

Aus der Klinik für Dermatologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Die Typ I Interferon Antwort und cGAS-Expression im humanen Melanom

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät

der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Nils Leonard Bach

aus Berlin, Wilmersdorf-Charlottenburg

Magdeburg 2021

## Dokumentationsblatt

Bach, Nils Leonard:

Die Typ I Interferon Antwort und cGAS-Expression im humanen Melanom

- 2021. - 57 B5., 25 Abb., 7 Tab.

Die vorliegende wissenschaftliche Arbeit beschäftigt sich mit der Expression von cGAS sowie der Typ I Interferon Antwort und CD8+ Infiltration im humanen Melanom. Dafür wurden Serienschnitte von 50 ausgewählten Melanompräparaten der Universitätsklinik Magdeburg immunhistochemisch für cGAS, MxA als Marker der Typ I Interferon Antwort, CD8+ Infiltrat sowie HMB45 gefärbt und mikroskopisch untersucht.

Die Ergebnisse zeigten eine positive Korrelation sowie eine Kolo-kalisation der Expression von MxA - und somit Typ I Interferon Antwort - und CD8+ Infiltration in den ausgewählten Melanomen. Die cGAS Expression korrelierte nicht mit der MxA Expression. Es zeigte sich eine verstärkte cGAS Expression bei dickeren und somit prognostisch schlechteren Tumoren. Die Überlebenszeit ab Erstdiagnose zeigte keine signifikanten Unterschiede bei der Unterscheidung von Tumoren mit einer großflächigen intratumoralen Expression (MxA-Level 2-4) und einer geringflächigen MxA-Expression (MxA-Level 1). Das Ergebnis bestätigt die These, dass die Typ I Interferon Produktion im Tumor zu einem verstärktem CD8+ Infiltrat führt.

## Schlüsselwörter

*Humanes Melanom, cGAS, Typ I Interferon, MxA, CD8+, Immunhistologie, Staining Methods, Prognose*

## Inhaltsverzeichnis

Dokumentationsblatt	2
Schlüsselwörter	2
Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	7
1.1 Das maligne Melanom	7
1.1.1 Epidemiologie	7
1.1.2 Risikofaktoren	7
1.1.3 Klinik	8
1.1.4 Diagnostik	9
1.1.5 Stadieneinteilung nach TNM gemäß der 8. Ausgabe AJCC Klassifikation	10
1.1.6 Therapie	11
1.1.7 Prognose	12
1.2 Prognostische Bedeutung der lymphozytären Infiltration im Melanom	13
1.3 Die Rolle des cGAS-STING Signalwegs für die Interferon-Produktion	13
1.4 Ziele und Hypothesen der Arbeit	15
2. Patienten, Material und Methoden	17
2.1 Das Patientenkollektiv	17
2.2 Allgemeine immunhistochemische Färbungen	17
2.4 Etablierung der immunhistochemischen Färbungen	21
2.5 Beurteilung der cGAS-Expression	27
2.6 Beurteilung der MxA- Expression	27
2.7 Beurteilung der CD8+ Infiltration	28
2.8. Statistische Auswertung	30
3. Ergebnisse	31
3.1 Das untersuchte Patientenkollektiv	31
3.2 Ausgeprägte Expression von cGAS in primären Melanomen	33
3.3 Geringe MxA-Expression in primären Melanomen	33
3.4 Geringe CD8+ Infiltration in primären Melanomen	34
3.5 Die cGAS- und MxA-Expression korrelieren nicht in primären Melanomen	36
3.6 Die MxA-Expression korreliert mit der CD8+ Infiltration	37
3.6.1 Häufige Kolo-kalisation der MxA-Expression und CD8+ Infiltration im Tumor	39
3.7 Die cGAS-Expression korreliert positiv mit der Tumordicke	41
3.8 Die Typ I Interferon Antwort korreliert nicht mit der Prognose	42

4. Diskussion	43
4.1 Ausblick	46
5. Zusammenfassung	47
Literaturverzeichnis	48
Abbildungsverzeichnis	55
Tabellenverzeichnis	56
Danksagungen	57
Ehrenerklärung	58
Darstellung des Bildungsweges	59

## Abkürzungsverzeichnis

TIL	T-Lymphozyten Infiltrat
IFN	Interferon
HMB45	Human melanoma black 45
STING	Stimulator of interferon genes
MxA	MX Dynamin Like GTPase 1
MC1R	Melanocortin 1
cGAS	Cyclic GMP-AMP synthase
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
Arf-p53	alternate reading frame protein 53
MITF	Mikrophthalmie-assoziiertes Transkriptionsfaktor
HIF1a	hypoxia inducible factor 1 alpha
LMM	Lentigo-maligna-Melanom
ALM	akrolentiginöses Melanom
SSM	superfiziell spreitendes Melanom
NM	Noduläres Melanom
MUP	Melanoma of unknown primary
BRAF	B rapidly accelerated fibrosarcoma
c-Kit	Tyrosine kinase C
CTLA	cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein
PD-1	programmed cell death protein 1
TIL	Tumorinfiltrierende Lymphozyten
MHC	major histocompatibility complex
STING	stimulator of interferon genes
TBk1	TANK-binding kinase 1

IRF3	interferon regulatory factor 3
IKK	IkappaB Kinase
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
TRIM	Tripartite motif family
AMFR	autocrine motility factor receptor
INSIG1	insulin-induced gene 1
RNF5	ring finger protein 5
APC	antigen presenting cell
GTDS	Gießener Tumordokumentationssystem
FFPE	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte
MIP-1	Macrophage inflammatory protein 1
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
RANTES	Regulated upon Activation, normal T cell Expressed and presumably secreted
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

# 1. Einleitung

## 1.1 Das maligne Melanom

### 1.1.1 Epidemiologie

Das Melanom ist die am häufigsten tödlich verlaufende Tumorerkrankung der Haut. Der sogenannte „schwarze Hautkrebs“ entsteht aus maligne entarteten Melanozyten. In Deutschland erkranken jährlich knapp über 20.000 Menschen und über 3000 Menschen versterben an den Folgen eines Melanoms. Das mittlere Manifestationsalter in Deutschland beträgt bei Frauen 59, bei Männern 67 Jahre (Eggermont et al. 2014).

Aufgrund der möglichen frühen lymphogenen und hämatogenen Metastasierung ist die frühzeitige Erkennung durch regelmäßige Ganzkörperscreenings für die Prognose von großer Bedeutung. Die Einführung des Screenings als Standardprozedur führte ab dem Jahr 2008 zu einer starken Zunahme der Inzidenz (Eggermont et al. 2014). Ebenfalls die zunehmende Lebenserwartung der Menschen sowie das Freizeitverhalten sorgten für eine starke Zunahme der Inzidenz (S3-Leitlinie "Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms" 2020). Seit den 1980er Jahren ist die Neuerkrankungsrate in allen westlichen Industrienationen gestiegen.

### 1.1.2 Risikofaktoren

Das Risiko der Erkrankung basiert u. a. auf Umwelt - und genetischen Faktoren. Zu den Umweltfaktoren zählt v. a. eine erhöhte UV-Exposition der Haut (Rastrelli et al. 2014). Diese kann durch viele Sonnenstunden/Jahr sowie die mangelhafte Nutzung von Sonnenschutzmitteln negativ beeinflusst werden (Mulliken et al. 2012). In anderen Regionen der Welt wie z.B. Australien kann die Inzidenz durch z. B. unterschiedlich starke UV-Belastung höher sein. Als Phänotyp zeigen Menschen mit u. a. heller Haut, roten oder blonden Haare, sowie blauen Augen ein erhöhtes Risiko. Menschen mit sehr dunklem Hauttyp leiden nur selten an einem Melanom (Bradford 2009). Das Melanom ist zu 5 - 10 % familiär bedingt. Es wird in diesem Fall autosomal-dominant vererbt und als FAMM-Syndrom (Familiäres atypisches multiples Muttermal- und Melanomsyndrom) bezeichnet (Lynch und Shaw 2016). Familien, in denen bereits ein gehäuftes Auftreten des Melanoms vorhanden war, tragen zu zwischen 20 - 40 % eine Keimbahnmutation im CDKN2A Gen (Rossi et al. 2019). In diesem Gen werden im Falle der Keimbahnmutation die beiden Tumorsuppressor-Proteine p16-Rb und Arf-p53 nicht mehr aktiviert (Bardeesy et al. 2001). Auch eine Missense-Substitution im MITF-Gen führt zu einem fünffach erhöhten Risiko, ein Melanom zu entwickeln. Die Mutation sorgt für eine stärkere Bindung des MITF-Proteins an den HIF1a-Promoter, was zur erhöhten Melanozyten-Produktion, -Migration und -Invasion führt (Eggermont et al. 2014).

### **1.1.3 Klinik**

#### **Superfiziell spreitendes Melanom (SSM)**

Das SSM ist mit 60 % der häufigste histologische Subtyp des Melanoms (Wallon-Dumon und Dréno 2003). Es tritt meist am Rücken, Rumpf und den Extremitäten auf. Histopathologisch zeigt sich ein Durchbruch der atypischen Melanozyten durch die Basalmembran sowie eine breite Durchsetzung der Dermis. Es zeigt sich als Immunreaktion meist basal ein unterschiedlich ausgeprägtes lymphozytäres Infiltrat (Smoller 2006).

#### **Noduläres Melanom (NM)**

Das noduläre Melanom ist der zweithäufigste Subtyp und zeigt meist eine ungünstige Prognose, da dem frühen vertikalen invasivem Wachstum nur eine kurze oder keine horizontale Phase vorausgeht (Saaq et al. 2016). Es zeigt sich eine knotige, bläulich-rötlich oder dunkelbraun farbige Hautveränderung (Roesch und Berking 2017).

#### **Lentigo-maligna-Melanom (LMM)**

Das Lentigo-maligna-Melanom tritt vorwiegend bei älteren Patienten in stark sonnenexponierten Arealen wie Gesicht, Hals, Händen, Armen und Unterschenkeln auf (Situm et al. 2010). Es entsteht meist nach einer präinvasiven Phase atypischer Melanozyten in Form eines Lentigo maligna. Im Verlauf entwickeln sich auf dem Boden dieser melanotischen Präkanzerose Knötchen, die auf ein vertikales und somit invasives Wachstum hinweisen (Iznardo et al. 2020). 10 % der diagnostizierten Melanome sind Melanome vom LMM-Typ.

#### **Akrolentiginöses Melanom (ALM)**

Dieser Typ des Melanoms wird durch seine Lokalisation bestimmt. Es kommt vorwiegend an Innenflächen der Hände und den Fußsohlen sowie interphalangeal und subungual vor (Kuchelmeister et al. 2000). Nur 4 – 5 % aller Melanome sind akrolentiginös. Bei dunklen Hauttypen ist es der häufigste Melanomtyp (Mahendraraj et al. 2017).

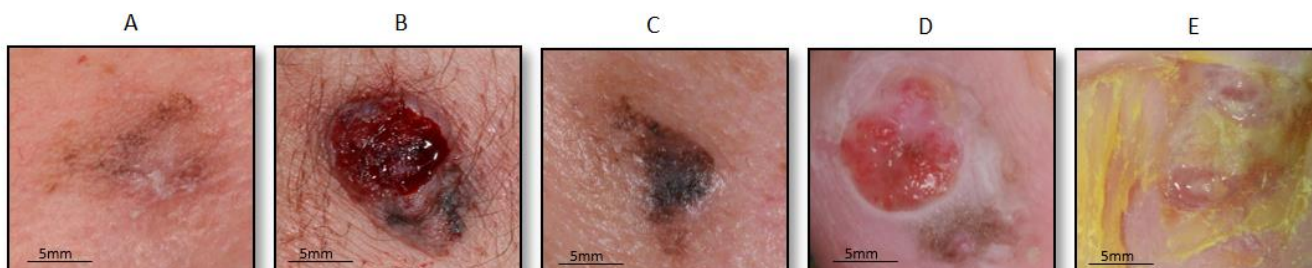
#### **Amelanotisches Melanom**

Als amelanotisches Melanom bezeichnet man die pigmentarme bis –freie Form des Melanoms. Klinisch ist meist ein roter bis hautfarbener Knoten sichtbar. Die Prognose ist schlecht, da amelanotische Melanome meist spät entdeckt werden (Gong et al. 2019).



## Sonderformen

Als Sonderformen des Melanoms bezeichnet man die klinischen Bilder, die nicht vollständig den oben genannten Formen zugeordnet werden können. Beispiele sind das Schleimhautmelanom, das maligne Melanom unklaren Primus (MUP) sowie das desmoplastische Melanom.



**Abb. 1:** Beispiele der unterschiedlichen Melanomtypen (Maßstab 5 mm), (A) superfiziell spreitendes Melanom, (B) noduläres Melanom, (C) Lentigo-maligna-Melanom, (D) akrolentiginöses Melanom, (E) amelanotisches Melanom.

### 1.1.4 Diagnostik

Zur Beurteilung der Malignität eines Pigmentmals der Haut können die sogenannten ABCDE-Kriterien herangezogen werden, die sich aus A - Asymmetrie, B - Begrenzung, C – Colour (engl. Farbe), D - Durchmesser, E - Erhabenheit, zusammensetzen (Tsao et al. 2015; Abbasi et al. 2004). Dazu wird häufig das Hässliche-Entlein-Zeichen („Ugly Duck Sign“) genannt. Es bezeichnet ein auffälliges Pigmentmal, das nicht zum Gesamtbild der restlichen Nävi des Patienten passt und für den Untersucher heraussticht (Gaudy-Marqueste et al. 2017; Scope et al. 2008). Die Beurteilung der Pigmentmale kann durch Verwendung eines Auflichtmikroskops verbessert werden. Wichtige Faktoren bei der Beurteilung der Melanome sind histopathologisch die Eindringtiefe (in mm) nach Breslow, das Clark-Level, Ulzerationen sowie die Mitoserate. Zusätzlich wird ab einer Tumordicke von 1 mm eine Sentinel-Lymphknoten-Diagnostik (SLNB) durchgeführt, um eine lymphogene Metastasierung auszuschließen (Mays et al. 2010; McMasters et al. 2001). Die Sentinel-Lymphknoten-Diagnostik kann bereits bei bestehenden Risikofaktoren wie Ulzerationen oder einer hohen Mitoserate ab einer Tumordicke von 0,8 mm erwogen werden. Dabei wird der sog. „Wächterlymphknoten“, also der Lymphknoten, welcher im Verlauf des Lymphabflussgebiets des primären Melanoms liegt, entfernt und histopathologisch auf Melanomzellinfiltrate untersucht.

Zudem werden die Laktatdehydrogenase und der Marker S100B im Serum als prognostische Marker und zur Verlaufskontrolle genutzt (Mocellin et al. 2008). Zeigt der entnommene Wächterlymphknoten histopathologisch bereits Metastasen, sollten dem Patienten Staging-

Untersuchungen angeboten werden. Zu dem üblichen Staging gehören eine Kernspintomographie (MRT) des Kopfes, eine Computertomographie (CT) des Thorax sowie des Abdomen, eine Lymphknoten-sonographie sowie eine Skelettszintigraphie (S3-Leitlinie "Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms" 2020; Fogarty und Tartaglia 2006).

### **1.1.5 Stadieneinteilung nach TNM gemäß der 8. Ausgabe AJCC Klassifikation**

<b>Stadium</b>	<b>Primärtumor</b>	<b>Regionäre Lymphknoten</b>	<b>Fernmetastasen</b>
0	in situ	unauffällige Lymphknoten	keine
I pathologisch <sup>1</sup>	≤ 2 cm maximaler Tumordurchmesser	in der pathologischen Untersuchung unauffällige Lymphknoten	keine
I klinisch <sup>2</sup>	≤ 2 cm maximaler Tumordurchmesser	klinisch unauffällige Lymphknoten (keine pathologische Untersuchung)	keine
IIA pathologisch <sup>1</sup>	≥ 2 cm maximaler Tumordurchmesser	in der pathologischen Untersuchung unauffällige Lymphknoten	keine
IIA klinisch <sup>2</sup>	≥ 2 cm maximaler Tumordurchmesser	klinisch unauffällige Lymphknoten (keine pathologische Untersuchung)	keine
IIB pathologisch <sup>1</sup>	Infiltration von Faszien, Muskeln, Knorpel oder Knochen	in der pathologischen Untersuchung unauffällige Lymphknoten	keine
IIB klinisch <sup>2</sup>	Infiltration von Faszien, Muskeln, Knorpel oder Knochen	klinisch unauffällige Lymphknoten (keine pathologische Untersuchung)	keine
IIIA	1) Unabhängig von Tumordurchmesser oder Infiltration 2) Kein Primärtumor (unknown primary)	1) pathologisch detektierte Lymphknotenmetastasen ohne vorherigen klinischen Verdacht 2) klinischer Verdacht auf und pathologisch bestätigte Lymphknotenmetastasen	keine

IIIB	unabhängig von Tumordurchmesser oder Infiltration	klinischer Verdacht auf und pathologisch bestätigte Lymphknotenmetastasen oder in transit Metastasen <sup>3</sup>	keine
IV	Tumordurchmesser oder Infiltration	unabhängig vom Lymphknotenstatus	klinischer Verdacht auf Fernmetastasen
IV	Tumordurchmesser oder Infiltration	unabhängig vom Lymphknotenstatus	pathologisch bestätigte Fernmetastasen
<p><sup>1</sup> Mikrometastasen wurden nach einer Schildwächterlymphknotenbiopsie oder nach elektiver Lymphadenektomie histopathologisch ausgeschlossen</p> <p><sup>2</sup> Der Befund basiert rein auf einer klinischen bzw. bildgebenden Untersuchung; diese kann Inspektion, Palpation und/oder Bildgebung beinhalten</p> <p><sup>3</sup> in transit Metastasen sind von ihrer Lokalisation definiert als: (1) zwischen Primärtumor und regionalem Lymphabflussgebiet; oder (2) distal des Primärtumors</p>			

**Tab. 1:** Stadieneinteilung nach TNM gemäß der 8. Ausgabe AJCC Klassifikation (Amin et al. 2017)

### **1.1.6 Therapie**

Bei dem Verdacht auf das Vorliegen eines Melanoms sollte umgehend eine vollständige chirurgische Exzision mit nachfolgender histopathologischer Aufarbeitung erfolgen. Alle Melanome mit einer Tumordicke von  $\geq 2$  mm sollten mit einem Sicherheitsabstand von 1 cm exzidiert werden, ab einer Tumordicke von mehr als 2 mm wird mit einem Sicherheitsabstand von 2 cm exzidiert (Wheatley et al. 2016).

Bei positiver SLN-Biopsie sollte unabhängig von einer vorhandenen Mikro- oder Makrometastasierung eine Lymphknotendissektion der betroffenen Lymphknotenregion erfolgen (Dzwierzynski 2010; Morton et al. 1991). Zur Verbesserung der postoperativen Tumorkontrolle besteht die Möglichkeit einer adjuvanten Radiotherapie (Creagan et al. 1978; Mendenhall et al. 2013). Die Auswahl der adjuvanten medikamentösen Therapie erfolgt nach dem Tumorstadium nach AJCC 2017. Patienten im Tumorstadium II können eine adjuvante Interferontherapie erhalten (Lens und Dawes 2002; Pirard et al. 2004). Patienten im AJCC 2017 Tumorstadium III sollte eine adjuvante Therapie mit einem anti-PD1-Antikörper angeboten werden. Dadurch, dass die Therapie mit einem CTLA-4 Antagonisten keine Verschlechterung der Lebensqualität gegenüber Placebo zeigte, kann es als Ergänzung zur Therapie mit einem anti-PD1-Antikörper kombiniert werden (Larkin et al. 2015). Bei positiver

BRAF V600 E oder V600K Mutation kann die Therapie mit einem BRAF- und MEK-Inhibitor angeboten werden (Long et al. 2017).

