

AUS DER KLINIK FÜR HÄMATOLOGIE, ONKOLOGIE UND PALLIATIVMEDIZIN;
MEDIZINISCHE KLINIK III, UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

DIREKTOR: PROF. DR. MED. C. JUNGHANß

Chemo-Immuntherapie in einem präklinischen MLH1-*knockout* Modell

INAUGURALDISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES DOKTOR DER MEDIZIN
DER
UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

ERSTGUTACHTER: PD Dr. rer. nat. Claudia Maletzki

EINRICHTUNG: Universitätsmedizin Rostock, Abteilung für Hämatologie, Onkologie
und Palliativmedizin

ZWEITGUTACHTER: PD Dr. med. habil. Inken Hilgendorf

EINRICHTUNG: Universitätsklinikum Jena, Abteilung für Hämatologie und internistische
Onkologie

DRITTGUTACHTER: Prof. Dr. med. Sebastian Stintzing

EINRICHTUNG: Charité, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Onkologie, Onkologie
und Tumorummunologie

VORGELEGT VON

LEONIE WIEGELE, GEB. AM 07.03.1996 IN LEOBEN

AUS GRAZ

GRAZ, 01.05.2020

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00003005

Jahr der Einreichung: 2020
Jahr der Verteidigung: 2020

Publikationen

Originalarbeiten

1. Maletzki C, Wiegele L, Nassar I, Stenzel J, Junghanss C. Chemo-immunotherapy improves long-term survival in a preclinical model of MMR-D-related cancer. J Immunother Cancer. 2019 Jan 10;7(1):8.
2. Gladbach YS, Wiegele L, Hamed M, Merckenschläger AM, Fuellen G, Junghanss C, Maletzki C. Unraveling the Heterogeneous Mutational Signature of Spontaneously Developing Tumors in MLH1^{-/-} Mice. Cancers (Basel). 2019 Oct 2;11(10). pii: E1485.

Kongressbeiträge

1. Gladbach YS, Wiegele L, Hamed M, Merckenschläger AM, Fuellen G, Junghanss C, Maletzki C. Identifikation pathogenetisch relevanter Mutationen in MLH1^{-/-}-assoziierten Tumoren -eine komparative Analyse im präklinischen Modell. Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Medizinische Onkologie, Berlin, 11.-14. Oktober 2019, Vortrag

1 Inhaltsverzeichnis

1	<i>Inhaltsverzeichnis</i>	4
2	<i>Einleitung</i>	6
2.1	Mismatch-Reparatur-Defizienz	6
2.1.1	Mechanismus und Funktion des Mismatch-Reparatur-Systems	6
2.1.2	Konsequenzen der MMR-Defizienz	7
2.1.3	Mikrosatelliteninstabilität	8
2.2	Das kolorektale Karzinom	9
2.2.1	Lynch Syndrom	11
2.2.2	konstitutionelle MMR-Defizienz	14
2.3	Experimentelle <i>in vivo</i> Modelle für MMR-D-assoziierte Erkrankungen	15
2.3.1	MMR- <i>knockout</i> Modell	15
2.4	Tumorimmunologie	16
2.4.1	Abwehrmechanismen des Immunsystems	16
2.4.2	Immun-Escape-Mechanismen	18
2.4.3	Immuntherapie solider Tumoren	19
2.4.4	Chemo-Immuntherapie solider Tumoren	20
3	<i>Zielstellung</i>	22
4	<i>Material und Methoden</i>	23
4.1	Material	23
4.1.1	Laborgeräte	23
4.1.2	Verbrauchsmaterialien	24
4.1.3	Chemikalien	25
4.1.4	Antikörper	26
4.1.5	Medien, Puffer, Lösungen	27
4.1.6	Kits	27
4.1.7	Primer	27
4.1.8	Software	28
4.1.9	Zelllinien	28
4.1.10	Versuchstiere	28
4.2	Methoden	30
4.2.1	<i>In vivo</i> Untersuchungen	30
4.2.2	Zellbiologische Arbeiten	33
4.2.3	Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie	36
4.2.4	ELISpot (Enzyme-Linked Immunospot Assay)	37
4.2.5	Immunfluoreszenz-Färbung	38
4.2.6	Molekularbiologische Methoden	39
5	<i>Ergebnisse</i>	44
5.1	MLH1 Genotypisierung	44
5.2	Prophylaktische Chemo-Immuntherapie	45
5.2.1	Tumorinzidenz, Überleben und Verteilung der Tumoren	45
5.2.2	Immunmonitoring und Nachweis immunologischer Veränderungen unter Chemo-Immuntherapie	47
5.3	Therapeutische Chemo-Immuntherapie	51
5.3.1	Tumorwachstum und Überleben	52
5.3.2	Überlebenszeitanalyse	53
5.3.3	Immunmonitoring	54
5.3.4	ELISpot IFN γ -Assays	56

5.4	Veränderungen des Tumormikromilieus	57
5.4.1	Tumormikromilieu nach prophylaktischer (Chemo-) Vakzine	58
5.4.2	Tumormikromilieu nach therapeutischer (Chemo-) Vakzine	59
5.5	Nachweis von MSI im Tumorgewebe	61
5.5.1	Nachweis von MSI in nicht-kodierenden Markern zur Bestätigung der Diagnose	61
5.5.2	Detektion von MSI in kodierenden Mikrosatelliten	62
5.5.3	Identifikation neuer Marker mit potentieller Relevanz für die Tumorgenese	63
6	Diskussion	66
6.1	Gemcitabin und Cyclophosphamid als immunmodulatorisch wirksame Chemotherapeutika und deren Anwendbarkeit in Kombination mit Immuntherapie	66
6.2	Einfluss der prophylaktischen Chemo-Immuntherapie auf die Entwicklung von MLH1 ^{-/-} Tumoren und das Gesamtüberleben	70
6.3	Einfluss der therapeutischen Chemo-Immuntherapie auf Tumorwachstum und Gesamtüberleben	71
6.4	Auswirkungen der prophylaktischen und therapeutischen Chemo-Immuntherapie auf das Tumormikromilieu	72
6.5	Identifikation neuer MSI-Zielgene der murinen MLH1 ^{-/-} Tumorgenese	76
6.6	Kritische Beurteilung der Vor- und Nachteile des verwendeten MLH1 ^{-/-} Mausmodells	78
7	Zusammenfassung	81
8	Abbildungsverzeichnis	83
9	Tabellenverzeichnis	84
10	Literaturverzeichnis	85
11	Danksagung	96
12	eidesstattliche Versicherung	97
13	Anhang	98
13.1	Thesen	98
13.2	Lebenslauf	99
13.3	Abkürzungsverzeichnis	100
13.4	Antikörper	102
13.5	Primer	103

