

Aus dem Institut für medizinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**„Vorkommen regulatorischer Zellen abhängig vom
Sentinelnode-Befall beim Malignen Melanom“**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katharina Kowalczyk

aus Berlin

Datum der Promotion: 5.6.2016

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Zusammenfassung – Abstract	VII
1 Einleitung	1
1.1 Malignes Melanom	1
1.1.1 Kurze Erläuterung der Tumorentität, prognostische Faktoren, Stadieneinteilung	1
1.1.2 Kritische Betrachtung der Wächterlymphknotenbiopsie	5
1.1.3 Derzeitige Therapieoptionen	8
1.2 Immunologie des Melanoms	9
1.2.1 Tumorabwehrmechanismen	9
1.2.2 Identifizierung von regulatorischen T-Zellen	11
1.2.3 Regulatorische Monozyten	12
1.3 Ziel der Arbeit/ Hypothesen	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Dermatologisch-klinischer Anteil – Patientenakquise – Materialgewinnung	14
2.1.1 Blut	14
2.1.2 Lymphknoten	17
2.2 Immunologischer Anteil – Materialaufarbeitung und Analyse	18
2.2.1 Material	18
2.2.2 Methoden	20
2.2.2.1 Zellpräparation	20
2.2.2.2 Einfrieren von Zellen	21
2.2.2.3 Auftauen von Zellen	21
2.2.2.4 Zellzählung	22
2.2.2.5 Färbungen für die Durchflusszytometrie (FACS)	22
2.2.2.5.1 regulatorische T-Zellen (Panel 1)	22
2.2.2.5.2 regulatorische Monozyten und Differenzierung der regulatorischen T- Zellen (Panel 2)	23
2.2.2.6 Durchflusszytometrie (FACS Analyse)	24
2.2.2.6.1 Messen von Panel 1	26
2.2.2.6.2 Messen von Panel 2	26

2.2.2.6.3	Gatingstrategien Panel 1 und Panel 2	27
2.2.2.7	PCR	32
2.2.2.7.1	Material	33
2.2.2.7.2	Materialaufbereitung	34
2.2.2.7.3	RT-PCR-Ablauf	35
2.3	Statistik	35
3	Ergebnisse	37
3.1	Regulatorische T-Zellen	39
3.1.1	FoxP3-DNA-Expression, untersucht in den Blutproben	39
3.1.2	Messung der Tregs in der Durchflusszytometrie	41
3.2	Analyse von Lymphknotenmaterial mittels PCR	51
3.3	Melanomart	56
3.4	Differenzierung der regulatorischen T-Zellen	58
3.5	Regulatorische Monozyten	61
4	Diskussion	65
4.1	Methodenkritik	65
4.2	Regulatorische T-Zellen	67
4.3	Analyse von Lymphknotenmaterial mittels PCR	72
4.4	Melanomart	73
4.5	Differenzierung der regulatorischen T-Zellen	74
4.6	Regulatorische Monozyten	75
4.7	Relevanz der Arbeit, Konsequenz und Ausblick	77
5	Literaturverzeichnis	82
	Erklärung an Eides statt	87
	Lebenslauf	88
	Veröffentlichungen	90
	Danksagung	91

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ALM	Akral-lentiginöses Melanom
Amp	Ampicillin
ANOVA	One-Way-Analysis of Variance
APC, APZ	Antigen präsentierende Zelle
AS	Aminosäure(n)
Bp	Basenpaar
B-RAF	Mitglied der Raf kinase family of growth signal transduction protein kinases
°C	Grad Celsius
CC, CCR	Chemokin, -rezeptor
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary DNA
CLND	completion lymph node dissection
CpG-Motive	Cytosinphosphat-Guanin
CT	Computertomographie
CTL, ZTL	Cytotoxischer T-Lymphozyt
CTL-A 4-AK	Antikörper gegen CTL-A 4
DFS	Disease free survival, krankheitsfreies Überleben
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA, DNS	Deoxyribonucleic Acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	double strand, Doppelstrang
DTIC	Dacarbazin
ECL	Enhanced Luminol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epithelial Growth Factor
FACS	fluorescence activated cell sorting, Durchflusszytometrie
FCS, FKS	fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-5-Isocyanat
FKDS	Doppler- und farbkodierte Duplex-Sonographie
FNAC	Feinnadelaspirationszytologie
foxP3	forkheadbox P3
FSC	Forward Scatter
GITR	glucocorticoid-induced TNF-receptor
GTC	Guanidinthiocyanat
Gp	Glykoprotein
h	Stunde
IDO	Indolamin-2,3-Desoxygenase
IFN	Interferon
IG	Immunglobulin
IL	Interleukin
JÜR	Jahres-Überlebensrate
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LAS	Lymphabstromszintigraphie
LE	low Endotoxin
LDH	Lactatdehydrogenase
LMM	Lentigo-maligna Melanom
MDSCs	myeloische Suppressorzellen
MFI	mean fluorescence intensity
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
MHz	Mega Hertz
MHC	Major Histocompatibility Complex
Min.	Minute
Mio.	Million
miRNA	micro RNA
µl	Mikroliter

ml	Milliliter
mM	millimolar
MM	Malignes Melanom
MM I-IV	Melanom-Stadium I-IV
μ M	mikromolar
μ m	mikrometer
mRNA	messenger RNA
MW	arithmetischer Mittelwert
n	number, Anzahl
NaHCO ₃	Natriumbicarbonat
NK	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
nM	nanomolar
NM	Noduläres Melanom
NO	Stickstoffmonoxid
NPW	Negativ Prädiktiver Wert
nt	Nukleotid
p-Wert	Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5% ($p < 0,05$)
PBMC	peripher blood mononuclear cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pg	Picogramm
PPW	Positiv prädiktiver Wert
PT	Primärtumor, Primarius
RNA, RNS	Ribonucleic Acid, Ribonukleinsäure
ROS	radikale Sauerstoffspezies
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rpm	revolutions per minute
RT	Reverse Transkriptase
Sek, sec	Sekunde
SD	Standarddeviation/-abweichung
SDS	Sodium Lauryl Sulfate
siRNA	short interfering RNA
SLN, SN	Sentinellymphnode
SLND, SLNB	Sentinel Lymph Node Dissection, - Biopsy
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
ss	single strand, Einzelstrand
SSC	Side Scatter
SSM	superfiziell spreitendes Melanom
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TAP	Peptidtransporter
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	Transforming Growth Factor
TH	T-Helferzellen
TILs	Tumor-infiltrating lymphocytes, Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TNM	Tumorklassifikation - T für Tumor, N für Nodus, M für Metastasen
Tregs	regulatorische T-Zellen
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSDR	demethylierte FoxP3-DNA-Region auf Chromosom 11
U	Unit (Aktivitätseinheit von Enzymen)
US	Ultraschall, Sonographie
WLK	Wächterlymphknoten

Zusammenfassung

Hintergrund: Das Maligne Melanom ist eine sehr immunogene Tumorentität, die im fortgeschrittenen Stadium mit einer sehr schlechten Prognose einhergeht. Diese ist von der Eindringtiefe nach Breslow zum Zeitpunkt der Erstdiagnose abhängig. Der Wächterlymphknoten stellt jedoch den bedeutendsten Prognoseparameter für das krankheitsfreie Intervall und krankheitsspezifisches Überleben dar.

Es wurde in vielen Studien gezeigt, dass regulatorische T-Zellen in Tumoren vorkommen und deren erhöhte Anzahl bzw. Frequenz im Blut und Tumorgewebe mit einer schlechteren Prognose des Betroffenen korreliert. Studien beim Melanom zu Tregs untersuchten bislang nicht den Zusammenhang zum klinischen Verlauf und schlossen meist Melanompatienten erst ab Stadium III (Befall des Wächterlymphknotens) ein.

Ziel dieser Dissertation war es, Vorkommen und prognostische Bedeutung von regulatorischen T-Zellen unter Einbeziehung des Wächterlymphknotenbefalls beim Melanom zu untersuchen, sowie die Rolle von regulatorischen Monozyten.

Material und Methoden: Insgesamt wurden 79 Patienten eingeschlossen, hiervon 1 unbekanntes Stadium (SLN-), 29 Stadium I, 15 Stadium II, 14 Stadium III und 20 Stadium IV (nach AJCC 2009). Die Analyse von Lymphknotenmaterial erfolgte anhand von archiviertem Material. Den Melanompatienten wurde nach Erstdiagnose und vor geplanter SLNB Blut für die Immunanalyse entnommen. Regulatorische T-Zellen wurden durchflusszytometrisch mit 2 unterschiedlichen Färbepanels charakterisiert, ebendfalls regulatorische Monozyten des Subtyps CD14+HLA-DRlow.

Die PCR-Analyse auf FoxP3-DNA erfolgte in PBMC und Lymphknoten. Hierfür wurden 12 Patientinnen ohne Befall des Wächterlymphknotens (SLN-, n12) und 7 Patientinnen mit Befall von 1-5 Wächterlymphknoten untersucht (SLN+, n11).

Ergebnisse: Die PCR-Analyse von PBMC zeigte eine Tendenz, dass die Patienten mit Befall des Wächterlymphknotens (SLN+) mehr FoxP3-DNA-Expression aufwiesen als die Wächterlymphknoten-negativen-Melanompatienten (SLN-). Nur für die männlichen Proben zeigte sich eine statistische Signifikanz ($p = 0,049$). Bei den

durchflusszytometrischen Analysen hatten Patienten in den frühen Stadien I-II und Gesunde mehr Tregs als Patienten mit fortgeschrittenen Melanomstadien III-IV. Jedoch hatten Melanopatienten statistisch signifikant weniger Treg-Effektorzellen als die Gesunden und eine erhöhte Zahl an Treg-Memory-Zellen ($p = 0,02$).

Es fand sich keine Korrelation zwischen der Anzahl der regulatorischen T-Zellen und dem klinischen Verlauf der Melanopatienten bezüglich des Rezidivrisikos und der Langzeitprognose. Auch die Tumorlast des Wächterlymphknotens und die FoxP3-DNA-Expression korrelierte nicht mit den klinischen Parametern.

Für die Monozytenanalysen ließ sich für Melanopatienten im Vergleich zu Gesunden eine statistisch signifikant erhöhte Anzahl des Monozytensubtypes (CD14+HLA-DRlow) nachweisen ($p = 0,005$).

Schlussfolgerung: Die Messung von regulatorischen T-Zellen und regulatorischen Monozyten mittels Durchflusszytometrie sowie PCR im Blut und von Lymphknotengewebe von Melanopatienten kann anhand der vorliegenden Daten nicht als prognostischer Parameter verwendet werden. Spezifische Marker in der primären Diagnostik müssen zur Verbesserung der Klassifizierung der Betroffenen und Optimierung der Therapie gefunden werden.

Abstract

Background: In melanoma patients the distinction between good and poor prognosis is dependent of the involvement of the Sentinel lymph node (SLN). A new biomarker would increase the accurateness of staging in these patients. Regulatory T cells (Tregs) play a pivotal role in inhibiting of antitumor response. The transcription factor FoxP3 has been reported to play a key role in Treg function. The frequency in circulation and tumor environment is increased in patients with various cancers and correlated with poor prognosis.

In this study material of melanoma patients was analyzed to characterize Tregs and regulatory monocytes as a possible diagnostic marker for a better staging.

Methods: Peripheral blood monocytes (PBMC) were obtained from healthy donors (n11) and melanoma patients stage I-IV (AJCC 2009, n79). Tregs were identified by FACS and PCR (demethylated FoxP3-DNA). Furthermore FACS analysis discriminated a subset of monocytes and differentiated Tregs in memory and effector T cells. A special PCR assay was performed on sentinel lymph nodes from melanoma patients (SLN negative n12 and SLN positive n11).

Results: The frequency of Tregs was not significantly higher in PBMC from melanoma patients by FACS. The PCR analysis of PBMC from male donors showed a significant increase in Tregs in SLN positive patients compared to SLN negative ($p=0,049$). There was no increase in Treg frequency in melanoma involved SLN as expected and no correlation between the clinical outcome of melanoma patients. For regulatory monocytes the analysis by FACS detected a higher frequency in melanoma patients compared to healthy donors.

Conclusion: The relevance of Tregs influencing disease outcome of melanoma patients is still controversial.

1 Einleitung

In dieser Dissertationsarbeit erfolgt die Untersuchung von immunologischen Zellen bei Melanompatienten und Gesunden. Der Schwerpunkt wird auf die regulatorischen T-Zellen (Tregs) gelegt, welche in unterschiedlichen Geweben (Blut, Lymphknoten) mit verschiedenen Methoden (FACS, PCR) untersucht werden.

Zur Herleitung der Hypothesen wird zunächst die Tumorentität des Malignen Melanoms mit Diagnostik, Prognose und Therapie beschrieben sowie die immunologischen Zellarten und Tumorabwehrmechanismen.

1.1 Malignes Melanom

1.1.1 Kurze Erläuterung der Tumorentität, prognostische Faktoren, Stadieneinteilung

Beim malignen Melanom handelt es sich um einen hochmalignen Tumor, der meist von den Melanozyten ausgeht und in der äußeren Haut (Epidermis) entsteht. Die Inzidenz des malignen Melanoms hat in den letzten 25 Jahren deutlich zugenommen (siehe Abbildung 1) und auch die Mortalität stieg an, jedoch in geringem Maße, was am ehesten einer verbesserten Früherkennung und Aufklärung geschuldet sei [1-4]. Neuste Daten aus Schleswig Holstein belegen, dass das in Deutschland propagierte Vorgehen mit intensiviertem Hautkrebscreening zwar eine weiter erhöhte Inzidenz bedingt, aber dies erstmals belegbar zu einer Verschiebung von dickeren zu dünneren Primärtumoren und damit gleichzeitig zu einer Reduktion der Mortalität führte [5-7].

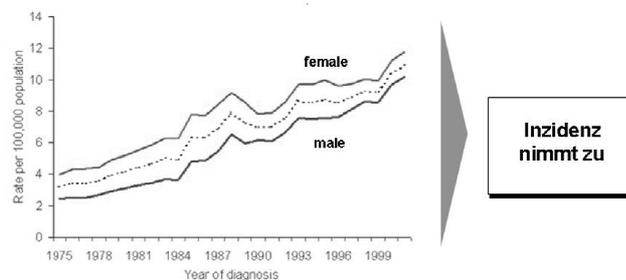


Abb.1 Melanominzidenz modifiziert nach Burton et al. , Cancer Research UK, IJC: die Y-Achse zeigt die Rate der Neuerkrankungen am Melanom per 100.000 Einwohner in Beziehung gesetzt zum Zeitraum von 1975-2000 (X-Achse).

Einleitung

Prädisponierend für das Auftreten eines kutanen malignen Melanoms sind ein heller Hauttyp, eine positive Familienanamnese (e.g. Genmutationen im CDKN2A-Gen wurden detektiert), Anzahl der Sonnenbrände im Kindesalter [8] und die Anzahl der atypischen Naevi (mehr als 50 Stück) im Rahmen eines sogenannten Atypischen Naevi Syndroms, Missbrauch von Solarien bzw. extremes Bräunungsverhalten [9]. Histologisch lässt sich der Tumor in vier Haupt- und einige Subtypen klassifizieren. Haupttypen (Melanomarten) sind das zu etwa 50 % vorkommende superfiziell spreitende Melanom (SSM), das noduläre Melanom (NM, 30 %), das Lentigo-maligna Melanom (LMM, 10 %) und das Akral-lentiginöse Melanom (ALM, 5 %). Als Subtypen unterscheidet man weiter das desmoplastische, das verruköse, das amelanotische Melanom, Schleimhautmelanome (z.B. konjunktivale und uveale Melanome des Auges) und andere [10].

Für die klinische Unterscheidung zwischen einem ungefährlichen Naevuszellnaevus (laienhaft Leberfleck) und dem bösartigen Melanom hat sich klinisch die ABCDE-Regel für das unbewaffnete Auge bewährt (siehe Abbildung 2).



Abb.2 ABCDE-Regel (aus National Cancer Institute): rechte Bilderspalte zeigt die Merkmale der ABCDE-Regel bei einem gutartigen Nävus (laienhaft „Leberfleck“) im Vergleich dazu die linke Spalte mit Bildern eines Malignen Melanoms

Die Prognose des malignen Melanoms ist in erster Linie von der Eindringtiefe nach Breslow zum Zeitpunkt der Erstdiagnose abhängig. Bei einer Tumordicke des Melanoms unter 1 mm beträgt die Fünfjahresüberlebensrate nahezu 100 %, bei über 4 mm sind es nur noch etwa 50 % (siehe Abbildung 3).

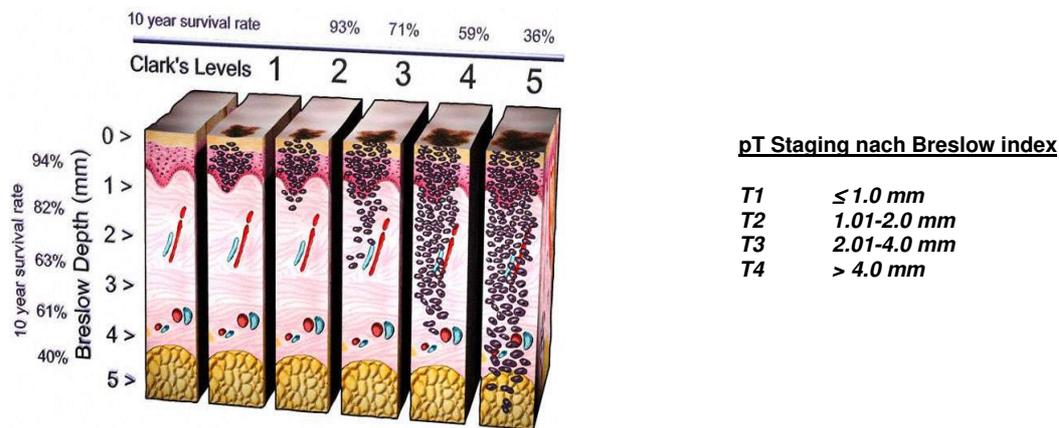


Abb.3 Ausbreitung des Melanoms in der Haut modifiziert nach Med-Art 2001 (<http://www.med-ars.it>):

Mit zunehmender Eindringtiefe (oben Clark Level 1-5 – abhängig von den durchdrungenen Hautschichten, links Tiefe nach Breslow in mm von der Oberfläche, Epicutanschnitt) der Melanomzellen sinkt die Überlebenswahrscheinlichkeit

Rechte Seite: pathologische T-Klassifikation (T=Tumor) nach dem Breslow-Index

Entscheidend ist die frühzeitige und vollständige chirurgische Entfernung des Primärtumors, denn mit steigender Tumordicke wächst auch das Risiko der Metastasierung. Vorrangiges Ziel neben der Prävention ist daher die Früherkennung des Melanoms in einem heilbaren Tumorstadium und die frühzeitige Erkennung und Verifizierung von Metastasen. Die Melanomzellen breiten sich hauptsächlich (bis zu >80 %) über die drainierenden Lymphwege in die regionären Lymphknoten aus [11, 12], nur ein ganz geringer Teil metastasiert direkt hämatogen.

Heutzutage erfolgt ab einer Tumordicke von >1mm oder bei Vorliegen weiterer Risikofaktoren (e.g. Alter <40, erhöhte Mitoserate) die Wächterlymphknotenbiopsie (SLND, SLNB), d.h. die Entfernung des oder der ersten Lymphknoten im Abstromgebiet des Primärtumors, anstelle der früher durchgeführten deutlich radikaleren kompletten regionären Lymphknotenausräumung (CLND) [13-14]. Der Wächterlymphknoten (WLK bzw. SLN - Sentinel Lymph Node) kann als repräsentativ für alle weiteren Lymphknoten im untersuchten Lymphgebiet erachtet werden und stellt den bedeutendsten Prognoseparameter für das krankheitsfreie Intervall und krankheitsspezifisches Überleben dar (Abb. 4) [15].

Einleitung

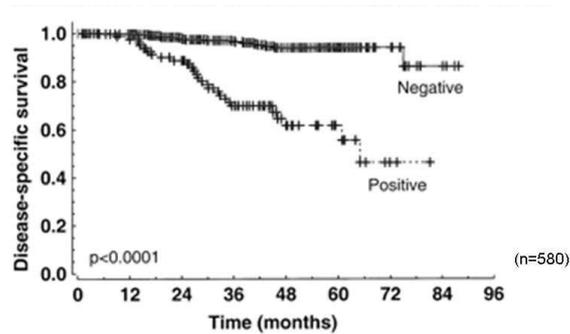


Abb.4 Befall des SLN modifiziert nach Gershenwald et al. 1999 [15]: Die Graphen zeigen den Sentinellymphknotenbefall beim Malignen Melanom an, in Beziehung gesetzt zum krankheitsspezifischen Überleben (Y-Achse) und den Überlebensmonaten (X-Achse) ab Erstdiagnose (Zeitpunkt Null). Hier zeigt sich, dass der SLN-Befall entscheidend für das Überleben ist.

Bei ca. 20 % der Melanompatienten wird ein positiver Befall des WLKs gefunden und diesen Patienten dann eine CLND (*completion lymph node dissection*) angeboten [16]. Die 5-JÜR beträgt >90 % bei SLNnegativen vs. <60 % bei SLNpositiven Melanompatienten (Abb. 5 „stage and prognosis“) [15].

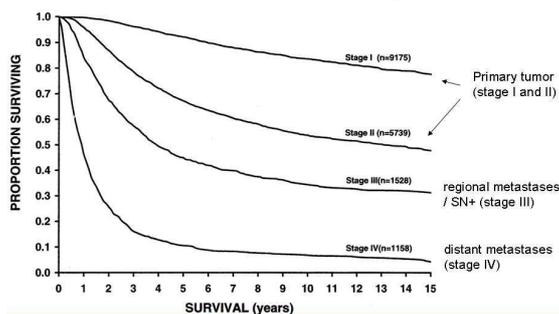


Abb.5 Melanomstadium und Prognose modifiziert nach Balch et al. 2004 [11]: Überleben in Jahren nach Erstdiagnose (Zeitpunkt Null) dargestellt in Abhängigkeit vom Tumorstadium I-IV.

Abhängig von der histologischen Aufarbeitung des entfernten SLNs wird der Patient einem Stadium zugeordnet und einer stadiengerechten Therapie sowie Nachsorge zugeführt. Das aktuelle Klassifikationssystem ist eine überarbeitete Version der pTNM-Klassifikation der AJCC (American Joint Committee on Cancer) [17], die die mikroskopisch befallenen Sentinellymphknoten mit einbezieht. In den folgenden beiden Tabellen der AJCC findet sich eine Auflistung der aktuellen Tumorstadienklassifikation (AJCC 2009).

Einleitung

Classification	Thickness (mm)	Ulceration Status/Mitoses
T		
Tis	NA	NA
T1	≤ 1.00	a: Without ulceration and mitosis < 1/mm ² b: With ulceration or mitoses ≥ 1/mm ²
T2	1.01-2.00	a: Without ulceration b: With ulceration
T3	2.01-4.00	a: Without ulceration b: With ulceration
T4	> 4.00	a: Without ulceration b: With ulceration
N		
	No. of Metastatic Nodes	Nodal Metastatic Burden
N0	0	NA
N1	1	a: Micrometastasis* b: Macrometastasis†
N2	2-3	a: Micrometastasis* b: Macrometastasis† c: In transit metastases/satellites without metastatic nodes
N3	4+ metastatic nodes, or matted nodes, or in transit metastases/satellites with metastatic nodes	
M		
	Site	Serum LDH
M0	No distant metastases	NA
M1a	Distant skin, subcutaneous, or nodal metastases	Normal
M1b	Lung metastases	Normal
M1c	All other visceral metastases	Normal
	Any distant metastasis	Elevated

Tab.1 TNM-Klassifikation des Malignen Melanoms modifiziert nach Balch et al. 2009 [17] : In der Tabelle findet sich die klassische Aufteilung der Tumorklassifikation nach TNM, T für Tumor – abhängig von der Tumordicke in mm und des Ulzerationsstatus, N für Nodus – Nicht- oder Befall von Lymphknoten sowie Anzahl von befallenen Lymphknoten, M für Metastasen – nach Lokalisation unterteilt

	Clinical Staging*			Pathologic Staging†			
	T	N	M	T	N	M	
0	Tis	No	M0	0	Tis	No	M0
IA	T1a	No	M0	IA	T1a	No	M0
IB	T1b	No	M0	IB	T1b	No	M0
	T2a	No	M0		T2a	No	
IIA	T2b	No	M0	IIA	T2b	No	M0
	T3a	No	M0		T3a	No	
IIB	T3b	No	M0	IIB	T3b	No	M0
	T4a	No	M0		T4a	No	
IIC	T4b	No	M0	IIC	T4b	No	M0
III	Any T	N > No	M0	IIIA	T1-4a	N1a	M0
					T1-4a	N2a	M0
				IIIB	T1-4b	N1a	M0
					T1-4b	N2a	M0
					T1-4a	N1b	M0
					T1-4a	N2b	M0
					T1-4a	N2c	M0
				IIIC	T1-4b	N1b	M0
					T1-4b	N2b	M0
					T1-4b	N2c	M0
	Any T	N3	M0				
IV	Any T	Any N	M1	IV	Any T	Any N	M1

Tab.2 Stadieneinteilung: in Abhängigkeit der TNM-Klassifikation wird jedem Betroffenen ein Tumorstadium 0 (In-situ-Tumor) über III (mit Lymphknotenbefall) bis IV (Metastasierung) zugeordnet

1.1.2 Kritische Betrachtung der Wächterlymphknotenbiopsie (SLND)

Die routinemäßige Entnahme des Wächterlymphknotens gerät zunehmend in die Diskussion. Zum einen zeigten Analysen keinen Vorteil der SLND für das Gesamtüberleben der Betroffenen [14] und des Weiteren entwickeln ca. 20 % der

Einleitung

SLN-negativen Patienten dennoch Metastasen [15,18, 19]. Ebenso ist gezeigt worden, dass Patienten mit Mikrometastasen im SLN, welche als SLNpositiv bezeichnet wurden und daraufhin einer CLND zugeführt wurden, eine bessere 5-Jahresüberlebensrate (JÜR) aufwiesen als SLNnegative Patienten [20]. Deshalb erscheint es sinnvoll, diese als SLNpositiv bezeichneten und dem MM-Stadium III (hochrisiko) zugeordneten Patienten vor einer unnötigen CLND zu bewahren.

Vorteil	Nachteil
<ul style="list-style-type: none">- Durch den SLN-Status kann eine Aussage über die Prognose getroffen werden.- Der Patient wird bei Befall des SLN für die CLND ausgewählt.- Mit der CLND kann die Tumoralast insgesamt gesenkt und das Rezidivrisiko minimiert werden.- Der SLN-Status stellt ein mögliches Selektionskriterium für Studien und adjuvante Therapien dar.	<ul style="list-style-type: none">- Bisher gibt es keine erfolgreichen adjuvanten Therapien, dies beinhaltet eine unnötige Belastung des Patienten mit einer prognostischen Information.- CLND ist ein ausgedehnter Eingriff mit OP-Risiken, der aufgrund einer falsch-positiven SLND (immerhin bis zu 25 %) unnötigerweise durchgeführt wird und ein Risiko für in-transit-Metastasen darstellt.

Tab.3: Auflistung der Vor- und Nachteile der Sentinellymphknotenentfernung (SLND) – Kritik nach Thomas JM et al. 2008 und Eggermont & Voit 2008 [14, 21]

Des Weiteren besteht die klinische Notwendigkeit eine neue Einteilung von Melanompatienten vorzunehmen, vor allem bei bestimmten Subkollektiven. Patienten mit einer Tumordicke des Primarius von <1mm (81 % der Melanom-Stadium I - Patienten, 78 % aller MM-Patienten) haben zwar eine 5JÜR von 96,4 – 98 %, dennoch versterben von diesen im Verlauf 15 % an den Folgen des Melanoms. Diese Patienten profitieren weder von der SLND, noch werden sie in der Nachsorge (nach chirurgischer Entfernung des Primarius und Nachexzision) gesondert betrachtet. Die Lymphknotensonographie wird nur in Ausnahmefällen bei Tumordicken <1 mm durchgeführt. Gimotty et al schlugen 2007 für dieses Patienten Klientel eine neue Klassifikation vor, die neben den Kriterien der AJCC 2002 noch zusätzliche histopathologische Kriterien einbezieht (Tumorstadiumphase, Mitoseraten und TILs) [22]. Die Mitoserate immerhin fand Einzug in die neue AJCC Klassifikation von 2009.

Durch die regelhafte Einführung der Lymphknotensonographie in die Nachsorgeuntersuchungen von Melanompatienten gemäß Leitlinie Malignes

Einleitung

Melanom in Deutschland und nachgewiesenermaßen auch schon vor SLND (in Berlin) lassen sich heute viele Lymphknotenmetastasen bereits in einem nicht-palpablen Zustand nachweisen [23 - 25]. In der Diagnostik derartiger Veränderungen hat sich die Feinnadelaspirationszytologie (FNAC) als günstig erwiesen. State of the art ist die diagnostische Entfernung palpatorisch oder sonographisch suspekter Befunde mit anschließender histologischer Aufarbeitung der Exzidate in Krebs-/Melanomzentren, was eine höhere Rate an unnötigen Operationen mit sich bringt. Benigne Befunde können durch Vorschaltung und Etablierung der FNAC in allen Zentren bei negativer FNAC in kürzeren Intervallen nachkontrolliert und so unnötige operative Interventionen vermieden werden. Die Methode in Kombination mit hochauflösendem Ultraschall weist eine hohe Sensitivität von 82 % bei einer Spezifität von 72 % und relativ hohe Vorhersagewerte (PPW von 54 % und NPW von 91 %) für die prä-SLND Diagnostik auf [26 - 27]. So kann ein Melanompatient nach Erstdiagnose vor der SLND sonographisch untersucht und bei suspektem Befund feinnadelpunktiert werden. Bei zytologisch positivem Ergebnis wird er sofort der CLND (therapeutischen Lymphknotendissektion) zugeführt bzw. bei negativem Befund erfolgt die reguläre SLND. Wenn ein Patient die SLND ablehnt, stellt die kombinierte Methode von Sonographie und FNAC mit engmaschigen (alle 3 Monate) Nachkontrollen eine sehr gute Alternative zur SLND dar.

Allerdings stellt die Feinnadelpunktion an den Untersucher erhöhte Anforderungen. Die Tumorzellnester bzw. suspekten Areale im Lymphknoten, die es mittels Sonographie zu detektieren gilt, sind nur wenige Millimeter groß und erfordern eine große Zielsicherheit bzw. Übung des Untersuchers (bei einer Sensitivität von präoperativem US und FNAC von 40 % bei pT1-Tumoren und von 79 % bei pT4-Tumoren) [28].

Eine Überlegung zur Verbesserung der Sensitivität der Methode ist es deshalb die Aussagekraft der geringen Punktatmengen (im Median ca. 2 µg RNA [29]) durch die Detektion von spezifischeren Markern für einen Tumorbefall des SLN zu erhöhen. Wissenschaftliche Studien wurden hierzu bereits durchgeführt. Die melanomspezifische Tyrosinkinase schien ein guter Marker zu sein, doch konnte die Gesamtsensitivität bei Kombination mit der Ultraschall-FNAC-Methode nicht weiter gesteigert werden, weshalb dieser Ansatz keinen weiteren Einzug in die klinische Praxis hielt [30].

Die Arbeitsgruppe von Torisu-Itakura erstellte mittels Sentinellymphknoten von Melanompatienten ein Zytokinprofil, welches vor allem in tumorbefallenen Lymphknoten vorherrscht. Weitere Studien, z.B. anhand von Feinnadelaspiraten könnten zukünftig eine bestimmte Patientenklientel vor unnötigen Operationen bewahren [31].

1.1.3 Derzeitige Therapieoptionen zusammengefasst

Patienten mit erhöhtem Metastasierungsrisiko soll im AJCC-Stadium IIB/C und IIIA-C „eine adjuvante Interferon Therapie angeboten werden“ (Evidenzlevel 1a) [25, 32 - 37]. Gleichzeitig gilt für diese Patienten auch, dass sie ausschließlich nachbeobachtet werden können, sofern zuvor eine adjuvante Therapie mit IFN-alpha diskutiert wurde. Eine adjuvante Hochdosistherapie mit Interferon-alpha-2b, welche bei einer geringen Prozentzahl von Patienten eine Verbesserung des rezidivfreien Überlebens bewirken kann, wird also mit den Patienten diskutiert und angeboten [38 Garbe 2005]. International ist diese Therapie umstritten, da sich erst in Metaanalysen aller Studien ein geringer (aber statistisch signifikanter) Vorteil in Bezug auf das Gesamtüberleben zusätzlich zum bereits bekannten, signifikanten Einfluss auf das rezidivfreie Überleben darstellte [34, 39 - 40]. Bei Fernmetastasierung existieren zahlreiche konventionelle Monotherapien z.B. mit Dacarbazin (DTIC) 850 - 1000 mg/m² pro Zyklus (alle 21 – 28 Tage), Fotemustin, Vindesin [41] und Polychemotherapien z.B. Cis-/Carboplatin, Gemcitabin/Treosulfan und die neuen, modernen Therapeutika wie Vemurafenib für Patienten mit Nachweis einer BRAF-Mutation oder Ipilimumab als second line-Therapeutikum bei langsamer Progression. Bis zur Einführung von Vemurafenib und Ipilimumab waren weder Chemo- noch Chemoimmun- oder Vakzinetherapien zur Behandlung von Hochrisikopatienten (ab Stadium III) wirklich erfolgreich und wiesen zum Teil sehr toxische Nebenwirkungsprofile auf. Etablierung weiterer, neuer Therapien durch Einschluss einer größtmöglichen Zahl von Patienten in Studien sind stets und weiterhin Gegenstand der Forschung [42 - 45]. Die Schwierigkeit besteht darin, die Immunreaktionen des Patienten, auf ein therapeutisches Agens hin, zu monitorieren. Die Etablierung von sensitiven und spezifischen diagnostischen Methoden zur Erkennung von Metastasen und auch zur Prognoseeinschätzung sind Gegenstand weiterer Forschung. Bisher zeigte sich in dieser Hinsicht noch kein geeigneter Marker, der eine hohe Vorhersagekraft besitzt, den Befall des Wächterlymphknotens nachzuweisen [46].

1.2 Immunologie des Melanoms

1.2.1 Tumorabwehrmechanismen

Tumorzellen sind körpereigene Zellen, die aus verschiedenen Gründen unkontrolliert wachsen. Jede Zelle des menschlichen Organismus präsentiert auf ihrer Zelloberfläche mittels MHC-I-Proteinen (auch als HLA-Moleküle bezeichnet) spezifische Antigene. Während der Ontogenese (Entwicklungsphase des Organismus) erfolgt neben der Reifung eine Selektion der T-Zellen im Thymus. Diese Selektion ist jedoch nicht vollständig, so dass T-Zellen neben körperfremden auch körpereigene Antigene erkennen können.