Lokoregionale Metastasen können chirurgisch therapiert werden, wenn eine vollständige R0-Resektion möglich ist und kein Hinweis auf eine Fernmetastasierung vorhanden ist. Zudem können Satelliten- und In-transit-Metastasen zur lokalen Tumorkontrolle radiotherapiert werden. Falls lokoregionale Metastasen nicht mehr in sano operabel sind, kann eine intratumorale Injektion von Interleukin 2, eine intratumorale Elektrochemotherapie mit Bleomycin oder Cisplatin, oder eine Therapie mit Talimogene Laherparepvec (T-VEC) erfolgen (Weide et al. 2010; Byrne et al. 2005; Andtbacka et al. 2015). Liegt eine KIT-Mutation vor, kann eine Therapie mit einem cKIT-Inhibitor wie z. B. Imatinib in Erwägung gezogen werden (Kim et al. 2008).

Bei Patienten mit frührezidivierenden Haut- und subkutanen Metastasen besteht die Möglichkeit der hyperthermen Perfusion mit Chemotherapeutika in Satelliten- oder In-transit-Metastasen (Overgaard et al. 1996).

Als weitere, meist jedoch letzte therapeutische Option gilt Dacarbazin als klassische Chemotherapie. Aufgrund der Überlegenheit der anderen Therapien bezüglich Lebensqualität und Lebensverlängerung wird diese jedoch relativ restriktiv genutzt (S3-Leitlinie "Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms" 2020).

### **1.1.7 Prognose**

Die Prognose des Melanoms wird durch mehrere Faktoren beeinflusst. Die wichtigsten Faktoren sind die Tumordicke nach Breslow, das Vorhandensein von Ulzerationen und die Anzahl der Mitosen. Zudem sind eine höhere Anzahl von positiven Sentinel-Lymphknoten, das Vorhandensein von Fernmetastasen sowie histopathologische Regressionszeichen ebenfalls mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Auch die Lokalisation des Primarius zeigt Unterschiede in der Prognose. So hat ein Primarius am Rumpf, Hals oder im Gesicht eine schlechtere Prognose als ein Primarius an den Extremitäten (Callender et al. 2011). Patienten mit dem AJCC Stadium I zeigen eine 5-Jahres-Überlebensrate von über 90 %, Patienten im AJCC Stadium II eine 5-Jahres-Überlebensrate von 45 – 77 %. Im Tumorstadium III zeigt sich lediglich eine 5-Jahres-Überlebensrate zwischen 27 % und 70 %. Patienten mit Fernmetastasen und dem Stadium IV nach AJCC Klassifikation zugehörig, zeigen eine 5-Jahres-Überlebensrate von weniger als 20 % (Heistein und Acharya 2020). Obwohl das männliche Geschlecht mit einer signifikant schlechteren Prognose assoziiert ist, konnte das weibliche Geschlecht als protektiver Faktor bislang nicht bewiesen werden (Crocetti et al. 2016).

## 1.2 Prognostische Bedeutung der lymphozytären Infiltration im Melanom

Viele Arbeiten haben sich in den letzten Jahrzehnten mit der Bedeutung des lymphozytären Infiltrats im Melanom für den weiteren Krankheitsverlauf beschäftigt. Es konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein von sog. „tumor infiltrating lymphocytes“ (TIL) unmittelbar mit der Prognose des Melanoms korreliert. Eine frühzeitige Infiltration des Tumors durch T-Lymphozyten sorgt für eine weniger aggressive lymphogene Metastasierung. Bezogen auf die 5-Jahres-Überlebensrate haben Tumore, die früh mit T-Lymphozyten infiltriert werden, eine bessere Prognose (Burton et al. 2011). Melanome bei Frauen haben eine niedrigere Wahrscheinlichkeit zu metastasieren und somit eine bessere Prognose als Männer, weil sie meist eine schnellere adaptive Immunantwort in Form vom TIL haben (Lee und Margolin 2012). Zudem wird ein besseres Ansprechen einer PD-1 Antikörpertherapie bei Tumoren vermutet, die bereits eine starke Aktivierung des Typ I Interferonsystems und somit ein stärkeres Immunzellinfiltrat besitzen (Lee et al. 2020).

Die Relevanz der lymphozytären Infiltration in Tumoren hinsichtlich der Prognose beruht auf der Aktivierung verschiedener immunologischer Prozesse. Unter anderem werden im Tumor maligne Zellen, die auf dem MHC-I-Komplex Tumorantigene präsentieren, von CD8+ Zellen angegriffen. CD8+ Zellen sezernieren Interferon- $\gamma$ , welches die Aktivierung von Makrophagen und die Expression von MHC-I-Klasse-Molekülen in benachbarten Zellen bewirkt. Auf diese Weise wird die antitumorale Immunantwort weiter aktiviert. Des Weiteren sezernieren CD8+-Zellen Interferone vom Typ I (IFN- $\alpha/\beta$ ). Diese sind für die Aktivierung natürlicher Killerzellen verantwortlich, welche die Tumorabwehr weiter verstärken (Fuertes et al. 2011).

## 1.3 Die Rolle des cGAS-STING Signalwegs für die Interferon-Produktion

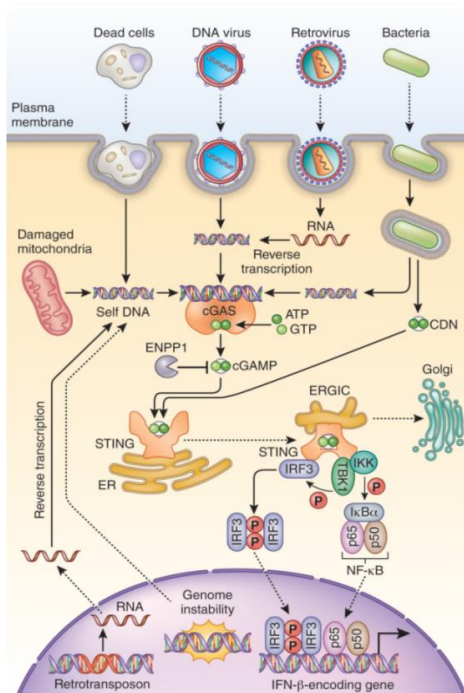
Die „cyclic GMP-AMP synthase“ (cGAS) ist eine DNA-bindende Domäne, welche durch ihre Aktivierung einen Signalweg verschiedener Interferon-stimulierender Gene in der Zelle anregt. Sie wird durch zytosolische DNA aktiviert. Zytosolische DNA ist entweder bei Invasion der Zelle durch ein Pathogen oder bei Schädigung von DNA in der Zelle vorhanden.

CGAS ist ein Enzym, welches aus einer Nukleotidyltransferase-Domäne sowie zwei DNA-bindenden Domänen besteht. Durch das Binden von dsDNA aus phagozytiertem Zelldebris, das Binden freier geschädigter mitochondrialer DNA, dsDNA aus DNA-Viren oder dsDNA nach reverser Transkription einer RNA aus einem Retrovirus kann cGAS aktiviert werden (Woo et al. 2014).

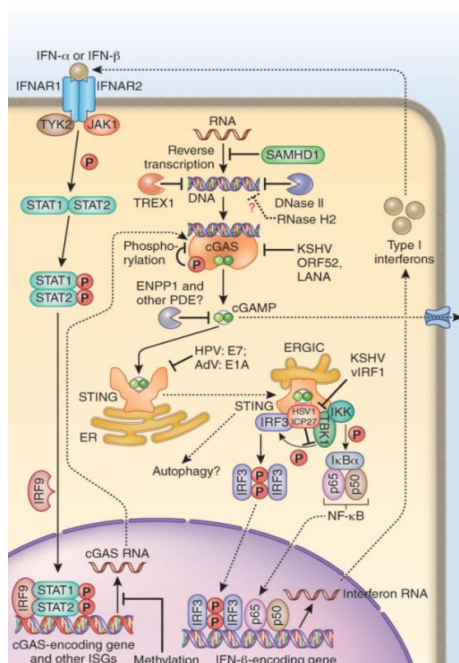
Wenn die DNA in einem 2:2 Komplex gebunden ist, wird zyklisches GMP-AMP (cGAMP) aus ATP und GTP generiert. Dieses cGAMP ist ein „second messenger“ und bindet an der „stimulator of interferon genes“-Domäne (STING-Domäne) im endoplasmatischen Retikulum.

Durch die Bindung an die STING-Domäne wird die „TANK-binding kinase 1“ (TBK1) aktiviert und der Transkriptionsfaktor „interferon regulatory factor 3“ (IRF 3) phosphoryliert (Cheng et al. 2020). TBK1 und die „IkappaB Kinase“ (IKK) aktivieren den „nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells“ (NF- $\kappa$ B) und phosphorylieren IRF3. Das phosphorylierte IRF3 bildet ein Homodimer, welches im Nucleus die Interferon-Produktion aktiviert. Das cGAMP kann durch interzelluläre Kommunikation über gap junctions auch in benachbarten Zellen den cGAS-STING-Signalweg aktivieren (Ablasser et al. 2013).

STING wird post-translational durch Phosphorylierung und Ubiquitinierung reguliert. Diese Art der Regulation ist wichtig, um eine übermäßige Interferonproduktion zu verhindern sowie den Abbau von STING in der Zelle zu ermöglichen (Konno et al. 2013). Es sind 3 Ubiquitin E3 Ligasen bekannt, die STING positiv regulieren. Die „Tripartite motif family“ (TRIM 56, 32) verstärkt die Aktivierung des Signalwegs (Zhang et al. 2012). Der „autocrine motility factor receptor Glykoprotein 78“ (AMFR-GP78) und „insulin-induced gene 1“ (INSIG1) Komplex sorgen für die Stimulation der IFN Produktion via TBK1 (Wang et al. 2014). Hemmende Ubiquitinasen sind das „ring finger protein 5“ (RNf5) und TRIM30a, welche die Polyubiquitinierung von STING bewirken und somit den Abbau im Proteasom fördern (Chen et al. 2016). In humanen Melanom-Zelllinien zeigte sich STING teils herabreguliert oder wurde gar nicht exprimiert. In primären Melanomen konnte STING nur in 75% nachgewiesen werden. Metastasierte Melanome zeigten einen Verlust von STING und cGAS in 40% der Fälle (Xia et al. 2016).



**Abb. 2:** Die unterschiedlichen Aktivierungsmöglichkeiten des cGAS-STING Signalweges in der Zelle (Chen et al. 2016)



**Abb. 3:** Die positive Rückkopplung der Typ I Interferon Antwort nach Aktivierung des cGAS-STING Signalweges in einer Zelle (Chen et al. 2016)

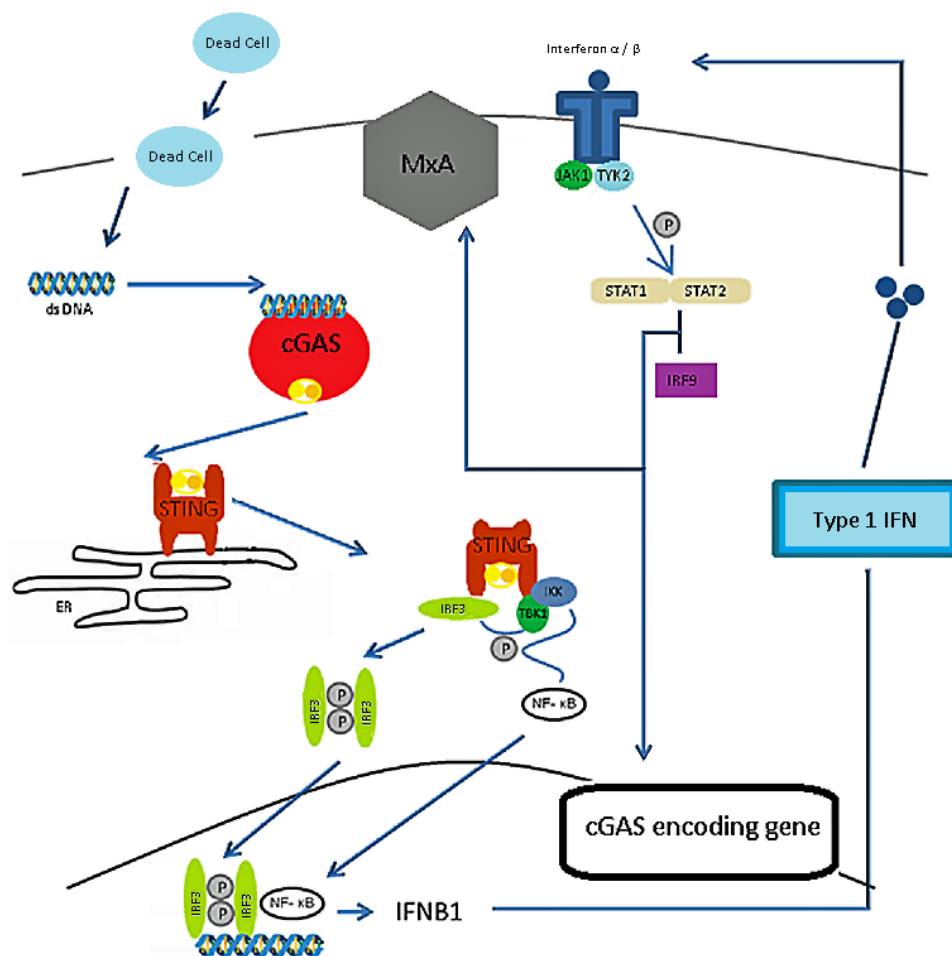
#### 1.4 Ziele und Hypothesen der Arbeit

Die Typ I Interferon Antwort spielt eine wichtige Rolle bei der Co-Stimulation zwischen Antigen-präsentierenden-Zellen (APC) und CD8+ Zellen sowie bei der Regulation von MHC-1-Rezeptoren (Welsh et al. 2012). Damit trägt die Typ I Interferon Antwort zu einer stärkeren Immunantwort und zur Bekämpfung des Tumors bei, was zu einer besseren Prognose bei stark CD8+Infiltrierten Tumoren führt (Wenzel et al. 2005).

In welchem Ausmaß cGAS an der Typ I Interferon Antwort beteiligt ist, ist nicht bekannt. In A375 und SK-MEL-5 Zelllinien ist cGAS teils nicht exprimiert, in G361 und SK-MEL-24 Zelllinien ist es schwach exprimiert. Auch in humanen primären Melanomen war die cGAS-Expression zu 16,1 % nicht mehr vorhanden (Xia et al. 2016). Die Herabregulierung des Enzyms cGAS könnte eine Ursache für die unterschiedliche Ausprägung der Typ I Interferon Antwort in humanen Melanomen sein. Die Stärke der Typ I Interferon Antwort kann durch das antivirale Protein MxA gezeigt werden. Dieses wird exprimiert, sobald eine Typ I Interferon Antwort induziert wurde (Wenzel et al. 2005).

Das untersuchte Patientenkollektiv in der vorliegenden Arbeit umfasst 50 Patienten mit einem primären Melanom. Die folgenden Fragen sollten dabei mittels immunhistochemischer Färbung von Melanompräparaten und ihrer nachfolgenden histopathologischen Auswertung beantwortet werden.

1. Korreliert die cGAS-Expression in Melanomen positiv mit der MxA-Expression?
2. Korreliert die cGAS-Expression mit der Tumordicke (in Melanomen  $\geq 1,5$  mm)?
3. Korreliert die MxA-Expression positiv mit der Infiltration von CD8+-Zellen?
4. Haben Melanome mit einer starken MxA-Expression eine bessere Prognose?



**Abb. 4:** Schema der möglichen Aktivierung des cGAS-STING-Signalwegs im Tumor durch dsDNA aus toten Zellen und der anschließenden Typ I Interferon Aktivierung und MxA-Expression.



## **2. Patienten, Material und Methoden**

### **2.1 Das Patientenkollektiv**

Das untersuchte Kollektiv umfasst ausgewählte Melanom-Patienten, bei denen zwischen 2012 und 2017 die Primärexzision in der Universitätsklinik Magdeburg durchgeführt wurde. Es erfolgte eine zustimmende Bewertung seitens der Ethikkommission der Universität Magdeburg für die Durchführung der geplanten Versuche.

Die Aufarbeitung und Suche der Patientendaten erfolgte über das MEDOS-System der Universitätsklinik sowie dem GTD–Magdeburg (Gießener Tumordokumentationssystem). In diesem Tumordokumentationssystem werden seit Jahren sämtliche Hauttumorpatienten der Universitätsklinik Magdeburg gemeldet und dokumentiert. Das MEDOS-System beinhaltet sämtliche archivierten Arztbriefe sowie dermatohistopathologischen Befunde. Die gesammelten Daten wurden anhand folgender Kriterien gefiltert: Name, Geburtsdatum, Geschlecht, Datum der Erstdiagnose, Tumorlokalisation, TNM Stadium, histologischer Subtyp, Tumordicke nach Breslow, Sentinel Lymphknotendiagnostik.

Für diese Arbeit wurden aus der Stichprobenmenge lediglich Patienten ausgewählt, die eine Tumordicke  $\geq 1,5$  mm nach Breslow zeigten und im Therapieverlauf eine Sentinel-Lymphknotendiagnostik erhalten haben. In den ausgewählten 50 Fällen wurde ebenfalls das Sterbedatum der Patienten ermittelt.

### **2.2 Allgemeine immunhistochemische Färbungen**

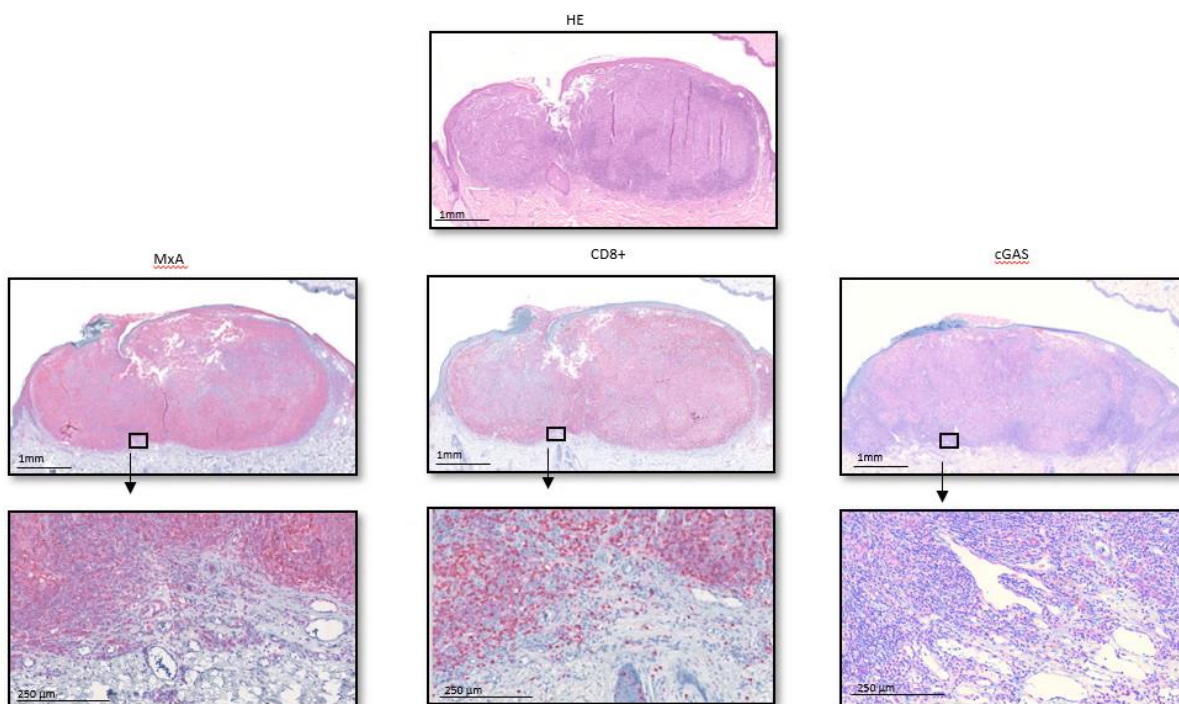
Die immunhistochemische Färbung besteht aus mehreren Schritten. Der erste Schritt ist das Schneiden der Gewebepräparate auf 3, 4 oder 5  $\mu\text{m}$  Schnitte. Diese Schnitte werden auf die Objektträger übertragen. Dabei ist zu beachten, dass die Präparate beim Schneiden von FFPE immer zeitweise auf eine kühlende Fläche gelegt werden, um das dünne Schneiden sauber zu ermöglichen. Auch das Entstehen von mechanischen Schäden im Schnitt sollte verhindert werden. Anschließend kommt es zum Entparaffinieren und Hydrieren der Schnitte, damit Antikörper und andere Reagenzien nicht beim Penetrieren der Gewebeprobe behindert werden. Das Entparaffinieren wird klassischerweise durch Xylol erreicht, das Hydrieren wird zunächst durch Alkohol, darauffolgend durch Wasser erreicht.