2 Einleitung

2.1 Mismatch-Reparatur-Defizienz

2.1.1 Mechanismus und Funktion des Mismatch-Reparatur-Systems

Im Laufe der Evolution haben sich in allen lebenden Organismen zahlreiche Reparaturmechanismen der DNA entwickelt, mit dem Ziel, korrektes genetisches Material zu vererben. Die Hauptfunktion des *Mismatch*-Reparatur (MMR) Systems liegt im Erkennen und Reparieren von Basenfehlpaarungen infolge von Basen-Substitutionen, sowie Nukleotid-Insertionen und -Deletionen (1). Das MMR System ist ebenfalls an Signalwegen bei DNA-Schäden, welche zum Zellzyklusarrest oder zur Apoptose führen, bei mutagenen Prozessen, wie der somatischen Hypermutation (*somatic hypermutation*), dem Klassenwechsel von Immunglobulin-Isotypen in B-Zellen (*class switch recombination*) und der Instabilität von DNA-Trinukleotid-Repeats beteiligt (2–4).

Die Existenz dieses Reparaturmechanismus wurde erstmals von Modrich und Lahue 1996 in dem Bakterium *Escherichia coli* nachgewiesen. Das *E. coli*-System beinhaltet drei „mutator“ oder „Mut“- Protein-Homodimere, MutS, MutL und MutH, welche unterschiedliche Funktionen bei den Reparaturprozessen einnehmen (5). Im menschlichen Organismus dient das humane MutS Homologus (hMSH) der Erkennung von fehlgepaarter DNA. Die prädominante Form des MutS Proteinkomplexes ist MutS α , welches aus einem Molekül hMSH2 und einem Molekül hMSH6 gebildet wird. Es dient vor allem der Erkennung von Basen-Basen Fehlpaarungen und von kurzen Nukleotid-Insertionen und -Deletionen. Der MutS β Proteinkomplex bildet sich aus je einem Molekül hMSH2 und hMSH3 und spielt bei der Erkennung von großen Nukleotid-Insertionen und -Deletionen eine Rolle (6,7). Die Proteinkomplexe MutS α und MutS β besitzen pro Molekül eine ATP-Bindungsstelle. Bei Vorliegen von ADP bindet MutS an das fehlgepaarte Basenpaar. Durch das Entstehen von ATP bildet MutS eine bewegliche Klammer (*sliding clamp*), die durch Seitwärtsbewegung den fehlerhaften Tochterstrang von der DNA-Matrize löst (8). Die Rekrutierung der Reparaturenzyme wird durch den Proteinkomplex human MutL Homologus (hMLH), bestehend aus einem hMLH1- und einem hPMS2- Protein, ausgeführt. Das, durch hMutS aktivierte, hMutL verdrängt die Polymerase und das *proliferating cell nuclear Antigen* (PCNA) vom fehlgepaarten Tochterstrang und rekrutiert anschließend Enzyme, wie die Exonuclease 1 (Exo1), die für die „*long strand excision*“ notwendig sind (9,10). Abhängig von der Lokalisation der Exzisionsstelle findet der Reparaturprozess entweder in 5'- oder in 3'- Richtung auf der DNA statt. Bei der

Reparatur in 5' Richtung werden ausschließlich MutS, Exo1 und das Replikationsprotein 1 (RPA1), welches an den Einzelstrang bindet und diesen nach Exzision der Fehlpaarung stabilisiert, benötigt. Die Reparatur in 3' Richtung benötigt zusätzlich MutL, PCNA und den Replikationsfaktor C (RFC). RFC bildet einen Komplex mit PCNA, und hilft anschließend die DNA mit PCNA zu beladen. Das PCNA wiederum ist ein Ringklemmprotein, welches die Prozessivität der Polymerase verbessert (11,12). Die Resynthese der DNA findet mittels der Polymerase δ und der DNA-Ligase statt (13) (Abb. 1).

Laut dem klassischen Modell der Replikation in Eukaryoten wird der Hauptstrang der DNA durch die Polymerase ϵ und der Tochterstrang durch die Polymerasen α und δ repliziert (14). Daraus resultiert eine Mutationsasymmetrie, welche auch bei der MMR-Defizienz (MMR-D) zu finden ist. Da das MMR-System vor allem Fehlpaarungen auf dem Tochterstrang repariert, ist folglich die Polymerase δ überwiegend an der Reparatur beteiligt. Somit kann das MMR-System zwischen Haupt- und Tochter-Strang der DNA differenzieren (15).

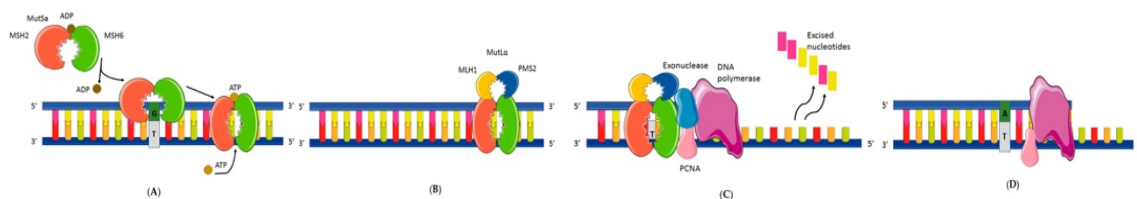


Abbildung 1 Ablauf des MMR-Mechanismus.