Für das Melanom konnten spezifische „Tumor-assoziierte“ Antigene (TAA) im Blut, Tumor- und Lymphknotengewebe nachgewiesen werden [2]. Bei vielen Tumoren ist bekannt, dass sich im Tumorgebiet sogenannte TILs (tumor-infiltrierende Lymphozyten) ansammeln und mit einer verbesserten klinischen Prognose des „Krebs-“Patienten einhergehen [47- 48]. Zu dieser Zellgruppe zählen v.a. spezifische zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs, CD8+), die das TAA über deren T-Zellrezeptoren erkennen und die Apoptose bzw. eine Lyse der Melanomzelle induzieren [49 - 50]. Dennoch ist die Tumorabwehr meist insuffizient, wofür so genannte „Escapemechanismen“ der Tumorzellen verantwortlich gemacht werden, mittels derer sie der Abwehr erfolgreich entgehen und zur Erfolglosigkeit zahlreicher Therapien beitragen [50 - 51].

Die Präsentation der TAA scheint unterdrückt, z.B. durch Veränderungen im proteasomalen System, Punktmutationen im Epitop, Defekte in den Komponenten der Antigenprozessierungsmaschinerie, Defekte im Peptidtransporter (TAP) oder eine Beta-2-Mikroglobulin-Mutation [52]. Des Weiteren sind die präsentierten Antigene (TAA) meist körpereigen und TAA-spezifische T-Zellen sind daher oft durch die sogenannte periphere Toleranz anerg [50, 53]. Die Arbeitsgruppe um Benjamin Negin entdeckte Ende 2007 mittels FACS (fluorescence activated cell sorting, Durchflusszytometrie) aus Lymphknotenmaterial von Melanompatienten, dass ein zunehmendes Tumorwachstum mit einer Herabregulierung bzw. einem vollständigen Verlust der TCR ζ -Kette einhergeht. Die TCR ζ -Kette stellt eine Untereinheit des T-Zellrezeptors dar, der für die Zellinteraktion zwischen antigenpräsentierenden Zellen (APCs) und T-Lymphozyten bedeutsam ist [54]. Ebenfalls eine große Rolle für eine verminderte Tumorabwehr spielen sogenannte regulatorische Zellen. Hierbei sind vor allem die regulatorischen T-Zellen (Tregs) für die Aufrechterhaltung der Toleranz

Einleitung

gegenüber körpereigenen Zellen verantwortlich. Ein Fehlen von Tregs führt zu verstärkter Autoimmunität [55].

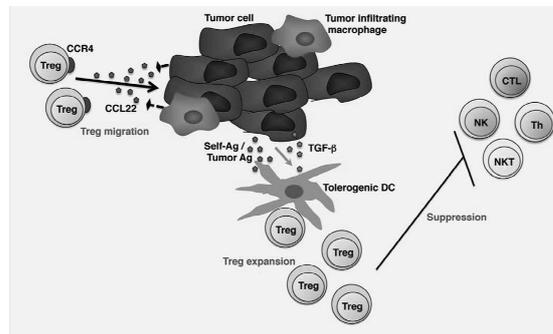


Abb. 6 modifiziert nach Nishikawa et al. 2010 Seite 761 [56]: Treg supprimieren NK (natürliche Killerzellen), NKT (NK-T-Zellen), Th (CD4+T-Helferzellen) und CTL-Zellen (CD8+zytotoxische T-Zellen) im rechten Bildrand. Vorher werden die Tregs vermittelt durch den CCR4-CCL22-Kontakt mit den Tumorzellen und einer TGF-beta-Ausschüttung in der Bildmitte zum Proliferieren gebracht und expandieren ins Tumorgebiet.

Über die Bindung von Chemokin CCL2 an den CCR-4-Rezeptor werden Tregs aktiviert und expandieren sowohl ins Tumorgewebe als auch in die drainierenden Lymphknoten [56 - 57], was vereinfacht auf Abbildung 6 dargestellt ist. Durch Ausschüttung von suppressorischen Botenstoffen (TGF-beta, IL-10) führen sie zu einer verminderten Aktivität und Proliferation von tumorabwehrenden Zellen (TILs, CTLs).

Es wurde eine erhöhte Anzahl bzw. Frequenz von Tregs und anderen regulatorischen Zellen z.B. Monozyten im Blut und Tumorgewebe nachgewiesen und für diese eine Korrelation mit einer schlechteren Prognose des Betroffenen diverser Tumorentitäten nachgewiesen (z.B. Ovarialkarzinom, Magenkarzinom, Mammakarzinom u.a.) [63 - 68].

Es scheint daher sinnvoll, Antitumorthérapien auf eine Verminderung der Tregs hin auszurichten. Einige Studien konnten bereits erfolgreich zeigen, dass Antikörper gegen Tregs fähig sind die Antitumoraktivität zu erhöhen [50, 56]. Beim fortgeschrittenen Melanom werden zur Zeit unterschiedliche therapeutische Ansätze verfolgt. Bei der Immuntherapie zeigt die Blockade von CTLA-4 (Yervoy® - Ipilimumab), das die Inhibition aktivierter T-Zellen vermittelt, beeindruckende Erfolge; die potentiell sehr toxischen Nebenwirkungen dieser Therapie müssen allerdings sorgfältig überwacht werden [43, 69]. Ebenso existieren Antikörper gegen CD4+CD25high-Tregs (ONTAK® - Denileukin Diftitox-AK), die durch eine Blockade von CD25 die Treg-Funktion behindern und die Tumorabwehr befördern sollen [70].

1.2.2 Identifizierung von regulatorischen T-Zellen

Bisherige Studien zu Tregs beim Melanom untersuchten meist PBMCs (periphere mononukleäre Blutzellen) von Stadium-IV-Patienten oder führten anhand von Gewebe immunhistochemische Färbungen durch [67, 73]. Eine Untersuchung in Abhängigkeit des SLN-Status sowie früher Melanomstadien und die Einbeziehung des klinischen Verlaufes ist nicht erfolgt.

Derzeit existieren verschiedene Nachweismöglichkeiten für die Tregs, entweder als Kombination der Oberflächenmarker CD25^{high} (IL-2-Rezeptor Alpha-Kette) und CD127^{low} (herunterregulierter IL-7-Rezeptor – [68, 74, 75] oder über den intrazellulären Marker FoxP3. Weitere Marker sind CTLA-4, LAG-3, GITR (glucocorticoid-induced TNF-receptor) - diese sind allerdings nicht streng Treg-spezifisch [55].

FoxP3 ist ein Transkriptionsfaktor, der in regulatorischen T-Zellen exprimiert wird und für die Entwicklung und Funktion bedeutsam ist, z.B. für die Expression von CD25, GITR und CTLA-4. Jedoch wird FoxP3 nicht nur von „natürlichen“ Tregs exprimiert, sondern auch von stimulierten und konventionellen T-Zellen [56, 76].

Die Arbeitsgruppe um Sven Olek und Udo Baron (Firma Epiontis, Berlin, Germany) haben eine epigenetische Modifikation entdeckt, die die Unterscheidung von Tregs und konventionellen T-Zellen erlaubt. In „natürlichen“ Tregs ist der Genlocus für FoxP3 vollständig demethyliert und deshalb ein stabiles Merkmal im Gegensatz zu aktivierten T-Zellen. In einem nichtcodierenden Abschnitt „TSDR-Region“ des Gens im FoxP3-Genlocus ab Exon 1 existieren CpG-Motive (Cytosinphosphat-Guanin), die komplett demethyliert sind sowie veränderte acetylierte Histone [77, 79 - 81]. Die spezifische quantitative real-time PCR auf demethylierte FoxP3⁺Zellen erlaubt präzisere Aussagen über den tatsächlichen Gehalt an regulatorischen T-Zellen, da andere transient FoxP3 exprimierende, aktivierte Zellen bei dieser Methode nicht miterfasst werden. Die Analyse von Tregs, spezifischer der demethylierten FoxP3-DNA-Region (TSDR) auf Chromosom 11, benötigt nur wenige µl an Material (siehe Abbildung 7).

Einleitung

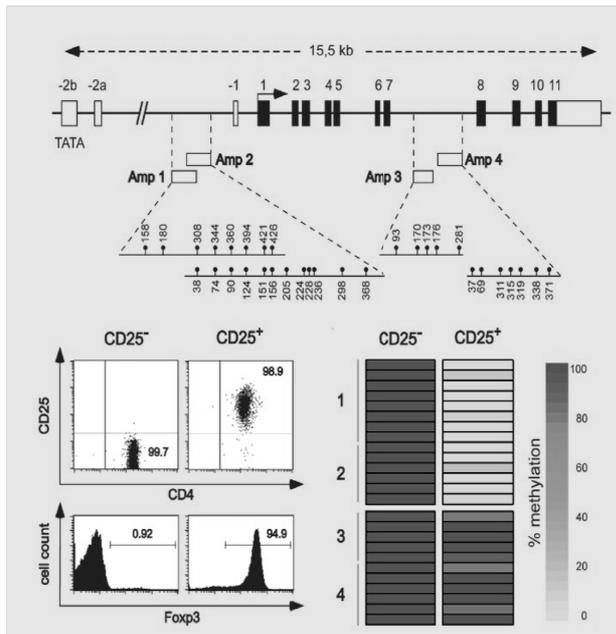


Abb.7 modifiziert nach Huehn et al. 2008

[81]: Epigenetische Analyse des *foXP3*-Gens.

A. Das *foXP3*-Gen liegt auf dem Abschnitt p11.2 des X-Chromosoms. Das Schema zeigt den *foXP3*-Lokus einschließlich der Exon/Intron-Struktur. Dabei sind die Regionen hervorgehoben, die für die DNA-Methylierungsanalyse ausgewählt wurden (Amp1/2). B. FACS-Analyse von naiven (CD25⁻FOXP3⁻) und regulatorischen (CD25⁺FOXP3⁺) CD4⁺-Lymphozyten. C. Methylierungsanalyse der entsprechenden Zellfraktionen aus B (1-4 = Amp1-4), rechts Farbmarkierung Blau (100 %) –Gelb (0 %-Methylierung)

In dieser Arbeit werden die regulatorischen T-Zellen in den durchflusszytometrischen Messungen charakterisiert als CD25^{high}CD127^{low}FoxP3⁺, CD25^{high}CD127^{low}, FoxP3⁺ und CD25^{high}FoxP3⁺ (der CD4⁺-Zellen). Diese Darstellungen wurden bis dato (Beginn der Materialakquise 2008) auch in den einschlägigen Artikeln verwendet und dienen der besseren Vergleichbarkeit der Daten [43, 48, 63, 66, 67, 78, 94, 100, 103].

1.2.3 Regulatorische Monozyten

Bei Melanomstadium-IV-Patienten zeigten L.Rivoltini et al., dass diese im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden eine erhöhte Anzahl/Frequenz von CD14⁺HLA-DR^{low}-Monozyten aufweisen. Es ist beschrieben, dass dieser Zellsubtyp von myeloischen Suppressorzellen ebenfalls im Tumorgebiet akkumuliert und Antitumorprozesse durch T-Effektorzellen inhibiert (z.B. durch die Ausschüttung von Arginase-Metaboliten, TGF- β , IL-10, iNOS, NO, ROS, Prostaglandin E2) [71]. Diaz-Montero et al zeigten vor allem bei Brustkrebspatientinnen, dass zirkulierende myeloische Suppressorzellen (MDSCs), charakterisiert als Lin^{-/low}HLA-DR⁻CD33⁺CD11b⁺, im Vergleich zu Gesunden in erhöhter Anzahl bzw. Frequenz vorkommen (2,85 % vs. 1,26 %, p<0,0001) und mit dem Tumorstadium korrelieren [72].

1.3 Ziel der Arbeit (Hypothesen)

Ziel dieser Dissertation ist es, die prognostische Bedeutung von regulatorischen T-Zellen unter Einbeziehung des Wächterlymphknotenbefalls zu untersuchen. Des Weiteren sollen die Bedeutung von regulatorischen Monozyten untersucht werden.

1. Anzahl der regulatorischen T-Zellen: Je höher das Tumorstadium von Melanompatienten (nach AJCC 2009), desto höher der Anteil der regulatorischen T-Zellen (Tregs) bzw. die Anzahl der Tregs steigt in Abhängigkeit von der Metastasierung (lymphogen – Befall des Wächterlymphknotens, hämatogen – systemische Metastasierung).

Hierzu erfolgen Analysen von Blutproben (PBMC) von Gesunden und Melanompatienten unterteilt nach Melanomstadium bzw. Wächterlymphknotenstatus und Geschlecht mittels PCR und Durchflusszytometrie.

Ebenfalls wird Lymphknotenmaterial mittels PCR untersucht nach folgenden Aspekten:

a) Histologisch positive SLNs weisen eine erhöhte Expression von FoxP3-DNA auf im Vergleich zu negativen SLNs.

b) Die erhöhte Expression von FoxP3-DNA (als Marker der regulatorischen T-Zellen) in SLNs mit Tumorbefall durch ein kutanes Melanom ist mit einem erhöhten Rezidivrisiko assoziiert.

c) Melanompatienten mit einem befallenen SLN, aber geringerer FoxP3-DNA-Expression haben eine günstigere Langzeitprognose (FoxP3 PCR von SLN+ retrospektiv).

2. Melanomart: Die Anzahl der regulatorischen T-Zellen unterscheidet sich bei den unterschiedlichen Melanomarten (SSM, NM, ALM, LMM). Hierzu: Vergleich der Melanompatienten unterteilt nach ihrem Primarius - mittels Durchflusszytometrie und PCR von Blutproben (PBMC).

3. Differenzierung der regulatorischen T-Zellen: Melanom-Stadium-IV-Patienten haben mehr Memory-Treg-Zellen (Treg-Gedächtniszellen) als Gesunde – Durchflusszytometrie von Blutproben (PBMC).

4. Regulatorische Monozyten: Melanom-Stadium-IV-Patienten haben eine erhöhte Anzahl von regulatorischen Monozyten des Subtyps CD14+HLA-DR^{low} als Gesunde – Untersuchung von Blutproben (PBMC) mittels Durchflusszytometrie.

2 Material und Methoden

2.1 Dermatologisch-klinischer Anteil - Patientenakquise – Materialgewinnung

2.1.1 Blut

In einem Zeitraum von ca. 4-6 Monaten wurde in der Klinik für Dermatologie der Charité prospektiv Material für die immunologische Untersuchung gesammelt.

Einschlusskriterien Patienten:

- Histologische Diagnose malignes Melanom der Haut
- Tumordicke nach Breslow >1 mm bzw. ergänzende Kriterien für SLND erfüllt
- Alter >18 Jahre, männlich und weiblich
- ECOG Performance Status 0

Für ein gezieltes Immunmonitoring auf regulatorische T-Zellen (Tregs) wurde den gesunden Kontrollprobanden ohne Melanom bzw. den Melanompatienten kurz nach Erstdiagnose vor SLND einmalig 10 – 25 ml Blut zur PBMC-Präparation entnommen. Die Blutentnahmen erfolgten zum großen Teil mit der Routineblutentnahme bei stationärer Aufnahme (nicht nüchtern) vor geplanter Operation bzw. Chemotherapie, um den Patienten unnötige Nadelstiche zu ersparen.

Von allen Personen ist das schriftliche Einverständnis zur Blutentnahme, Verarbeitung und Untersuchung sowie der Speicherung ihrer klinischen Daten in einer Datenbank eingeholt worden. Die Untersuchung wurde gemäß der ethischen Standards der Helsinki-Deklaration (1964) durchgeführt. Im Vorfeld erfolgte das schriftliche Einverständnis der zuständigen Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin. Die klinischen Daten wurden in eine von Prof. Dr. med. C. Voit bestehende Excel-Datenbank (Berlin-Rotterdam) aufgenommen.

Insgesamt wurden 79 Patienten eingeschlossen, hiervon 29 Stadium I, 15 Stadium II, 14 Stadium III und 20 Stadium IV, 1 unbekanntes Stadium.

Kontrollgruppe:

11 Gesunde Probanden ohne Malignes Melanom; >18Jahre; ECOG 0, beide Geschlechter

Identifizierung des Wächterlymphknotenbefalls

Routineablauf (in der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin) nach Diagnose malignes Melanom:

Patienten mit meist auswärtiger Diagnose malignes Melanom (MM) der Haut und entsprechender Tumordicke >1mm bzw. <1mm mit Regression erhielten ein Staging auf Metastasen mittels Röntgenthorax, Abdomensonographie, ggf. Ganzkörper-CT und nach erfolgter Lymphabstromszintigraphie (LAS) eine Lymphknotenultraschalluntersuchung vor geplanter Sentinellymphknotenentfernung (SLNB, SLND) und Nachexzision mit Sicherheitsabstand gemäß gültiger Leitlinie [13, 25, 27].

In Abbildung 8 ist der Routineablauf in der dermatologischen Klinik der Charité zur Zeit der Materialsammlung (2008 - 2009) in einem Flowchartschema dargestellt. Entsprechend der Lokalisation des Primärtumors und der LAS-Markierungen wird der Patient sonographisch mit einem Linearscanner bei einer Frequenz von 7,5 - 14 MHz im B-Mode und mit Power Doppler nach den Leitlinien der DEGUM untersucht (Gerät: MyLab70, Esaote, Italien).

Sitz des Primärtumors	zu untersuchende Region mit Sonographie
Kopf und Gesicht	Halsweichteile, supra- und infraclavikulär beidseits sowie Primärtumorregion und intransit-Strecke
Stamm	Axilla bds., supra-/ infraclavikulär und Leisten beidseits sowie die Primärtumorregion und intransit-Strecke
Arme oder Hand	Axilla bds., supra-/ infraclavikulär sowie Primärtumorregion und die restliche intransit-Strecke
Beine oder Fuß	Beide Leisten, proximaler Oberschenkel der betroffenen Seite, sowie die restliche intransit-Strecke inkl. Primärtumorregion

Tab.5: Sonographisch zu untersuchende Regionen nach Lokalisation des Primarius modifiziert nach den Leitlinien der DEGUM für cutane Sonographie [83]

Therapieschema nach Exzision des Melanoms und Nachexzision (Sicherheitsabstand)

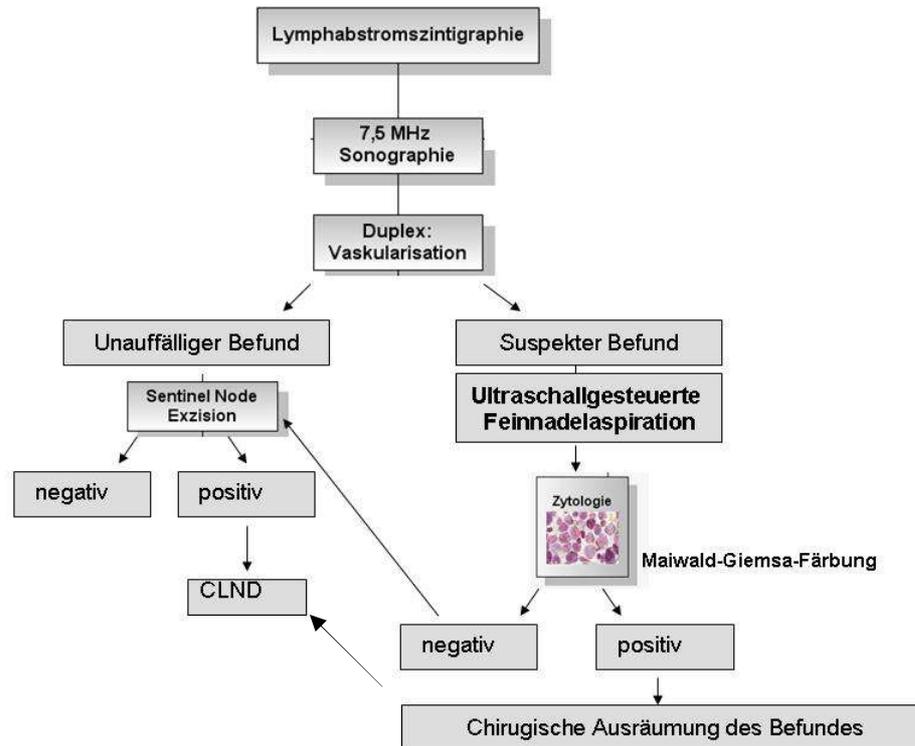


Abb.8: Routineablauf der Diagnostik und Therapie in der Hautklinik der Charité, Patienten nach Erstdiagnose cutanes Melanom werden nach der erfolgten Markierung des Lymphabflussgebietes des primären Tumors sonographiert. Bei unauffälligem Befund (linker Verlauf) erfolgt die Sentinelnode-Entfernung, bei Tumorbefall die CLND; bei auffälligem Sonographiebefund (rechter Verlauf) wird eine Feinnadelpunktion durchgeführt, bei positiver Zytologie wird der Patient direkt der CLND zugeführt.

Die Klassifikation bzw. Stadieneinteilung der Melanompatienten erfolgte endgültig nach schriftlichem histopathologischen Befund der Sentinellymphknotenentfernung gemäß der Nomenklatur des AJCC von 2009 [17]. Im Falle einer Herabstufung der Tumordicke nach Breslow oder einer benignen Histologie des Primarius wurden die Patienten aus dem Studienkollektiv entfernt, z.B. bei Diagnose Basaliom oder dysplastischer Naevus.

Zur Komplettierung des Immunmonitorings von Melanompatienten wurden zunächst eingefrorene PBMCs von 9 bekannten Melanom-Stadium-IV-Patienten zur FACS- und PCR-Analyse verwendet, die seit 1998 im Rahmen einer hämatonkologischen Studie von Prof. Dr. med. C. Scheibenbogen gesammelt wurden. Die qualitative Überprüfung erforderte die Aquisition von 10 neuen Melanom-Stadium-IV-Patienten (2008-2009), die stationär vor Beginn des Chemotherapiezyklusses ihr Einverständnis zur Blutentnahme gaben.

2.1.2 Lymphknotenmaterial

Die Analyse von Lymphknotenmaterial erfolgte mittels archiviertem Material der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie.

Der Nachweis von Tregs mittels PCR anhand von Lymphknotenmaterial der Melanompatienten erfolgte in mehreren Schritten.

Für die Machbarkeit des FoxP3-Assays an paraffineingebetteten Lymphknoten wurden Proben aus dem histologischen Archiv der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie (Charité – Universitätsmedizin Berlin) von bekannten Melanompatienten mit langjährigem Follow-Up und vielen entnommenen Lymphknoten getestet.

Nach bestätigter Machbarkeit wurden Paraffinschnitte (à 10 µm Dicke) von Lymphknoten nur weiblicher Melanompatienten für einen interindividuellen Vergleich angefertigt, da der PCR-Assay x-linked ist, d.h. die untersuchten Genloci sich auf dem X-Chromosom befinden. Hierbei handelte es sich um zwölf negative und elf vom Melanom befallene Wächterlymphknoten, die auf FoxP3 mittels PCR von der Berliner Firma Epiontis analysiert wurden.

Die Erlaubnis zur Verwendung des archivierten Lymphknotenmaterials und der Patientendaten wurde vom Klinikdirektor der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie Herrn Prof. Dr. med. Wolfram Sterry 2007 eingeholt.

Zuschneiden von Lymphknotenmaterial in Paraffin

Material:

- Mikrotom Finesse 325
- Thermoshandon mit Messern (SEC 35 low profile blades; Richard Allan Scientific)
- Desinfektionsmittel, Papiertücher und Pinsel zur Säuberung

Ablauf: Pro Patient wurden Paraffinblöckchen der Wächterlymphknoten zugeschnitten. Pro Blöckchen je 8 Schnitte à 10 µm (± 2 µm) in ein Eppendorfgefäß/-tube überführt.

2.2 Immunologischer Anteil – Materialaufarbeitung und Analyse

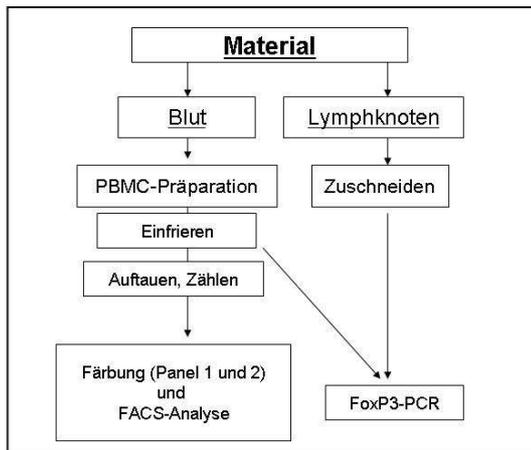


Abb.9: Schema der Materialaufarbeitung

2.2.1 Material

Puffer und Lösungen, die in den verwendeten Kits enthalten sind, sind nicht extra aufgeführt.

Medien, Lösungen, Reagenzien

RPMI 1640-Medium
 Leibovitz-Medium
 DMEM
 L-15-Medium
 Eagle-MEM
 FCS
 L-Glutamin (200 mM)
 Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)
 DMSO
 EDTA
 Trypanblaulösung (0,4 %)
 DMSO
 FCS
 L-Glutamin
 Tetracyclin
 Ficoll-Hypaque 1.077
 Fix/Perm Puffer
 Beads
 Permeabilisationspuffer
 PBS

Hersteller

Biochrom, Berlin
 Merck, Darmstadt
 Sigma, Deisenhofen
 Gibco BRL, Karlsruhe
 Merck, Darmstadt
 Biochrom, Berlin
 Biochrom, Berlin
 Sigma-Aldrich, München
 Biochrom, Berlin
 eBioscience, San Diego, USA
 BD - Becton Dickinson, Heidelberg
 BD - Becton Dickinson, Heidelberg
 Biochrom, Berlin

Einfriermedium

Bestehend aus 18 ml AB-Serum (bei -20 °C eingefroren), 27 ml ISCOVES-Medium ohne Zusätze und 5 ml DMSO; Enthält: 50 % Kulturmedium (RPMI) – Nährstoffe, Aminosäuren, Salze etc.; 40 % FCS – fetales Kälberserum; 10 % DMSO – Dimethylsulfoxid

Auftaumedium

Bestehend aus 500 ml RPMI-Medium, 5 ml Penicillin und Streptomycin (10000 U/ml), 10 ml L-Glutamin und 18 ml AB-Serum

Kulturmedium (für T-Zelllinien)

Bestehend aus 500 ml RPMI-Medium, 5 ml Penicillin und Streptomycin (10000 U/ml), 10 ml L-Glutamin und 50 ml FCS (fetales Kälberserum)

Verwendete Geräte

Materialien

Brutschrank Automatic CO2 Inkubator
Durchflusszytometer FACScanto II und LSR II
Kühlgeräte -4 °C, -20 °C
Kühlgeräte -80 °C
Mikroskop
Sterile Werkbank
Tischzentrifuge Eppendorf 5415C
Zentrifuge Eppendorf 5804R
Zentrifuge Varifuge 3.2RS
Eismaschine AF-10
Gefrierschrank -20 °C
GS-158 Zentrifuge
Kühlzentrifuge 54178
Kühlzentrifuge Avanti J-25
Kühlzentrifuge J2-HS
Kühlzentrifuge RC24 Sorvall
Netzgerät DC PS3000
Pipetten
Pipettus-Akku
Stickstofftank
Ultrazentrifuge L-70
Ultrazentrifuge Ultra Pro 80 Sorvall
Vortexer VF2
Wasserbad TWB 12
Wasserbad U3
Zellkultur-Inkubator BB4220CV

Hersteller

Friedrich S. Bartolomey, Alfter
BD, Biosciences, Heidelberg
Liebherr, Ochsenhausen
Forma Scientific, Marietta, USA
Zeiss, Jena
Erlab, Köln
Eppendorf, Hamburg
Eppendorf, Hamburg
Heraeus Sepatech, Osterode
Scotsman, Mailand
Liebherr, Ochsenhausen
Beckman Coulter, Krefeld
Eppendorf, Hamburg
Beckman Coulter, Krefeld
Beckman Coulter, Krefeld
Dupont, Bad Homburg
Hoefer, Taiskirchen
Gilson, Limburg
Hirschmann, Eberstadt
Taylor-Wharton, Hollywood, USA
Beckman Coulter, Krefeld
Dupont, Bad Homburg
Janke&Kunkel, Staufen
Julabo, Allentown, USA
Julabo, Allentown, USA
Heraeus, Hanau

Antikörper

Flebogamma humanes IgG
MausIgG CD3 PerCP
MausIgG CD4 Pacific Blue
MausIgG CD25 PE
MausIgG CD127 FITC
MausIgG Fox-P3 Alexa647 (613-APC)
MausIgG HLA-DR PerCP
MausIgG CD45RA-ECD (Texasred-PE)
MausIgG CD8-Pacific Orange
MausIgG CD4 PE-Cy7
MausIgG CD3 Pacific Blue
MausIgG CD14 APC

eBioscience, San Diego, USA
BD, Biosciences, Heidelberg
BD, Biosciences, Heidelberg
BD, Biosciences, Heidelberg
eBioscience, San Diego, USA
BD, Pharmingen, Heidelberg
BD, Biosciences, Heidelberg
Beckmann Coulter, Krefeld
Caltag, Hamburg
BD, Biosciences, Heidelberg
BD, Biosciences, Heidelberg
BD, Biosciences, USA

Kits

LiveDead fixable Dead Cell stain Kit

Invitrogen, Darmstadt

Hilfs- und Verbrauchsmaterialien

Materialien

Zellkultur-Plastikwaren, steril
Kryoröhrchen
Sterilfilter 4,5; 0,2 µm

Ultrazentrifugenröhrchen

Hersteller

Falcon, BD Biosciences, Heidelberg
Nunc, Roskilde, DK
Whatmann Schleicher & Schuell,
Dassel
Beckman Coulter, Krefeld

Blutentnahmebesteck (Vacutainersystem – EDTA-Röhrchen, Heparinröhrchen, Serumröhrchen, Butterflypunktionskanüle, Adapter, Stauschlauch, Desinfektionsspray, Pflaster, Tupfer, Handschuhe)

Einfrierboxen
Einfrierröhrchen
Falcontubes (15 ml und 50 ml)
Glasgefäße diverse
Neubauer Zählkammer
Pipetten
Pipettenspitzen

Nunc, Roskilde, DK
Nunc, Roskilde, DK
Falcon, Becton Dickenson, Heidelberg
Schott Duran, Mainz
Sigma, Deisenhofen
Eppendorf, Hamburg
Brand, Wertheim

Verwendete Software

Software

FlowJo Version 8.8.3 - 8.8.7
FACS-diva™ Version 3.0
EndNote 8.0
Microsoft Excel
Microsoft Power Point
Microsoft Word
SPSS 17.0 für Windows
Graphpad Prism Version 5.01

Hersteller

Tree Star, Ashland, OR, USA
BD, Biosciences, USA
Thomson-Reuters, Carlsbad, USA
Microsoft, Redmond, USA
Microsoft, Redmond, USA
Microsoft, Redmond, USA
SPSS, Chicago, USA
GraphPad Software Inc., San Diego, USA

2.2.2 Methoden

Sämtliche Arbeitsschritte (Zellpräparation bis Auftauen) erfolgten unter sterilen Bedingungen.

2.2.2.1 Zellpräparation (PBMC) [84]

Material:

Abzug; PBS; Phicoll – Biocoll Separations Solution; Pipetten – pro Blutprobe ca. 5 x 5 ml-Pipette, 2 x 20 ml Pipetten und pro Blutprobe (buffycoat) eine Pasteurpipette; mehrere Ständer; Handschuhe; Abfallkorb; 50 ml Falcon-Tubes; Eppendorfgefäße 2ml; Eis; Einfriermedium; Zentrifuge

Ablauf:

Die abgenommenen Blutproben wurden in jeweils ein beschriftetes 50 ml Tube (max. 2 Röhrchen a 10 ml in 1 Tube) überführt und mit PBS bis auf die 35 ml Markierung aufgefüllt, was einer 1:2 Verdünnung entsprach. Jede verdünnte Blutprobe wurde auf 15 ml Phicoll mittels Pipette langsam tropfend aufgetragen und bei 1200 G (Bremse auf Null) für 20 Minuten zentrifugiert. Das überstehende Plasma wurde verworfen und die sich darunter befindende Schicht aus PBMCs in neue Tubes überführt. Der Rest aus Phicoll und Erythrozyten am Boden wurde entsorgt. In die PBMC-Tubes wurde zum Waschen PBS bis insgesamt 50 ml aufgefüllt und diese bei 300 G für 10 Min. zentrifugiert (Bremse auf Stärke 5). Währenddessen taute das Einfriermedium auf. Nach erfolgter Zentrifugation wurde der PBS-Waschüberstand dekantiert und das Zellpellet aufgeklopft, mit ca. 4 ml Einfriermedium aufgenommen, gemischt und jeweils 1 ml davon in ein beschriftetes Eppendorfgefäß gefüllt.

2.2.2.2 Einfrieren von Zellen

Das Einfriermedium bestand aus 50 % Kulturmedium ohne Zusätze, 10 % DMSO und 40 % FCS. Die Einfrierröhrchen wurden nach Zugabe der Zellen umgehend in eine mit Isopropanol gefüllte Einfrierbox gegeben und 24 Stunden später in den Stickstofftank überführt (-80 °C).

2.2.2.3 Auftauen von Zellen

Material:

Falcon-Röhrchen (50 ml) jeweils eins pro Probe (1 ml Tube); Auftaumedium (RPMI) 1640, 4 % AB-Serum, 2 % L-Glutamin, 1 % PenStrep; Zentrifuge; Kulturmedium basal ISCOVE-Medium (1+), w 15 mg/l Phenol-red, w 3.024 g/l NaHCO₃, L-Glutamin 2 %, LE (low Endotoxin), 10 % AB-Serum bei 2 – 8 °C; Eppendorf-Pipette 1 ml plus Pipettenspitzen; Glas-Pipette 5 ml und 25 ml; BD-Röhrchen mit Deckel; Zentrifuge

Ablauf:

Beschriftete Falcon-Röhrchen wurden mit 20 ml Auftaumedium befüllt. Die tiefgefrorenen Zellen (1 ml Probe bestehend aus PBMC und Einfriermedium) wurden in vorgewärmtes Medium aufgenommen und gewaschen, um das dem Einfriermedium zugesetzte DMSO zu entfernen und dann resuspendiert.

Die Zellen wurden dann bei 20 – 24 °C, 1300 – 1400 rpm für 10 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet mit jeweils 3 ml Kulturmedium resuspendiert (max. 3mal) und in BD-Röhrchen überführt und bei 37°C im Brutschrank (über Nacht) gelagert.

2.2.2.4 Zellzählung

Material:

Pipetten; Mikroskop; Neubauer-Zählkammer (0,1 mm tief, 0,0025 mm²), Tryphanblau (PBS 1:2); Vortexer; BD-Röhrchen eins pro Probe; PBS; Zähl-Uhr

Ablauf:

Zur Zellzählung wurden die zuvor aufgetauten Proben aus dem Brutschrank entnommen, gevortext und jeweils 50 µl in ein Feld der Zählkammer pipettiert. Jede wurde mit 50 µl Tryphanblau versetzt. Der Farbstoff dringt in alle Zellen ein. Lebende Zellen können ihn aktiv wieder ausscheiden, während tote Zellen blau angefärbt bleiben. Die Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer unter Ausschluss der toten Zellen unter einem Mikroskop ausgezählt.

