

DISSERTATION

Einfluss des CDK4/6-Inhibitors Ribociclib auf die periphere Immunantwort
beim Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinom.

Influence of the CDK4/6 inhibitor Ribociclib on the peripheral immune re-
sponse in hormone receptor-positive breast cancer.

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sarvenaz Yaghobramzi

Erstbetreuerin: PD Dr. Antonia Busse

Datum der Promotion: 29.11.2024

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	iii
Abbildungsverzeichnis	iv
Abkürzungsverzeichnis	v
Zusammenfassung.....	1
1 Einleitung	4
1.1 Das Hormonrezeptor- positive Mammakarzinom	4
1.2 Die Rolle der Cyklin-abhängigen Kinasen 4 und 6 im Zellzyklus.....	5
1.3 Die zelluläre Immunantwort und Ihre Rolle bei Tumoren.....	6
1.4 T-Zell-Rezeptor und dessen Rolle bei der Antitumorimmunität	7
1.5 Immunmodulatorische Wirkung der CDK4/6- Inhibitoren	8
1.6 Einsatz immunmodulatorisch wirksamer Substanzen in der Praxis	9
1.7 Spezifische Fragestellung.....	10
2 Methodik.....	11
2.1 Patientenkollektiv und Blutproben	11
2.2 Bestimmung des Immunphänotyps im peripheren Blut.....	12
2.3 Genexpressionsanalysen	15
2.4 T-Zell-Rezeptor-Diversität	16
2.5 Statistik	16
3 Ergebnisse	17
3.1 Veränderungen der Immunzellsubpopulation während der Behandlung.....	17
3.2 Veränderungen der Genexpressionsmuster.....	20
3.3 Veränderungen der Diversität und Kolonialität des T Zell-Rezeptors während der Behandlung	23
3.4 Korrelation zwischen der Abnahme regulatorischer T-Zellen und dem klinischen Ansprechen	25
4. Diskussion	27

4.1	Kurze Zusammenfassung der Ergebnisse.....	27
4.2	Interpretation der Ergebnisse	27
4.3	Einbettung der Ergebnisse in den bisherigen Forschungsstand	28
4.4	Stärken und Schwächen der Studie	29
4.5	Implikationen für Praxis und/oder zukünftige Forschung.....	30
5.	Schlussfolgerungen	32
	Literaturverzeichnis	33
	Eidesstattliche Versicherung.....	40
	Anteilerklärung an der erfolgten Publikation.....	41
	Druckexemplar(e) der Publikation(en)	43
	Lebenslauf – Sarvenaz Yaghobramzi	55
	Komplette Publikationsliste	56
	Danksagung	57

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. DuraClone IM Treg subsets Tube	13
Tabelle 2. DuraClone IM Tcell subsets Tube.....	13
Tabelle 3. Die 10 wichtigsten unterschiedlich exprimierten Gene.....	20

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Regulation des Zellzyklus beim Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinom.....	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Sequenzierung der TCR β -Kette.....	8
Abbildung 3: Gating Strategie: Repräsentative Dot Plots der Gating-Strategie der PBMCs von Patienten vor und nach 12 Wochen Behandlung.	14
Abbildung 4: Veränderung verschiedener T-Zell Subpopulationen im peripheren Immunsystem während der Behandlung.....	17
Abbildung 5: Veränderungen der medianen Häufigkeit in naiven CD8+ Zellen und in CD8+CD57+PD1+ T-Zellen während der Behandlung mit Ribociclib und Letrozol.	18
Abbildung 6: Gen Set Enrichment Analyse von differentiell exprimierten Gen-Signaturen	21
Abbildung 7: Veränderung der T-Zell Repertoire Diversität und Klonalität während der Behandlung.	23
Abbildung 8 : Vergleich der Häufigkeiten der 20 häufigsten TCR-Klone zwischen W0 und W12 der Behandlung.	24
Abbildung 9: Korrelation zwischen der Abnahme regulatorischer T-Zellen (CD4+FOXP3+CD25+Helios+) und das Ansprechen auf die Behandlung mit Ribociclib in Kombination mit Letrozol (n=22).	25
Abbildung 10: Korrelation zwischen den Veränderungen einzelner T-Zell Subpopulationen und dem klinischen Ansprechen.	26

Abkürzungsverzeichnis

ATM	Serin-Proteinkinase (Ataxia Teleangiectasia Mutated)
AKT	Serin/Threonin-Kinase (Proteinkinase B)
BCL2L1	B-cell lymphoma 2 like protein 1
BCL-XL	B-cell lymphoma-extra large
CCL2/7/22	CC-Chemokin-Ligand 2/7/22 (C-C Motif Chemokine Ligand 2/7/22)
CDK4/6	Cyclin Dependent Kinase 4/6
CDR (1-3)	Complementarity Determining Region
Chk2	Checkpoint Kinase 2
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4
E2F	Transkriptionsfaktor in Eukaryoten
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
ER	Öströgen-Rezeptor
FOXP3	Forkhead-Box-Protein P3
HER2	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
HERV	Humanes endogenes Retrovirus
HR	Hormonrezeptor
IFN	Interferon
IL6/11	Interleukin 6/11
IL1R1	Interleukin-1-Rezeptor-1
LAG3	Lymphocyte-activation gene 3
MDSC	myeloide Suppressorzellen
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	Boten-RNA
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NCRNPD	Non-Complete Response or Non-Progressive Disease
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NGS	Next-Generation Sequencing
NK	Natürliche Killerzelle
OS	Overall Survival
p16	CDK-Inhibitor 2A
p27	Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitor 1B
PBMC	Periphere mononukleäre Zellen des Blutes
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PD-1	Programmed cell death protein 1
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PFS	Progressionsfreies Überleben

Abkürzungsverzeichnis

PIK3	Phosphoinositid-3-Kinasen
Rb	Retinoblastom Protein
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
TCM	Zentrale Gedächtnis-T-Zelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
TE	Effektor-T-Zelle
TEM	Effektor-Gedächtnis-T-Zelle
TGF-beta	Transforming growth factor beta
Th1	T-Helfer Zellen
TIL	Tumor-infiltrierender Lymphozyt
Tim-3	T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3
TKI	Tyrosinkinaseinhibitoren
TM	Gedächtnis-T-Zelle
TME	Tumormikroenvironment
TN	Naïve T-Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	Regulatorische T-Zelle
UBB	Ubiquitin B
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ZNS	Zentrales Nervensystem

Zusammenfassung

Einführung:

CDK4/6-Inhibitoren sind Zellzyklushemmer, die vor allem bei der Behandlung des Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinoms eine bedeutende Rolle spielen. Neben der antiproliferativen Wirkung der CDK4/6-Inhibitoren gegenüber Tumorzellen, konnte *in vitro* eine günstige immunmodulatorische Wirkung nachgewiesen werden. Ziel unserer Arbeit ist es, die Auswirkungen einer Therapie mit CDK4/6-Inhibitoren beim Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinom im menschlichen System zu untersuchen.

Methoden:

Innerhalb der RIBECCA-Studie wurde vor Therapiebeginn und nach 12 Wochen Therapie mit Ribociclib und Letrozol Blut entnommen. Aus dem Vollblut der Patienten wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) isoliert. Mittels Durchflusszytometrie, Genexpressionsanalysen und TCRVbeta-Repertoire Analysen wurden die PBMCs vergleichend und paarweise zwischen Woche 0 vor der Behandlung und 12 Wochen nach der Behandlung untersucht.

Ergebnisse:

Aus den durchflusszytometrischen Analysen ergab sich ein signifikanter Anstieg der naiven und früh naiven CD4⁺ T-Zellen, während die Subpopulationen der regulatorischen T-Zellen 12 Wochen nach der Therapie signifikant herunterreguliert wurden. Effektor-T-Zellen, T-Zell-Gedächtniszellen und T-Zellen mit Erschöpfungsmarkern blieben weitgehend unverändert. Die Genexpressionsanalysen zeigten einen signifikanten Anstieg der Expression der Gene UBB und BCL2L1. Gene, die für die Antigenverarbeitung und -präsentation verantwortlich sind, sowie Gene, die mit den Interferon-Signalwegen vom Typ I und -III in Verbindung stehen, wurden signifikant hochreguliert. Chemokine, die eine immunsuppressive Wirkung haben, wurden dagegen signifikant herunterreguliert. Nach 12 Wochen Behandlung wurden keine signifikanten Veränderungen in der T-Zell-Diversität beobachtet. Bei einem Teil der Patienten kam es während der Therapie zu einem signifikanten Anstieg der Klonalität des TCR-Repertoires.

Fazit:

Unsere Ergebnisse bestätigen die *in vitro* beschriebenen immunmodulatorischen Wirkungen von Zellzyklushemmern auch im menschlichen System. Die beobachteten Veränderungen deuten darauf hin, dass vielmehr eine bereits bestehende adaptive Immunantwort verstärkt wird, als dass eine *de novo* Immunantwort ausgelöst wird. Die Daten sind Anlass zu der Vermutung, dass mögliche Kombinationstherapien mit CDK4/6-Inhibitoren vielversprechende Wirkungen haben könnten.

Abstract**Introduction:**

CDK4/6 inhibitors are cell cycle inhibitors that play an important role in the treatment of hormone receptor-positive breast carcinoma. In addition to the antiproliferative effect of CDK4/6 inhibitors against tumour cells, a favourable immunomodulatory effect could be demonstrated *in vitro*. The aim of our work is to investigate the effects of therapy with CDK4/6 inhibitors in hormone receptor-positive breast carcinoma within the human system.

Methods:

Within the RIBECCA study, blood was taken from the patients before the start of therapy and after 12 weeks of therapy with ribociclib and letrozole. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from the patients' whole blood. Using flow cytometry, gene expression analyses and TCRV-beta repertoire analyses, the PBMCs were examined comparatively and in pairs between week 0 before treatment and 12 weeks after treatment.

Results:

As a result of immune cell profiling, there was a significant increase in naïve and early naïve CD4⁺ T cells, while the subpopulations of regulatory T cells were significantly downregulated 12 weeks after therapy. Effector T cells, memory T cells and T cells with depletion markers remained largely unchanged. Gene expression analyses showed a

significant increase in the expression of the genes UBB and BCL2L1. Genes responsible for antigen processing and presentation, as well as genes related to type-I and -III-interferon signaling pathways, were significantly upregulated. In contrast, chemokines that have an immunosuppressive effect were significantly downregulated. No significant changes in T cell repertoire diversity were observed after 12 weeks of treatment. In some of the patients, there was a significant increase in T cell repertoire clonality during therapy.

Conclusion:

Our results confirm the immunomodulatory effects of cell cycle inhibitors described in vitro also in the human system. The observed changes indicate that an already existing adaptive immune response is enhanced rather than that a de novo immune response is triggered. The data give rise to the assumption that possible combination therapies with CDK4/6 inhibitors could have promising effects. (Original Abstract modifiziert aus Peuker C.A., Yaghobramzi S. et al, European Journal of Cancer (EJC) 2022)¹

1 Einleitung

1.1 Das Hormonrezeptor- positive Mammakarzinom

Mit fast 69.000 Neuerkrankungen ² pro Jahr, stellt das Mammakarzinom die häufigste Krebsursache bei Frauen in Deutschland dar. Trotz fortgeschrittener Therapieverfahren sowie verschiedener Screening Methoden in Deutschland sterben jährlich ungefähr 18.000 Frauen am Mammakarzinom ². Das Mammakarzinom lässt sich in verschiedene Untergruppen unterteilen. Eine wichtige Unterteilung ist die Unterteilung, ob der Tumor auf seiner Oberfläche einen Hormonrezeptor und oder den humanen epidermalen Wachstumsfaktor (HER2) exprimiert. In den USA allein macht ein Hormonrezeptor-positiver (HR-positiv) und HER2-negativer Brustkrebsbefund 70% aller Brustkrebsfälle aus³. Als Standardtherapie bei HR-positivem, lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Mammakarzinom gelten die klassischen endokrinen Therapeutika wie Tamoxifen oder Aromatasehemmer. Nichtsdestotrotz zeigen – ungefähr 40% der Frauen mit Öströgenrezeptor-positivem (ER-positivem) Mammakarzinom ⁴ - ein schlechtes Ansprechen und im Verlauf Resistenzen gegenüber endokriner Therapie und erschweren somit die Behandlung sowie die Langzeit Prognose HR-positiver Mammakarzinom-Patienten ^{5 6}. Mit der Einführung von Checkpoint-Inhibitoren zeigte sich ein Durchbruch in der Therapie verschiedener Tumorentitäten. Daten der KEYNOTE-522-Studie zeigten, dass beim frühen tripple- negativem Mammakarzinom mit hohem Risiko das ereignisfreie Überleben durch eine neoadjuvante Kombinationstherapie mit dem Checkpoint-Inhibitor Pembrolizumab im Vergleich zur Placebo Gruppe signifikant erhöht werden konnte. ⁷ Anders als beim Tripple-negativen Mammakarzinom zeigt die Immuncheckpoint Blockade keinen wesentlichen Erfolg in der Therapie des HR- positiven Mammakarzinoms ⁸. 2020 demonstrierten Tolaney et al. in einer randomisierten klinischen Studie, dass die Kombination von Pembrolizumab mit Eribulin keinen signifikanten Unterschied zur alleinigen Gabe von Eribulin in Bezug auf progressionsfreie Überleben (PFS) oder das Gesamtüberleben (OS) bei Patienten mit HR-positivem Mammakarzinom ergab.⁸ Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass das HR-positive Mammakarzinom als nur schwach immunogen gilt ⁹. Dies liegt vermutlich daran, dass es zu einer chronischen Inflammation im Tumormikroenvironment kommt, welche die Anti-Tumor-Immunität des Tumors fördert. An diesem Prozess sind immunsuppressive T-Zell-Subpopulationen (wie regulatorische T-Zellen,

myeloiden Suppressorzellen (MDSCs)) und weitere Zytokine, wie IL-6, TGF-beta und CCL22 beteiligt.^{9 10}

1.2 Die Rolle der Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6 im Zellzyklus

Im Gegensatz zur Immuncheckpoint-Inhibition konnten die Behandlungsmöglichkeiten für das Hormonrezeptor-positive Mammakarzinom in den letzten Jahren durch die Zulassung von CDK4/6-Inhibitoren erweitert werden. Demnach sind CDK4/6-Inhibitoren (Palbociclib, Ribociclib, Abemaciclib und Trilaciclib) in der Behandlung des lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Hormonrezeptor-positiven, HER2-negativen Mammakarzinoms in Kombination mit einer endokrinen Therapie mittlerweile gut etabliert. Es hat sich herausgestellt, dass Ribociclib (MONALEESA-2 und 3 Studie)¹¹, Abemaciclib (MONARCH-2 Studie)¹² und Palbociclib (PALOMA-2 Studie)¹³ in Kombination mit einem Aromatase-Hemmer das PFS und das OS signifikant verlängern.

Die Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6 (CDK 4/6) sind wichtige Regulatoren und Treiber des menschlichen Zellzyklus¹⁴. Cyclin D1 ist ein transkriptionelles Zielmolekül des Östrogenrezeptors und führt nach Bindung an CDK4/6 zur Phosphorylierung des Retinoblastom (Rb) -Tumorsuppressor-Proteins (inaktive Form). Dies führt zur Freisetzung von Transkriptionsfaktoren, die für den Übergang von der G1- in die S-Phase der Zellzyklus-Progression wichtig sind (siehe Abbildung Nr. 1). Dysregulationen des Cyclin-D-abhängigen-Kinase 4/6-Retinoblastom-Signalweges spielen eine wichtige Rolle bezüglich der Entstehung verschiedener Tumorarten sowie in der Tumorbilogie des Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinoms¹⁵. CDK4-/6- Inhibitoren wie Palbociclib, Ribociclib, und Abemaciclib führen durch die Hemmung der Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6 dazu, dass das Rb-Protein nicht phosphoryliert wird und damit aktiv bleibt. Somit verharrt die Tumorzelle im G1-Zellzyklus Stadium¹⁶. Mechanistisch sind die Wirkungen von CDK4/6-Inhibitoren auf Tumorzellen durch eine reduzierte Aktivität der Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie erklärt¹⁷. Zusammenfassend können sowohl CDK4/6-Inhibitoren als auch endokrine Therapien in die Östrogen-getriggerte Signalkaskade eingreifen. Beide wirken hemmend auf die Proliferation der Tumorzellen. Dadurch, dass die Wirkung der CDK4/6-Inhibitoren der Wirkung der endokrinen Therapie in der Signalkaskade nachgeschaltet ist, können die Zellzyklushemmer immer noch wirken, selbst wenn Resistenzen gegen endokrine Therapien vorhanden sind.¹⁸ So konnten Haricharan S. et al. (2017) zeigen, dass beim HR+ und HER2- Mammakarzinom unter anderem ein funktionsfähiges

Zusammenspiel des MutL- Mismatch-Reparaturweges erforderlich ist, um auf eine endokrine Therapie anzusprechen. Dafür seien Faktoren wie der MutL-Komplex zusammen mit ATM, Chk2 und CDK4/6 von großer Bedeutung ¹⁸. Wenn diese Faktoren beispielsweise im Rahmen einer Neumutation verloren gehen, ist die Rückkopplungskontrolle von CDK4/6 ohne Erfolg. Folglich wird der Zellzyklus trotz DNA-Mismatch fortgesetzt. Diese Patienten seien dann resistent gegenüber endokrinen Therapien, jedoch empfindlich gegenüber CDK4/6-Inhibitoren.