Um die immunhistochemische Färbung zu optimieren, bevor man die Gewebeproben mit dem Antikörper in Kontakt bringt, gibt es zwei notwendige Schritte. Zunächst sollten zur Antigendemaskierung mit Hilfe von beispielsweise kochender EDTA oder Citrat-Pufferlösung oder proteolytischen Enzymen wie z.B. der Proteinase K die kovalenten Cross-Links in der Zelle, die bei der Formalin-Fixierung entstanden sind, aufgespalten werden. Kontrollierte Proteolyse verbessert die Penetration der Reagenzien enorm. Danach sollten mit einem

Proteinblocker die endogenen Enzyme in der Zelle blockiert werden, um ein unspezifisches Binden von beispielsweise alkaliner Phosphatase und „horseradish peroxidase“ zu vermeiden.

Bei dem Färbungsprozess gibt es verschiedene Methoden. Es gibt zum einen die direkte Färbung, bei der der primäre Antikörper direkt gekoppelt ist mit einem Marker, und zum anderen die indirekte Färbung, bei der der Antikörper über das passende Fc-Fragment mit einem sekundären Antikörper reagiert. Dieser sekundäre Antikörper ist an ein Enzym gekoppelt, welches das danach hinzugegebene Substrat spaltet. Die Spaltung dieses Substrats führt zu einem sichtbaren Farbstoff.

Für die Etablierung der Primärantikörper wurde das Zytomed-Kit genutzt. Dieses färbt die histologischen Präparate mittels der „Labelled (Strept-) Avidin-Biotin Methode“ (LSAB). In diesem Fall ist der sekundäre Antikörper biotinyliert. Streptavidin und Avidin haben eine hohe Affinität gegenüber Biotin, sodass das Streptavidin-AP-Konjugat später durch das Hinzugeben von dem Naphtol-AS-MX-Phosphat („FastRed“) zu einer spezifischen Färbung führt, da die alkaline Phosphatase den Phosphat-Komplex im „FastRed“ spaltet. Der sekundäre Antikörper ist in diesem Fall ein Antikörpergemisch aus biotinylierten Antikörpern, sodass auch z. B. der monoklonale MB143 Antikörper aus der Maus bei der AK-Ag-Komplexbildung abgedeckt wird. Nach der Färbung und Gegenfärbung folgt die Dehydrierung. Diese erfolgt mit einer aufsteigenden Alkoholreihe. Abschließend werden die Träger neu eingedeckt.



**Abb. 5:** Beispiele der etablierten Färbungen eines ausgewählten Tumors. HE-Färbung

(Maßstab 1 mm); MxA-Färbung (Maßstab 1 mm, 250 µm); CD8+ Färbung (Maßstab 1 mm, 250 µm); cGAS-Färbung (Maßstab 1 mm, 250 µm).

## 2.3 Substanzen und Chemikalien

Primärantikörper					
	Antigen	Host	Clone	Hersteller	Verdünnung
Anti-CGas	Human CGas	Rabbit polyclonal	MB21D1	Novus Biologicals	1:2000
Anti MxA	Human MxA	Mouse monoclonal	M143	Universitätsklinikum Freiburg, Arbeitsgruppe Prof. Georg Kochs	1:100
Anti CD8A	Human CD8+	Mouse monoclonal	CD8A	Zytomed	1:50
Anti P100	Human Melanosome	Mouse monoclonal	HMB45	Dako/Agilent	1:100

**Tab. 2:** Eigenschaften der Primärantikörper. Angabe des gesuchten Antigens, des Hosts, des Klons, des Herstellers und der Verdünnung.

Substanzen, Chemikalien und Lösungen	Firma
Streptavidin-AP-Konjugat	Zytomed (FastRedKit)
Substrat-Chromogenlösung	Zytomed (FastRedKit)
Biotinylierter Sekundär-Antikörper	Zytomed

PBS-Lösung/ System Wash Buffer	Zytomed
Blockingserum	Zytomed (FastRedKit)
Antibody Diluent	Zytomed
Hämatoxylin	Zytomed
Ethanol 100 %, 96 %, 70 %	Fischar
Xylolersatz, ProTaq <sup>s</sup> ® Clear	Quartett
0,3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Lösung	Zytomed
Aqua dest.	Braun
Glycerineindeckmedium	Leica
EDTA, pH 9	Zytomed
Citrat, pH 6	Zytomed

**Tab. 3:** Verwendete Substanzen, Chemikalien und Lösungen

Geräte und Materialien	Firma
BenchMark Ultra	Ventana
Leica ST5020 Multistainer	Leica
CV5030 Eindecker	Leica
Glasobjektträger	Menzel
Pipetten	Eppendorf
Deckgläser	Leica
NanoZoomer-SQ Digital slide scanner: C13140-01	Hamamatsu

**Tab. 4:** Verwendete Geräte und Materialien

## 2.4 Etablierung der immunhistochemischen Färbungen

Die Färbung für den CD8A- Antikörper und für HMB45 erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Färbeprotokolle für den cGAS- und MxA-Antikörper wurden zunächst mittels Handfärbungen etabliert und dann als Programm auf den BenchMark Ultra (Ventana) übertragen.

Die Etablierung des MxA-Antikörpers der Forschungsgruppe von Dr. Georg Kochs wurde zunächst mit einem bereits bekannten Protokoll durchgeführt und dann für die maschinelle Färbung des BenchMark Ultra angepasst.

Für die Protokolle des cGAS-Antikörpers wurden ebenfalls Handfärbungen angefertigt. Dies diente vor allem einem optimalen Antigen Retrieval (Kochen in Citrat/EDTA-Puffer, enzymatisch mit Proteinkinase K) sowie einer optimalen Verdünnung des Antikörpers. Die Beurteilung wurde durch Kontrolle von einem Dermato-Histopathologen ebenfalls als spezifisch eingeschätzt.

Als Positivkontrollen für cGAS wurden Präparate ausgewählt, welche für eine starke Typ I Interferon Aktivierung bekannt sind. Entsprechend der Herstellerempfehlung wurden Tonsillen-, Plazenta- und Melanom -Präparate genutzt und miteinander verglichen. Zur Etablierung der MxA-Färbung wurden Hautproben von Lupus erythematoses-Patienten verwendet.

### 1. Entparaffinieren/Rehydratisieren maschinell

Schritt	Reagenz	t (min)	Dip
1	Xylol	5	ja
2	Xylol	5	ja
3	Xylol	5	ja
4	Ethanol 100 %	1,5	ja
5	Ethanol 96 %	1,5	ja
6	Ethanol 70 %	1,5	ja
7	Fließwasser-Station	1	nein

**Tab. 5:** Schritte des maschinellen Entparaffinierungsprogramms, mit Angabe der jeweiligen Schrittnummer, Reagenz, Reaktionszeit und Eintauchbewegung im ST5020 Leica.

## 2. Antigen Retrieval

Hier zeigte sich ein Unterschied bei den beiden Antikörpern:

MxA-Antikörper:

- 14 min einlegen in 0,3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Waschen mit PBS-Lösung
- 10 min Blockingserum

cGAS-Antikörper:

- 20 min Kochen in EDTA (pH 6)
- Waschen mit PBS-Lösung
- 10 min Blockingserum

Das Blockingserum wird benutzt, um chromogene Signale von beispielsweise „horseradish peroxidase“ und alkaline Phosphatase, die viel Bindungsaktivität in verschiedenen Zellorten und Gewebearten zeigen, zu verhindern. Es kann zu unspezifischen Ergebnissen kommen, wenn kein Blockingserum genutzt wird. Das benutzte Blockingserum war in dem „FastRedKit“ von Zytomed enthalten.

## 3. LSAB-AP Färbungen

### I. Primärantikörper

- MxA-Antikörper: 100 µl Primärantikörper/Schnitt auftragen, inkubieren über 60 min bei 37° Celsius
- cGAS-Antikörper: 100µl Primärantikörper/Schnitt auftragen, inkubieren über 45 min bei 37° Celsius

Träger 2x5 min mit PBS Waschpuffer waschen

### II. biotenylierter Sekundär-Antikörper

- 100 µl sekundär Antikörpermischung auftragen, 20 min lang inkubieren

Träger 2x5 min mit PBS Waschpuffer waschen

### III. Streptavidin-AP-Konjugat

- 100 µl Streptavidin-AP-Konjugat auftragen und 20 min lang inkubieren

Träger 2x5 min mit PBS Waschpuffer waschen

## IV. FastRed-Lösung

- 100 µl Substrat-Chromogenlösung auftragen und 20 min lang inkubieren

Träger 2x5 min mit PBS Waschpuffer waschen, Präparat mit Aqua dest. spülen

## V. Gegenfärbung

- Präparat kurz in Hämatoxylin eintauchen, gründlich mit Aqua dest. Waschen

## 4. Dehydrieren maschinell, Eindecken der Träger maschinell

Schritt	Reagenz	t (min)
1	Fließwasser-Station	1
2	Ethanol 96%	1
3	Ethanol 100%	5
4	Ethanol 100%	5
5	Xylol	2,5
6	Xylol	2,5

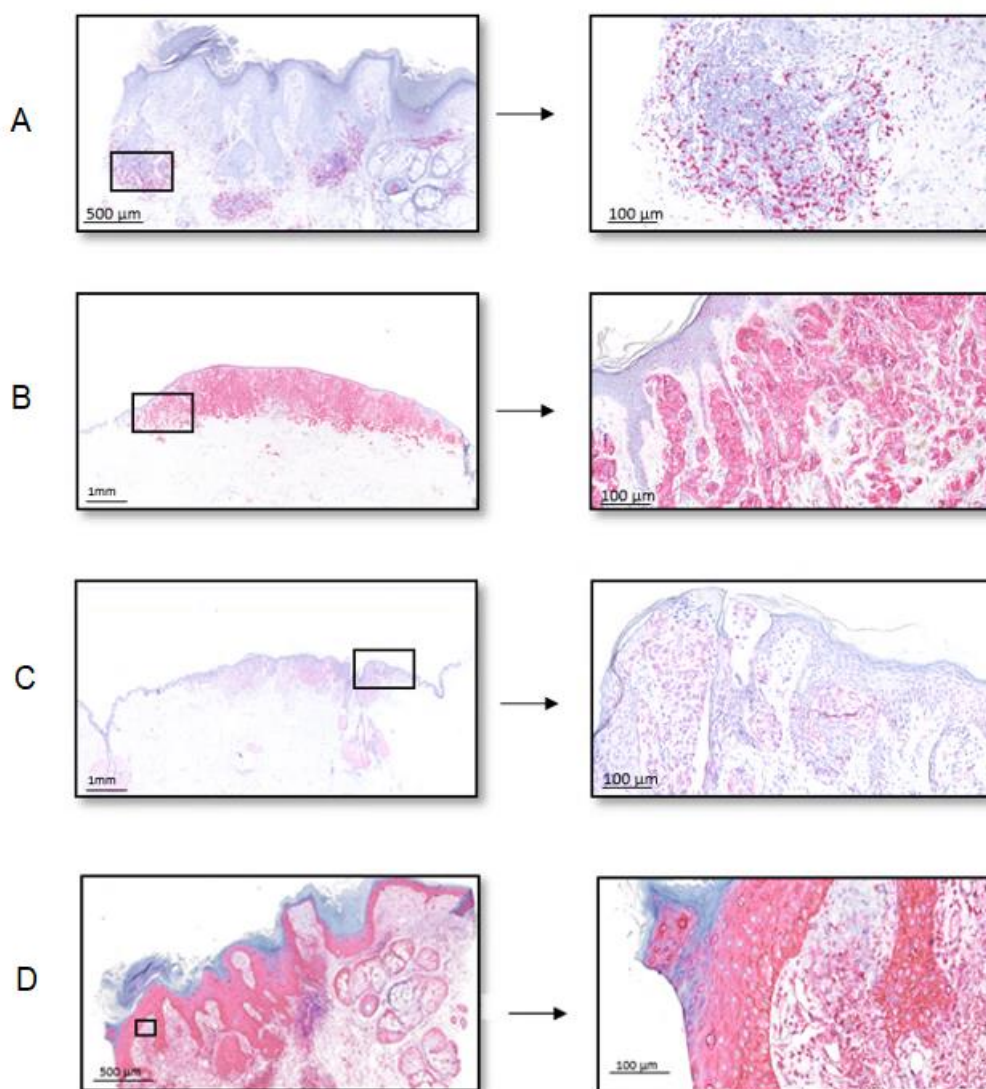
**Tab. 6:** Schritte des maschinellen Dehydratationsprogramms, mit Angabe der jeweiligen Schrittnummer, Reagenz und Reaktionszeit im ST5020 Leica.

Nach der Etablierung mittels der Methode per Hand wurde im „BenchMark ULTRA“ von Ventana ein identisches Programm erstellt, um die Serie der 50 ausgewählten Melanome zu färben. Der Schritt der Bleichung mittels der 0,3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung wurde dabei nicht mehr durchgeführt.

Antigen	Positiv-Kontrolle
MxA	Hautbioptat eines Lupus erythematodes-Patienten
cGas	Melanom
HMB45	Melanom
CD8A	Hautbioptat eines Lupus erythematodes-Patienten

**Tab. 7:** Beispielfärbungen/Positivkontrollen zum Nachweis der Bindungsspezifität der genutzten Antikörper

## 5. Whole slide imaging der Proben



**Abb. 6:** Beispiele für Positivkontrollen (A) CD8+ positives Infiltrat bei Lupus erythematosus (Maßstab 500 µm, 100 µm). (B) HMB45 Färbung im Melanom (Maßstab 1 mm, 100 µm). (C) cGAS Färbung eines Melanoms (Maßstab 1 mm, 100 µm). (D) MxA Färbung eines Lupus erythematosus (Maßstab 500 µm, 100 µm).



Die Serienfärbung erfolgte mittels des Ventana Bench Ultra.

A

1001	t MxA
------	-------

- 1 Entparaffinierung [Ausgewählt]
- 2 Objektträger-Temperatur von [63 °C] auf Mittlere Temperaturen ( Entparaffinierung ) erhöhen
- 3 Hitzevorbehandlung [Ausgewählt]
- 4 ULTRA Conditioner #1 [Ausgewählt]
- 5 Erwärme Objektträger auf [90 °C] und inkubiere für 8 Minuten ( Cell Conditioner Nr.1 )
- 6 20 Minuten ULTRA CC1 [Ausgewählt]
- 7 36 Minuten ULTRA CC1 [Ausgewählt]
- 8 52 Minuten ULTRA CC1 [Ausgewählt]
- 9 64 Minuten ULTRA CC1 [Ausgewählt]
- 10 Titration [Ausgewählt]
- 11 Hand Apply ( Primär Antikörper ), and Incubate for [0 Stunden 48 Min]
- 12 ultraWash [Ausgewählt]
- 13 Gegenfärbung [Ausgewählt]
- 14 1 Tropfen von [HEMATOXYLIN II] ( Gegenfärbung ) auftragen, LCS auftragen u. für [8 Minuten] inkubieren.
- 15 Nach-Gegenfärbung [Ausgewählt]
- 16 1 Tropfen von [BLUING REAGENT] ( Nach-Gegenfärbung ) auftragen, LCS auftragen u. für [4 Minuten] inkubieren.

B

1000	t c Gas
------	---------

- 1 Entparaffinierung [Ausgewählt]
- 2 Objektträger-Temperatur von [63 °C] auf Mittlere Temperaturen ( Entparaffinierung ) erhöhen
- 3 Hitzevorbehandlung [Ausgewählt]
- 4 ULTRA Conditioner #1 [Ausgewählt]
- 5 Erwärme Objektträger auf [90 °C] und inkubiere für 8 Minuten ( Cell Conditioner Nr.1 )
- 6 20 Minuten ULTRA CC1 [Ausgewählt]
- 7 36 Minuten ULTRA CC1 [Ausgewählt]
- 8 52 Minuten ULTRA CC1 [Ausgewählt]
- 9 64 Minuten ULTRA CC1 [Ausgewählt]
- 10 Titration [Ausgewählt]
- 11 Hand Apply ( Primär Antikörper ), and Incubate for [0 Stunden 48 Min]
- 12 ultraWash [Ausgewählt]
- 13 Gegenfärbung [Ausgewählt]
- 14 1 Tropfen von [HEMATOXYLIN II] ( Gegenfärbung ) auftragen, LCS auftragen u. für [8 Minuten] inkubieren.
- 15 Nach-Gegenfärbung [Ausgewählt]
- 16 1 Tropfen von [BLUING REAGENT] ( Nach-Gegenfärbung ) auftragen, LCS auftragen u. für [4 Minuten] inkubieren.

## C

3	CD 8
---	------

- 1 Entparaffinierung [Ausgewählt]
- 2 Objektträger-Temperatur von [63 °C] auf Mittlere Temperaturen ( Entparaffinierung ) erhöhen
- 3 Hitzevorbehandlung [Ausgewählt]
- 4 ULTRA Conditioner #1 [Ausgewählt]
- 5 Erwärme Objektträger auf [90 °C] und inkubiere für 8 Minuten ( Cell Conditioner Nr.1 )
- 6 20 Minuten ULTRA CC1 [Ausgewählt]
- 7 36 Minuten ULTRA CC1 [Ausgewählt]
- 8 52 Minuten ULTRA CC1 [Ausgewählt]
- 9 64 Minuten ULTRA CC1 [Ausgewählt]
- 10 Antikörper [Ausgewählt]
- 11 1 Tropfen von [anti-CD8 (SP57)] ( Antikörper ) auftragen, LCS auftragen u. für [0 Stunden 32 Min] inkubieren.
- 12 ultraWash [Ausgewählt]
- 13 Gegenfärbung [Ausgewählt]
- 14 1 Tropfen von [HEMATOXYLIN II] ( Gegenfärbung ) auftragen, LCS auftragen u. für [8 Minuten] inkubieren.
- 15 Nach-Gegenfärbung [Ausgewählt]
- 16 1 Tropfen von [BLUING REAGENT] ( Nach-Gegenfärbung ) auftragen, LCS auftragen u. für [4 Minuten] inkubieren.

## D

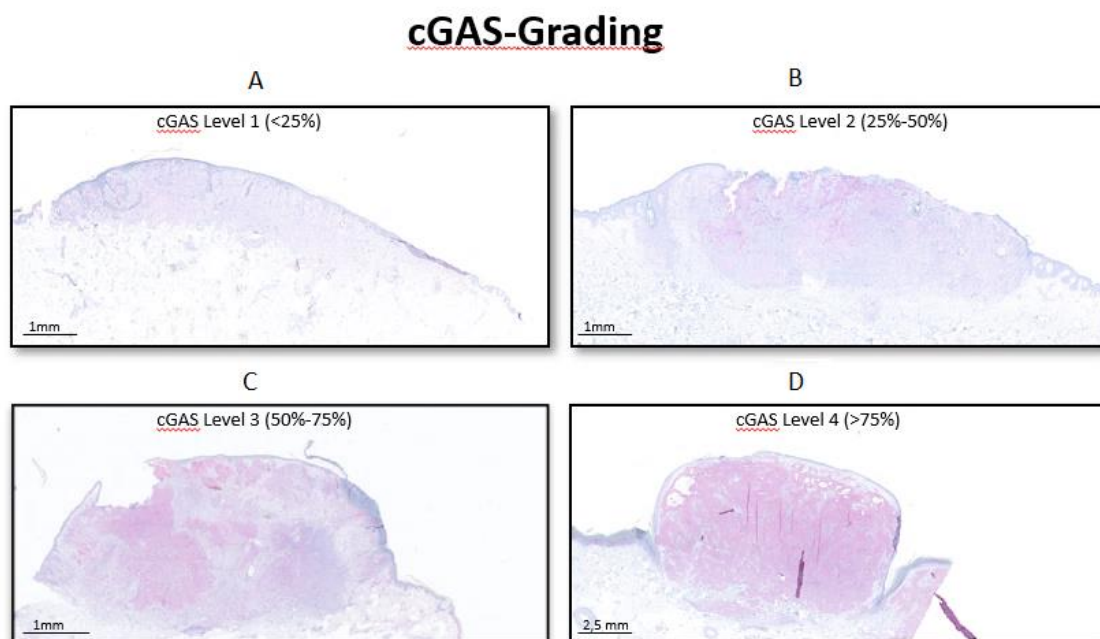
12	HMB45
----	-------

- 1 Entparaffinierung [Ausgewählt]
- 2 Objektträger-Temperatur von [63 °C] auf Mittlere Temperaturen ( Entparaffinierung ) erhöhen
- 3 Antikörper [Ausgewählt]
- 4 1 Tropfen von [anti-Mel (HMB45)] ( Antikörper ) auftragen, LCS auftragen u. für [0 Stunden 24 Min] inkubieren.
- 5 ultraWash [Ausgewählt]
- 6 Gegenfärbung [Ausgewählt]
- 7 1 Tropfen von [HEMATOXYLIN II] ( Gegenfärbung ) auftragen, LCS auftragen u. für [8 Minuten] inkubieren.
- 8 Nach-Gegenfärbung [Ausgewählt]
- 9 1 Tropfen von [BLUING REAGENT] ( Nach-Gegenfärbung ) auftragen, LCS auftragen u. für [4 Minuten] inkubieren

**Abb. 7:** Auszug aus den Protokollen der Antigenfärbung des Benchmark Ultras von Ventana. A (MxA), B (cGAS), C (CD8+), D (HMB45)

## 2.5 Beurteilung der cGAS-Expression

Nach der immunohistochemischen Färbung der Melanompräparate wurden diese semiquantitativ auf die Fläche des Antigens cGAS mikroskopisch untersucht. Die Färbung zeigte granulär gefärbte, im Zytosol gelegene Strukturen. Es wird zur Beurteilung ein Grading von 1 - 4 genutzt. Level 1 beschreibt eine starke eindeutige Expression von <25 % des Tumors, Level 2 >25 % bis <50 %, Level 3 >50 % bis <75 %, Level 4 >75 %.

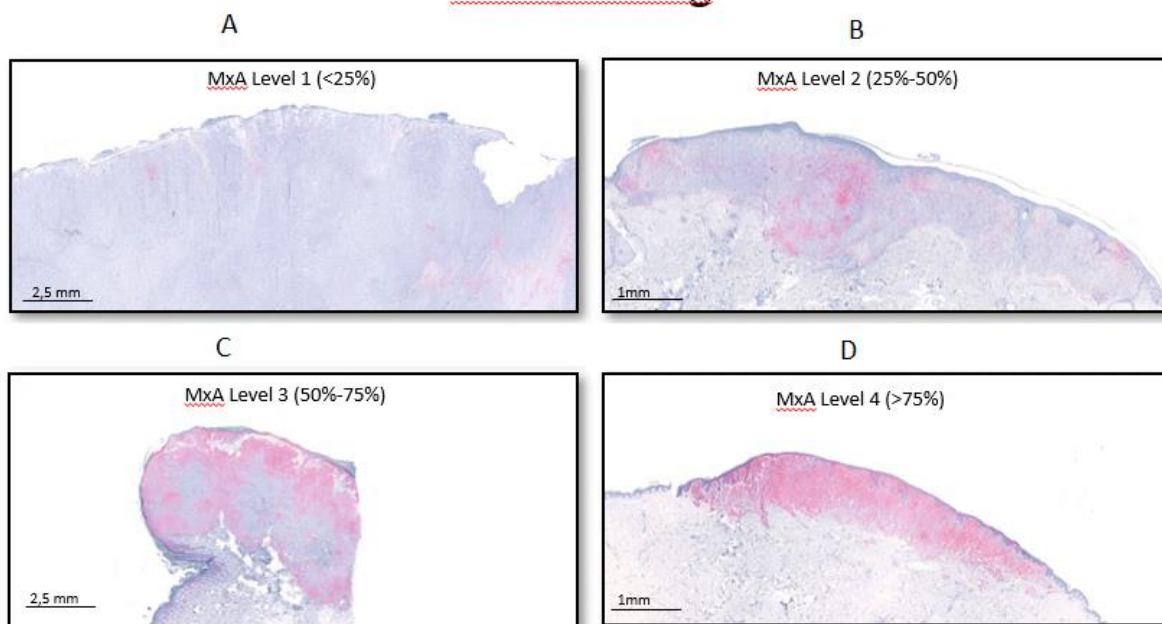


**Abb. 8:** Einteilung der jeweiligen Gradings der cGAS-Färbungen nach gefärbter Fläche im Tumor. (A) cGAS Level 1 (<25 %) Maßstab 1mm; (B) cGAS Level 2 (25 % - 50 %) Maßstab 1 mm; (C) cGAS Level 3 (50 % - 75 %) Maßstab 1 mm; (D) cGAS Level 4 (75 % - 100 %) Maßstab 2,5 mm

## 2.6 Beurteilung der MxA- Expression

Nach der immunohistochemischen Färbung der Melanompräparate wurden diese semiquantitativ auf das Verteilungsmuster und die Fläche von MxA mikroskopisch untersucht. Die Färbung zeigte wie erwartet granulär gefärbte membranös gelegene Strukturen. Es wurde zur Beurteilung ein Grading von 1-4 genutzt. Level 1 beschreibt eine starke eindeutige Expression von <25 % des Tumors, Level 2 >25 %;< 50 %, Level 3 >50 %;<75 %, Level 4 >75 %.

## MxA-Grading



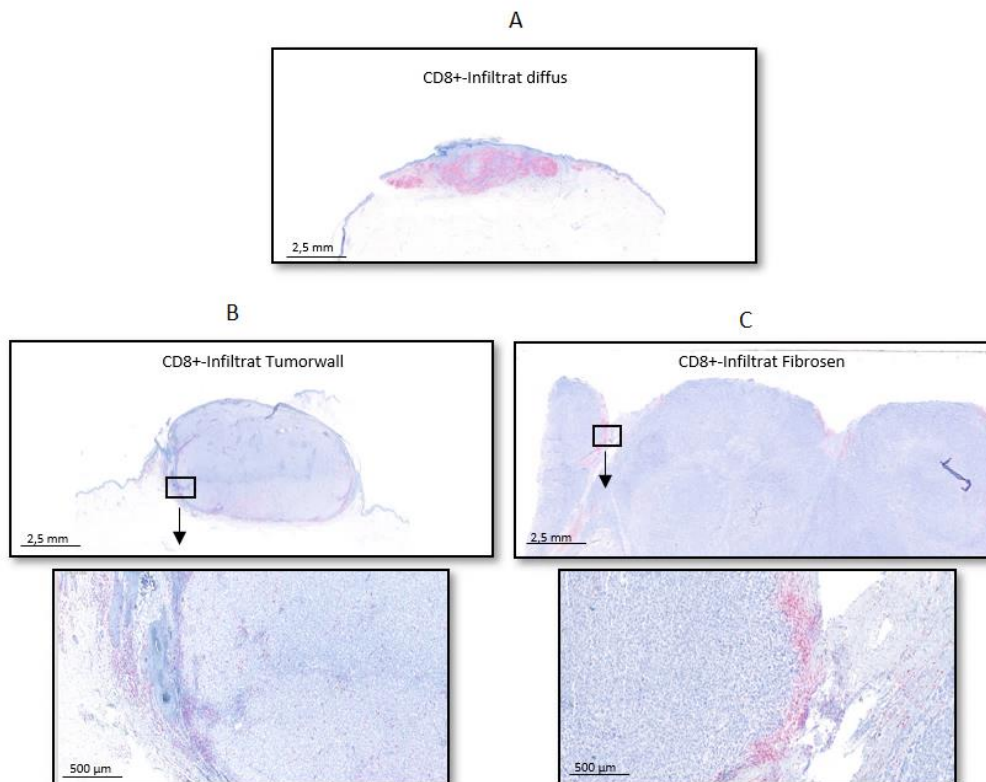
**Abb. 9:** Einteilung der jeweiligen Gradings der MxA-Färbungen nach gefärbter Fläche im Tumor. (A) MxA Level 1 (<25 %) Maßstab 2,5 mm; (B) MxA Level 2 (25 % - 50 %) Maßstab 1 mm; (C) MxA Level 3 (50 % - 75 %) Maßstab 2,5 mm; (D) MxA Level 4 (75 % - 100 %) Maßstab 1 mm.

### 2.7 Beurteilung der CD8+ Infiltration

Nach der immunohistochemischen Färbung wurde das Infiltrat nach Verteilungsmuster und Zellzahl untersucht.

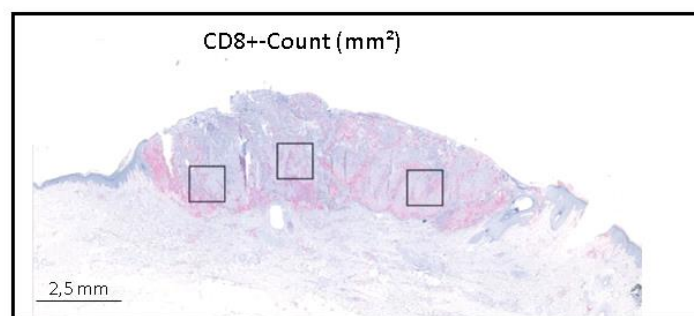
Verteilungsmuster:

1. CD8+ Infiltrat im Tumorwall
2. CD8+ Infiltrat im fibrosierten Gewebe
3. CD8+ Infiltrat diffus im Tumor verteilt



**Abb. 10:** Einteilung der unterschiedlichen Lokalisationen des CD8+ Infiltrats. (A) Darstellung der diffusen Verteilung der Zellen im Tumor (Maßstab 2,5 mm). (B) Häufung des Infiltrats im Tumorwall (Maßstab 2,5 mm; 500 µm). (C) Häufung des Infiltrats im fibrosierten Gewebe des Tumors (Maßstab 2,5 mm; 500 µm).

Es wurden im Tumor die immunhistochemisch gefärbten CD8+ Zellen semiquantitativ ausgezählt. Dafür wurden pro Präparat drei je 1 mm<sup>2</sup> große Flächen im Tumor zentral, am Tumorrand und zwischen den vorgenannten Lokalisationen im Tumor gewählt und ausgezählt. Aus diesen Zahlen wurde für jedes Präparat die durchschnittliche Zellzahl pro mm<sup>2</sup> ermittelt.



**Abb. 11:** Beispiel der quantitativen Analyse der im Tumor lokalisierten CD8+ Zellen (Maßstab 2,5 mm)

## 2.8. Statistische Auswertung

Die statistische Analyse wird mit dem Programm PRISM 8 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) durchgeführt. Für die Untersuchung der Korrelationen wurde die Rangkorrelation nach Spearman genutzt, da das ausgewählte Patientenkollektiv nicht als normalverteilt angesehen werden kann und die Variablen ordinalskaliert sind. Die unterschiedlichen Effektstärken der Korrelationen wurden nach Cohen (1992) klassifiziert. Der p-Wert wird als signifikant gewertet, wenn er kleiner als 0,05 ist (p-Wert <0,05= \*; p-Wert <0,001: \*\*; p-Wert <0,0001: \*\*\*). Bei der Rangkorrelation wird der ungerichtete lineare Zusammenhang zweier Variablen untersucht. Ungerichtet bedeutet, dass nicht von einer abhängigen und einer unabhängigen Variablen gesprochen wird. Es werden keine kausalen Aussagen gemacht. Die Rangkorrelation nach Spearman ist das nichtparametrische Äquivalent der Korrelationsanalyse nach Bravais-Pearson. Nicht parametrisch heißt, die Daten müssen nicht normalverteilt sein und sollten lediglich ordinalskaliert sein. Auch bei kleineren Stichproben kann eine Rangkorrelation berechnet werden. Ob das Ergebnis signifikant ist, wird mit einem Test auf Signifikanz untersucht. Bei diesem fällt die Wahl auf einen zweiseitigen Test, da ein ungerichteter Zusammenhang angenommen wird.

Die zwei Stichproben der Kaplan-Meier-Kurven setzen sich aus einer geringen und einer häufigen MxA-Expression zusammen. Als häufig wurden sämtliche Melanome zusammengefasst, die als ein MxA-Level 2-4 definiert sind. Melanome mit einer geringen MxA-Expression gehören der Level 1 Einteilung des MxA-Gradings an. Die beiden Überlebenszeiten werden univariat anhand des Log-Rank-Test miteinander verglichen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Das untersuchte Patientenkollektiv

Patientenkollektiv 2012-2017					
<b>Anzahl</b>	50				
<b>Alter (Jahre)</b>					
Median	72,5				
Min - Max	41-94				
<b>Alter bei Diagnose</b>					
<30	0	(0 %)			
30-39	2	(4 %)			
40-49	1	(2 %)			
50-59	8	(16 %)			
60-69	13	(26 %)			
70-79	18	(36 %)			
80-89	7	(14 %)			
90-100	1	(2 %)			
<b>Geschlecht</b>					
Weiblich	26	(52 %)			
Männlich	24	(48 %)			
<b>Melanomtypen</b>					
SSM	22	(44 %)			
ALM	5	(10 %)			
NMM	15	(30 %)			
Amelanotisch	3	(6 %)			
LMM	2	(4 %)			
Sonstige	3	(6 %)			
<b>Lokalisation</b>					
Fuß/Bein	14	(28 %)			
Hand/Arm	7	(14 %)			
Kopf	5	(10 %)			
Rumpf/Rücken	24	(48 %)			
<b>Tumordicke nach Breslow</b>				Davon SLNB positiv	
T1 ( $\leq 1,0$ mm)	0	(0 %)	0	(0 %)	
T2 (1,0-2,0 mm)	12	(24 %)	1	(8 %)	
T3 (2,0-3,0 mm)	14	(28 %)	3	(21 %)	

T4 (>4 mm)	24	(48 %)	10	(42 %)
<b>Sentinellymphknoten- diagnostik (SLND)</b>				
negativ	30	(60 %)		
positiv	17	(34 %)		
unbekannt	3	(6 %)		

**Tab. 8:** Klinische Charakteristika der Patienten der dermato-onkologischen Ambulanz Magdeburg, bei denen in den Jahren 2012-2017 ein Melanom primär exzidiert wurde und eine Sentinel-Lymphknoten-Diagnostik durchgeführt wurde.

50 Patienten der dermato-onkologischen Ambulanz der Universitätsklinik Magdeburg erfüllten in den Jahren 2012-2017 die Auswahlkriterien: (1) Primäre Exzision im Universitätsklinikum Magdeburg, (2) durchgeführte Sentinel-Lymphknoten-Diagnostik, (3) Tumordicke nach Breslow >1,5 mm. Das Patientenkollektiv wurde nach den klinischen Parametern Alter, Geschlecht, Lokalisation des Primärtumors, Melanomtyp, Tumorstadium und Sentinel-Lymphknoten-Status charakterisiert (s. Tab. 1).

Das Alter der Patienten lag zwischen 41-94 Jahren. Die Verteilung bezogen auf das Geschlecht zeigt sich ausgeglichen. Die Kohorte setzt sich zu gleichen Anteilen aus Männern und Frauen zusammen. Die Lokalisation der exzidierten Primärtumore zeigte ein gehäuftes Vorkommen an Rumpf und Rücken (48 %), gefolgt von Fuß und Bein (28 %), Hand und Arm (14 %) und dem Kopf (10 %).

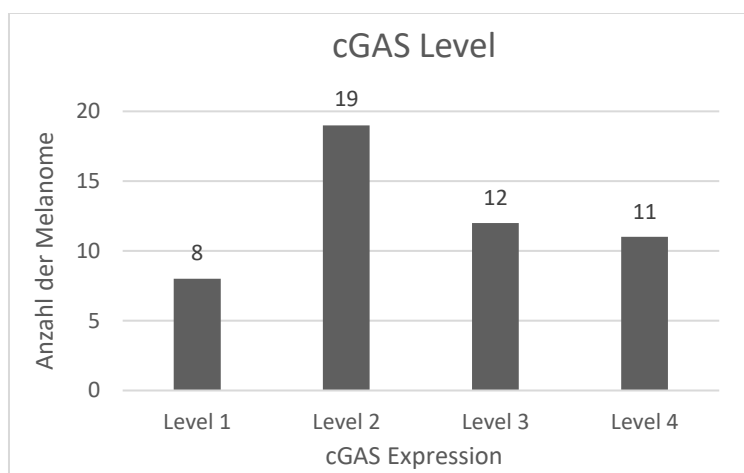
48 % der Patienten befanden sich nach histopathologischer Einschätzung im T4-Stadium. Die Sentinel-Lymphknoten-Diagnostik war im T4 Stadium zu 42 % positiv. Das T1-Stadium macht 0 % der Stichprobe aus. Im Tumorstadium T2 und T3 befinden sich jeweils 24 % bzw. 28 % der Melanome des Patientenkollektivs. Die Sentinel-Lymphknoten-Diagnostik war in diesen beiden Stadien in 8 % (T2) bzw. 21 % (T3) der Fälle positiv. Insgesamt ergab sich für das Patientenkollektiv eine positive Sentinel-Lymphknotenbiopsie bei 34 % der Patienten, wobei bei 6 % der Status unbekannt blieb.

Die unterschiedlichen Melanomtypen zeigten eine Mehrheit der SSM mit 44 %, gefolgt von den NMM (30 %), den ALM (10%), den amelanotischen Melanomen (6 %) und den LMM (4 %). 6 % der Melanome konnten klinisch und histopathologisch keinem der o.g. Kriterien zugeordnet werden, so dass diese in Tab.1 als „Sonstige“ bezeichnet wurden.



