a new prognostic factor in cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 9, e98259.
- SHIRLEY, S. H., VON MALTZAN, K., ROBBINS, P. O. & KUSEWITT, D. F. 2014. Melanocyte and melanoma cell activation by calprotectin. *J Skin Cancer*, 2014, 846249.
- SIMICZYJEW, A., DRATKIEWICZ, E., MAZURKIEWICZ, J., ZIETEK, M., MATKOWSKI, R. & NOWAK, D. 2020. The Influence of Tumor Microenvironment on Immune Escape of Melanoma. *Int J Mol Sci*, 21.
- SIMPSON, T. R., LI, F., MONTALVO-ORTIZ, W., SEPULVEDA, M. A., BERGERHOFF, K., ARCE, F., RODDIE, C., HENRY, J. Y., YAGITA, H., WOLCHOK, J. D., PEGGS, K. S., RAVETCH, J. V., ALLISON, J. P. & QUEZADA, S. A. 2013. Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J Exp Med*, 210, 1695-710.
- SINGHAL, S., BHOJNAGARWALA, P. S., O'BRIEN, S., MOON, E. K., GARFALL, A. L., RAO, A. S., QUATROMONI, J. G., STEPHEN, T. L., LITZKY, L., DESHPANDE, C., FELDMAN, M. D., HANCOCK, W. W., CONEJO-GARCIA, J. R., ALBELDA, S. M. & ERUSLANOV, E. B. 2016. Origin and Role of a Subset of Tumor-Associated Neutrophils with Antigen-Presenting Cell Features in Early-Stage Human Lung Cancer. *Cancer Cell*, 30, 120-135.
- SINHA, P., OKORO, C., FOELL, D., FREEZE, H. H., OSTRAND-ROSENBERG, S. & SRIKRISHNA, G. 2008. Proinflammatory S100 proteins regulate the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol*, 181, 4666-75.
- SIONOV, R. V., ASSI, S., GERSHKOVITZ, M., SAGIV, J. Y., POLYANSKY, L., MISHALIAN, I., FRIDLENDER, Z. G. & GRANOT, Z. 2015a. Isolation and Characterization of Neutrophils with Anti-Tumor Properties. *J Vis Exp*, e52933.
- SIONOV, R. V., FRIDLENDER, Z. G. & GRANOT, Z. 2015b. The Multifaceted Roles Neutrophils Play in the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron*, 8, 125-58.
- SOUTO, J. C., VILA, L. & BRU, A. 2011. Polymorphonuclear neutrophils and cancer: intense and sustained neutrophilia as a treatment against solid tumors. *Med Res Rev*, 31, 311-63.
- SRIKRISHNA, G. 2012. S100A8 and S100A9: new insights into their roles in malignancy. *J Innate Immun*, 4, 31-40.
- STOTZ, M., GERGER, A., EISNER, F., SZKANDERA, J., LOIBNER, H., RESS, A. L., KORNPRAT, P., ALZOUGHBI, W., SEGGEWIES, F. S., LACKNER, C., STOJAKOVIC, T., SAMONIGG, H., HOEFLER, G. & PICHLER, M. 2013. Increased neutrophil-lymphocyte ratio is a poor prognostic factor in patients with primary operable and inoperable pancreatic cancer. *Br J Cancer*, 109, 416-21.
- STRAUSS, J., HEERY, C. R., SCHLOM, J., MADAN, R. A., CAO, L., KANG, Z., LAMPING, E., MARTE, J. L., DONAHUE, R. N., GRENGA, I., CORDES, L.,