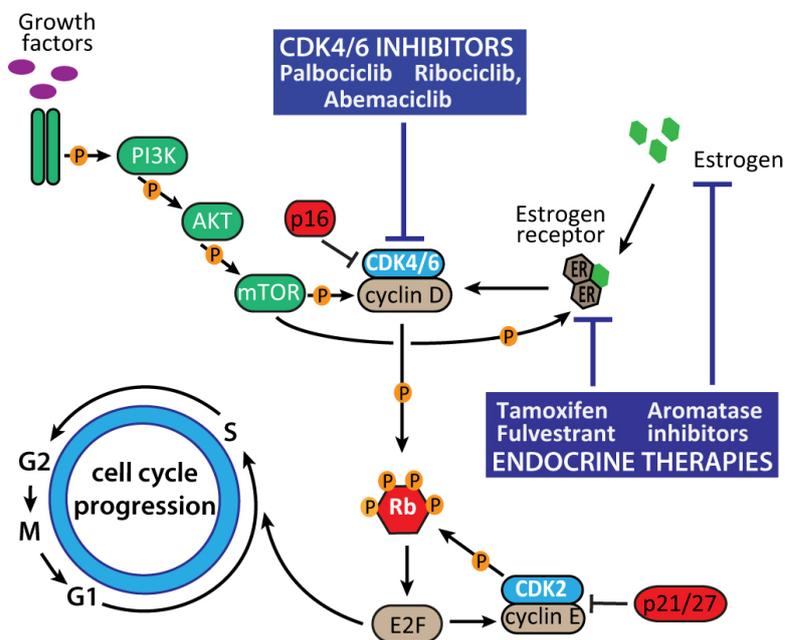


Abbildung 1: Regulation des Zellzyklus beim Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinom. Phosphoinositid-3-Kinase (PIK3), Proteinkinase B (AKT), mammalian Target of Rapamycin (mTOR), CDK-Inhibitor 2A (p16), Retinoblastom-Protein (Rb), CDK-Inhibitor 1 (p21), Cyclin-abhängige-Kinase-Inhibitor 1B (p27), Transkriptionsfaktor E2F, Phasen des Zellzyklus (S, G1, M, G2). Originalabbildung aus Portman et al, Endocrine-related Cancer 2019¹⁹

1.3 Die zelluläre Immunantwort und Ihre Rolle bei Tumoren

Wie am Beispiel des Mammakarzinoms zu sehen, spielen verschiedene T-Zell-Subpopulationen eine große Rolle bezüglich der zellulären Immunantwort gegen Tumore. Ob die Antitumorimmunität gefördert wird oder nicht, hängt von dem Zusammenspiel verschiedener Immunzellen, Tumorzellen und membrangebundener Moleküle oder sezernierter Zytokine / Chemokine im Tumormikroenvironment (TME) ab. Dabei konnten sowohl

CD4+ T-Helfer-Zellen als auch CD8+ positive zytotoxische T-Zellen im TME verschiedener Tumore nachgewiesen werden²⁰. Durch weitere Expressionsmarker können die CD4+ oder CD8+ T-Zellen weiter unterteilt werden in naive (antigenunerfahrene Zellen), Effektor-Zellen, zentrale Gedächtniszellen und terminal differenzierte Zellen (TEMRA), (siehe Abbildung Nr. 3)²¹. Eine weitere Population, die unterschieden werden kann, sind die regulatorischen T-Zellen. Vor allem Marker wie Helios und FOXP3 können auf regulatorische T Zellen hindeuten²². Die Infiltration immunsuppressiver, regulatorischer T-Zellen in die Tumormikroumgebung wird bei verschiedenen Tumorentitäten mit einem schlechten klinischen Outcome in Verbindung gebracht.²³ Die myeloiden Suppressorzellen (MDSC) sind unreife myeloische Zellen, die in der Lage sind, die T-Zell Immunantwort zu unterdrücken. Auch die Infiltration der MDSCs in die Tumormikroumgebung ist mit einer schlechten Prognose assoziiert.²³

1.4 T-Zell-Rezeptor und dessen Rolle bei der Antitumorimmunität

Neben den verschiedenen T-Zell Subpopulationen ist der T-Zell-Rezeptor (TCR), der sich auf der T-Zell Oberfläche befindet, entscheidend in Bezug auf die Antitumorimmunität. Die Mehrheit der TCRs besteht aus den zwei Ketten alpha und beta. Die beta Kette wird zusammengesetzt aus den Segmenten V, D und J (VDJ). Durch die somatische Rekombination dieser drei Segmente wird unter anderem die enorme Vielfalt des T-Zell-Repertoires ermöglicht, denn die komplementaritätsbestimmende Regionen des TCRs (CDR1-3) werden durch die unterschiedliche Zusammenstellung der VDJ-Segmente kodiert. Die größte Variabilität besitzt die CDR3 Region (siehe Abbildung Nr. 2).²⁴

Um unterscheiden zu können, ob eine Antitumor-Immunantwort behandlungsinduziert ist oder nicht, kann das Profiling des TCRs nützlich sein. Man unterscheidet die TCR-Klonalität, die durch die Anzahl und Häufigkeit der untersuchten TCRs bestimmt wird, von der TCR-Diversität, die beschreibt, wie viele unterschiedliche TCRs vorliegen. Je mehr unterschiedliche TCRs detektiert werden können (TCR-Diversität), desto geringer ist die Anzahl der klonalen TCRs. Mit Hilfe der Sequenzierung des TCR-Repertoires zu Beginn und nach einem definiertem Zeitpunkt können Aussagen darüber gemacht werden, ob behandlungsinduzierte klonale Expansionen von TCRs tumorspezifisch sind oder nicht

²⁵.

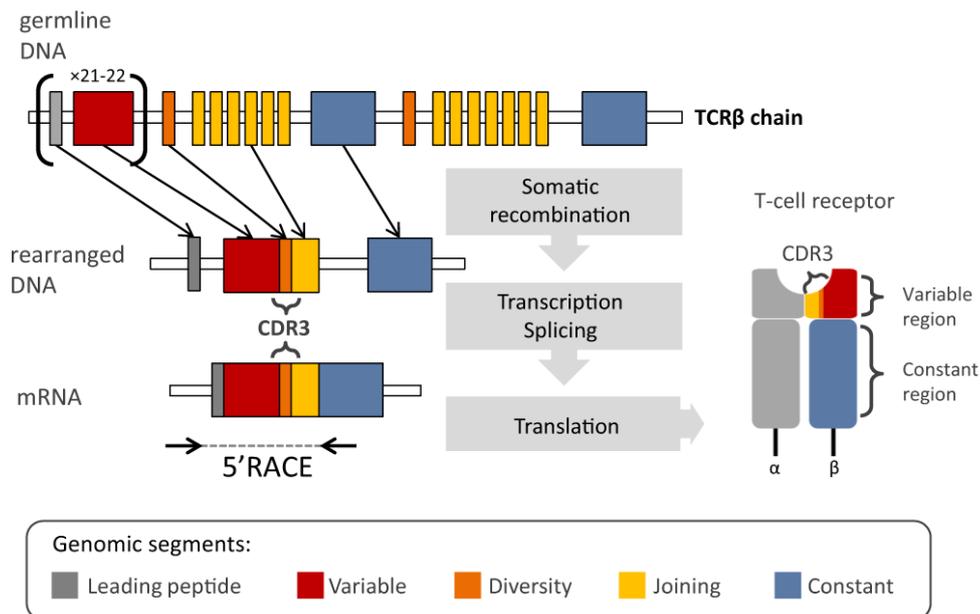


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Sequenzierung der TCR β -Kette

Originalabbildung aus Migalska et al, Scientific Reports 2018 ²⁶

1.5 Immunmodulatorische Wirkung der CDK4/6- Inhibitoren

Neben der direkten Wirkung auf den Zellzyklus gibt es inzwischen aus Mausmodellen und *in vitro* Versuchen Hinweise darauf, dass CDK4/6-Inhibitoren eine günstige immunmodulatorische Wirkung sowohl auf Tumorzellen, als auch auf Immunzellen im Tumormikroenvironment haben ²⁷. Mehrere Mechanismen sind hierzu beschrieben worden.

Goel et. al konnten in einer 2017 erschienen experimentellen Arbeit zeigen, dass CDK4/6-Inhibitoren die Antitumorimmunität fördern. Es wird vermutet, dass die intrazelluläre Konzentration von doppelsträngiger RNA in den Tumorzellen erhöht wird ²⁷. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die CDK4/6-Hemmung die Expression humaner endogener retroviraler Elemente (HERVs) erhöht ²⁷. Schlussfolgernd führen diese Effekte wiederum zu einer verbesserten Antigenrepräsentation der Tumorzelle. Zudem wird neben der oben beschriebenen CDK4/6- vermittelten Tumor-Seneszenz mit Freisetzung-T-Zell-anziehender Chemokine, eine differenzierte Wirkung auf verschiedene T-Zell-Subpopulationen und immunsuppressive myeloide Zellen im Tumormikroenvironment sowie eine Steigerung der Immunogenität der Tumorzellen beschrieben. ²⁷

In einem Tumorsphäroid-Modell mit autologen tumorinfiltrierenden Lymphozyten konnte gezeigt werden, dass durch die Gabe von CDK4/6-Inhibitoren die IL-2 Produktion- einem Surrogatmarker für T-Zellaktivierung- gesteigert werden kann ¹⁷. Weiterhin kam es zu einer insgesamt gesteigerten Sekretion von Th1-Zytokinen ¹⁷.

Palbociclib und Trilaciclib führten im Mausmodell zu einer vermehrten CD4+ und CD8+ T-Zellinfiltration. Interessanterweise kam es neben dieser prozentualen Steigerung an Effektor-Zellen gleichzeitig zu einer Verringerung immunsuppressiver myeloider Zellen ¹⁷. Diese Effekte sind u.a. auf eine Reaktivierung der NFAT-Transkriptionsfaktoren (Nuclear Factor of Activated T cell), zurückzuführen, die eine entscheidende Rolle in der Regulation der T-Zell-Aktivität spielen. Außerdem wurde im Mausmodell eine Proliferationsabnahme der CD4+FOXP3+ regulatorischen T-Zellen (Tregs) beobachtet, interessanterweise nicht nur im Tumormikroenvironment, sondern auch im peripheren Blut. Die Proliferation von CD8+ T-Zellen war indes nicht betroffen, während T-Zell-Erschöpfungs-Marker wie PD-1, Tim-3, CTLA-4 und LAG3 in CD8+ T-Zellen gering waren ¹⁷.

Dieser unterschiedliche Effekt auf die Proliferation verschiedener T-Zell-Subpopulationen ist möglicherweise auf die höhere CDK6-Expression in Tregs im Vergleich zu anderen T-Zell-Populationen zurückzuführen ¹⁷.

1.6 Einsatz immunmodulatorisch wirksamer Substanzen in der Praxis

Mittlerweile gibt es mehrere Wirkstoffe, die zu der Klasse der zielgerichteten Therapie gehören und eine immunmodulatorische Wirkung aufweisen. Am Beispiel des VEGF-Inhibitors Axitinib sind immunmodulatorische Wirkungen wie eine gesteigerte Th1-vermittelte Antwort oder eine vermehrte T-Zellinfiltration in das Tumormikroenvironment beschrieben worden ²⁸. In der Klinik wurden diese günstigen immunmodulatorischen Eigenschaften im Rahmen der Erstlinienbehandlung bei fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom eingesetzt. In der KEYNOTE 426 -Studie führte die Kombinationstherapie von Axitinib und dem Checkpoint-Inhibitor Pembrolizumab bei fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom zu einem signifikanten Anstieg des OS und des PFS ²⁹.

Es ist folglich zu vermuten, dass auch die immunmodulatorisch günstigen Eigenschaften von CDK4/6-Inhibitoren sie zu einem geeigneten Kombinationspartner für immuntherapeutische Ansätze wie z.B. eine Checkpointinhibition machen. In der Tat konnte *in vitro* und im Mausmodell gezeigt werden, dass die CDK4/6-Inhibition das Ansprechen auf die

PD-1-Blockade verstärkt, da gezeigt wurde, dass Abemaciclib mit einer Anti-PD-L1-basierten Immuntherapie synergistisch wirke ³⁰.

Für die weitere Entwicklung immuntherapeutischer Kombinationstherapien ist es unbedingt erforderlich, die Wirkungen der CDK4/6-Hemmung auf Immunzellpopulationen und deren Funktion im humanen System *in vivo* zu untersuchen. Im Gegensatz zu den unter Kurzzeitexposition mit CDK4/6-Inhibitoren beobachteten Effekten, kann eine längerfristige Exposition der Immunzellen aufgrund der auch in den klinischen Studien beobachteten Proliferationshemmung der Leukozyten, auch eine immunsuppressive Wirkung haben ³¹. Gerade deshalb ist es wichtig, den Effekt der CDK4/6-Inhibition auf einzelne Immunzellsubpopulationen, analog zur aktuell praktizierten therapeutischen Anwendung zu untersuchen, um gegebenenfalls für die Entwicklung von Kombinationstherapien das Verabreichungsschema so anzupassen, dass die günstigen immunmodulatorischen Wirkungen überwiegen. Ferner wird die Entwicklung von Resistenzen im Verlauf der Therapie gegenüber CDK4/6-Inhibitoren beobachtet. Einige Resistenzmechanismen sind beschrieben worden, wie beispielsweise die erhöhte Aktivität des Targets CDK6, die Hyperaktivierung nachgeschalteter Kinasen oder die Aktivierung von alternativen Signalwegen, welche ebenfalls ein Zellwachstum zu Folge haben ^{32 33}.

1.7 Spezifische Fragestellung

Im Fokus dieser experimentellen Doktorarbeit steht die Untersuchung der Interaktionen des CDK4/6-Inhibitors Ribociclib mit dem Immunsystem. Zwei Fragestellungen sollen dabei beantwortet werden. Zum einen wollen wir herausfinden, ob sich der bisher *in vitro* und im Mausmodell gezeigte immunmodulatorische Einfluss von CDK4/6-Inhibitoren auch *in vivo* im humanen System im peripheren Blut nachweisen lässt. Als zweites untersuchen wir, ob prognostische und/oder prädikative Immunbiomarker bei Patienten, die mit Ribociclib behandelt werden, identifiziert werden können.

Dazu werden Immunphänotypen basierend auf der durchflusszytometrischen Analyse, den mRNA- Expressionsprofilen und der Sequenzierung der TCR-Beta-Ketten (TCR-beta-Repertoire) definiert und mit klinisch-pathologischen Parametern, Therapieansprechen und Überleben korreliert.