Es wurden mindestens 2 x 16 Felder betrachtet. Für die Berechnung der Zelldichte gilt: Anzahl der Zellen in 16 Feldern x Verdünnung x 10⁴ (Umrechnungsfaktor Zählkammer) = Anzahl Zellen pro ml.

Das berechnete Volumen pro Probe wurde in jeweils ein beschriftetes BD-Röhrchen pipettiert und gevortext.

2.2.2.5 Färbungen für die Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

2.2.2.5.1 Panel 1 Tregs - intrazelluläre FoxP3-Färbung:

Material:

Zentrifuge, BD-Röhrchen, Pipetten 1 µl – 1 ml und 25 ml Pipette mit Pipettierhilfe, PBS, Flebogamma, eBioscience Fix/Perm Puffer, Permeabilisation Puffer, Formalin
Antikörper: pro Probe (hier insgesamt 81 Proben)

- CD3-PerCP 10 µl
- CD4-Pacific Blue 3 µl
- CD25 PE 10 µl
- CD127 FITC 20 µl [74]
- Fox-P3- Alexa647 20 µl [85]

Ablauf:

Nach erfolgter Zellzählung wurden pro Patientenprobe 1 x 10⁶Zellen in jeweils ein BD-Tube pipettiert und mit PBS und Flebogamma (2 %) bei 1400 rpm und 4 °C für 10 Min. abzentrifugiert und der Überstand abgekippt. Für die extrazellulären Färbungen wurde ein Mastermix hergestellt (CD4, CD3, CD25, CD127) und auf jede Probe gegeben und diese dann für 15 Min. auf Eis dunkel inkubiert. Es erfolgte ein

Material und Methoden

erneuter Waschschrift in der Zentrifuge mit PBS und 2 % Flebogamma für 10 Min. (1400 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde abgekippt. Das Zellpellet wurde in 1 ml eBioscience Fix/Perm Puffer (1:4 mit Fix/Perm Diluent verd. = 1+3) resuspendiert und für 45 Min. auf Eis, dunkel inkubiert und danach einmal gewaschen mit PBS und 2 % Flebogamma, abzentrifugiert bei 1400 rpm, 4 °C für 10 Min. und der Überstand abgekippt und dann in gleicher Weise zweimal mit je 2ml Permeabilisation Puffer (1:10 in Aqua dest = 1+9) gewaschen und abzentrifugiert. Die Proben wurden mit je 20 µl FoxP3 Alexa647 AK versetzt und für 30 Min. auf Eis, dunkel inkubiert und erneut zweimal mit je 2 ml Permeabilisation Puffer (1:10 in Aqua dest) gewaschen und abzentrifugiert.

Zur Kompensation der Farbstoffe für die spätere Messung wurde in 6 BD-Röhrchen jeweils ein Tropfen beads (negativ und positiv) mit den jeweiligen µl der Antikörper versetzt sowie einer „unstained control“ und für 5 Min. auf Eis dunkel inkubiert und in PBS und 2 % Flebogamma resuspendiert sowie für 10 Min. abzentrifugiert (1400 rpm, 4 °C).

Alle Proben wurden dann in 1 % Formalin (200 µl) fixiert und für 5 Min. bei Raumtemperatur dunkel inkubiert.

2.2.2.5.2 Panel 2 - Extrazelluläre Färbung

Dieses Panel hat zum Ziel den Vergleich von PBMCs Gesunder mit MM-Stadium-IV-Patienten an Hand der Differenzierung von naiven Effektor- und Memory-T-Zellen (Tregs) mittels CD45RA und die Quantifizierung von CD14⁺HLA-DR^{low}-Monozyten basierend auf den Ergebnissen von Rivoltini et al. 2007 [71].

Material:

Zentrifuge, BD-Röhrchen, Pipetten 1 µl – 1 ml und 25 ml Pipette mit Pipettierhilfe, PBS, Flebogamma, Formalin 0,5 %, Live-Death-Kit

Antikörper pro Probe: (11x Gesunde und 20x Melanomstadium-4-Patienten)

- CD3 - Pacific blue 3 µl, CD4 – PE-Cy7 3 µl, CD25 PE 10 µl
- CD127 FITC 20 µl, CD14 APC 3 µl [71, 86 - 87]
- HLA-DR –PercP 20 µl [71, 86 - 88]
- CD45 RA- ECD 5 µl (Texasred-PE)
- CD8- Pacific-Orange 3 µl (nur für beads)

Ablauf:

Nach erfolgter Zellzählung wurden pro Patientenprobe 1×10^6 Zellen in jeweils ein BD-Tube pipettiert und mit PBS und Flebogamma (2 %) bei 1400 rpm und 4 °C für 10 Min. abzentrifugiert und der Überstand abgekippt.

Zu jeder Probe wurden 50 µl des Livedeathkits hinzugegeben, welches zuvor nach Anleitung des Herstellers in PBS, 2 % Flebogamma und DMSO verdünnt wurde. Dann erfolgten eine Inkubation auf Eis im Dunklen für 30 Min. und ein Waschschrift in PBS und Flebogamma (2 %) sowie das Abzentrifugieren bei 1400 rpm und 4 °C für 10 Min. Die Zellpellets wurden jeweils mit einem für die extrazellulären Färbungen hergestellten Mastermix (CD3 - Pacific blue 3 µl, CD4 – PE-Cy7 3 µl, CD25 PE 10 µl, CD127 FITC 20 µl, CD14 APC 3 µl, HLA-DR –PercP 20 µl, CD45 RA- ECD (Texasred-PE) 5 µl) versehen und für 15 Min. auf Eis dunkel inkubiert.

Zur Kompensation der Farbstoffe für die spätere Messung wurden in 6 BD-Röhrchen jeweils ein Tropfen beads (negativ und positiv), mit den jeweiligen µl der Antikörper versetzt (hier noch CD8-Pacific Orange) und einer „unstained control“ und für 5 Min. auf Eis dunkel inkubiert.

Alle Proben und Beads wurden dann in PBS und 2 % Flebogamma resuspendiert sowie für 10 Min. abzentrifugiert (1400 rpm, 4 °C) und in 0,5 % Formalin (200 µl) fixiert und für 5 Min. bei Raumtemperatur dunkel inkubiert. Es erfolgte eine erneute Resuspension in PBS und 2 % Flebogamma sowie die Zentrifugation.

2.2.2.6 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die simultane Messung von Streulichteigenschaften und Fluoreszenzsignalen einer großen Anzahl einzelner Zellen. Die Messungen erfolgten an einem FACS-scan Durchflusszytometer, die graphische Darstellung und Analyse der Daten wurde mit der FlowJo-Software durchgeführt.

Die Zellen lagen in einer Einzelzellsuspension vor und wurden mittels Überdruck in eine Messküvette gesogen. Durch hydrodynamische Fokussierung wurden die Zellaggregate getrennt, so dass eine Zelle nach der anderen auf einen Laserstrahl traf. Dies führt zu zwei physikalischen Phänomenen: Lichtstreuung und Fluoreszenz, die über ein optisches und elektronisches System in elektrische Signale umgewandelt, anschließend digitalisiert und von einer Software analysiert und ausgewertet werden können. Zwei Richtungen der Lichtstreuung werden detektiert: Streuung in Vorwärtsrichtung (FSC) entlang des Laserstrahls, die Information über

Material und Methoden

die Größe der Zellen liefert, und Streuung im 90° Winkel (SSC) zum Laserstrahl, als Indikator für die Granularität und Oberflächeneigenschaften der Zellen.

Durch Einbringen von Fluoreszenzfarbstoffen in die Zellen (hier über fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide) kann Fluoreszenz und damit weitere Merkmale detektiert werden. Es wurden die oben aufgeführten Farbstoffe verwendet (siehe 2.2.2.5).

Die Anzahl der zu messenden Ereignisse wurde vor der Messung festgelegt. Für die Darstellung der Zellen wurde zunächst ein FSC/SSC Diagramm verwendet (Dot-Plot). Die erste Messung erfolgte mit einer Negativkontrolle, sie diente als Referenzpunkt. SSC und FSC wurden so ausgerichtet, dass die Zellen auf dem Diagramm erschienen. Dann wurde eine Region gesetzt, die die Zellen von Interesse umfasste (Lymphozyten und bei Panel 2 auch Monozyten). Die Sensitivität der Fluoreszenzkanäle wurde so eingestellt, dass die Negativkontrolle nahe dem Nullpunkt, aber noch auf der Skala erschien.

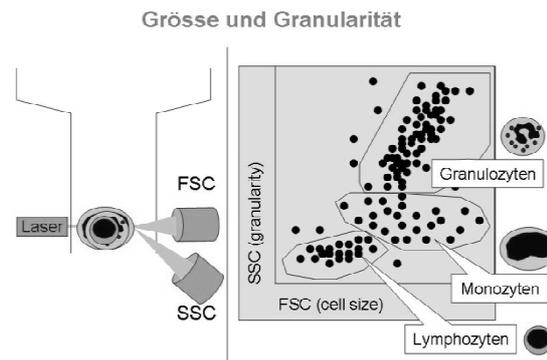


Abb.10: FSC – Vorwärtsstreuung, SSC – Seitwärtsstreuung; Die gefärbten Zellen gelangen im Durchflusszytometer an mehreren Lasern vorbei, ihr Streulicht wird von Filtern aufgefangen (links), in digitale Signale umgewandelt und mittels Software in Graphen aufgetragen (rechts). Anhand der Streueigenschaft kann man die Zellarten identifizieren.

Für die Analysen wurden 1×10^6 Zellen pro Patientenprobe gefärbt und für Panel 1 am FACS Canto II und Panel 2 am LSR II gemessen. Nachfolgend sind die Geräteeinstellungen aufgeführt. Es wurden mindestens 250.000 Ereignisse (events) gemessen.

2.2.2.6.1 Messen von Panel 1 am FACS Canto II



Abb.11: FACS CANTO II Gerät mit Durchflusszytometer links, Vortextmischer mittig und am rechten Bildrand PC mit Auswertungsprogramm

Geräteeinstellungen:

Voltages für Kompensation am FACS Canto II: Grundeinstellung

FSC	283 nm
SSC	417 nm
FITC (CD127)	368 nm
PE (CD25)	400 nm
PercP (CD3)	550 nm
Pacific blue (CD4)	354 nm
Alexa 647/ APC/Red1 (FoxP3)	534 nm

→ Einstellungen für unstained control und beads zur Kompensation

	6.1.2009	15.1.2009	26.3.2009
FSC	302 nm	302 nm	283 nm
SSC	417 nm	417 nm	380 nm
FITC (CD127)	351 nm	341 nm	368 nm
PE (CD25)	386 nm	377 nm	400 nm
PercP (CD3)	527 nm	498 nm	550 nm
Pacific blue (CD4)	329 nm	329 nm	308 nm
Alexa 647/ APC/Red1 (FoxP3)	501 nm	465 nm	489 nm
Threshold	5.000	5.000	5.000
Flowrate	high	high	high

→ für Proben:

Threshold	30.000
Flowrate	Medium, dann high
Events	250.000

2.2.2.6.2 Messen von Panel 2 am LSR II

Geräteeinstellungen:

Voltages für Kompensation am LSR II am 6.1.09:

	6.1.2009	25.3.2009
FSC	330 nm	330 nm
SSC	345 nm	345 nm
FITC (CD127)	534 nm	534 nm
PE (CD25)	530 nm	530 nm
PercP Cy5.5 (HLA-DR)	737 nm	737 nm
Pacific blue/violet 1 440/40 (CD3)	473 nm	412 nm
APC/Red1 (CD14)	620 nm	620 nm
ECD/Texasred-PE / Red613 (CD45RA)	626 nm	626 nm
PE-Cy7 (CD4)	671 nm	671 nm

Material und Methoden

Pacific-Orange/ violet 2 525/50 (Live-Death-Kit)	533 nm	489 nm
--	--------	--------

→ für unstained control und beads: 6.1.09

Threshold	5.000
Flowrate	high
Events	5.000

→ für 2 Testproben: 6.1.09

Threshold	5.000
Flowrate	high
Events	250.000

→ für 21 Proben: 8.1.09

Threshold	5000-12.000
Flowrate	High
Events	250.000-1.000.000

→ für 10 Proben: 25.3.09

Threshold	5000
Flowrate	High
Events	1.000.000

2.2.2.6.3 Gatingstrategien

Panel 1

Panel 1 wurde durchgeführt, um die Anzahl der Tregs bei Melanompatienten und Gesunden zu ermitteln. Folgende Populationen wurden als Tregs identifiziert:

CD4+/CD25highCD127low, CD4+/CD25highCD127lowFoxP3+,

CD4+/CD25highFoxP3+, CD4+/CD127lowFoxP3+, CD4+/FoxP3+.

Die Lymphozyten wurden entsprechend ihrer Vorwärts- und Seitwärtsstreuungseigenschaften sortiert („gated“) und mittels ihrer CD3- und CD4-Expression identifiziert, siehe Abb.12. Die CD3+CD4+-T-Zellen wurden nach CD25 und CD127 sowie FoxP3-Expression gated (siehe Abbildung 13) und die Populationen mit dem FlowJo-Programm quantifiziert.

Material und Methoden

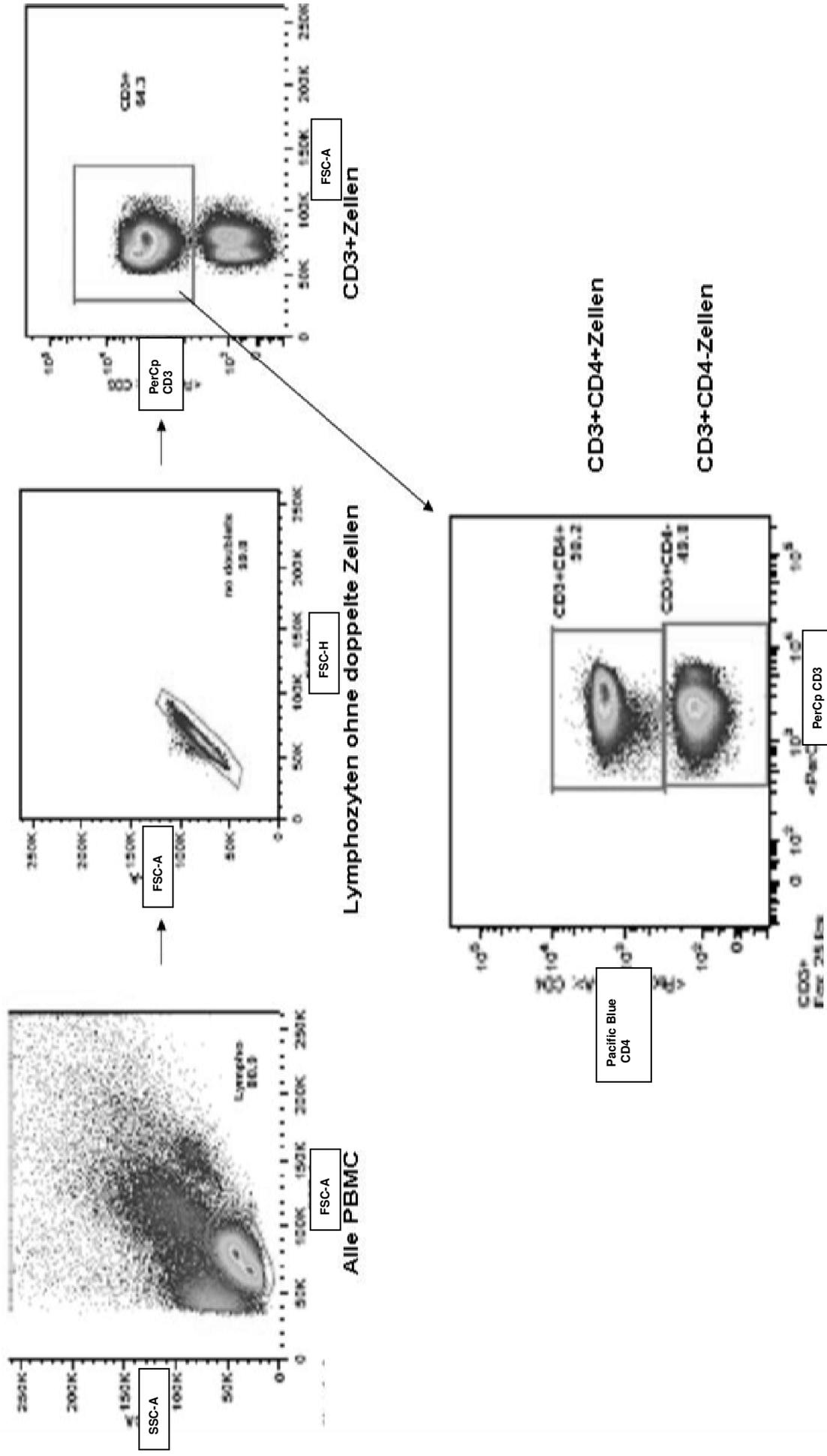


Abb.12: Oben links wurden die Lymphozyten bezüglich ihrer FSC/SSC-Eigenschaften identifiziert, mittig wurden die doppelten Zellen ausgeschlossen, links oben sind die CD3^{pos}-Zellen abgebildet, welche unten mittig nach ihrer CD4-Expression sortiert wurden.

Material und Methoden

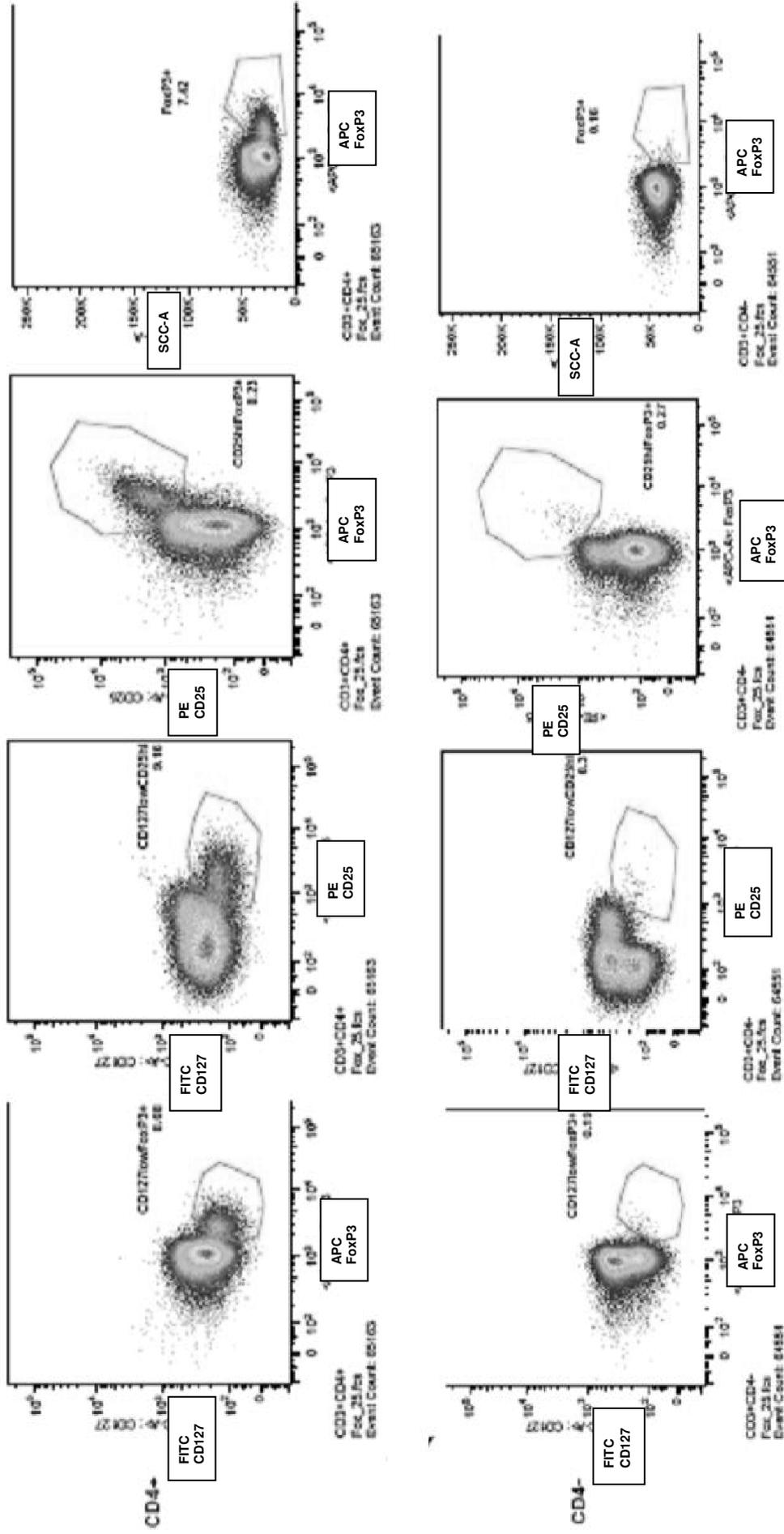


Abb.13: Die obere Spalte zeigt die CD4^{pos}-T-Lymphozyten und zum Vergleich sind in der unteren Spalte die CD4^{neg}-T-Lymphozyten dargestellt. Beide Zellpopulationen wurden nach ihrer FoxP3-, CD25- und CD127-Expression sortiert.

Panel 2

Zunächst wurden aus der Gesamtzellpopulation die lebenden Zellen identifiziert. Und die Populationen unterteilt in Lymphozyten und Monozyten entsprechend ihrer Vorwärts- und Seitwärtsstreuungseigenschaften sowie ihrer CD3-Expression, siehe Abbildung 14.

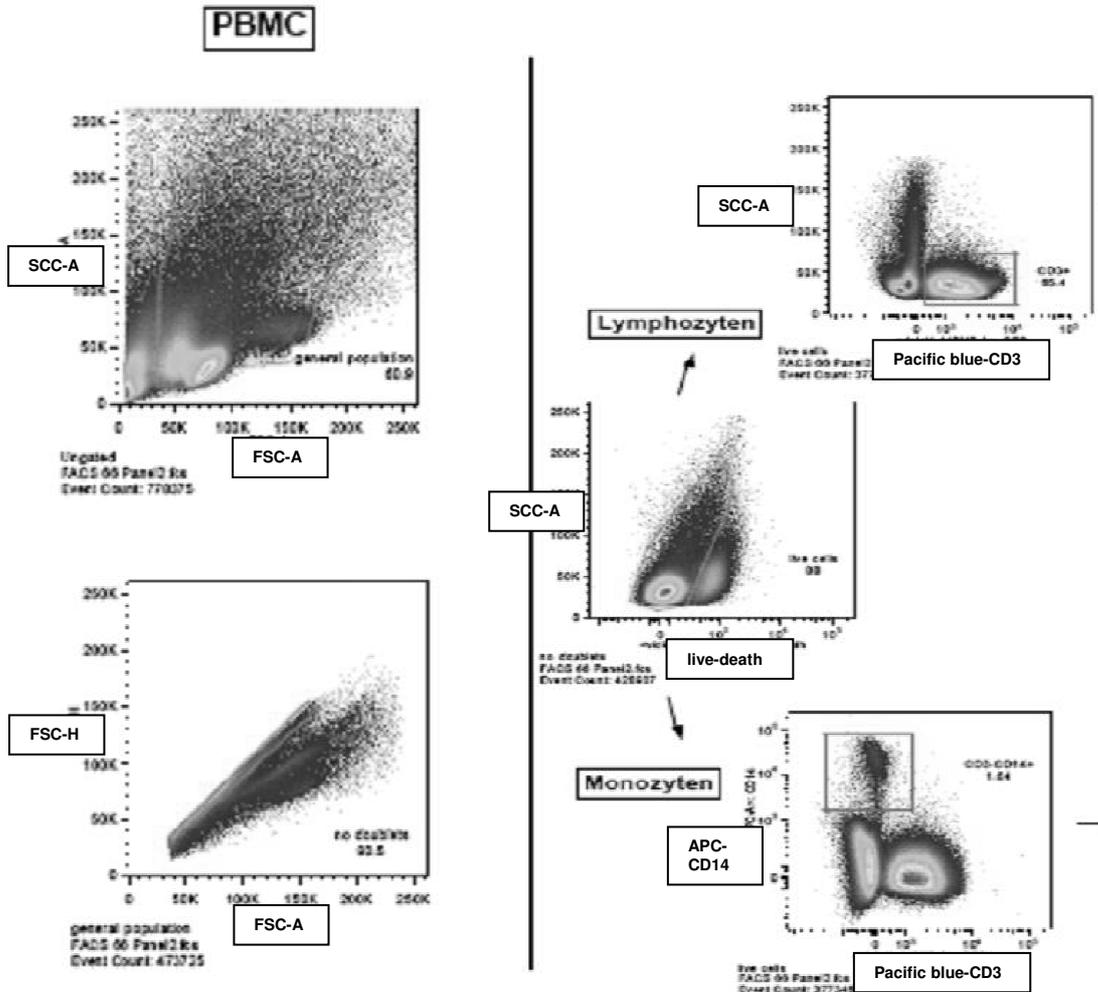


Abb.14: oben links Darstellung aller Zellen nach SSC/FSC-Eigenschaft, unten links Ausschluss aller doppelten Zellen, rechts mittig sind alle lebenden Zellen eingefasst und diese aufgeteilt nach positiver CD3-Expression oben rechts (Lymphozyten) und CD3negativerExpression und CD14-Expression (Monozyten) unten rechts.

Die CD3+CD4+-T-Zellen wurden als Tregs nach CD25 und CD127 gated und dann nach ihrer CD45 RA – Expression in Memory- und Naive-/Effektorzellen unterteilt, siehe Abbildung 15. Die Populationen wurden mittels des FlowJo-Programmes quantifiziert (Memoryzellen CD4+/CD127lowCD25highCD45RA-, Naive-Effektor-Zellen CD4+/CD127lowCD25highCD45RA+).

Material und Methoden

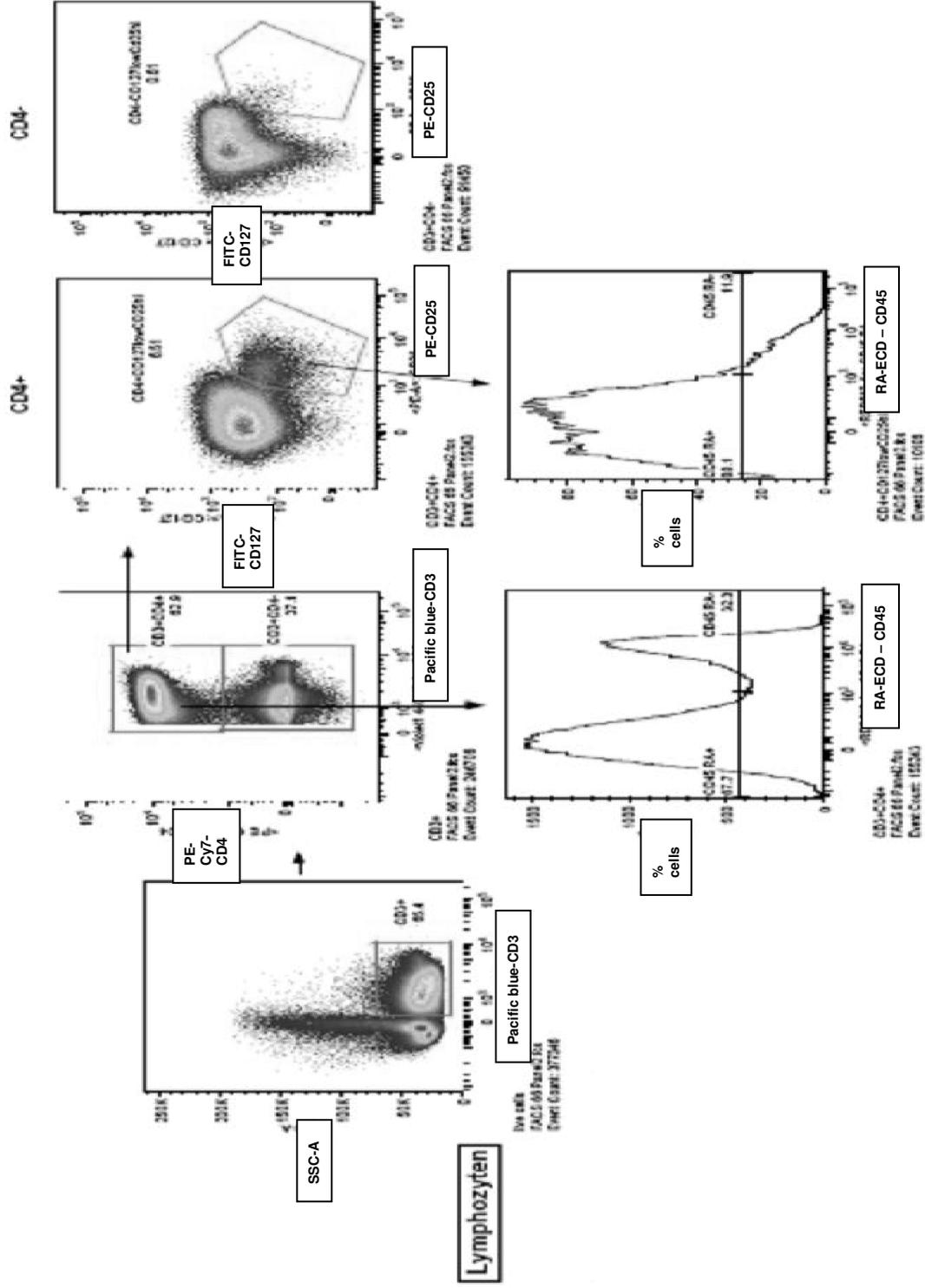


Abb.15: Die Lymphozyten (CD3+) links oben wurden nach ihrer CD4-Expression sortiert. Und die CD4++T-Lymphozyten unterteilt nach ihrer CD25- und CD127-Expression (oben dritter Graph von links) und zum Vergleich die CD4negativen Zellen (oben rechts). Die CD25highCD127low-Population wurde bezüglich ihrer CD45RA-Expression (unten rechts) unterteilt. Links unten zum Vergleich die CD45RA-Expression der CD3+CD4+-Zellen.

Die Monozytensubpopulation (CD3negativCD14+) wurde nach ihrer HLA-DR-Expression (MFI – mean fluorescence intensity) gated (Abb.16).

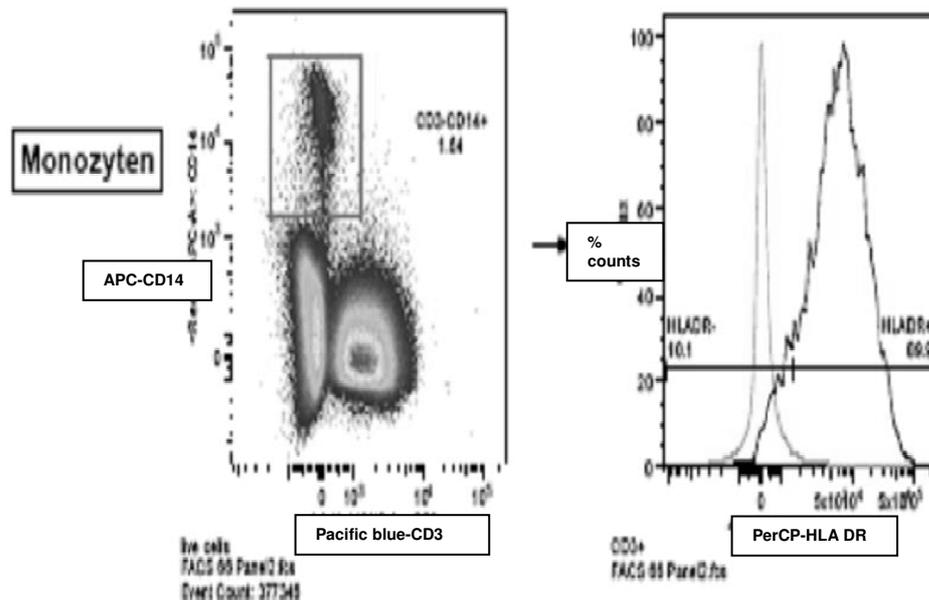


Abb.16: links sind die CD3negativen Zellen (Monozyten) nach ihrer CD14-Expression unterteilt, wovon die CD14+-Zellen rechts nach ihrer HLA-DR-Expression sortiert wurden.

2.2.2.7 PCR

Die PCR-Experimente wurden von Epiontismitarbeitern unter der Leitung von Udo Baron und Sven Olek durchgeführt. Es wurden zum einen zugeschnittene Lymphknoten und zum anderen PBMCs (tiefgefroren) von den Melanompatienten und Gesunden verwendet und analysiert.