### 3.2 Ausgeprägte Expression von cGAS in primären Melanomen

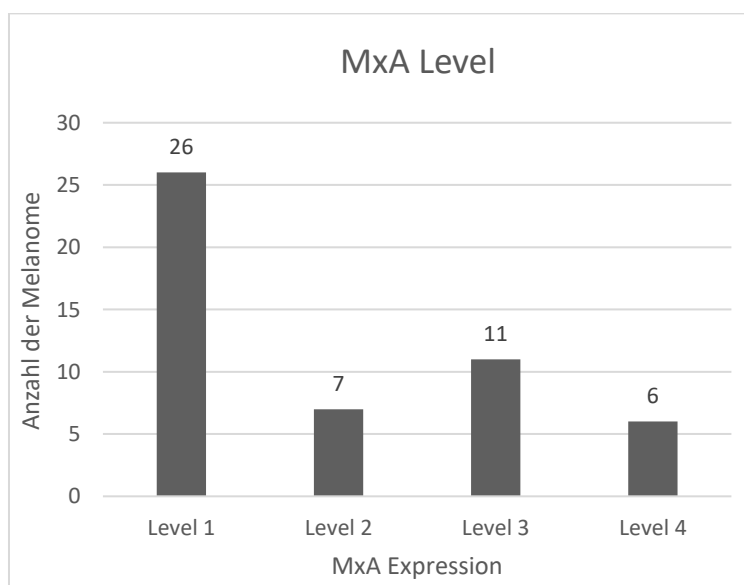
Das gesamte Patientenkollektiv zeigte im Tumor eine Expression von cGAS, welche sich nur in der Ausprägung der Intensität sowie der Fläche unterschied. In der Kategorie cGAS Level 1 befanden sich 16 % des Patientenkollektivs. Der größte Anteil der Melanome wurde cGAS Level 2 zugeordnet (38 %). Die Kategorien cGAS Level 3 sowie 4 ergaben 24 % bzw. 22 % des Patientenkollektivs.



**Abb. 12:** Ausprägung der cGAS-Expression (n=50).

### 3.3 Geringe MxA-Expression in primären Melanomen

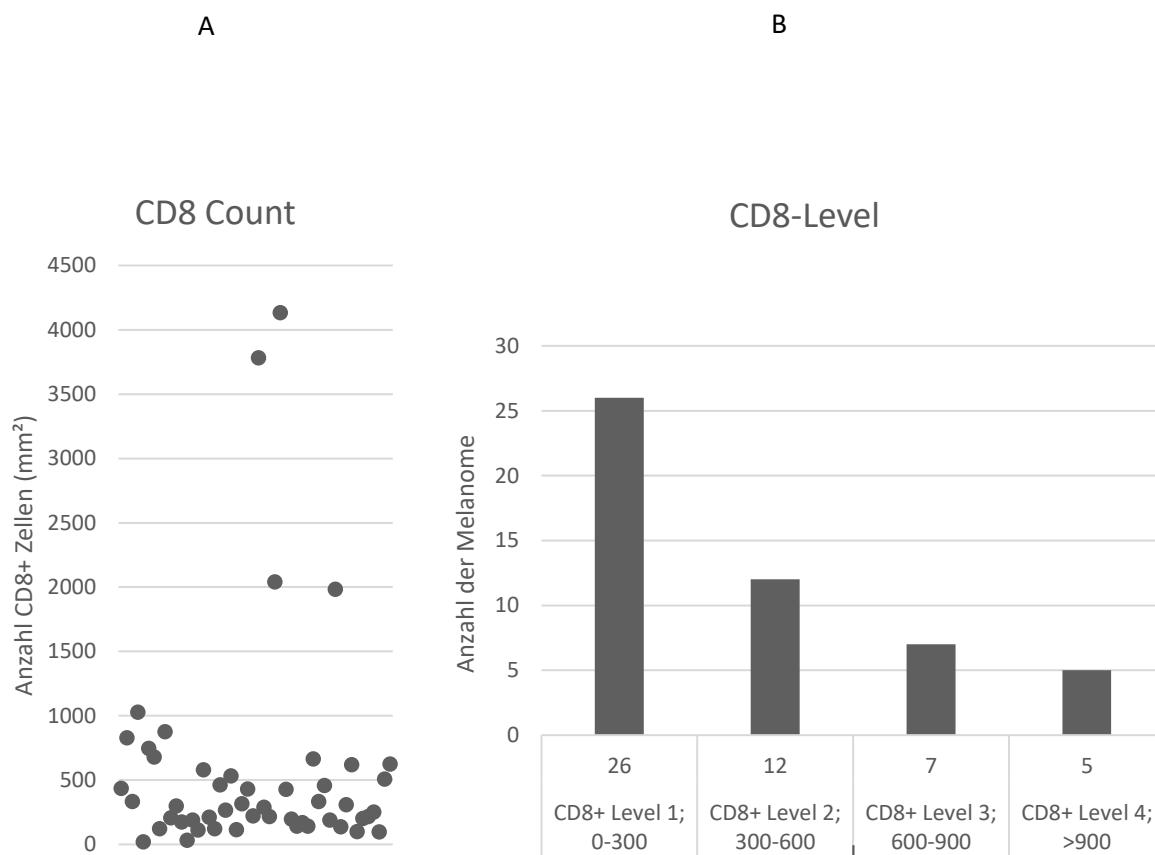
Die Expression von MxA in den Tumoren wurde nach der unterschiedlich großen Fläche untersucht. In der Kategorie MxA Level 1 befand sich mit 52 % der größte Anteil des Patientenkollektivs. Der kleinste Anteil der Melanome wurde MxA Level 4 zugeordnet (14 %). Die Kategorien MxA Level 2 sowie 3 ergaben 14 % bzw. 22 % des Patientenkollektivs.



**Abb. 13:** Ausprägung der MxA-Expression (n=50).

### 3.4 Geringe CD8+ Infiltration in primären Melanomen

Die CD8+-Zellinfiltration wurde zunächst anhand der Anzahl der Zellen bestimmt, und danach für die Übersicht in 4 verschiedene Gruppen eingeteilt. Den größten Anteil hat das CD8+ Level 1 (0-300/mm<sup>2</sup>), gefolgt von dem CD8+ Level 2 (300-600/mm<sup>2</sup> und 3 (600-900/mm<sup>2</sup>) mit jeweils 24 % und 14 %. Die kleinste Gruppe zeigt das CD8+ Level 4 (>900/mm<sup>2</sup>) mit 10 %.

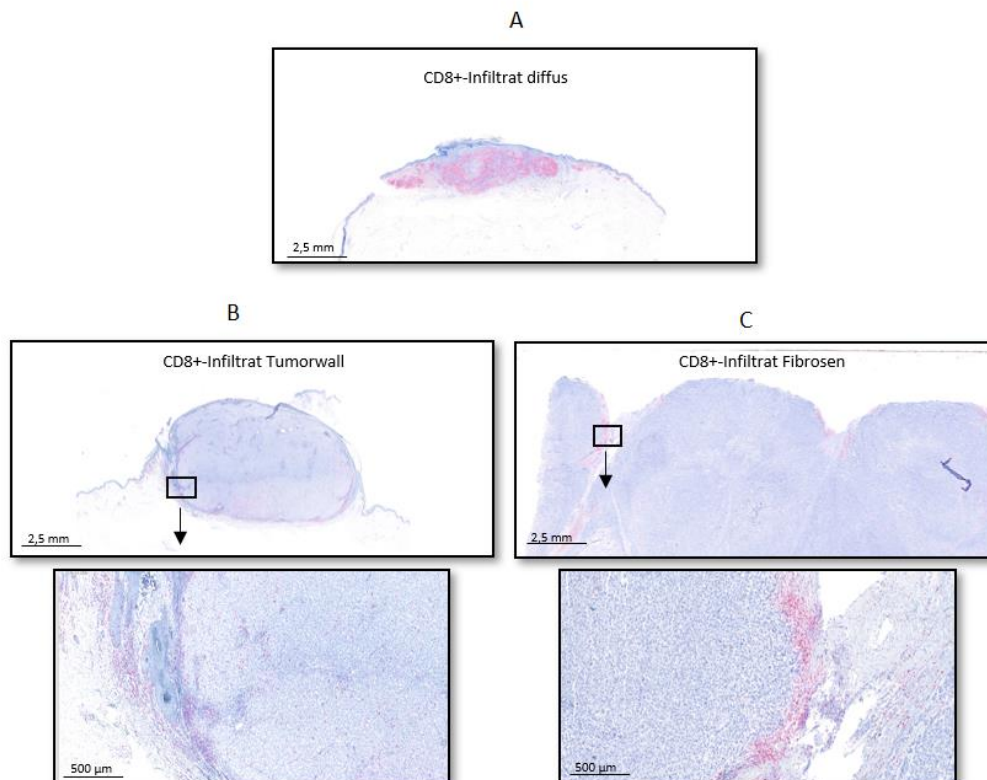


**Abb. 14:** Stärke des CD8+ Infiltrats in den untersuchten primären Melanomen. (A)

Darstellung der Gesamtzahl der CD8+ Zellen in den einzelnen Tumoren. (B) Darstellung der Gesamtzahl der unterschiedlichen CD8+ Infiltrat Level von 1-4.

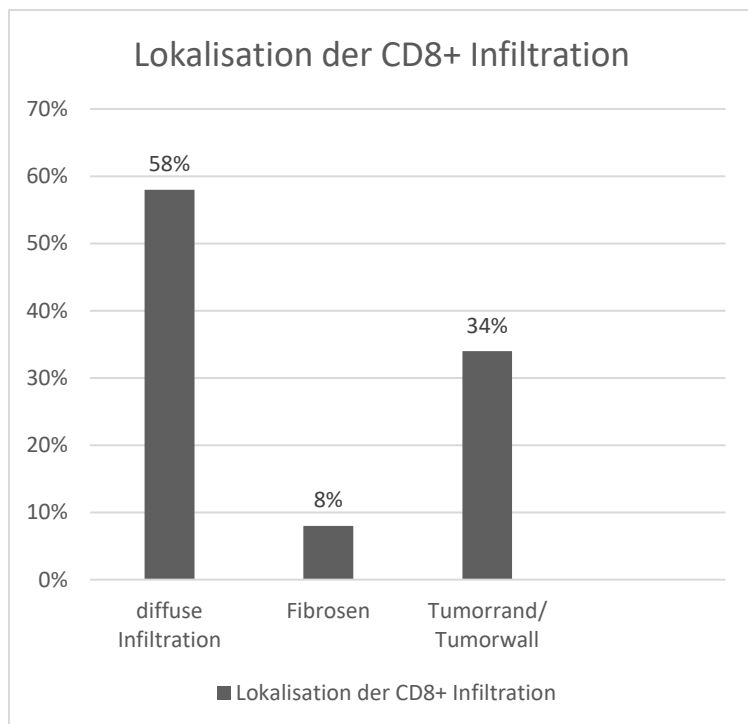
Auffällig waren immer ähnliche Lokalisationen der CD8+ Zellen in den Melanomen. Die Charakterisierung der Lokalisation erfolgte in den folgenden drei Gruppen:

- Diffuse Infiltration, ohne einen Schwerpunkt der Infiltration
- Fibrosen
- Tumorwall/Tumorrand



**Abb. 15:** Einteilung der unterschiedlichen Lokalisationen des CD8+ Infiltrats. (A) Darstellung der diffusen Verteilung der Zellen im Tumor (Maßstab 2,5 mm). (B) Häufung des Infiltrats im Tumorwall (Maßstab 2,5 mm; 500 µm). (C) Häufung des Infiltrats im fibrosierten Gewebe des Tumors (Maßstab 2,5 mm; 500 µm).

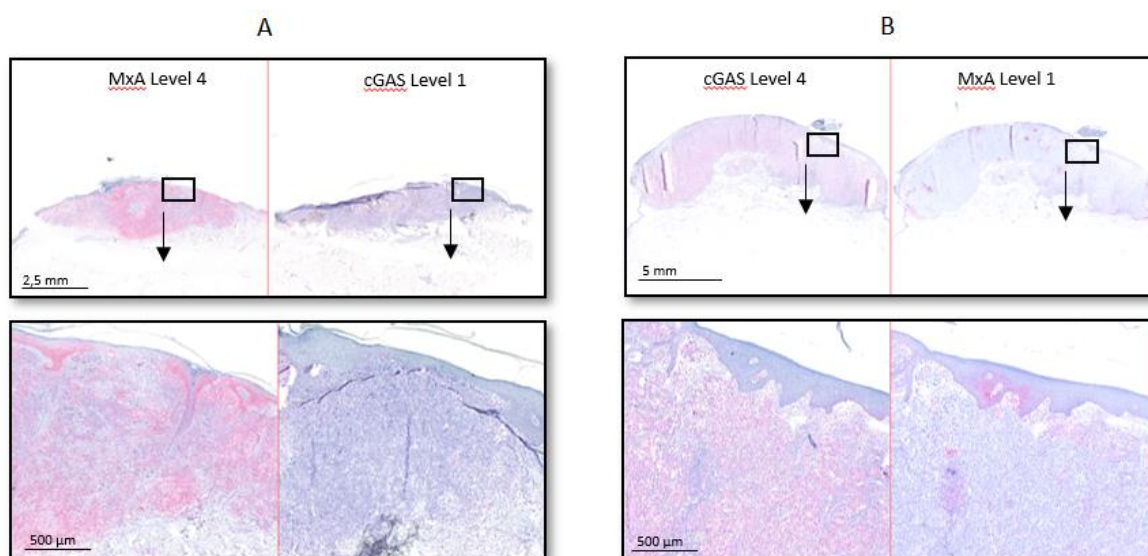
In den meisten Tumoren waren die CD8+ Zellen diffus im Gewebe verteilt. Das heißt, es waren sowohl am Tumorrand/Tumorwall als auch in den Fibrosen und im restlichen Tumorgewebe Zellen zu finden. Der Anteil der diffus infiltrierten Melanome lag bei 58 %. Ein großer Anteil der Tumore zeigte eine Häufung der CD8+ Infiltration im Tumorwall (siehe Abb. 16). Hierbei war eine stärkere CD8+ Infiltration am Übergang von tumorösen zu gesundem Gewebe zu erkennen. Zeigte sich dieses Infiltrationsmuster, war zentral im Tumor sehr wenig CD8+ Infiltrat vorhanden. Der geringste Anteil der Tumore wies die Infiltration von CD8+ Zellen im fibrosierten Gewebe auf (siehe Abb. 16). Häufig waren in diesem Fall die CD8+ Zellen in der Nähe von Vaskularisation innerhalb der Fibrosen nachweisbar.



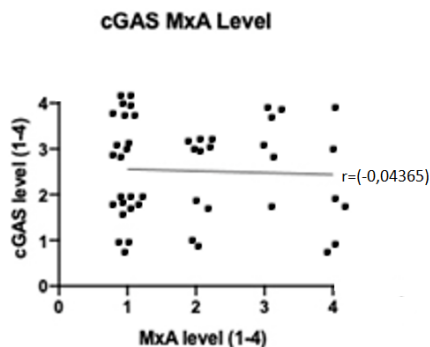
**Abb. 16:** Verteilung des CD8+ Infiltrats im Tumor (n=50).

### 3.5 Die cGAS- und MxA-Expression korrelieren nicht in primären Melanomen

Der Korrelationskoeffizient der Rangkorrelation nach Spearman beträgt  $r = -0,04365$ . Es gibt keine relevante Korrelation zwischen den beiden Expressionen - weder eine positive noch eine negative. Das Ergebnis ist bei einem 95 %-Konfidenzintervall nicht signifikant. Da der Korrelationskoeffizient  $r < .10$  ist, kann keine Effektstärke nach Cohen bestimmt werden.



**Abb. 17:** Beispiele der Korrelation von cGAS- und MxA-Expression. (A) Präparat mit MxA-Level 4 und cGAS-Level 1 (Maßstab 2,5 mm; 500 µm). (B) Präparat mit MxA-Level 1 und cGAS-Level 4 (Maßstab 5 mm; 500 µm).

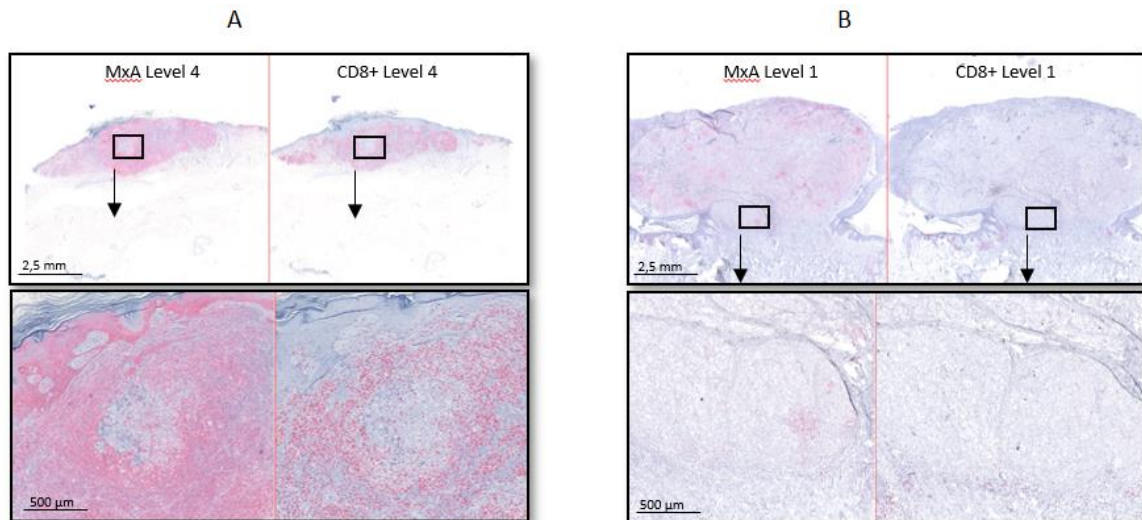


**Abb. 18:** Darstellung der Korrelation der cGAS- und MxA-Expression in einem Scatter-Plot mit Steigungsgrade des r-Wertes.

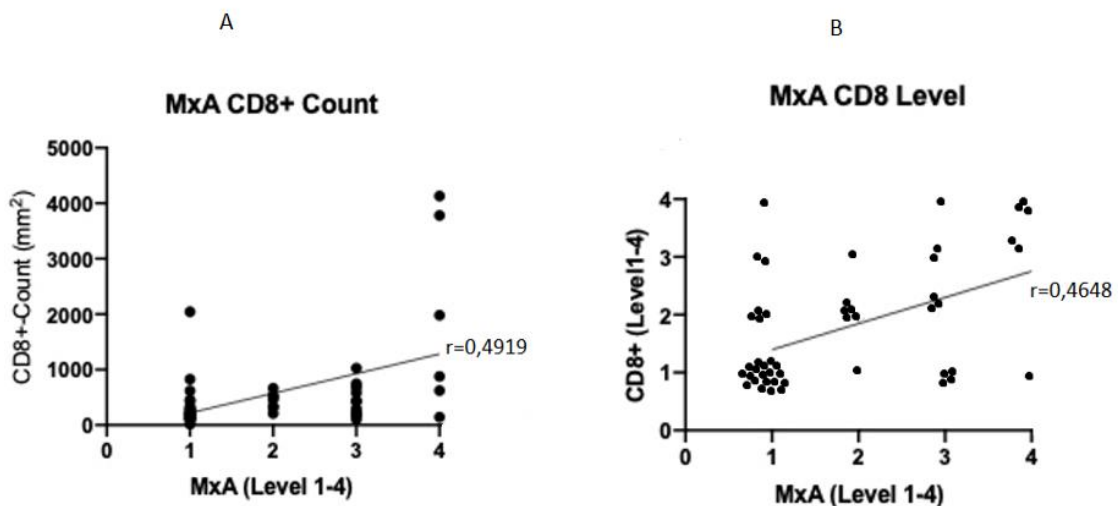
### 3.6 Die MxA-Expression korreliert mit der CD8+ Infiltration

Der Korrelationskoeffizient der Rangkorrelation nach Spearman beträgt  $r = 0.4648$ . Die unterschiedlichen Level der MxA Expression korrelieren positiv mit der CD8+ Infiltration. Das Ergebnis ist bei einem 95 %-Konfidenzintervall signifikant. Der Korrelationskoeffizient ist größer als  $r = .30$  und liegt fast bei  $r = .50$ . Nach Cohen kann man von einer mittelstarken positiven Korrelation sprechen.