(A) Erkennen des Mismatch durch MutS (B) Rekrutierung der Reparaturenzyme durch MutL (C) „long strand excision“ mit Hilfe des Exonucleasekomplexes (D) Resynthese der DNA durch die DNA-Polymerase; Quelle: (190)

2.1.2 Konsequenzen der MMR-Defizienz

Das MMR-System wird durch zahlreiche Prozesse reguliert und beeinflusst. Aus der Masse an involvierten Proteinen und regulierenden Prozessen resultiert die große Bandbreite des Phänotyps, womit sich auch die Fehlerwahrscheinlichkeit erhöht (1). Genetische oder epigenetische Inaktivierungen führen zur MMR-D und damit verbunden auch zur Akkumulation von Mutationen in den betroffenen Zellen. Die am Häufigsten betroffenen MMR-Gene sind *hMLH1* und *hMSH2* (ca. 70% aller Fälle), gefolgt von *hMSH6* und *hPMS2* (16). Hierbei ist zu erwähnen, dass *hMSH6* und *hPMS2* von ihren Bindungspartnern *hMLH1* und *hMSH2* abhängig sind. Bei verringerter Expression von *hMSH2* liegt häufig auch eine verminderte Expression von *hMSH6* vor. Gleiches gilt für *hMLH1* und *hPMS2*, wobei *hMLH1* auch durch epigenetische Hypermethylierung der Promotorregion

deaktiviert werden kann. Die epigenetische Promotormethylierung von *hMLH1* ist keine Folge einer pathogenen Keimbahnmutation (= sporadisch). Heterozygote Keimbahn-Mutationen im Exon *TACSTD1*, welches für EPCAM (*epithelial cell adhesion molecule*) kodiert, führt zum epigenetischen *silencing* von *MSH2* und damit zur *MSH2*-Defizienz. Mutationen in *hMSH6* und *hPMS2* sind generell isolierte Mutationen und unabhängig von *hMLH1* und *hMSH2* (17–19). Unabhängig von der ursächlichen MMR-Mutation resultiert ein *Mutator Phänotyp*, charakterisiert durch zahlreiche spontane Mutationen in, für die Tumorgenese relevanten, Genen. Zu diesen zählen u.a. Gene der Apoptoseregulation (*BAX*), Inflammation (*Caspase-5*), Signaltransduktion (*TGFβ-RII*, *ACVR2*) sowie der Transkriptionsregulation (*TAF1B*). Die Mutationen führen zur Translation teilweise bzw. komplett funktionsloser, trunkierter Proteine, sogenannter Frameshiftproteine. Werden diese Frameshiftproteine auf der Zelloberfläche präsentiert, so können sie von Immunsystem als fremd erkannt werden (= Tumor-spezifische Antigene). Da MMR-D grundsätzlich in allen Organen auftreten kann, ist das Tumorspektrum entsprechend komplex. Aufgrund der hohen Penetranz von *MLH1*- und *MSH2*- Mutationen entwickeln sich besonders häufig kolorektale Karzinome (*colorectal cancer*; CRC). Extrakolische Malignome umfassen u.a. Endometrium-, Ovarial-, Magen-, Urothel- und Pankreas-Karzinome und sind eher, jedoch nicht ausschließlich, mit *MSH6* bzw. *PMS2* Mutationen assoziiert (20).

2.1.3 Mikrosatelliteninstabilität

DNA-Mikrosatelliten (MS) sind kurze, repetitive Nukleosidsequenzen, die sich typischerweise stetig, bis zu 100-mal wiederholen (21). MS finden sich in kodierenden und nicht-kodierenden Abschnitten der DNA. Aufgrund der sich wiederholenden Sequenz, neigen diese DNA Abschnitte zu Replikationsfehlern, die normalerweise durch das MMR-System korrigiert werden (22). Im Falle einer MMR-D kann es zu Längenveränderungen in den repetitiven Nukleotidsequenzen der DNA, einer sogenannten Mikrosatelliteninstabilität (MSI), kommen, wobei Mononukleotid-Repeats eine höhere Anfälligkeit gegenüber Mutationsereignissen aufweisen als Dinukleotid-Repeats. Zur einheitlichen Analyse von MSI wurde das *Bethesda Panel* entwickelt. Hierbei werden fünf MS-Marker untersucht, zwei Mononukleotid-Repeats (BAT26, BAT25) und drei Dinukleotid-Repeats (D2S123, D5S346, D17S250) (23,24). Die Diagnostik wird ergänzt durch den immunhistochemischen Nachweis/Ausfall einzelner MMR-Proteine. Beide Tests

sollen parallel durchgeführt werden, um die Rate an falsch negativen Testergebnissen zu minimieren. So wirken die beiden Tests synergistisch (25).

Untersuchte Tumorproben werden als MSI-High (MSI-H), MSI-Low (MSI-L) oder MS-Stabil (MSS) klassifiziert. Das Tumorgewebe wird als MSI-H bezeichnet, wenn mindestens zwei der fünf Marker, oder über 30% eines größeren Markerspektrums eine Instabilität aufweisen. Von MSI-L wird bei einem instabilen Marker gesprochen und bei Fehlen von Instabilität liegt ein MSS vor (22,26).

In der Zukunft könnte das gesamte Genom mittels Next Generation Sequencing noch effizienter und genauer auf MSI untersucht werden. Aktuell sind hierfür noch Speziallabore notwendig und die Kosten zu hoch (27).

2.2 Das kolorektale Karzinom

Das CRC ist das zweithäufigste Karzinom der Frau und das dritthäufigste Karzinom des Mannes. In Deutschland erkranken jährlich etwa 60.000 Menschen, wobei die Inzidenz in den Industrieländern wie Europa, Nordamerika und Australien deutlich höher ist, als in weniger entwickelten Ländern (28). Ebenfalls liegt ein Zusammenhang mit dem sozio-ökonomischen Status vor (29). Wesentliche Einflussgrößen für die Entstehung sind Umweltfaktoren, wie fett- und fleischreiche Ernährung, Rauchen und fehlende körperliche Betätigung, genetische Faktoren und prädisponierende Erkrankungen, wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn.