2 Methodik

2.1 Patientenkollektiv und Blutproben

Es wurden 40 Patientinnen, die in der RIBECCA-Studie -eine Phase IIIb, multizentrische open-label Studie für Frauen mit Östrogenrezeptor-positiven, lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Brustkrebs, behandelt mit Ribociclib (LEE011) in Kombination mit Letrozol- in die wissenschaftliche Arbeit eingeschlossen (NCT03096847). Hierfür wurde Blut vor Therapiebeginn sowie nach Woche 12 der Ribociclib-Therapie gewonnen und PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert und kryokonserviert (zentrales Labor des Universitätsklinikums Erlangen, Prof. Dr. Andreas Mackensen). Im Rahmen der RIBECCA-Studie wurde Ribociclib in der Standarddosis von 600mg/dl über 21 Tage verabreicht, gefolgt von sieben Tagen ohne Behandlung. Gleichzeitig erhielten die Patientinnen Letrozol in der Dosis von 2,5mg per os. Die Dosisunterbrechung und -modifikation erfolgte gemäß den allgemeinen Empfehlungen für Ribociclib beziehungsweise dem Studienprotokoll³⁴. In die Studie eingeschlossen waren erwachsene Patienten ≥ 18 mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Brustkrebs (nicht ansprechbar für eine kurative Therapie). Das histologische Kriterium war das Vorliegen eines Östrogenrezeptor-positiven und/oder Progesteronrezeptor-positiven und gleichzeitig HER2-negativen Mammakarzinoms. Die Patientinnen mussten entweder eine messbare Krankheit aufweisen, das heißt mindestens eine messbare Läsion gemäß den Kriterien von RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors), oder Knochenläsionen (lytisch oder gemischt lytisch und sklerotisch) oder keine messbare Krankheit aufweisen. Nach den Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Kriterien sollten ≥ 2 Punkte für die Patientinnen zutreffen³⁴. Ausschlusskriterien waren eine bereits erfolgte Therapie mit CDK4/6-Inhibitoren oder mTOR-Inhibitoren, Überempfindlichkeit der Patientinnen gegenüber Inhaltsstoffen der Medikation, zum Zeitpunkt des Studienbeginns inflammatorisches Mammakarzinoms, mehr als eine bereits erfolgte Chemotherapie für ein fortgeschrittenes oder metastasiertes Mammakarzinom, mehr als eine bereits erfolgte endokrine Therapie für ein fortgeschrittenes oder metastasiertes Mammakarzinom, sowie das Vorliegen einer aktiven Herzerkrankung oder einer Vorgeschichte mit kardiologischen Erkrankungen. Weiterhin galt die Beteiligung des zentralen Nervensystems (Hirnmetastasen) als Ausschlusskriterium außer die Patientin hatte eine

abgeschlossene Therapie der Hirnmetastasen mindestens 28 Tage vor Studienbeginn, der ZNS-Tumor zum Zeitpunkt der Untersuchung stabil ist und gegen die Hirnmetastase keine Steroide und/oder antiepileptische Medikamente verabreicht wurden. Der primäre Endpunkt war die Clinical Benefit Rate (CBR) 24 Wochen nach Behandlung gemäß der Definition von RECIST 1.1 als Prozentsatz der Patientinnen mit komplettem Ansprechen (CR), teilweisem Ansprechen (PR) oder stabilem Krankheitsverlauf (SD), der 24 Wochen oder länger anhält, sowie der Patientinnen mit nicht komplettem Ansprechen, nicht fortschreitender Erkrankung (NCRNPD). Sekundäre Endpunkte waren vor allem das progressionsfreie Überleben (PFS) sowie das Gesamtüberleben (OS)³⁴.

2.2 Bestimmung des Immunphänotyps im peripheren Blut

Mittels Multicolor-Durchflusszytometrie wurde die Frequenz einzelner Immunzellsubpopulationen gemessen. Dabei erfolgte die Messung an dem CytoFLEX S Flow Cytometer von Beckman Coulter. Die Färbung der Zellen erfolgte mittels der zwei folgenden Panels: 1. DuraClone IM Tcell subsets Tube und 2. DuraClone IM Treg subsets Tube (siehe Tabelle 1 und 2). Diese Panels enthalten vorformulierte Antikörper, die speziell für die Untersuchungen von größeren Probenmengen z.B. im Rahmen von Studien genutzt werden können. Die PBMCs der Patientenproben wurden jeweils mit den oben genannten verschiedenen Antikörperset-Panels gefärbt. Die Patientenproben waren im flüssigen Stickstoff gelagert und anschließend als Probenpaar (Baseline und zugehörige Woche 12 von einer Patientin) zunächst mit warmen (37° C) T-Zellmedium aufgetaut und zentrifugiert (300g, 10 min. bei Raumtemperatur) sowie zweimal gewaschen. Nach Zählen der Zellzahl (mittels Zählkammer) wurden die Proben auf zwei verschiedene Falcon Tubes aufgeteilt (einmal für die Treg Färbung und einmal für die TCell Färbung, ca. 1×10^6 Zellen pro Panel). Anschließend erfolgte die Färbung der Zellen gemäß des zugehörigen KIT-Protokolls. Statt Vollblut wie im Protokoll beschrieben erfolgte die Färbung direkt mit den aufgetauten PBMCs. Um zusätzlich die Frequenz der „Myeloid Derived Suppressor Cells“ (MDSCs) messen zu können, wurde das Treg-Panel um zwei Antikörper: HLA-DR und CD11b ergänzt. Dazu wurden im ersten Schritt des Protokolls jeweils 2,5 µl HLA-DR und 2,5 µl CD11b zu der 50 µl Suspension von PBMCs und FACS-Buffer gegeben. Insgesamt erfolgte bei 33 Patientinnen die Färbung mit dem DuraClone IM Tcell subsets Tube. Auf Grund der niedrigen Zellzahl konnte die Färbung mit dem DuraClone IM Treg subsets Tube nur bei 22 Patientinnen durchgeführt werden. Die Lebend-Tot-Diskriminierung zur

Detektion und Ausschließung toter Zellen erfolgte mit dem Zombie Red Fixable Viability KIT (Biologend) nach Protokoll. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte am selben Tag, an dem die Zellen nach Protokoll gefärbt wurden. Die Kompensationen erfolgten ebenfalls durch das im DuraClone Kit vorhandene Kompensations-Kit nach Protokoll. Die Auswertung der T-Zell-Subpopulationen wurde mit der Software FlowJo V 7.6.5. durchgeführt. In Abbildung 3 ist die Gating-Strategy beschrieben.

Tabelle 1. DuraClone IM Treg subsets Tube

<u>Channels</u>	<u>Emissions</u>	<u>Fluorchromes used in Treg Panel</u>
PB450	450/45	Helios
KO525	525/40	CD45
Violet610	610/20	CD11b BioLegend
Violet660	660/10	-
ECD	610/20	-
PE	585/42	CD25
PC5.5	690/50	CD39
PC7	780/60	CD4
APC	660/10	FOXP3
APC-A700	712/25	-
APC-A750	780/60	CD3
FITC	525/40	CD45RA
PerCP	690/50	HLA-DR BioLegend

Dargestellt sind die im Treg-Panel verwendeten Fluorchrome mit dem zugehörigen Kanal und Emissionsspektrum.

Tabelle 2. DuraClone IM Tcell subsets Tube.

<u>Channels</u>	<u>Emissions</u>	<u>Fluorchromes used in Tcell Panel</u>
PB450	450/45	CD57
KO525	525/40	CD45
Violet610	610/20	-
Violet660	660/10	-
ECD	610/20	CD28
PE	585/42	CD197 (CCR7)
PC5.5	690/50	CD279 (PD1)
PC7	780/60	CD27
APC	660/10	CD4
APC-A700	712/25	CD8
APC-A750	780/60	CD3
FITC	525/40	CD45RA
PerCP	690/50	

Dargestellt sind die im Tcell-Panel verwendeten Fluorchrome mit dem zugehörigen Kanal und Emissionsspektrum.

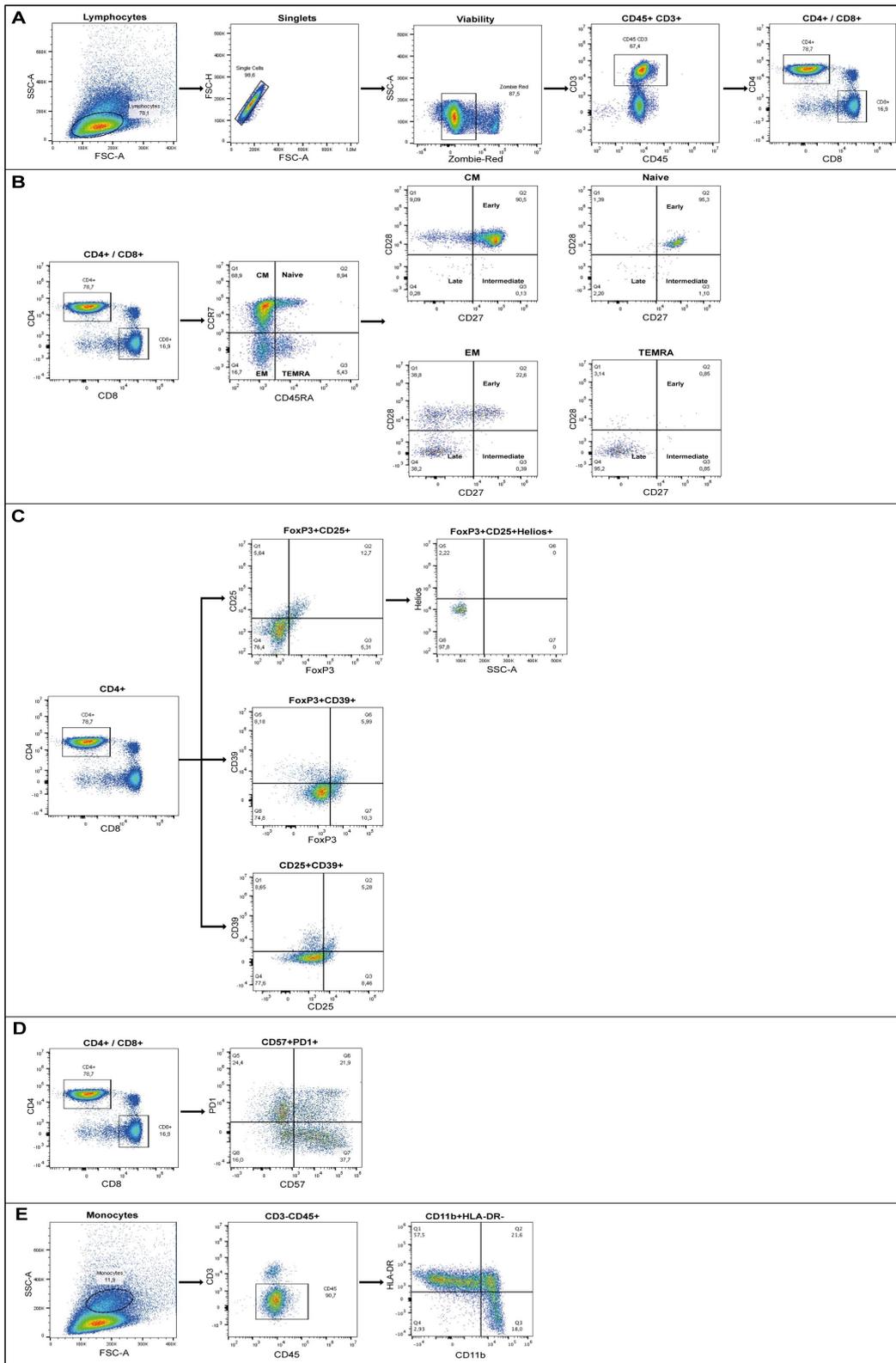


Abbildung 3: Gating Strategie: Repräsentative Dot Plots der Gating-Strategie der PBMCs von Patienten vor und nach 12 Wochen Behandlung. A Zunächst wurden Lymphozyten auf der Grundlage von Scatter-Profilen gruppiert, Doubletten wurden ausgeschlossen, und lebensfähige Zellen wurden mit Hilfe des Life/Dead Dyes (Zombie Red™) markiert, gefolgt von der Markierung von CD3+

Zellen zur Identifizierung von T-Zellen. In der CD3⁺ Population wurden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen unterschieden. **B** Anhand der Expression von CD45RA und CCR7 wurden in der CD4⁺ und CD8⁺ Population Subpopulationen von zentralen Gedächtniszellen (CM), naiven, terminal differenzierten Effektor-Gedächtniszellen (TEMRA) und Effektor-Gedächtniszellen (EM) identifiziert. Naive, CM-, TEMRA- und EM-T-Zellen wurden anhand ihrer Expression von CD27 und CD28 in verschiedene Entwicklungsstadien unterteilt: frühe (CD27+CD28⁺), intermediäre (CD27+CD28⁻) und späte Subpopulationen (CD27-CD28⁻). **C** Die regulatorischen T-Zellen innerhalb der CD4⁺ Population wurden anhand ihrer Expressionsprofile von CD25, FOXP3, Helios und CD39 bestimmt. **D** T-Zellen mit einem erschöpften terminalen Effektor-Phänotyp (CD57+PD1⁺) wurden in der CD4⁺ und der CD8⁺ Population identifiziert. **E** Zur Schätzung der Häufigkeit von myeloid-derived suppressor cells (MDSC) wurden zunächst Monozyten anhand ihrer Streuprofile gated, gefolgt von einer Unterscheidung der CD45⁺ CD3⁻ Subpopulation, in der MDSCs anhand ihrer Expression von CD11b und fehlender HLADR-Expression identifiziert wurden. Originalabbildung aus Peuker C.A., Yaghobramzi S. et al, European Journal of Cancer (EJC) 2022 ¹

2.3 Genexpressionsanalysen

Für die RNA-Isolation wurden die PBMCs wie oben beschrieben aufgetaut und gezählt. Pro Patientenprobe wurden insgesamt 1×10^6 Zellen verwendet.

Die RNA-Isolation wurde mit dem RNA Mini KIT von QIAGEN durchgeführt. Alle Schritte erfolgten gemäß Protokoll. Die Qualitäts- und Konzentrationsmessung der RNA erfolgten mittels NanoDrop2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und der 4200 TapeStation (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) ¹. Nach Bestimmung der Konzentration wurden 50ng RNA in 1,5ml Eppendorf Gefäßen aliquotiert und anschließend bei -80°C bis zur Durchführung der Genexpressionsanalysen aufbewahrt. Das mRNA-basierte Genexpressionsprofil von mehr als 700 Genen, die an der Immunantwort beteiligt sind, wird mittels Nanostring-nCounter-Technologie (NanoString Technologies, Seattle, WA, USA) untersucht. Hierfür wird das nCounter CAR-T Characterization Panel verwendet. Die Nanostring-nCounter-Technologie verwendet eine digitale, farbcodierte Barcode-Methode, die auf der direkten Multiplex-Messung der Genexpression basiert. Jeder farbcodierte Barcode ist an eine einzelne zielspezifische Sonde gebunden, so dass direkt eine Quantifizierung ohne Amplifikation des Targets möglich ist. Es können mRNA-Transkripte von 780 Genen gemessen werden. Dies umfasst sowohl Gene, die mit den Signalwegen der T-Zell-Aktivierung und Chemokin-Signalwegen assoziiert sind, als auch Gene, die an der Migration und Toxizität von T-Zellen sowie ihrer Erschöpfung und ihrem Metabolismus beteiligt sind. Die Analyse der differentiellen Genexpression wurde mit dem R/Bioconductor-Softwarepaket limma³⁵ nach Hintergrundkorrektur und Normalisierung der Daten

durchgeführt. Die P-Werte wurden zur Korrektur für Mehrfachvergleiche unter Verwendung der Benjamini-Hochberg (BH) Korrektur angepasst. Die Analyse der Anreicherung von Gensätzen wurde mit dem R-Paket fgsea durchgeführt³⁶. Zusätzlich wurden die Ergebnisse auch mit der Software NSolver (Version 4.0) analysiert.

2.4 T-Zell-Rezeptor-Diversität

Bei einer kleineren Anzahl an Patientinnen (n=20) wurde zudem eine Sequenzierung der TCR-Beta-Ketten (TCRVbeta-Repertoire) durchgeführt, um eine detaillierte Analyse des TCR-Repertoires und seiner Diversität zu gewinnen.

Die einzelnen Klonotypen des TCRs wurden definiert als TCR β /CDR3- Klonotypen. Um diese ermitteln zu können, wurde die TCR-DNA-Sequenz, der CDR3 Region ermittelt. Um die einzelnen TCR β /CDR3 Klone zu detektieren, wurde der cut-off Wert für den prozentualen Anteil an Reads bei 0,01% festgelegt. Die Analysen wurden ebenfalls zum Zeitpunkt Woche 0 und Woche 12 vergleichend untersucht. Das TCR-Repertoire wurde wie oben beschrieben mittels Next-Generation Sequencing (NGS) analysiert³⁷. Zu diesem Zweck wurde die cDNA aus der isolierten RNA der PBMCs der Patienten extrahiert. Die Extraktion erfolgte mittels dem GoScript Reverse Transkriptase System (Promega Madison, WI, USA). Im Rahmen einer zweistufigen PCR-Amplifikation mit speziellen Primern, wurden die TCR β -spezifische Region aus der genomischen DNA amplifiziert und im Anschluss entschlüsselt.³⁷

2.5 Statistik

Die statistische Analyse erfolgte mit der IBM SPSS Statistik Software Version 25 (IBM, Armonk, NY, USA). Die Abbildungen wurden erstellt durch die Software GraphPad Prism Version 9.1.2 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Als statistisch signifikant wurde ein zweiseitiger p-Wert bei <0.05 definiert.

