

# Abschlussbericht zum Promotionsstipendium: Erforschung der Rolle eines Plasmaproteins in der Resistenz gegen Immuntherapie bei Melanompatient:innen

## **Stipendiat:**

Tim Zell

AG Prof. Dr. Christoffer Gebhardt

Stellvertretender Klinikdirektor

Leiter Universitäres Hauttumorzentrum Hamburg

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE)

Martinstraße 52

20246 Hamburg

Das Melanom ist mit rund 25.000 Neuerkrankungen pro Jahr eine der häufigsten Krebsarten in Deutschland und für fast 3.000 Todesfälle pro Jahr verantwortlich. Mit der Entdeckung der Immun-Checkpoints, die als Oberflächenrezeptoren auf Lymphozyten die Immunantwort unterdrücken und vom Tumor zu diesem Zweck genutzt werden, gelang jedoch ein Durchbruch auf dem Gebiet der Krebstherapie: Erstmals wurden Antikörper gegen die Checkpoints auf T-Zellen eingesetzt, um die vom Tumor unterdrückte Immunantwort zu enthemmen. Heute ist die therapeutische Blockade des Immun-Checkpoints PD-1 (programmed cell death ligand) der medizinische Goldstandard in der adjuvanten Melanomtherapie; in der palliativen Therapie wird teils zusätzlich der CTLA-4-Rezeptor blockiert. Diese Behandlung ermöglicht eine drastische Verbesserung der progressionsfreien Überlebens- und Gesamtüberlebensraten. Im Verlauf der Therapie entwickelt der Tumor jedoch häufig Resistenzen. Bei 22 % der Patient:innen zeigt sich ein dauerhaftes klinisches Ansprechen, während bei 60 % der Patient:innen innerhalb des ersten Jahres nach der Therapie eine klinische Progression auftritt. Außerdem treten bei 59 % der behandelten Patient:innen schwere Nebenwirkungen (Grad III-IV) auf. Die Therapie von Patient:innen mit primärer Resistenz des Tumors stellt eine der größten Herausforderungen für die moderne Krebstherapie dar. Insbesondere bedarf es hier eines validen klinischen Biomarkers, welcher das Ansprechen auf die Therapie mit Immun-Checkpoint Inhibitoren vor Beginn der Therapie vorhersagen kann.

Ein spezifisches Protein, das mit dem Fortschreiten des Tumors oder dem Scheitern der Behandlung in Verbindung gebracht wird, könnte sehr nützlich sein, unabhängig davon, ob es vom Tumor abgesondert wird oder Teil von Immunabwehrmechanismen ist. Um potenzielle Proteinkandidaten zu finden, wurde von unserer Arbeitsgruppe am ein Proteom-Profiling aus Patient:innenplasma durchgeführt, bei dem die Konzentrationen verschiedener Proteine, zwischen Therapieansprecheer:innen, mit Therapieresistenten verglichen wurden. Es wurde ein Protein mit starker Korrelation zu schnellen Fortschreiten der Therapie gefunden. Von diesem Protein ist bereits bekannt, dass es im Zusammenhang mit der Schwangerschaft immunsuppressive Eigenschaften hat. Ziel meiner Arbeit ist es, die Mechanismen zu entschlüsseln, die hinter diesen Eigenschaften in der tumorimmunologischen Umgebung stehen. Aus Vertraulichkeitsgründen darf der Name des Proteins zu diesem Zeitpunkt noch nicht genannt werden. Deswegen wird es nachfolgend als „Protein X“ bezeichnet.