Es werden grundsätzlich drei Mechanismen der Kanzerogenese unterschieden (Abb. 2):

1. ***Suppressor Pathway*** mit chromosomaler Instabilität (60-70% aller Fälle) (30). Dabei treten Mutationen in spezifischen Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen auf, die zu Chromosomenteilungsstörungen, DNA-Reparaturdefekten oder Telomer-Funktionsstörungen führen (31).
2. ***Methylator Pathway*** mit epigenetischen Methylierungen der DNA (ca. 20% der Fälle), die auch als „*CpG island methylator phenotype*“ (=Hypermethylierung des *CpG Island*-Promotor) bezeichnet werden (32).
3. ***Mutator Pathway*** infolge von MMR-D/MSI (15% der Fälle, teilweise überlappend mit Methylator Pathway) (32).

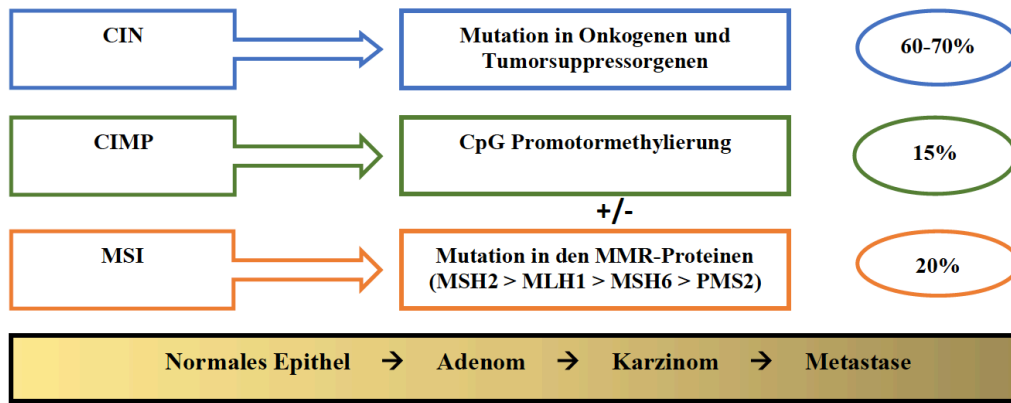


Abbildung 2 Ätiologie des CRC

Neuere Arbeiten klassifizieren das CRC nach sogenannten *Consensus Molecular Subtypes* (CMS) (Abb. 3). Hierbei werden vier Gruppen unterschieden. Zu CMS1 (14%) zählen CRC, bei denen MSI und eine starke Immunreaktion nachweisbar sind. Epitheliale Tumoren sind entweder CMS2 (37%) oder CMS3 (13%) zuzuordnen. Der Unterschied findet sich darin, dass Tumoren mit einem typischen Defekt im WNT-Signalweg und/oder in der *MYC*-Genexpression CMS2 und Tumoren mit einem metabolischen Defekt, genauer *KRAS*-Mutationen, CMS3 zugewiesen werden. CMS4 (23%) sind mesenchymale Tumoren, welche einen hohen Anteil an Stroma und eine hohe Aktivität von TGF- β und VEGF-R aufweisen (33).

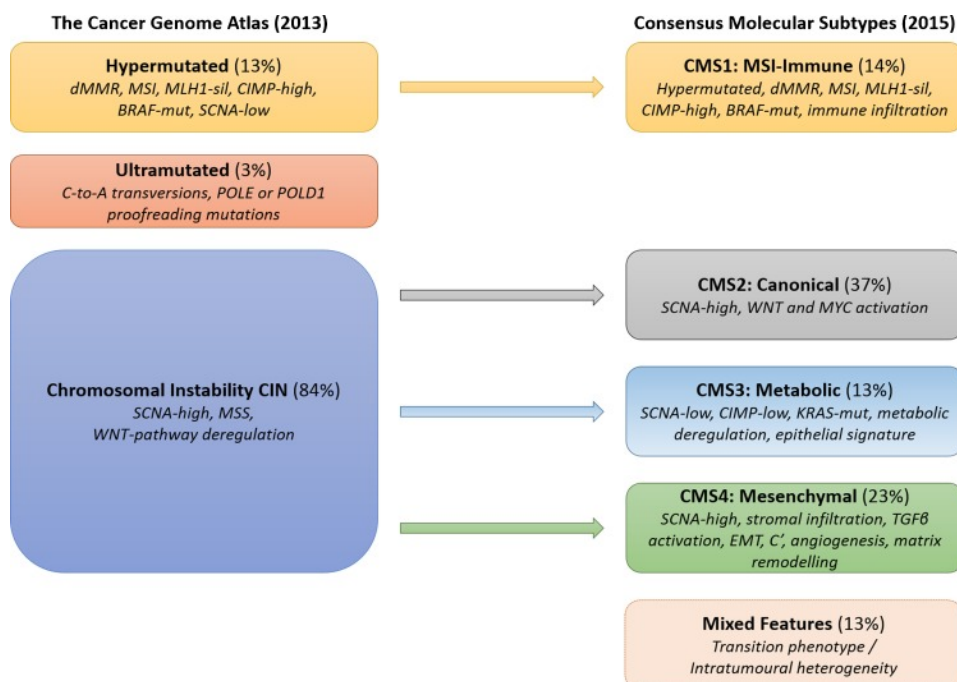


Abbildung 3 Molekulare Klassifikation des CRC.

links: Unterteilung des CRC in die drei molekularen Hauptkategorien. rechts: Unterteilung in die vier Consensus Molecular Subtypes. Quelle: (34)

In Hinblick auf die Einflussgrößen lassen sich das hereditäre CRC vom sporadischen Karzinom unterscheiden. Die Erstdiagnose nach dem 50. Lebensjahr und eine unauffällige Familienanamnese sind typisch für das sporadische CRC. Die negative Familienanamnese lässt dabei auf eine somatische Mutation schließen (35).