- CHRISTENSEN, O., MAHNKE, L., HELWIG, C. & GULLEY, J. L. 2018. Phase I Trial of M7824 (MSB0011359C), a Bifunctional Fusion Protein Targeting PD-L1 and TGFbeta, in Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res*, 24, 1287-1295.
- STRONCEK, D. F., SHANKAR, R. A. & SKUBITZ, K. M. 2005. The subcellular distribution of myeloid-related protein 8 (MRP8) and MRP14 in human neutrophils. *J Transl Med*, 3, 36.
- TAKASHIMA, A. & YAO, Y. 2015. Neutrophil plasticity: acquisition of phenotype and functionality of antigen-presenting cell. *J Leukoc Biol*, 98, 489-96.
- TAKEUCHI, Y. & NISHIKAWA, H. 2016. Roles of regulatory T cells in cancer immunity. *Int Immunol*, 28, 401-9.
- TARHINI, A. A., GOGAS, H. & KIRKWOOD, J. M. 2012. IFN-alpha in the treatment of melanoma. *J Immunol*, 189, 3789-93.
- TAZZYMAN, S., LEWIS, C. E. & MURDOCH, C. 2009. Neutrophils: key mediators of tumour angiogenesis. *Int J Exp Pathol*, 90, 222-31.
- TECCHIO, C., MICHELETTI, A. & CASSATELLA, M. A. 2014. Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. *Front Immunol*, 5, 508.
- TEIMOURI, F., NIKFAR, S. & ABDOLLAHI, M. 2013. Efficacy and side effects of dacarbazine in comparison with temozolomide in the treatment of malignant melanoma: a meta-analysis consisting of 1314 patients. *Melanoma Res*, 23, 381-9.
- TEMPLETON, A. J., MCNAMARA, M. G., SERUGA, B., VERA-BADILLO, F. E., ANEJA, P., OCANA, A., LEIBOWITZ-AMIT, R., SONPAVDE, G., KNOX, J. J., TRAN, B., TANNOCK, I. F. & AMIR, E. 2014. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*, 106, dju124.
- THOMMEN, D. S., SCHREINER, J., MULLER, P., HERZIG, P., ROLLER, A., BELOUSOV, A., UMANA, P., PISA, P., KLEIN, C., BACAC, M., FISCHER, O. S., MOERSIG, W., SAVIC PRINCE, S., LEVITSKY, V., KARANIKAS, V., LARDINOIS, D. & ZIPPELIUS, A. 2015. Progression of Lung Cancer Is Associated with Increased Dysfunction of T Cells Defined by Coexpression of Multiple Inhibitory Receptors. *Cancer Immunol Res*, 3, 1344-55.
- TOPALIAN, S. L., HODI, F. S., BRAHMER, J. R., GETTINGER, S. N., SMITH, D. C., MCDERMOTT, D. F., POWDERLY, J. D., CARVAJAL, R. D., SOSMAN, J. A., ATKINS, M. B., LEMING, P. D., SPIGEL, D. R., ANTONIA, S. J., HORN, L., DRAKE, C. G., PARDOLL, D. M., CHEN, L., SHARFMAN, W. H., ANDERS, R. A., TAUBE, J. M., MCMILLER, T. L., XU, H., KORMAN, A. J., JUREKUNKEL, M., AGRAWAL, S., MCDONALD, D., KOLLIA, G. D., GUPTA, A., WIGGINTON, J. M. & SZNOL, M. 2012. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*, 366, 2443-54.
- TREFFERS, L. W., HIEMSTRA, I. H., KUIJPERS, T. W., VAN DEN BERG, T. K. & MATLUNG, H. L. 2016. Neutrophils in cancer. *Immunol Rev*, 273, 312-28.
- TUMEH, P. C., HARVIEW, C. L., YEARLEY, J. H., SHINTAKU, I. P., TAYLOR, E. J., ROBERT, L., CHMIELOWSKI, B., SPASIC, M., HENRY, G., CIOBANU, V., WEST, A. N., CARMONA, M., KIVORK, C., SEJA, E., CHERRY, G., GUTIERREZ, A. J., GROGAN, T. R., MATEUS, C., TOMASIC, G., GLASPY, J. A., EMERSON, R. O., ROBINS, H., PIERCE, R. H., ELASHOFF, D. A., ROBERT, C. & RIBAS, A. 2014. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*, 515, 568-71.
- UMANSKY, V. & SEVKO, A. 2012. Melanoma-induced immunosuppression and its neutralization. *Semin Cancer Biol*, 22, 319-26.