3. Ergebnisse

3.1 Veränderungen der Immunzellsubpopulation während der Behandlung

Im Folgenden haben wir uns die einzelnen Immunphänotypen im peripheren Blut der Patientinnen vor und nach 12 Wochen Behandlung mit Ribociclib angeschaut und vergleichend analysiert.

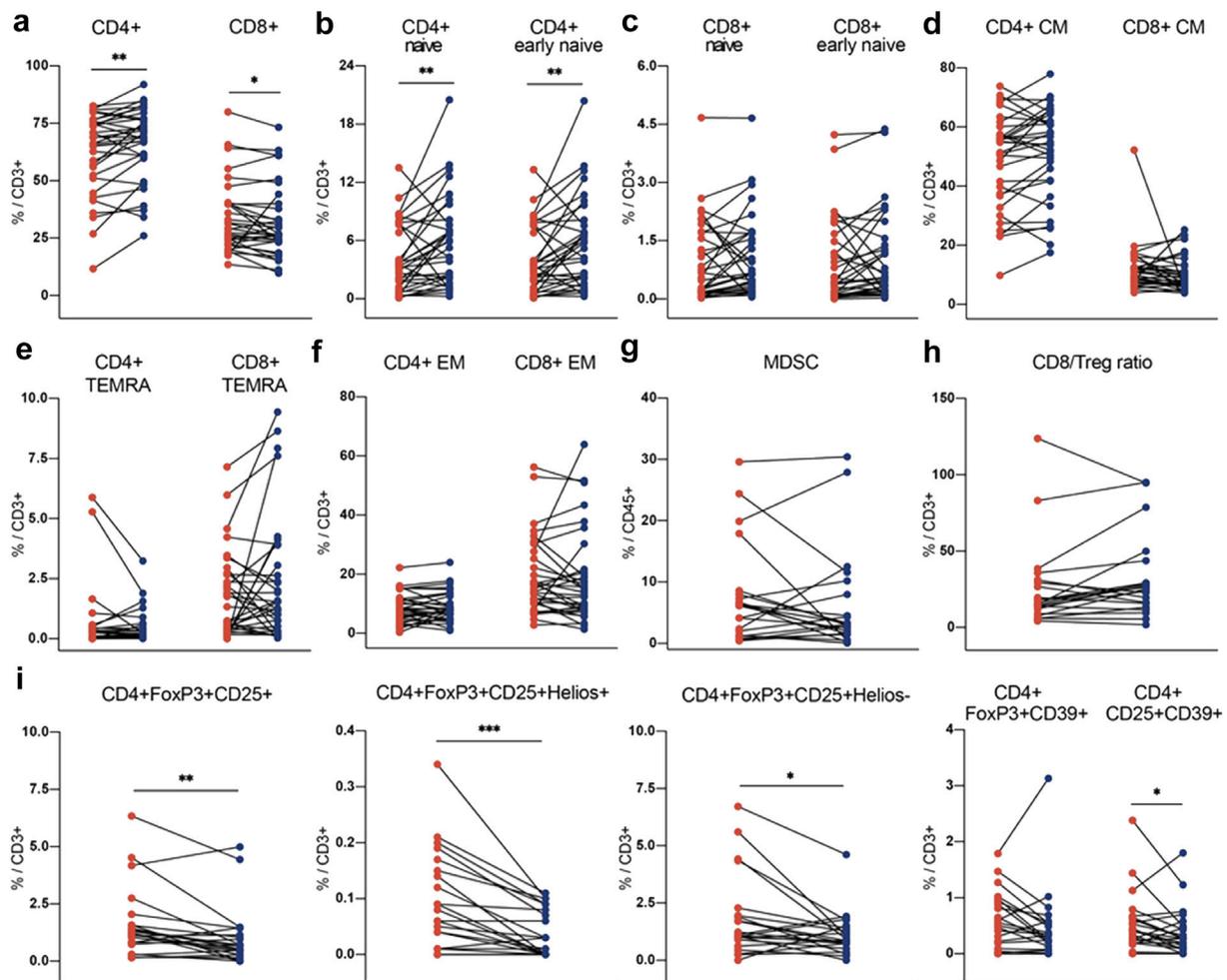


Abbildung 4: Veränderung verschiedener T-Zell Subpopulationen im peripheren Immunsystem während der Behandlung (a-i) Die Punkte stellen die individuellen medianen Häufigkeiten der Immunzellpopulationen der Patientinnen in den PBMCs vor Behandlung (W0; in Rot dargestellt) im Vergleich zu den medianen Häufigkeiten nach 12 Wochen Behandlung mit Ribociclib und Letrozol (W12; in Blau dargestellt). Zum Vergleich der Veränderungen der Zellhäufigkeiten zwischen W0 und W12 wurde der Wilcoxon Signed-Rank-Test angewendet. **{a}** Die medianen Häufigkeiten der CD4+ und CD8+ T-Zellen wurden zwischen den Zeitpunkten W0 und W12 verglichen. (CD4+ W0 66,2% {IQR, 51,8-75,3} versus W12

69.1% {IQR, 60.3-77.0}, $p=0,006$; CD8+ medianer Abfall von 6,8% {IQR, -16.9-3.6}, $p=0,044$); $n= 33$. **{b},{c},{d},{e},{f}** CD4+ und CD8+ Zellen wurden durch ihre Expression von CD45RA und CCR7 weiter differenziert in naive T-Zellen (CD45RA+CCR7+), zentrale Gedächtniszellen (CM;CD45RA-CCR7+), Terminal differenzierte Effektor-Gedächtniszellen (TEMRA; CD45RA+CCR7-) und Effektor-Gedächtniszellen (EM; CD45RA-CCR7-); $n=33$. **{b}** Nach 12 Wochen Behandlung kann es zu einem signifikanten Anstieg der medianen Häufigkeit naiver T-Zellen (medianer Anstieg= 42,7% {IQR, -6,7-157,2}, $p=0.006$). Die naiven T-Zellen wurden weiter differenziert anhand der Expressionsmarker CD28 und CD27. In der Subpopulation der frühen naiven T-Zellen (CD27+CD28+) kam es zu einem signifikanten Anstieg (W0 3.1% {IQR, 1.0-7.6} versus W12 5.2% {IQR, 1.8-7.8}, $p=0.0007$). **{g}** Bei den myeloiden Suppressorzellen (MDSC, CD45+CD3-CD11b+HLA-DR-) kam es zu einem Abfall unter Therapie, jedoch nicht signifikant=22. **{h}** Es kam zu einer Abnahme der Ratio zwischen den CD8+ Zellen zu den regulatorischen T-Zellen (CD4+FOXP3+CD25+), nicht signifikant.**{i}** In der Subpopulation der regulatorischen T-Zellen, welche durch die Expressionsmarker CD4+FOXP3+CD25+ differenziert sind, kam es zu einem signifikanten Abfall unter der Therapie mit Ribociclib (mediane Häufigkeit W0 1.2% {IQR 0.8-1.7} versus W12 0,7 {IQR 0,3-1.2}, $p=0,007$, $n=22$). In der zusätzlich Helios+ Subpopulation war die Verminderung am größten mit einem medianen Abfall von 48.2% {IQR, 83.1-0.0}, $p<0.001$). Auch in der regulatorischen T-Zell Population, die durch die Expressionsmarker CD4+CD25+CD39+ gekennzeichnet ist, kam es zu einem signifikanten Abfall ($p=0,044$); $n=22$). Originalabbildung aus Peuker C.A., Yaghobramzi S. et al, European Journal of Cancer (EJC) 2022 ¹

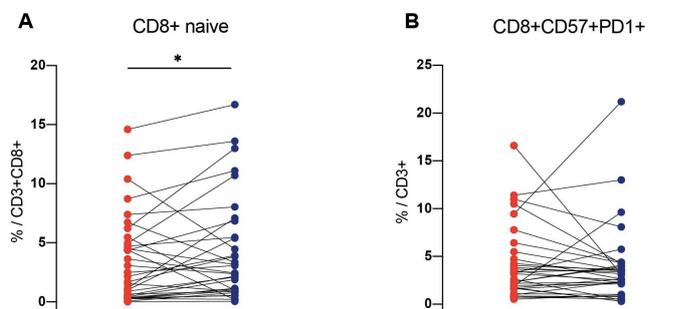


Abbildung 5: Veränderungen der medianen Häufigkeit in naiven CD8+ Zellen und in CD8+CD57+PD1+ T-Zellen während der Behandlung mit Ribociclib und Letrozol. Die Punkte stellen die individuellen medianen Häufigkeiten und die IQR der Immunzellpopulationen der Patientinnen in den PBMCs vor Behandlung (W0; in Rot dargestellt) im Vergleich zu den medianen Häufigkeiten nach 12 Wochen Behandlung mit Ribociclib und Letrozol (W12; in Blau dargestellt). **A:** Unter der Behandlung kommt es zu einer signifikanten Zunahme der naiven T-Zellen (CD45RA+ CCR7+) in der CD3+ CD8+ T-Zell Subpopulation (Wilcoxon signed-rank Test, $p=0,044$; $n=33$) **B:** In der CD8+CD57+PD1+ T-Zell Population wurden nach 12 Wochen Therapie keine signifikanten Veränderungen beobachtet (Wilcoxon signed-rank Test, $p=0.326$; $n=33$). Originalabbildung aus Peuker C.A., Yaghobramzi S. et al, European Journal of Cancer (EJC) 2022 ¹

Als wir die Häufigkeiten einzelner peripherer T-Zell-Subpopulationen vor und nach 12 Wochen Therapie mit Ribociclib und Letrozol paarweise analysierten, stellten wir fest, dass die CD4⁺ Population innerhalb der CD3⁺ T-Zell-Gruppe nach 12 Wochen Therapie signifikant anstieg ($p=0,006$). Bei einer weiteren Differenzierung der Population innerhalb der CD4⁺ Population konnten wir zeigen, dass es sich hauptsächlich um die CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺ Subpopulation handelt, die unter der Behandlung zunimmt. Die Expressionsmarker CD45RA⁺ und CCR7⁺ stehen für naive T-Zellen, die noch keine Antigenerfahrung haben.³⁸ Der mediane relative Anstieg der naiven T-Zellen nach 12 Wochen Behandlung beträgt 42,7% ($p=0,006$). Die naiven T-Zellen wurden weiter durch die Expressionsmarker CD28 und CD27 differenziert. Hier fanden wir heraus, dass der Anstieg primär bedingt ist durch die frühen naiven T Zellen (CD28⁺CD27⁺).

Im Gegensatz dazu kam es in der CD3⁺ CD8⁺ Population zu einem signifikanten Abfall der medianen Häufigkeit um 6.8% ($p=0,044$). Ein Anstieg der naiven T-Zellen wurde auch in der CD3⁺CD8⁺ Population beobachtet, aber angesichts der allgemeinen Abnahme der CD8⁺ Fraktion, war dieser Anstieg nur grenzwertig signifikant (siehe Abbildung Nr. 5).

Anhand der Expressionsmarker CD45RA und CCR7 wurden beide T-Zell Populationen (CD3⁺CD4⁺ und CD3⁺CD8⁺) weiter differenziert in zentrale Gedächtniszellen (CM; CD45RA⁻CCR7⁺), terminal differenzierte Effektor-Gedächtniszellen (TEMRA, CD45RA⁺CCR7⁻) und Effektor-Gedächtniszellen (EM, CD45RA⁻CCR7⁻). Hier wurden nach 12 Wochen Behandlung keine signifikanten Veränderungen festgestellt.

Die T-Zell Erschöpfungsmarker CD57 und PD1 innerhalb der CD8⁺T-Zellen als auch der CD4⁺ T-Zellen ergaben keine signifikanten Veränderungen unter der Behandlung. Betrachtet man die regulatorischen T-Zell Marker innerhalb der CD3⁺CD4⁺ Population, so zeigte sich für die regulatorische T-Zell Subpopulation (CD4⁺FOXP3⁺CD25⁺) ein signifikanter Abfall der medianen Häufigkeit ($p=0,007$). Auch in der weiteren Differenzierung fallen die regulatorischen T Zellen sowohl in der CD4⁺FOXP3⁺CD25⁺Helios⁺ als auch in der Helios⁻ Untergruppe signifikant ab ($p<0,001$). Der mediane Abfall in der Helios⁺ Untergruppe beträgt nach 12 Wochen Therapie 48,2%. Weiterhin konnten wir einen signifikanten Abfall in der CD4⁺FOXP3⁺CD39⁺ Population innerhalb der regulatorischen T-Zellen beobachten ($p=0,044$). Insgesamt zeigen die Daten der durchflusszytometrischen Untersuchungen peripherer Immunzellen eine Induktion naiver CD4⁺ Zellen, während die Populationen von Effektor und Gedächtnis-T-Zellen weitgehend unverändert bleibt.

Außerdem konnten wir mit unseren Analysen darlegen, dass es zu einem Rückgang regulatorischer T-Zellen nach 12 Woche Behandlung gekommen ist. Diese korreliert mit dem klinischen Ansprechen auf die Behandlung (siehe Abbildung Nr. 9 und 10).

3.2 Veränderungen der Genexpressionsmuster

Tabelle 3. Die 10 wichtigsten unterschiedlich exprimierten Gene

Gen	logFC	AveExpr	t	p-Wert	Adj. p-Wert	B	Erklärung
BCL2L1	1.75	7.17	5.52	4.90855E-07	0.00039	5.68	Kodiert für BCL-XL (BCL-2 -Proteinfamilie), einen Zelltod-Inhibitor
UBB	1.27	11.57	4.12	9.73956E-05	0.038666	1.16	Kodiert für Ubiquitin, einen Hauptakteur bei der posttranslationalen Modifikation verschiedener zellulärer Proteine (Ubiquitinierung)
TFDP1	0.85	6.30	3.72	0.000386174	0.102207	-0.01	Kodiert einen Transkriptionsfaktor, der die E2F-abhängige Transkription in der Zellzyklusphase fördert.
TRIM25	0.35	7.05	3.39	0.00112029	0.191273	-0.91	Kodiert für ein Mitglied der TRIM-Proteinfamilie, das an der angeborenen Immunantwort beteiligt ist
STAT1	1.05	8.60	3.37	0.00120449	0.191273	-0.97	Kodiert für ein Mitglied der STAT-Proteinfamilie, das an der Immunreaktion auf IFNs beteiligt ist, die zur Auslösung eines zellulären antiviralen Zustands führen, JAK-STAT-Signalweg
IRF9	0.43	8.16	3.17	0.002202851	0.270096	-1.47	Kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der die Signalübertragung durch Typ-I-IFNs vermittelt, JAK-STAT-Signalweg
MTCP1	-0.52	4.10	-3.13	0.002552728	0.270096	-1.59	Fördert AKT1 und AKT2 im PI3K-Akt-Signalweg
IL11	-0.63	2.74	-3.09	0.002806737	0.270096	-1.67	Kodiert das entzündungshemmende Zytokin IL11, das die MDSC-Differenzierung über STAT3 fördert
IL9	-0.60	3.36	-3.06	0.003129965	0.270096	-1.76	Kodiert für das pleiotrope Zytokin IL9, das von verschiedenen Arten von Immunzellen ausgeschüttet wird und als positiver oder negativer Immunregulator wirkt, je nach Zelltyp
MS4A2	-0.60	3.80	-3.03	0.003401711	0.270096	-1.83	Kodiert für die beta Einheit des IgE-Rezeptors, welche in der Mastzellantwort beteiligt ist

AveExpr: Mittelwert der Expression für dieses Gen in allen Proben. t: Verhältnis der log2-fachen Veränderung zu ihrem Standardfehler, der über die Gene hinweg modifiziert wurde (modifizierte t-Statistik); Adj. p-value p-Wert angepasst für Mehrfachtests zur Kontrolle der Falschentdeckungsrate; B: Geschätztes log-odds-Wahrscheinlichkeitsverhältnis, zu dem das Gen differenziell exprimiert ist. Modifiziert aus Peuker C.A., Yaghobramzi S. et al, European Journal of Cancer (EJC) 2022 ¹