Bei etwa fünf bis zehn % aller CRC-Patienten liegt eine hereditäre Ursache der Erkrankung zugrunde. In den meisten Fällen handelt es sich um monogenetische Keimbahnmutationen. Zu den häufigsten hereditären Tumorsyndromen zählen die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und das Lynch Syndrom (36). Hinweisend sind die positive Familienanamnese und ein frühes Erstdiagnosealter (37).

Karzinome, die aufgrund von MMR-D entstehen, befinden sich meist in der rechten Kolonseite und weisen einen typischen histopathologischen Befund auf. Charakteristisch sind hierbei muzinöse Merkmale, ein schlecht differenziertes medulläres Wachstumsmuster und Crohn-ähnliche lymphozytäre Reaktionen (38).

Sowohl sporadische als auch hereditäre MSI-H-assoziierte Tumoren weisen eine weniger aggressive Klinik und eine bessere Prognose auf, als deren MSS Pendant (39). Durch den hypermutierten Phänotyp bei MSI-H CRC, tragen die Tumorzellen eine Vielzahl von Neoantigenen und Immuncheckpoint-Molekülen, wie beispielsweise PD-1 (*programmed cell death 1*) und PD-L1 (*programmed cell death 1 ligand 1*) auf ihrer Zelloberfläche. Dadurch kann sich der Tumor schlechter dem Immunsystem entziehen und dieser gezielt eliminiert werden (40).

Beim sporadischen und beim hereditären CRC steht die chirurgische Therapie an erster Stelle. Neoadjuvante oder adjuvante Chemo- oder Strahlentherapie können in gewissen Fällen, beispielsweise bei R1-Resektion oder Metastasierung zusätzlich eingesetzt werden. Die aktuellen Leitlinien empfehlen keine adjuvante Chemotherapie im Stadium II von MSI-H CRC durchzuführen, da in zahlreichen Studien kein besseres *Outcome* nachgewiesen wurde (41).

2.2.1 Lynch Syndrom

Dr. Warthin begann 1895 erstmals mit der Dokumentation familiär gehäuft auftretender Karzinome im Kolorektum, Magen und Uterus. Basierend auf der Forschung von Henry Lynch, etablierte sich 1971 das *cancer family syndrome* (CFS), das neben der FAP, als weiteres familiär erbliches Karzinom angesehen und 1984 von Boland in das Lynch Syndrom umbenannt wurde (20).

Das Syndrom wird autosomal dominant vererbt und basiert, wie zuvor dargelegt, auf einer Keimbahnmutation in einem der MMR-Gene. Meist vererbt durch ein Elternteil, findet sich in jeder Zelle des Körpers eine defekte und eine intakte Genkopie des betroffenen MMR-Proteins. Die intakte Genkopie kann die MMR solange aufrecht halten, bis diese ebenfalls durch eine somatische Mutation betroffen ist. In prämaligen MMR-D Zellen häufen sich dann zahlreiche defekte Genkopien an, welche nicht mehr durch die MMR korrigiert werden können, wodurch sich die maligne Entartung massiv beschleunigt (42). Typisch ist das syndromale Auftreten von kolorektalen und anderen Karzinomen, wie Endometrium-, Ovarial-, Magen-, Haut- und Urothel-Karzinomen, vor allem im frühen Alter (durchschnittlich vor dem 45. Lebensjahr). Das Lebenszeitrisiko, an einem Karzinom zu erkranken, beträgt in Abhängigkeit der zugrunde liegenden Keimbahnmutation für das Kolon 52-82%, das Endometrium 25-60%, den Magen 6-13% und das Ovar 4-12% (43). Männliche Anlageträger haben ein höheres Risiko an einem CRC zu erkranken als Frauen (42).

Lynch Syndrom-assoziierte Tumoren sind meist Adenokarzinome, welche bevorzugt in der rechten Kolonhälfte auftreten (44). Im Gegensatz zur FAP, liegen bei Patienten mit Lynch Syndrom meist nur einzelne Adenome oder Karzinome im Kolorektum vor, die sich makroskopisch nur schwer vom sporadischen Karzinom unterscheiden lassen (45,46). Daher wurden von der *International Collaborative Group* 1991 erstmals standardisierte Kriterien für die Diagnose entwickelt. Die Amsterdam-Kriterien I fokussieren sich vor allem auf die starke familiäre Häufung, das CRC und Auftreten im jungen Alter. Mit den Amsterdam-Kriterien II erweiterte sich das Spektrum auf Lynch-assoziierte maligne Neoplasien. Mit eingeschlossen sind dabei auch Patienten ohne Nachweis eines DNA-Reparatur-Defektes (24,47).

Mit der Entdeckung von MSI als molekularer Marker für die MMR-D wurden im Jahre 1997 die *Bethesda-Guidelines* entwickelt, welche 2002 revidiert und erneuert wurden. Mit Hilfe der Bethesda-Kriterien können Verdachtsdiagnosen für das Lynch Syndrom gestellt werden, ohne dass alle Kriterien erfüllt werden müssen (24,45,46,48).

Positive Amsterdam oder Bethesda Kriterien haben eine weiterführende molekularpathologische Untersuchung des Tumorgewebes zur Folge (Abb. 4). Hierbei wird das Tumorgewebe auf immunhistochemische Veränderungen der MMR-Proteine und MSI untersucht. Bei Familien mit positiven Amsterdam- oder Bethesda-Kriterien, liegt in 35% der Fälle eine MSI vor (17,44).