- UMANSKY, V., UTIKAL, J. & GEBHARDT, C. 2016. Predictive immune markers in advanced melanoma patients treated with ipilimumab. *Oncoimmunology*, 5, e1158901.
- URBAN, C. F., ERMERT, D., SCHMID, M., ABU-ABED, U., GOOSMANN, C., NACKEN, W., BRINKMANN, V., JUNGBLUT, P. R. & ZYCHLINSKY, A. 2009. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog*, 5, e1000639.
- USTYANOVSKA AVTENYUK, N., VISSER, N., BREMER, E. & WIERSMA, V. R. 2020. The Neutrophil: The Underdog That Packs a Punch in the Fight against Cancer. *Int J Mol Sci*, 21.
- VALPIONE, S., MARTINOLI, C., FAVA, P., MOCELLIN, S., CAMPANA, L. G., QUAGLINO, P., FERRUCCI, P. F., PIGOZZO, J., ASTRUA, C., TESTORI, A. & CHIARION-SILENI, V. 2015. Personalised medicine: Development and external validation of a prognostic model for metastatic melanoma patients treated with ipilimumab. *Eur J Cancer*, 51, 2086-94.
- VAN DER GIESSEN, L. J., GOSSELINK, R., HOP, W. C. & TIDDENS, H. A. 2007. Recombinant human DNase nebulisation in children with cystic fibrosis: before bedtime or after waking up? *Eur Respir J*, 30, 763-8.
- VASUDEV, N. S. & REYNOLDS, A. R. 2014. Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. *Angiogenesis*, 17, 471-94.
- VAUPEL, P. & MULTHOFF, G. 2018. Hypoxia-/HIF-1alpha-Driven Factors of the Tumor Microenvironment Impeding Antitumor Immune Responses and Promoting Malignant Progression. *Adv Exp Med Biol*, 1072, 171-175.
- VEDDER, D., GERRITSEN, M., DUVVURI, B., VAN VOLLENHOVEN, R. F., NURMOHAMED, M. T. & LOOD, C. 2020. Neutrophil activation identifies patients with active polyarticular gout. *Arthritis Res Ther*, 22, 148.
- VIOLA, A., SARUKHAN, A., BRONTE, V. & MOLON, B. 2012. The pros and cons of chemokines in tumor immunology. *Trends Immunol*, 33, 496-504.
- WAGNER, N. B., FORSCHNER, A., LEITER, U., GARBE, C. & EIGENTLER, T. K. 2018. S100B and LDH as early prognostic markers for response and overall survival in melanoma patients treated with anti-PD-1 or combined anti-PD-1 plus anti-CTLA-4 antibodies. *Br J Cancer*, 119, 339-346.
- WAGNER, N. B., WEIDE, B., GRIES, M., REITH, M., TARNANIDIS, K., SCHUERMANS, V., KEMPER, C., KEHREL, C., FUNDER, A., LICHTENBERGER, R., SUCKER, A., HERPEL, E., HOLLAND-LETZ, T., SCHADENDORF, D., GARBE, C., UMANSKY, V., UTIKAL, J. & GEBHARDT, C. 2019. Tumor microenvironment-derived S100A8/A9 is a novel prognostic biomarker for advanced melanoma patients and during immunotherapy with anti-PD-1 antibodies. *J Immunother Cancer*, 7, 343.
- WALSH, S. R., COOK, E. J., GOULDER, F., JUSTIN, T. A. & KEELING, N. J. 2005. Neutrophil-lymphocyte ratio as a prognostic factor in colorectal cancer. *J Surg Oncol*, 91, 181-4.
- WANG, S., SONG, R., WANG, Z., JING, Z., WANG, S. & MA, J. 2018. S100A8/A9 in Inflammation. *Front Immunol*, 9, 1298.
- WANG, T. S., JOHNSON, T. M., CASCADE, P. N., REDMAN, B. G., SONDAK, V. K. & SCHWARTZ, J. L. 2004. Evaluation of staging chest radiographs and serum lactate dehydrogenase for localized melanoma. *J Am Acad Dermatol*, 51, 399-405.