Die mRNA-basierten Genexpressionsanalysen der peripheren Immunzellen unter der Behandlung mit Ribociclib und Letrozol zum Zeitpunkt 12 Wochen nach Therapie im Vergleich zu Beginn ohne Therapie zeigten eine signifikante Hochregulierung der Gene BCL2L1 und UBB (adjustierter p-Wert $<0,001$ und $p <0,05$). BCL2L1 kodiert für BCL-XL, welche zur BCL-2-Proteinfamilie gehört. Daten zeigen, dass BCL-XL als Apoptose-Inhibitor fungiert und so die Überlebensdauer verschiedener Zellen verlängert.³⁹ Dabei spielen BCL-2 und BCL-XL eine größere Rolle für das Überleben naiver T- und B-Zellen als für regulatorische T-Zellen.³⁹ UBB wird nach BCL2L1 am zweithöchsten unter der Behandlung hochreguliert und spielt eine entscheidende Rolle, wenn es um die Ubiquitinierung von Proteinen in Zellen geht, damit diese abgebaut beziehungsweise modifiziert werden können. Außerdem ist das UBB-System für die Regulation vieler Proteine, die in der TCR-Signalkaskade beteiligt sind, verantwortlich.⁴⁰

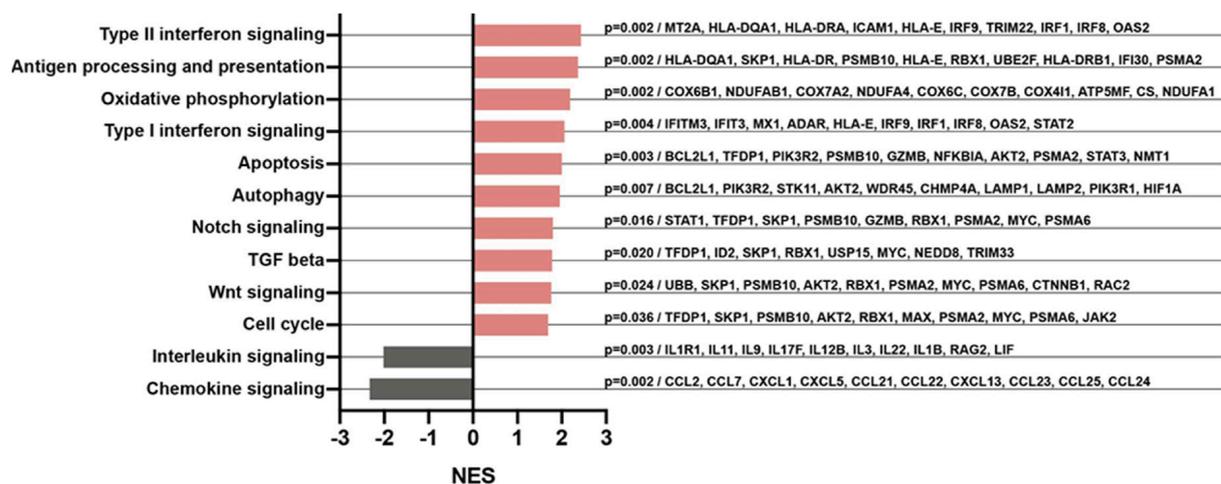


Abbildung 6: Gen Set Enrichment Analyse von differentiell exprimierten Gen-Signaturen.

Mit Hilfe des nCounter Panels wurden Veränderungen in der Anreicherung von Expressionsmustern vordefinierter Genmengen nach 12 Wochen Therapie mit Ribociclib und Letrozol untersucht. Der Grad der Anreicherung eines Gen-Sets wurde durch den normalisierten enrichment score (NES) wiedergegeben. Ein positiver Wert deutet auf eine Hochregulierung der Gen-Sets hin (rote Balken), während ein negativer Wert auf eine Runterregulierung hindeutet (graue Balken). Im Balkendiagramm sind die 12 signifikant hoch- oder runterregulierten Gen-Sets mit einem Bejamini-Hochberg adjustierten p-Wert von $<0,05$ zu sehen. Die 10 wichtigsten Gene in einem entsprechendem Gen-Set, die am meisten für das Anreicherungssignal verantwortlich sind (Leading Edge-Subset), sind rechts mit dem entsprechenden p-Wert angezeigt. Originalabbildung aus Peuker C.A., Yaghobramzi S. et al, European Journal of Cancer (EJC) 2022¹

In der Abbildung 6 kann man sehen, dass Gen-Sets, welche assoziiert sind mit Typ-I- und Typ-II-Interferon Signalwegen signifikant unter der Behandlung mit Ribociclib und Letrozol hochreguliert wurden. Auch Gene, die eine Rolle in der Antigen-Prozessierung und Präsentation spielen, wurden signifikant hochreguliert. Im Gegensatz dazu zeigt sich eine signifikante Runterregulierung von Gen-Sets, die assoziiert sind mit Interleukin-Signalwegen und Chemokin-Signalwegen. Im Gen-Set, dass verknüpft ist mit den Chemokin-Signalwegen, waren es vor allem die Chemokine CCL2, CCL7 und CCL22, die runterreguliert wurden. CCL2 spielt eine wichtige Rolle in Tumorzellen. Durch die Bindung an den CCR2-Rezeptor wird dieser aktiviert und die Proliferation der Tumorzellen wird gefördert. Außerdem führt die Expression von CCL2 zur Rekrutierung von MDSCs und Tregs in das Tumormikroenvironment.⁴¹ Daher ist eine gesteigerte Expression von CCL2 in soliden Tumoren insgesamt mit einer schlechten Prognose assoziiert.⁴² Im Interleukin-Signalweg werden Interleukine wie IL1R1 und IL11 runterreguliert. IL11 stellt ebenfalls eine wichtige Komponente in der Tumormikroumgebung dar und fördert die Tumorgenese.⁴³

3.3 Veränderungen der Diversität und Klonalität des T Zell-Rezeptors während der Behandlung

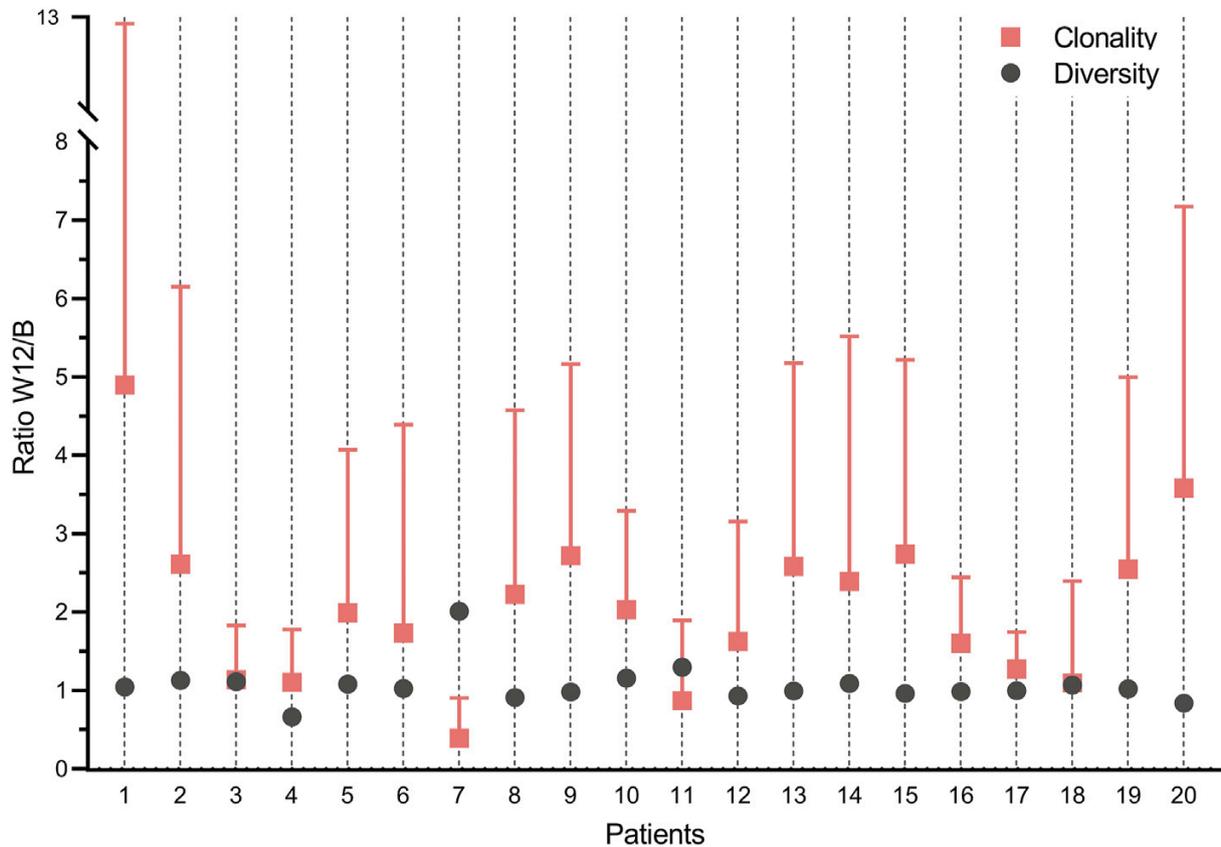


Abbildung 7: Veränderung der T-Zell Repertoire Diversität und Klonalität während der Behandlung. Die Veränderung bezüglich der Diversität des TCRbeta-Repertoires werden als Verhältnis der Shannon-Diversitätsindizes in W0 und W12 für jede Patientin in grau dargestellt. Ein Verhältnis >1 zeigt eine Zunahme der Diversität des TCRbeta-Repertoires während der Behandlung an, während eine Abnahme der Diversität durch ein Verhältnis von <1 ausgedrückt wird. Die Entwicklung der unterschiedlichen Klonotypen während der Behandlung wurde durch den Vergleich der Häufigkeit identischer CDR3-Nukleotidsequenzen als Verhältnis zwischen W0 und W12 der Behandlung bewertet. Die roten Quadrate stellen die mittleren Verhältnisse der 20 häufigsten Klonotypen zwischen W0 und W12 für jeden Patienten dar; die Standardabweichungen sind als obere Fehlerbalken dargestellt. Je höher der Wert, desto größer ist die Klonotyp-Expansion während der Behandlung und umgekehrt. Originalabbildung aus Peuker C.A., Yaghobramzi S. et al, European Journal of Cancer (EJC) 2022 ¹

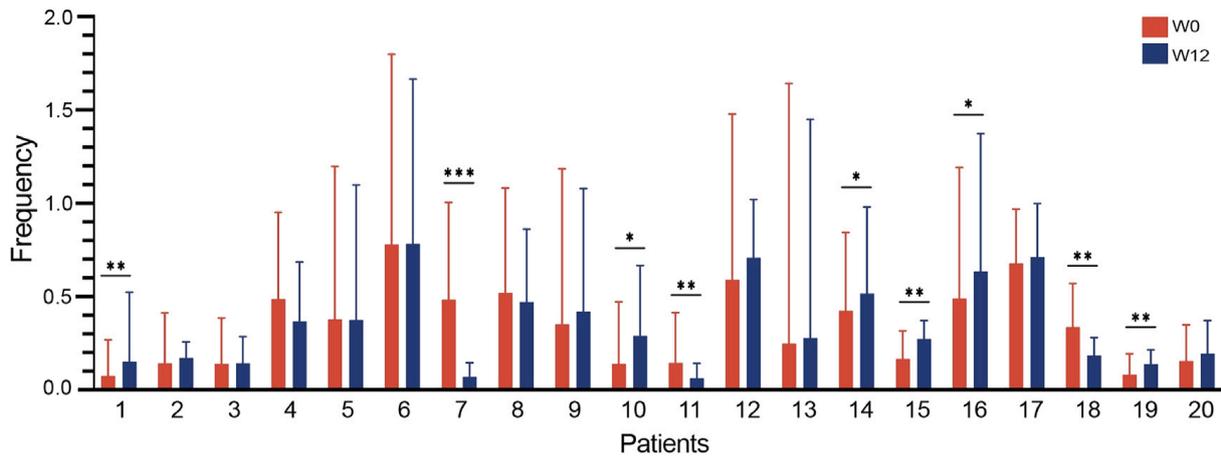


Abbildung 8: Vergleich der Häufigkeiten der 20 häufigsten TCR-Klone zwischen W0 und W12 der Behandlung. Boxplots zeigen die medianen Häufigkeiten der 20 häufigsten identischen Klone in W0 und W12 für jeden Patienten; die Whisker stellen den IQR dar. Die Häufigkeiten der Klontypen wurden mit dem Wilcoxon Signed-Rank-Test verglichen. Bei 6/20 Patienten wurde eine signifikante klonale Expansion festgestellt, während bei drei Patienten eine signifikante Abnahme der Klonalität zu beobachten war. Originalabbildung aus Peuker C.A., Yaghobramzi S. et al, European Journal of Cancer (EJC) 2022 ¹

Die durchschnittliche Anzahl individueller TCRbeta/CDR3-Klonotypen mit einer Häufigkeit von $\leq 0,01$ % betrug 1.941 ± 1.019 (Standardabweichung) in Woche 0 vor der Behandlung und 2.144 ± 739 in Woche 12 nach Behandlung mit Ribociclib und Letrozol. Dieser Anstieg ist jedoch nicht signifikant. In Abbildung 7 sieht man die Veränderung der T-Zell Repertoire Diversität. Diese blieb nach 12 Wochen Behandlung weitgehend unverändert. Die Häufigkeit der Klontypen wurde mit dem Wilcoxon Signed-Rank-Test verglichen. Hierbei wurde die mediane Häufigkeit der 20 häufigsten TCR-Klone zwischen Woche 0 und Woche 12 für jeden Patienten ermittelt (Abbildung Nr. 8). Bei 6 von 20 Patientinnen zeigte sich ein signifikanter Anstieg der medianen Häufigkeit unter Therapie, währenddessen kam es bei 3 Patientinnen zu einer signifikanten Abnahme.

3.4 Korrelation zwischen der Abnahme regulatorischer T-Zellen und dem klinischen Ansprechen

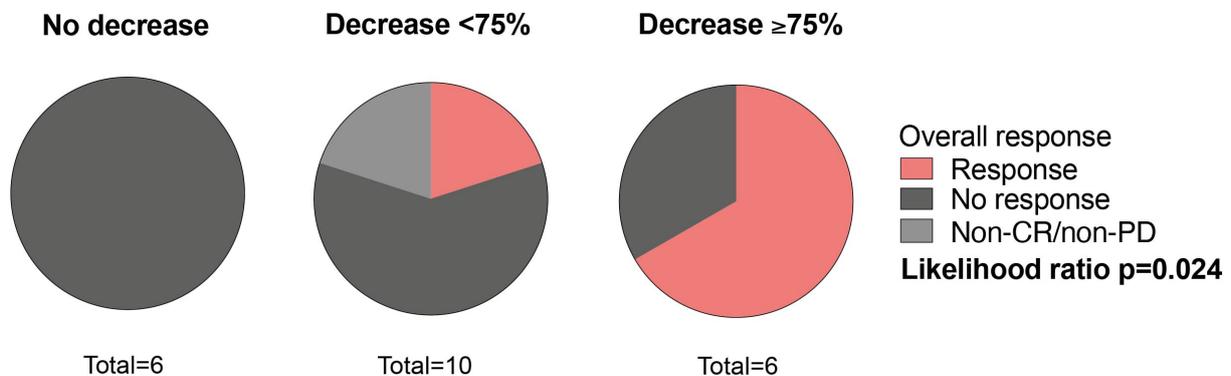


Abbildung 9: Korrelation zwischen der Abnahme regulatorischer T-Zellen (CD4+FOXP3+CD25+Helios+) und das Ansprechen auf die Behandlung mit Ribociclib in Kombination mit Letrozol (n=22). Eigene Abbildung von Originaldaten (kein Bestandteil der Publikation)

Das Ausmaß der Abnahme der CD4+FOXP3+CD25+Helios+ Treg-Zellpopulation während der Behandlung mit Ribociclib und Letrozol korrelierte signifikant mit dem Ansprechen auf die Behandlung; n=22. Kein Ansprechen auf die Behandlung wurde bei Patienten beobachtet, bei denen während der Behandlung eine fehlende Abnahme oder eine Zunahme der CD4+FOXP3+CD25+Helios+ -Treg-Zellpopulation auftrat. Das meiste Ansprechen wurde bei Patienten mit einem Rückgang von mindestens 75 % gegenüber dem Ausgangswert (W0) beobachtet (4/6 Patienten mit PR, 2/6 mit SD), verglichen mit Patienten mit einem Rückgang unter 75 % (2/10 Patienten mit Ansprechen (1 CR, 1 PR), 4/10 mit SD, 2/10 mit Non-CR/non-PD und 2/10 mit PD). Zwischen den Veränderungen anderer T-Zell Subpopulationen wie den naiven CD4+ T-Zellen oder CD8+ T-Zellen und dem klinischen Ansprechen konnten keinen weiteren Zusammenhängen festgestellt werden (Siehe Abbildung Nr. 10). Sowohl die Analysen der TCR- Diversität und -Klonalität als auch die Genexpressionsanalysen waren nicht assoziiert mit dem Ansprechen auf die Behandlung oder dem progressionsfreien Überleben.