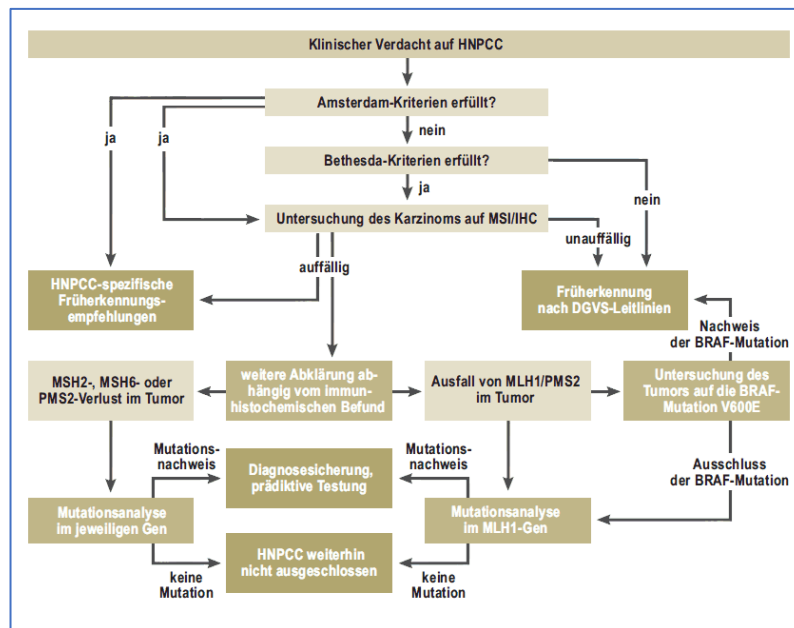


Abbildung 4 Ablauf der HNPCC-Diagnostik.

Der Leitfaden erläutert die Schritte der Diagnostik und erleichtert das Handeln bei Vorliegen eines HNPCC-Verdachts. Quelle: (44)

Lynch Syndrom Patienten haben auch nach erfolgreicher Ersttherapie des Primärtumors ein lebenslang erhöhtes Risiko, an weiteren Tumoren zu erkranken. Aus diesem Grund wurden Vor- und Nachsorgeprogramme entwickelt, die Risikopatienten zur Früherkennung dienen sollen (49).

So wird empfohlen, ab dem 25. Lebensjahr und spätestens fünf Jahre vor dem Erstdiagnosealter des betroffenen Familienangehörigen, einmal Jährlich die folgenden Untersuchungen durchführen zu lassen: körperliche Untersuchung, Abdomensonografie, Koloskopie, Gastroskopie (ab 35. Lebensjahr), gynäkologische Untersuchung mit transvaginalen Ultraschall, Endometriumbiopsie (ab 35. Lebensjahr) (44). In einigen Studien konnte bewiesen werden, dass durch regelmäßige Koloskopien in Abständen von etwa zwei bis drei Jahren, Tumoren in den frühen Stadien entdeckt und damit die Mortalität gesenkt werden kann. Das optimale Koloskopie-Intervall liegt bei ein bis zwei Jahren (49).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Lynch Syndrom Patienten häufig multiple Tumorerde im Kolorektum aufweisen. Aus diesem Grund ist bei jungen Patienten (Alter unter 45. Lebensjahr) eine subtotale Kolektomie mit Ileorektaler Anastomose als Therapieoption in Erwägung zu ziehen. Dies führt zu einem verlängerten Überleben (49). Bei weiblichen Lynch Syndrom Patienten mit abgeschlossener Familienplanung sollte auch eine prophylaktische Hysterektomie mit Adnektomie diskutiert werden (50).

2.2.2 konstitutionelle MMR-Defizienz

Im Jahre 1999 wurde die Konstitutionelle Mismatch-Reparatur-Defizienz (*constitutional MMR-D*, CMMR-D) zum ersten Mal beschrieben. Dabei handelt es sich um eine seltene biallelische Keimbahnmutation in einem MMR-Gen (51). Meist liegen die Mutationen in den MMR-Proteinen MSH6 oder PMS2, weshalb die Inzidenz innerhalb der Familie bei Verwandten ersten und zweiten Grades recht gering ist (52). Das Tumorspektrum der CMMR-D kann in vier Gruppen unterteilt werden: Hämatologische Neoplasien (akute lymphatische Leukämie, akute myeloische Leukämie, chronisch myeloische Leukämien, Non-Hodgkin-Lymphome und andere Lymphome), Hirntumoren (Medulloblastom oder Glioblastom), Lynch-Syndrom-assoziierte Neoplasien (CRC, Endometrium-Karzinom, Urothel-Karzinom) und Andere (Neurofibromatose Typ1 = NF1, Wilms-Tumor, Mamma-Karzinom, Rhabdomyosarkom, etc.). Das Tumorspektrum ist abhängig von der MMR-Keimbahnmutation. So treten bei Mutationen in *MSH2* oder *MLH1* häufiger hämatologische Neoplasien und in *MSH6* und *PMS2* vermehrt Hirntumoren auf (53). Charakteristisch ist das häufige Auftreten der Malignome bereits im frühen Kindesalter (54). Aufgrund des gemeinsamen Auftretens mit anderen Erkrankungen, wie der NF1 oder der FAP, wird die CMMR-D im klinischen Alltag häufig übersehen. Aus diesem Grund wurde ein Algorithmus entwickelt, der bei der Diagnose helfen soll. Wenn drei der folgenden klinischen Punkte vorliegen sollte an eine weiterführende Diagnostik gedacht werden (52): 1.) *Café au Lait* Flecken oder andere für die NF1 typische und/oder hypopigmentierte Hauterscheinungen 2.) Konsanguinität 3.) Lynch Syndrom-assoziierte Tumoren in der Familie 4.) sekundäre Malignome 5.) Zwillings mit Tumorerkrankungen im Kindesalter (53). Als weiterführende Diagnostik wird ein kombinierter molekular-funktioneller Test durchgeführt, bestehend aus einer *ex vivo* MSI-Analyse und einem Toleranztest. Letzterer basiert auf der Beobachtung, dass MMR-D Zellen eine höhere Toleranz gegenüber methylierenden Agenzien haben, als MMR-suffiziente Zellen. Bei Verdacht auf CMMR-D folgen die immunhistochemische Färbung der MMR-Proteine, sowie eine Keimbahn-MMR-Analyse (52).