- WEIDE, B., MARTENS, A., HASSEL, J. C., BERKING, C., POSTOW, M. A., BISSCHOP, K., SIMEONE, E., MANGANA, J., SCHILLING, B., DI GIACOMO, A. M., BRENNER, N., KAHLER, K., HEINZERLING, L., GUTZMER, R., BENDER, A., GEBHARDT, C., ROMANO, E., MEIER, F., MARTUS, P., MAIO, M., BLANK, C., SCHADENDORF, D., DUMMER, R., ASCIERTO, P. A., HOSPERS, G., GARBE, C. & WOLCHOK, J. D. 2016. Baseline Biomarkers for Outcome of Melanoma Patients Treated with Pembrolizumab. *Clin Cancer Res*, 22, 5487-5496.
- WEIS, S. M. & CHERESH, D. A. 2005. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature*, 437, 497-504.
- WHERRY, E. J. & KURACHI, M. 2015. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol*, 15, 486-99.
- WOLCHOK, J. D., HOOS, A., O'DAY, S., WEBER, J. S., HAMID, O., LEBBE, C., MAIO, M., BINDER, M., BOHNSACK, O., NICHOL, G., HUMPHREY, R. & HODI, F. S. 2009. Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria. *Clin Cancer Res*, 15, 7412-20.
- WOLFRAM, L. A., WALZ, T. M., JAMES, Z., FERNANDEZ, T. & LETTERIO, J. J. 2004. p21Cip1 and p27Kip1 act in synergy to alter the sensitivity of naive T cells to TGF-beta-mediated G1 arrest through modulation of IL-2 responsiveness. *J Immunol*, 173, 3093-102.
- WONG, S. L., DEMERS, M., MARTINOD, K., GALLANT, M., WANG, Y., GOLDFINE, A. B., KAHN, C. R. & WAGNER, D. D. 2015. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. *Nat Med*, 21, 815-9.
- WU, L., SAXENA, S., AWAJI, M. & SINGH, R. K. 2019a. Tumor-Associated Neutrophils in Cancer: Going Pro. *Cancers (Basel)*, 11.
- WU, Q., JIANG, L., LI, S. C., HE, Q. J., YANG, B. & CAO, J. 2021. Small molecule inhibitors targeting the PD-1/PD-L1 signaling pathway. *Acta Pharmacol Sin*, 42, 1-9.
- WU, S. & SINGH, R. K. 2011. Resistance to chemotherapy and molecularly targeted therapies: rationale for combination therapy in malignant melanoma. *Curr Mol Med*, 11, 553-63.
- WU, Y., CHEN, W., XU, Z. P. & GU, W. 2019b. PD-L1 Distribution and Perspective for Cancer Immunotherapy-Blockade, Knockdown, or Inhibition. *Front Immunol*, 10, 2022.
- YAN, J., KLOECKER, G., FLEMING, C., BOUSAMRA, M., 2ND, HANSEN, R., HU, X., DING, C., CAI, Y., XIANG, D., DONNINGER, H., EATON, J. W. & CLARK, G. J. 2014. Human polymorphonuclear neutrophils specifically recognize and kill cancerous cells. *Oncoimmunology*, 3, e950163.
- YANG, F., FENG, C., ZHANG, X., LU, J. & ZHAO, Y. 2017. The Diverse Biological Functions of Neutrophils, Beyond the Defense Against Infections. *Inflammation*, 40, 311-323.
- YANG, L., LIU, Q., ZHANG, X., LIU, X., ZHOU, B., CHEN, J., HUANG, D., LI, J., LI, H., CHEN, F., LIU, J., XING, Y., CHEN, X., SU, S. & SONG, E. 2020. DNA of neutrophil extracellular traps promotes cancer metastasis via CCDC25. *Nature*, 583, 133-138.
- YAZDANI, H. O., ROY, E., COMERCI, A. J., VAN DER WINDT, D. J., ZHANG, H., HUANG, H., LOUGHRAN, P., SHIVA, S., GELLER, D. A., BARTLETT, D. L., TSUNG, A., SHENG, T., SIMMONS, R. L. & TOHME, S. 2019. Neutrophil Extracellular Traps Drive Mitochondrial Homeostasis in Tumors to Augment Growth. *Cancer Res*, 79, 5626-5639.
- YIPP, B. G. & KUBES, P. 2013. NETosis: how vital is it? *Blood*, 122, 2784-94.