Die Methodik wird in Anbetracht oben genannter Tatsache nur anhand der einschlägig veröffentlichten Literatur wiedergegeben und deshalb gesondert vom Rest des Kapitels aufgeführt. Weiterführende Angaben finden sich in folgenden Artikeln:

- Udo Baron et al. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3+ conventional T cells Eur. J. Immunol. 2007. 37: 2378–2389
- Udo Baron et al. DNA Methylation Analysis as a Tool for Cell Typing Epigenetics 2006. 1;1;55-60
- Floess et al. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. PLoS Biol 2007, 5(2): 0169-0178
- Wieczorek et al. Quantitative DNA Methylation Analysis of FOXP3 as a New Method for Counting Regulatory T Cells in Peripheral Blood and Solid Tissue Cancer Res 2009; 69: (2). 599-608

2.2.2.7.1 Material

Für die cDNA-Synthese und Materialpräparation:

- 50 mmol/L Tris/HCl (pH 8), 1 mmol/L EDTA, 0.5 % Tween20 inklusive 2 mg/mL Proteinase K
- Qia-AMP-DNA-FFPE-tissue-kit (Qiagen, Hilden, Germany)
- Epi Tect kit (Qiagen)
- FACSCalibur (BD Bioscience), FACS Aria, (BD Bioscience)
- Antikörper: anti-FOXP3-APC (PCH101; eBioscience), anti-CD3-PerCP (clone SK7), anti-CD25 -PE (M-A251), and anti-CD4-FITC, anti-CD45RA-FITC, anti-CD25-APC (BD Pharmingen)
- anti-CD4 microbeads (Miltenyi Biotec)
- AutoMACS magnetic separation system (Miltenyi Biotec)
- DNeasy blood and tissue kit (Qiagen)

Für die RT-PCR:

- Roche LightCycler 480 Probes Master (Roche Diagnostics)
- lambda-DNA (New England Biolabs)
- bisulfite-treated genomic DNA template
- TOPO TA cloning kit (Invitrogen)
- Qiagen Plasmid Midi Kit
- Qubit fluorometer (Invitrogen)
- Verwendete Primer:

Material und Methoden

FOXP3 (ENSG0000049768):	
Amp1:	p-GTTATTTGTGGAGTTTATGGG o-CCCACACTTACCTCTACACA
Amp2:	r-AAAAAGCTGCTATCTACCTCC q-AGGGTATGTGTTTGGTTATTGT
Amp3:	r-AAACCTCACTTCTTAATCCCTA q-TTGGGATGGTTTAAAGTGTAT
Amp4:	r-AAGCCTCAAAGCTAACCTCATA q-GGAGGTGATAGTAAAGAAAGGA
Amp5:	p-TGTTTGGGGTAGAGGATTT o-TATCACCCACCTAAACCAA
Amp6:	r-AAATCCTAAAATCTCAAAACCA q-GGTGATGATGGAGGTATGTTA
Amp7:	p-TAGAGATGGTAATAGGGGAG o-CCAAACCTCAGAAAACATAACT
Amp8:	p-GTGAGGTGGGTTTATATTGT o-TATCCTATCTCTCAACCAATC
Amp9:	r-TCTAATTCACACACAAAATA q-AAGGTTAAAAGGAGATTAAAGAG
Amp10:	r-AAATTTACCTAATCCCCAGATT q-GGITGTTGGTTTAGAAAGTGT
Amp11:	p-AGGAGTAGGAGATTTATTTTGG o-TTCAAGTACCTAACCTCAACCT
PSL1 (ENSG000005206):	r-TTAAAGCCAAATAGTCGCAAAAC q-GAGGGGTTTAGAAGAAAAATTA
EZH1 (ENSG00000108799):	p-TTTGGGATGAGATAAAGTGATT o-TTTAAGAAGTCAAACAGAAAAA
Amp864 (no Ensembl-ID):	p-TTAAAGTTGGGAAATGTTTATT o-AACAACCCATAATCTACTACCCT
TCF7 (ENSG0000081059):	r-TCTAACACAAAAATCCAAACA q-TAGGGTAGTGGTTTGGGAA
AMZ1 (ENSG00000174945):	r-TCTTCCC AAAATAACITTCCTCT q-TTAGAAGGAAGGAGGTTTAGT
TNIP3 (ENSG0000050730):	r-TAAAACCTCACAAGCCGTAAT q-TGGAGAGTTGAGAAATAGAAATGA
ZBTB32 (ENSG0000011590):	p-TTTTGAGGATGTGTTTAGAAGT o-CTTATCCAAAATCATAACAAATAAAC
APOBEC3H (ENSG00000100298):	r-TCCCTTCATCTTAAATTTTCC q-AGAGGGGTAGAGGAGTATTT
CAMTA1 (ENSG00000171735):	p-TTTATGGTGGTTTPTATGAGAAT o-AAACCTAACTCCTTCTCCTCTC
NP_689963 (ENSG00000128536):	p-TAAGATGAATATAAGGTAGAGTTGGT o-TTCTCTCAACTACACAAAAACA
MRIIP (ENSG00000133030):	r-CCACCTAATAAACCACTTAAT q-GGGTATAGGGGATTTAGAATTG
NP001008745 (ENSG00000204934):	r-CTCTTTCATAAATCTCTCTCC q-TAGGGTTTGTGTTAGGTTGA

2.2.2.7.2 Materialaufbereitung:

PBMCs

Die tiefgefrorenen PMBC wurden nach oben stehendem Protokoll aufgetaut (1.2.2.3). CD4+T-Zellen wurden von den PBMC-Proben (Gesunde und Melanompatienten aller Stadien) mittels anti-CD4-microbeads und dem AutoMACS isoliert. Es folgte eine intracelluläre FoxP3-Färbung mit dem "PE anti-humanFOXP3 staining set" nach den Herstellerprotokollen. Diese MACS-sortierten CD4+T-Zellen wurden dann extrazellulär mit den Antikörpern CD45RA-FITC and CD25-APC gefärbt und mittels FACS in CD25highCD45RAnegative Tregs und CD25highCD45RA+naive T-Zellen sortiert.

Ein Teil der CD4-Population wurde für FACS-Analysen (FACSCalibur und FlowJo-Software) verwendet zur Bestimmung des FOXP3+Zellenanteils.

10.000, 5.000, 2.500, 1.250, and 625 reine CD4+CD25high-T-Zellen wurden jeweils mit zwei Millionen isolierten Granulocyten entsprechend einem Treg-Prozentsatz von 0,5 %, 0,25 %, 0,13 %, 0,06 % und 0,03 % vermischt.

Die Zellmischungen wurden der genomischen DNA-Isolation zugeführt, gefolgt von einer Bisulfitbehandlung und der RT-PCR.

Lymphknoten

Acht Schnitte pro Probe wurden jeweils für die DNA-Isolation aus dem Lymphknotengewebe verwendet. Diese wurden über Nacht in 50 mmol/L Tris/HCl (pH 8), 1 mmol/L EDTA, 0.5 % Tween20 inklusive 2 mg/mL Proteinase K gelagert und dann bei 90 °C für 10 Min. inkubiert. Die DNA wurde aus paraffineingebetteten LK-Gewebe mittels dem Qia-AMP-DNA-FFPE-tissue-kit (Qiagen, Hilden, Germany) nach dem Herstellerprotokoll isoliert und mit Bisulfit an Hand des Epi Tect kit (Qiagen) behandelt [89].

DNA Präparation und Bisulfit-Conversion

Genomische DNA wurde mit dem DNeasy blood and tissue kit (Qiagen) nach dem Herstellerprotokoll für kultivierte Zellen isoliert. Die Bisulfitbehandlung der DNA wurde nach den Angaben von Olek durchgeführt [90].

2.2.2.7.3 RT-PCR Versuchsablauf:

Die RT-PCR ist eine Methode, um Aussagen über den mRNA-Gehalt von Zellen zu treffen. Hierbei setzt man cDNA ein, die vorher mittels Reverser Transkriptase aus der isolierten mRNA umgeschrieben wurde. Ausgesuchte Genabschnitte des Transkripts wurden anschließend mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert unter Verwendung des Roche LightCycler 480 Probes Master (Roche Diagnostics) (10 Min. bei 95 °C „preheating Stepp“, 50 Zyklen bei 95 °C für 15 Sek. gefolgt von 1 Min. bei 61 °C).

Plasmid Standard siehe Instruktionen der Firma Epiontis unter Wieczorek et al. 2009 [91].

2.3 Statistik

Für den Vergleich der Gruppen (unabhängige Variablen, normalverteilt) bezüglich eines Merkmals wurden folgende statistische Tests mit GraphPad Prism angewendet. Bei zwei Gruppen wurde für die metrischen, normalverteilten,

Material und Methoden

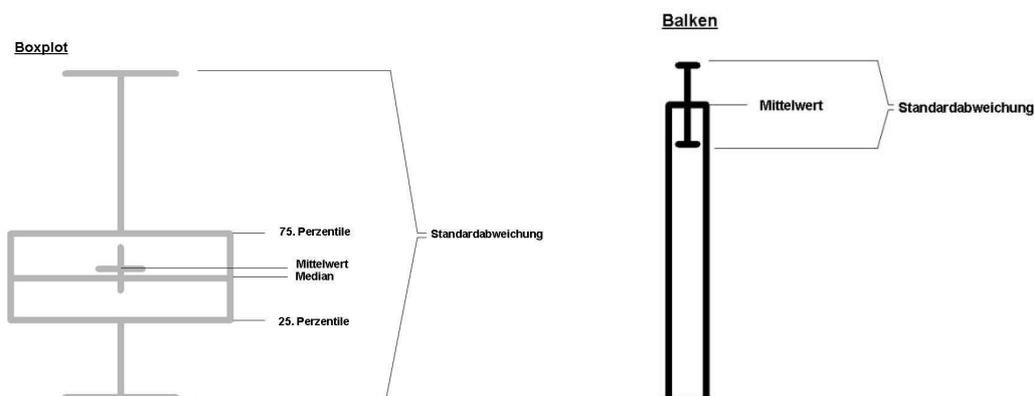
unabhängigen (unverbundene) Stichproben der zweiseitige t-Test angewandt, der gegenüber Verstößen gegen die Voraussetzungen des t-Test (z.B. schiefe Daten) weniger empfindlich reagiert.

Bei mehr als 2 Gruppen (bis zu 5) wurden die Unterschiede zwischen den Gruppen mittels einfaktorieller ANOVA („One-Way-**A**nalysis of **V**ariance“) ermittelt, gefolgt von einem Post Hoc Test (Bonferroni). Die Normalverteilung der Stichprobenmenge und die Varianzhomogenität der Daten sind notwendige Bedingungen für die ANOVA. Für diese Untersuchung wurde der Bartlett-Test herangezogen. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um arithmetische Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung der Mittelwerte (SEM). Das Ergebnis eines statistischen Tests wurde als signifikant erachtet, sofern die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5 % lag ($p < 0,05$).

Boxplots wurden zur Darstellung der Gruppen und Ergebnisse verwendet.

Statistische Analyse PCR - Die Mengen der methylierten und unmethylierten FOXP3 DNA wurden mittels einer linearen Regressionskurve ermittelt.

Allgemeine Erklärung der verwendeten Graphen



3 Ergebnisse

Für die Untersuchungen wurden Blutproben von insgesamt 90 Probanden (11 Gesunde und 79 Melanompatienten) gewonnen. Die klinischen Daten sind in Tabelle 6 „Patientenstatistik PBMC“ zusammengefasst. Diese 90 Proben wurden als PBMCs für FACS- und PCR-Analysen (reduzierte Anzahl an Proben) verwendet. Die Patientendaten für die PCR-Untersuchung an Hand von Lymphknotenmaterial auf FoxP3-DNA-Expression, werden gesondert aufgeführt. Die Ergebnisse werden anhand der Reihenfolge der Hypothesen nacheinander aufgeführt.

Von den 90 Probanden waren 64% männlich und im Durchschnitt 56 Jahre alt. Die Lokalisation der Primärtumore befand sich zu 46% im Bereich des Rumpfes gefolgt von den oberen Extremitäten. Die häufigste Melanomart war mit 37% das superfiziell spreitende Melanom. Die Tumordicke betrug zu ~30% zwischen 1-2mm. Bei drei Viertel der Melanompatienten erfolgte die Entfernung des Wächterlymphknotens (SLNB), von welchen sich 25% vom Melanom befallen zeigten. Von diesen Patienten erhielten 14 eine komplette Entfernung der Lymphknoten im Abstromgebiet je nach Primariuslokalisation (CLND).

Ergebnisse

Tab.6: Patientenstatistik für die PBMC-Proben

		Patientenanzahl (n = 90)	100%
weiblich		32	36
männlich		58	64
<u>Alter im Median ("range" von bis)</u>	56 (22-87)		
<u>kein MM</u>		11	12
<u>MM-Patienten</u>		79	88
<u>Tumordicke nach Breslow</u>			
unbekannt		14	17
<1mm		12	15
1-2mm		23	29
2,01-4mm		12	15
>4mm		19	24
<u>Median</u>	3,93mm		
<u>Eindringtiefe nach Clark</u>			
unbekannt		19	24
I		0	0
II		3	4
III		20	25
IV		33	42
V		4	5
<u>Lokalisation des Primarius</u>			
Kopf, Hals		5	6
Rumpf		36	46
Arm		17	22
Bein		10	12
andere		11	14
<u>MM-Art</u>			
SSM		29	37
NM		20	25
LMM		2	3
ALM		1	1
unbekannt		27	34
<u>FNAC erfolgt</u>		29/79	37
positiv		6/29	21
negativ		19/29	65
unverwertbar		4/29	14
<u>SLNB</u>			
erfolgt		59/79	75
abgelehnt		14/79	18
direkt durch positive FNAC zur CLND		6/79	7
SLN positiv		15/59	25
SLN negativ		44/59	75
<u>CLND erfolgt</u>		14/21	67
positiv		8/14	57
negativ		5/14	36
unbekannt		1/14	7
<u>Stadium nach AJCC 2009</u>			
unbekannt		1/79	1
I		29/79	37
a		9/29	31
b		20/29	69
II		15/79	19
a		6/15	40
b		6/15	40
c		3/15	20
III		14/79	18
a		10/14	72
b		2/14	14
c		2/14	14
IV		20/79	25

3.1 Regulatorische T-Zellen

Zur Analyse des Anteils der regulatorischen T-Zellen erfolgte die Untersuchung von Blutproben (PBMC) bei Gesunden und Melanompatienten unterteilt nach Melanomstadium bzw. Wächterlymphknotenstatus und Geschlecht. Die PCR-Analysen erfolgten an einer geringeren Probenanzahl ($n < 90$). Bei den FACS-Analysen werden die Tregs unterschiedlich präsentiert wie bereits in der Einleitung dargestellt (Seite 12), die Gatingstrategien sind mit Beispielen vorangestellt.

3.1.1 FoxP3-DNA-Expression untersucht in den Blutproben

In der PCR-Analyse der PBMC (Blut von Patienten mit Melanom und gesunden Kontrollen) ist der Anteil der demethylierten FoxP3-DNA in % angegeben, was einem Marker der natürlichen regulatorischen T-Zellen ist.

In der Abbildung 18 ist die DNA-Expression in Abhängigkeit des Wächterlymphknotenbefalls dargestellt, es handelt sich um die Proben beider Geschlechter. Hier zeigt sich, dass es keinen signifikanten Unterschied bezüglich eines Befalls oder Nichtbefalls gibt ($p = 0,13$; Mittelwert und SD SLNnegativ $3,391\% \pm 0,2572$; Mittelwert und SD SLNpositiv $4,151\% \pm 0,4757$, Differenz zwischen den Mittelwerten $-0,7598\% \pm 0,4939$; 95 %-Konfidenzintervall $-1,767$ bis $0,2477$).

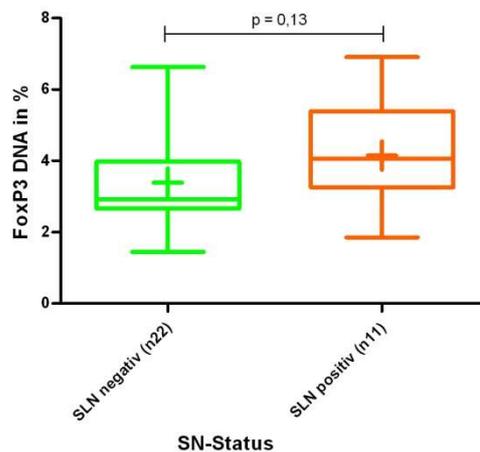


Abb.18 FoxP3-DNA-Expression in Abhängigkeit vom Sentinelstatus: Darstellung der Gruppe der Sentinelnode-Negativen (22 Patientenproben, grün, PBMCs) im Vergleich zur Gruppe der Sentinelnode-Positiven (11 Proben, orange), p -Wert = 0,13 ist nicht signifikant.

Auf Grund der Tatsache, dass die Expression von FoxP3 an das X-Chromosom gebunden ist, wurden die Analyseergebnisse im Folgenden nach Geschlechtern getrennt.

Ergebnisse

Bei den weiblichen Proben zeigte sich in der Analyse der Blutproben kein signifikanter Unterschied bezüglich des Befalls des Sentinellymphknotens (siehe Abbildung 19).

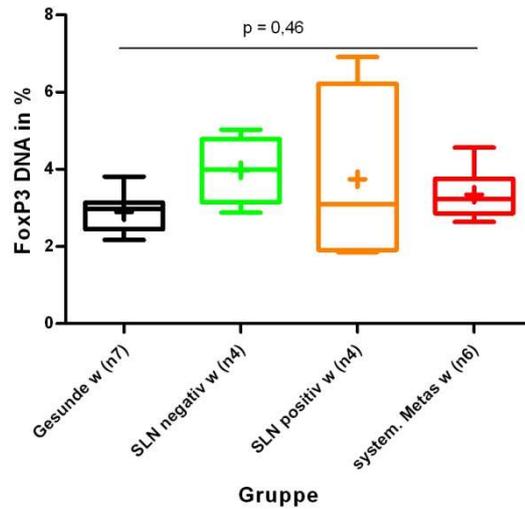


Abb. 19 FoxP3-DNA-Expression in Abhängigkeit vom Sentinelstatus - weiblich: Auswertung von PBMC-Material von 4 weiblichen Gruppen (7 gesunde Kontrollen, 4 nicht-befallene, 4 mit befallenem Sentinelnode und 6 systemisch metastasierten Melanompatientinnen), die Unterschiede bezüglich der Expression sind zwischen den Gruppen nicht signifikant, $p = 0,46$.

Die männlichen Blutproben aufgeteilt nach Melanomstadium zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Expression von FoxP3, was Abbildung 20 zu entnehmen ist.

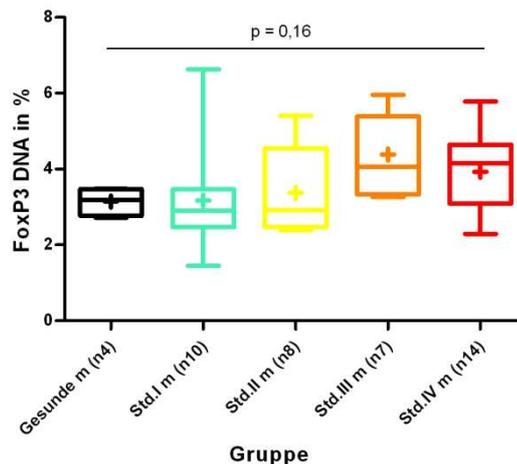


Abb. 20 FoxP3-DNA-Expression in Abhängigkeit vom Melanomstadium - männlich: dargestellt werden die Daten der männlichen Patienten (PBMC-Material) in 5 Gruppen unterteilt (4 gesunde Kontrollen, 10 Melanomstadium-I-Patienten, 8 Melanomstadium-II-Patienten, 7 Melanomstadium-III-Patienten und 14 Melanomstadium-IV-Patienten), die Unterschiede bezüglich der Expression sind zwischen den Gruppen nicht signifikant, $p = 0,16$.

Ordnet man die Ergebnisse allerdings nach dem Wächterlymphknotenbefall, so war ein signifikanter Unterschied der nichtbefallenen vs. der befallenen

Ergebnisse

Sentinellymphknoten für die Expression der FoxP3-DNA zu verzeichnen ($p = 0,0246$; Mittelwert und SD SLNnegativ $3,262\% \pm 0,2947$; Mittelwert und SD SLNpositiv $4,385\% \pm 0,4170$; Differenz zwischen $-1,123\% \pm 0,5406$; 95 %-Konfidenzintervall $-2,242$ to $-0,004457$), siehe Abbildung 21.

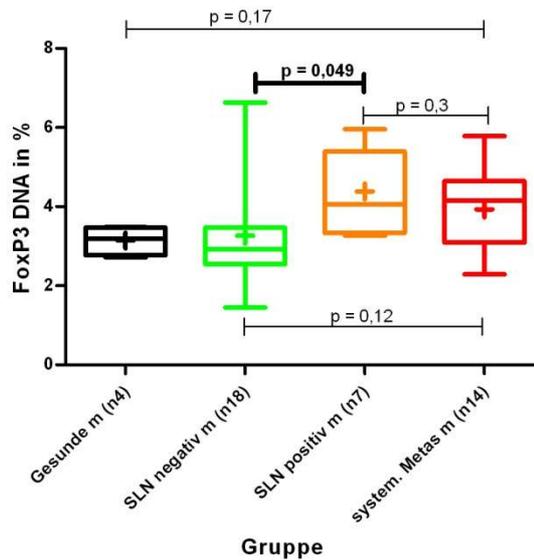


Abb. 21 FoxP3-DNA-Expression in Abhängigkeit vom Sentinelstatus - männlich: dargestellt werden die Daten der männlichen Patienten (PBMC-Material) (4 gesunde Kontrollen, 18 Sentinelnodenegative, 7 Sentinelnodepositive und 14 systemisch metastasierte Patienten), die Unterschiede bezüglich der Expression sind zwischen den Gruppen für den Vergleich der Gruppe SLNnegativ versus SLNpositiv signifikant $p = 0,049$ (fett); die nicht signifikanten p-Werte sind „dünn“-hervorgehoben.

3.1.2 Messung der Tregs in der Durchflusszytometrie

Für die FACS-Analysen wurden ebenfalls PBMC von Melanompatienten und Gesunden verwendet. Für das Melanom-Stadium IV erfolgte zu Kontrollzwecken die Aufarbeitung von älteren Proben, die schon einige Jahre eingefroren waren und neu eingefrorenen Proben (ca. 2-3 Wochen), welche als „MMIV-alt bzw. systemische Metas alt“ bezeichnet und abgekürzt werden. Für einige Subgruppenanalysen zeigten sich zwischen alten und neuen Proben deutliche Unterschiede in den Werten. Für die Darstellungen wurden meist beide Gruppen einzeln sowie auch eine zusammengefasste Gruppe aufgeführt. Zeigten sich große Unterschiede in der statistischen Analyse mit signifikanten p-Werten wurde dies erwähnt und dargestellt. Keine relevanten Differenzen der alten und neuen Gruppe blieben meist unkommentiert.

Die Tregs wurden charakterisiert als Anteil der CD4positiven Lymphozyten als CD25highCD127lowFoxP3+, CD25highCD127low, FoxP3+ und CD25highFoxP3+, wie auf Seite 12 erklärt.

Ergebnisse

CD4+/CD25highCD127lowFoxP3+

PBMC von Melanompatienten und gesunden Kontrollen zeigten bezüglich der regulatorischen T-Zellen als Anteil der CD4+Lymphozyten in Prozent (charakterisiert als CD25highCD127lowFoxP3+) für die Gruppe der nicht-befallenen im Vergleich zu den befallenen Wächterlymphknoten sowie für die Gesunden versus systemisch metastasierte Patienten keinen statistisch signifikanten Unterschied. Die Patienten ohne Befall des Wächterlymphknotens und mit Befall zeigten im Vergleich zur Gruppe mit systemischen Metastasen signifikant höhere Tregzahlen (*SLNnegativ vs. systemisch* $p = 0,004$ Mittelwert und SD SLNnegativ $3,442\% \pm 0,1861$; Mittelwert und SD system. Metas $2,526\% \pm 0,1945$; Differenz zwischen den Mittelwerten $0,9156\% \pm 0,3083$; 95 %-Konfidenzintervall 0,2992 bis 1,532; *SLNpositiv vs. system. Metas* $p = 0,031$; Mittelwert und SD SLNpositiv $3,440\% \pm 0,3981$; Mittelwert und SD system. Metas $2,526\% \pm 0,1945$; Differenz zwischen den Mittelwerten $0,9140\% \pm 0,4050$; 95 %-Konfidenzintervall 0,08877 bis 1,739), siehe Abbildung 22.

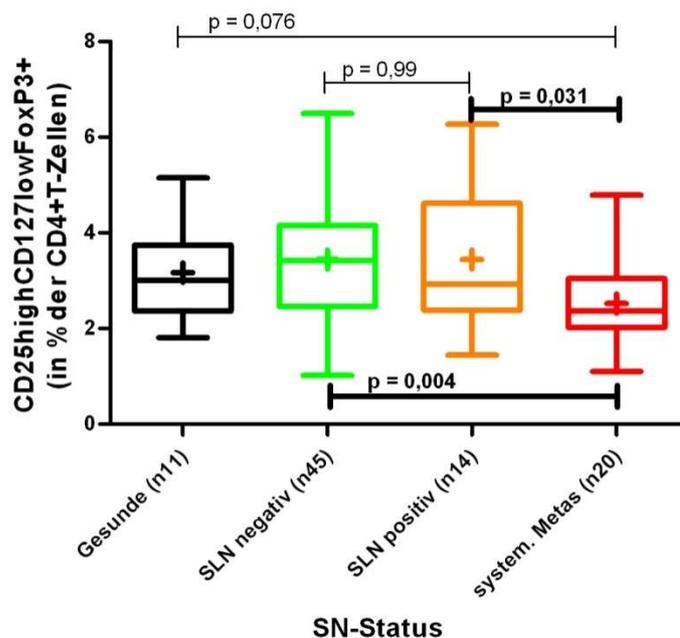


Abb. 22 Tregs (CD25highCD127lowFoxP3+) in Abhängigkeit vom Sentinelstatus: abgebildet sind die Daten der FACS-Analyse aller Patienten aus PBMC-Material aufgeteilt in 4 Gruppen (11 gesunde Kontrollen, 45 Sentinelnodenegetive, 14 Sentinelnodepositive und 20 systemisch metastasierte Patienten), die Unterschiede in der Anzahl der CD25highCD127lowFoxP3+-Tregs sind für den Vergleich der Gruppe SLNnegativ versus systemisch metastasierten und SLNpositiv versus system.Metas signifikant (p-Werte fett); die nicht signifikanten p-Werte zwischen den verglichenen Gruppen sind „dünn“-hervorgehoben.

Betrachtet man die Gruppen nach Geschlechtern getrennt, weisen die weiblichen Proben differenziert nach Melanomstadium und nach Sentinellymphknotenbefall keine signifikanten Unterschiede auf, siehe Abbildung 23.

Ergebnisse

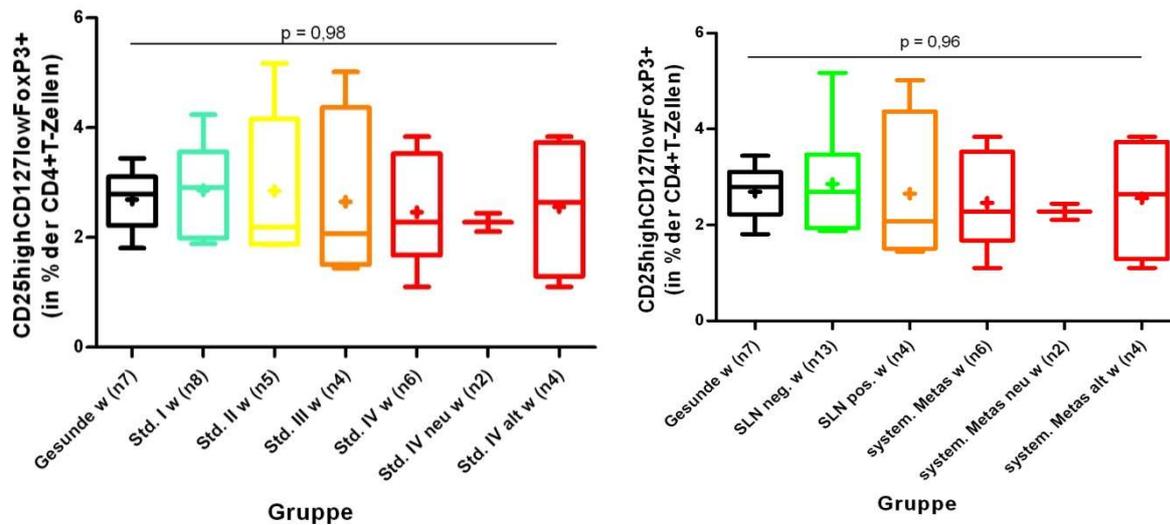


Abb. 23 Tregs (CD25^{high}CD127^{low}FoxP3⁺) in Abhängigkeit vom Melanomstadium (rechts) und Sentinelstatus (links) - weiblich

Für die männlichen Proben zeigten sich nicht nur für die Betrachtung der nach dem SLN-Status unterteilten Gruppen ähnlich signifikante Unterschiede im Anteil der Tregs wie in der oben dargestellten Gesamtgruppe, sondern ebenfalls für die Aufteilung nach den Melanomstadien (*Gesunde vs. system. Metas* $p = 0,0137$; Mittelwert und SD *Gesunde* $4,015\% \pm 0,6249$; Mittelwert und SD *system. Metas* $2,553\% \pm 0,2247$; Differenz zwischen den Mittelwerten $1,462\% \pm 0,5280$; 95 %-Konfidenzintervall $0,3427$ bis $2,582$; *SLN negativ vs. systemische Metas* $p = 0,0039$; Mittelwert und SD *SLNnegativ* $3,679\% \pm 0,2229$; Mittelwert und SD *system. Metas* $2,553\% \pm 0,2247$; Differenz zwischen den Mittelwerten $1,126\% \pm 0,3695$; 95 %-Konfidenzintervall $0,3808$ bis $1,871$; *SLN positiv vs. system. Metas* $p = 0,014$; Mittelwert und SD *SLNpositiv* $3,756\% \pm 0,4391$; Mittelwert und SD *system. Metas* $2,553\% \pm 0,2247$; Differenz zwischen den Mittelwerten $1,203\% \pm 0,4548$; 95 %-Konfidenzintervall $0,2599$ bis $2,146$). Die gesamte männliche und weibliche Population nach Melanomstadien betrachtet zeigt ähnliche Tendenzen wie die Einzeldarstellung der männlichen Proben. Dieser Gesamteindruck ging nur von den männlichen Proben aus, da die Weiblichen wie dargestellt keine Unterschiede zeigten, weshalb hier selektiv die männlichen Analyseergebnisse Erwähnung finden. Gesunde Proben, Stadium I, II und III wiesen untereinander verglichen keine signifikanten P-Werte auf, jedoch ergaben sich für den Vergleich mit den Melanom-Stadium-IV-Patienten statistische Unterschiede in der Treganzahl (*Gesunde vs. Std.IV* $p = 0,0137$; Mittelwert und SD *Gesunde* $4,015\% \pm 0,6249$; Mittelwert und SD *Std.IV* $2,553\% \pm 0,2247$; Differenz zwischen den Mittelwerten $1,462\% \pm 0,5280$; 95

Ergebnisse

%-Konfidenzintervall 0,3427 bis 2,582; *Std.I vs. Std.IV* $p = 0,008$; Mittelwert und SD *Std.I* 3,662% \pm 0,2801; Mittelwert und SD *Std.IV* 2,553% \pm 0,2247; Differenz zwischen den Mittelwerten 1,109% \pm 0,3952; 95 %-Konfidenzintervall 0,3057 bis 1,913; *Std.II vs. Std.IV* $p = 0,01$; Mittelwert und SD *Std.2* 3,715% \pm 0,3806; Mittelwert und SD system. Metas 2,553% \pm 0,2247; Differenz zwischen den Mittelwerten 1,162% \pm 0,4162; 95 %-Konfidenzintervall 0,2989 bis 2,025; *Std. III vs. Std.IV* $p = 0,014$; Mittelwert und SD *Std.III* 3,756% \pm 0,4391; Mittelwert und SD *Std.IV* 2,553% \pm 0,2247; Differenz zwischen den Mittelwerten 1,203% \pm 0,4548; 95 %-Konfidenzintervall 0,2599 bis 2,146), siehe Abbildung 24.

Die Melanomstadium-IV-Gruppen (alt versus neu) unterschieden sich nicht in ihrer Treganzahl.

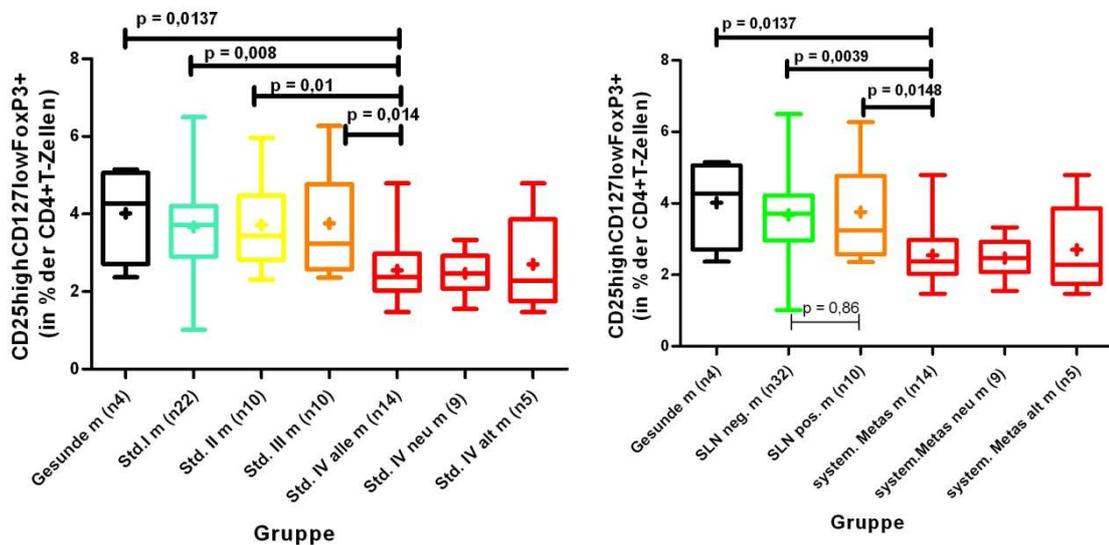


Abb. 24 Tregs (CD25highCD127lowFoxP3+) in Abhängigkeit vom Melanomstadium (rechts) und vom Sentinelstatus (links): Darstellung der männlichen Proben (n74). Die signifikanten Unterschiede in der Anzahl der CD25highCD127lowFoxP3+-Tregs zwischen den Gruppen sind fett markiert, die nicht signifikanten dünn.

CD4+/CD25highCD127low

Für die Subgruppe der CD25highCD127low-Tregs in Prozent der CD4+Lymphozyten wurden unterschiedliche FACS-Analysen (Panel 1 und 2) durchgeführt, was bei den Gesunden und Melanomstadium-IV-Patienten bzw. der systemisch metastasierten Gruppe zu einer doppelten Fallzahl führte, welche hier nun wiedergegeben wurden.

In der folgenden Abbildung 25 wurden Beispiele für die Gatingstrategie der Gruppen für die zu betrachtende Population ausgewählt.