Regelmäßiges Screening verbessert die Tumordiagnostik im frühen Stadium und damit auch die Aussicht auf vollständige chirurgische Entfernung des Tumors. Regelmäßig sollten körperliche Untersuchungen, Blutuntersuchungen inklusive Tumormarker CEA, MRT Gehirn, endoskopische Untersuchungen des GIT, endometriale Biopsien und transvaginaler Ultraschall durchgeführt werden (53,55–58).

Dennoch ist die Prognose der CMMR-D im Gegensatz zum Lynch Syndrom deutlich schlechter. Dies ist auf das komplexe Tumorspektrum und das hohe Risiko für syn- bzw. metachrone Zweit- oder Dritttumore zurückzuführen (59).

2.3 Experimentelle *in vivo* Modelle für MMR-D-assoziierte Erkrankungen

Aufgrund der großen Ähnlichkeit in Bezug auf die Phylogenetik und Physiologie zwischen Menschen und Mäusen, werden diese als Modell für die humane Biologie und Pathogenese herangezogen. Durch die Möglichkeit, genetisches Material gezielt zu beeinflussen, entwickelten sich *knockout*, *knockin* und *transgene* Modelle, wodurch sich das pathophysiologische Verständnis im menschlichen Körper verbessert hat.

2.3.1 MMR-*knockout* Modell

Um die MMR-D besser verstehen zu können, wurden zahlreiche Mausmodelle entwickelt, welche die humane Kanzerogenese darstellen. Die genaue Funktion im DNA-Reparaturprozess jedes einzelnen MMR-Proteins und die Pathogenese von MMR-D Karzinomen, konnten mithilfe der unterschiedlichen Mauslinien analysiert werden (60).

Ähnlich dem humanen MMR-System, spielen die MMR-Proteine MSH2 und MLH1, eine wichtige Rolle bei der murinen Kanzerogenese. Das Fehlen eines dieser Proteine ist mit einem starken Tumorphänotyp und einer entsprechend reduzierten Lebenserwartung in den betroffenen Tieren assoziiert. Zum Tumorspektrum zählen Karzinome im GIT, Lymphome und Hauttumoren. Zu unterscheiden ist bei den beiden Mauslinien die Fertilität. Bei den homozygot MSH2 defizienten Mäusen (MSH2^{-/-}) sind sowohl Männchen als auch Weibchen fertil. Die Sterilität beider Geschlechter bei MLH1 defizienten Mäusen (MLH1^{-/-}) lässt auf den Einfluss des MMR-Proteins MLH1 bei der Meiose schließen (61–64).

MSH6 defiziente Mäuse (MSH6^{-/-}) weisen einen ähnlichen Phänotyp wie MSH2^{-/-}-Mäuse auf. Jedoch sind ein spätes Auftreten der Karzinome und eine geringe MSI-Frequenz typisch. Im humanen System finden sich MSH6^{-/-} Tumoren fast ausschließlich bei atypischen Lynch Syndrom Patienten, welche häufig nach dem 60. Lebensjahr auftreten und ein anderes Mutationsprofil aufweisen, verbunden mit einer geringeren Frequenz MSI-spezifischer Mutationen (65).

PMS2 defiziente Mäuse (PMS2^{-/-}) haben ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Lymphomen und Sarkomen, nicht jedoch für CRC – in Analogie zu diesen Befunden, ist auch im humanen Pendant die Frequenz PMS2-assoziiierter Tumor unterrepräsentiert (64,66).

2.4 Tumorimmunologie

2.4.1 Abwehrmechanismen des Immunsystems

Die Interaktion zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem spielt eine wichtige Rolle bei der Tumorabwehr.

Das angeborene Immunsystem wirkt durch die Aktivierung von zahlreichen Effektorzellen, wie zytotoxischen T-Zellen (*cytotoxic T-Lymphocyte*, CTL), Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und Makrophagen auf den Tumor ein. Diese werden durch die vom Tumor präsentierten Antigene aktiviert (67). Im Zusammenhang mit der Kanzerogenese werden Makrophagen als Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) bezeichnet. Hierbei werden zwei Typen unterschieden. Makrophagen vom M1-Typ wirken proinflammatorisch und lysieren Tumorzellen, M2-Typ Makrophagen hingegen fördern das Tumorstadium, beispielsweise durch Stimulation von (Lymph-) Angiogenese, Proliferation und Metastasierung (68,69). M2-TAMs sezernieren IL-10 und TGF- β , welche sowohl die Aktivität von dendritischen Zellen (*dendritic cells*, DC), als auch T-Zellen hemmen (70–72). T-Zellen werden nach den Makrophagen am zweithäufigsten in Tumoren gefunden (73,74). Befinden sich ausreichend Tumorantigene auf der Oberfläche der Tumorzellen, kommt es im frühen Tumorstadium zur T-Zellaktivierung (Abb. 5). Die aktivierten T-Zellen wandern von den Lymphknoten in das Tumorgewebe und eliminieren dort die immungen Tumorzellen. CD8⁺-T-Zellen werden durch die antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APC) aktiviert und zerstören mittels Perforinen und Granzymen die Zielzellen (75). T-Helferzellen (CD4⁺-T-Helferzellen, Th1) sezernieren proinflammatorische Zytokine wie IL-2, TNF- α und IFN- γ , wodurch die antitumorale Aktivität von Makrophagen, NK-Zellen und CTL verstärkt wird (76,77). Die regulatorischen CD4⁺-T-Zellen (Treg) wiederum hemmen die Funktionen anderer Effektorzellen. Durch die Expression von Immuncheckpoint-Molekülen wie PD1/PD-L1, LAG-3 (Lymphozytenaktivierungsgen 3) oder CTLA4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4*), sowie durch Produktion von IL-10, TGF- β , Prostaglandin E2, Adenosin und Galectin-1, wirken Treg immunsuppressiv (75). Die NK-Zellen sind ein weiterer wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunantwort. Sie binden an die Oberfläche MHC-I-negativer Tumorzellen und bewirken eine Zytolyse (78,79). Weniger gut verstanden ist aktuell die Rolle der B-Lymphozyten in der Kanzerogenese, wobei vermutet wird, dass diese Entitäten-spezifisch entweder wachstumsfördernde oder -inhibierende Wirkung auf den Tumor haben (80). Die DC (=spezialisierte APC) sind ein wichtiger Brückenbildner zwischen dem