- YU, X., HUANG, X., CHEN, X., LIU, J., WU, C., PU, Q., WANG, Y., KANG, X. & ZHOU, L. 2019. Characterization of a novel anti-human lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) antibody for cancer immunotherapy. *MAbs*, 11, 1139-1148.
- YUAN, J., DONG, X., YAP, J. & HU, J. 2020. The MAPK and AMPK signalings: interplay and implication in targeted cancer therapy. *J Hematol Oncol*, 13, 113.
- ZHANG, J., ENDRES, S. & KOBOLD, S. 2019. Enhancing tumor T cell infiltration to enable cancer immunotherapy. *Immunotherapy*, 11, 201-213.
- ZHANG, N. & BEVAN, M. J. 2012. TGF-beta signaling to T cells inhibits autoimmunity during lymphopenia-driven proliferation. *Nat Immunol*, 13, 667-73.
- ZHANG, X., HALVORSEN, K., ZHANG, C. Z., WONG, W. P. & SPRINGER, T. A. 2009. Mechanoenzymatic cleavage of the ultralarge vascular protein von Willebrand factor. *Science*, 324, 1330-4.
- ZHANG, X. & XU, W. 2017. Neutrophils diminish T-cell immunity to foster gastric cancer progression: the role of GM-CSF/PD-L1/PD-1 signalling pathway. *Gut*, 66, 1878-1880.
- ZHANG, X., ZHANG, W., YUAN, X., FU, M., QIAN, H. & XU, W. 2016. Neutrophils in cancer development and progression: Roles, mechanisms, and implications (Review). *Int J Oncol*, 49, 857-67.
- ZHU, Y., KNOLHOFF, B. L., MEYER, M. A., NYWENING, T. M., WEST, B. L., LUO, J., WANG-GILLAM, A., GOEDEGEBUURE, S. P., LINEHAN, D. C. & DENARDO, D. G. 2014. CSF1/CSF1R blockade reprograms tumor-infiltrating macrophages and improves response to T-cell checkpoint immunotherapy in pancreatic cancer models. *Cancer Res*, 74, 5057-69.
- ZLOBEC, I., KOELZER, V. H., DAWSON, H., PERREN, A. & LUGLI, A. 2013. Next-generation tissue microarray (ngTMA) increases the quality of biomarker studies: an example using CD3, CD8, and CD45RO in the tumor microenvironment of six different solid tumor types. *J Transl Med*, 11, 104.

11 Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

12 Eigene Veröffentlichungen

Publikationen

Ammann, N.L., Schwietzer, Y.F., Mess, C., Stadler, J.C., Geidel, G., Kött, J., Pantel, K., Schneider, S.W., Utikal, J., Bauer, A.T., Gebhardt, C. 2022. Activated Eosinophils Predict Longer Progression-Free Survival under Immune Checkpoint Inhibition in Melanoma. *Cancers*, 14, 5676. doi: 10.3390/cancers14225676. PMID: 36428768.

Im Revisionsprozess (Cancers):

Schwietzer, Y.F., Ammann, N.L., Mess, C., Stadler, J.C., Geidel, G., Schwietzer, Y.A., Kött, J., Pantel, K., Schneider, S.W., Utikal, J., Bauer, A.T., Gebhardt, C. Increasing S100A8/A9 and Neutrophils during Immune-Checkpoint Inhibition Predict Poor Survival in Metastatic Melanoma.

Vortrag und Poster

Schwietzer, Y.F., Ammann, N.L., Mess, C., Stadler, J.C., Geidel, G., Kött, J., Schneider, S.W., Bauer, A.T., Gebhardt, C. 2022. Role of the Damage-Associated Molecular Pattern Molecule S100A8/A9 and Neutrophils in the Peripheral Blood and the Tumor Microenvironment in Malignant Melanoma. 48. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), virtuell.

13 Danksagung

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

14 Eidesstattliche Versicherung

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

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

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

Unterschrift: