

**Die Leistungsfähigkeit freizirkulierender zellfreier
SHOX2 DNA-Methylierung als Biomarker beim
adjuvant und palliativ Anti-PD-1-behandelten Melanom**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Eric Victor Diekmann

aus Köln

2026

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

- | | |
|---------------|-----------------------------------|
| 1. Gutachter: | PD Dr. rer. nat. Dimo Dietrich |
| 2. Gutachter: | Prof. Dr. med. Jörg Albert Wenzel |

Tag der mündlichen Prüfung: 30.01.2026

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1. Deutsche Zusammenfassung	6
1.1 Einleitung	6
1.2 Material und Methoden	9
1.2.1 Probenaufbereitung und <i>SHOX2</i> -ccfDNAm Analyse	10
1.2.2 Patientenkollektiv	11
1.2.3 Statistische Analyse	13
1.3 Ergebnisse	14
1.3.1 Betrachtung der <i>SHOX2</i> -ccfDNAm Analyse bei palliativ mit ICB behandelten Patienten	14
1.3.2 Betrachtung der <i>SHOX2</i> -ccfDNAm Analyse bei adjuvant mit ICB behandelten Patienten	20
1.4 Diskussion	22
1.5 Zusammenfassung	27
1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	28
2. Veröffentlichung	34
3. Erklärung zum Eigenanteil	35
4. Danksagung	36

Abkürzungsverzeichnis

95 % CI	<i>95 % Confidence interval</i> ; 95 % Konfidenzintervall
ACTB	β -Aktin
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AUC	<i>Area under the curve</i> ; Fläche unter der Kurve
BRAF	<i>Serine/threonine-protein kinase B-Raf</i>
ccfDNA	<i>Circulating cell-free DNA</i> ; zirkulierende zellfreie DNA
ccfDNAm	<i>Circulating cell-free DNA Methylation</i> ; zirkulierende zellfreie DNA-Methylierung
CR	<i>Complete response</i> ; Vollständiges Ansprechen
CT	<i>Computed tomography</i> ; Computertomographie
C _T	<i>Cycle threshold</i>
ctDNA	<i>Circulating tumor DNA</i> ; zirkulierende Tumor DNA
CTLA-4	<i>Cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
engl.	<i>English</i> ; englisch
ICB	Immuncheckpointblockade
HR	<i>Hazard ratio</i>
IQR	<i>Interquartile range</i> ; Interquartilsabstand
LAG-3	<i>Lymphocyte activating 3</i>
LDH	Lactatdehydrogenase
MRI	<i>Magnetic resonance imaging</i> ; Magnetresonanztomographie
MUP	<i>Melanoma of unknown primary</i> , Melanom unbekannten Ursprungs
NRAS	<i>Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>
NSCLC	<i>Non-small cell lung cancer</i> ; Nicht-kleinzelliger Lungenkrebs
n.z.	nicht zutreffend
OS	<i>Overall survival</i> ; Gesamtüberleben
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion

PD	<i>Progressive disease; Fortschreitende Erkrankung</i>
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed cell death ligand 1</i>
PFS	<i>Progression free survival; Progressionsfreies Überleben</i>
PR	<i>Partial response; Teilweises Ansprechen</i>
RASSF1	<i>Ras association domain family member 1</i>
RECIST	<i>Response evaluation criteria in solid tumors</i>
S100B	<i>S100 calcium-binding protein B</i>
SEPT9	<i>Septin-9</i>
SD	<i>Stable disease; Stabile Erkrankung</i>
SHOX2	<i>Short-stature homeobox 2</i>
TMB	<i>Tumor mutational burden; Tumormutationslast</i>

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Rolle der zellfreien zirkulierenden DNA-Methylierung (ccfDNAm) des „short-stature homeobox 2“ (*SHOX2*) Genlokus bei adjuvant und palliativ mit Immuncheckpoint-Inhibitoren behandelten Patienten mit kutan, lymphogen, und hämatogen metastasiertem Melanom. Ziel der Arbeit ist es, eine Aussage über den prognostischen und prädiktiven Wert von ccfDNAm als Biomarker zu treffen. Zudem soll die Fähigkeit als Biomarker zur Überwachung der Therapie untersucht werden.

Das Melanom ist eine Tumorentität, die in den vergangenen Jahren stets an Bedeutung gewonnen hat und für 90 % der durch Hautkrebs verursachten Mortalität verantwortlich ist (Garbe et al., 2022). Auch die Immuntherapie mittels Immuncheckpoint-Inhibitoren spielt in den letzten Jahren eine zunehmend zentrale Rolle bei der Behandlung maligner Erkrankungen. Sie basiert auf einer Immuncheckpoint-Blockade (ICB), welche zu einer Aktivierung des patienteneigenen Immunsystems führt (Michel et al., 2020). Dieses kann von bestimmten Tumorentitäten herunterreguliert werden. Die Behandlungen mit gegen die Immuncheckpoints PD-1 („programmed cell death 1“), CTLA-4 („cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4“) und LAG3 („lymphocyte activating 3“) gerichteten monoklonalen Antikörpern beim metastasierten Melanom stellen wirkungsvolle Therapiemöglichkeiten dar (Knight et al., 2023). Zudem sind Anti-PD-1- und Anti-CTLA-4-Inhibitoren für die adjuvante Behandlung des fortgeschrittenen Melanoms zugelassen (Knight et al., 2023). Insbesondere die Kombination aus Anti-PD-1- und Anti-CTLA-4-Inhibitoren verspricht mit Ansprechraten von etwa 61 % gute Ergebnisse (Knight et al., 2023).

Dennoch wirkt die Immuntherapie bei einem großen Teil der Patienten nicht ausreichend oder es entwickelt sich eine Resistenz gegen jene Medikamente (Silva et al., 2021; Xia et al., 2018). Insbesondere dieser Anteil an Patienten könnten von einem Wechsel der Therapie zu einer kombinierten Immuntherapie oder einer zielgerichteten Therapie profitieren (Xia et al., 2018). Um den Erfolg der Therapie zu bestimmen und weitere Behandlungsschritte einzuleiten, werden vor allem strahlenintensive Bildgebung oder

klinische Untersuchungen eingesetzt. Diese sind teilweise sehr zeit-, kosten- und strahlenintensiv. Zudem kann bei mit Immuntherapie behandelten Patienten eine sogenannte Pseudoprogression auftreten (Seymour et al., 2017). Dies bedeutet, dass initial eine Tumorumfangvergrößerung durch Infiltration von Immunzellen auftritt, und im weiteren Verlauf der Tumor auf die Therapie anspricht und schrumpft. Daher sind weitere Parameter zur Überwachung der Therapie und der Vorhersage des Therapieerfolgs erforderlich. Aktuell ist hierfür jedoch bisher kein Tumormarker bei Patienten mit Melanom, welche ICB erhalten, im klinischen Alltag etabliert (Stadler et al., 2022). Die Gewinnung von Biomarkern aus leichtverfügbarem Material, wie etwa Blutplasma, wäre hierfür besonders geeignet. Im Blutplasma befindet sich ccfDNA, welche zum großen Teil von peripheren Leukozyten stammt. Aber auch Tumorzellen können durch aktive Sekretion, Apoptose oder Nekrose zellfreie Tumor-DNA (ctDNA) freisetzen (Huynh und Hoon, 2016). Es gibt zahlreiche Ansätze, ctDNA für die Diagnostik von malignen Erkrankungen einzusetzen. Darunter fallen beispielsweise das Screening, Prognoseabschätzungen, Prädiktion des Therapieansprechens, Verlaufskontrollen oder ein molekulares Staging (Stadler et al., 2022; Wan et al., 2017). Auch bei Patienten mit Melanom, welche eine Immuntherapie, zielgerichtete Tumorthherapie oder einen T-Zell-Transfer erhalten, gibt es Ansätze, ctDNA aufgrund seiner guten prognostischen und prädiktiven Eigenschaften zu nutzen (Forschner et al., 2019; Syeda et al., 2021; Xi et al., 2016). In diesem Fall kann ctDNA etwa für das Monitoring und die Erkennung von Pseudoprogression genutzt werden (Lee et al., 2018; Xi et al., 2016).

Typischerweise wird ctDNA durch eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)-Analyse der typischen Mutationsstellen *BRAF* (ein Protoonkogen, kodierend für die Serin-Threonin-Kinase B-Raf) und *NRAS* (ebenfalls ein Protoonkogen, kodierend für die GTPase NRAS) nachgewiesen (Stadler et al., 2022; Wan et al., 2017). Bei Wildtyp-Melanomen ohne *BRAF/NRAS*-Mutation müssen hingegen aufwendige und kostspielige Multi-Gen-Panel oder Hochdurchsatz-Sequenzierungen durchgeführt werden. Wildtyp-Melanome kommen bei ungefähr einem Drittel der erkrankten Patienten vor und machen damit einen signifikanten Anteil aus (Stadler et al., 2022).

Bereits früh wiesen Hoon et al. (2004) auf die Möglichkeit hin, methylierte DNA im Blut von Melanompatienten zu untersuchen, um ctDNA mutationsunabhängig nachweisen zu können.

Eine derartige DNA-Methylierung spielt insbesondere bei der Entstehung und dem Fortschreiten von Tumorerkrankungen verschiedener Entitäten eine entscheidende Rolle und wird deshalb als ein zentrales Charakteristikum maligner Erkrankungen erachtet (Jones und Baylin, 2007). Bei Tumorpatienten lassen sich aberrante Methylierungsmuster in zellfreier freizirkulierender DNA feststellen. Während die klinische Anwendung von ccfDNAm als Biomarker beim Melanom erst in einigen wenigen Studien untersucht wurde, ist dieses Vorgehen in den USA bereits als Screening-Test für das Kolorektalkarzinom zugelassen (Food and Drug Administration, 2016).

Bereits 2004 konnten Hoon et al. zeigen, dass die Hypermethylierung des Tumorsuppressor-Gens „Ras association domain family member 1“ (*RASSF1*) dabei helfen konnte, Melanompatienten von gesunden Kontrollpatienten zu unterscheiden. Außerdem konnten Mori et al. (2005) sowie Salvianti et al. (2012) zeigen, dass die Hypermethylierung von ccfDNA mit einer schlechteren Therapieansprechrate und einem kürzeren Overall Survival (OS) bei Patienten unter Biochemotherapie einherging. Ähnliche Untersuchungen zum prädiktiven oder prognostischen Wert von ccfDNAm fehlen bisher für Patienten, die eine Immun- oder zielgerichtete Therapie erhalten.