Ergebnisse

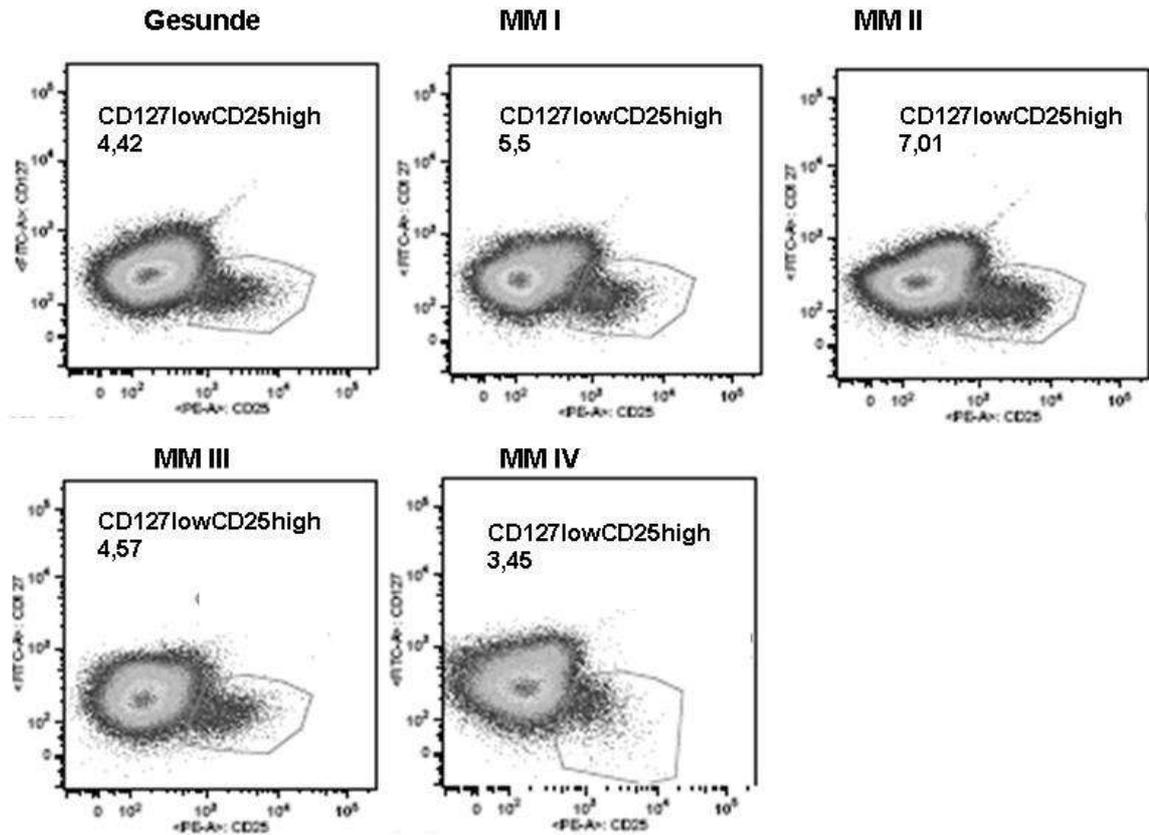


Abb.25: Wiedergabe der FlowJo-Gating-Bilder für jeweils einen ausgewählten Patienten pro Gruppe (Gesunde, MM I – Melanomstadium I, MM II – Melanomstadium II, MM III – Melanomstadium III und MM IV – Melanomstadium IV); gezeigt ist die Expression von CD127 (y-Achse) und CD25 (x-Achse), die Gates markieren die CD25^{high}CD127^{low}-Tregs, deren Anzahl in % der CD4⁺Lymphozyten als Ziffer für jede Gruppe abgebildet ist.

Für die Unterschiede im Anteil der CD127^{low}CD25^{high}-Tregs zwischen den Gruppen waren nur die männlichen Proben verantwortlich und sind hier exemplarisch dargestellt, die weiblichen Gruppen zeigten keinen signifikanten Unterschied.

CD25^{high}CD127^{low}-Tregs zeigten keine Unterschiede in ihrer Anzahl für die Gruppen mit nicht befallenen (SLNnegativ, Stadium I und II) versus denen mit befallenen Wächterlymphknoten (SLNpositiv, Stadium III) ($p = 0,94$; Mittelwert und SD SLNnegativ $5,284\% \pm 0,2786$; Mittelwert und SD SLNpositiv $5,322\% \pm 0,4434$; Differenz zwischen den Mittelwerten $0,03762\% \pm 0,5573$; 95 %-Konfidenzintervall - 1,164 bis 1,089), siehe Abbildung 26.

SLNpositive bzw. Melanomstadium-III-Patienten hatten mehr CD25^{high}CD127^{low}-Tregs als die Stadium-IV-Patienten bzw. system. Metastasierten ($p = 0,017$; Mittelwert und SD Std.III/SLNpositiv $5,322\% \pm 0,4434$; Mittelwert und SD Std.IV/system. Metas $4,359\% \pm 0,1716$; Differenz zwischen den Mittelwerten $0,9634\% \pm 0,3881$; 95 %-Konfidenzintervall 0,1757 bis 1,751).

Ergebnisse

Ebenfalls zeigten die Gesunden, SLNnegativen bzw. Std. I und II Patienten signifikant höhere Tregs als die Stadium-IV-Patienten (*Gesunde vs. Std.IV/system. Metas* $p < 0,0001$; Mittelwert und SD Gesunde $6,190\% \pm 0,4641$; Mittelwert und SD Std. IV/system. Metas $4,359\% \pm 0,1716$; Differenz zwischen den Mittelwerten $1,831\% \pm 0,4028$; 95 %-Konfidenzintervall 1,012 bis 2,651; *SLNnegativ vs. system. Metas.* $p = 0,008$; Mittelwert und SD SLNneg. $5,284\% \pm 0,2786$; Mittelwert und SD system. Metas $4,359\% \pm 0,1716$; Differenz zwischen den Mittelwerten $0,9258\% \pm 0,3385$; 95 %-Konfidenzintervall 0,2481 bis 1,604; *Std. I vs. IV* $p = 0,0085$; Mittelwert und SD Std. I $5,399\% \pm 0,3681$; Mittelwert und SD Std. IV $4,359\% \pm 0,1716$; Differenz zwischen den Mittelwerten $1,040\% \pm 0,3788$; 95 %-Konfidenzintervall 0,2777 bis 1,802).

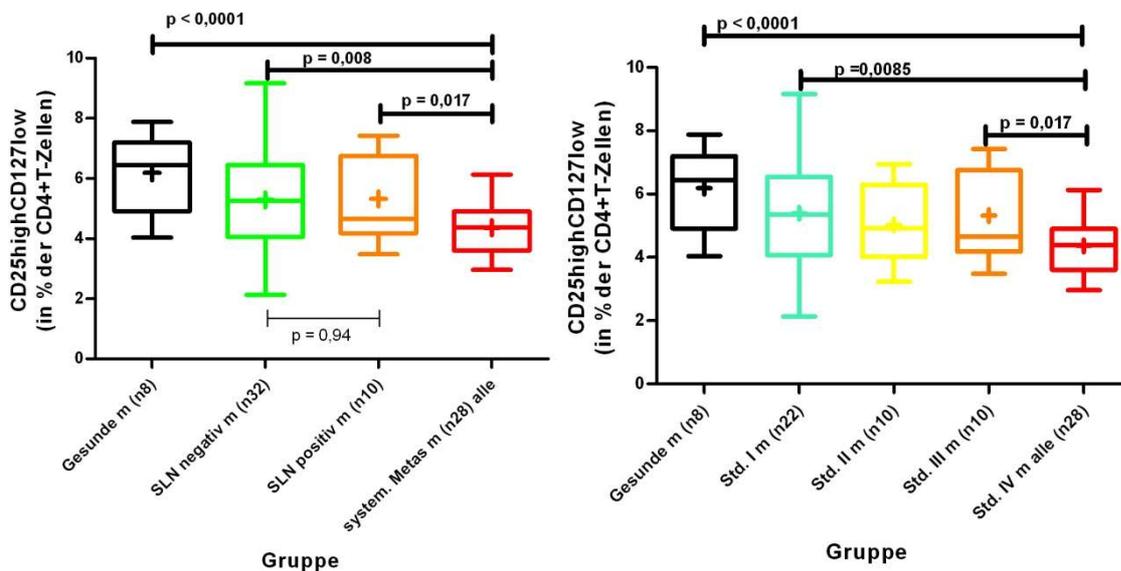


Abb. 26 Tregs (CD25highCD127low) in Abhängigkeit vom Melanomstadium (rechts) bzw. vom Sentinelnodestatus (links): dargestellt werden die FACS-Analyse-Daten der männlichen Patienten. Die signifikanten Unterschiede in der Anzahl der CD25highCD127low-Tregs zwischen den Gruppen sind fett markiert, die nicht signifikanten dünn hervorgehoben.

CD4+/FoxP3+

Die CD4+Zellen wurden im Folgenden nach ihrer FoxP3-Expression dargestellt, siehe Abbildung 27.

Ergebnisse

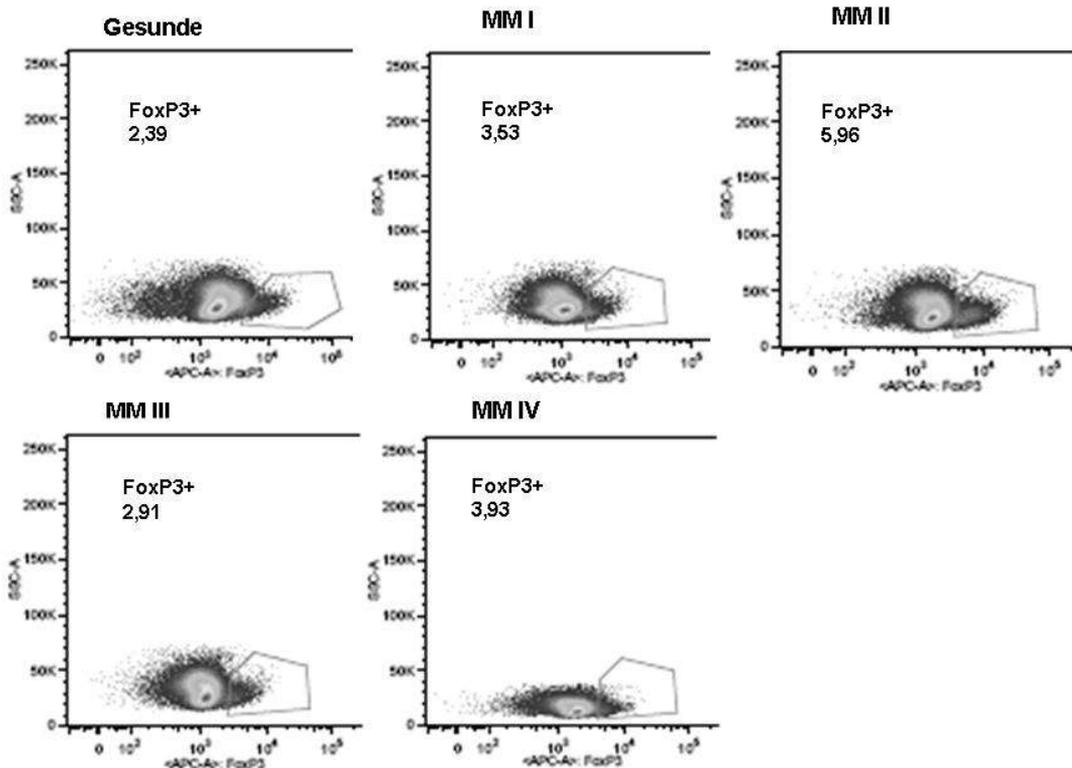


Abb.27: Wiedergabe der FlowJo-Gating-Bilder für jeweils einen ausgewählten Patienten pro Gruppe (Gesunde, MM I – Melanomstadium I, MM II – Melanomstadium II, MM III – Melanomstadium III und MM IV – Melanomstadium IV); gezeigt ist die Expression von FoxP3-DNA (x-Achse) in % der CD4+-Zellen

Für die Fragestellung der Treganzahl zwischen Befall und Nichtbefall des Wächterlymphknotens ergab sich keine signifikante Differenz zwischen den Gruppen für die FoxP3+Tregs in Prozent aller CD4+-Lymphozyten ($p = 0,96$; Mittelwert und SD SLN negativ $4,261\% \pm 0,2512$; Mittelwert und SD SLN positiv $4,288\% \pm 0,5470$; Differenz zwischen den Mittelwerten $0,02697\% \pm 0,5429$; 95% Konfidenzintervall - 1,115 bis 1,061), siehe Abbildung 28.

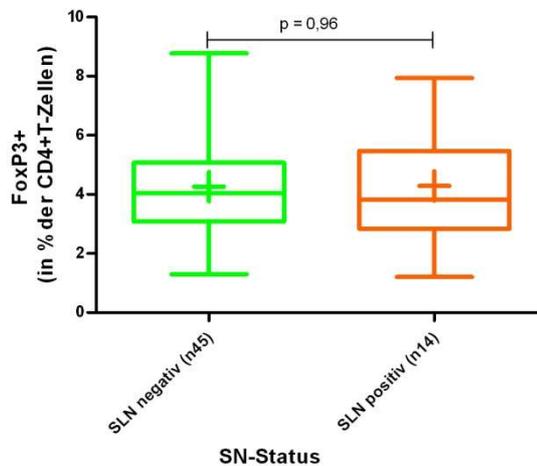


Abb. 28 Tregs (CD4+/FoxP3+) in Abhängigkeit vom Sentinelstatus: für die Gruppe der Sentinelnode-Negativen (45 Patientenproben, grün, PBMCs) im Vergleich zur Gruppe der Sentinelnode-Positiven (14 Proben, orange) ist der p-Wert = 0,96 nicht signifikant.

Ergebnisse

Nach dem Geschlecht unterteilt wiesen die männlichen Proben für die nicht hämatogen metastasierten Gruppen (Gesunde, Std.I,II und III sowie SLNnegativ, SLN positiv) signifikant mehr Tregs auf im Vergleich zur hämatogen metastasierten Gruppe sowohl nach dem Sentinelstatus als auch nach dem Melanomstadium sortiert (*Gesunde vs. system.Metas/Std. IV* $p = 0,034$; Mittelwert und SD Gesunde $4,530\% \pm 0,4316$; Mittelwert und SD system. Metas $3,585\% \pm 0,1940$; Differenz zwischen den Mittelwerten $0,9446\% \pm 0,4287$; 95 %-Konfidenzintervall $0,07291$ bis $1,816$; *Std. I vs. IV* $p = 0,02$; Mittelwert und SD Std. I $4,456\% \pm 0,2649$; Mittelwert und SD Std. IV $3,585\% \pm 0,1940$; Differenz zwischen den Mittelwerten $0,8710\% \pm 0,3668$; 95 %-Konfidenzintervall $0,1385$ bis $1,603$; *Std. II vs. IV* $p = 0,005$; Mittelwert und SD Std. II $4,786\% \pm 0,4035$; Mittelwert und SD Std. IV $3,585\% \pm 0,1940$; Differenz zwischen den Mittelwerten $1,2\% \pm 0,4103$; 95 %-Konfidenzintervall $0,3736$ bis $2,027$; *SLNnegativ vs. system. Metas* $p = 0,006$; Mittelwert und SD SLNnegativ $4,559\% \pm 0,2205$; Mittelwert und SD system. Metas $3,585\% \pm 0,1940$; Differenz zwischen den Mittelwerten $0,9739\% \pm 0,3579$; 95 %-Konfidenzintervall $0,2616$ bis $1,686$; *Std. III/ SLNpositiv vs. Std. IV* $p = 0,008$; Mittelwert und SD Std. III/ SLNpositiv $4,724\% \pm 0,4074$; Mittelwert und SD system. Metas $3,585\% \pm 0,1940$; Differenz zwischen den Mittelwerten $1,138\% \pm 0,4130$; 95 %-Konfidenzintervall $0,3062$ bis $1,970$), siehe Abbildung 29.

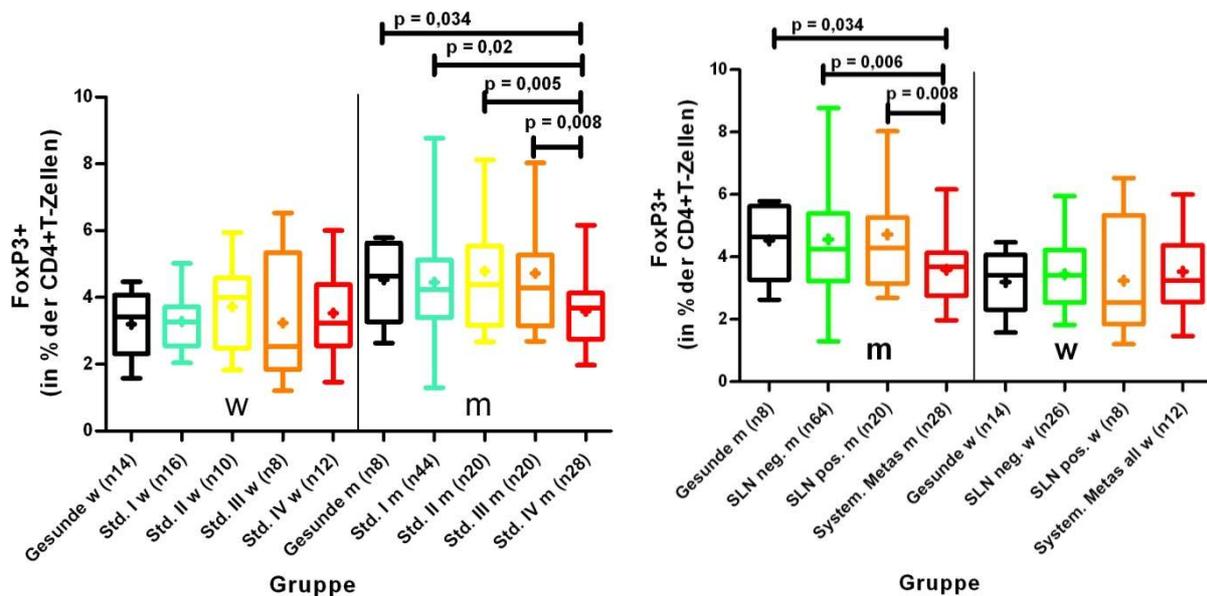


Abb. 29 Darstellung der Tregs (CD4+/FoxP3+) in Abhängigkeit vom Melanomstadium (links) bzw. vom Sentinelnodestatus (rechts): dargestellt werden die FACS-Analyse-Daten der weiblichen und männlichen Patienten getrennt durch die Linie. Die signifikanten Unterschiede in der Anzahl der FoxP3+-T-Zellen der CD4+Lymphozyten zwischen den Gruppen sind wiedergegeben.

Ergebnisse

CD4+/CD25highFoxP3+

In Abbildung 30 wurden die CD4+-Zellen bezüglich ihrer CD25- und FoxP3-Expression gated.

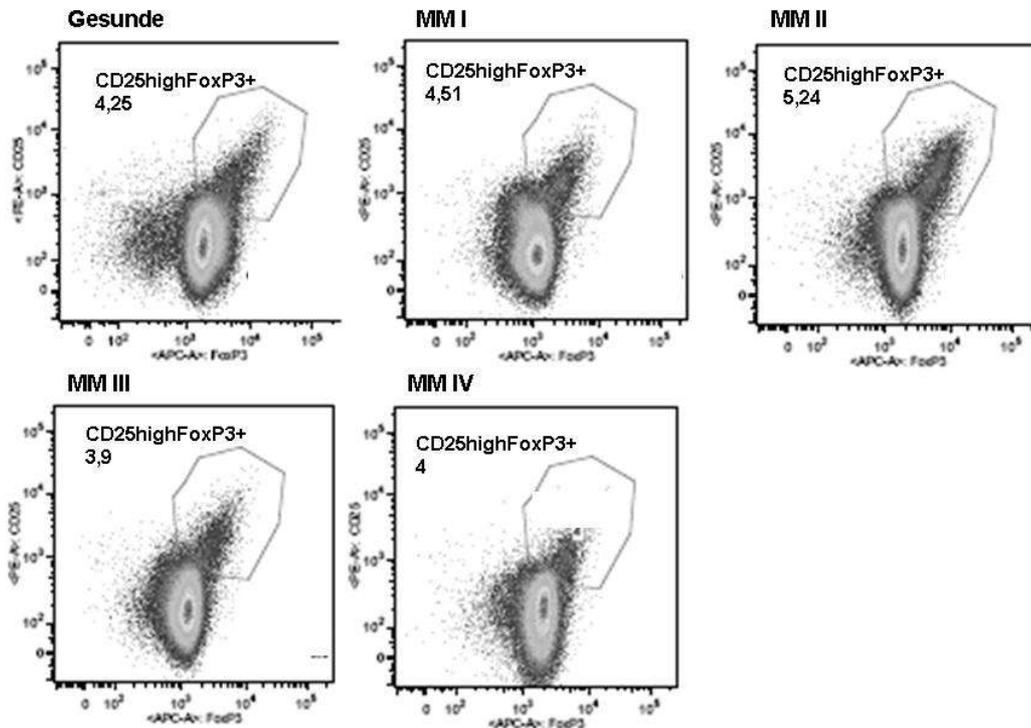


Abb.30: Wiedergabe der FlowJo-Gating-Bilder für jeweils einen ausgewählten Patienten pro Gruppe (Gesunde, MM I – Melanomstadium I, MM II – Melanomstadium II, MM III – Melanomstadium III und MM IV – Melanomstadium IV); gezeigt ist die Expression von CD25 (y-Achse) und FoxP3 (x-Achse)

In der klassischen Darstellungsform der Tregs als CD25highFoxP3+-CD4+-T-Lymphozyten wies die Treganzahl zwischen nicht- und befallenen Wächterlymphknoten in der Gesamtbetrachtung (männliche und weibliche Proben) keinen signifikanten Unterschied auf (Abb.31).

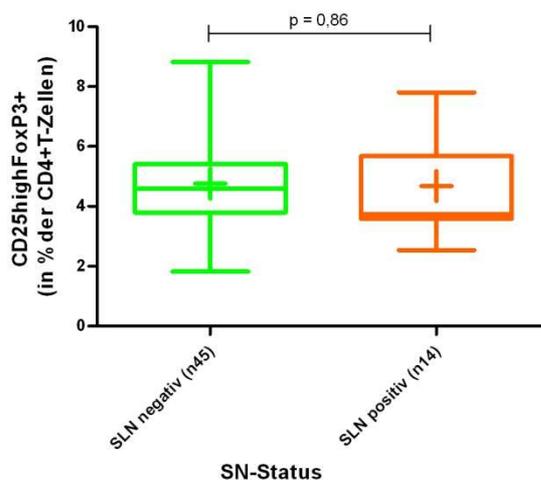


Abb.31 Tregs in Abhängigkeit vom Sentinelstatus: Gezeigt sind die Tregs (CD25highFoxP3+) in % der CD4+-T-Zellen (y-Achse) für die Gruppe der Sentinelnode-Negativen (45 Patientenproben, grün, PBMCs) im Vergleich zur Gruppe der Sentinelnode-Positiven (14 Proben, orange), p-Wert = 0,86 ist nicht signifikant.

Ergebnisse

Ebenso zeigten die weiblichen Melanomstadiumgruppen im Vergleich zu den gesunden Kontrollen keine Differenz in der Treg-Anzahl (siehe Abbildung 32).

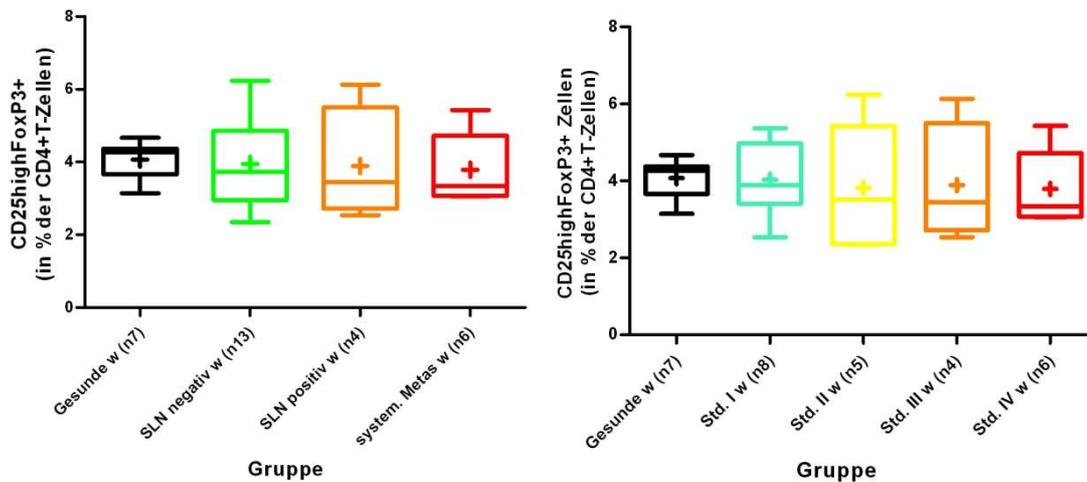


Abb. 32 Darstellung der Tregs (CD25highFoxP3+) in Abhängigkeit vom Melanomstadium (rechts) bzw. vom Sentinelnodestatus (links): dargestellt werden die FACS-Analyse-Daten der weiblichen Patienten. Die Unterschiede in der Anzahl der CD25highFoxP3+-Tregs zwischen den Gruppen sind nicht signifikant.

Für die männlichen Proben ergab sich wiederum eine statistisch signifikant erhöhte Treganzahl der Gruppen gesund, Std.I und SLNnegativ im Vergleich zu Männern mit systemisch metastasiertem Melanom (*Gesunde vs. system.Metas/Std. IV* $p = 0,045$; Mittelwert und SD Gesunde $5,470\% \pm 0,7989$; Mittelwert und SD system. Metas $4,020\% \pm 0,2835$; Differenz zwischen den Mittelwerten $1,45\% \pm 0,6692$; 95 %-Konfidenzintervall 0,03131 bis 2,869; *Std. I vs. IV* $p = 0,043$; Mittelwert und SD Std. I $5,088\% \pm 0,3624$; Mittelwert und SD Std. IV $4,02\% \pm 0,2835$; Differenz zwischen den Mittelwerten $1,068\% \pm 0,5088$; 95 %-Konfidenzintervall 0,03295 bis 2,103; *SLNnegativ vs. system. Metas* $p = 0,031$; Mittelwert und SD SLNnegativ $5,095\% \pm 0,2927$; Mittelwert und SD system. Metas $4,020\% \pm 0,2835$; Differenz zwischen den Mittelwerten $1,075\% \pm 0,4822$; 95 %-Konfidenzintervall 0,1025 bis 2,047) , siehe Abbildung 33.

Ergebnisse

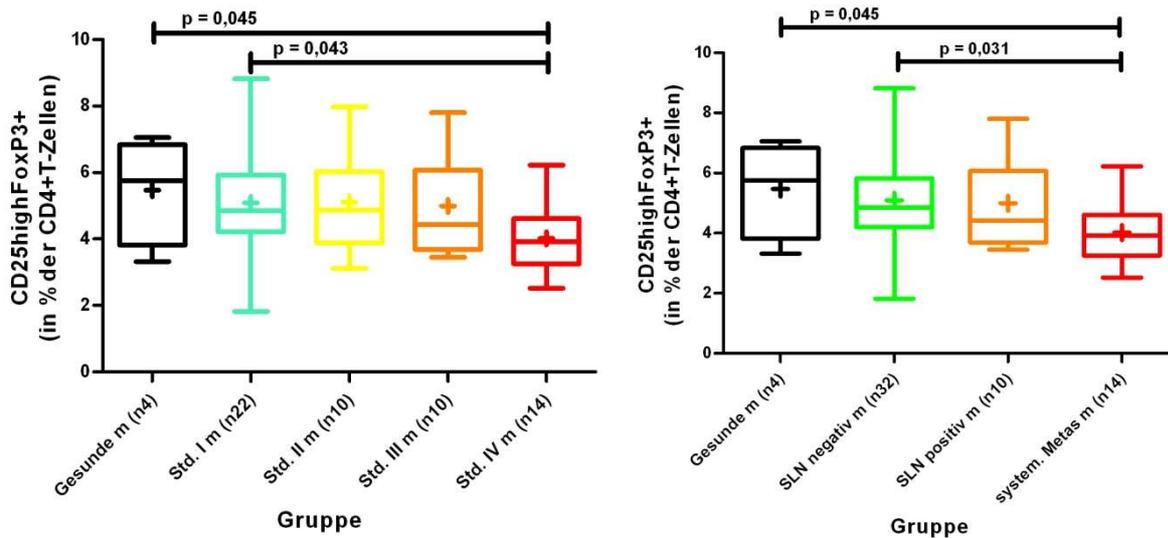


Abb. 33 Darstellung der Tregs (CD25highFoxP3+) in Abhängigkeit vom Melanomstadium (links) bzw. vom Sentinelnodestatus (rechts): dargestellt werden die FACS-Analyse-Daten der männlichen Patienten.

3.2 Analysen von Lymphknotenmaterial mittels PCR

Zur Machbarkeitsüberprüfung der PCR-Methodik der Analyse des demethylierten FoxP3-DNA-Lokus (TSDR) an paraffineingebettetem Lymphknoten-Gewebe wurden 24 Gewebeschnitte von sechs ausgewählten Melanompatienten analysiert. Die klinischen Daten wurden in der Tabelle 7 „Patientenstatistik (Probegewebeschnitte)“ aufgelistet. Die Auswahl dieser Patienten geschah auf Grund ihres befallenen Wächterlymphknotens mit konsekutiv gefolgter CLND und einer Follow-UP-Zeit von 23-71 Monaten nach Erstdiagnose.

Tab. 7: Patientenstatistik (Probegewebeschnitte)

Nr.	Geschlecht	Alter	MM Art	Tumordicke nach Breslow (in mm)	Stadium nach AJCC 2009	FNAC erfolgt/ Ergebnis	SLNB	Tumorlast in mm ²	CLND	Rekurrenz lokal	Metastasen
1	männlich	34	NM	5,50	III C	ja/ positiv	positiv	1,2	1/13	nein	Nein
2	weiblich	77	NM	4,00	III A	ja/ negativ	positiv	0,7	0/21	ja	ja, keine Angaben
3	weiblich	43	SSM	1,89	III B	ja/ positiv	positiv	1,4	1/11	nein	nein
4	männlich	40	ALM	2,00	III C	ja/ positiv	positiv	3,5	5/20	ja	pulmonal, cerebral, suprarenal
5	weiblich	58	ALM	6,00	III B	ja/ negativ	positiv	0,4	0/11	nein	ja, keine Angaben
6	männlich	25	NM	7,00	III B	ja/ positiv	positiv	0,7	0/13	nein	pulmonal, hepatisch, cerebral, cutan

PCR-Analyseergebnisse Expression von FoxP3 DNA in %:

	FoxP3 in %	FoxP3 in %	FoxP3 in %	Mittelwert	Standard- abweichung						
Zu 1	3,919551238	5,263395536	2,341915373	2,93827312	2,493341099	3,597127128	0,379154443	0,91565087	2,73	±1,49	
Zu 2	7,368379105	5,79265604							6,58	±0,79	
Zu 3	0,343010928	7,207294152							3,78	±3,43	
Zu 4	8,975581176	7,905075975	7,660480738						8,18	±0,57	
Zu 5	3,485319898	2,913913019	4,502591759	3,907049656	2,697851621				3,5	±0,66	
Zu 6	5,836974276	7,11729915	7,981339737	6,421476804					6,84	±0,8	

Ergebnisse

Vergleicht man die Tumorlast unter den Patienten und setzt dies in Beziehung zur FoxP3-DNA-Expression lässt sich keine Korrelation nachweisen, Patient Nummer 4 mit einer Tumorlast von 3,5mm² im Wächterlymphknoten exprimiert im Mittel 8% FoxP3-DNA. Rein deskriptiv scheint eine Korrelation zwischen der FoxP3-DNA-Expression des Patienten und seines klinischen Verlaufes in Hinsicht auf die Metastasierung zu bestehen, d.h. Patienten mit hoher Expression wiesen Fernmetastasen auf.

Vergleiche der FoxP3-DNA-Expression zwischen den Gruppen mit negativen Lymphknoten (LKnegativ alle, sowie männlich und weiblich), Lymphknotenbefall durch das Melanom und undefinierte Proben (LK mit unklarem Befall, kein LK evtl. Tumorgewebe aus intransit-Metastasen oder der Nachexzision) ergaben für die Lymphknoten-Negativen versus der Gruppe „Tumorgewebe“ eine signifikant erhöhte FoxP3DNA-Expression ($p = 0,017$; Mittelwert und SD LKnegativ $4,787\% \pm 0,5515$; Mittelwert und SD kein LK/ Tumorgewebe $0,6474\% \pm 0,2682$; Differenz zwischen den Mittelwerten $4,139\% \pm 1,555$; 95 %-Konfidenzintervall 0,8250 bis 7,453), siehe Abbildung 34.

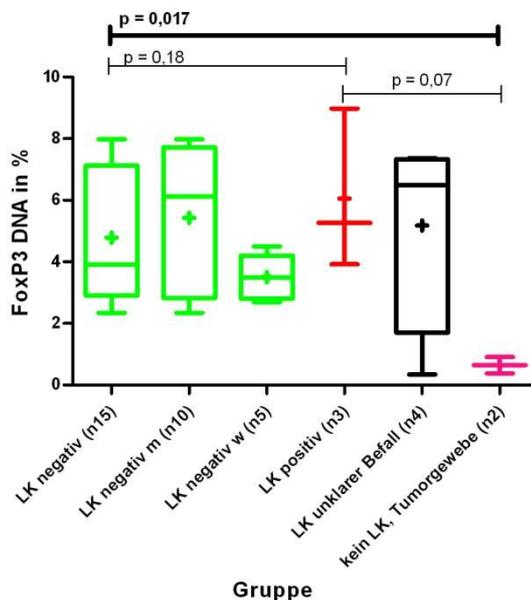


Abb. 34 Darstellung der FoxP3-DNA Expression in Gewebe von Melanompatienten: Aufgeführt sind die Daten von 6 Gruppen (15 nicht vom Melanom befallene Lymphknoten in grün - LK negativ, noch einmal nach Geschlecht unterteilt; 3 befallenen Lymphknoten in rot – LK positiv; 4 Lymphknoten unklaren Befalles und 2 Tumorgewebebeobungen). Die signifikanten Unterschiede bezüglich der Expression sind zwischen den Gruppen nach Analyse fett markiert, die nicht signifikanten dünn.

Nach erfolgreicher Machbarkeitsprüfung, der Möglichkeit der Extraktion von DNA aus Paraffin, wurde aufgrund der Tatsache, dass der PCR-Assay X-linked ist, nur weibliches Gewebematerial zur Bestätigung der Hypothese ausgewählt.

Ergebnisse

Hierfür wurden von 12 Patientinnen jeweils ein Sentinellymphknoten (SLNnegativ) untersucht und von 7 Patientinnen mit Befall von 1-5 Wächterlymphknoten, so dass sich eine Anzahl von 11 befallenen Wächterlymphknoten (SLN+) ergab. Die klinischen Daten wurden in Tabelle 8 „Patientenstatistik (weibliche Lymphknotenschnitte)“ zusammengefasst. Die Follow-Up-Zeit für die klinische Beobachtung der Patientinnen betrug zum Zeitpunkt der Analyse 1-26 Monate.