In der Analyse der ausgezählten CD8+ Infiltration ist das Ergebnis bei einem 95 %-Konfidenzintervall ebenfalls signifikant. Nach Cohen liegt der r-Wert sehr nah an  $r = .50$ . Die Effektstärke ist demnach als stark zu bewerten.



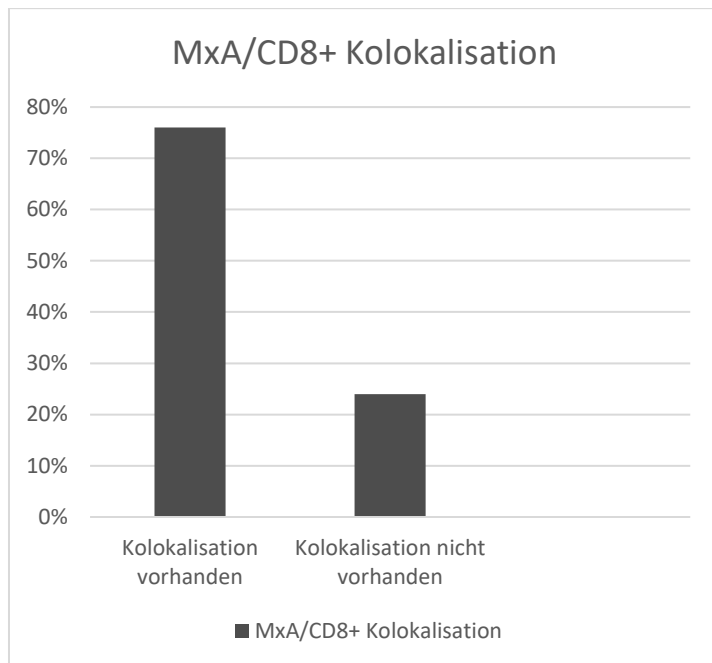
**Abb. 19:** Beispiele der Korrelation der CD8+ Infiltration und MxA-Expression. (A) Präparat mit MxA Level 4 und CD8+ Level 4 (Maßstab 2,5 mm, 500 µm). (B) Präparat mit MxA Level 1 und CD8+ Level 1 (Maßstab 2,5 mm, 500 µm).



**Abb. 20:** (A) Darstellung der Korrelation der MxA-Expression und der ausgezählten CD8+ Zellen in einem Scatter-Plot mit Steigungsgrade des r-Wertes. (B) Darstellung der Korrelation der MxA Expression und dem CD8+ Level in einem Scatter-Plot mit Steigungsgrade des r-Wertes.

### 3.6.1 Häufige Kolokalisation der MxA-Expression und CD8+ Infiltration im Tumor

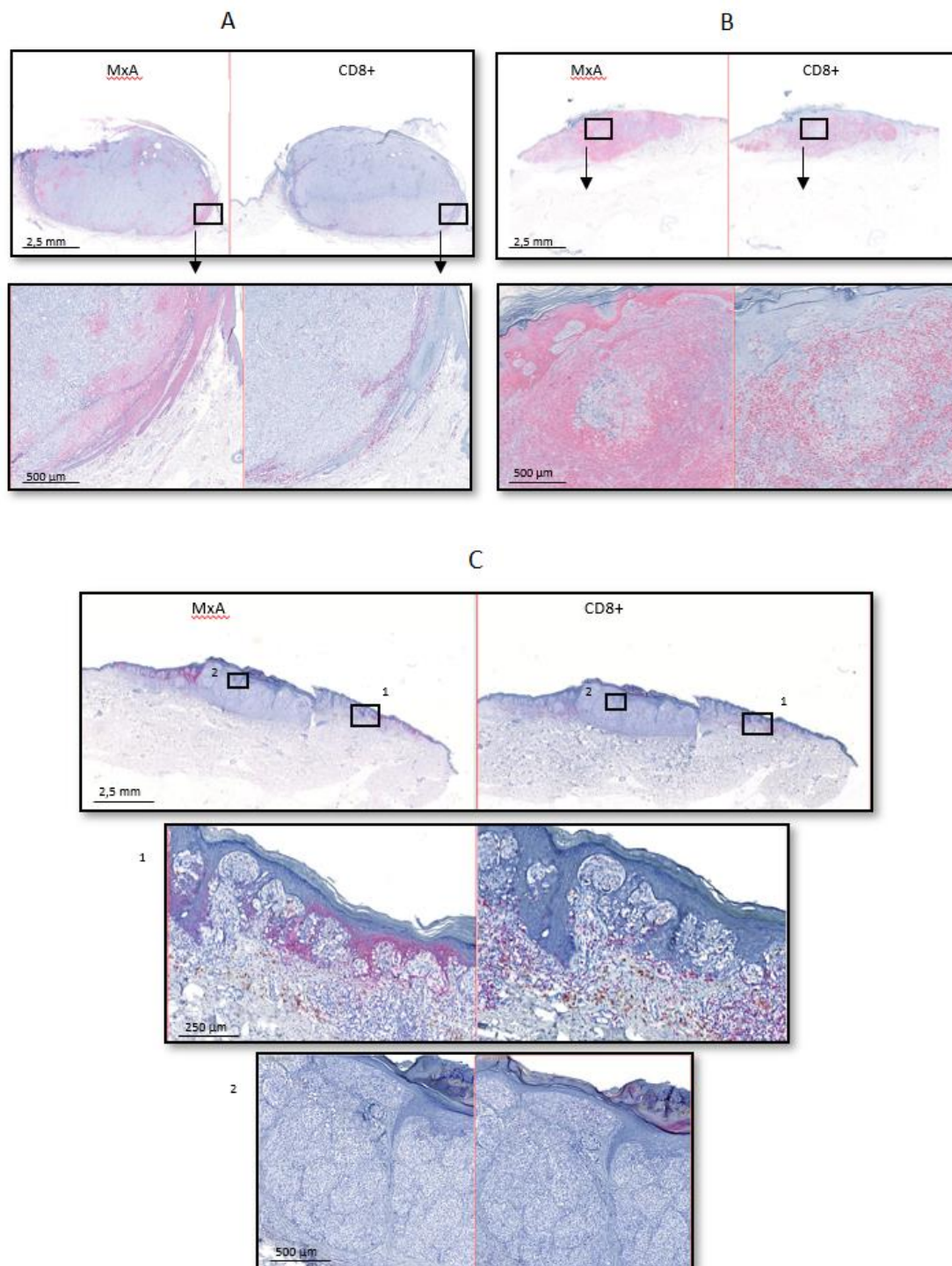
Im Vergleich zwischen der Lokalisation von der MxA-Expression und der CD8+ Zellen war in 76 % der Tumore mikroskopisch eine Kolokalisation zu sehen. Lediglich 24 % der Tumore zeigten keine Kolokalisation.



**Abb. 21:** Verteilung der Kolokalisation von CD8+ Infiltrat und der MxA-Expression

Ob eine Kolokalisation zwischen MxA und CD8+ Zellen vorliegt, wurde mittels der digitalen Software „NDP view2“ von Hammamatsu ermittelt. Es wurden jeweils aus einem Tumor zwei Stellen fokussiert, welche im Tumor direkt hintereinander geschnitten, danach vergrößert und fotografisch festgehalten wurden. In den Beispielbildern werden eine Lokalisation im Tumorwall (Abb.1), in Fibrosen (Abb.2) sowie die diffuse Lokalisation der CD8+ Zellen (Abb.3) gezeigt und mit der MxA Expression an den jeweiligen Stellen im Tumor verglichen. Links sei die Färbung mittels MxA Antikörper gegeben, rechts die Färbung des CD8+ Rezeptors.



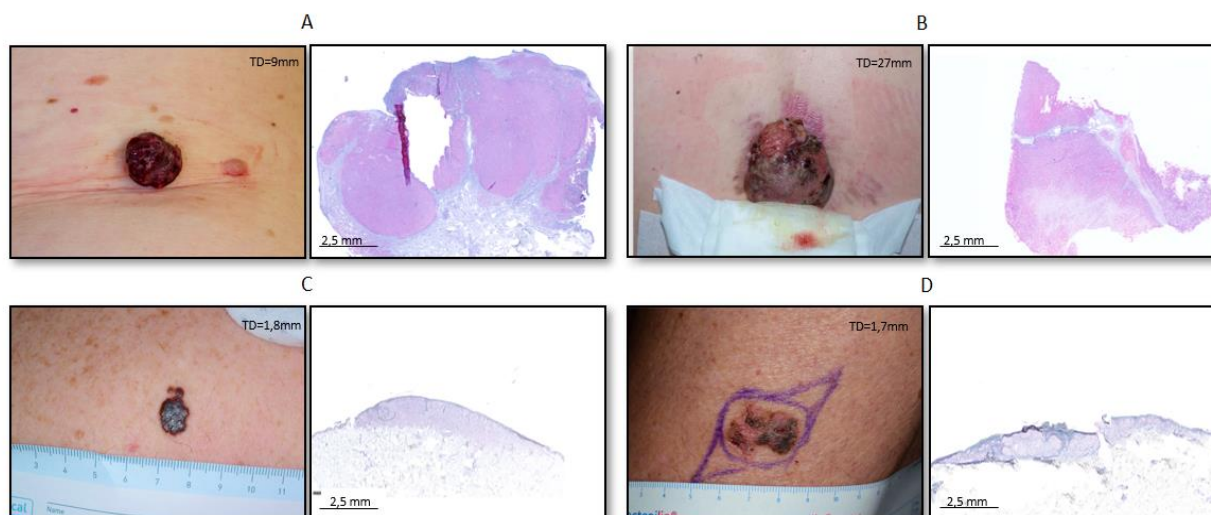


**Abb. 22:** Darstellung und Gegenüberstellung der Kolokalisation von CD8+ Zellen und MxA-exprimierenden Zellen: (A) im Tumorwall lokalisiert (Maßstab 2,5 mm, 500 µm), (B) diffuse Verteilung (Maßstab 2,5 mm, 500 µm) (C) diffuse Verteilung der CD8+ Zellen und MxA exprimierenden Zellen (Maßstab 2,5 mm), (C1) Kolokalisation vorhanden (Maßstab 250 µm), (C2) keine Kolokalisation vorhanden (Maßstab 500 µm).

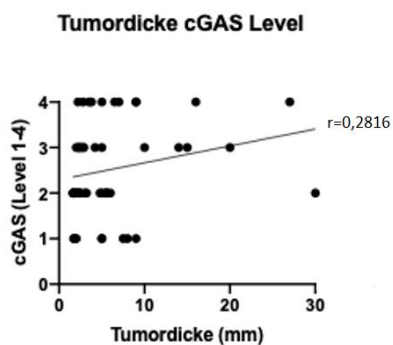


### 3.7 Die cGAS-Expression korreliert positiv mit der Tumordicke

Der Korrelationskoeffizient der Rangkorrelation nach Spearman beträgt  $r=0.2816$ . Die unterschiedlichen Level der cGAS Expression korrelieren positiv mit der Tumordicke. Das Ergebnis ist bei einem 95 %-Konfidenzintervall signifikant. Der p-Wert wird als ungefähr angegeben, da die Stichprobengöße größer als 17 Stichproben ist. Der Korrelationskoeffizient ist größer als  $r=.10$  und liegt fast bei  $r=.30$ . Nach Cohen kann man von einer mittelschwachen positiven Korrelation sprechen.

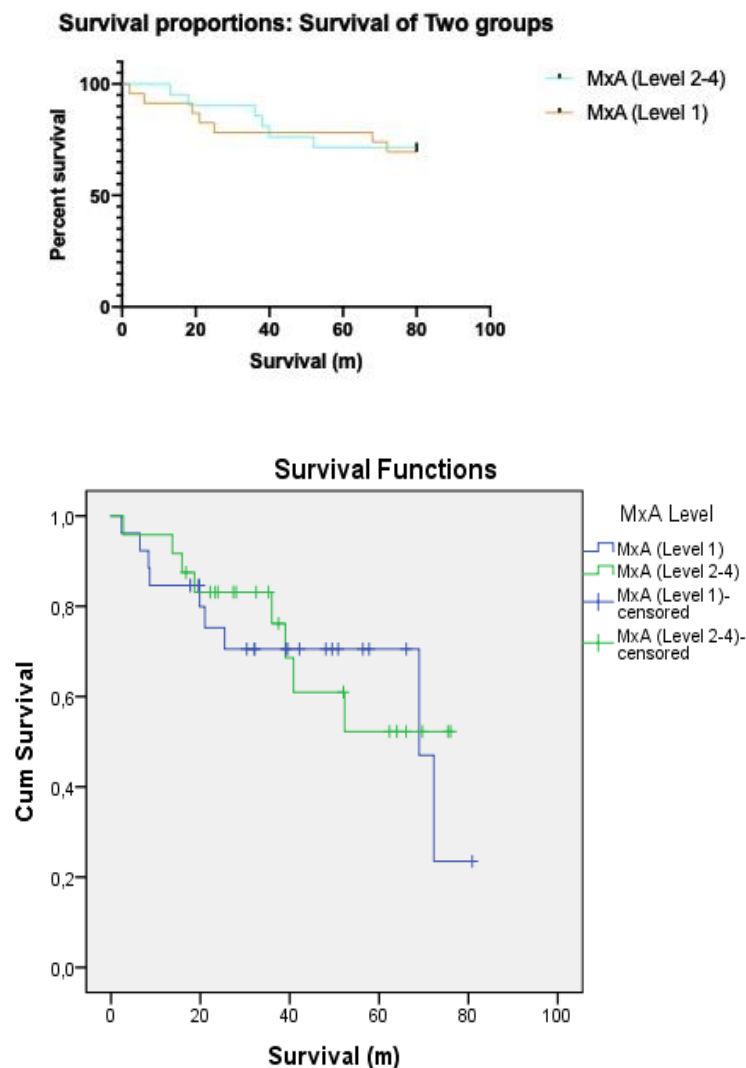


**Abb. 23:** Darstellung der positiven Korrelation der cGAS-Expression und Tumordicke: (A) Noduläres Melanom TD=9 mm; dazugehöriges histopathologisches Präparat mit starker cGAS-Expression (Maßstab 2,5 mm), (B) Noduläres Melanom TD=27 mm; histopathologisches Präparat mit starker cGAS-Expression (Maßstab 2,5 mm), (C) Superfiziell spreitendes Melanom TD=1,8 mm; histopathologisches Präparat mit geringer cGAS-Expression (Maßstab 2,5 mm), (D) Noduläres Melanom TD=2,5 mm; histopathologisches Präparat mit geringer cGAS-Expression (Maßstab 2,5 mm).



**Abb. 24:** Darstellung der Korrelation der cGAS-Expression und Tumordicke in einem Scatter-Plot mit Steigungsgrade des r-Wertes.

### 3.8 Die Typ I Interferon Antwort korreliert nicht mit der Prognose



**Abb. 25:** Kaplan-Meier Analyse zur Überlebenszeit ab Erstdiagnose in Monaten zwischen Tumoren mit einer hohen MxA-Expression (MxA Level 2-4) und einer niedrigen MxA-Expression (MxA Level 1).

Ob es eine bessere Prognose für Melanome mit einer starken MxA Expression gibt, wurde mittels des Log-Rang-Tests ermittelt. Das Ergebnis zeigt, dass es keine signifikant bessere Prognose bei einer starken MxA Expression im Vergleich zu einer niedrigen MxA Expression gibt. Da die beiden Stichproben sich überschneiden, musste zusätzlich der Breslow-Test durchgeführt werden. Auch hier zeigte sich keine signifikant bessere Prognose für die Melanome mit einer höheren MxA-Expression. Die Kaplan-Meier-Kurve zeigt bei der Gruppe der höheren MxA-Expression einen leichten Vorteil der Überlebensprognose bis zum 40. Monat nach Erstdiagnose. Ab dem 40. Überlebensmonat sieht man keine relevanten Unterschiede zwischen beiden Patientengruppen.

## 4. Diskussion

Das Melanom ist ein bösartiger, invasiv wachsender Tumor der Melanozyten von Haut und/oder der Schleimhaut. Es ist die am häufigsten tödlich verlaufende Tumorerkrankung der Haut. In Deutschland erkranken jährlich über 20.000 Menschen, mit weiterhin steigender Inzidenz. Als Ursachen dafür werden u. a. eine alternde Gesellschaft, ein geändertes Freizeitverhalten der Bevölkerung und eine damit verbundene verstärkte UV-Exposition diskutiert (Eggermont et al. 2014). Klinisch-histologisch werden verschiedene Typen mit jeweils unterschiedlichen makroskopischen Phänotypen unterschieden (Abb. 1). Es metastasiert lymphogen und hämatogen. Im Stadium IV nach AJCC Klassifikation liegt die 5 Jahresüberlebensrate bei unter 20 % (Heistein und Acharya 2020).

In den letzten Jahrzehnten wurde immer diskutiert, wie sich das Vorliegen eines lymphozytären Infiltrats im Melanom auf den weiteren Krankheitsverlauf auswirkt. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Nachweis sog. „tumor infiltrating lymphocytes“ (TIL) unmittelbar mit der Prognose des Melanoms korreliert (Antohe et al. 2019). Eine frühzeitige Infiltration des Tumors durch T-Lymphozyten sorgt für eine weniger aggressive lymphogene Metastasierung und verbessert die Prognose für den Patienten (Fu et al. 2019). Auch moderne Therapien, wie z.B. eine Behandlung mit PD-1-Antikörpern zeigen ein besseres Ansprechen bei Patienten mit einem starken lymphozytären Infiltrat im Tumor (Trujillo et al. 2018).

Die „tumor infiltrating lymphocytes“ bestehen zum größten Teil aus CD8+ Zellen (Fujimura et al. 2017). Diese migrieren v. a. durch die Aktivierung der Typ I Interferon Produktion verstärkt in das Tumorgewebe (Ben-Sasson et al. 2013). Durch das Typ I Interferon System wird auch die Co-Stimulation zwischen Antigen-präsentierenden Zellen und CD8+ Zellen unterstützt und die MHC-I Expression verstärkt. Somit ist es essenziell für die Aktivierung des angeborenen Immunsystems gegen Tumorzellen (Welsh et al. 2012). Aus welchem Grund in manchen Tumoren Typ I Interferone verstärkt nachzuweisen sind, andere Tumore aber nahezu keine Typ I Interferon Aktivierung aufweisen, ist bis heute nicht abschließend verstanden. In den letzten Jahren wurde u. a. eine Aktivierung des cGAS-STING Signalwegs als Ursache einer verstärkten Typ I Interferon Antwort diskutiert. cGAS als DNA-bindende Domäne im Zytosol aktiviert NF- $\kappa$ B, welches als Transkriptionsfaktor die Typ I Interferon Produktion unterstützt. Ein positiver Effekt konnte dabei bereits in anderen Tumorformen sowie bei virusinfizierten Zellen gezeigt werden (Xia et al. 2016).

Um die Bedeutung des cGAS-STING Signalwegs auf die Typ I Interferon Produktion im Tumorgewebe zu untersuchen, haben wir 50 humane Melanome immunhistochemisch auf die Expression von cGAS, MxA -als Indikator einer Typ I Interferon Antwort sowie auf die Infiltration von CD8+ Zellen im Tumor untersucht. Die Ergebnisse wurden statistisch auf eine

mögliche positive Korrelation der cGAS- und MxA- Expression, der cGAS-Expression und der Tumordicke sowie der MxA-Expression und CD8+ Infiltration im Tumor analysiert. Zudem erfolgte die Auswertung der ausgewählten Proben auf eine mögliche bessere Prognose der Patienten bei ausgeprägter MxA-Expression im Tumor. Die Auswertung der immunhistochemischen Proben erfolgte mikroskopisch.