Zu betrachten ist in diesem Zusammenhang *SHOX2*, welches als Homöobox-Gen eine entscheidende Rolle für die Entwicklung verschiedener Organe spielt (Cobb et al., 2006). Eine aberrante Methylierung dieses Gens findet sich bei verschiedenen Tumoren, so auch beim Melanom (de Vos et al., 2020). Eine Hypermethylierung des *SHOX2*-Gens kann bei vielen Tumorentitäten beobachtet werden, etwa beim kolorektalen Karzinom, Nierenzellkarzinom, Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereichs oder beim Lungenkarzinom (Dietrich et al., 2013; Jones und Baylin, 2007; Jung et al., 2019; Kneip et al., 2011; Schmidt et al., 2015; Schröck et al., 2017). *SHOX2*-ccfDNAm hat sich bei fortgeschrittenem Lungenkrebs und Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich sowohl als prognostischer als auch als prädiktiver Biomarker erwiesen und ermöglicht die frühzeitige Identifikation von Therapieversagen oder Krankheitsrückfällen (Schmidt et al., 2015; Schröck et al., 2017). Auf dieser Grundlage kann angenommen werden, dass *SHOX2*-ccfDNAm auch für das Melanom einen vielversprechenden Plasmabiomarker darstellt, da von de Vos et al. (2020) gezeigt werden konnte, dass in 93 % der Melanome eine Hypermethylierung bei 90 % Spezifität gegenüber Normalgeweben vorliegt.

Auf dieser Grundlage soll die folgende Fragestellung beantwortet werden:

Welchen prognostischen und prädiktiven Wert besitzt die ccfDNAm des *SHOX2*-Genlokus als Biomarker im Rahmen der Immuntherapie bei adjuvant und palliativ mit Immuncheckpoint-Inhibitoren behandelten Patienten mit kutan, lymphogen und hämatogen metastasiertem Melanom und inwiefern eignet es sich zur Überwachung der Therapie?

1.2 Material und Methoden

Für die Studie wurden drei verschiedene Patientenkohorten herangezogen: Die erste Kohorte bestand aus $n = 42$ Patienten, welche im Zeitraum von 2017 bis 2020 eine palliative Immuntherapie bei metastasiertem, malignem Melanom erhielten. Bei dieser Patientengruppe wurde prospektiv Plasma aus Blutproben analysiert, welche sowohl vor Behandlungsbeginn am Tag der Behandlung als auch während der Behandlung entnommen wurden. Die erste Staging-Untersuchung erfolgte im Median nach 2,7 Monaten [Interquartilsabstand (IQR): 2,4 – 3,6 Monate], während die mediane Nachbeobachtungszeit 18,3 Monaten betrug (IQR: 11,0 – 34,4 Monate). Als primäre Endpunkte wurden das progressionsfreie Überleben (PFS) und das Gesamtüberleben (OS) festgelegt. Die Überlebenszeit wurde als Zeitraum zwischen Behandlungsbeginn und Tod/Progression beziehungsweise dem letzten dokumentierten Patientenkontakt definiert. Als sekundäre Endpunkte wurden das bestmögliche Gesamtansprechen, die objektive Ansprechrates sowie der Zeitgewinn bis zur Feststellung eines Rezidivs oder einer Progression des Tumorleidens festgesetzt. Im Abstand von 2 bis 3 Monaten wurde der erzielte Therapieerfolg radiologisch sowohl durch Computertomographie (CT) des Thoraxes als auch durch Magnetresonanztomographie (MRT) des Gehirns beurteilt. Auf Grundlage der Kriterien zur Beurteilung des Ansprechens bei soliden Tumoren (RECIST v.1.1) wurde das erzielte Ergebnis entweder als komplette Remission (CR), Teilremission (PR), stabile Erkrankung (SD) oder progressive Erkrankung (PD) klassifiziert.

Die zweite Kohorte umfasste $n = 55$ Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Melanom (Stadium IIIA–IV). Alle Patienten dieser Kohorte wurden zwischen 2017 und 2020 am Universitätsklinikum Bonn nach chirurgischer Tumorresektion mit adjuvanter ICB behandelt. Die mediane Nachbeobachtungszeit der Patienten betrug 15,6 Monate (IQR: 11,7 – 29,6 Monate). Als primärer Endpunkt wurde

ein Tumorrezidiv definiert, welches das Auftreten von Lymphknotenmetastasen, (sub)kutanen Metastasen und Fernmetastasen umfasst. Alle drei Monate wurden die Patienten klinisch und mittels Lymphknotenultraschall untersucht. Zudem wurde alle drei Monate während und alle sechs Monate nach der beendeten adjuvanten Immuntherapie ein CT des Thorax und ein MRT des Gehirns durchgeführt. Sechs Monate nach der letzten Blutabnahme wurden Patienten ohne Tumorrezidiv zensiert.

Die dritte Kohorte bestand aus $n = 126$ Kontrollpatienten, deren Plasmaproben ebenfalls analysiert wurden. Bei dieser Gruppe bestand kein Nachweis einer malignen Erkrankung, sie befanden sich jedoch im Zeitraum zwischen 2014 und 2016 am Universitätsklinikum Bonn aufgrund diverser Erkrankungen in Behandlung und wurden in Bezug auf Geschlecht und Alter der palliativen Kohorte angepasst.

1.2.1 Probenaufbereitung und *SHOX2*-ccfDNAm Analyse

Für die Studie wurden Blutproben der Patienten in K3-EDTA-haltigen Blutabnahmeröhrchen gesammelt. Das gewonnene Blutplasma wurde innerhalb von zwei Stunden aufbereitet und bei -80°C aufbewahrt. DNA-Extrahierung und Bisulfit-Konvertierung erfolgten wie von Schröck et al. (2017) beschrieben. Die *SHOX2*-ccfDNAm wurde mittels einer quantitativen methylierungsspezifischen Echtzeit-PCR (Polymerase-Kettenreaktion) bestimmt (Dietrich et al., 2013; Jung et al., 2019). Zur Quantifizierung der Gesamt-ccfDNA in der Plasmaprobe diente β -Aktin (*ACTB*) als Referenzgen (Dietrich et al., 2013; Dietrich et al., 2023; Jung et al., 2019; Schröck et al., 2017). Die Zielregionen des Assays waren Chromosom 3:158.103.550 – 158.103.661 (*SHOX2*) und Chromosom 7:5.532.100 – 5.532.228 (*ACTB*; gemäß der Referenzversion GRCh38.13).

Die relative *SHOX2*-ccfDNA-Methylierung wurde, wie in vorherigen Studien bereits beschrieben, nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode berechnet (Bergheim et al., 2018; Dietrich et al., 2013; Jung et al., 2019; Schröck et al., 2017; de Vos et al., 2017). Bei Testergebnissen über einem zuvor validierten Schwellenwert von 0,25 %, wurden diese als ccfDNAm-positiv eingestuft (Jung et al., 2019; Schröck et al., 2017; de Vos et al., 2020). Werte unter 0,25 % Methylierung wurden als ccfDNAm-negativ eingestuft.

1.2.2 Patientenkollektiv

Die klinischen und molekularbiologischen Eigenschaften der palliativen und adjuvanten Behandlungskohorte sind den nachfolgenden Tabellen 1 (palliativ) und 2 (adjuvant) zu entnehmen.

Tab. 1: Klinische und molekulare Eigenschaften der palliativen Behandlungskohorte. Die Tabelle ist (modifiziert) aus Fietz et al., (2024) übernommen

Eigenschaft	Anzahl [n] (%), Median (IQR)	Median <i>SHOX2</i> - ccfDNAm [%] (IQR)	P-Wert
Alle Patienten (Gesamt)	42 (100)	1,62 (0,00 – 17,31)	n.z.
Alter (Jahre)	67 (IQR: 55 – 70)	n.z.	0,56
Geschlecht (%)			0,010
männlich	22 (52)	9,46 (0,47 – 27,59)	
weiblich	20 (48)	0,00 (0,00 – 3,74)	
AJCC-Stadium (%)			n.z.
IIIc	1 (2)	0,00 (n.z.)	
IV	41 (98)	1,71 (0,00 – 17,38)	
M-Kategorie (%)			0,12
M0	1 (2)	0,00 (n.z.)	
M1a	3 (7)	2,69 (n.z.)	
M1b	15 (36)	0,00 (0,00 – 14,64)	
M1c	9 (21)	17,24 (2,10 – 29,90)	
M1d	14 (33)	2,81 (0,30 – 16,70)	
Metastasenanzahl			0,002
< 3	18 (43)	0,00 (0,00 – 2,72)	
< 2	24 (57)	9,46 (0,81 – 20,59)	
Gehirnmetastasen			0,64
Ja	27 (64)	1,71 (0,00 – 17,52)	
Nein	15 (36)	1,53 (0,00 – 12,61)	
Mutationsstatus			0,61
<i>BRAF</i> -Mutation	16 (38)	2,81 (0,00 – 18,02)	
<i>NRAS</i> -Mutation	9 (21)	4,11 (0,00 – 57,01)	
<i>BRAF</i> - und <i>NRAS</i> -Wildtyp	17 (40)	1,34 (0,00 – 10,97)	
Krankheitsursprung			0,40
Kutan	23 (55)	1,17 (0,00 – 11,57)	
Akral	3 (7)	0,40 (n.z.)	
Melanom unbekanntem Ursprung	11 (26)	8,07 (0,00 – 52,65)	
Mucosal	4 (10)	1,35 (0,00 – 3,81)	
Uveal	1 (2)	30,30 (n.z.)	
Erst-Linien-Therapie (%)			0,40
Anti-PD-1 (Pembrolizumab)	19 (45)	0,63 (0,00 – 14,64)	
Anti-PD-1 (Nivolumab)	3 (7)	0,00 (n.z.)	
Anti-PD-1 + anti-CTLA-4 (Nivolumab + Ipilimumab)	20 (48)	6,62 (0,00 – 20,60)	
Bestmögliches Ansprechen			0,43
PD	13 (31)	2,69 (0,00 – 16,90)	
SD	12 (29)	1,41 (0,00 – 15,59)	
PR	14 (33)	6,85 (0,00 – 36,91)	
CR	3 (7)	0,00 (n.z.)	