Ergebnisse

Tab. 8: Patientenstatistik (weibliche Lymphknotenschnitte)

<u>Nr.</u>	<u>Alter</u>	<u>MM Art</u>	<u>Tumordicke nach Breslow (in mm)</u>	<u>Stadium nach AJCC 2009</u>	<u>FNAC erfolgt/ Ergebnis</u>	<u>SLNB</u>	<u>Tumorlast im SLN in mm²</u>	<u>CLND</u>	<u>Rekurrenz lokal</u>	<u>Metastasen</u>	<u>FoxP3 in %</u>
SLNneg 1	66	SSM	0,27	1A	nein	negativ	keine	n.d.	nein	nein	7,688487173
SLNneg 2	28	SSM	3	1A	nein	negativ	keine	n.d.	nein	nein	8,972021594
SLNneg 3	67	SSM	1	1A	ja/ negativ	negativ	keine	n.d.	nein	nein	11,74322695
SLNneg 4	82	SSM	0,4	1A	nein	negativ	keine	n.d.	nein	nein	8,863311971
SLNneg 5	56	SSM	1,2	1B	nein	negativ	keine	n.d.	nein	nein	7,737593824
SLNneg 6	72	SSM	1,35	1B	nein	negativ	keine	n.d.	nein	nein	10,20857994
SLNneg 7	46	SSM	0,65	1A	nein	negativ	keine	n.d.	nein	nein	8,595991022
SLNneg 8	66	ALM	1,8	1B	ja/ negativ	negativ	keine	n.d.	nein	nein	6,148681858
SLNneg 9	43	SSM	2,1	2A	nein	negativ	keine	n.d.	nein	nein	7,592840162
SLNneg 10	70	NM	5,4	2C	ja/ negativ	negativ	keine	n.d.	nein	nein	5,999635245
SLNneg 11	71	SSM	1	1B	nein	negativ	keine	n.d.	nein	nein	5,368492839
SLNneg 12	60	unbekannt	unbekannt	unbekannt	nein	negativ	keine	n.d.	nein	nein	1,714815782
SLNpos 1	31	NM	3,00	2A	ja/negativ	positiv	0,05	0/19	nein	nein	8,298971546
SLNpos 2	80	NM	7,50	3A	ja/negativ	positiv	0,4	0/26	nein	nein	13,09039572
SLNpos 3	66	NM	2,60	3A	nein	positiv	1,19	0/19	nein	nein	5,936431925
SLNpos 4	68	SSM	2,30	3A	ja/negativ	positiv	1,1	0/27	nein	nein	5,198417229
											4,696100407
											4,900442253
											3,897327035
											5,348440947
									nein	hepatisch,	
									nein	pulmonal,	8,458719855
SLNpos 5	65	NM	3,8	3B	ja/positiv	positiv	7	0/24		intransit	
SLNpos 6	64	NM	10	3B	nein	positiv	0,4	0/8	nein	pulmonal	6,897651856
SLNpos 7	46	SSM	2,18	3A	nein	positiv	0,4	0/16	nein	nein	5,803751248

Ergebnisse

Die Daten ließen keine Aufschlüsse bezüglich des Rezidivrisikos und der Langzeitprognose verglichen mit der Expression der FoxP3-DNA zu. Es ergab sich keine Korrelation bezüglich der Tumorlast des befallenen Sentinellymphknotens mit der Expression, synonym der Treganzahl. Ebenfalls korrelierte die FoxP3DNA in % nicht mit dem klinischen Verlauf, v.a. der hämatogenen Metastasierung.

Die untersuchten Gewebeschnitte mittels PCR auf FoxP3DNA wiesen zwischen der Gruppe der nichtbefallenen Sentinellymphknoten (n=12) und der Gruppe mit Befall des SLN (n=11) keine signifikante Differenz in der Expression auf ($p = 0,38$; Mittelwert und SD SN negativ $7,553\% \pm 0,7423$; Mittelwert und SD SN positiv $6,593\% \pm 0,7803$; Differenz zwischen den Mittelwerten $0,9595\% \pm 1,077$; 95 %-Konfidenzintervall -1,280 bis 3,199).

Es zeigte sich lediglich eine Tendenz, dass die Gruppe SLNnegativ mehr Tregs, also eine erhöhte FoxP3DNA-Expression aufwies als die SLNpositive Gruppe, siehe Abbildung 35.

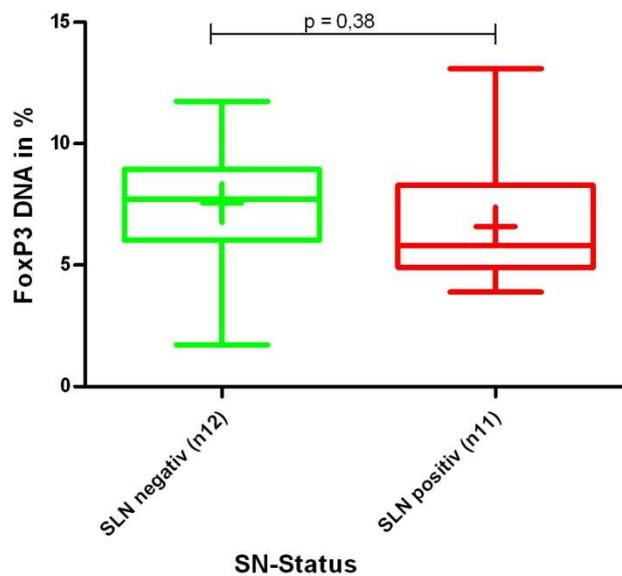


Abb. 35 Darstellung der FoxP3-DNA Expression in Abhängigkeit vom Sentinelstatus: Die Expression zwischen 11 befallenen Sentinelnodes (rot, SLN positiv) und 12 nicht vom Melanom befallenen (grün, SLN negativ) unterscheidet sich nicht signifikant ($p = 0,38$).

3.3 Melanomart

Die Hypothese lautete, dass die Anzahl der regulatorischen T-Zellen sich bei den unterschiedlichen Melanomarten (SSM, NM, ALM, LMM) unterscheidet. Zur Überprüfung erfolgte die Aufarbeitung von Blutproben von Melanompatienten verglichen nach ihrem Primarius mittels Durchflusszytometrie und PCR von Blutproben (PBMC).

Ergebnisse

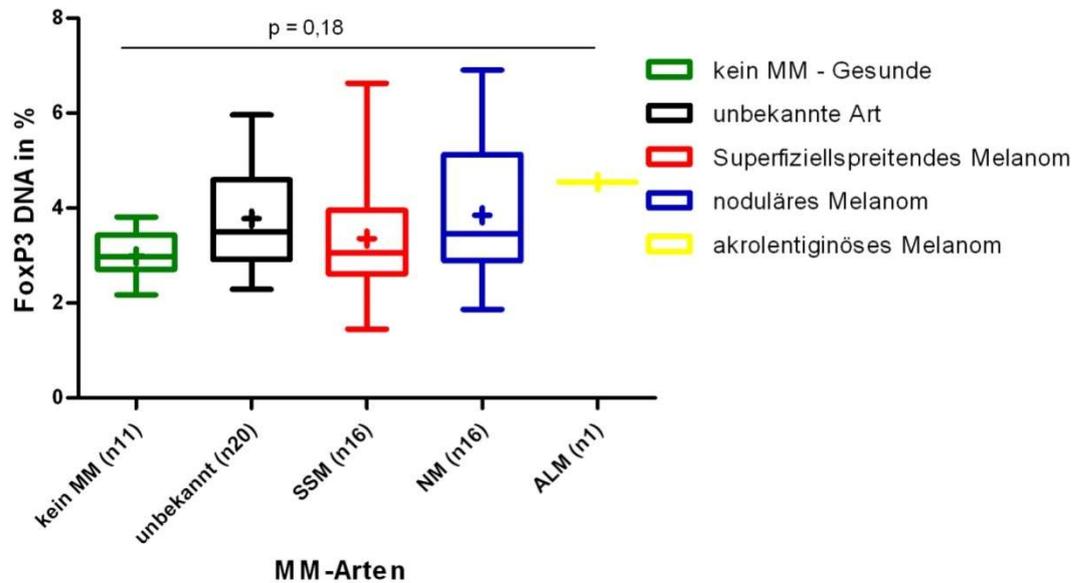


Abb. 36 Darstellung der FoxP3-DNA Expression in Abhängigkeit von der Melanomart: PBMC-Material unterteilt in 5 Gruppen (11 gesunde Kontrollen – kein MM, 20 mit unbekannter Art, 16 mit einem superfiziellspreitenden, 16 mit einem nodulären Melanom und 1 Patient mit einem akrolentiginösen Melanom). Die Unterschiede bezüglich der FoxP3-DNA-Expression sind zwischen den Gruppen nicht signifikant, $p = 0,18$.

Die analysierten Blutproben nach der Art des vorliegenden Melanoms bzw. Primarius unterteilt, wurden bezüglich ihrer FoxP3-DNA Expression in Abbildung 36 dargestellt. Hier zeigte sich allerdings kein signifikanter Unterschied in der Expression, $p = 0,18$. In der FACS-Analyse trat diese Tatsache ebenfalls zu Tage. In Verwendung der häufig genutzten Darstellung der Tregs als CD25highFoxP3+-T-Zellen aufgeteilt nach der Melanomart, ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen, siehe Abbildung 37.

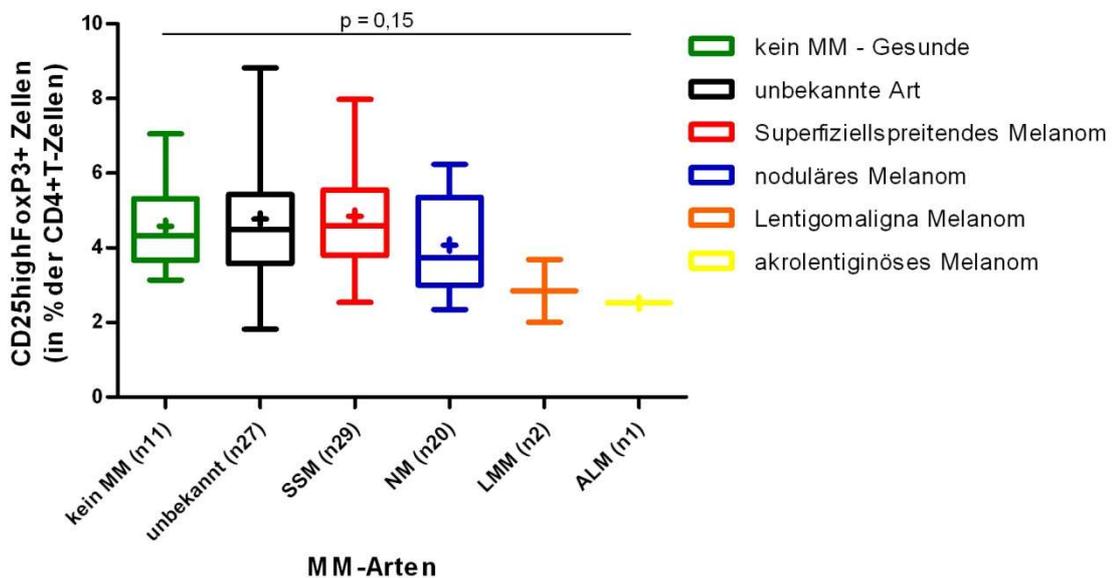


Abb. 37 Tregs (CD25highFoxP3+-T-Zellen) in Abhängigkeit von der Melanomart: Die Unterschiede der FACS-Analyse bezüglich der Treg-Anzahl in % der CD4-T-Zellen zwischen den 6 Gruppen (11 gesunde Kontrollen – kein MM, 27 mit unbekannter Art, 29 mit einem

Ergebnisse

superfiziellspreitenden, 20 mit einem nodulären, 2 mit einem lentigomaligna und 1 Patient mit einem akrolentigenösen Melanom) sind nicht signifikant, $p = 0,15$.

3.4 Differenzierung der regulatorischen T-Zellen

Ziel der Analyse für die Treg-Differenzierung in Treg-Naive-/Effektorzellen und Treg-Memory-Zellen war die Fragestellung, ob es zwischen zunächst gesunden Kontrollprobanden und systemisch metastasierten Melanompatienten einen Unterschied bezüglich der Anzahl gibt. Hierzu wurden PBMCs mittels Durchflusszytometrie analysiert, die Gatingstrategie findet sich in Abbildung 38 für zwei Beispiele dargestellt.

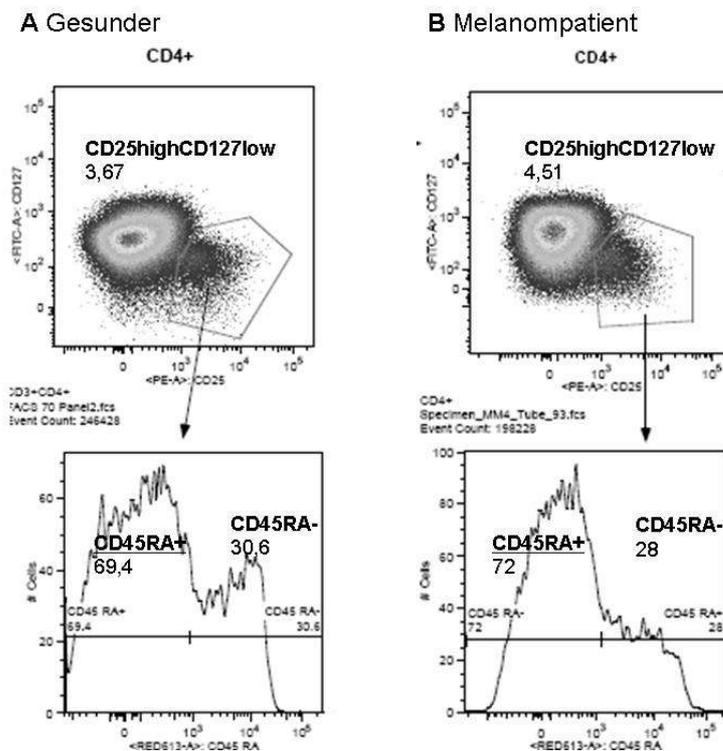


Abb. 38: Treg-Differenzierung bei einem Gesunden links und einem Melanomstadium-IV-Patienten rechts. Die obige Darstellung zeigt die Gatingstrategie der FACS-Analyse mittels FlowJo-Programm. Auf der Y-Achse erscheint CD127 und der x-Achse CD25. Der ausgewählte Kasten markiert die CD25highCD127low-T-Zellen (Tregs), die in der unteren Zeile nach der Expression von CD45RA unterteilt wurden. Die Analyseergebnisse der einzelnen Populationen sind in Zahlen hervorgehoben.

Hierfür wurden Proben von 11 Gesunden und 20 Melanom-Stadium-IV-Patienten verglichen. Die MM-IV-Patientengruppe bestand aus 10 alten und 10 neu akquirierten Proben und wurden hier getrennt (neue MM IV und alte MM IV) sowie zusammengefasst (alle MM IV) aufgeführt. Im Balkendiagramm Abbildung 39 wurden die unterschiedlichen Populationen in ihrer Anzahl dargestellt. Für die Anzahl der CD3+-T-Zellen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gesunden und MM-IV-Patienten ($p = 0,0075$; Gesunde (n11) vs alle MM IV (n20):

Ergebnisse

Mittelwertdifferenz 13,38; 95% Konfidenzintervall 1,721 bis 25,03; Gesunde (n11) vs. alte MM IV (n10) Mittelwertdifferenz 16,29; 95% Konfidenzintervall 2,724 bis 29,86)

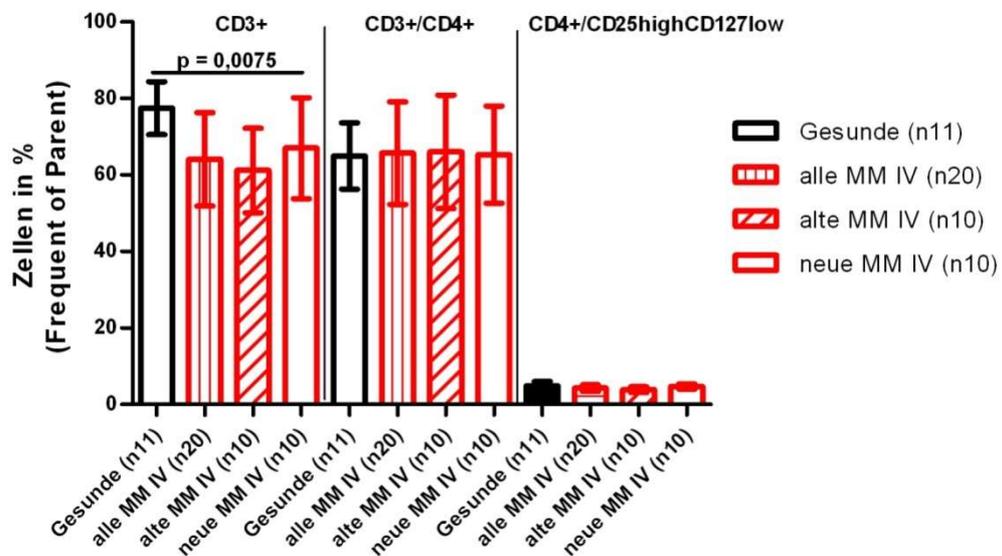


Abb. 39 Darstellung der Ergebnisse der FACS-Analyse von T-Zellen bei Gesunden und Melanompatienten-Stadium-IV: Die Melanompatienten sind unterteilt in neue und alte Proben. Aufführung der Zellen in % (der Ausgangspopulation – frequency of parent) auf der y-Achse für die unterschiedlichen Gruppen (x-Achse) als Balken mit Mittelwert und Standardabweichung vom Mittelwert (SEM). Die linke Spalte zeigt die CD3+-T-Zellen und einen signifikanten Unterschied zwischen diesen 4 Gruppen ($p = 0,0075$). Für die mittlere (CD4+-T-Zellen) und rechte Spalte (CD25highCD127low-Zellen der CD4+-T-Zellen) ist keine statistische Auswertung abgebildet. Die Legende rechts zeigt die Beschreibung der einzelnen Balken sowie die Anzahl (n) der Proben pro Gruppe.

CD25highCD127low-Tregs unterteilt in CD45RApositive-naive/Effektorzellen und CD45RAnegative-Memory-Zellen wurden in den beiden folgenden Boxplotdiagrammen dargestellt.

Gesunde zeigten signifikant mehr Treg-Effektorzellen als die neu akquirierten MM-IV-Patienten ($p = 0,025$; Mittelwert und SD Gesunde $59,20\% \pm 4,650$; Mittelwert und SD MM IV neu $43,35\% \pm 4,250$; Differenz zwischen den Mittelwerten $15,85\% \pm 6,3$; 95 %-Konfidenzintervall 2,713 bis 29) sowie signifikant weniger Memory-Zellen als die oben genannte Vergleichsgruppe ($p = 0,021$; Mittelwert und SD Gesunde $40,80\% \pm 4,650$; Mittelwert und SD MM IV neu $56,65\% \pm 4,250$; Differenz zwischen den Mittelwerten $15,85\% \pm 6,3$; 95 %-Konfidenzintervall -29 bis -2,713), siehe Abbildung 40-41.

Interessant ist bei beiden Tregsubpopulationen der signifikante Unterschied in der Zellfrequenz bezüglich alter und neuer MM-IV-Patienten (*Treg-Effektorzellen MM IV alt vs. MM IV neu* $p = 0,0015$; Mittelwert und SD MM IV alt $67,96\% \pm 5,197$; Mittelwert und SD MM IV neu $43,35\% \pm 4,250$; Differenz zwischen den Mittelwerten

Ergebnisse

24,61% ± 6,663; 95 %-Konfidenzintervall 10,67 bis 38,56; und *Tregmemoryzellen* MM IV alt vs. MM IV neu $p = 0,0015$; Mittelwert und SD MM IV alt 32,04% ± 5,196; Mittelwert und SD MM IV neu 56,65% ± 4,250; Differenz zwischen den Mittelwerten 24,61% ± 6,663; 95 %-Konfidenzintervall -38,56 bis -10,67).

Alte und neue MM IV-Proben zusammengefasst ergaben keinen Unterschied in der betrachteten Zellpopulation im Vergleich zur Gruppe der Gesunden.

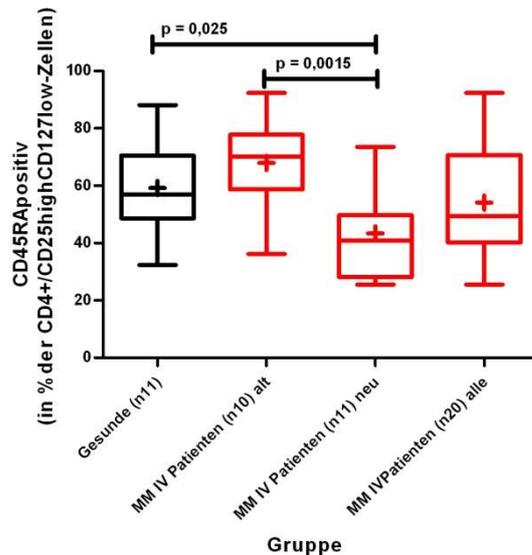


Abb.40: Darstellung der Ergebnisse der FACS-Analyse für „Naive bzw. T-Effektorzellen unter den Tregs“ von PBMC-Material Gesunder und Melanompatienten Stadium IV. Die Melanompatienten sind unterteilt in neue und alte Proben. Aufführung der CD45RApositiven-Zellen in % (der Ausgangspopulation – CD4+/CD25highCD127low-Zellen) auf der y-Achse für die unterschiedlichen Gruppen (x-Achse) als Boxplots.

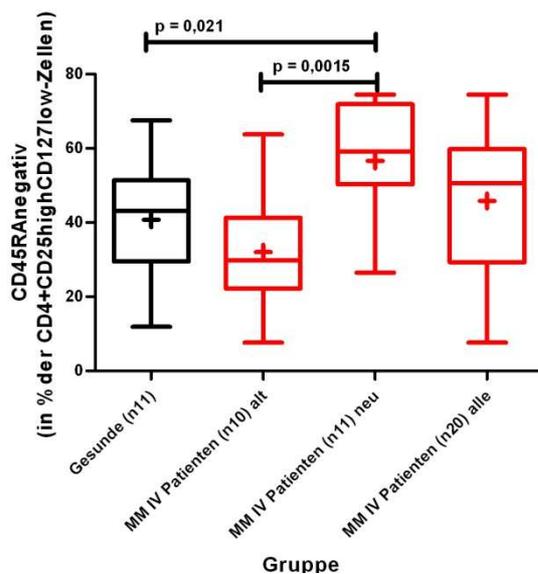


Abb. 41: Darstellung der Ergebnisse der FACS-Analyse für „Memory-Zellen unter den Tregs“ von PBMC-Material Gesunder und Melanompatienten Stadium IV. Die Melanompatienten sind unterteilt in neue und alte Proben. Aufführung der CD45RAnegativen-Zellen in % (der Ausgangspopulation – CD4+/CD25highCD127low-Zellen) auf der y-Achse für die unterschiedlichen Gruppen (x-Achse) als Boxplots.

3.5 Regulatorische Monozyten

Zu untersuchen war, ob Melanom-Stadium-IV-Patienten eine erhöhte Anzahl von regulatorischen Monozyten des Subtyps CD14+HLA-DRlow im Vergleich zu Gesunden haben, welches bei Blutproben (PBMC) mittels Durchflusszytometrie untersucht wurde.

Für die Untersuchung der Hypothese wurden PBMC von 11 gesunden Probanden und 20 Melanomstadium-IV-Patienten nach Panel2 gefärbt, siehe hierzu auch Abbildung 42 der Gatingstrategie. Die Färbung von einer Probe der neuen MM-IV-Patienten misslang, weshalb nur 9 neue MM-IV-Patienten im Folgenden aufgeführt wurden. Zunächst wurden aus den lebenden Zellen die CD3negativen-Monozyten bezüglich der CD14-Expression analysiert.

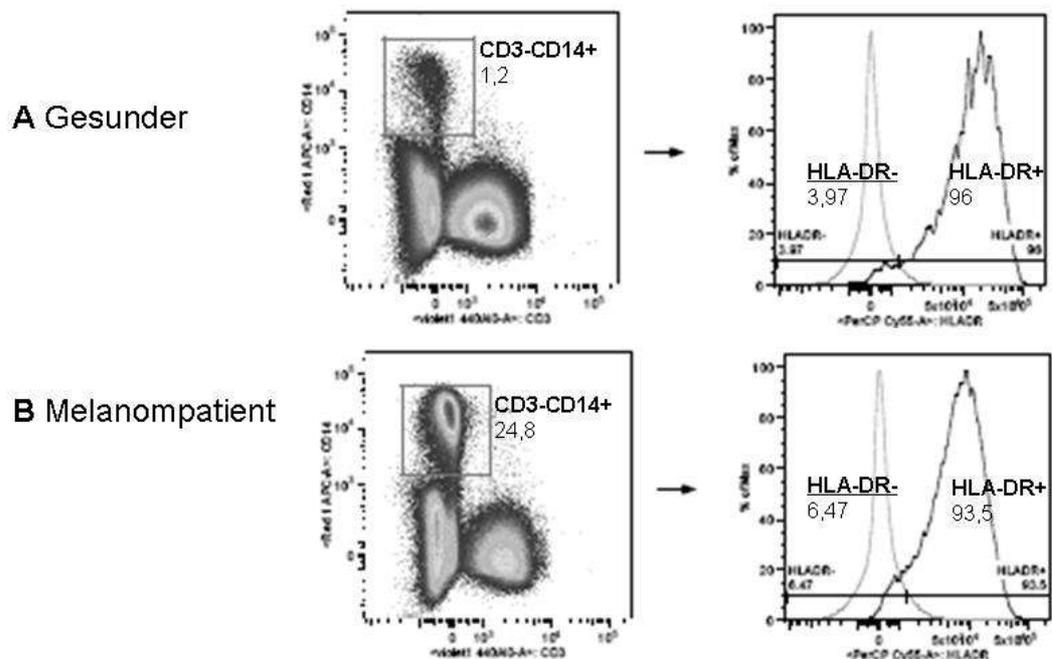


Abb.42: Gatingstrategie für die Monozyten mit FlowJo gezeigt für ein gesundes (A) und ein krankes Daten-Exemplar (B); in der rechten Spalte ist die Expression der Zellen für CD14 (y-Achse) und CD3 (x-Achse) angegeben, die Rechtecke umranden die CD3negativenCD14positiven Monozyten, in ihrer Anzahl als Ziffer wiedergegeben, diese CD3-CD14+Subpopulation wurde nach der HLA-DR-Expression (x-Achse) im linken Histogramm unterteilt, die aufgeführten Ziffern zeigen die % der Expression an.

Hier wiesen die Melanompatienten signifikant mehr CD14positive-Zellen unter den CD3negativen Monozyten auf als die Gesunden ($p = 0,0014$; Mittelwert und SD Gesunde $1,105\% \pm 0,2436$; Mittelwert und SD alle MM IV $7,245\% \pm 1,297$; Differenz zwischen den Mittelwerten $6,139\% \pm 1,727$; 95 %-Konfidenzintervall 9,676 bis 2,603), siehe Balkendiagramm Abbildung 43.

Ergebnisse

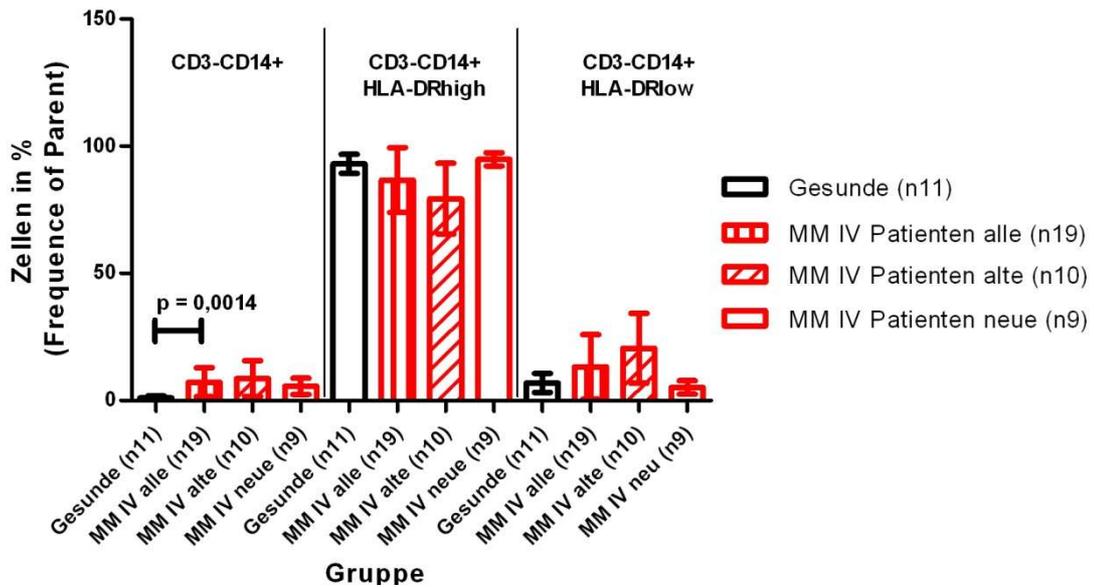


Abb. 43: Darstellung der Ergebnisse der FACS-Analyse von PBMC Gesunder und Melanompatienten Stadium IV. Die Melanompatienten sind unterteilt in neue und alte Proben. Aufführung der Zellen in % (der Ausgangspopulation – frequency of parent) auf der y-Achse für die unterschiedlichen Gruppen (x-Achse) als Balken mit Mittelwert und Standardabweichung vom Mittelwert (SEM). Die linke Spalte zeigt die CD3negativen-Zellen und zwischen den gesunden und allen Melanomstadium-IV-Patienten einen signifikanten Unterschied ($p = 0,0014$). Die mittlere und rechte Spalte zeigen die nach HLA-DR-Expression unterteilten Monozyten. Die Legende rechts zeigt die Beschreibung der einzelnen Balken sowie die Anzahl (n) der Gruppen.

Weiterhin wurde diese Zellpopulation (CD14+) nach ihrer HLA-DR-Expression ausgewertet. Wie in Abbildung 44 gezeigt, war der Anteil der CD14+HLA-DRlow Monozyten signifikant höher bei Melanompatienten als bei Gesunden (*Gesunde vs. MM IV-Patienten alt* $p = 0,0052$; Mittelwert und SD Gesunde $6,966\% \pm 1,134$; Mittelwert und SD alte MM IV $20,57\% \pm 4,353$; Differenz zwischen den Mittelwerten $-13,60\% \pm 4,308$; 95 %-Konfidenzintervall 22,62 bis 4,584), für die anderen Melanomgruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Ergebnisse

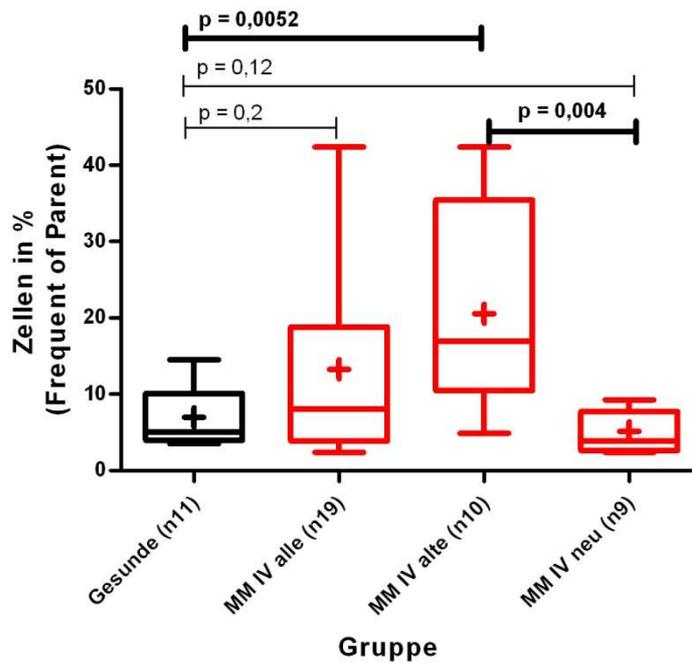


Abb. 44: Wiedergabe der Zellanzahl des Monozytensubtypes CD14+HLA-DRlow in % der CD3negativen Zellen bei Gesunden und Melanomstadium-IV-Patienten als Boxplots. Die p-Werte sind signifikant fett und nicht signifikant dünn hervorgehoben.

Ebenfalls unterschieden sich die HLA-DRlow-Monozyten zwischen den alten Proben im Vergleich zu den neuen Melanomstadium-IV-Proben signifikant, die alten Proben wiesen mehr Monozyten des Subtypes CD14+HLA-DRlow auf ($p = 0,004$; Mittelwert und SD alte MM IV $20,57\% \pm 4,353$; Mittelwert und SD neue MM IV $5,131\% \pm 0,8753$; Differenz zwischen den Mittelwerten $15,44\% \pm 4,676$; 95 %-Konfidenzintervall 5,569 bis 25,30), gleiches zeigte sich in Betrachtung der Mean-Fluoreszenz-Intensity (MFI) dieser Subpopulation ($p = 0,0001$, Mittelwert und SD MM IV alt $849,7 \pm 91,46$; Mittelwert und SD MM IV neu $361,7 \pm 13,69$; Differenz zwischen den Mittelwerten $488,0 \pm 97,55$; 95 %-Konfidenzintervall 282,2 bis 693,9), siehe Abbildung 44-45.

Die MFI der Gesunden stellte sich als signifikant höher dar im Vergleich zu der Gruppe „neue MM IV“ ($p = 0,013$; Mittelwert und SD Gesunde $927,7 \pm 185,9$; Mittelwert und SD MM IV-Patienten neu $361,7 \pm 13,69$; Differenz zwischen den Mittelwerten $566,1 \pm 206,9$; 95 %-Konfidenzintervall 131,4 bis 1001), siehe Abbildung 45.

Ergebnisse

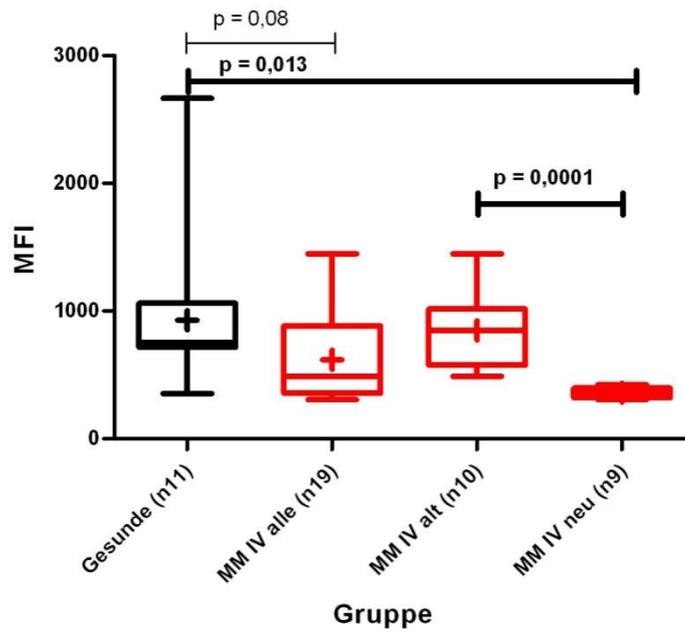


Abb. 45: Darstellung der Mean-fluorescence-intensity (MFI) des Monozytensubtypes CD14+/HLA-DRlow bei Gesunden und Melanomstadium-IV-Patienten.

4 Diskussion

Es ist bekannt, dass die regulatorischen T-Zellen in Tumoren vorkommen, so auch beim malignen Melanom [67]. Die Bedeutung von Tregs für die Prognose der Tumorpatienten gilt als unbestritten [63, 92].

Ziel dieser Arbeit war, es die Beziehung zwischen der Anzahl der regulatorischen T-Zellen und dem Tumorstadium beim Malignen Melanom sowie unterschiedliche Bestimmungsverfahren zu ergründen.