In unseren Experimenten konnten wir keine positive Korrelation zwischen der Expression von cGAS und der Expression von MxA nachweisen. Immunhistochemisch zeigte sich v.a. eine schwache MxA- und eine hohe cGAS-Expression im Melanomgewebe. Eine Erklärung für diese Expressionsmuster ist eine mögliche Deaktivierung der Effektoren am Ende des cGAS-STING-Signalwegs. Das heißt, in den Schritten zwischen dem Binden der zytosolischen DNA an den cGAS Komplex und der Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch TBK1 und IKK könnten Veränderungen des Signalwegs vorliegen, welche als Escape-Strategie des Tumors gegen die Immunabwehr des Körpers dienen. Hierfür wäre es sinnvoll, die ausgewählten Proben immunhistochemisch auf die nachfolgenden zytologischen Komponenten des cGAS-STING Signalweges zu untersuchen. Eine weitere Erklärung wäre, dass der cGAS-STING Signalweg keine Rolle in der Interferon Typ I Antwort in Melanomen spielt. Dies würde die fehlende Ko-Lokalisation der Expressionsmuster von cGAS und MxA in den immunhistochemischen Färbungen erklären. Um diese Hypothesen weiter zu untersuchen, sollte u. a. die untersuchte Probenanzahl erweitert werden, da bei einer Stichprobengröße von 50 Patienten, die Auswertung, bezogen auf eine Rangkorrelation nach Spearman, kein signifikantes Ergebnis zeigen konnte. Bei einer größeren Stichprobe würde man am ehesten keine Korrelation der beiden untersuchten Expressionen erwarten, jedoch ein signifikantes Testergebnis erhalten. Eine immunhistochemische Doppelfärbung von zwei verschiedenen Antigenen könnte ebenfalls ein aussagekräftigeres Ergebnis zeigen. In dieser Arbeit war dies leider nicht möglich, da beide gesuchten Antigene zytosolisch oder membranös lokalisiert sind und somit keine genaue Auswertung der Proben möglich gewesen wäre.

Die Hypothese, dass die cGAS-Expression positiv mit der Tumordicke in Melanomen mit einer Tumordicke von mind. 1,5 mm korreliert, konnte bestätigt werden. Die cGAS-Expression ist in sämtlichen Melanomen der Stichprobe mit unterschiedlicher Ausprägung vorhanden. Die Vermutung, dass cGAS im cGAS-STING-Signalweg bei Melanomen deaktiviert wird und es somit zu einer verminderten Typ I Interferon Produktion kommt, konnte nicht bestätigt werden.

Im Gegensatz zu der Hypothese, dass die MxA-Expression und cGAS-Expression positiv miteinander korrelieren, steht die Beobachtung, dass cGAS in dickeren und somit prognostisch schlechteren Melanomen sogar stärker exprimiert wird. Die

immunhistochemischen Färbungen zeigte die cGAS-Expression überwiegend in Tumorzellen, teils im Immunzellinfiltrat sowie schwach in Epithelzellen. Die Ursache dafür lässt sich am wahrscheinlichsten mit der Funktion von cGAS erklären. cGAS ist ein DNA-Sensor, der ds-DNA bindet und über den cGAS-STING-Signalweg die Tumorabwehr fördert. Im Tumor selbst gibt es viel phagozytierte DNA, die in den Zellen an cGAS binden kann. Die Beobachtung, dass in dicken Tumoren eine stärkere cGAS-Expression zu sehen ist, könnte mit einer positiven Rückkopplung erklärt werden. Durch mehr Angebot von ds-DNA produzieren Zellen im Tumor mehr cGAS, um eine größere Anzahl von Komplexen zwischen cGAS und ds-DNA zu bilden und somit eine stärkere Immunabwehr durch die Typ I Interferon Produktion zu erreichen.

Zelluläre Seneszenz ist ein weiterer Mechanismus, um geschädigte Zellen an der Proliferation zu hindern. Es wird diskutiert, dass der cGAS-STING Signalweg den „senescence-associated secretory phenotype“ (SASP) verstärkt (Loo et al. 2019). Ob der cGAS-STING Signalweg über diesen Weg die Seneszenz in Zellen beeinflusst und somit die Tumorgenese inhibiert oder verstärkt, ist nicht abschließend geklärt. Die Ergebnisse unserer Stichprobe bestärken die Theorie, dass cGAS die Seneszenz in Zellen verstärken und somit auch eine große Rolle für die erhöhte Malignität des Tumors spielen könnte. Das zeigt das Ergebnis, dass besonders dicke Tumore mit einer schlechten Prognose eine sehr starke cGAS-Expression aufweisen.

Die Aussage, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen der MxA-Expression – und somit der IFN- $\beta$  Produktion- und der CD8+ Infiltration gibt, wurde erneut in dem Patientenkollektiv bestätigt. Durch die Interferon-Produktion wandern Leukozyten in das Tumorgewebe ein. Des Weiteren könnten andere Botenstoffe, die durch die Aktivierung von NF- $\kappa$ B produziert werden, bei der Leukozyteninfiltration eine Rolle spielen. Dazu zählen z.B. IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 und IL-12. IL-1 $\beta$  ist wichtig für die Expansion, Effektorfunktionen, Gewebelokalisation und Memory-Antwort der T-Zellen (Ben-Sasson et al. 2013). IL2 ist für die Differenzierung von T-Zellen (Boyman et al. 2010) von Bedeutung, IL6 ist wichtig für die Proliferation und zytotoxische Aktivität der T-Zellen (Lee et al. 2016). IL12 unterstützt eine Verstärkung der CD8+ Aktivierung (Henry et al. 2008). Als Chemokine werden u. a. MIP-1, MCP-1 und RANTES produziert (Loetscher et al. 1994). Die koloniestimulierenden Faktoren, welche durch NF- $\kappa$ B aktiviert werden, sind G-CSF und GM-CSF (Blackwell und Christman 1997).

Die Unterstützung der angeborenen Immunität in Form eines verstärkten CD8+ Infiltrats scheint auch durch eine in den immunhistochemischen Präparaten auffällige Ko-Lokalisation der MxA-Expression und CD8+ Infiltration wahrscheinlich. Da die MxA-Expression meist „wolkenförmig“ gehäuft an verschiedenen Stellen im Tumor vorkommt, könnte man einen

Zusammenhang in Form von einer positiven Rückkopplung zwischen der IFN- $\beta$  Produktion der Zelle und der gleichzeitigen verstärkten Expression von Interferon  $\alpha/\beta$ -Rezeptoren annehmen. Diese positive Rückkopplung könnte für eine noch stärkere CD8+ Attraktion sorgen und somit die Korrelation und häufige Ko-Lokalisation der MxA-Expression und dem CD8+ Infiltrat erklären. In der vorliegenden Arbeit war eine stärkere MxA-Expression nicht mit einer besseren Prognose assoziiert. Die stärkere Interferon-Antwort zeigte lediglich in den ersten 40 Monaten eine bessere Prognose.

Therapeutisch könnte die Ausprägung der IFN- $\beta$  Produktion somit wichtig sein. In klinischen Studien wurde bereits versucht, Immuntherapien wie z.B. PD-1 Antikörper mit IFN- $\beta$  als adjuvante Gabe zu kombinieren, um den Tumor empfänglicher für die Immuntherapie zu machen (Fujimura et al. 2017). Es ist jedoch fraglich, ob sich Interferon  $\beta$ , ohne zusätzliche Therapie, positiv auf die Prognose der Melanompatienten auswirkt (S3-Leitlinie "Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms" 2020).

#### **4.1 Ausblick**

Unsere Analyse der Melanomproben unterstützt die Hypothese, dass die Expression von Typ I Interferon mit der Infiltration durch CD8+ Zellen positiv korreliert. Der cGAS-STING Signalweg könnte dabei eine zentrale Rolle bei der Aktivierung der Typ I Interferon Antwort spielen (Li et al. 2019). Vor allem die Aktivierung von STING könnte die antitumorale Aktivität verstärken (Chin et al. 2020). Der STING-Agonist diABZI (dimeric amidobenzimidazole) beispielsweise soll das adaptive Immunsystem stärken, um einer Therapieresistenzbildung zu entgehen (Chipurupalli et al. 2020). In der Zukunft könnte eine Stärkung dieses immunologischen Signalwegs zu einer Unterstützung bei verschiedensten Mono- oder kombinierten Tumortherapien führen.

Auch die Aktivierung der Typ I Interferon Antwort scheint eine größere Rolle für die Prognose von Melanompatienten sowie für die Wirksamkeit von Immuntherapien wie zum Beispiel Nivolumab zu spielen (Fujimura et al. 2017). Des Weiteren spielt die IFN- $\beta$  Produktion eine wichtige Rolle für den Erfolg einer Strahlentherapie (Deng et al. 2014). Das Ziel sollte eine Intensivierung der Erforschung des cGAS-STING Signalweges sein, um beispielweise Tumoren zur einer stärkeren Typ I Interferon Antwort zu verhelfen. Auch die Tatsache, dass in dickeren und somit prognostisch schlechteren Tumoren die cGAS-Expression verstärkt ist, rückt den cGAS-STING Signalweg als therapeutisches Ziel weiter in den Fokus.

## 5. Zusammenfassung

Das Melanom ist die am häufigsten tödlich verlaufende Tumorerkrankung der Haut. Es kann früh lymphogen und hämatogen metastasieren und die 5 Jahresüberlebensrate beim metastasierten Melanom ist mit unter 20 % noch schlecht. Unterschiedliche Faktoren können den Verlauf und die Prognose positiv oder negativ beeinflussen. So zeigen z.B. Tumore mit einem starken Immunzellinfiltrat prognostisch günstigere Verläufe. Dabei sind die Aktivierung des Typ I Interferon Systems und die damit verbundene verstärkte Einwanderung von CD8+ T-Zellen in das Tumorgewebe von zentraler Bedeutung. Als möglicher Aktivator des Typ I Interferon Systems wird u.a. der cGAS-STING Signalweg diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die cGAS-Expression in Melanomen mit einer verstärkten Interferon-Signatur korreliert. Dazu wurden 50 Melanome, die in den Jahren 2011-2017 in der Universitätsklinik Magdeburg exzidiert wurden, immunohistochemisch auf die Expression von cGAS, MxA sowie die Infiltration von CD8+ Zellen untersucht. Das Expressionsmuster von cGAS/MxA und MxA/CD8+ Zellen wurde verglichen sowie die cGAS Expression mit der Tumordicke korreliert. Abschließend wurde untersucht, ob die MxA-Expression Einfluss auf die Prognose hat.

Die ursprüngliche Annahme, dass eine stärkere cGAS-Produktion in Tumoren positiv mit einer stärkeren Aktivierung der Typ I Interferon Antwort korreliert, wurde nicht bestätigt. Die beschriebene positive Korrelation von Typ I Interferon Antwort und CTL-Infiltrat konnte in unserem Kollektiv bestätigt werden. Die Expression des Enzyms cGAS korreliert positiv mit der Tumordicke. Aus diesem Grund könnte die cGAS-Expression bzw. sogar der gesamte cGAS-STING Signalweg eine Rolle bei der Prognose von dickeren Tumoren spielen. Die verstärkte Ausprägung der Typ I Interferon Antwort zeigte in unserer Stichprobe keinen positiven Einfluss auf die Prognose.

Die therapeutische Modulation des cGAS-STING könnte in Zukunft für die Verbesserung verschiedener Mono- oder kombinierter Tumortherapien genutzt werden. Dahinter steht das Prinzip, aus einem „Cold-Tumor“ einen „Hot-Tumor“ zu machen, welcher empfänglicher für Immuntherapien des Melanoms ist (Bonaventura et al. 2019).

## Literaturverzeichnis

1. Abbasi, Naheed R.; Shaw, Helen M.; Rigel, Darrell S.; Friedman, Robert J.; McCarthy, William H.; Osman, Iman et al. (2004): Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria. In: *JAMA* 292 (22), S. 2771–2776. DOI: 10.1001/jama.292.22.2771.
2. Ablasser, Andrea; Schmid-Burgk, Jonathan L.; Hemmerling, Inga; Horvath, Gabor L.; Schmidt, Tobias; Latz, Eicke; Hornung, Veit (2013): Cell intrinsic immunity spreads to bystander cells via the intercellular transfer of cGAMP. In: *Nature* 503 (7477), S. 530–534. DOI: 10.1038/nature12640.
3. Amin, Mahul B.; Greene, Frederick L.; Edge, Stephen B. (Hg.) (2017): AJCC cancer staging manual. 8th edition. Schweiz, Chicago, IL: Springer; AJCC American Joint Committee on Cancer. Online verfügbar unter <http://www.springer.com/>.
4. Andtbacka, Robert H. I.; Kaufman, Howard L.; Collichio, Frances; Amatruda, Thomas; Senzer, Neil; Chesney, Jason et al. (2015): Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 33 (25), S. 2780–2788. DOI: 10.1200/JCO.2014.58.3377.
5. Antohe, Mihaela; Nedelcu, Roxana Ioana; Nichita, Luciana; Popp, Cristiana Gabriela; Cioplea, Mirela; Brinzea, Alice et al. (2019): Tumor infiltrating lymphocytes: The regulator of melanoma evolution. In: *Oncology letters* 17 (5), S. 4155–4161. DOI: 10.3892/ol.2019.9940.
6. Bardeesy, N.; Bastian, B. C.; Hezel, A.; Pinkel, D.; DePinho, R. A.; Chin, L. (2001): Dual inactivation of RB and p53 pathways in RAS-induced melanomas. In: *Molecular and cellular biology* 21 (6), S. 2144–2153. DOI: 10.1128/MCB.21.6.2144-2153.2001.
7. Ben-Sasson, Shlomo Z.; Hogg, Alison; Hu-Li, Jane; Wingfield, Paul; Chen, Xi; Crank, Michelle et al. (2013): IL-1 enhances expansion, effector function, tissue localization, and memory response of antigen-specific CD8 T cells. In: *The Journal of experimental medicine* 210 (3), S. 491–502. DOI: 10.1084/jem.20122006.
8. Blackwell, T. S.; Christman, J. W. (1997): The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 17 (1), S. 3–9. DOI: 10.1165/ajrcmb.17.1.f132.
9. Bonaventura, Paola; Shekarian, Tala; Alcazer, Vincent; Valladeau-Guilemond, Jenny; Valsesia-Wittmann, Sandrine; Amigorena, Sebastian et al. (2019): Cold Tumors: A Therapeutic Challenge for Immunotherapy. In: *Frontiers in immunology* 10, S. 168. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00168.
10. Boyman, Onur; Cho, Jae-Ho; Sprent, Jonathan (2010): The role of interleukin-2 in memory CD8 cell differentiation. In: *Advances in experimental medicine and biology* 684, S. 28–41.
11. Bradford, Porcia T. (2009): Skin cancer in skin of color. In: *Dermatology nursing* 21 (4), 170-7, 206; quiz 178.



12. Burton, Alison L.; Roach, Brent A.; Mays, Michael P.; Chen, Andrea F.; Ginter, Brooke A. R.; Vierling, Abbey M. et al. (2011): Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in melanoma. In: *The American surgeon* 77 (2), S. 188–192.
13. Byrne, Christopher M.; Thompson, John F.; Johnston, Heather; Hersey, Peter; Quinn, Michael J.; Michael Hughes, T.; McCarthy, William H. (2005): Treatment of metastatic melanoma using electroporation therapy with bleomycin (electrochemotherapy). In: *Melanoma research* 15 (1), S. 45–51. DOI: 10.1097/00008390-200502000-00008.
14. Callender, Glenda G.; Egger, Michael E.; Burton, Alison L.; Scoggins, Charles R.; Ross, Merrick I.; Stromberg, Arnold J. et al. (2011): Prognostic implications of anatomic location of primary cutaneous melanoma of 1 mm or thicker. In: *American journal of surgery* 202 (6), 659-64; discussion 664-5. DOI: 10.1016/j.amjsurg.2011.06.048.
15. Chen, Qi; Sun, Lijun; Chen, Zhijian J. (2016): Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing. In: *Nature immunology* 17 (10), S. 1142–1149. DOI: 10.1038/ni.3558.
16. Cheng, Zhangliang; Dai, Tong; He, Xuelin; Zhang, Zhengkui; Xie, Feng; Wang, Shuai et al. (2020): The interactions between cGAS-STING pathway and pathogens. In: *Signal transduction and targeted therapy* 5 (1), S. 91. DOI: 10.1038/s41392-020-0198-7.
17. Chin, Emily N.; Yu, Chenguang; Vartabedian, Vincent F.; Jia, Ying; Kumar, Manoj; Gamo, Ana M. et al. (2020): Antitumor activity of a systemic STING-activating non-nucleotide cGAMP mimetic. In: *Science (New York, N.Y.)* 369 (6506), S. 993–999. DOI: 10.1126/science.abb4255.
18. Chipurupalli, Sandhya; Ganesan, Raja; Dhanabal, S. P.; Kumar, M. Suresh; Robinson, Nirmal (2020): Pharmacological STING Activation Is a Potential Alternative to Overcome Drug-Resistance in Melanoma. In: *Frontiers in oncology* 10, S. 758. DOI: 10.3389/fonc.2020.00758.
19. Creagan, Edward T.; Cupps, Roger E.; Ivins, John C.; Pritchard, Douglas J.; Sim, Franklin H.; Soule, Edward H.; O'Fallon, Judith R. (1978): Adjuvant radiation therapy for regional nodal metastases from malignant melanoma. A randomized, prospective study. In: *Cancer* 42 (5), S. 2206–2210. DOI: 10.1002/1097-0142(197811)42:5<2206::aid-cnrc2820420518>3.0.co;2-s.
20. Crocetti, Emanuele; Fancelli, Laura; Caldarella, Adele; Buzzoni, Carlotta (2016): Thickness and diameter in melanoma: is there a relation? In: *Tumori* 102 (1), e1-3. DOI: 10.5301/tj.5000369.
21. Deng, Liufu; Liang, Hua; Xu, Meng; Yang, Xuanming; Burnette, Byron; Arina, Ainhoa et al. (2014): STING-Dependent Cytosolic DNA Sensing Promotes Radiation-Induced Type I Interferon-Dependent Antitumor Immunity in Immunogenic Tumors. In: *Immunity* 41 (5), S. 843–852. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.10.019.
22. Dzwierzynski, William W. (2010): Complete lymph node dissection for regional nodal metastasis. In: *Clinics in plastic surgery* 37 (1), S. 113–125. DOI: 10.1016/j.cps.2009.07.002.