Anmerkung: AJCC = American Joint Center on Cancer; n.z. = nicht zutreffend, p-Werte beziehen sich auf Spearman-Korrelationen, Mann-Whitney U und Kruskal-Wallis-Test.

Tab. 2: Klinische und molekulare Eigenschaften der Kohorte adjuvant behandelter Melanompatienten. Die Tabelle ist (modifiziert aus den ergänzenden Daten) aus Fietz et al., (2024) übernommen

Eigenschaften	Anzahl [n] (%), Median (IQR)
Alle Patienten	55 (100)
Alter (Jahre)	61 (IQR 51 – 69)
Geschlecht	
männlich	36 (65)
weiblich	19 (35)
AJCC-Stadium	
IIIA	8 (15)
IIIB	11 (20)
IIIC	31 (56)
IV ^s	5 (9)
Mutationsstatus	
<i>BRAF</i> Mutation	24 (44)
<i>NRAS</i> Mutation	16 (29)
<i>BRAF</i> und <i>NRAS</i> Wildtyp	15 (27)
Krankheitsursprung	
kutan	45 (82)
akral	2 (4)
Melanom unbekannten Ursprungs (engl.: MUP)	7 (13)
mukosal	1 (2)
Adjuvante Immuntherapie	
Anti-PD-1 (Pembrolizumab)	18 (33)
Anti-PD-1 (Nivolumab)	37 (67)
Lokalisation aufgetretener Metastasen	
Lymphknoten oder (Sub-)kutan-Metastasen	11 (20)
Fernmetastasen	6 (11)
zensiert (keine Metastasen)	38 (69)

Anmerkung: Resezierte (sub-)kutane (3/5); intestinale (1/5), sowie Lymphknoten- und Nebennierenmetastasen (1/5); AJCC = American Joint Center on Cancer.

1.2.3 Statistische Analyse

Alle statistischen Berechnungen im Rahmen der Studie wurden mit SPSS, Version 28.0. (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. Vorab wurden alle Variablen auf Normalverteilung geprüft. Zusammenhänge zwischen nominalen Variablen wurden mit dem Pearson- χ^2 -Test geprüft. Mittels Wilcoxon-Test (für zwei Gruppen) sowie Mann-Whitney-U-Test (für zwei Gruppen) oder Kruskal-Wallis-Test (für mehr als zwei Gruppen) wurden Mittelwertvergleiche von gepaarten und ungepaarten, nicht normalverteilten Variablen durchgeführt. Anhand des Spearman- ρ wurden Korrelationen berechnet. Zur

Untersuchung des Überlebens wurden Kaplan-Meier-Analysen und das Regressionsmodell nach Cox verwendet. Die Hazard-Ratio mit 95 %-Konfidenzintervallen (95 % CIs) wurde als das relative Risiko für Tod oder Progression angegeben. Ein p -Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. Die p -Werte beziehen sich auf den Log-Rank- und Wald-Test. Die Durchführung der Studie folgt den Richtlinien der Deklaration von Helsinki in der derzeit gültigen Fassung. Die Studie wurde der Ethikkommission der Universitätsklinik Bonn genehmigt (Nummer 301/19). Von allen Patienten liegt eine schriftliche Einwilligungserklärung vor.

1.3 Ergebnisse

1.3.1 Betrachtung der *SHOX2*-ccfDNAm-Analyse bei palliativ mit ICB behandelten Patienten

Da bereits vor Kurzem von de Vos et al. (2020) gezeigt wurde, dass *SHOX2*-Hypermethylierung in Gewebeproben von 93 % der malignen Melanome bei einer Spezifität von 90 % vorkommt, wurde die *SHOX2*-ccfDNAm bei Patienten mit metastasiertem Melanom mit der von Kontrollpatienten ohne Anhalt für eine maligne Erkrankung verglichen. Dabei wurde eine signifikante Erhöhung der Methylierung ($p < 0,001$) bei der Gruppe der Melanompatienten festgestellt. Der in vorherigen Studien etablierte Cut-off Wert ($> 0,25$ %) für *SHOX2*-ccfDNAm (Bergheim et al., 2018; Dietrich et al., 2013; Jung et al., 2019; Schröck et al., 2017; de Vos et al., 2017) wurde von 25/42 (60 %) der Patienten überschritten, jedoch lediglich von 3/126 (2 %) Patienten der Kontrollgruppe (Abb.1A). Somit ergab sich eine Spezifität von 98 % bei einer Sensitivität von 60 %.

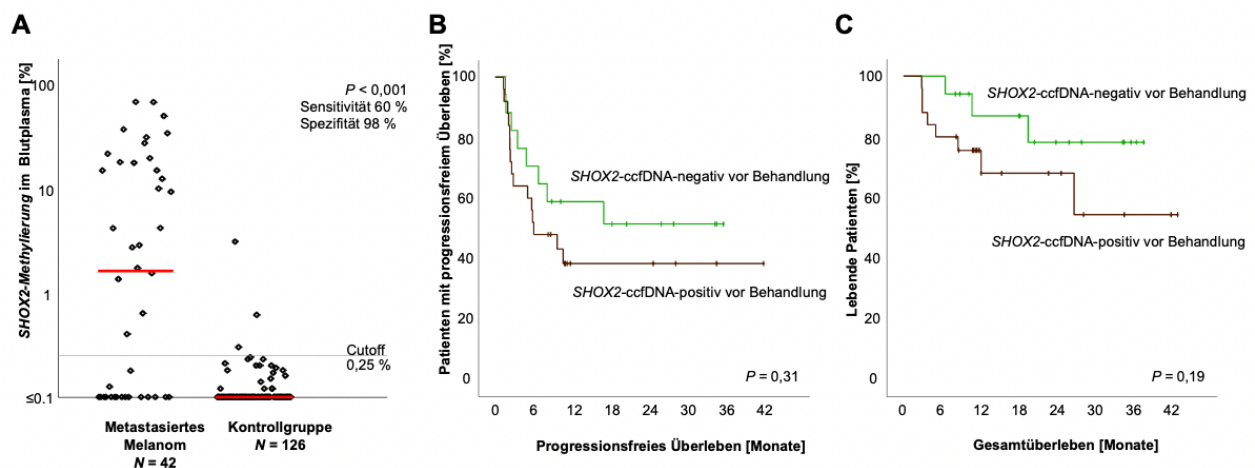


Abb. 1: *SHOX2* ccfDNAm-Spiegel und die Assoziation mit dem Überleben von Melanompatienten unter palliativer Immuntherapie. Dargestellt sind in Unterabbildung A die *SHOX2*-ccfDNAm-Spiegel im Blutplasma vor Behandlungsbeginn bei $n = 42$ Patienten mit metastasiertem Melanom, die eine palliative Anti-PD-1-Immuntherapie erhielten, im Vergleich zu $n = 126$ Kontrollpersonen ohne Anhalt für eine maligne Erkrankung. Unterabbildungen B und C zeigen Kaplan-Meier-Kurven des progressionsfreien Überlebens (B) und des Gesamtüberlebens (C) bei Patienten mit metastasiertem Melanom, unterteilt nach *SHOX2*-ccfDNAm-Positivität ($> 0,25$ %-Schwellenwert) sowie Negativität ($< 0,25$ %-Schwellenwert) vor Behandlungsbeginn. Die p -Werte beziehen sich auf den Mann-Whitney-U-Test und den Log-Rank-Test. Die Abbildung ist modifiziert aus Fietz et al., (2024) übernommen

Zur Beurteilung des prognostischen Wertes der Methylierung vor Behandlungsbeginn wurde die Gruppe der Melanompatienten in *SHOX2*-positiv und *SHOX2*-negativ unterteilt. Es ließ sich kein prognostischer Wert ableiten und der Unterschied im PFS ($p = 0,31$) und OS ($p = 0,19$) zwischen den *SHOX2*-positiven und *SHOX2*-negativen Patienten war nicht signifikant (Abb.1B und C).

Nachfolgend wurde die *SHOX2*-ccfDNAm vier Wochen nach Behandlungsbeginn untersucht. Dabei wurden Patienten über dem zuvor definierten Cut-off Wert als *SHOX2*-ccfDNAm-positiv, unter dem Schwellenwert als negativ definiert. Anschließend wurden diese auf PFS und OS miteinander verglichen. Hierbei zeigte sich ein signifikant verlängertes PFS ($p < 0,001$) und OS ($p = 0,002$) bei Patienten mit *SHOX2* ccfDNAm-Negativität (Abb.2A und B). *SHOX2*-ccfDNAm-positive Patienten zeigten ein medianes PFS von 3,5 Monaten und ein medianes OS von 26,4 Monaten.

Bei den *SHOX2*-ccfDNAm-negativen Patienten wurde weder ein medianes PFS noch OS erreicht. Sechs Monate nach Behandlungsbeginn zeigten 14/19 (74 %) der *SHOX2*-

ccfDNAm-positiven Patienten ein Fortschreiten der Krankheit. In der Gruppe der *SHOX2*-ccfDNAm-negativen Patienten zeigte sich ein solcher Verlauf bei 4/23 (17 %) Patienten. Im Betrachtungszeitraum von sechs Monaten verstarben insgesamt 5/19 (26 %) der *SHOX2*-ccfDNAm-positiven Patienten, während es in der Gruppe der *SHOX2*-ccfDNAm-negativen Patienten zu keinem Todesfall kam.

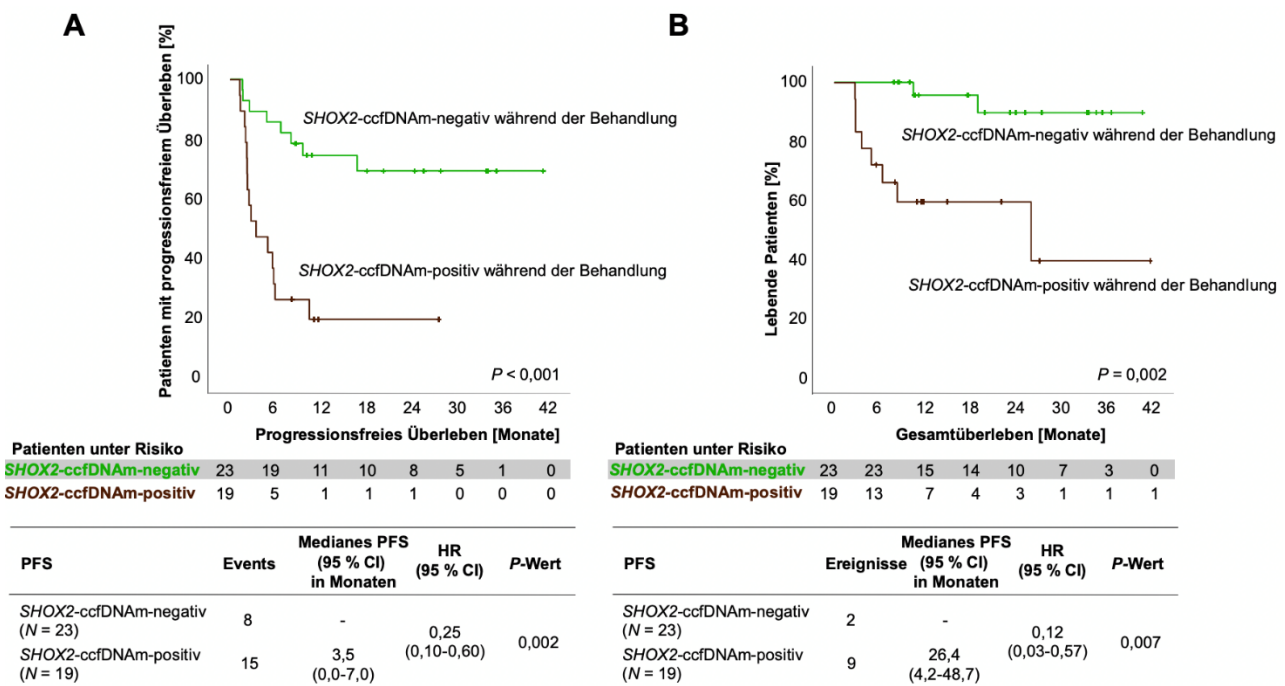


Abb. 2: Kaplan-Meier-Kurven des progressionsfreien Überlebens (A) und des Gesamtüberlebens (B) bei $n = 42$ Patienten mit metastasiertem Melanom (Stadium IIIC-IV), die eine palliative Anti-PD-1-Immuntherapie erhielten, unterteilt nach *SHOX2*-ccfDNAm-Positivität vier Wochen nach Beginn der Immuntherapie (Log-Rank-Test). *SHOX2*-ccfDNAm-Spiegel $> 0,25$ % wurden als *SHOX2*-ccfDNAm-positiv definiert. Die Abbildung ist modifiziert aus Fietz et al., (2024) übernommen

Nachfolgend wurde der Zusammenhang zwischen dem raschen Abfall von *SHOX2*-ccfDNAm und dem Therapieansprechen der Melanompatienten untersucht. Bei 17/42 (40 %) wurde ein objektives Ansprechen der Therapie (CR, PR) nachgewiesen, gemeinsam mit einem signifikanten Abfall von *SHOX2*-ccfDNAm ($p = 0,005$). Auch bei 12/42 Patienten, die weder ein Fortschreiten der Krankheit noch eine Remission (SD) zeigten, nahm die *SHOX2*-ccfDNAm signifikant ab ($p = 0,036$, Mann-Whitney-U-Test). Bei 13/42 Patienten (31 %), die ein Fortschreiten der Erkrankung (PD) zeigten, konnte jedoch keine signifikanten Veränderungen der *SHOX2*-ccfDNAm nachgewiesen werden ($p = 0,65$, Mann-Whitney-U-Test). Dies ist Abbildung 3A zu entnehmen. Darüber hinaus

wurde untersucht, ob die *SHOX2*-ccfDNAm-Bestimmung einen zeitlichen Vorteil zur präziseren Diagnosestellung eines Krankheitsfortschreitens im Vergleich zu bildgebenden Verfahren, wie beispielsweise dem CT oder MRT, bietet. Hier konnten wir bei 10/13 (77 %) der während der Behandlung *SHOX2*-ccfDNAm-positiven Patienten, die ein Fortschreiten der Erkrankung zeigten, eine *SHOX2*-ccfDNAm-Positivität mit einem im Median 1,5 Monate (IQR: 0,3 – 1,9) betragenen Zeitgewinn im Vergleich zur aktuellen klinischen Praxis nachweisen. Dies ist Abbildung 3B zu entnehmen.

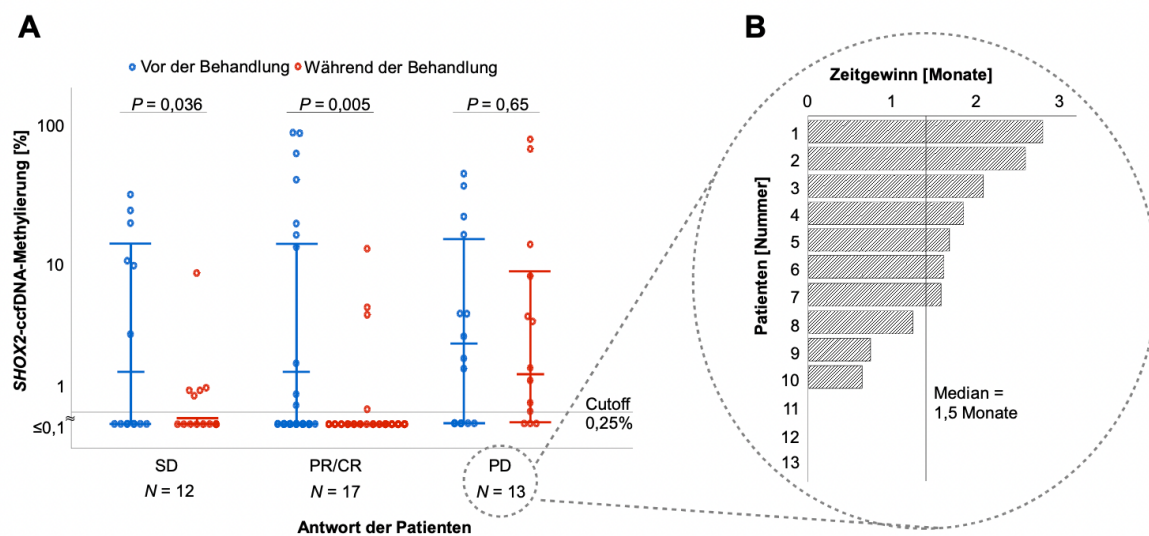
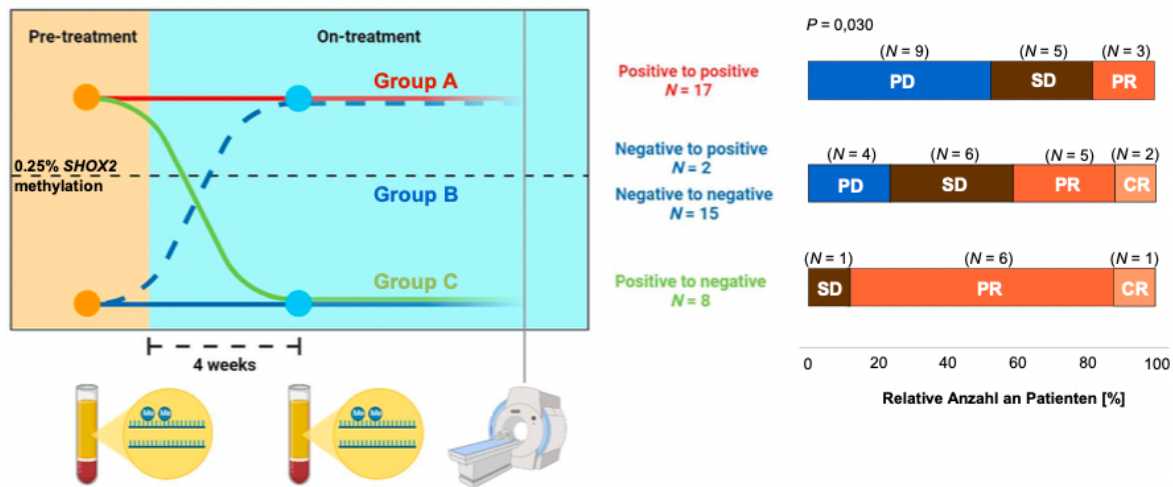
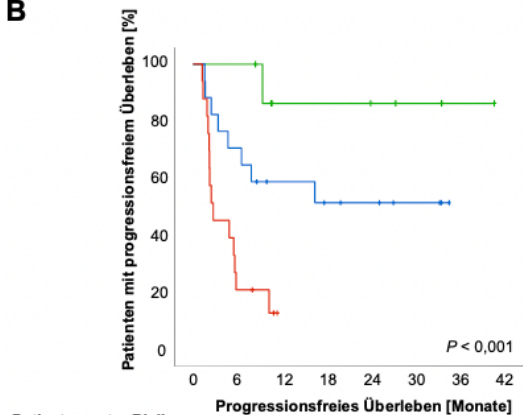


Abb. 3: Zusammenhang von *SHOX2*-ccfDNAm-Positivität vor und während der Behandlung mit dem Therapieansprechen sowie einer verkürzenden Diagnosedauer bei fortschreitendem Krankheitsverlauf. A: *SHOX2*-ccfDNAm-Spiegel vor Therapiebeginn sowie vier Wochen nach Beginn der Behandlung bei Patienten mit SD, PR und CR und PD (Wilcoxon-Test). Balken und Whisker zeigen Median und untere sowie obere Quartile. B: Zeitlicher Vorteil bei der Erkennung des Krankheitsverlaufs durch *SHOX2*-ccfDNAm im Vergleich zur etablierten klinischen Diagnostik bei Patienten mit PD ($n = 13$). Die Abbildung ist modifiziert aus Fietz et al., (2024) übernommen

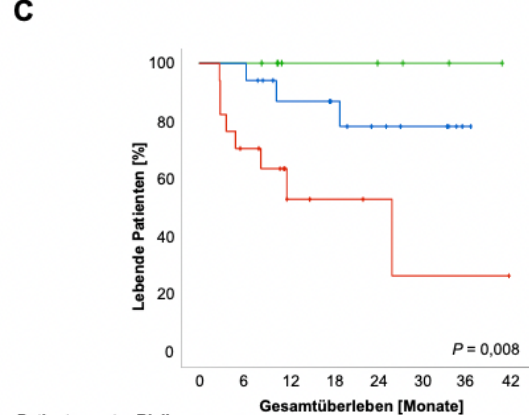
Auf Grundlage ihres *SHOX2*-ccfDNAm-Status jeweils vor und während der Behandlung wurden die Patienten wie folgt in drei Gruppen eingeteilt:

- A: Vor und unter Therapie ccfDNAm-positiv
- B: Vor der Behandlung ccfDNAm-negativ (unabhängig vom Status während der Behandlung)
- C: Vor der Behandlung ccfDNAm-positiv und unter Therapie negativ.

Wie Abbildung 4 zeigt, war die Ansprechrate auf die Therapie in Gruppe C, die einen schnellen Abfall von *SHOX2*-ccfDNAm zeigte, signifikant höher als in den anderen beiden Gruppen ($p = 0,030$, Pearson- χ^2 -Test). Hier zeigte sich ein objektives Ansprechen der Therapie bei 7/8 Patienten (88 %), verglichen mit 7/17 (41 %) Patienten in Gruppe B und 3/17 (18 %) Patienten in Gruppe A. In Gruppe A wurde darüber hinaus bei 9/17 (53 %) Patienten ein Fortschreiten der Erkrankung festgestellt, während sich ein solcher Verlauf in Gruppe B bei nur 4/17 (24 %) Patienten zeigte. In Gruppe C konnte bei allen Patienten eine Kontrolle des Fortschritts erreicht werden (SD, PR oder CR).

A**B**

PFS	Ereignisse	Medianes PFS (95% CI) in Monaten	HR (95% CI)	P-Wert
Negativ (N = 17)	8	-	0,32 (0,13-0,81)	0,016
Positiv zu negativ (N = 8)	1	-	0,072 (0,01-0,56)	0,012
Positiv zu positiv (N = 17)	14	2,8 (0,0-6,4)	-	-

C

PFS	Ereignisse	Medianes PFS (95% CI) in Monaten	HR (95% CI)	P-Wert
Negativ (N = 17)	3	-	0,22 (0,06-0,84)	0,027
Positiv zu negativ (N = 8)	0	-	0,020 (0,00-0,49)	0,20
Positiv zu positiv (N = 17)	8	26,4 (7,5-45,4)	-	-

Abb. 4: Behandlungsergebnis bei mit Anti-PD-1 behandelten Patienten mit metastasiertem Melanom in Abhängigkeit von Veränderungen der *SHOX2*-ccfDNAM. Aufgetragen ist der Zeitraum vor der Behandlung bis vier Wochen nach Behandlungsbeginn. A: Verteilung der Ansprechraten in Abhängigkeit vom Statuswechsel der *SHOX2*-ccfDNAM von vor der Behandlung bis vier Wochen nach Behandlungsbeginn (positiv zu positiv, negativ zu positiv/negativ und positiv zu negativ; Pearson's χ^2 -Test, n = 42) (Erstellt mit bioRender.com). B und C: Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie Überleben (B) und das Gesamtüberleben (C) in Abhängigkeit vom Statuswechsel der *SHOX2*-ccfDNAM von vor der Behandlung bis vier Wochen nach Behandlungsbeginn (Log-Rank-Test, n = 42). Die Abbildung ist modifiziert aus Fietz et al., (2024) übernommen

Zusätzlich wurde der Zusammenhang zwischen *SHOX2*-ccfDNAm-Abfall und PFS und OS untersucht. Differenziert zwischen den drei Gruppen zeigte sich, dass Patienten der Gruppe A mit dauerhaft positiver *SHOX2*-ccfDNAm das schlechteste, die der Gruppe B mit dauerhaft negativer *SHOX2*-ccfDNAm ein besseres und die der Gruppe der C mit einem Wechsel von Positivität zu Negativität das beste PFS ($p < 0,001$) und OS ($p = 0,008$) zeigten. Eine differenzierte Betrachtung ist Abbildung 4B zu entnehmen.

In den Gruppen B und C wurden für die primären Endpunkte das mediane Überleben nicht erreicht, während Gruppe A mit einer durchgehend positiven *SHOX2*-ccfDNAm lediglich ein medianes PFS von 2,8 Monaten (95 % CI [0,0 – 6,4]) und OS von 26,4 Monaten (95 % CI [7,5 – 45,4]) erreichen konnten.

1.3.2 Betrachtung der *SHOX2*-ccfDNAm-Analyse bei adjuvant mit ICB behandelten Patienten

Zur Bewertung der *SHOX2*-ccfDNAm-Analyse während der Nachsorge von Patienten unter adjuvanter Anti-PD-1-Therapie nach chirurgischer Tumoresektion wurden Plasmaproben von insgesamt $n = 55$ Patienten mit kutan oder lymphogen metastasiertem Melanom bzw. bei Patienten mit kurativ resezierbaren Fernmetastasen untersucht. Insgesamt blieben 38/55 der Patienten rezidivfrei, 11/55 entwickelten Lymphknoten- oder (sub-)kutane Metastasen und bei 6/55 Patienten wurden Fernmetastasen nachgewiesen. Bei allen 38/55 Patienten ohne Rezidiv blieb *SHOX2*-ccfDNAm während der Nachsorge durchgehend negativ. Bei 2/11 Patienten (18 %) mit Lymphknoten- oder (sub)kutanen Metastasen und bei 5/6 Patienten (83 %) mit Fernmetastasen zeigte sich ein *SHOX2*-ccfDNAm über dem Schwellenwert, entweder vor oder zeitgleich mit der Rezidivdiagnose durch Standard-Nachsorgeuntersuchungen. Dies ist Abbildung 5 zu entnehmen.

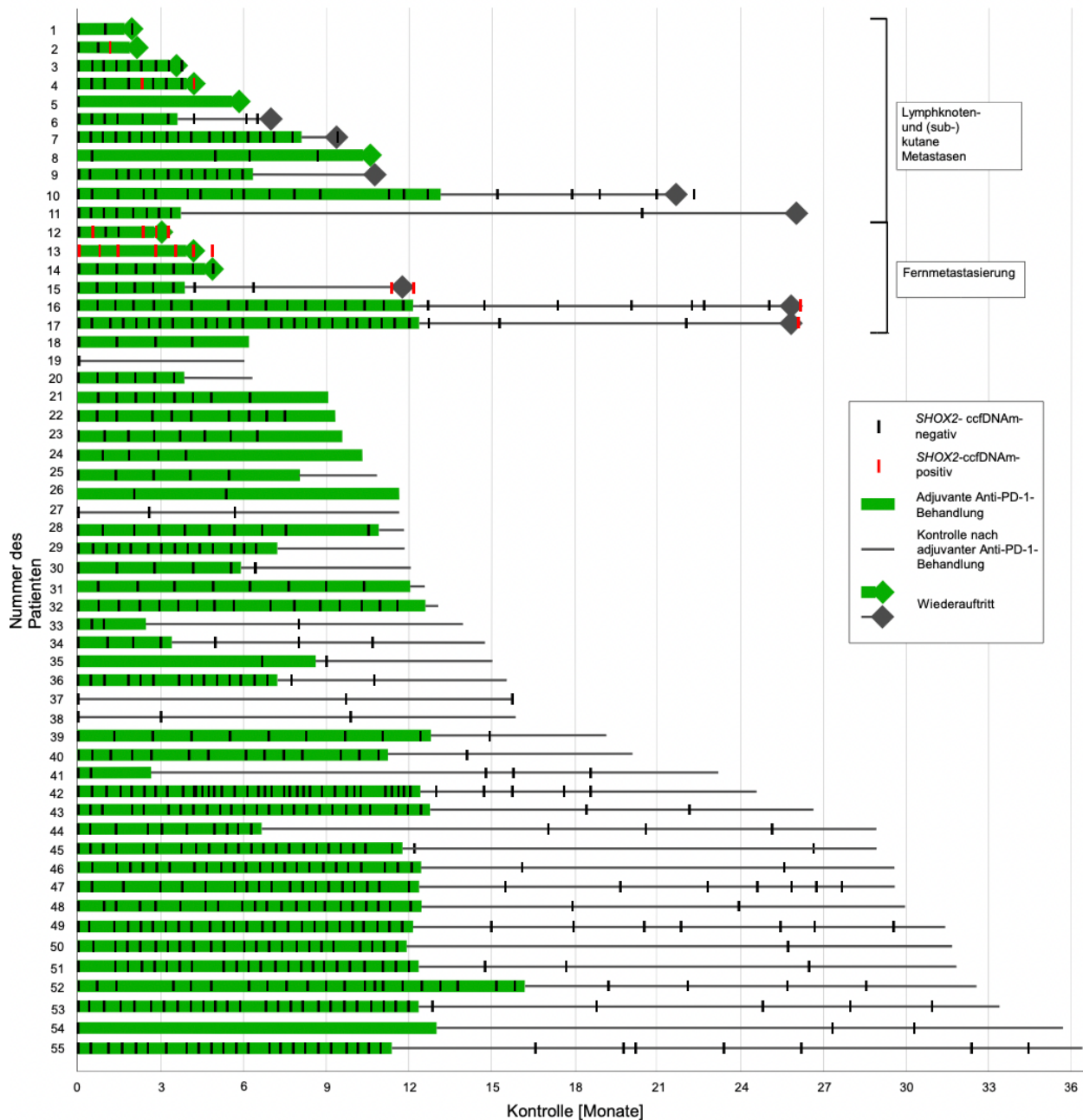


Abb. 5: *SHOX2*-ccfDNA-Methylierungsstatus bei Melanompatienten mit Rückfall oder rückfallfreiem Verlauf unter adjuvanter Anti-PD-1-Immuntherapie. Schwimmer-Plot zur Darstellung des *SHOX2*-ccfDNAm-Status während und nach adjuvanter Anti-PD-1-Therapie bei $n = 55$ Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Melanom. Die Patienten wurden anhand der Lokalisation von Metastasen gruppiert: Lymphknoten- oder (sub-)kutane Metastasen ($n = 11$), Fernmetastasen ($n = 6$) sowie kein Fortschreiten der Erkrankung ($n = 38$). Ein *SHOX2*-ccfDNAm-Wert $> 0,25\%$ wurde als positiv gewertet (rote Balken). Die Abbildung ist modifiziert aus Fietz et al., (2024) übernommen

Der einzige Patient, welcher Fernmetastasen bei negativem *SHOX2*-ccfDNAm entwickelte, wies eine isolierte Hirnmetastase auf, während 5/6 Patienten mit positiven *SHOX2*-ccfDNAm-Werten auch Metastasen in Lunge, Leber, Knochen oder an mehreren Stellen aufwiesen.