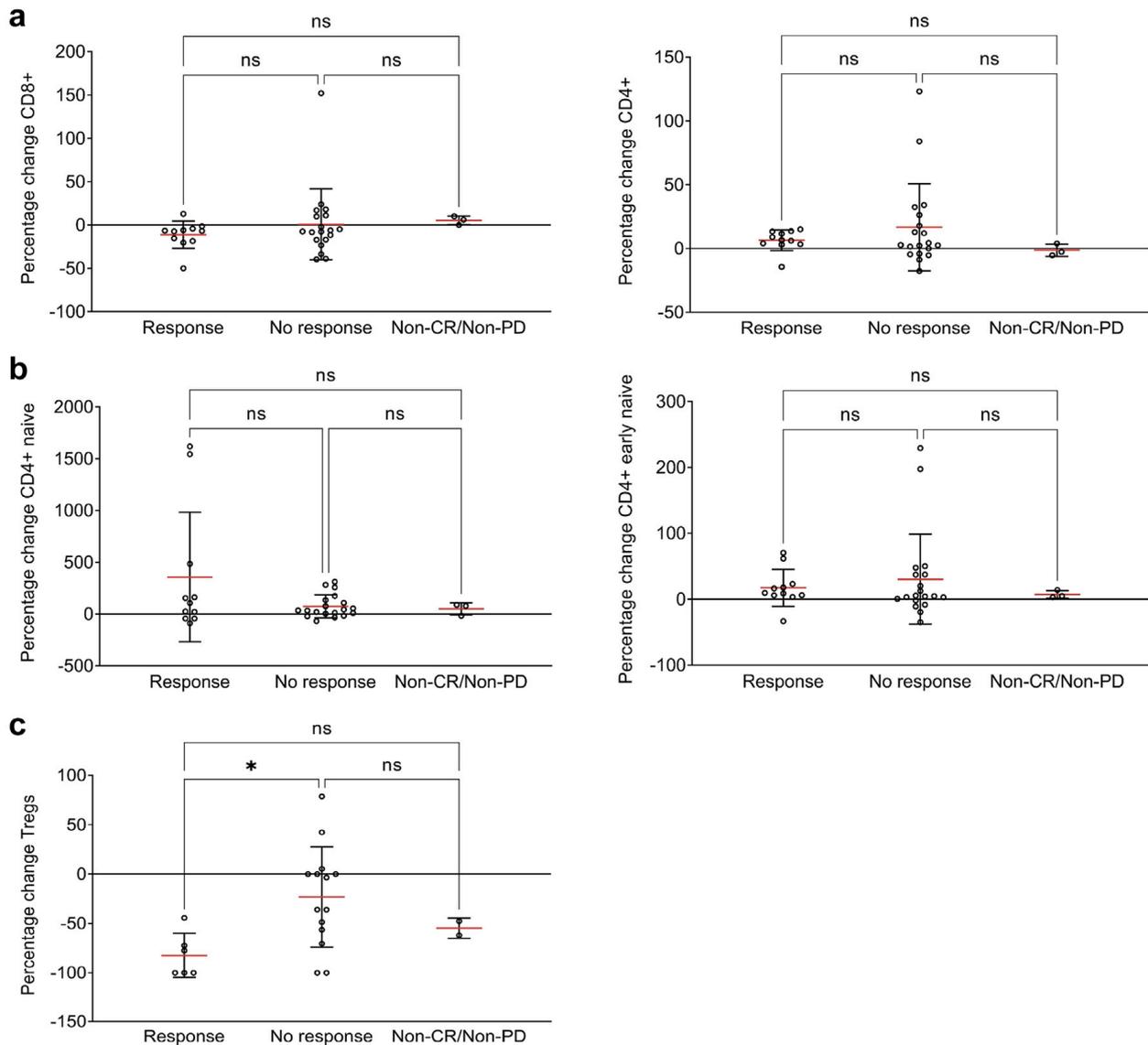


Abbildung 10: Korrelation zwischen den Veränderungen einzelner T-Zell Subpopulationen und dem klinischen Ansprechen.

Die Punktdiagramme zeigen die prozentuale Veränderung der jeweiligen Zellfrequenzen während der Behandlung mit Ribociclib und Letrozol. Gruppirt wurden diese nach dem Ansprechen auf die Behandlung. Diese wird unterteilt in 1) *Response*, definiert als: komplettes Ansprechen {CR} oder partielles Ansprechen, 2) *No Response*, definiert als kein Ansprechen (entweder progressive Erkrankung {PD} oder stabile Erkrankung) und 3) *Non-CR/Non-PD*, steht für die Gruppe der Patientinnen, die weder CR noch PD erreichten. Die roten Balken repräsentieren den Mittelwert mit der jeweils zugehörigen Standardabweichung. Für die Analyse wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. (a) Keine Korrelation zwischen dem Ansprechen und der Veränderungen der CD4+ oder CD8+ T-Zellen konnte detektiert werden. (b) Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Zunahme der naiven CD4+ T-Zellen und der früh naiven CD4+ T-Zellen beobachtet werden. (c) die Abnahme der Treg-Zellpopulation (CD4+FOXP3+CD25+Helios+) während Behandlung war signifikant mit dem Ansprechen auf die Behandlung verbunden (Kruskal-Wallis-Test $p = 0,032$). Originalabbildung aus Peuker C.A., Yaghobramzi S. et al, European Journal of Cancer (EJC) 2022 ¹

4. Diskussion

4.1 Kurze Zusammenfassung der Ergebnisse

In unserer Analyse der peripheren Immunzellen sehen wir einen Anstieg der Typ-I- und Typ-II-Interferon Signale, was auf eine günstige Immunantwort hindeutet, die sich auch in der Abnahme der immunsuppressiven Subpopulationen, wie z. B. der regulatorischen T-Zellen, widerspiegelt. Außerdem sehen wir eine Zunahme der naiven CD4+ T-Zell Populationen, jedoch keine Zunahme der Effektor-T-Zell Populationen und keine wesentlichen Veränderungen in Bezug auf die TCR-Diversität. Darüber hinaus konnten wir mit unseren Ergebnissen zeigen, dass das Ausmaß der Abnahme regulatorischer T-Zellen (in diesem Fall die CD4+FOXP3+CD25+Helios+ Subpopulation) während der Behandlung mit Ribociclib und Letrozol signifikant mit dem Ansprechen auf die Behandlung korrelierte. Dieser Zusammenhang führte jedoch nicht zu unterschiedlichen Behandlungsergebnissen. Zusammenfassend deuten die Daten darauf hin, dass der günstige immunmodulatorische Effekt keine de novo Immunantwort induziert, sondern viel mehr eine bereits vorhanden Immunantwort fördert ¹.

4.2 Interpretation der Ergebnisse

Entgegen der Tatsache, dass CDK4/6-Inhibitoren den Zellzyklus hemmen und somit eine Proliferationsabnahme herbeiführen, sieht man innerhalb der T-Zell Populationen eine differenzierte Wirkung der T-Zellen. Während regulatorische T-Zellen runterreguliert werden, kommt es zur Hochregulierung naiver T-Zellen. Diese Ergebnisse sind wahrscheinlich auf ein unterschiedliches Expressionsniveau von CDK4/6 in den einzelnen T-Zell Subpopulationen zurückzuführen ¹⁷. So weisen regulatorische T-Zellen eine höhere CDK6-Expression auf, welche vermutlich wiederum eine stärkere Empfindlichkeit gegenüber CDK4/6-Inhibitoren zu Folge hat.¹⁷ Die Behandlung mit CDK4/6-Inhibitoren führt jedoch nicht zu einer Induktion der Effektor-T-Zellen. Auch die Daten der Genexpressionsanalysen stützen die immunmodulatorisch günstige Wirkung durch die Behandlung mit Ribociclib. Die Apoptose-Inhibitoren BCL-2 und BCL-XL, die eine größere Rolle für das Überleben der naiven T- und B-Zellen spielen ³⁹, werden unter der Behandlung hochreguliert. Dies könnte auch eine Erklärung dafür sein, wieso eine differenzierte Inhibition der Zellen zu beobachten ist.

Ein weiterer Grund ist, dass vor allem Chemokine wie CCL2 runterreguliert werden. CCL2 führt unter anderem zur Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen und MDSCs in das Tumormikroenvironment.⁴¹ Bei beiden Populationen sehen wir eine Runterregulierung unter der Therapie mit Ribociclib auch wenn bei den MDCs nicht signifikant. Die T-Zell-Diversität bleibt weitgehend unverändert. Bei einem Teil der Patienten konnte eine signifikante klonale Expansion der TCR-Klone beobachtet werden. Die Antigenpezifität der erweiterten Klone bleibt unklar. Einige wurden als virusspezifische Klone identifiziert. Es ist nicht eindeutig, ob bereits vorhandene expandierende T-Zell-Klone tumorspezifisch sind¹. Das HR+-Mammakarzinom gilt im Allgemeinen als wenig immunogen⁹, die bisher begrenzten Daten zur Checkpoint-Inhibition bei HR+-Brustkrebs zeigen eine nur bescheidene Aktivität. Die immunmodulatorischen Eigenschaften von CDK4/6-Inhibitoren könnten sie jedoch zu einem geeigneten Kombinationspartner für immuntherapeutische Ansätze wie die Checkpoint-Inhibition machen. Deng und seine Kollegen konnten in einem *ex vivo* Tumor-Sphäroid Modell zeigen, dass die Zugabe von CDK4/6-Inhibitoren das Ansprechen auf die PD1-Blockade verstärkt.¹⁷ Auch im Mausmodell führte die Zugabe des CDK4/6-Inhibitors Abemaciclib, zur größten Reduktion der Tumormasse im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Wirkstoff.²⁷

4.3 Einbettung der Ergebnisse in den bisherigen Forschungsstand

Mit unseren Daten konnten wir das erste Mal im humanen System die günstigen Immunmodulatorischen Wirkungen von CDK4/6-Inhibitoren im peripheren Immunsystem verdeutlichen. Goel und seine Kollegen publizierten 2017 Daten über die immunmodulatorischen Wirkungen von CDK4/6-Inhibitoren im Mausmodell mit induziertem Mammakarzinom und anderen soliden Tumoren. Einerseits konnten sie zeigen, dass die selektiven CDK4/6-Inhibitoren nicht nur den Zellzyklus des Tumors zum Stillstand bringen, sondern auch die Antitumorimmunität fördern. Die Behandlung mit Abemaciclib hat zu einer Stimulierung der Typ-III-Interferon Produktion und der Expression Interferon empfindlicher Gene geführt, darunter MHC-Klasse-I-Gene, die die Antigenpräsentation verbessern.²⁷ Auch Gene, die an der Lymphozyten-Adhäsion und Kostimulation beteiligt sind, wurden unter der Behandlung hochreguliert. Auf der anderen Seite konnten nicht nur im Tumor, sondern auch in den Lymphknoten, der Milz und im peripheren Blut der tumortragenden Mäuse deutlich weniger regulatorische T-Zellen nachgewiesen werden. Die Behandlung

mit Abemaciclib in den Mausmodellen förderte außerdem die Proliferation der antigen-spezifischen und der MHC-Klasse-I spezifischen CD8+ T-Zellen.²⁷

In unserer Arbeit konnten wir erstmals *in vivo* zeigen, dass die Behandlung mit Ribociclib ähnliche immunmodulatorische Wirkungen hat. Regulatorische T-Zellen wurden ebenfalls runterreguliert, Gene die mit Interferon-Signalwegen verknüpft sind sowie Gene, die assoziiert sind mit Antigenprozessierung und -präsentation, wurden hochreguliert. Auch wenn unsere Daten eher darauf schließen lassen, dass eine bereits vorhanden Immunantwort verstärkt wird, als dass es sich um eine *de novo* Immunantwort handelt, ist nicht ausschließen, dass einige der bereits vorhandenen expandierenden T Zell-Klone tatsächlich tumorspezifisch sind¹. Die Entnahme von Tumorgewebe zu den Zeitpunkten vor und nach Therapie war nicht Teil des Protokolls dieser klinischen Studie. Es ist daher nicht auszuschließen, dass eine adaptive *de novo* Immunantwort am Tumor und in der Tumormikroumgebung initiiert wurde, die wir im peripheren Blut nicht beobachten konnten.

4.4 Stärken und Schwächen der Studie

Zu den Einschränkungen der oben genannten Studie gehört die geringe Zahl der Patienten, die in unsere Analyse einbezogen werden konnten.

Trotz der geringen Zahl konnten wir jedoch hochsignifikante Ergebnisse erzielen, die nicht im Widerspruch zu früheren Untersuchungen stehen. Zum ersten Mal konnten wir frühere Forschungsergebnisse für das menschliche System bestätigen.

Weitere Einschränkungen unserer Studie war die Tatsache, dass wir nicht mehrere Zeitpunkte nach Behandlung untersuchen konnten. Wir können keine Aussagen darüber machen, ob die günstigen Wirkungen auf das periphere Immunsystem auch nach über 12 Wochen Therapie anhalten oder, ob sich nicht dennoch die primär antiproliferative Wirkung der CDK4/6-Inhibitoren durchsetzt. Nichtsdestotrotz wissen wir, dass CDK4/6-Inhibitoren im Zeitraum von 12 Wochen günstige immunmodulatorische Wirkungen aufweisen.

4.5 Implikationen für Praxis und/oder zukünftige Forschung

Wir konnten mit dieser Arbeit, die bisher in Mausmodellen generierten Daten unterstützen, dass die zielgerichtete Therapie mit CDK4/6-Inhibitoren eine immunmodulatorische Wirkung haben. Die Checkpoint-Inhibition allein hat jedoch eine begrenzte Wirksamkeit als Monotherapie beim HR+ Mammakarzinom⁸. Bezüglich prädiktiven und prognostischen Biomarkern in der Therapie mit CDK4/6-Inhibitoren konnte *in vitro* gezeigt werden, dass eine erhöhte CDK6-Expression mit einer Resistenz gegenüber CDK4/6-Inhibitoren assoziiert ist⁴⁴. Yang et al vermuten, dass für die Resistenzentwicklung vor allem die Entkopplung des G1/S-Kontrollpunkt von der Regulierung durch Wachstumsfaktoren/Hormone eine wichtige Rolle spielt. In Zelllinienmodellen von Mamma- und Ovarialkarzinom korrelierte eine hohe Expression von Cyclin E1 (CCNE1) mit einer Resistenz gegenüber Palbociclib⁴⁵. In der klinischen Studie NeoPalAna, in dem Patienten mit HR-positivem Mammakarzinom neoadjuvant mit Palbociclib in Kombination mit Anastrozol behandelt wurden, konnten die *in vitro* beobachteten Ergebnisse bekräftigt werden. Zu verschiedenen Behandlungszeitpunkten wurden Biopsien entnommen und Genexpressionsanalysen durchgeführt. Die Daten haben gezeigt, dass eine hohe Konzentration von CCNE1- und CDKN2D-mRNA mit Resistenzen gegenüber Palbociclib verbunden war⁴⁶. Beide Gene gehören zu den E2F1-Transkriptionszielen (siehe Abbildung Nr. 1). Bei Abemaciclib konnten Zusammenhänge zwischen genetischen Myc-Veränderungen und Resistenzen gegenüber der Therapie beobachtet werden⁴⁷. Biomarker, die für die Therapiestratifizierung mit CDK4/6-Inhibitoren in der Klinik routinemäßig verwendet werden, sind bisher nicht etabliert. Dies sollte in Zukunft weiter erforscht werden, um eine personalisierte Therapiesteuerung zu ermöglichen.