In einer ersten Analyse mittels Proteomics-Protein-Screening in Plasmaproben von 48 Melanompatient:innen unserer Biobank, die adjuvant mit einem anti-PD-1 Antikörper

behandelt wurden, hat die Arbeitsgruppe ein vielversprechendes Kandidatenprotein identifiziert, das nur bei Patient:innen mit früher primärer Resistenz (Resistenz innerhalb von 6 Monaten nach Therapiestart) im Vergleich zu Patient:innen ohne Rückfall in den ersten zwölf Monaten stark hochreguliert war. Der Proteinkandidat ist ein sekretiertes Protein, das daher direkt angegriffen und gehemmt werden könnte. Interessanterweise wurden verschiedene immunsuppressive Eigenschaften dieses Kandidatenproteins bereits in anderen Zusammenhängen als der Immunonkologie beschrieben. Wir haben die Ergebnisse mit einem kommerziellen ELISA-Assay am Serum der gesamten adjuvanten Patient:innenkohorte bestätigt und eine gute Korrelation zwischen beiden Methoden festgestellt. Es zeigte sich eine mediane Konzentration von 8,01 pg/ml bei den Patient:innen mit Rezidiv im Vergleich zu 36 pg/ml in der Gruppe der Patient:innen mit Rezidiv ( $p=0,0113$ ; Mann-Whitney Test) zum Start der Therapie. Eine Untergruppe von 5 Patient:innen fiel durch eine besonders hohe Protein X Konzentration auf. Interessanterweise hatten diese Patient:innen alle ein Rezidiv innerhalb von 3 Monaten. Diese Untersuchung wurde nun auf die palliative Kohorte unserer Melanombiobank erweitert. Hier zeigte sich bei 91 insgesamt untersuchten Patient:innen eine ähnliche Korrelation. Von 14 Patient:innen, welche erhöhte Protein X Werte vor Beginn der Therapie hatten ( $>500\text{pg/ml}$ ), zeigten 13 einen Progress innerhalb der ersten sechs Monate. Hieraus ergibt sich ein positiv prädiktiver Wert von 93%.

Anschließend untersuchten wir die Konzentration von Protein X im Zeitverlauf bei palliativ mit Immuntherapie behandelten Patient:innen. Diese wurden je nach Therapieansprechen in Primary Response, Secondary Response (Nach anfänglichen Progress unter Therapie, zeigte sich ein Ansprechen im weiteren Verlauf), Secondary Resistance und Primary Resistance (entsprechend der klinischen Einschätzung durch die behandelnden Ärzt:innen) aufgeteilt. Hier ergaben sich für die Patient:innen mit sekundärem Therapieansprechen durchgehend Werte, welche unter dem von uns auf 500 ng/ml festgelegten Grenzwert liegen. Bei den Proteinkonzentrationen der Patient:innen, welche ein direktes Therapieansprechen (Primary Response) auf die Immuntherapie zeigten, lag der Wert fast durchgehend unter 500 pg/ml. Lediglich zwei Patient:innen zeigten erhöhte Werte vor oder ein Jahr nach Therapiebeginn. Bei Patient:innen mit sekundärer Resistenz blieben die Werte niedrig, lediglich bei zwei Patient:innen erhöhte sich die Protein X Konzentration im Blut zum Progress- oder Todeszeitpunkt. Die weitaus höchsten Protein X Werte ließen sich im Blut von Patient:innen mit primärer Resistenz (Progress innerhalb von 6 Monaten) feststellen. In dieser Gruppe ergab sich ein sehr heterogenes Bild. Einige Patient:innen wiesen im Zeitverlauf fallende Werte auf, bei anderen stiegen die Werte zum Progress- oder Todeszeitpunkt über den Grenzwert.

Zum Nachweis der Herstellung von Protein X durch Melanomzellen wurde die Protein X Konzentration im Zellkulturüberstand verschiedener humaner Melanomzelllinien gemessen. Hier zeigte sich eine erhöhte Konzentration insbesondere im Überstand der Zelllinien MeWo, SK2 und SK30. Diese Ergebnisse ließen sich in einer Genexpressionsanalyse mittels RT-qPCR bestätigen.

Mit weiterführenden funktionellen Experimenten mit Melanomzelllinien sowie der Analyse von Tumorgewebe hoffen wir, mehr über die Herkunft und Rolle von Protein X im Tumor-Mikromilieu zu erfahren. Außerdem könnten uns die klinischen und pathologischen Charakteristika der Patient:innen wichtige Hinweise zu einer möglichen klinischen Anwendung von Protein X als blutbasiertem Biomarker liefern, welcher Patient:innen mit Melanom bei der Entscheidung über eine Therapie unterstützen könnte.