Bei 2/11 Patienten (18 %) mit Lymphknoten- oder (sub-)kutanen Metastasen sowie bei 2/6 Patienten (29 %) mit Fernmetastasen konnte eine *SHOX2*-ccfDNAm-Positivität bereits mindestens einen Monat vor der klinischen oder radiologischen Diagnose eines Tumorrezidivs detektiert werden.

1.4 Diskussion

Ziel der durchgeführten Untersuchung war es, die Dynamik der Methylierung von zellfreier zirkulierender *SHOX2* DNA bei adjuvant und palliativ mit Immuntherapie behandelten Patienten mit metastasiertem Melanom zu untersuchen und eine mögliche klinische Verwendbarkeit als prädiktiver, prognostischer sowie Monitoring-Biomarker einzuschätzen.

Eine frühzeitige und verlässliche Überwachung des Ansprechens von Tumoren auf die gewählte Therapie ist entscheidend für die weitere Therapieplanung. Traditionelle, bildgebende Verfahren weisen hierbei jedoch einige Einschränkungen auf: Zu nennen sind besonders die Strahlenexposition, Kosten, Verfügbarkeit und Schwierigkeiten der Interpretation, die vor allem am Anfang einer Behandlung auftreten (Park et al., 2020). Besonders vor diesem Hintergrund ist es sinnvoll, jene Patienten zu identifizieren, die von einer Immuntherapie profitieren, allerdings auch solche, bei denen eine frühzeitige Umstellung auf alternative Therapieoptionen sinnvoll wäre. Zu nennen sind hier etwa die zielgerichtete Therapie, die als Erstlinienbehandlung bei *BRAF*-mutierten Melanomen eingesetzt wird aber auch als Zweitlinientherapie bei Fortschreiten der Tumorerkrankung nach Anti-PD-1-Immuntherapie Anwendung findet (Knight et al., 2023).

Behandlungsstrategien, wie etwa die adoptive T-Zell-Therapie (Borch et al., 2020) oder auch die Kombination von Pembrolizumab mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Lenvatinib (Arance et al., 2023) wurden etwa im Falle einer Immuntherapie-Resistenz untersucht.

In der vorliegenden Studie wurde der prädiktive und prognostische Wert, sowie die Anwendung als Monitoring-Biomarker von *SHOX2*-ccfDNAm im Blutplasma von Patienten, die eine Anti-PD-1-Immuntherapie bei lokal fortgeschrittenem oder

metastasiertem Melanom erhielten, untersucht. Die frühzeitige Analyse von *SHOX2*-ccfDNAm nach Behandlungsbeginn ermöglichte eine Unterscheidung zwischen Patienten mit gutem Therapieansprechen und solchen mit hohem Risiko für ein schlechtes Therapieansprechen mit folgender Tumorprogression. Eine *SHOX2*-ccfDNAm-Positivität während der Behandlung war mit einem insgesamt kürzerem PFS und OS verbunden, während eine *SHOX2*-ccfDNAm-Negativität mit vierfach niedrigerem Risiko der Progression und achtfach niedrigerem Sterberisiko verbunden war. Eine im Behandlungsverlauf beobachtete Negativität der *SHOX2*-ccfDNAm bei initialer Positivität war mit einem nochmals geringeren Progressionsrisiko sowie einer höheren Überlebensrate (OS) assoziiert. Dies steht im Einklang mit den Befunden von Alshowbaki et al. (2023), die im Rahmen einer Metaanalyse von insgesamt 18 Studien die Nutzbarkeit von freizirkulierender Tumor-DNA (ctDNA) als frühen Biomarker für das Therapieansprechen bei Immuntherapie mit Checkpoint-Inhibitoren untersuchten. Acht der dabei herangezogenen Studien wurden bei Patienten mit malignem Melanom durchgeführt.

Die Befunde der Metaanalyse verweisen auf ein bei einer Reduktion der ctDNA um > 50 % dreifach geringeres Risiko für ein Progression sowie ein sechsfaches geringeres Sterberisiko. Während der Zeitpunkt der Messung nach Behandlungsbeginn in der vorliegenden Studie mit insgesamt vier Wochen eine zeitlich relativ frühe Einschätzung des Therapieansprechens erlaubt, erfolgte die erste Messung der zellfreien DNA in den 18 verglichenen Studien zudem erst nach 6 – 16 Wochen.

Die Dynamik von ctDNA bei Patienten mit stabilem Krankheitsverlauf unter ICB ist nach aktuellem Forschungsstand nur unzureichend untersucht (Alshowbaki et al., 2023). In einer Subgruppenanalyse zweier Studien mit Nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) zeigte sich jedoch ein Trend zu verlängertem PFS bei SD, wenn die ctDNA während der Behandlung mit ICB abnahm (Anagnostou et al., 2019; Goldberg et al., 2018). Analog zu diesen Befunden zeigt auch die vorliegende Untersuchung eine signifikante Verringerung von *SHOX2*-ccfDNAm bei Melanompatienten mit SD. Verglichen zu Patienten mit einer Positivität der *SHOX2*-ccfDNAm war eine Negativität der *SHOX2*-ccfDNAm während der Behandlung mit einem signifikant verbesserten PFS assoziiert. Dies zeigte sich trotz einer vergleichsweise geringen Stichprobengröße. Insgesamt unterstreichen diese Erkenntnisse damit die potenzielle Anwendbarkeit der

SHOX2-ccfDNAm als frühen Biomarker für das Ansprechen auf eine Anti-PD-1-Immuntherapie und ermöglichen damit zukünftig eventuell eine bessere Planung und Steuerbarkeit der Behandlung mit ICB beim metastasiertem Melanom.

Im Rahmen der Staging- und Nachsorgeuntersuchungen erhalten Patienten mit metastasiertem Melanom in regelmäßigen Abständen Computertomographie-Untersuchungen, die mit einer hohen Strahlenbelastung einhergehen. In Abhängigkeit von Häufigkeit und angewandter Strahlendosis kann dies mit einem erhöhten Auftreten von weiteren Tumoren assoziiert sein (Cao et al., 2022). Mithilfe der in der Untersuchung angewandten Testung von *SHOX2*-ccfDNAm konnten Patienten, die von einer ICB-Therapie profitieren, zuverlässig identifiziert werden. Insbesondere bei initial positiver *SHOX2*-ccfDNAm und im Behandlungsverlauf folgend negativer *SHOX2*-ccfDNAm zeigten die Patienten in jedem der untersuchten Fälle ein sehr gutes Ansprechen. Die Anwendung von *SHOX2*-ccfDNAm als prädiktiver und prognostischer Biomarker kann in der Folge eine Verlängerung des Abstandes zwischen strahlenintensiven, bildgebenden Verfahren im Rahmen der Nachsorgeuntersuchungen ermöglichen. Somit ist eine Reduktion schädlicher Strahlenexposition denkbar.

Im Rahmen der adjuvanten Behandlung mit einer Anti-PD-1-Immuntherapie zeigte *SHOX2*-ccfDNAm eine geringere klinische Aussagekraft, jedoch konnte das seltene Auftreten von Fernmetastasen detektiert werden. Alle Patienten, die ohne Metastasierung blieben und auch die meisten Patienten mit (sub-)kutanen oder Lymphknoten-Metastasen, zeigten negative *SHOX2*-ccfDNAm-Spiegel im Behandlungsverlauf. Dennoch ist die Analyse von *SHOX2*-ccfDNAm im Patientenblut im Zusammenspiel mit einer Kombination aus körperlicher Untersuchung und Ultraschall, welche die höchste Sensitivität und Spezifität zur Detektion von Lymphknoten- und kutanen Metastasen aufweist (Xing, 2011), zur Verlängerung der Staging-Intervalle denkbar.

Ein bisher regelmäßig angewandter und für das metastasierte Melanom etablierter Tumormarker ist die Lactatdehydrogenase, welcher jedoch nicht besonders zuverlässig für die Vorhersage des Therapieansprechens genutzt werden kann. Untersuchungen von Gershenwald et al. (2017) zu Folge ist dies auf eine mangelnde Sensitivität sowie eine geringe Spezifität zurückzuführen.

Im Falle von *BRAF*- und *NRAS*-mutierten Melanomen haben sich spezifische Mutationen dieser Gene, wie *BRAF*^{V600} und *NRAS*^{Q61}, in ctDNA als vielversprechende Biomarker

erwiesen (Seyda et al., 2021; Xi et al., 2016). Für *BRAF*- und *NRAS*-Wildtyp-Melanome, welche etwa ein Drittel aller Melanom-Fälle ausmachen, sind diese jedoch nicht anwendbar. Somit könnte der im Rahmen der Studie untersuchte Biomarker *SHOX2*-ccfDNAm eine Möglichkeit darstellen, mutationsunabhängig ctDNA zu detektieren. Weiterführende Untersuchungen sind hier notwendig, um Methylierung und Mutationsanalysen als Biomarker zu vergleichen und potenzielle, synergistische Effekte zu eruieren.

Untersuchungen von de Vos et al. (2020) zeigten, dass die kombinierte Analyse der Methylierung von *SHOX2*- sowie *SEPT9*- (*Septin-9*, ein weiterer Methylierungsmarker) ccfDNA vielversprechendes Potenzial für die Überwachung des Therapieansprechens bei Patienten mit soliden Tumoren oder Lymphomen bietet. Des Weiteren könnte die Kombination von *SHOX2*-ccfDNAm mit weiteren Methylierungsbiomarkern (z.B. *RASSF1*) und Mutationsanalysen die klinische Nutzbarkeit weiter verbessern.

In Verbindung mit körperlicher Untersuchung, Ultraschall und folgender Bildgebung könnte *SHOX2*-ccfDNAm zu einer Verbesserung von Spezifität und Sensitivität bei der Kontrolle des Krankheitsverlaufes von mit ICB behandelten Melanompatienten führen. Eine erneute Testung positiver Proben sollte insbesondere bei adjuvant behandelten Patienten diskutiert werden, um das Risiko falsch-positiver Proben zu minimieren.

Das prädiktive Potenzial weiterer Biomarker, darunter das kalziumbindende Protein S100B, Tumormutationslast, die Zusammensetzung der Darmflora, T-Zell-Infiltrationsmuster, *CTLA4*-Promotermethylierung, PD-L1-Expression oder Interferon- γ -Signaturen, wurde in bisherigen Studien bereits untersucht (Baltussen et al., 2021; Fietz et al., 2021). Groß angelegte Studien zur Validierung und Bestätigung der prädiktiven Aussagekraft fehlen jedoch nach aktuellem Forschungsstand (Baltussen et al., 2021; Fietz et al., 2021).