4.1 Methodenkritik

Zur Analyse des Materials wurden zwei Methoden eingesetzt, zum einen die **Durchflusszytometrie** nach Färbungen von verschiedenen extrazellulären Markern (CD3, CD4, CD25, CD127, HLA-DR, CD14) bzw. einem intrazellulären Marker (FoxP3) sowie die **realtime-PCR** zur Bestimmung der Expression des demethylierten FoxP3-DNA-Locus auf Chromosom 11, welche gleichgesetzt wurde mit der Treg-Anzahl. Für die Methoden wurden zwei unterschiedliche Materialien eingesetzt. Zum einen handelte es sich um leicht gewinnbares Blut, welches in geringer Menge entnommen wurde, um einen Schaden am Probanden zu vermeiden und zum anderen um archiviertes Lymphknotenmaterial, welches bei notwendigen therapeutischen Interventionen bei Melanompatienten asserviert wurde.

Die Aufarbeitung des Blutes erfolgte ohne großen Zeitverzug, so dass ein Verlust von wertvollem Zellgut nahezu auszuschließen ist.

Für die **Durchflusszytometrie** (FACS-Analyse) erfolgte ein umfangreiches Färbeprogramm mit vielen Markern, eine mögliche Interaktion untereinander und eine Überlagerung in der Messung ist nicht vollkommen vermeidbar. Eine Instabilität des biologischen Materials ex vivo und eine Ambiguität der Marker stellt bei FACS-Analysen immer ein Problem dar [77]. Die Messung von mit Panel 1-gefärbten Zellen gestaltete sich schwieriger, da es häufiger zu einer Verstopfung des Ansaugkanals mit Reduzierung der zu messenden „events“ kam. Dies beruhte vermutlich auf einer Akkumulation der gefärbten Zellen, die durch Vortexen und Zusatz von Flebogamma aufgehoben werden konnte und ein Fortsetzen der Messung ermöglichte (events > 250.000). Die Analyse von Panel 1 am FACS-Canto II geschah aus organisatorischen Gründen am Folgetag nach der Färbung (ca. 16 Stunden später) und ist für Wiederholungen kritisch zu überdenken [93]. Sie sollte möglichst direkt nach der Färbung erfolgen. Ebenso wie die FACS-Analyse eine zeitliche

Diskussion

Schwankung bzw. Unbeständigkeit in den gemessenen Daten auf [67]. Dies stellt für die Methodik FACS ein bedeutendes Problem dar. Es scheint, als wären die Färbungen und somit Expressionen, v.a. der extrazellulären Marker, großen Schwankungen ausgesetzt, was an unterschiedlichen Temperaturen, Messbedingungen, Geräteeinstellungen am FACS-Gerät, evtl. unbeabsichtigter Lyse der Zellen, Verunreinigungen und somit Verfälschung des Datenmaterials liegen könnte. Strenge Untersuchungs- und Messkriterien mögen dies nur zu einem Teil unterbinden können. Die zeitaufwändigen Färbeprotokolle berücksichtigen meist nicht die biologische Aktivität der Zellen und führen auch so zu einem Verlust an Information [94].

Ein großer Vorteil der **PCR** ist die Beständigkeit der DNA-Merkmale und unterstreicht die Verwendung dieser Methodik in der vorliegenden Arbeit.

Mit der speziellen PCR, die hier angewandt wurde, gelang ein vollständiger Ausschluss von T-Helferzellen, die durch TGF-beta zur FoxP3-Expression stimuliert wurden, anhand des Methylierungsmusters [77]. Die TSDR-Region bei natürlichen Tregs ist auch bei lysierten Zellen ein stabiler Marker und somit unabhängig von Lagerungs- und Untersuchungsbedingungen. Mit der Methode können vielfältigste Materialien untersucht werden, v.a. in geringer Menge (μl) [81]. Eine Schwäche des Assays besteht darin, dass neben natürlichen Tregs auch 1-2 % der B-Lymphozyten den demethylierten FoxP3-TSDR-Lokus aufweisen. Da die B-Lymphozyten allerdings nur einen verschwindend geringen Teil aller Leukozyten ausmachen, wirkt sich oben beschriebene Tatsache nicht entscheidend auf die Resultate der analysierten Proben aus (lediglich eine Varianz von ca. 0,0001 %) [91].

Für die Monozytenfärbungen zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen alten und neu akquirierten Proben, zum Teil genau gegensätzliche Daten. Dies lässt sich nur durch die lange Lagerung der alten PBMC im Stickstofftank und einer wahrscheinlichen Lyse der Zellen erklären, die zu unterschiedlich gemessenen Expressionen der v.a. extrazellulären Marker führten. Durch Verwendung des Death-Live-Kits (Invitrogen) zum Ausschluss von toten Zellen, konnte dies nur zum Teil korrigiert werden. Ziel für folgende Analysen der Monozyten sollte es sein, relativ frische Proben zu gewinnen und ohne Zeitverzug zu analysieren. Ziegler-Heitbrock et al. empfehlen in ihrer Zusammenfassung der Konferenz „Definition of Human Blood Monocytes“ im Oktober 1999 die Analyse von Monozyten in Vollblut, da

nachfolgende Prozeduren der Aufarbeitung zur Veränderung der Zelloberfläche führten [86].

4.2 Regulatorische T-Zellen

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt in der Betrachtung der regulatorischen T-Zellen. Die Verwendung von Blut und Lymphknotenmaterial erschien sinnvoll, da Ersteres gut gewinnbar und Letzteres vor allem für die Klassifikation des Malignen Melanoms von großer Bedeutung ist. Hierfür wurden, wie bereits ausführlich erläutert, und im Gegensatz zu den häufigen anderen Studien, die nur immunhistochemische Färbungen oder FACS-Analysen allein durchführten [46, 95] sowohl FACS- als auch PCR-Analysen vorgenommen.

Eine Besonderheit stellt die Analyse von klinischen Stadien und Subtypen der Melanome sowie die Unterteilung der Geschlechter dar. Der Vergleich mit der Klinik der Patienten, v.a. beim Lymphknotenmaterial, ist in den vorliegenden Studien eher eine Seltenheit. Zum Teil wurden die Melanompatienten nicht unterteilt, sondern als eine homogene Gruppe betrachtet und mit Gesunden verglichen [96] bzw. erst ab einem fortgeschrittenen Stadium betrachtet [67, 91].

Die **Ausgangshypothese**, dass die Treg-Anzahl mit zunehmendem Tumorstadium bzw. mit Befall des Wächterlymphknotens durch Melanomzellen steigt, konnte in keiner der hier durchgeführten Analysen vollständig bestätigt werden.

Die **PCR-Analyse von PBMC** zeigte, für alle Proben betrachtet, eine Tendenz, dass die Patienten mit Befall des Wächterlymphknotens (SLN positiv) mehr FoxP3-DNA-Expression (als Marker für die Anzahl der Tregs) aufwiesen als die Wächterlymphknoten-negativen-Melanompatienten (SLN negativ). Nur für die Proben von Männern hinsichtlich dieser Fragestellung zeigte sich eine statistische Signifikanz ($p = 0,049$).

Die Gruppe von Wieczorek konnte 2009 mit dem gleichen PCR-Ansatz (wie in dieser Arbeit verwendet) aufzeigen, dass Melanompatienten Stadium IV vor und nach Interleukin-2-Therapie dreifach höhere Werte an Tregs gegenüber Gesunden aufwiesen. Die Fallzahl ist aufgrund der Intervention mit Zytokinen allerdings gering [91]. Weitere Studien zur PCR-Methodik an Hand von PBMC von Melanompatienten sind rar.

Bei Betrachtung der Ergebnisse der **FACS-Analysen für die Tregs** anhand von PBMC, egal ob für die gesamte Gruppe oder nach Geschlechtern unterteilt, wird die Ausgangshypothese widerlegt.

Viguier et al. zeigten 2004 neben ihren Daten mit Lymphknotenmaterial für den Vergleich von PBMC Gesunder mit denen von Melanompatienten bezüglich der Treg-Zahl keinen Unterschied [66].

Die hiesigen statistisch signifikanten Daten stehen den bislang Veröffentlichten konträr gegenüber. Hier wiesen die Anfangsstadien und die Gesunden mehr Tregs auf als die fortgeschrittenen Melanomstadien.

Vor allem bei den Proben von Männern wurde dies deutlich, was allerdings auch an der höheren Fallzahl liegen könnte.

Für die CD25^{high}CD127^{low}FoxP3⁺-Tregs stellte sich ein signifikanter Unterschied in der Anzahl zwischen den Gesunden und Melanom-Stadium-IV-Patienten dar. Diese statistische Signifikanz mündet hier allerdings keineswegs in klinische Relevanz. Die Unterscheidung von Gesunden und Kranken wird vorrangig klinisch und nicht laborparametrisch getroffen. Die Detektion von Tregs bei Gesunden hätte in der klinischen Realität keinen diagnostischen Wert.

Die Analyseergebnisse zeigten insbesondere für die männlichen Proben zwischen den Gruppen bzw. Melanomstadien signifikante Differenzen. Eine pathomechanistische Erklärung bleibt offen. Auffallend jedoch ist, dass die Anzahl von männlichen Kranken die der weiblichen deutlich übersteigt. Ist dies im Sozialverhalten begründbar (Körperbewusstsein, Verwendung von Sonnencreme etc.), liegt dem eine genetische Ursache zu Grunde oder ist es der Testmethodik geschuldet? Ursächlich könnte auch eine Rolle spielen, dass die Lokalisation des Primarius bei Frauen die Extremitäten und bei Männern vorwiegend den Rumpfbereich einschließt [97]. Melanome werden häufiger von Frauen früh und vor allem selbst entdeckt. Sind dann meist noch dünner oder in-situ-Tumore. Melanome bei Männern sind häufig dicker und später entdeckt, eine Tumordicke von >1mm überschreitend und müssen im weiteren Verlauf stationär behandelt werden.

Studien, die höhere Treg-Anzahlen aufweisen mit höherem Tumorstadium:

Die derzeitigen Ergebnisse basieren vor allem auf FACS-Analysen von CD4+CD25highFoxP3+-Zellen bzw. CD4+CD25high-T-Zellen, z.B. dargestellt als Tregs in der Abbildung 46 [98].

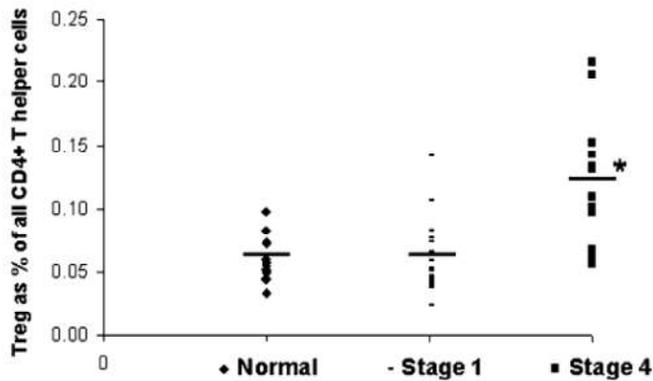


Abb. 46 modifiziert nach McCarter et al. 2007 [98]: Zeigt den Prozentsatz der Tregs in Abhängigkeit vom Melanomstadium verglichen mit Gesunden.

Anita Correll wies mit FACS-Analysen von PBMC von Gesunden und Melanompatienten aller Stadien einen signifikanten Unterschied vor allem zwischen den Gesunden und Melanomstadium-IV-Patienten in der Treg-Anzahl nach (hier CD4+FoxP3+, CD4+CD25+FoxP3+ und CD4+CD127lowFoxP3+, siehe dort Figure 2 [99]). Limitation dieser Studie ist zum einen die geringe Fallzahl und die einseitige Analyse von nur PBMCs.

Amazadeh et al. ermittelte 2008 mittels FACS ein erhöhtes Auftreten von CD4+FoxP3+-T-Zellen (25,8%, range 5,8-61%) im Melanom-Tumorgewebe (n26) im Vergleich zum peripheren Blut derselben Patienten (7,7%, 2,5-17,1%) [100]. Diese Melanompatienten zeigten im peripheren Blut im Vergleich zu Gesunden mehr Tregs (7,7% vs. 4,9%).

Bei Melanompatienten im Stadium III und IV entdeckte die Gruppe um Camilla Jandus mittels FACS 1,7fach höhere CD4+FoxP3+-Zellen als bei gesunden Kontrollen sowie einen Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Proben, welcher evtl. in der Regulation der Steroide begründet liegt. Weiterhin zeigten die präsentierten Daten eine Erhöhung der Tregs in Lymphknoten im Vergleich zum Blut (PBMCs), welches durch eine verstärkt stattfindende Akkumulation der Tregs im Tumorgebiet erklärt wird [67].

In der Studie von Ascierto im Jahre 2010 wiesen Tumorpatienten ebenfalls mehr CD4+CD25highFoxP3+-Tregs auf als Gesunde. Mit zunehmendem Tumorstadium

Diskussion

ließ sich lediglich ein Trend in der Treg-Anzahl, aber kein signifikanter Anstieg feststellen. Interessanterweise kam es nach Interferon-alpha-2b-Therapie zu einem Abfall der zuvor gemessenen Tregs [101]. Hier handelte es sich um eine seltene Veröffentlichung mit Bezug zum klinischen Verlauf der Melanompatienten, allerdings mit einer limitierten Fallzahl, was die Autoren selbst kritisierten.

Giovanni Cesana veröffentlichte 2006 folgende Resultate: Verglichen wurden in PBMC-Material Gesunde und Melanompatienten im Stadium IV sowie metastasierte Nierenzellkarzinompatienten bezüglich ihrer Anzahl an CD4+CD25high-Tregs mittels FACS-Analysen. Es konnte gezeigt werden, dass Melanompatienten mehr Tregs aufwiesen als Gesunde (7,75% versus 2,24%) und diese durch Interleukin-2-Hochdosistherapie abfielen. Die Verwendung eines Markers (CD25) lässt allerdings keine Aussage zu, ob es sich um transiente Tregs handelte oder um Natürliche. Die Analyse von intrazellulär exprimiertem FoxP3 zeigte keine Unterschiede zwischen den genannten Gruppen [102].

Des Weiteren stellten immunhistochemische Färbungen auf FoxP3 heraus, dass intratumorale Läsionen mehr Tregs (27%) im Vergleich zu peritumoralen Regionen (Stroma mit 17,4%) enthielten. Hierbei handelte es sich um die Betrachtung von Melanommetastasen. Dies widerspricht den Daten von Loddenkemper et al. (Untersuchung anderer Gewebe), unterstützt aber die These von Miracco et al., die bei Primärtumoren mehr Tregs (definiert als CD4+CD25+FoxP3+) im Tumorparenchym als in der Peripherie nachwies. Diese Arbeitsgruppe verglich die Resultate der IHC-Färbung mit dem klinischen Verlauf [48, 89]. Melanompatienten wurden hierzu in zwei Gruppen unterteilt. Die eine wies im Verlauf Metastasen auf, also eine klinische Rezidivierung, die mit einer erhöhten Anzahl an Tregs im Primarius korrelierten.

Nicht nur für das Melanom sind erhöhte Treg-Anzahlen mit dem Fortschreiten des Tumors beschrieben, sondern ebenso für das Magen-, Mamma-, Bronchial- und Ovariakarzinom [66, 68, 82, 103].

Barnett B und Curiel TJ wiesen 2005 mittels FACS-Analysen in Aszitesproben (n45) von Ovariakarzinompatientinnen CD4+CD25high-Tregs nach, die mit zunehmendem Tumorstadium anstiegen. Anhand von mikroskopischen Untersuchungen am Ovarialtumorgewebe zeigten sich in dieser Studie ebenfalls erhöhte Zellzahlen an

Diskussion

Tregs. Sie gaben Werte im Mittel von 25,3 % Tregs im Blut an, die nach Therapie mit ONTAK auf 17,7 % fielen [104]. In Anbetracht der Tatsache, dass die Tregs ein Zehntel aller T-Lymphozyten im Mittel ausmachen [105] und diese als Gesamtpopulation (plus B-Lymphozyten) ca. 20-25 % aller Leukozyten, erscheinen die Daten extrem hoch. Die Verwendung von unterschiedlichen Materialien verwirrt zudem. Zunächst existiert maligner Aszites klinisch nur im fortgeschritten metastasierten Tumorstadium und ist leider häufig das erste Symptom (Bauchumfangszunahme) bei Ovarialkarzinombetroffenen. Für die klinischen Versuche mit ONTAK verwendeten sie allerdings zum Tregnachweis plötzlich Blut als Material. Insgesamt bleibt ein Vergleich mit gesunden Probanden bezüglich der Treganzahl aus.

Andrew Rech und Kollegen zeigten wiederum mittels FACS einen Abfall von Tregzellen im Blut bei Mammakarzinompatientinnen (Stadium IV, n23) nach einmaliger intravenöser Impfung mit einem Anti-CD25-Antikörper (hier Daclizumab). Zuvor zeigten die Gesunden (n14) 3,2% CD4+CD25highFoxP3+-Tregs im Vergleich zu den Kranken mit 6,6% im Mittel. Sie äußerten, dass im Intervall des Treg-Nadir „Krebs-Antigen-Vakzine“ effektiver sein könnten als bislang belegt [70].

Wie lassen sich die konträren Ergebnisse dieser Arbeit für die regulatorischen T-Zellen im Vergleich zur einschlägigen Literatur erklären, vor allem für die FACS-Analyse?

In Anbetracht der Tatsache, dass es mittels der FACS-Methodik schwer ist, die aktivierten transient FoxP3-exprimierenden T-Helferzellen von den natürlichen Tregs zu unterscheiden und in Hinsicht auf die bereits demonstrierten methodischen Schwächen handelt es sich höchstwahrscheinlich um falsch hohe Zahlen für die Tregs.

Zur Unterscheidung von aktivierten T-Zellen (FoxP3+) ohne suppressorische Funktion und natürlichen Tregs schlagen Ilona Kryczek und Kollegen in ihrer Studie die zusätzliche Verwendung eines Zytokinprofils vor [106]. Dies ist allerdings sowohl aufwendig als auch kostspielig. Es wird in ihrer Arbeit auch nicht deutlich, welches Tumormaterial verwendet wurde – Primärtumormaterial oder Metastasen von Melanompatienten und den anderen betrachteten Tumorarten.

4.3 Analyse von Lymphknotenmaterial mittels PCR

Die prognostische Bedeutung der **Lymphknoten** bei Melanompatienten legt die Beschäftigung mit diesem Material nahe. Retrospektives in Paraffin eingebettetes Gewebe wurde **mittels PCR** auf den Gehalt an natürlichen Tregs (speziell: Expression von demethylierter FoxP3-DNA) analysiert. Anhand der vorliegenden Daten konnte keine Korrelation zwischen der Anzahl der regulatorischen T-Zellen und dem klinischen Verlauf der Melanompatienten, v.a. die Betrachtung des Rezidivrisikos und der Langzeitprognose gefunden werden. Die eingeschlossene Fallzahl in dieser Arbeit erscheint allerdings zu gering für eine abschließende Aussage.

Ebenso ergab sich kein Hinweis auf eine Beziehung zwischen der Tumorlast des Sentinellymphknotens und der FoxP3DNA-Expression.

Die Hypothese, dass vom Melanom befallene Wächterlymphknoten mehr Tregs aufweisen als Nicht-befallene konnte mittels PCR-Methodik nicht bestätigt werden. Zwischen beiden Gruppen stellte sich kein signifikanter Unterschied dar.

Viguier et al. erbrachten den Nachweis jedoch mittels FACS-Analyse, dass in Lymphknoten von Melanom-Stadium-III-Patienten (n12, mit Befall von Lymphknoten) gegenüber Lymphknotennegativen (CD4+CD25high-Tregs bei LNpositiven $11,06 \pm 1,7\%$ versus LNnegative $6,2 \pm 4,2\%$, $p = 0,0006$) eine erhöhte Anzahl von FoxP3+-Tregs nachzuweisen ist, was sie als Zeichen der Akkumulation der Tregs im Tumorgebiet deuteten [66].

Die Tendenz in der vorliegenden Arbeit, dass die Gruppe der SLNnegativen sogar mehr Tregs aufwies als die SLNpositive, könnte darin begründet sein, dass generell bei Tumorbefall des Lymphknotens die Architektur zerstört vorliegt und das lymphatische Gewebe durch die Melanomzellen verdrängt wurde, was auch Knol et al. vermuteten. Die quantitative real-time PCR zeigte in dieser Arbeitsgruppe zum einen für Lymphknotennegative mehr FoxP3DNA-Expression als bei Patienten mit Befall des Lymphknotens durch das Melanom. Die immunhistochemische Färbung auf FoxP3 bildete auf der anderen Seite einen erhöhten Anteil an FoxP3+-Zellen bei befallenen Lymphknoten im Vergleich zu den nichtbefallenen Proben ab. Sie erklärten die PCR-Resultate durch ein Überwiegen von Tumorzellen im befallenen Lymphknoten und einer damit einhergehenden Verdrängung der Tregs. Die

Tumorzellen führten ihrer Ansicht nach auf Grund einer Downregulation der FoxP3-RNA zu einem verminderten FoxP3-Protein. Weiterhin wiesen sie darauf hin, dass in nicht-befallenen Lymphknoten der Hauptanteil der FoxP3-Expression durch „Nicht-Tregs“ zu Stande kommt, also falsch positive Werte auftreten [75].

Ein Vergleich der Gruppen (befallener Lymphknoten und nicht-befallener) ist demnach trotz Normierung auf die CD4+-T-Lymphozyten als kritisch anzusehen, jedoch alternativlos. Die Komplexität der Zellarten und Zellinteraktionen im Tumorgebiet ist mit einer Methode schwer abzubilden.

Immunhistochemische Färbungen von C. Loddenkemper wiesen darauf hin, dass sich T-Lymphozyten und v.a. FoxP3-exprimierende Zellen vorwiegend im Stroma von Geweben und selten im Tumorgebiet (Zentrum des Geschehens) aufhalten [89], was im Falle einer Aufarbeitung von Lymphknotenmaterial je nach Untersucher zu unterschiedlichen Zahlen führen muss.

Lucas et al. konnte 2011 durch PCR-Analysen nachweisen, dass der Status der demethylierten FoxP3-DNA nicht nur bei natürlichen Tregs zu finden ist, sondern Melanomzellen dieses Merkmal ebenfalls ausprägen. Dies wurde für FoxP3-Transkripte und Proteine bereits 2008 von Karanikas et al. herausgefunden [64, 107]. Diese Tatsache würde bedeuten, dass im vom Melanom befallenen Lymphknoten mehr FoxP3-DNA zu messen sein müsste. In dieser Arbeit mittels des PCR-Assays von Epiontis wurde allerdings nur der Anteil der FoxP3-DNA bestimmt, der von T-Lymphozyten ausgeht und schließt somit die exprimierenden Tumorzellen aus. Dieser Sachverhalt könnte allerdings falsch hohe Werte bei immunhistochemischen Färbungen erklären, wenn eine Differenzierung der Zellarten ausbleibt.

Ähnliches wie Lucas beschrieben Niu et al. 2011: Melanomzellen wiesen hier FoxP3-abhängige Treg-ähnliche Suppressionseffekte auf, die zur verminderten Tumorabwehr führten. Melanomzellen konnten direkt über Enzyme und Interleukine sowie Chemokine und indirekt über Stimulation von Tregs die TILS (tumorinfiltrating lymphocytes) also zytotoxische T-Lymphozyten supprimieren [108].

4.4 Melanomart

Die Betrachtung der Melanomart ist zumindest aus histopathologischer Sicht interessant, da die Art die Ausbreitungsform die Tumorerkrankung bedingt (oberflächliches vs. vertikales Wachstum). So existiert z.B. beim nodulären Melanom

(NM) keine radiale Wachstumsphase [97]. Beim häufigen superfiziellspreitenden Melanom (SSM) kommt es zunächst zu einer oberflächlichen Ausbreitung der Tumorzellen, bevor später auch ein vertikales oder gar sekundär knotiges Wachstum zur Invasion in die tieferen Hautschichten führt und das Überschreiten der Basalmembran sowie die mögliche Infiltration von Lymph- und Blutgefäßen begünstigt. Hier handelt es sich durchaus auch um einen prognostischen Faktor. Die hier vorliegenden Daten zur Treg-Anzahl bei den unterschiedlichen Melanomarten konnten keinen Unterschied zwischen den Gruppen zeigen. In Anbetracht der geringen Fallzahl ist die Aussagekraft allerdings nur als gering einzuschätzen. Anzunehmen wäre ein Unterschied wie oben beschrieben.

4.5 Differenzierung der regulatorischen T-Zellen

Zur spezifischeren Betrachtung der regulatorischen T-Zellen bestand ein Interesse am Zustand der Zellen. Die Unterscheidung in Gedächtniszellen und naive Effektorzellen wurde durch den Marker CD45RA erreicht [109]. Die Tatsache, dass auch T-Helferzellen aktiviert im Tumorgebiet transient FoxP3 exprimieren [110], warf die Vermutung auf, dass Tumorpatienten mehr Gedächtniszellen vom Tregtyp besitzen müssten als gesunde Probanden und die Anzahl abhängig sein müsste vom Tumorstadium.

Es wird angenommen, dass Memory-T-Zellen Antigen-spezifisch sind und in sekundäre lymphatische Organe wandern, wodurch sie eine Stimulation von T-Effektor-Zellen im Tumorgebiet verhindern [102].

Für die Erstbetrachtung und Bestätigung der Verdachtshypothese wurden zunächst nur Proben von Gesunden und Melanomstadium-IV-Patienten analysiert. Später sollte eine Begutachtung aller Melanomstadien folgen. In den vorliegenden Analysen zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede für die Vergleiche von Gesunden und Melanomstadium-IV-Patienten. Gesunde wiesen mehr Treg-Effektorzellen (CD25^{high}CD127^{low}CD45RA^{positiv}) auf als die Melanompatienten (allerdings nur die neuen Proben) und hatten eine geringere Anzahl an Tregmemoryzellen als die Kranken, womit die Hypothese bestätigt wurde. In diesem Fall ist also anzunehmen, dass die Beschäftigung des Immunsystems mit den Melanomzellen zu einer Differenzierung der Treg-Zellen führt und es zu einer Ausbildung von Gedächtniszellen kommt.

Wolf et al. zeigten 2003 bereits für Krebspatienten (keine Melanompatienten) 2,5-fach erhöhte CD4⁺CD25⁺CD45RA^{negative}-Zellen im Vergleich zu Gesunden

($p < 0,001$) [111]. Die klinische Relevanz der Gedächtniszellen als therapeutisches Ziel und die Bedeutung des Vorkommens ist derzeit noch nicht ermessbar, bislang fehlen aussagekräftige Studien, die dies bestätigen. Die Arbeitsgruppe um Giovanni Cesana widerlegten in ihrer Arbeit von 2006 anhand von PBMC die oben genannte Hypothese. In der Abbildung 47 zeigen sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich Gesunder im Vergleich zu Melanompatienten [102].

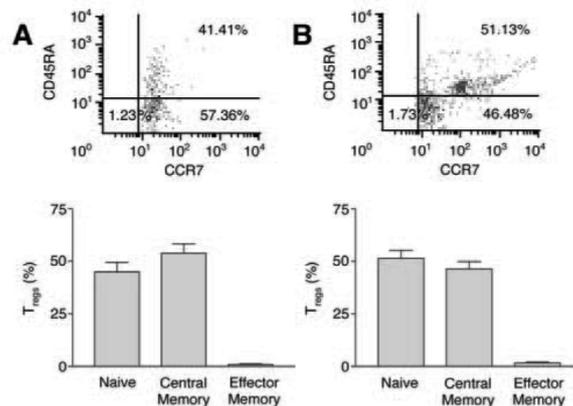


Abb.47 modifiziert nach Cesana et al. 2006 [102]: T-Zellen in Gesunden (A), und metastasierten Melanompatienten (B), Die obere Zeile demonstriert representative Gatingdaten und die untere Zeile zeigt die mittlere Frequenz der Tregs nach Phänotyp (naiv vs. Effektor-Zelle) unterteilt.

Die Färbung auf CCR7 wurde in dieser Arbeit auf Grund der Komplexität des Panel 2 weggelassen, möglicherweise ein Fehler.

Jandus und Kollegen konnten mittels FACS-Analyse ebenfalls eine erhöhte Anzahl naiver T-Zellen (Effektorzellen CD4+FoxP3+) in tumorfreien Lymphknoten nachweisen im Vergleich zu befallenen [67].

4.6 Regulatorische Monozyten

Zur Ausweitung der Bedeutung von regulatorischen Zellen beschäftigte die Frage, ob es bei Melanompatienten noch andere Zellen gibt, die für den klinischen Verlauf entscheidend sein könnten. Die Arbeitsgruppe um Lucia Rivoltini entdeckte 2007 eine Subgruppe von Monozyten vom CD3-CD14+HLA-DR^{low}-Typ, die regulatorische Funktion im Tumorgebiet ausüben und bei Melanompatienten zu einem schlechteren Outcome führen [71]. Zur Analyse verwendeten sie PBMC von vorbehandelten und vakzinierten Melanomstadium-IV-Patienten und Gesunden.

Die relativ simple extrazelluläre Färbung und Charakterisierung der Monozyten mittels FACS stellt wohlmöglich eine Alternative zur Beschäftigung mit den Tregs dar. Deshalb wurde in dieser Arbeit die zusätzliche Hypothese gestellt, dass Melanompatienten im Vergleich zu Gesunden eine erhöhte Anzahl des

Diskussion

Monozytensubtypes (CD14+HLA-DR^{low}) aufweisen. Diese Hypothese konnte für den Vergleich der gesunden Proben mit den alten Melanomstadium-IV-Proben für die Zellanzahl (Frequency of Parent) mit statistischer Signifikanz ($p = 0,005$) bestätigt werden.

Da die Anzahl der Zellen nicht unbedingt mit der Expression der Oberflächenmarker korreliert, wurde ebenfalls die Darstellung der „Mean-Fluorescence-Intensity“ (MFI) verwendet. In der Betrachtung der MFI zeigten die Gesunden eine erhöhte MFI der regulatorischen Monozyten gegenüber den neuen Melanompatientenproben. In Anbetracht der großen Differenz in den Werten der alten und neuen Melanompatientenproben ist die Glaubwürdigkeit der Ergebnisse durchaus als fragwürdig anzusehen und es besteht keine klinische Relevanz der vorliegenden Daten.

Die Funktion der Monozyten bei Tumorbefall ist in der aktuellen Literatur noch unklar. Słafarskas Arbeitsgruppe beschrieb für die CD14+CD16+-Monozyten eher proinflammatorische Eigenschaften und Antitumoraktivität [112]. Die in dieser Dissertation untersuchten Proben zeigten allerdings unerklärbar, dass die Gesunden insgesamt signifikant weniger Monozyten aufwiesen ($p = 0,0014$) als die Melanompatienten. Angenommen wurde, dass es bei den Tumorpatienten ebenfalls zu einer Herabregulierung der HLA-DR-Moleküle kommt, wie es bei Sepsis-Patienten beschrieben ist [88]. Die HLA-DR-Moleküle gehen mit der Antigenpräsentation einher und spielen in dieser Funktion für die Tumorabwehr eine große Rolle. Eine Downregulation würde keineswegs verwundern. Die vorliegenden Daten konnten dies allerdings nicht bestätigen, da die Gesunden eine erhöhte MFI der HLA-DR-low-Monozyten aufwiesen als die Melanompatienten. Betrachtet man die Verteilung der Daten innerhalb der Gruppe der Gesunden, zeigten diese insgesamt eine stärkere Streuung.

Diaz-Montero et al. überprüften mittels FACS bei unterschiedlichen Tumorarten im Blut von Patienten den Zusammenhang zwischen dem Vorkommen und der Anzahl von „myeloid-derived suppressor cells (MDSCs)“, Monozyten und dem Tumorstadium sowie der Tumorlast („tumor burden“ unterteilt in „limitiert“ und „ausgedehnt“). Hierunter fanden sich allerdings nur vier Melanompatienten. Die MDSCs wurden charakterisiert als Lin^{-/lo}HLA-DR-CD33+CD11b+ und korrelierten nachweislich mit dem Tumorstadium. Zwischen Gesunden und Tumorpatienten (gesamte Gruppe)

ergab sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich der MDSC (1,26 % zu 2,85 % mit $p < 0,0001$) [72].

Die Aussagen, die diese Arbeitsgruppe trifft, basieren auf einer Zusammenfassung unterschiedlicher Tumorarten, die unterschiedlichen Zellarten werden vernachlässigt. Eine Unterscheidung zwischen epithelialen und mesenchymalen sowie melanozytären Zellen erscheint allerdings sinnvoll, nicht zuletzt im Hinblick auf das auch morphologisch geprägte unterschiedliche Ansprechen auf Therapien [105]. Die Fähigkeit der Metastasierung und die Überlebensraten zwischen den Tumorarten unterscheiden sich und haben andere klinische Prozeduren zur Folge. Können also auch im Hinblick auf eine effektivere Antitumorthherapie nicht außer Acht gelassen werden. Die Ausgangsstudie für diese Arbeit von Filipazzi lässt eine genaue Charakterisierung ihrer Melanompatienten vermissen. Es geht nicht hervor, ob alle Patienten vor Materialgewinnung therapiert wurden und womit. Diaz-Montero zeigte, dass Chemotherapeutika einen Einfluss auf die Anzahl der MDSC haben, somit werden Resultate eventuell verfälscht [72].

4.7 Relevanz der Arbeit, Konsequenz und Ausblick

Regulatorische Zellen als Marker für Prognose und Verlauf

Die Messung von regulatorischen T-Zellen und regulatorischen Monozyten mittels FACS-Analyse im Blut von Patienten kann anhand der vorliegenden Daten nicht für die Prognostik verwendet werden. Die Schwierigkeit der Differenzierung zwischen natürlichen Tregs und aktivierten FoxP3-exprimierenden T-Zellen anhand von Oberflächenmarkern scheint für die praktische Anwendung in der Diagnostik zu aufwendig. Eine sinnvolle und beständige Methodik stellt die PCR auf demethylierte FoxP3-DNA-Region dar. Die Vielfalt der hiermit untersuchbaren Materialien ist für die unterschiedlichsten klinischen Fragestellungen interessant. Für die derzeitige klinische Arbeit mit Melanompatienten sind nicht nur therapeutische Ziele, neue Angriffsziele bei v.a. fortgeschrittenem Stadium von Bedeutung, sondern auch eine Optimierung der Frühdiagnostik mit Einstufung der Betroffenen in unterschiedliche Risikoklassifikationen. Eine *in vivo* Diagnostik von v.a. Lymphknoten und Markierung dieser, als vom Tumor befallen oder frei, stellt eine besondere Aufgabe dar. Bisher erfolgt die Diagnostik nur durch zytologische Beurteilung, die Untersuchung von Feinnadelaspiraten auf demethylierte FoxP3-DNA könnte aber eine Ergänzung zur Steigerung der Sensitivität sein. Ein Monitoring von high risk-Melanompatienten

(Stadium IIc-IV) erfolgt aktuell gemäß S3-Leitlinie Melanom in vierteljährlichen Abständen inklusive der Lymphknotenultraschalluntersuchung.

Hierin besteht eine mögliche Aufdeckung von 50% aller befallenen SLN bereits in vivo vor SLND mittels Ultraschall und Feinnadel-Aspirations-Zytologie (FNAC) [21].