Synergistische Effekte von CDK4/6-Inhibitoren und der PD-1/PDL1-Blockade haben *in vitro* vielversprechende Ergebnisse geliefert und können auch *in vivo* aussichtsreich sein. In der nicht-randomisierten, offenen Phase Ib multi-Kohorten Studie (NCT02779751) wurde die Sicherheit und Wirksamkeit von einem CDK4/6-Inhibitor (Abemaciclib) und Pembrolizumab bei Patienten mit Hormonrezeptor-positivem Mammakarzinom analysiert. Die Patienten erhielten den CDK4/6-Inhibitor Abemaciclib (150mg alle 12 Stunden an Tag 1-21) und den Immuncheckpoint-Inhibitor Pembrolizumab (200mg intravenös an Tag 1, dann alle 21 Tage) entweder in der Kombination mit Anastrozol (1mg alle 24 Stunden in Kohorte 1) oder ohne (Kohorte 2). Das Nutzen-Risiko Profil der Studie ergab ein

ungünstiges Nebenwirkungsprofil der Kombinationstherapie. Mit und ohne Anastrozol zeigte die Therapie zwar eine Antitumoraktivität, aber höheren Raten von interstitiellen Lungenerkrankungen/Pneumonitis und schweren Transaminasenerhöhungen ⁴⁸.

Schauen wir uns das generelle Nebenwirkungsprofil bei Patienten, die mit CDK4/6-Inhibitoren wie Palbociclib und Ribociclib behandelt werden an so, findet sich als unerwünschte Wirkung zu 60% eine höhergradige Neutropenie. Bei Abemaciclib kommt es in ungefähr 21% zu einer Neutropenie, allerdings sind hier vermehrt gastrointestinale Nebenwirkungen beschrieben ⁴⁹. Sowohl CDK4/6-Inhibitoren, Aromatasehemmer als auch Pembrolizumab können zu Transaminaseveränderungen führen ^{50 51}. Die interstitielle Lungenerkrankung als Nebenwirkung ist öfters beschrieben bei Pembrolizumab als bei CDK4/6-Inhibitoren aber prinzipiell können beide Wirkstoffgruppen diese als seltene unerwünschte Wirkung aufweisen ^{52 53}.

Im Gegensatz zur Kombination von Abemaciclib mit Pembrolizumab deuten die Daten der Phase-I/II-Studie (*NCT02778685*) mit Palbociclib in Kombination mit Pembrolizumab und Letrozol auf eine gute Verträglichkeit der Kombinationstherapie hin. Zusätzlich zeigte sich bei 31% der Patienten ein komplettes Ansprechen ⁵⁴. Die Patienten erhielten Letrozol (2,5 mg täglich), Palbociclib (125 mg täglich für 21 Tage, 1 Woche Pause) und Pembrolizumab (200 mg iv. an Tag 1 und alle 21 Tage). Warum die Verträglichkeit in dieser Studie besser ist, ist noch unklar. Dennoch konnten die *in vitro* gezeigten positiven Effekte der Kombinationstherapie auch im klinischen Setting bestätigt werden.

Obwohl In-vitro-Kombinationstherapien von CDK4/6-Inhibitoren und Immun-Checkpoint-Inhibitoren durchaus vielversprechend sind, sind weitere Forschungen erforderlich, um festzustellen, wie diese in Bezug auf die Toxizität klinisch durchführbar sind. Dabei ist es wichtig, in welchem Schema die Medikamente gegeben werden, so dass es nicht zu einer Augmentation der Toxizität kommt. Wahrscheinlich wäre eine sequenzielle Kombinationstherapie mit einem gewissen Abstand zwischen den zwei Wirkstoffen sinnvoll, um die potenziellen Nebenwirkungen zu minimieren. Es ist naheliegend, mit einem CDK4/6-Inhibitor im Therapieschema zu beginnen, um die T-Zell-vermittelte Antitumorimmunität zu stärken. In einem zweiten Schritt würde die Immun-Checkpoint-Blockade verhindern, dass die Tumorzellen dem Immunsystem durch so genannte Escape-Strategien entkommen können.

Am Beispiel des tripple-negativen Mammakarzinom konnten Teo et al 2017 in präklinischen Studien zeigen, dass die Kombination von CDK4/6-Inhibitoren mit einem Inhibitor des PIK3-Signalweges die Aktivierung und Zytotoxizität tumorinfiltrierender T-Zellen signifikant steigern konnte. Darüber hinaus kam es zu einer Abnahme der MDSCs⁵⁵. Dieser Therapeutische Ansatz könnte auch beim Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinom vielversprechend sein, da beide Signalwege im Zellzyklus zusammentreffen (siehe Abbildung Nr. 1). Eine andere Möglichkeit wäre die Kombination mit Therapien, die eine adaptive Immunantwort auslösen. Sowohl für die Radiotherapie als auch für die Chemotherapie sind immunmodulierende Eigenschaften beschrieben worden, die sie zu einem geeigneten Kombinationspartner für eine Immuntherapie machen⁵⁶. In Abhängigkeit vom Therapieschema und der Dosis am Beispiel von Cyclophosphamid konnte die Antitumorimmunität gefördert werden, da regulatorische T-Zellen herunterreguliert wurden und tumorspezifische Effektorzellen weiter expandieren konnten⁵⁷. Wir sind der Meinung, dass weitere Untersuchungen von Kombinations- oder sequenziellen Ansätzen erfolgversprechend sein können. Dazu gehören auch experimentellere Methoden wie Tumorantigen-Impfung oder adoptive T-Zell-Therapie.

5. Schlussfolgerungen

In Bezug auf das Mammakarzinom ist die Einführung der CDK4/6-Inhibitoren ein Durchbruch bei fortgeschrittenem Krankheitsverlauf. Die Daten aus dieser Arbeit bestärken die immunmodulatorisch günstigen Eigenschaften von CDK6/4-Inhibitoren beim Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinom. Zum ersten Mal konnten wir im humanen System zeigen, dass CDK4/6-Inhibitoren nicht nur einen Zellzyklustand in Tumorzellen bewirken, sondern auch in der Lage sind positive immunmodulatorische Eigenschaften hervorzurufen. Aufgrund ihres günstigen immunmodulatorischen Profils können CDK4/6-Inhibitoren als geeignete Kombinationspartner für immuntherapeutische Strategien eingesetzt werden. Um das größtmögliche Potential der zielgerichteten Therapie auszuschöpfen, wird ihre Zukunft in der Kombinationstherapie liegen.

Literaturverzeichnis

1. Peuker, C. A., Yaghobramzi, S., Grunert, C., Keilholz, L., Gjerga, E., Hennig, S., Schaper, S., Na, I.-K., Keller, U., Brucker, S., Decker, T., Fasching, P., Fehm, T., Janni, W., Kümmel, S., Schneeweiss, A., Schuler, M., Lüftner, D. & Busse, A. Treatment with ribociclib shows favourable immunomodulatory effects in patients with hormone receptor-positive breast cancer—findings from the RIBECCA trial. *European Journal of Cancer* 162, 45–55 (2022).
2. Robert Koch-Institut (2019) Zentrum für Krebsregisterdaten 2019- Brustkrebs. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs_node.html (letzter Zugriff: 23.04.2023, 17:15 Uhr).
3. Howlader, N., Altekruse, S. F., Li, C. I., Chen, V. W., Clarke, C. A., Ries, L. A. G. & Cronin, K. A. US incidence of breast cancer subtypes defined by joint hormone receptor and HER2 status. *J Natl Cancer Inst* 106, dju055 (2014).
4. Kohler, B. A., Sherman, R. L., Howlader, N., Jemal, A., Ryerson, A. B., Henry, K. A., Boscoe, F. P., Cronin, K. A., Lake, A., Noone, A.-M., Henley, S. J., Ehemann, C. R., Anderson, R. N. & Penberthy, L. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2011, Featuring Incidence of Breast Cancer Subtypes by Race/Ethnicity, Poverty, and State. *J Natl Cancer Inst* 107, (2015).
5. Chanrion, M., Negre, V., Fontaine, H., Salvétat, N., Bibeau, F., Grogan, G. M., Mauriac, L., Katsaros, D., Molina, F., Theillet, C. & Darbon, J.-M. A gene expression signature that can predict the recurrence of tamoxifen-treated primary breast cancer. *Clin Cancer Res* 14, 1744–1752 (2008).
6. Gnant, M. Overcoming endocrine resistance in breast cancer: importance of mTOR inhibition. *Expert Review of Anticancer Therapy* 12, 1579–1589 (2012).
7. Schmid, P., Cortes, J., Pusztai, L., McArthur, H., Kümmel, S., Bergh, J., Denkert, C., Park, Y. H., Hui, R., Harbeck, N., Takahashi, M., Foukakis, T., Fasching, P. A., Cardoso, F., Untch, M., Jia, L., Karantza, V., Zhao, J., Aktan, G., Dent, R., O’Shaughnessy, J., & KEYNOTE-522 Investigators. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* 382, 810–821 (2020).
8. Tolaney, S. M., Barroso-Sousa, R., Keenan, T., Li, T., Trippa, L., Vaz-Luis, I., Wulf, G., Spring, L., Sinclair, N. F., Andrews, C., Pittenger, J., Richardson, E. T., Dillon, D., Lin, N. U., Overmoyer, B., Partridge, A. H., Van Allen, E., Mittendorf, E. A., Winer, E. P. & Krop, I. E. Effect of Eribulin With or Without Pembrolizumab on Progression-Free Survival for Patients With Hormone Receptor-Positive, ERBB2-Negative Metastatic Breast Cancer. *JAMA Oncol* 6, 1–8 (2020).

9. Dieci, M. V., Griguolo, G., Miglietta, F. & Guarneri, V. The immune system and hormone-receptor positive breast cancer: Is it really a dead end? *Cancer Treat Rev* 46, 9–19 (2016).
10. Dunbier, A. K., Ghazoui, Z., Anderson, H., Salter, J., Nerurkar, A., Osin, P., A'hern, R., Miller, W. R., Smith, I. E. & Dowsett, M. Molecular Profiling of Aromatase Inhibitor-Treated Postmenopausal Breast Tumors Identifies Immune-Related Correlates of Resistance. *Clinical Cancer Research* 19, 2775–2786 (2013).
11. Hortobagyi, G. N., Stemmer, S. M., Burris, H. A., Yap, Y.-S., Sonke, G. S., Hart, L., Campone, M., Petrakova, K., Winer, E. P., Janni, W., Conte, P., Cameron, D. A., André, F., Arteaga, C. L., Zarate, J. P., Chakravartty, A., Taran, T., Le Gac, F., Serra, P. & O'Shaughnessy, J. Overall Survival with Ribociclib plus Letrozole in Advanced Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 386, 942–950 (2022).
12. Sledge, G. W., Toi, M., Neven, P., Sohn, J., Inoue, K., Pivot, X., Burdaeva, O., Okera, M., Masuda, N., Kaufman, P. A., Koh, H., Grischke, E.-M., Frenzel, M., Lin, Y., Barriaga, S., Smith, I. C., Bourayou, N. & Llombart-Cussac, A. MONARCH 2: Abemaciclib in Combination With Fulvestrant in Women With HR+/HER2- Advanced Breast Cancer Who Had Progressed While Receiving Endocrine Therapy. *JCO* 35, 2875–2884 (2017).
13. Finn, R. S., Rugo, H. S., Dieras, V. C., Harbeck, N., Im, S.-A., Gelmon, K. A., Walshe, J. M., Martin, M., Chavez Mac Gregor, M., Bananis, E., Gauthier, E. R., Lu, D. R., Kim, S. & Slamon, D. J. Overall survival (OS) with first-line palbociclib plus letrozole (PAL+LET) versus placebo plus letrozole (PBO+LET) in women with estrogen receptor-positive/human epidermal growth factor receptor 2-negative advanced breast cancer (ER+/HER2- ABC): Analyses from PALOMA-2. *JCO* 40, LBA1003–LBA1003 (2022).
14. Sherr, C. J. & Roberts, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13, 1501–1512 (1999).
15. Ezhevsky, S. A., Ho, A., Becker-Hapak, M., Davis, P. K. & Dowdy, S. F. Differential Regulation of Retinoblastoma Tumor Suppressor Protein by G1 Cyclin-Dependent Kinase Complexes In Vivo. *Mol Cell Biol* 21, 4773–4784 (2001).
16. Tadesse, S., Yu, M., Kumarasiri, M., Le, B. T. & Wang, S. Targeting CDK6 in cancer: State of the art and new insights. *Cell Cycle* 14, 3220–3230 (2015).
17. Deng, J., Wang, E. S., Jenkins, R. W., Li, S., Dries, R., Yates, K., Chhabra, S., Huang, W., Liu, H., Aref, A. R., Ivanova, E., Paweletz, C. P., Bowden, M., Zhou, C. W., Herter-Sprie, G. S., Sorrentino, J. A., Bisi, J. E., Lizotte, P. H., Merlino, A. A., Quinn, M. M., Bufe, L. E., Yang, A., Zhang, Y., Zhang, H., Gao, P., Chen, T., Cavanaugh, M. E.,

- Rode, A. J., Haines, E., Roberts, P. J., Strum, J. C., Richards, W. G., Lorch, J. H., Parangi, S., Gunda, V., Boland, G. M., Bueno, R., Palakurthi, S., Freeman, G. J., Ritz, J., Haining, W. N., Sharpless, N. E., Arthanari, H., Shapiro, G. I., Barbie, D. A., Gray, N. S. & Wong, K.-K. CDK4/6 Inhibition Augments Anti-Tumor Immunity by Enhancing T Cell Activation. *Cancer Discov* 8, 216–233 (2018).
18. Haricharan, S., Punturi, N., Singh, P., Holloway, K. R., Anurag, M., Schmelz, J., Schmidt, C., Lei, J. T., Suman, V., Hunt, K., Olson, J. A., Hoog, J., Li, S., Huang, S., Edwards, D. P., Kavuri, S. M., Bainbridge, M. N., Ma, C. X. & Ellis, M. J. Loss of MutL Disrupts CHK2-Dependent Cell-Cycle Control through CDK4/6 to Promote Intrinsic Endocrine Therapy Resistance in Primary Breast Cancer. *Cancer Discov* 7, 1168–1183 (2017).
19. Portman, N., Alexandrou, S., Carson, E., Wang, S., Lim, E. & Caldon, C. E. Overcoming CDK4/6 inhibitor resistance in ER-positive breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 26, R15–R30 (2019).
20. Hadrup, S., Donia, M. & Thor Straten, P. Effector CD4 and CD8 T Cells and Their Role in the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron* 6, 123–133 (2012).
21. Koch, S., Larbi, A., Derhovanessian, E., Ozcelik, D., Naumova, E. & Pawelec, G. Multiparameter flow cytometric analysis of CD4 and CD8 T cell subsets in young and old people. *Immun Ageing* 5, 6 (2008).
22. Thornton, A. M., Lu, J., Korty, P. E., Kim, Y. C., Martens, C., Sun, P. D. & Shevach, E. M. Helios+ and Helios- Treg subpopulations are phenotypically and functionally distinct and express dissimilar TCR repertoires. *Eur J Immunol* 49, 398–412 (2019).
23. Li, F., Zhao, Y., Wei, L., Li, S. & Liu, J. Tumor-infiltrating Treg, MDSC, and IDO expression associated with outcomes of neoadjuvant chemotherapy of breast cancer. *Cancer Biol Ther* 19, 695–705 (2018).
24. De Simone, M., Rossetti, G. & Pagani, M. Single Cell T Cell Receptor Sequencing: Techniques and Future Challenges. *Frontiers in Immunology* 9, (2018).
25. Porciello, N., Franzese, O., D'Ambrosio, L., Palermo, B. & Nisticò, P. T-cell repertoire diversity: friend or foe for protective antitumor response? *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 41, 356 (2022).
26. Migalska, M., Sebastian, A. & Radwan, J. Profiling of the TCR β repertoire in non-model species using high-throughput sequencing. *Sci Rep* 8, 11613 (2018).
27. Goel, S., DeCristo, M. J., Watt, A. C., BrinJones, H., Sceneay, J., Li, B. B., Khan, N., Ubellacker, J. M., Xie, S., Metzger-Filho, O., Hoog, J., Ellis, M. J., Ma, C. X., Ramm,

- S., Krop, I. E., Winer, E. P., Roberts, T. M., Kim, H.-J., McAllister, S. S. & Zhao, J. J. CDK4/6 inhibition triggers anti-tumour immunity. *Nature* 548, 471–475 (2017).
28. Lapeyre-Prost, A., Terme, M., Pernot, S., Pointet, A.-L., Voron, T., Tartour, E. & Taieb, J. in *International Review of Cell and Molecular Biology* (ed. Galluzzi, L.) 330, 295–342 (Academic Press, 2017).
29. Rini, B. I., Plimack, E. R., Stus, V., Gafanov, R., Hawkins, R., Nosov, D., Pouliot, F., Alekseev, B., Soulières, D., Melichar, B., Vynnychenko, I., Kryzhanivska, A., Bondarenko, I., Azevedo, S. J., Borchiellini, D., Szczylik, C., Markus, M., McDermott, R. S., Bedke, J., Tartas, S., Chang, Y.-H., Tamada, S., Shou, Q., Perini, R. F., Chen, M., Atkins, M. B. & Powles, T. Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine* 380, 1116–1127 (2019).
30. Schaer, D. A., Beckmann, R. P., Dempsey, J. A., Huber, L., Forest, A., Amaladas, N., Li, Y., Wang, Y. C., Rasmussen, E. R., Chin, D., Capen, A., Carpenito, C., Staschke, K. A., Chung, L. A., Litchfield, L. M., Merzoug, F. F., Gong, X., Iversen, P. W., Buchanan, S., Dios, A. de, Novosiadly, R. D. & Kalos, M. The CDK4/6 Inhibitor Abemaciclib Induces a T Cell Inflamed Tumor Microenvironment and Enhances the Efficacy of PD-L1 Checkpoint Blockade. *Cell Reports* 22, 2978–2994 (2018).
31. Guan, X., LaPak, K. M., Hennessey, R. C., Yu, C. Y., Shakya, R., Zhang, J. & Burd, C. E. Stromal senescence by prolonged CDK4/6 inhibition potentiates tumor growth. *Mol Cancer Res* 15, 237–249 (2017).
32. Teh, J. L. F. & Aplin, A. E. Arrested developments: CDK4/6 inhibitor resistance and alterations in the tumor immune microenvironment. *Clin Cancer Res* 25, 921–927 (2019).
33. Knudsen, E. S. & Witkiewicz, A. K. The Strange Case of CDK4/6 Inhibitors: Mechanisms, Resistance, and Combination Strategies. *Trends Cancer* 3, 39–55 (2017).
34. Nusch, A., Decker, T., Reinisch, M., Hartkopf, A. D., Heinrich, B., Kurbacher, C. M., Fuchs, R. D., Tesch, H., Krabisch, P., Brucker, S., Fehm, T. N., Janni, W., Kümmel, S., Luftner, D., Schneeweiss, A., Schuler, M. H., Voges, C., Schubert, J. & Fasching, P. A. RIBECCA: A phase IIIb, multicenter, open label study for women with estrogen receptor-positive locally advanced or metastatic breast cancer treated with ribociclib (LEE011) in combination with letrozole—Results of the second interim analysis. *JCO* 37, 1061–1061 (2019).
35. Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W. & Smyth, G. K. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 43, e47 (2015).