In einer Studie von Forschner et al. (2019) wurde bei 35 Melanompatienten die Tumormutationslast, sowohl einzeln und in Kombination mit ctDNA-Spiegeln im Blutplasma, untersucht. Ihre Ergebnisse zeigten, dass die kombinierte Analyse beider Biomarker zu einem zusätzlichen prognostischen und prädiktiven Informationsgewinn führte. Demzufolge könnte besonders die Kombination eines blutbasierten mit einem gewebebasierten Biomarker vorteilhaft sein. Hierbei ist denkbar, dass durch gewebebasierte Biomarker eine prätherapeutische Auswahl geeigneter Patienten

getroffen werden kann, sodass im Verlauf anhand von blutbasierten Biomarkern diejenigen Patienten identifiziert werden könnten, die von der Fortführung einer solchen Therapie profitieren. Ausgehend von diesen Überlegungen lässt sich ein potenziell synergistischer Nutzen von *SHOX2*-ccfDNAm in Kombination mit anderen vielversprechenden Biomarkern ableiten. In weiteren Untersuchungen sollte durch Funktionsanalysen allerdings noch eruiert werden, ob *SHOX2*-ccfDNAm lediglich einen Surrogat-Parameter für die Tumormasse beim Melanom darstellt oder ob die Methylierung von *SHOX2* im Melanomgewebe mechanistisch mit dem Ansprechen auf ICB assoziiert ist.

Zudem könnte *SHOX2*-ccfDNAm als Biomarker für weitere Tumorentitäten genutzt werden. So konnten etwa Büttner et al. (2024) eine Anwendbarkeit von *SHOX2*-ccfDNAm als Monitoring-Biomarker beim Prostatakarzinom zeigen. Anzumerken ist hier jedoch, dass die Gesamtstichprobe mit $n = 11$ gering ausfällt. Auch wenn Jung et al. (2018) und Schmidt et al. (2015) in vorherigen Studien die Wiederholbarkeit, Präzision und Genauigkeit von ccfDNA-Methylierungstests nachweisen konnten, sind vor der klinischen Implementierung von *SHOX2*-ccfDNAm als Biomarker jedoch insgesamt betrachtet weitere Studien notwendig, um die Reproduzierbarkeit in anderen Laboren zu untersuchen.

Insgesamt zeigt sich, dass eine Reduktion von *SHOX2*-ccfDNAm im Blutplasma von Patienten mit metastasiertem Melanom, die eine Anti-PD-1-Immuntherapie erhalten, mit einem guten Ansprechen auf ICB und einer verbesserten Überlebensprognose einhergeht. Mit Hilfe des Biomarkers *SHOX2*-ccfDNAm könnte die Therapie beim metastasierten Melanom zukünftig bereits frühzeitig sinnvoll angepasst, weitergeführt oder deeskaliert werden. Besonders im Falle der adjuvanten ICB könnte eine Testung der *SHOX2*-ccfDNAm eine Verlängerung der Intervalle zwischen strahlenintensiven Kontrolluntersuchungen erlauben.

Insgesamt sind weitere Studien erforderlich, um eine differenzierte Betrachtung der klinischen Anwendbarkeit des Biomarkers *SHOX2*-ccfDNAm zu ermöglichen und das Potenzial, Therapieentscheidungen zu unterstützen, fundiert zu belegen.

1.5 Zusammenfassung

Die Behandlung des metastasierten Melanoms hat mit der Einführung der Immuntherapie mittels Immuncheckpoint-Inhibitoren eine sehr wirkungsvolle Option dazugewonnen. Dennoch zeigt ein erheblicher Anteil der Tumoren initial kein Therapieansprechen oder entwickelt im zeitlichen Verlauf eine Resistenz. Um das Patientenkollektiv zu identifizieren, das von einer solchen Therapie profitiert, kann ein wenig invasiver Biomarker entscheidende Informationen zur individualisierten Entscheidungshilfe mit Blick auf die weitere Therapie liefern. Eine engmaschige, strahlenintensive Überwachung im Krankheitsverlauf könnte in der Folge reduziert werden.

Dafür wurden in der vorliegenden Studie die Methylierungsspiegel von freizirkulierender zellfreier *SHOX2* DNA (*SHOX2*-ccfDNAm) mittels quantitativer methylierungsspezifischer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bei palliativ (n = 42) und adjuvant (n = 55) mit Anti-PD-1-Immuntherapie behandelten Patienten mit metastasiertem Melanom untersucht. Zusätzlich wurden die Daten einer Gruppe mit n = 126 Kontrollpatienten ohne Anhalt für eine maligne Erkrankung analysiert. Dafür wurde mittels eines in der der Literatur bereits validierter Schwellenwerts von 0,25 % für *SHOX2*-ccfDNAm in positiv und negativ unterschieden und die Werte für die palliative Kohorte vor Start der Behandlung und vier Wochen nach Start im Hinblick auf progressionsfreies Überleben (PFS) und Gesamtüberleben (OS) untersucht. Für die adjuvante Kohorte wurde die Entwicklung von *SHOX2*-ccfDNAm über einen Zeitraum von im Median 15,6 Monaten im Hinblick auf einen radiologisch bestätigten Rückfall der Erkrankung betrachtet.

Es zeigte sich, dass bei 25/42 (60 %) der palliativ behandelten Patienten vor Therapiestart erhöhte *SHOX2*-ccfDNAm-Werte vorlagen, während 123/126 (98 %) der Kontrollpatienten *SHOX2*-ccfDNAm-negative Werte zeigten. Eine *SHOX2*-ccfDNAm-Negativität vier Wochen nach Behandlungsbeginn war mit einem guten Therapieansprechen verbunden, insbesondere bei bestehender *SHOX2*-ccfDNAm-Positivität zu Behandlungsbeginn. Der initiale *SHOX2*-ccfDNAm-Status allein zeigte jedoch keine signifikante Korrelation mit dem PFS oder OS. Bei der Analyse des Krankheitsverlaufes in der adjuvanten Kohorte konnte bei einem Großteil der Patienten mit nachgewiesener Fernmetastasierung ein positiver *SHOX2*-ccfDNAm-Wert entweder zeitgleich oder vor klinischer Diagnostik der Fernmetastasen nachgewiesen werden. Somit lässt sich feststellen, dass mit Hilfe des Biomarkers *SHOX2*-ccfDNAm die

Vorhersage des Ansprechens auf eine Anti-PD-1-Immuntherapie bei metastasiertem Melanom verbessert werden kann. So könnten von der Immuntherapie profitierende Patienten schnell identifiziert werden. Zudem könnten insbesondere in der adjuvanten Behandlung die Intervalle von strahlenintensiven Nachuntersuchungen verlängert werden. Weitere Studien sind notwendig, um sowohl die klinische Anwendbarkeit als auch die mögliche Kombinierbarkeit mit anderen Biomarkern zu analysieren.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Al-Showbaki L, Wilson B, Tamimi F, Molto C, Mittal A, Cescon DW, Amir E. Changes in circulating tumor DNA and outcomes in solid tumors treated with immune checkpoint inhibitors: a systematic review. *J Immunother Cancer*. 2023; 11: e005854

Anagnostou V, Forde PM, White JR, ..., Velculescu VE. Dynamics of tumor and immune responses during immune checkpoint blockade in non–small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2019; 79: 1214–1225

Arance A, de la Cruz-Merino L, Petrella TM, ..., Long GV. Phase II LEAP-004 Study of Lenvatinib Plus Pembrolizumab for Melanoma with Confirmed Progression on a Programmed Cell Death Protein-1 or Programmed Death Ligand 1 Inhibitor Given as Monotherapy or in Combination. *J Clin Oncol*. 2023; 41: 75-85

Baltussen JC, Welters MJP, Verdegaal EME, Kapiteijn E, Schrader AMR, Slingerland M, Liefers G-J, van der Burg SH, Portielje JEA, de Glas NA. Predictive biomarkers for outcomes of immune checkpoint inhibitors (ICIs) in melanoma: a systematic review. *Cancers (Basel)*. 2021; 13: 6366

Bergheim J, Semaan A, Gevensleben H, ..., Dietrich D. Potential of quantitative SEPT9 and SHOX2 methylation in plasmatic circulating cell-free DNA as auxiliary staging parameter in colorectal cancer: a prospective observational cohort study. *Br J Cancer*. 2018; 118: 1217-1228

Borch TH, Andersen R, Ellebaek E, Met Ö, Donia M, Svane IM. Future role for adoptive T-cell therapy in checkpoint inhibitor-resistant metastatic melanoma. *J Immunother Cancer*. 2020; 8: e000668

Büttner T, Dietrich D, Zarbl R, Klümper N, Ellinger J, Krausewitz P, Ritter M. Feasibility of Monitoring Response to Metastatic Prostate Cancer Treatment with a Methylation-Based Circulating Tumor DNA Approach. *Cancers*. 2024; 16: 482

Cao C-F, Ma K-L, Shan H, Liu T-F, Zhao S-Q, Wan Y, Zhang-Jun, Wang H-Q. CT scans and cancer risks: a systematic review and dose-response meta-analysis. *BMC Cancer*. 2022; 22: 1238

Chauvin J-M, Zarour HM. TIGIT in cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer*. 2020; 8: e000957

Cobb J, Dierich A, Huss-Garcia Y, Duboule D. A mouse model for human short-stature syndromes identifies *Shox2* as an upstream regulator of *Runx2* during longbone development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103: 4511-4515

de Vos L, Gevensleben H, Schröck A, ..., Dietrich D. Comparison of quantification algorithms for circulating cell-free DNA methylation biomarkers in blood plasma from cancer patients. *Clin Epigenetics*. 2017; 9: 125

de Vos L, Jung M, Koerber R-M, Dietrich D. Treatment response monitoring in patients with advanced malignancies using cell-free *SHOX2* and *SEPT9* DNA methylation in blood: an observational prospective study. *J Mol Diagn*. 2020; 22: 920-933

Dietrich D, Jung M, Puetzer S, ..., Kristiansen G. Diagnostic and prognostic value of *SHOX2* and *SEPT9* DNA methylation and cytology in benign, paramalignant and malignant pleural effusions. *PLoS One*. 2013; 8: e84225