Der metastatische Befall von Sentinel Nodes (SLN) bei Melanompatienten lässt sich bereits zytologisch in vivo (durch Ultraschall gesteuerte Feinnadelaspiration), wie auch ergänzt durch molekularbiologisches Zytokinprofiling anhand der erhöhten IL-13, Leptin, LTbR, MIP1b bzw. erniedrigten IL-11Ra-Expression mittels qRT-PCR nachweisen. Das Zytokinprofil lässt sich unabhängig von der genauen Lokalisation der Punktion innerhalb des Sentinel Lymphknoten bestimmen [31].

Scoggings et al. beschäftigten sich 2007 mit der Rolle der Diagnostik (RT-PCR versus Immunhistochemie) zur Einstufung von rezidivgefährdeten Patienten.

Histologisch negative Wächterlymphknoten (SLN negativ) von 1446 Melanompatienten (ohne Metastasen also Stadium I und II) wurden mittels RT-PCR untersucht. Für die Marker Tyrosinkinase, MART-1, MAGE-3 und GP-100 konnte für den klinischen Verlauf kein Unterschied zwischen RT-PCR-positiven und RT-PCR-negativen (ohne Markernachweis) Patienten nachgewiesen werden. Jedoch zeigte die Analyse von Blut (PBMCs) derselben Patienten Unterschiede im krankheitsfreien Überleben (DFS) bei einem Nachweis von mehr als zwei Markern (Tyrosinkinase, MART-1) [16].

Anderes Monitoring aus dem Blut mittels sogenannter Tumormarker erfolgte experimentell bei Melanompatienten mittels MIA (Serum), in der Routine bzw. Leitlinienengemäß in der Regel nur noch mit S100 als Marker für ein mögliches „Tumorrelapse“ im Follow-Up ab Stadium IB [25, 113 - 114].

Therapieansätze

Als neue Therapien in einer bislang prognostisch aussichtslosen Situation bei metastasierten Melanompatienten kristallisieren sich mehrere Strategien heraus:

1. Depletion der regulatorischen T-Zellen
2. Impfung mit Tumorantigenen
3. Zelltransfer bzw. Transplantation
4. Eingriffe in die Signalkaskade von Zellwachstum

Zelldepletion – Verminderung von Tregs

Tumorantigenspezifische Tregs (CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺) wurden nicht bei gesunden Kontrollen im Vergleich zu Melanomstadium-IV-Patienten (n16, PBMCs) gefunden und könnten ein mögliches Target für Immuntherapien darstellen. Ihre Eliminierung könnte die Tumorabwehr befördern [115].

Strategien zur Depletion von Tregs und Tumorstimmung zur beschleunigten Antitumoraktivität sind derzeit in der Diskussion [68, 116]. In zahlreichen Mausmodellen konnten mit der Tregdepletion erste Erfolge erzielt werden.

Die Arbeitsgruppe von Tim Sparwasser verwies bei Mäusen auf die Bedeutung der selektiven Tregdepletion in Kombination mit Tumorstimmungen [117].

Fujii et al. stellten eine Klassifikation von naiven Tregs (FoxP3^{low}CD45RO^{negativ}), aktivierten „non-regulatorischen T-Zellen“ (FoxP3^{low}CD45RO⁺) und „Effektor-Tregs“ (FoxP3^{high}CD45RO⁺) auf [96]. Hierfür maßen sie die oben beschriebenen Zellen in Blut und Gewebe von 28 Gesunden und 23 Melanompatienten (bis Stadium IV) nach erfolgter Operation oder Chemotherapie mittels FACS-Analyse. Es stellte sich heraus, dass die Tregs im Blut nicht mit den gemessenen Zahlen im Gewebe übereinstimmten. Nach Immuntherapie mit CTLA-4-Blockern, Anti-CD25-AK (ONTAK®) und Anti-TGF-Beta-Antikörpern kam es zu einem messbaren Abfall der Tregs (sowohl der Induzierten als auch der Natürlichen) und einem verminderten Tumorwachstum.

Bei Denileukin-difitox (DAB₃₈₉IL-2) [56] bzw. ONTAK® oder auch Daclizumab® [70] handelt es sich um ein Immunotoxin, welches an Interleukin-2 gebunden den Oberflächenmarker CD25 auf Tregs angreift und so zur Eliminierung der Treg-Funktion beiträgt. Allerdings werden nicht nur natürliche Tregs eliminiert, sondern auch Effektor-T-Zellen [117 - 118]. Eine Kombination mit dem ebenfalls Treg-blockierenden CTLA-4-Antikörper (Ipilimumab - Yervoy®) wird als Steigerung der Effektivität der Tumorabwehr diskutiert und weist eine verminderte Toxizität auf [119]. Jedoch treten Autoimmunerkrankungen gehäuft auf.

Jolanda de Vries verglich in einer Studie mit Melanomstadium-IV-Patienten drei Strategien der Tregdepletion (denileukin difitox - ONTAK®, Cyclophosphamid, Anti-CD25-AK - Daclizumab®) und konnte für keine der drei eine ausreichende Reduktion der Tregs um 50% mittels FoxP3-PCR-Analyse nachweisen [120].

DieIDO (Indolamin-2,3-Desoxygenase) stellt ein weiteres Angriffsziel dar und führt bei Melanom-Stadium-III-Patienten zur Rekrutierung von Tregs und bedingt ein

kürzeres Überleben. Hierfür wurden 25 Lymphknotenmetastasen von Melanompatienten mit kurzem (n15, Mittelwert 236Tage Überleben) und langem (n10, Mittelwert 7848 Tage) Überleben auf dieIDO-Expression und Treganzahl (FoxP3+) mittels Immunhistochemie untersucht. Die Unterbindung derIDO-Produktion könnte einen indirekten Weg darstellen, um die Tregs im Tumorgebiet zu eliminieren [121].

Eine Alternative zur Treg-Depletion wurde von Sharma im Mausmodell konzipiert. In Versuchen mit einem Mausmodell sowie in-vitro-Analysen zeigte sich durch Blockierung der dendritischen Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) und Interleukin-6-Stimulation eine Konversion von Effektor-Tregs zu T-Helferzellen vom Typ 17 (TH₁₇), die proinflammatorische Funktion ausübten [122]. DieIDO stellt evtl. ein wichtiges Schlüsselenzym für die Tumorabwehr dar. Die Übertragbarkeit auf den Menschen wird sich noch zeigen.

Jacobs JFM fasst 2012 in seinem Artikel die bisherigen Veröffentlichungen zur Strategien der Treg-Depletion zusammen [105].

Impfstrategien

Im Rahmen einer Studie in Amsterdam erfolgte bei Melanompatienten Stadium I bis III eine intradermale Injektion in die Primariusnarbe von CpG-B-Typ-Oligonucleotiden. Danach wurde ein Abfall der Tregs (CD4+CD25^{high}CTLA4+FoxP3+) bei Geimpften im Vergleich zur Kontrollgruppe (Injektion von Kochsalzlösung) gemessen. Vor Therapie erfolgte allerdings keine Bestimmung der Zellfrequenzen. Hier handelte es sich methodisch um FACS-Analysen und Immunhistochemie von frischen Wächterlymphknoten direkt nach der operativen Entfernung [123].

Correll et al. zeigten bereits 2009 mittels einer Impfung mit Dendritischen Zellen eine Verminderung der vorherrschenden Immunsuppression bei Melanompatienten mit Reduktion der Treg-Zahl nach Impfung [99], zuvor boten Melanomstadium-IV-Patienten eine höhere Treg-Anzahl.

Es ist bekannt, dass Tumorpatienten, Melanompatienten, mehr TGF-beta-produzierende Zellen aufzeigen als gesunde Kontrollen [98], da die TGF-beta Ausschüttung durch Melanomzellen induziert zu einer Konversion von naiven T-Zellen zu transient FoxP3-exprimierenden T-Zellen führt. Im Mausmodell wurde die TGF-beta1-Produktion mittels siRNA inhibiert und war zusätzlich zu einem Dendritischen-Zell-Impfstoff für ein vermindertes Tumorwachstum verantwortlich [124].

Zelltransplantation

Die Zelltherapie mit TILs (tumorinfiltrating lymphocytes) nach erfolgter Lymphozytendepletion durch z.B. Ganzkörperbestrahlung beim metastasierten Melanom erreicht eine höhere Ansprechrate (Reduktion der Tumorlast, Steigerung der Überlebensrate in Monaten) von 72% im Gegensatz zu Antitumorvakzinen mit 3%, IL-2-Therapie und CTLA-4-AK-Therapie mit 15% [125]. Die TILs werden zuvor aus dem Tumorgewebe des Patienten entnommen und kultiviert, bevor sie zurückgegeben werden [126].

Die Effektivität von T-Zelltherapien und Reduktion der systemischen Nebenwirkungen könnte gesteigert werden, indem Chemokinrezeptoren, v.a. CXCR2, erhöht werden. Diese führen zur Anlockung von T-Zellen ins Tumorgebiet und entfalten somit eine gezieltere Wirkung und minderten die systemische Wirkung [127].

Eingriffe in die Signalkaskade von Zellwachstum

Für eine gezielte Therapie des metastasierten Melanoms existiert ein neuer Antikörper gegen die mutierte BRAF-Kinase Namens Vemurafenib (PLX4031, Zelboraf ®), der seit Februar 2012 auch in Deutschland zugelassen ist. In einer Phase 3 Studie wurde die Therapie mit Vemurafenib (2-mal täglich 960 mg per os) mit der Monochemotherapie mit Dacarbazin (1g/ m² i.v. alle 3 Wochen) bei insgesamt 675 Patienten mit metastasiertem Melanom verglichen. Eine Mutation der BRAF-Kinase (V600E-Mutation) konnte bei jedem zweiten Melanompatienten nachgewiesen werden. Eine Blockierung dieser Kinase führte zu einer signifikanten Verlängerung des Überlebens und einer Reduktion des Mortalitätsrisikos um 63% [128]. Problematisch ist, dass dieser Antikörper bei einer BRAF Wildtyp-Mutation zur Förderung des Zellwachstums führt und einhergeht mit einem erhöhten Risiko für Plattenepithelzellkarzinome und anderen erheblichen Nebenwirkungen. Leider erschöpft sich bei einem Großteil der Patienten die Wirksamkeit nach etwa einem halben Jahr. Kombinationstherapien von Vemurafenib und anderen Kinaseinhibitoren werden für zukünftige Therapiestrategien gegen das metastasierte Melanom bedeutsam sein. Gleichwohl müssen die Escape-Mechanismen des Melanoms weiter aufgeschlüsselt werden, um den neuen und den etablierten Therapien noch bessere Ausgangssituationen für Ihre antitumorale Wirksamkeit zu schaffen.

5 Literaturverzeichnis

1. de Vries, E. and J.W. Coebergh, *Cutaneous malignant melanoma in Europe*. Eur J Cancer, 2004. **40**(16): p. 2355-66.
2. Molenkamp, B.G., et al., *Immunomodulation of the melanoma sentinel lymph node: a novel adjuvant therapeutic option*. Immunobiology, 2006. **211**(6-8): p. 651-61.
3. Garbe, C. and A. Blum, *Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide*. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol, 2001. **14**: p. 280-290.
4. Voit, C., A. Schoengen, and G. Schäfer-Hesterberg, *Risikoadaptierte Nachsorge von Melanompatienten Serielle Tyrosinase-RT-PCR, Ultraschall und Feinnadelaspirationszytologie*. Onkologie, 2007: p. 1-5.
5. Breitbart, E.W., et al., *Systematic skin cancer screening in Northern Germany*. J Am Acad Dermatol, 2012. **66**(2): p. 201-11.
6. Waldmann, A., et al., *Frequency of excisions and yields of malignant skin tumors in a population-based screening intervention of 360,288 whole-body examinations*. Arch Dermatol, 2012. **148**(8): p. 903-10.
7. Waldmann, A., et al., *Skin cancer screening participation and impact on melanoma incidence in Germany--an observational study on incidence trends in regions with and without population-based screening*. Br J Cancer, 2012. **106**(5): p. 970-4.
8. Armstrong, B. and A. Krickler, *The epidemiology of UV induced skin cancer*. J Photochem Photobiol B., 2001. **63**(1-3): p. 8-18.
9. Boniol, M., et al., *Cutaneous melanoma attributable to sunbed use: systematic review and meta-analysis*. Bmj, 2012. **345**: p. e4757.
10. Dummer, R., *Malignes Melanom*. CME Dermatol, 2009. **4**(3): p. 184-195.
11. Balch, C.M., et al., *An evidence-based staging system for cutaneous melanoma*. CA Cancer J Clin, 2004. **54**(3): p. 131-49; quiz 182-4.
12. Buzzell, R. and J. Zitelli, *Favorable prognostic factors in recurrent and metastatic melanoma*. J Am Acad Dermatol., 1996. **34**(5): p. 798-803.
13. Morton, D.L., et al., *Sentinel-node biopsy or nodal observation in melanoma*. N Engl J Med, 2006. **355**(13): p. 1307-17.
14. Thomas, J.M. and A. Hayes, *Sentinel Lymph Node Biopsy Melanoma 2008*. Principles & Practice of Oncology, 2008. **22**(1): p. 1-9.
15. Gershenwald, J.E., et al., *Multi-institutional melanoma lymphatic mapping experience: the prognostic value of sentinel lymph node status in 612 stage I or II melanoma patients*. J Clin Oncol, 1999. **17**(3): p. 976-83.
16. Scoggins, C.R.e.a., *Prospective Multi-Institutional Study of Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction for Molecular Staging of Melanoma*. J Clin Oncol, 2007. **24**(18).
17. Balch, C.M., et al., *Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification*. J Clin Oncol, 2009. **27**(36): p. 6199-206.
18. Zogakis, T.G., et al., *Melanoma recurrence patterns after negative sentinel lymphadenectomy*. Arch Surg, 2005. **140**(9): p. 865-71; discussion 871-2.
19. Essner, R., et al., *Efficacy of lymphatic mapping, sentinel lymphadenectomy, and selective complete lymph node dissection as a therapeutic procedure for early-stage melanoma*. Ann Surg Oncol, 1999. **6**(5): p. 442-9.
20. van Akkooi, A.C., et al., *Clinical relevance of melanoma micrometastases (<0.1 mm) in sentinel nodes: are these nodes to be considered negative?* Ann Oncol, 2006. **17**(10): p. 1578-85.
21. Eggermont, A.M. and C. Voit, *Management of melanoma: a European perspective*. Surg Oncol Clin N Am, 2008. **17**(3): p. 635-48, x.
22. Gimotty, P.A., et al., *Identification of high-risk patients among those diagnosed with thin cutaneous melanomas*. J Clin Oncol, 2007. **25**(9): p. 1129-34.
23. Callery, C., et al., *Factors prognostic for survival in patients with malignant melanoma spread to the regional lymph nodes*. Ann Surg Oncol, 1982. **196**(1): p. 69-75.
24. Cangiarella, J., et al., *Malignant melanoma metastatic to the breast*. Cancer, 1998. **84**(3): p. 160-162.
25. Pflugfelder, A., et al., *Malignes melanom s3-leitlinie "diagnostik, therapie und nachsorge des melanoms"*. J Dtsch Dermatol Ges, 2013. **11 Suppl 6**: p. 1-126.
26. Voit, C., et al., *The role of ultrasound in detection and management of regional disease in melanoma patients*. Semin Oncol, 2002. **29**(4): p. 353-60.
27. Voit, C., et al., *Ultrasound-guided fine needle aspiration cytology prior to sentinel lymph node biopsy in melanoma patients*. Ann Surg Oncol, 2006. **13**(12): p. 1682-9.

Literaturverzeichnis

28. Schafer-Hesterberg, G., et al., *Use of ultrasound to early identify, diagnose and localize metastases in melanoma patients*. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2007. **7**(12): p. 1707-16.
29. Wang, E. and F.M. Marincola, *A natural history of melanoma: serial gene expression analysis*. *Immunol Today*, 2000. **21**(12): p. 619-23.
30. Voit, C.A., et al., *Impact of molecular staging methods in primary melanoma: reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) of ultrasound-guided aspirate of the sentinel node does not improve diagnostic accuracy, but RT-PCR of peripheral blood does predict survival*. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(35): p. 5742-7.
31. Torisu-Itakura, H., et al., *Molecular characterization of inflammatory genes in sentinel and nonsentinel nodes in melanoma*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(11): p. 3125-32.
32. Leiter, U., et al., *Hazard rates for recurrent and secondary cutaneous melanoma: an analysis of 33,384 patients in the German Central Malignant Melanoma Registry*. *J Am Acad Dermatol*, 2011. **66**(1): p. 37-45.
33. Lens, M.B. and M. Dawes, *Interferon alfa therapy for malignant melanoma: a systematic review of randomized controlled trials*. *J Clin Oncol*, 2002. **20**(7): p. 1818-25.
34. Mocellin, S., et al., *Interferon alpha for the adjuvant treatment of cutaneous melanoma*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2013. **6**: p. CD008955.
35. Pirard, D., et al., *Interferon alpha as adjuvant postsurgical treatment of melanoma: a meta-analysis*. *Dermatology*, 2004. **208**(1): p. 43-8.
36. Verma, S., et al., *Systematic review of systemic adjuvant therapy for patients at high risk for recurrent melanoma*. *Cancer*, 2006. **106**(7): p. 1431-42.
37. Wheatley, K., et al., *Does adjuvant interferon-alpha for high-risk melanoma provide a worthwhile benefit? A meta-analysis of the randomised trials*. *Cancer Treat Rev*, 2003. **29**(4): p. 241-52.
38. Garbe, C., *interdisziplinäre Leitlinien zur Diagnostik und Behandlung von Hauttumoren*. 2005: Georg Thieme Verlag. 35.
39. Garbe, C., et al., *Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects*. *Oncologist*, 2011. **16**(1): p. 5-24.
40. Punt, C.J. and A.M. Eggermont, *Adjuvant interferon-alpha for melanoma revisited: news from old and new studies*. *Ann Oncol*, 2001. **12**(12): p. 1663-6.
41. Nashan, D., *Systemic therapy of disseminated malignant melanoma – an evidencebased overview of the state-of-the-art in daily routine*. *J EUR Acad. Dermatol.Ven.*, 2007. **21**(10): p. 1305-18.
42. Schadendorf, D., et al., *Immunotherapy of distant metastatic disease*. *Ann Oncol*, 2009. **20 Suppl 6**: p. vi41-50.
43. Hodi, F.S., et al., *CTLA-4 blockade with ipilimumab induces significant clinical benefit in a female with melanoma metastases to the CNS*. *Nat Clin Pract Oncol*, 2008. **5**(9): p. 557-61.
44. Keilholz, U., C. Punt, and M. Gore, *Dacarbazine, cisplatin, and interferon-alfa-2b with or without interleukin-2 in metastatic melanoma: a randomized phase III trial (18951) of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Melanoma Group*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**: p. 6747–6755.
45. Keilholz, U., P. Martus, and C. Scheibenbogen, *Immune monitoring of T-cell responses in cancer vaccine development*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(7 Pt 2): p. 2346s-2352s.
46. Mourmouras, V., et al., *Evaluation of tumour-infiltrating CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in human cutaneous benign and atypical naevi, melanomas and melanoma metastases*. *Br J Dermatol*, 2007. **157**(3): p. 531-9.
47. Gross, S. and P. Walden, *Immunosuppressive mechanisms in human tumors: why we still cannot cure cancer*. *Immunol Lett*, 2008. **116**(1): p. 7-14.
48. Miracco, C., et al., *Utility of tumour-infiltrating CD25+FOXP3+ regulatory T cell evaluation in predicting local recurrence in vertical growth phase cutaneous melanoma*. *Oncol Rep*, 2007. **18**(5): p. 1115-22.
49. Kloetzel, P.M., *Antigen processing by the proteasome*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**(3): p. 179-87.
50. Curiel, T.J., *Tregs and rethinking cancer immunotherapy*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(5): p. 1167-74.
51. Zou, W., *Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance*. *Nat Rev Cancer*, 2005. **5**(4): p. 263-74.
52. Morel, S., et al., *Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells*. *Immunity*, 2000. **12**(1): p. 107-17.
53. Boon, T., et al., *Human T cell responses against melanoma*. *Annu Rev Immunol*, 2006. **24**: p. 175-208.

Literaturverzeichnis

54. Negin, B., et al., *Effect of melanoma on immune function in the regional lymph node basin*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(3): p. 654-9.
55. Corthay, A., *How do regulatory T cells work?* Scand J Immunol, 2009. **70**(4): p. 326-36.
56. Nishikawa, H. and S. Sakaguchi, *Regulatory T cells in tumor immunity*. Int J Cancer, 2010. **127**(4): p. 759-67.
57. Shevach, E.M., *Fatal attraction: tumors beckon regulatory T cells*. Nat Med, 2004. **10**(9): p. 900-1.
58. von Boehmer, H., *Mechanism of suppression by suppressor T cells*. Nat Immunol, 2005. **6**(4): p. 338-344.
59. Shevach, E.M., *CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(6): p. 389-400.
60. Nishikawa, H., et al., *IFN-gamma controls the generation/activation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in antitumor immune response*. J Immunol, 2005. **175**(7): p. 4433-40.
61. Nishikawa, H., et al., *CD4+ CD25+ regulatory T cells control the induction of antigen-specific CD4+ helper T cell responses in cancer patients*. Blood, 2005. **106**(3): p. 1008-11.
62. Nishikawa, H., et al., *Definition of target antigens for naturally occurring CD4(+) CD25(+) regulatory T cells*. J Exp Med, 2005. **201**(5): p. 681-6.
63. Curiel, T.J., et al., *Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival*. Nat Med, 2004. **10**(9): p. 942-9.
64. Karanikas, V., et al., *Foxp3 expression in human cancer cells*. J Transl Med, 2008. **6**: p. 19.
65. Beyer, M. and J.L. Schultze, *Regulatory T cells in cancer*. Blood, 2006. **108**(3): p. 804-11.
66. Viguier, M., et al., *Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells*. J Immunol, 2004. **173**(2): p. 1444-53.
67. Jandus, C., et al., *Selective accumulation of differentiated FOXP3(+) CD4 (+) T cells in metastatic tumor lesions from melanoma patients compared to peripheral blood*. Cancer Immunol Immunother, 2008. **57**(12): p. 1795-805.
68. Baecher-Allan, C. and D.E. Anderson, *Regulatory cells and human cancer*. Semin Cancer Biol, 2006. **16**(2): p. 98-105.
69. Hodi, F.S., et al., *Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma*. N Engl J Med, 2010. **363**(8): p. 711-23.
70. Rech, A.J. and R.H. Vonderheide, *Clinical use of anti-CD25 antibody daclizumab to enhance immune responses to tumor antigen vaccination by targeting regulatory T cells*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1174**: p. 99-106.
71. Filipazzi, P., et al., *Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine*. J Clin Oncol, 2007. **25**(18): p. 2546-53.
72. Diaz-Montero, C.M., et al., *Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy*. Cancer Immunol Immunother, 2009. **58**(1): p. 49-59.
73. Cochran, A.J., et al., *Sentinel lymph nodes show profound downregulation of antigen-presenting cells of the paracortex: implications for tumor biology and treatment*. Mod Pathol, 2001. **14**(6): p. 604-8.
74. Liu, W., et al., *CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells*. J Exp Med, 2006. **203**(7): p. 1701-11.
75. Knol, A.C., et al., *Absence of amplification of CD4+CD25(high) regulatory T cells during in vitro expansion of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma patients*. Exp Dermatol, 2008. **17**(5): p. 436-45.
76. Fontenot, J.D. and A.Y. Rudensky, *A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3*. Nat Immunol, 2005. **6**(4): p. 331-7.
77. Floess, S., et al., *Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells*. PLoS Biol, 2007. **5**(2): p. e38.
78. Sakaguchi, S., *Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self*. Nat Immunol, 2005. **6**(4): p. 345-52.
79. Polansky, J.K., et al., *DNA methylation controls Foxp3 gene expression*. Eur J Immunol, 2008. **38**(6): p. 1654-63.
80. Baron, U., et al., *DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells*. Eur J Immunol, 2007. **37**(9): p. 2378-89.
81. Huehn, J., J.K. Polansky, and A. Hamann, *Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage?* Nat Rev Immunol, 2009. **9**(2): p. 83-9.

Literaturverzeichnis

82. Liyanage, U.K., et al., *Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma*. J Immunol, 2002. **169**(5): p. 2756-61.
83. Blum, A. and D. Dill-Müller, *Sonographie der Lymphknoten und der Subkutis in der Dermatologie Teil 2*. Hautarzt, 1999. **50**: p. 62–73.
84. Böyum, A., *Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes combining centrifugation and sedimentation at 1g*. Scan J Clin Lab Invest, 1968. **97**: p. 77-89.
85. Roncador, G., et al., *Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level*. Eur J Immunol, 2005. **35**(6): p. 1681-91.
86. Ziegler-Heitbrock, H.W., *Definition of human blood monocytes*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(5): p. 603-6.
87. Stec, M., et al., *Expansion and differentiation of CD14+CD16(-) and CD14+ +CD16+ human monocyte subsets from cord blood CD34+ hematopoietic progenitors*. J Leukoc Biol, 2007. **82**(3): p. 594-602.
88. Docke, W.D., et al., *Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study*. Clin Chem, 2005. **51**(12): p. 2341-7.
89. Loddenkemper, C., et al., *Regulatory (FOXP3+) T cells as target for immune therapy of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer*. Cancer Sci, 2009. **100**(6): p. 1112-7.
90. Olek, A., J. Oswald, and J. Walter, *A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**: p. 5064–6.
91. Wieczorek, G., et al., *Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue*. Cancer Res, 2009. **69**(2): p. 599-608.
92. Lee, A. and M. Calaminici, *Number of CD4+ cells and location of forkhead box protein P3 – positive cells in diagnostic follicular lymphoma tissue microarrays correlates with outcome*. J Clin Oncol, 2006. **24**: p. 5052-9.
93. Crellin, N.K., R.V. Garcia, and M.K. Levings, *Flow cytometry-based methods for studying signaling in human CD4+CD25+FOXP3+ T regulatory cells*. J Immunol Methods, 2007. **324**(1-2): p. 92-104.
94. Morgan, M., *Time-consuming CD25+FoxP3+ staining leaves lack of discrimination from recently activated conventional T cells*. Hum Immunol, 2005.
95. Kobayashi, N., et al., *FoxP3+ reg T cells affect the development and progression of hepatocarcinogenesis*. Clin Cancer Res., 2007. **13**: p. 902-911.
96. Fujii, H., et al., *Perturbations of both nonregulatory and regulatory FOXP3+ T cells in patients with malignant melanoma*. Br J Dermatol, 2011. **164**(5): p. 1052-60.
97. Crowson, A.N., C.M. Magro, and M.C. Mihm, *Prognosticators of melanoma, the melanoma report, and the sentinel lymph node*. Mod Pathol, 2006. **19 Suppl 2**: p. S71-87.
98. MCCarter, M., *Immunosuppressive Dendritic and Reg T cells*. Ann Surg Oncol, 2007. **14**(10): p. 2854-2860.
99. Correll, A., et al., *Increased regulatory T-cell frequencies in patients with advanced melanoma correlate with a generally impaired T-cell responsiveness and are restored after dendritic cell-based vaccination*. Exp Dermatol, 2010. **19**(8): p. e213-21.
100. Ahmadzadeh, M., et al., *FOXP3 expression accurately defines the population of intratumoral regulatory T cells that selectively accumulate in metastatic melanoma lesions*. Blood, 2008. **112**(13): p. 4953-60.
101. Ascierto, P.A., et al., *Regulatory T cell frequency in patients with melanoma with different disease stage and course, and modulating effects of high-dose interferon-alpha 2b treatment*. J Transl Med, 2010. **8**: p. 76.
102. Cesana, G.C., et al., *Characterization of CD4+CD25+ regulatory T cells in patients treated with high-dose interleukin-2 for metastatic melanoma or renal cell carcinoma*. J Clin Oncol, 2006. **24**(7): p. 1169-77.
103. Shen, L.S., et al., *CD4(+)CD25(+)CD127(low/-) regulatory T cells express Foxp3 and suppress effector T cell proliferation and contribute to gastric cancers progression*. Clin Immunol, 2009. **131**(1): p. 109-18.
104. Barnett, B., et al., *Regulatory T cells in ovarian cancer: biology and therapeutic potential*. Am J Reprod Immunol, 2005. **54**(6): p. 369-77.
105. Jacobs, J., et al., *Regulatory T cells in melanoma: the final hurdle towards effective immunotherapy?* Lancet Oncol, 2012. **13**: p. e32-42.
106. Kryczek, I., et al., *FOXP3 defines regulatory T cells in human tumor and autoimmune disease*. Cancer Res, 2009. **69**(9): p. 3995-4000.

Literaturverzeichnis

107. Lucas, S., et al., *Demethylation of the FOXP3 gene in human melanoma cells precludes the use of this epigenetic mark for quantification of Tregs in unseparated melanoma samples*. Int J Cancer, 2012.
108. Niu, J., et al., *Foxp3 expression in melanoma cells as a possible mechanism of resistance to immune destruction*. Cancer Immunol Immunother, 2011. **60**(8): p. 1109-18.
109. Sakaguchi, S., et al., *FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(7): p. 490-500.
110. Pillai, V., et al., *Transient regulatory T cells: a state attained by all activated human T cells*. Clin Immunol, 2007. **123**: p. 18-29.
111. Wolf, A.M., et al., *Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(2): p. 606-12.
112. Szaflarska, A., et al., *Antitumor response of CD14+/CD16+ monocyte subpopulation*. Exp Hematol, 2004. **32**(8): p. 748-55.
113. Hofmann, M.A., et al., *Impact of lymph node metastases on serum level of melanoma inhibitory activity in stage III melanoma patients*. J Dermatol, 2011. **38**(9): p. 880-6.
114. Wevers, K., et al., *S-100B: A Stronger Prognostic Biomarker than LDH in Stage IIIB-C Melanoma*. Ann Surg Oncol, 2013.
115. Vence, L., et al., *Circulating tumor antigen-specific regulatory T cells in patients with metastatic melanoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(52): p. 20884-9.
116. Feng, L.L. and X. Wang, *Targeting Foxp3+ regulatory T cells-related immunosuppression for cancer immunotherapy*. Chin Med J (Engl), 2010. **123**(22): p. 3334-42.
117. Klages, K., *Selective Depletion of Foxp3+ Regulatory T Cells Improves Effective Therapeutic Vaccination against Established Melanoma*. Cancer Res, 2010. **70**(20): p. 7788-7799.
118. Jacobs, J., C. Punt, and G. Adema, *Dendritic Cell Vaccination in Combination with Anti-CD25 Monoclonal Antibody Treatment: A Phase I/II Study in Metastatic Melanoma Patients*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(20): p. 5067-78.
119. Pruitt, S., D. Boczkowski, and S. Nair, *Enhancement of anti-tumor immunity through local modulation of CTLA-4 and GITR by dendritic cells*. Eur J Immunol, 2011. **41**: p. 3553-63.
120. de Vries, I., C. Castelli, and C. Huygens, *Frequency of Circulating Tregs with Demethylated FOXP3 Intron 1 in Melanoma Patients Receiving Tumor Vaccines and Potentially Treg-Depleting Agents*. Clin Cancer Res, 2010. **17**(4): p. 841-48.
121. Brody, J.R., et al., *Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in metastatic malignant melanoma recruits regulatory T cells to avoid immune detection and affects survival*. Cell Cycle, 2009. **8**(12): p. 1930-4.
122. Sharma, M.D., et al., *Indoleamine 2,3-dioxygenase controls conversion of Foxp3+ Tregs to TH17-like cells in tumor-draining lymph nodes*. Blood, 2009. **113**(24): p. 6102-11.
123. Molenkamp, B.G., et al., *Intradermal CpG-B activates both plasmacytoid and myeloid dendritic cells in the sentinel lymph node of melanoma patients*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(10): p. 2961-9.
124. Conroy, H., et al., *Gene silencing of TGF-beta 1 enhances antitumor immunity induced with a dendritic cell vaccine by reducing tumor-associated regulatory T cells*. Cancer Immunol Immunother, 2012. **61**: p. 425-31.
125. Rosenberg, S.A. and M.E. Dudley, *Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma*. Curr Opin Immunol, 2009. **21**(2): p. 233-40.
126. Lee, S. and K. Margolin, *Tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma*. Curr Oncol Rep, 2012. **14**(5): p. 468-74.
127. Sapoznik, S., et al., *CXCR1 as a novel target for directing reactive T cells toward melanoma: implications for adoptive cell transfer immunotherapy*. Cancer Immunol Immunother, 2012. **61**(10): p. 1833-47.
128. Chapman, P., et al., *Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation*. N Engl. J. of Med., 2011. **364**: p. 2507-16.

Erklärung an Eides statt

„Ich, Katharina Kowalczyk, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Vorkommen regulatorischer T-Zellen abhängig vom Sentinelnode-Befall beim Malignen Melanom“ 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 beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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 etwaigen erfolgten Publikationen

Katharina Kowalczyk hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Voit C, Van Akkooi AC, Schäfer-Hesterberg G, Schoengen A, Kowalczyk K, Roewert JC, Sterry W, Eggermont AM. *Ultrasound morphology criteria predict metastatic disease of the sentinel nodes in patients with melanoma*. J Clin Oncol. 2010 Feb 10;28(5):847-52. Epub 2010 Jan 11.

Beitrag im Einzelnen: Datensammlung, Patientenbetreuung

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

Lebenslauf

Aus Datenschutzgründen entfernt

Aus Datenschutzgründen entfernt

Veröffentlichungen

Ultrasound morphology criteria predict metastatic disease of the sentinel nodes in patients with melanoma. Voit C, Van Akkooi AC, Schäfer-Hesterberg G, Schoengen A, Kowalczyk K, Roewert JC, Sterry W, Eggermont AM. J Clin Oncol. 2010 Feb 10;28(5):847-52. Epub 2010 Jan 11.

Danksagung

Ich danke Frau Prof. Carmen Scheibenbogen für die jahrelange Begleitung und geduldige Beratung von der Themenstellung bis zum Abschluss der Arbeit. Ihre wertvollen Hinweise halfen mir inhaltliche und formelle Hürden zu überwinden.

Zu Dank verpflichtet fühle ich mich der AG Scheibenbogen, v.a. Sandra Bauer, Manuel Guerreiro und Heinz Tanzmann sowie Torsten Ebeling, die mir in praktischen Dingen mit ihrem Rat zur Seite standen.

Vielen Dank auch an meinen Betreuer Gregor Schäfer, der seine Begeisterung für die klinische Forschung auch an mich weitergab.

Außerdem danke ich der viel zu früh aus dem Leben geschiedenen Frau Prof. Christiane Voit, die mich in die Praxis des Ultraschalles bei Melanompatienten einwies und mich Grundlagen des klinischen Arbeitens lehrte.

Schade, dass unsere von ihr überragend geplante Studie leider zu früh durch den Sponsor beendet wurde.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die Motivation und Geduld in Zeiten, in denen Beruf und Kind den Weg des Abschließens nicht erleichterten.