36. Korotkevich, G., Sukhov, V., Budin, N., Shpak, B., Artyomov, M. N. & Sergushichev, A. Fast gene set enrichment analysis. 060012 Preprint at <https://doi.org/10.1101/060012> (2021)
37. Seitz, V., Kleo, K., Dröge, A., Schaper, S., Elezkurtaj, S., Bedjaoui, N., Dimitrova, L., Sommerfeld, A., Berg, E., von der Wall, E., Müller, U., Joosten, M., Lenze, D., Heimesaat, M. M., Baldus, C., Zinser, C., Cieslak, A., Macintyre, E., Stocking, C., Hennig, S. & Hummel, M. Evidence for a role of RUNX1 as recombinase cofactor for TCR β rearrangements and pathological deletions in ETV6-RUNX1 ALL. *Sci Rep* 10, 10024 (2020).
38. Tian, Y., Babor, M., Lane, J., Schulten, V., Patil, V. S., Seumois, G., Rosales, S. L., Fu, Z., Picarda, G., Burel, J., Zapardiel-Gonzalo, J., Tennekoon, R. N., De Silva, A. D., Premawansa, S., Premawansa, G., Wijewickrama, A., Greenbaum, J. A., Vijayanand, P., Weiskopf, D., Sette, A. & Peters, B. Unique phenotypes and clonal expansions of human CD4 effector memory T cells re-expressing CD45RA. *Nat Commun* 8, 1473 (2017).
39. Carrington, E. M., Tarlinton, D. M., Gray, D. H., Huntington, N. D., Zhan, Y. & Lew, A. M. The life and death of immune cell types: the role of BCL-2 anti-apoptotic molecules. *Immunology & Cell Biology* 95, 870–877 (2017).
40. Ebner, P., Versteeg, G. A. & Ikeda, F. Ubiquitin enzymes in the regulation of immune responses. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 52, 425–460 (2017).
41. Korbecki, J., Kojder, K., Simińska, D., Bohatyrewicz, R., Gutowska, I., Chlubek, D. & Baranowska-Bosiacka, I. CC Chemokines in a Tumor: A Review of Pro-Cancer and Anti-Cancer Properties of the Ligands of Receptors CCR1, CCR2, CCR3, and CCR4. *Int J Mol Sci* 21, 8412 (2020).
42. Wang, H., Zhang, Q., Kong, H., Zeng, Y., Hao, M., Yu, T., Peng, J., Xu, Z., Chen, J. & Shi, H. Monocyte chemotactic protein-1 expression as a prognostic biomarker in patients with solid tumor: a meta analysis. *Int J Clin Exp Pathol* 7, 3876–3886 (2014).
43. Grivennikov, S. I. IL-11: a prominent pro-tumorigenic member of IL-6 family. *Cancer Cell* 24, 10.1016/j.ccr.2013.07.018 (2013).
44. Yang, C., Li, Z., Bhatt, T., Dickler, M., Giri, D., Scaltriti, M., Baselga, J., Rosen, N. & Chandralapaty, S. Acquired CDK6 amplification promotes breast cancer resistance to CDK4/6 inhibitors and loss of ER signaling and dependence. *Oncogene* 36, 2255–2264 (2017).

45. Taylor-Harding, B., Aspuria, P.-J., Agadjanian, H., Cheon, D.-J., Mizuno, T., Greenberg, D., Allen, J. R., Spurka, L., Funari, V., Spiteri, E., Wang, Q., Orsulic, S., Walsh, C., Karlan, B. Y. & Wiedemeyer, W. R. Cyclin E1 and RTK/RAS signaling drive CDK inhibitor resistance via activation of E2F and ETS. *Oncotarget* 6, 696–714 (2015).
46. Ma, C. X., Gao, F., Luo, J., Northfelt, D. W., Goetz, M., Forero, A., Hoog, J., Naughton, M., Ademuyiwa, F., Suresh, R., Anderson, K. S., Margenthaler, J., Aft, R., Hobday, T., Moynihan, T., Gillanders, W., Cyr, A., Eberlein, T. J., Hieken, T., Krontiras, H., Guo, Z., Lee, M. V., Spies, N. C., Skidmore, Z. L., Griffith, O. L., Griffith, M., Thomas, S., Bumb, C., Vij, K., Bartlett, C. H., Koehler, M., Al-Kateb, H., Sanati, S. & Ellis, M. J. NeoPalAna: Neoadjuvant palbociclib, a cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor, and anastrozole for clinical stage 2 or 3 estrogen receptor positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 23, 4055–4065 (2017).
47. Asghar, U. S., Kanani, R., Roylance, R. & Mitnacht, S. Systematic Review of Molecular Biomarkers Predictive of Resistance to CDK4/6 Inhibition in Metastatic Breast Cancer. *JCO Precision Oncology* e2100002 (2022). doi:10.1200/PO.21.00002
48. Rugo, H. S., Kabos, P., Beck, J. T., Jerusalem, G., Wildiers, H., Sevillano, E., Paz-Ares, L., Chisamore, M. J., Chapman, S. C., Hossain, A. M., Chen, Y. & Tolaney, S. M. Abemaciclib in combination with pembrolizumab for HR+, HER2– metastatic breast cancer: Phase 1b study. *NPJ Breast Cancer* 8, 118 (2022).
49. Klein, M. E., Kovatcheva, M., Davis, L. E., Tap, W. D. & Koff, A. CDK4/6 inhibitors: The mechanism of action may not be as simple as once thought. *Cancer Cell* 34, 9–20 (2018).
50. Jahan, N., Wongsasengsak, S., Rehman, S., Adhikari, N., Tijani, L. A. & Raghunath, A. Relative risk of hepatotoxicity associated with cyclin-dependent kinase inhibitors (CDK4/6i): A systematic review and meta-analysis of phase 3 randomized controlled trials. *JCO* 39, e13037–e13037 (2021).
51. Calderon, B., Stancu, A., Vanel, F.-R. & Vazquez, L. Pembrolizumab Treatment-Induced Liver Toxicity. *Case Rep Gastroenterol* 15, 742–750 (2021).
52. Zhang, Y., Ma, Z., Sun, X., Feng, X. & An, Z. Interstitial lung disease in patients treated with Cyclin-Dependent Kinase 4/6 inhibitors: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Breast* 62, 162–169 (2022).
53. Leroy, V., Templier, C., Faivre, J.-B., Scherpereel, A., Fournier, C., Mortier, L. & Wemeau-Stervinou, L. Pembrolizumab-induced pneumonitis. *ERJ Open Res* 3, 00081–02016 (2017).

54. Yuan, Y., Lee, J. S., Yost, S. E., Frankel, P. H., Ruel, C., Egelston, C. A., Guo, W., Padam, S., Tang, A., Martinez, N., Schmolze, D., Presant, C., Ebrahimi, B., Yeon, C., Sedrak, M., Patel, N., Portnow, J., Lee, P. & Mortimer, J. Phase I/II trial of palbociclib, pembrolizumab and letrozole in patients with hormone receptor-positive metastatic breast cancer. *European Journal of Cancer* 154, 11–20 (2021).
55. Teo, Z. L., Versaci, S., Dushyanthen, S., Caramia, F., Savas, P., Mintoff, C. P., Zethoven, M., Virassamy, B., Luen, S. J., McArthur, G. A., Phillips, W. A., Darcy, P. K. & Loi, S. Combined CDK4/6 and PI3K α Inhibition Is Synergistic and Immunogenic in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res* 77, 6340–6352 (2017).
56. Kumari, S., Mukherjee, S., Sinha, D., Abdisalaam, S., Krishnan, S. & Asaithamby, A. Immunomodulatory Effects of Radiotherapy. *Int J Mol Sci* 21, 8151 (2020).
57. Nars, M. S. & Kaneno, R. Immunomodulatory effects of low dose chemotherapy and perspectives of its combination with immunotherapy. *International Journal of Cancer* 132, 2471–2478 (2013).

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sarvenaz Yaghobramzi, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: [Einfluss des CDK4/6-Inhibitors Ribociclib auf die periphere Immunantwort beim Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinom/ Influence of the CDK4/6 inhibitor Ribociclib on the peripheral immune response in hormone receptor-positive breast cancer] selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Erstbetreuerin, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [_](#)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Sarvenaz Yaghobramzi war beteiligt an folgender Publikation:

Peuker, C. A.*, **Yaghobramzi, S.*** *et al.* Treatment with ribociclib shows favourable immunomodulatory effects in patients with hormone receptor-positive breast cancer—findings from the RIBECCA trial. *European Journal of Cancer* **162**, 45–55 (2022).

* These authors contributed equally.

Beitrag im Detail:

Im Jahr 2018 erkundigte ich mich bei Frau PD Dr. Antonia Busse, ob ich in ihrer AG im Bereich der Tumormunologie am Campus Benjamin Franklin meine Promotion machen kann. Nach Fertigstellung der Literaturrecherche und Planung des Projektes in Kooperation mit dem RIBECCA Studien-Konsortium in Erlangen konnte ich die experimentelle Arbeit ab April 2019 beginnen. Im Mai 2019 begann ich mit der Etablierung der Methoden im Labor. Ab Oktober 2019 waren die Methoden so weit etabliert, dass ich mit den Analysen der Patientenproben anfangen konnte. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen habe ich in den Räumlichkeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Keller durchgeführt. Die Genexpressionsanalysen durfte ich im BIH (Berlin Institute of Health) im Labor der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Il-Kang NA am „NanoString“ ausführen. Alle durchflusszytometrischen Untersuchungen und alle mRNA-Genexpressionsanalysen wurden von mir durchgeführt. Für die T-Zell-Rezeptor Analysen habe ich die RNA isoliert und aliquotiert. Die TCRbeta-Repertoire Analysen wurden von Dr. Steffen Hennig und Dr. Sigrid Schaper (HS Diagnostics) durchgeführt und teilweise ausgewertet. Die statistische Auswertung der Genexpressionsanalysen wurde in Zusammenarbeit mit Dr.-Ing. Enio Gjerga erstellt. Die gesamte statistische Auswertung der durchflusszytometrischen Untersuchungen wurde von mir durchgeführt (mit Ausnahme der Korrelationsanalysen, die von Dr. Peuker gemacht wurden). Alle Abbildungen sowohl in der Publikation als auch im Supplement sind von mir erstellt worden. Der Text wurde gemeinsam von Dr. Caroline Peuker, PD Dr. Antonia Busse und mir geschrieben und im Anschluss von allen Co-Autoren gelesen und überarbeitet.

Beitrag im Einzelnen:

- Literaturrecherche
- Etablierung der Methoden (Testung der DuraClone-Panels und Titrationsversuche bei der Etablierung des Treg-Panels, Kompensationsexperimente, RNA-Isolierung und Qualitätsdurchführung der RNA-Proben für die Genexpressions- und T-Zell Rezeptoranalysen.)
- Durchführung der durchflusszytometrischen Analysen und der Genexpressionsanalysen
- Statistische Auswertung und Interpretation der durchflusszytometrischen Analysen und der Genexpressionsanalysen
- Erstellung aller Abbildungen
- Fertigstellung der Publikation mit den Co-Autoren

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Druckexemplar(e) der Publikation(en)

Peuker, C. A.*, **Yaghobramzi, S.*** *et al.* Treatment with ribociclib shows favourable immunomodulatory effects in patients with hormone receptor-positive breast cancer—findings from the RIBECCA trial. *European Journal of Cancer* **162**, 45–55 (2022).

<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2021.11.025>

DOI-Nummer: [10.1016/j.ejca.2021.11.025](https://doi.org/10.1016/j.ejca.2021.11.025)

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Komplette Publikationsliste

Peuker, C. A.*, **Yaghobramzi, S.*** *et al.* Treatment with ribociclib shows favourable immunomodulatory effects in patients with hormone receptor-positive breast cancer—findings from the RIBECCA trial. *European Journal of Cancer* **162**, 45–55 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2021.11.025>

Kongressbeiträge:

Yaghobramzi, S., Peuker, C. A., Lüftner, D., Busse, A., Influence of CDK4/6 inhibitors on the peripheral immune response in HR-positive breast cancer: RIBECCA (Poster-Präsentation bei der Jahrestagung der DGHO (deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie) 2019 in Berlin).

Peuker, C. A.*, **Yaghobramzi, S.*** *et al.* Einfluss des CDK4/6-Inhibitors Ribociclib auf die periphere Immunantwort beim Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinom / Influence of CDK4/6 inhibitors on the peripheral immune response in hormone receptor-positive breast cancer. (Online-Vortrag auf der Covid-19 bedingt virtuell durchgeführten Jahrestagung der DGHO 2020)

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei meiner Doktormutter Dr. Antonia Busse bedanken. Durch die freundliche Aufnahme in ihrer Arbeitsgruppe durfte ich Teil dieses Projektes werden. Sie hatte immer ein offenes Ohr für meine Fragen und hat mich von Anfang an unterstützt und ermutigt, auch in Zeiten, in denen ich auf Hindernisse gestoßen bin.

Dr. Caroline Anna Peuker möchte ich von ganzem Herzen für ihre stetige Unterstützung danken. Ihr Enthusiasmus für die Forschung hat mich sehr motiviert und es war mir eine besondere Freude, mit ihr zusammenzuarbeiten.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Co-Autoren (u.a. Corinna Grunert und Luisa Keilholz) bedanken. Die gesamte Arbeitsgruppe der AG Busse/Ochsenreiter ermöglichte mir eine hilfsbereite und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, für die ich sehr dankbar bin. Chae-Yeong Eom möchte ich ganz herzlich für die langen Tage und Abende gemeinsam im Labor danken. Jacob Ritter danke ich für das Korrekturlesen und der vielen Gespräche.

Ebenso danke ich meiner liebevollen Schwester und meinen besten Freunden, die mich immer moralisch unterstützt haben. Meinem Partner Lukas Hawkins danke ich von ganzem Herzen, dass er von Anfang bis Ende an meiner Seite war und immer Verständnis für meine Situation gezeigt hat.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern Behroz Yaghobramzi und Fariba Samei, die mir beigebracht haben, geduldig zu sein. Zu jeder Tageszeit haben sie mich liebevoll unterstützt und bestärkt. Diese Arbeit ist Ihnen gewidmet.