Dietrich D, Weider S, de Vos L, ..., Franzen A. Circulating cellfree SEPT9 DNA methylation in blood is a biomarker for minimal residual disease detection in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Clin Chem*. 2023; 69: 1050–1061

Fietz S, Diekmann E, de Vos, L, Zarbl R, Hunecke A, Glosch A K, ... & Dietrich D. Circulating cell-free SHOX2 DNA methylation is a predictive, prognostic, and monitoring biomarker in adjuvant and palliative anti-PD-1-treated melanoma. *Clinical Chemistry*. 2024; 70: 516-527

Fietz S, Zarbl R, Niebel D,..., Dietrich D. CTLA4 promoter methylation predicts response and progression-free survival in stage IV melanoma treated with anti-CTLA-4 immunotherapy (ipilimumab). *Cancer Immunol Immunother* 2021; 70: 1781-1788

Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services, Veröffentlichung der Zulassung des Epi proColon Tests, https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf13/p130001c.pdf (Zugriffsdatum: 18.01.2025)

Forschner A, Battke F, Hadaschik D, ..., Biskup S. Tumor mutation burden and circulating tumor DNA in combined CTLA-4 and PD-1 antibody therapy in metastatic melanoma—results of a prospective biomarker study. *J Immunother Cancer* 2019; 7: 180

Garbe C, Amaral T, Peris K, ..., Lorigan P. European Dermatology Forum (EDF), the European Association of Dermato-Oncology (EADO), and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). European consensus-based interdisciplinary guideline for melanoma. Part 1: Diagnostics: Update 2022. *Eur J Cancer*. 2022 Jul;170:236-255. doi: 10.1016/j.ejca.2022.03.008. Epub 2022 May 12. PMID: 35570085.

Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, ..., Thompson MD. Melanoma staging: evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*. 2017; 67: 472-492

Goldberg SB, Narayan A, Kole AJ, ..., Patel AA. Early assessment of lung cancer immunotherapy response via circulating tumor DNA. *Clin Cancer Res.* 2018; 24: 1872-1880

Hoon DS, Spugnardi M, Kuo C, Huang SK, Morton DL, Taback B. Profiling epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in tumors and plasma from cutaneous melanoma patients. *Oncogene.* 2004; 23: 4014–4022

Huynh K, Hoon DS. Liquid biopsies for assessing metastatic melanoma progression. *Crit Rev Oncog.* 2016; 21: 141-154

Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell.* 2007; 128: 683–692

Jung M, Ellinger J, Gevensleben H, Syring I, ..., Dietrich D. Cell-free SHOX2 DNA methylation in blood as a molecular staging parameter for risk stratification in renal cell carcinoma patients: a prospective observational cohort study. *Clin Chem.* 2019; 65: 559-568

Jung M, Kristiansen G, Dietrich D. DNA methylation analysis of free-circulating DNA in body fluids. *Methods Mol Biol.* 2018; 1708: 621-641

Kneip C, Schmidt B, Seegebarth A, Weickmann S, Fleischhacker M, Liebenberg V, Field JK, Dietrich D. SHOX2 DNA methylation is a biomarker for the diagnosis of lung cancer in plasma. *J Thorac Oncol.* 2011; 6: 1632-1638

Knight A, Karapetyan L, Kirkwood JM. Immunotherapy in Melanoma: Recent Advances and Future Directions. *Cancers (Basel).* 2023; 15: 1106

Kreft S, Glutsch V, Zaremba A, ..., Schilling B. MAPKinase inhibition after failure of immune checkpoint blockade in patients with advanced melanoma—an evaluation of the multicenter prospective skin cancer registry ADOREG. *Eur J Cancer.* 2022; 167: 32–41

Lee JH, Long GV, Menzies AM, ..., Valey, AHR. Association between circulating tumor DNA and pseudoprogression in patients with metastatic melanoma treated with anti-programmed cell death 1 antibodies. *JAMA Oncol.* 2018; 4: 717–721

Michel L, Totzeck M, Lehmann L. et al. Emerging role of immune checkpoint inhibitors and their relevance for the cardiovascular system. *Herz.* 2020; 45: 645-651

Mori T, O'Day SJ, Umetani N, ..., Hoon, DSB. Predictive utility of circulating methylated DNA in serum of melanoma patients receiving biochemotherapy. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 9351–9358

Park HJ, Kim KW, Pyo J, Suh CH, Yoon S, Hatabu H, Nishino M. Incidence of pseudoprogression during immune checkpoint inhibitor therapy for solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Radiology.* 2020; 297: 87–96

Salvianti F, Pinzani P, Verderio P, Ciniselli CM, Massi D, De Giorgi V, Grazzini M, Pazzagli M, Orlando C. Multiparametric analysis of cell-free DNA in melanoma patients. *PLoS One.* 2012; 7: e49843

Schmidt B, Beyer J, Dietrich D, Bork I, Liebenberg V, Fleischhacker M. Quantification of cell-free mSHOX2 plasma DNA for therapy monitoring in advanced stage non-small cell (NSCLC) and small-cell lung cancer (SCLC) patients. *PLoS One.* 2015; 10: e0118195

Schröck A, Leisse A, de Vos L, ..., Dietrich D. Free-circulating methylated DNA in blood for diagnosis, staging, prognosis, and monitoring of head and neck squamous cell carcinoma patients: an observational prospective cohort study. *Clin Chem.* 2017; 63: 1288-1296

Seymour L, Bogaerts J, Perrone A, Ford R, Schwartz LH, Mandrekar S, et al. iRECIST: guidelines for response criteria for use in trials testing immunotherapeutics. *Lancet Oncol.* 2017; 18: e143–152

Silva I DP, Ahmed T, Reijers ILM, ..., Long GVL. Ipilimumab alone or ipilimumab plus anti-PD-1 therapy in patients with metastatic melanoma resistant to anti-PD-(L)1 monotherapy: a multicentre, retrospective, cohort study. *Lancet Oncol.* 2021; 22: 836-847

Stadler J-C, Belloum Y, Deitert B, ..., Pantel K. Current and future clinical applications of ctDNA in immuno-oncology. *Cancer Res.* 2022; 82: 349–358

Syeda MM, Wiggins JM, Corless BC, ..., Polsky D. Circulating tumour DNA in patients with advanced melanoma treated with dabrafenib or dabrafenib plus trametinib: a clinical validation study. *Lancet Oncol.* 2021; 22: 370–380

Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, ..., Rosenfeld N. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer.* 2017; 17: 223–238

Xi L, Pham TH-T, Payabyab EC, Sherry RM, Rosenberg SA, Raffeld M. Circulating tumor DNA as an early indicator of response to T-cell transfer immunotherapy in metastatic melanoma. *Clin Cancer Res.* 2016; 22: 5480–5486

Xia CY, Wang DY, Mason R, ..., Menzies AM. Activity of targeted therapy after failure of first-line immunotherapy in BRAF-mutant metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 2018; 36: 9532

Xing Y, Bronstein Y, Ross MI, Askew RL, Lee JE, Gershenwald JE, Royal R, Cormier JN. Contemporary diagnostic imaging modalities for the staging and surveillance of melanoma patients: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2011; 103: 129-142

2. Veröffentlichung

Dieser Publikationsdissertation liegt die folgende, unabhängig begutachtete Veröffentlichung zugrunde:

Fietz S, Diekmann E, de Vos, L, Zarbl R, Hunecke A, Glosch A K, ... & Dietrich D. Circulating cell-free SHOX2 DNA methylation is a predictive, prognostic, and monitoring biomarker in adjuvant and palliative anti-PD-1-treated melanoma. Clinical Chemistry. 2024; 70: 516-527

<https://doi.org/10.1093/clinchem/hvad230>

3. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde (HNO) unter Betreuung von PD Dr. rer. nat. Dima Dietrich durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit PD Dr. Dietrich und Dr. med. Simon Fietz, PostDoc. Sämtliche Versuche und Analysen wurden nach Einarbeitung durch PD Dr. Dietrich und Dr. Fietz von mir in Zusammenarbeit mit PD Dr. Dietrich und Dr. Fietz durchgeführt. Das zur Auswertung verwendete Datenmaterial wurde von mir in Zusammenarbeit mit PD Dr. Dietrich und Dr. Fietz generiert bzw. zusammengestellt. Die statistische Auswertung erfolgte von mir in Zusammenarbeit mit PD Dr. Dietrich und Dr. Fietz. Die Erstellung des Manuskripts für die Publikation, inkl. der Abbildungen, erfolgte von mir in Zusammenarbeit mit PD Dr. Dietrich und Dr. Fietz.

Bei der Erstellung dieser Arbeit verwendete ich ChatGPT (Version 3.5) zur Verbesserung der Lesbarkeit und Sprache des Manuskripts. Nach der Verwendung dieses Tools habe ich die entsprechenden Passagen überprüft und bearbeitet und übernehme die volle Verantwortung für den Inhalt der veröffentlichten Dissertationsschrift.

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

4. Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde in der Biomarker Group unter der Leitung von PD Dr. rer. nat. Dimo Dietrich an der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde des Universitätsklinikums Bonn angefertigt. Ich möchte allen Menschen danken, die mich bei dieser Dissertation unterstützt haben.

An vorrangiger Stelle möchte ich mich bei Herrn PD Dr. rer. nat. Dimo Dietrich für die Überlassung des Themas sowie die Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit herzlich bedanken. Ich danke ihm für seine Geduld, seine Hilfsbereitschaft, seine konstruktive Kritik, sein Fachwissen und die stets geöffnete Tür.

Mein großer Dank geht an Herrn Dr. med. Simon Fietz für die angenehme Zusammenarbeit bei der Erstellung des Papers sowie sein stets offenes Ohr.

Des Weiteren danke ich allen Mitarbeitenden der Biomarker Group für die nette Aufnahme in die Arbeitsgemeinschaft, die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft. Insbesondere möchte ich hier Frau Romina Zarbl für ihre großartige Einweisung in die Versuchsabläufe und Hilfe bei der Arbeit im Labor danken.

Ich danke meiner Partnerin Farina, die mich stets unterstützt und in allen Abschnitten meines Lebens mein Fels in der Brandung ist.

Außerdem danke ich meiner Schwester Charlotte für die stete Aufmunterung und Motivation bei der Erstellung der Dissertation.

Herzlich danken möchte ich auch meinen Eltern, ohne deren Unterstützung ich meinen Weg nicht hätte bestreiten können und auf die ich mich in jeder Lebenslage verlassen kann.