23. Eggermont, Alexander M. M.; Spatz, Alan; Robert, Caroline (2014): Cutaneous melanoma. In: *Lancet (London, England)* 383 (9919), S. 816–827. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60802-8.
24. Fogarty, G. B.; Tartaglia, C. (2006): The utility of magnetic resonance imaging in the detection of brain metastases in the staging of cutaneous melanoma. In: *Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))* 18 (4), S. 360–362. DOI: 10.1016/j.clon.2006.01.002.
25. Fu, Qiaofen; Chen, Nan; Ge, Chunlei; Li, Ruilei; Li, Zhen; Zeng, Baozhen et al. (2019): Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a systematic review and meta-analysis. In: *Oncoimmunology* 8 (7), S. 1593806. DOI: 10.1080/2162402X.2019.1593806.
26. Fuertes, Mercedes B.; Kacha, Aalok K.; Kline, Justin; Woo, Seng-Ryong; Kranz, David M.; Murphy, Kenneth M.; Gajewski, Thomas F. (2011): Host type I IFN signals are required for antitumor CD8<sup>+</sup> T cell responses through CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cells. In: *The Journal of experimental medicine* 208 (10), S. 2005–2016. DOI: 10.1084/jem.20101159.
27. Fujimura, Taku; Hidaka, Takanori; Kambayashi, Yumi; Furudate, Sadanori; Kakizaki, Aya; Tono, Hisayuki et al. (2017): Phase I study of nivolumab combined with IFN- $\beta$  for patients with advanced melanoma. In: *Oncotarget* 8 (41), S. 71181–71187. DOI: 10.18632/oncotarget.17090.
28. Gaudy-Marqueste, Caroline; Wazaefi, Yanal; Bruneu, Yvane; Triller, Raoul; Thomas, Luc; Pellacani, Giovanni et al. (2017): Ugly Duckling Sign as a Major Factor of Efficiency in Melanoma Detection. In: *JAMA dermatology* 153 (4), S. 279–284. DOI: 10.1001/jamadermatol.2016.5500.
29. Gong, Hui-Zi; Zheng, He-Yi; Li, Jun (2019): Amelanotic melanoma. In: *Melanoma research* 29 (3), S. 221–230. DOI: 10.1097/CMR.0000000000000571.
30. Heistein, Jonathan B.; Acharya, Utkarsh (2020): StatPearls. Malignant Melanoma. Treasure Island (FL).
31. Henry, Curtis J.; Ornelles, David A.; Mitchell, Latoya M.; Brzoza-Lewis, Kristina L.; Hiltbold, Elizabeth M. (2008): IL-12 produced by dendritic cells augments CD8<sup>+</sup> T cell activation through the production of the chemokines CCL1 and CCL17. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 181 (12), S. 8576–8584. DOI: 10.4049/jimmunol.181.12.8576.
32. Iznardo, Helena; Garcia-Melendo, Cristina; Yélamos, Oriol (2020): Lentigo Maligna: Clinical Presentation and Appropriate Management. In: *Clinical, cosmetic and investigational dermatology* 13, S. 837–855. DOI: 10.2147/CCID.S224738.
33. Kim, K. B.; Eton, O.; Davis, D. W.; Frazier, M. L.; McConkey, D. J.; Diwan, A. H. et al. (2008): Phase II trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma. In: *British journal of cancer* 99 (5), S. 734–740. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604482.

34. Konno, Hiroyasu; Konno, Keiko; Barber, Glen N. (2013): Cyclic dinucleotides trigger ULK1 (ATG1) phosphorylation of STING to prevent sustained innate immune signaling. In: *Cell* 155 (3), S. 688–698. DOI: 10.1016/j.cell.2013.09.049.
35. Kuchelmeister, C.; Schaumburg-Lever, G.; Garbe, C. (2000): Acral cutaneous melanoma in caucasians: clinical features, histopathology and prognosis in 112 patients. In: *The British journal of dermatology* 143 (2), S. 275–280. DOI: 10.1046/j.1365-2133.2000.03651.x.
36. Larkin, James; Chiarion-Sileni, Vanna; Gonzalez, Rene; Grob, Jean Jacques; Cowey, C. Lance; Lao, Christopher D. et al. (2015): Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. In: *The New England journal of medicine* 373 (1), S. 23–34. DOI: 10.1056/NEJMoa1504030.
37. Lee, Jenny H.; Shklovskaya, Elena; Lim, Su Yin; Carlino, Matteo S.; Menzies, Alexander M.; Stewart, Ashleigh et al. (2020): Transcriptional downregulation of MHC class I and melanoma de- differentiation in resistance to PD-1 inhibition. In: *Nature communications* 11 (1), S. 1897. DOI: 10.1038/s41467-020-15726-7.
38. Lee, Sylvia; Margolin, Kim (2012): Tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma. In: *Current oncology reports* 14 (5), S. 468–474. DOI: 10.1007/s11912-012-0257-5.
39. Lee, Yun-Jung; Won, Tae Joon; Hyung, Kyeong Eun; Jang, Ye Won; Kim, Soo Jeong; Lee, Do Ik et al. (2016): IL-6 induced proliferation and cytotoxic activity of CD8(+) T cells is elevated by SUMO2 overexpression. In: *Archives of pharmacal research* 39 (5), S. 705–712. DOI: 10.1007/s12272-016-0736-6.
40. Lens, Marko B.; Dawes, Martin (2002): Interferon alfa therapy for malignant melanoma: a systematic review of randomized controlled trials. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 20 (7), S. 1818–1825. DOI: 10.1200/JCO.2002.07.070.
41. Li, Anping; Yi, Ming; Qin, Shuang; Song, Yongping; Chu, Qian; Wu, Kongming (2019): Activating cGAS-STING pathway for the optimal effect of cancer immunotherapy. In: *Journal of hematology & oncology* 12 (1), S. 35. DOI: 10.1186/s13045-019-0721-x.
42. Loetscher, P.; Seitz, M.; Clark-Lewis, I.; Baggiolini, M.; Moser, B. (1994): Monocyte chemotactic proteins MCP-1, MCP-2, and MCP-3 are major attractants for human CD4+ and CD8+ T lymphocytes. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 8 (13), S. 1055–1060. DOI: 10.1096/fasebj.8.13.7926371.
43. Long, Georgina V.; Hauschild, Axel; Santinami, Mario; Atkinson, Victoria; Mandalà, Mario; Chiarion-Sileni, Vanna et al. (2017): Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in Stage III BRAF-Mutated Melanoma. In: *The New England journal of medicine* 377 (19), S. 1813–1823. DOI: 10.1056/NEJMoa1708539.
44. Loo, Tze Mun; Miyata, Kenichi; Tanaka, Yoko; Takahashi, Akiko (2019): Cellular senescence and senescence-associated secretory phenotype via the cGAS-STING signaling pathway in cancer. In: *Cancer science*. DOI: 10.1111/cas.14266.

45. Lynch, Henry T.; Shaw, Trudy G. (2016): Familial atypical multiple mole melanoma (FAMMM) syndrome: history, genetics, and heterogeneity. In: *Familial cancer* 15 (3), S. 487–491. DOI: 10.1007/s10689-016-9888-2.
46. Mahendraraj, Krishnaraj; Sidhu, Komal; Lau, Christine S. M.; McRoy, Georgia J.; Chamberlain, Ronald S.; Smith, Franz O. (2017): Malignant Melanoma in African-Americans: A Population-Based Clinical Outcomes Study Involving 1106 African-American Patients from the Surveillance, Epidemiology, and End Result (SEER) Database (1988-2011). In: *Medicine* 96 (15), e6258. DOI: 10.1097/MD.0000000000006258.
47. Mays, Michael P.; Martin, Robert C. G.; Burton, Alison; Ginter, Brooke; Edwards, Michael J.; Reintgen, Douglas S. et al. (2010): Should all patients with melanoma between 1 and 2 mm Breslow thickness undergo sentinel lymph node biopsy? In: *Cancer* 116 (6), S. 1535–1544. DOI: 10.1002/cncr.24895.
48. McMasters, K. M.; Wong, S. L.; Edwards, M. J.; Ross, M. I.; Chao, C.; Noyes, R. D. et al. (2001): Factors that predict the presence of sentinel lymph node metastasis in patients with melanoma. In: *Surgery* 130 (2), S. 151–156. DOI: 10.1067/msy.2001.115830.
49. Mendenhall, William M.; Shaw, Christiana; Amdur, Robert J.; Kirwan, Jessica; Morris, Christopher G.; Werning, John W. (2013): Surgery and adjuvant radiotherapy for cutaneous melanoma considered high-risk for local-regional recurrence. In: *American journal of otolaryngology* 34 (4), S. 320–322. DOI: 10.1016/j.amjoto.2012.12.014.
50. Mocellin, Simone; Zavagno, Giorgio; Nitti, Donato (2008): The prognostic value of serum S100B in patients with cutaneous melanoma: a meta-analysis. In: *International journal of cancer* 123 (10), S. 2370–2376. DOI: 10.1002/ijc.23794.
51. Morton, D. L.; Wanek, L.; Nizze, J. A.; Elashoff, R. M.; Wong, J. H. (1991): Improved long-term survival after lymphadenectomy of melanoma metastatic to regional nodes. Analysis of prognostic factors in 1134 patients from the John Wayne Cancer Clinic. In: *Annals of surgery* 214 (4), 491-9; discussion 499-501. DOI: 10.1097/0000658-199110000-00013.
52. Mulliken, Jennifer S.; Russak, Julie E.; Rigel, Darrell S. (2012): The effect of sunscreen on melanoma risk. In: *Dermatologic clinics* 30 (3), S. 369–376. DOI: 10.1016/j.det.2012.04.002.
53. Overgaard, J.; Gonzalez Gonzalez, D.; Hulshof, M. C.; Arcangeli, G.; Dahl, O.; Mella, O.; Bentzen, S. M. (1996): Hyperthermia as an adjuvant to radiation therapy of recurrent or metastatic malignant melanoma. A multicentre randomized trial by the European Society for Hyperthermic Oncology. In: *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 12 (1), S. 3–20. DOI: 10.3109/02656739609023685.
54. Pirard, Delphine; Heenen, Michel; Melot, Christian; Vereecken, Pierre (2004): Interferon alpha as adjuvant postsurgical treatment of melanoma: a meta-analysis. In: *Dermatology (Basel, Switzerland)* 208 (1), S. 43–48. DOI: 10.1159/000075045.

55. Rastrelli, Marco; Tropea, Saveria; Rossi, Carlo Riccardo; Alaibac, Mauro (2014): Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. In: *In vivo (Athens, Greece)* 28 (6), S. 1005–1011.
56. Roesch, Alexander; Berking, Carola (2017): Melanom. In: Gerd Plewig, Thomas Ruzicka, Roland Kaufmann und Michael Hertl (Hg.): *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie*, Bd. 30. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 1–17.
57. Rossi, Mariarita; Pellegrini, Cristina; Cardelli, Ludovica; Ciciarelli, Valeria; Di Nardo, Lucia; Fagnoli, Maria Concetta (2019): Familial Melanoma: Diagnostic and Management Implications. In: *Dermatology practical & conceptual* 9 (1), S. 10–16. DOI: 10.5826/dpc.0901a03.
58. S3-Leitlinie "Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms". Leitlinienreport, Version 3.2., 2019, AWMF Registernummer: 032/024OL (2020). Langversion.
59. Saaq, Muhammad; Ashraf, Bushra; Siddiqui, Saad (2016): Nodular Melanoma. In: *Iranian journal of medical sciences* 41 (2), S. 164–165.
60. Scope, Alon; Dusza, Stephen W.; Halpern, Allan C.; Rabinovitz, Harold; Braun, Ralph P.; Zalaudek, Iris et al. (2008): The "ugly duckling" sign: agreement between observers. In: *Archives of dermatology* 144 (1), S. 58–64. DOI: 10.1001/archdermatol.2007.15.
61. Situm, Mirna; Bolanca, Zeljana; Buljan, Marija (2010): Lentigo maligna melanoma--the review. In: *Collegium antropologicum* 34 Suppl 2, S. 299–301.
62. Smoller, Bruce R. (2006): Histologic criteria for diagnosing primary cutaneous malignant melanoma. In: *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 19 Suppl 2, S34-40. DOI: 10.1038/modpathol.3800508.
63. Trujillo, Jonathan A.; Sweis, Randy F.; Bao, Riyue; Luke, Jason J. (2018): T Cell-Inflamed versus Non-T Cell-Inflamed Tumors: A Conceptual Framework for Cancer Immunotherapy Drug Development and Combination Therapy Selection. In: *Cancer immunology research* 6 (9), S. 990–1000. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0277.
64. Tsao, Hensin; Olazagasti, Jeannette M.; Cordero, Kelly M.; Brewer, Jerry D.; Taylor, Susan C.; Bordeaux, Jeremy S. et al. (2015): Early detection of melanoma: reviewing the ABCDEs. In: *Journal of the American Academy of Dermatology* 72 (4), S. 717–723. DOI: 10.1016/j.jaad.2015.01.025.
65. Wallon-Dumon, Gwénaëlle; Dréno, Brigitte (2003): Diagnostic clinique de mélanome. In: *Presse medicale (Paris, France : 1983)* 32 (1), S. 33–38.
66. Wang, Qiang; Liu, Xing; Cui, Ye; Tang, Yijun; Chen, Wei; Li, Senlin et al. (2014): The E3 ubiquitin ligase AMFR and INSIG1 bridge the activation of TBK1 kinase by modifying the adaptor STING. In: *Immunity* 41 (6), S. 919–933. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.11.011.

67. Weide, Benjamin; Derhovanessian, Evelyn; Pflugfelder, Annette; Eigentler, Thomas K.; Radny, Peter; Zelba, Henning et al. (2010): High response rate after intratumoral treatment with interleukin-2: results from a phase 2 study in 51 patients with metastasized melanoma. In: *Cancer* 116 (17), S. 4139–4146. DOI: 10.1002/cncr.25156.
68. Welsh, Raymond M.; Bahl, Kapil; Marshall, Heather D.; Urban, Stina L. (2012): Type 1 interferons and antiviral CD8 T-cell responses. In: *PLoS pathogens* 8 (1), e1002352. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002352.
69. Wenzel, Joerg; Bekisch, Barbara; Uerlich, Manfred; Haller, Otto; Bieber, Thomas; Tüting, Thomas (2005): Type I interferon-associated recruitment of cytotoxic lymphocytes: a common mechanism in regressive melanocytic lesions. In: *American journal of clinical pathology* 124 (1), S. 37–48. DOI: 10.1309/4EJ9KL7CGDENVVLE.
70. Wheatley, Keith; Wilson, Jayne S.; Gaunt, Piers; Marsden, Jerry R. (2016): Surgical excision margins in primary cutaneous melanoma: A meta-analysis and Bayesian probability evaluation. In: *Cancer treatment reviews* 42, S. 73–81. DOI: 10.1016/j.ctrv.2015.10.013.
71. Woo, Seng-Ryong; Fuertes, Mercedes B.; Corrales, Leticia; Spranger, Stefani; Furdyna, Michael J.; Leung, Michael Y. K. et al. (2014): STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors. In: *Immunity* 41 (5), S. 830–842. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.10.017.
72. Xia, Tianli; Konno, Hiroyasu; Barber, Glen N. (2016): Recurrent Loss of STING Signaling in Melanoma Correlates with Susceptibility to Viral Oncolysis. In: *Cancer research* 76 (22), S. 6747–6759. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1404.
73. Zhang, Jing; Hu, Ming-Ming; Wang, Yan-Yi; Shu, Hong-Bing (2012): TRIM32 protein modulates type I interferon induction and cellular antiviral response by targeting MITA/STING protein for K63-linked ubiquitination. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (34), S. 28646–28655. DOI: 10.1074/jbc.m112.362608.

## Abbildungsverzeichnis

**Abb. 1:** Beispiele der unterschiedlichen Melanomtypen

**Abb. 2:** die unterschiedlichen Aktivierungsmöglichkeiten des cGAS-STING Signalwegs in der Zelle (Chen et al. 2016)

**Abb. 3:** die positive Rückkopplung der Typ I Interferon Antwort nach Aktivierung des cGAS-STING Signalwegs in einer Zelle (Chen et al. 2016)

**Abb. 4:** Schema der möglichen Aktivierung des cGAS-STING-Signalwegs im Tumor durch dsDNA aus toten Zellen und der anschließenden Typ I Interferon Aktivierung und MxA Expression.

**Abb. 5:** Beispiele der etablierten Färbungen eines ausgewählten Tumors

**Abb. 6:** Beispiele der Positivkontrollen

**Abb. 7:** Auszug aus den Protokollen der Antigenfärbung des Benchmark Ultras von Ventana

**Abb. 8:** Einteilung der jeweiligen Gradings der cGAS-Färbungen nach gefärbter Fläche im Tumor

**Abb. 9:** Einteilung der jeweiligen Gradings der MxA-Färbungen nach gefärbter Fläche im Tumor

**Abb. 10:** Einteilung der unterschiedlichen Lokalisationen des CD8+ Infiltrats

**Abb. 11:** Beispiel der semiquantitativen Analyse der im Tumor lokalisierten CD8+ Zellen in 2,5-facher Vergrößerung

**Abb. 12:** Ausprägung der cGAS-Expression (n=50).

**Abb. 13:** Ausprägung der MxA-Expression (n=50).

**Abb. 14:** Darstellung der Ausprägung des CD8+ Infiltrats in den Tumoren

**Abb. 15:** Einteilung der unterschiedlichen Lokalisationen des CD8+ Infiltrats

**Abb. 16:** Verteilung des CD8+ Infiltrats im Tumor (n=50).

**Abb. 17:** Beispiele der Korrelation der cGAS- und MxA-Expression

**Abb. 18:** Darstellung der Korrelation der cGAS- und MxA Expression in einem Scatter-Plot mit Steigungsgrade des r-Wertes

**Abb. 19:** Beispiele der Korrelation von CD8+ Infiltration und MxA Expression

**Abb. 20:** (A) Darstellung der Korrelation der MxA-Expression und ausgezählten CD8+ Zellen in einem Scatter-Plot mit Steigungsgrade des r-Wertes. (B) Darstellung der Korrelation der MxA Expression und dem CD8+ Level in einem Scatter-Plot mit Steigungsgrade des r-Wertes.

**Abb. 21:** Verteilung der Kolo-kalisation von CD8+ Infiltrat und der MxA-Expression

**Abb. 22:** Darstellung und Gegenüberstellung der Kolo-kalisation von CD8+ Zellen und MxA exprimierenden Zellen

**Abb. 23:** Darstellung der positiven Korrelation der cGAS-Expression und Tumordicke

**Abb. 24:** Darstellung der Korrelation der cGAS-Expression und Tumordicke in einem Scatter-Plot mit Steigungsgrade des r-Wertes

**Abb. 25:** Kaplan-Meier Analyse zur Überlebenszeit ab Erstdiagnose in Monaten zwischen Tumoren mit einer hohen MxA-Expression (MxA Level 2-4) und einer niedrigen MxA-Expression (MxA Level 1)

## Tabellenverzeichnis

**Tab. 1:** Stadieneinteilung nach TNM gemäß der 8. Ausgabe AJCC Klassifikation

**Tab. 2:** Eigenschaften der Primärantikörper

**Tab. 3:** Verwendete Substanzen, Chemikalien und Lösungen

**Tab. 4:** Verwendete Geräte und Materialien

**Tab. 5:** Schritte des maschinellen Entparaffinierungsprogramms

**Tab. 6:** Schritte des maschinellen Dehydratationsprogramms

**Tab. 7:** Beispielfärbungen/positiv Kontrollen

**Tab. 8:** klinische Charakteristika der Melanompatienten der allgemeinen Dermato-Onkologischen Ambulanz Magdeburg, bei denen in den Jahren 2012-2017 ein Melanom primär exzidiert und eine Sentinel-Lymphknoten-Diagnostik durchgeführt wurde



## **Danksagungen**

Mein größter Dank gilt Frau Prof. Evelyn Gaffal für die unglaublich gute Betreuung, das große Verständnis, die oft notwendige Geduld und die äußerst hilfreichen Ratschläge während der Doktorarbeit. Ein sehr großer Dank gebührt auch Herrn Prof. Tüting. Ohne ihn wäre das Projekt nicht begonnen worden.

Ein besonderer Dank gilt dem Team aus dem Labor der Histopathologie der Hautklinik und dort am meisten Frau Herz, die bei Fragen immer ein offenes Ohr hatte und mit sehr viel Geduld und viel Herzblut das Projekt vorangetrieben hat.

Der Dank für einfach alles, was in den letzten zehn Jahren und auch schon davor in meinem Werdegang geschehen ist, gilt meiner Familie und am meisten meinen Eltern, ohne die weder der Weg des Studiums noch das Schreiben der Dissertation möglich gewesen wäre.

## **Ehrenerklärung**

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

**„Die Typ 1 Interferon Antwort und cGAS-Expression im humanen Melanom“**

in der Hautklinik der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg mit Unterstützung durch

Frau Prof. Evelyn Gaffal und Herrn Prof. Thomas Tüting

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Essen, den 24.09.2021

Unterschrift

(Nils Leonard Bach)