erworbenen und den angeborenen Immunsystem. Hauptfunktion ist die Präsentation von endogenen und exogenen Antigenen den naiven und Gedächtnis-T-Zellen. Abhängig von der Kostimulation und der Entzündungsreaktion im Tumor, reagieren die T-Zellen entweder mit einer Immuntoleranz oder Immunreaktion, dem Tumor gegenüber (81,82) (Abb. 5).

Eine weitere wichtige Gruppe sind die myeloiden Suppressorzellen (*myeloid-derived suppressor cells*, MDSC). Hierbei handelt es sich um eine heterogene Gruppe unreifer myeloider Zellen, zu dessen Hauptfunktion die Suppression anderer Immunzellen zählt. Die Hauptzielzellen sind die T-Lymphozyten. Hierbei findet die Suppression sowohl Antigen-spezifisch als auch unspezifisch, durch NO- und Zytokinproduktion, statt. Zu unterscheiden sind zwei Gruppen, PMN-MDSC (*polymorphonuclear*) und M-MDSC (*monocytic*). Die PMN-MDSC sind phänotypisch und morphologisch sehr ähnlich zu den neutrophilen Granulozyten und machen etwa 80% der MDSC aus. Die M-MDSC ähneln den Monozyten. Neben der Suppression, sind die MDSC auch an der Tumorprogression beteiligt. Sie fördern die Angiogenese durch Sekretion von Wachstumsfaktoren, wie VEGF oder bFGF (*basic fibroblast growth factor*) (83–86).

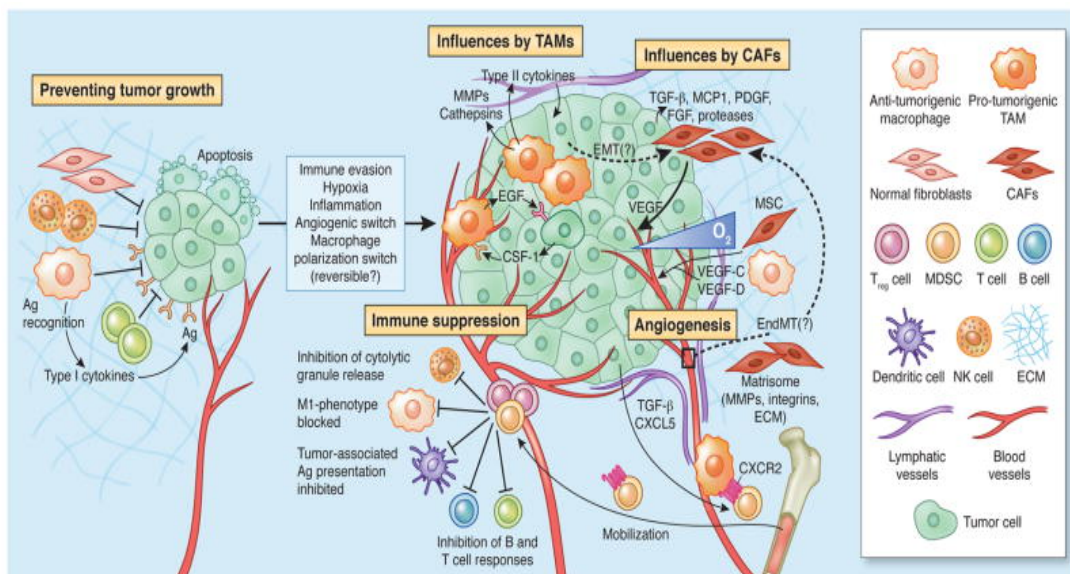


Abbildung 5 Entwicklung des Tumormikromilieus.

Bei der immun-vermittelten Tumorstillung sind Typ1-Makrophagen, sowie NK- und T-Zellen beteiligt. Sie induzieren Apoptose in den entarteten Zellen. Durch zahlreiche Mechanismen (Immunsuppression, Angiogenese, Hypoxie und Switch der Makrophagen-Subtypen) gelingt es dem Tumor, dem Immunsystem zu entkommen. Hierbei spielen die Treg und die MDSC eine wichtige Rolle, da diese die NK-Zellen, Typ1-Makrophagen, DC, T- und B-Zellantworten inhibieren. Typ2-Makrophagen (protumorigenic TAM) und Tumor-assoziierte Fibroblasten (cancer associated fibroblast, CAF) fördern durch Freisetzung von VEGF und EGF das lokale Tumorstillung und die Angiogenese im Tumor. Quelle: (87)

2.4.2 Immun-Escape-Mechanismen

Die relevante Frage ist: „Wie können die Tumorzellen dem hochkomplexen Immunsystem entkommen?“. Karzinome und Metastasen bestehen aus neoplastischen Zellen, extrazellulärer Matrix, endothelialen Zellen und infiltrierten Immunzellen, die sich zu einem komplexen Mikromilieu formieren (88).

In allen Stadien der Tumorentwicklung finden Tumor-assoziierte Entzündungsreaktionen statt, welche Ursache zahlreicher Reaktionen sind (Abb. 6). Ausgelöst werden die Entzündungen durch abnormale Funktionen des angeborenen und erworbenen Immunsystems dem Tumor gegenüber. Im frühen Stadium der Kanzerogenese werden die immunogenen Tumorzellen von den zytotoxischen Immunzellen (NK-Zellen und CTL) erkannt und zerstört. Die aggressiven Tumorzellen werden jedoch nicht angegriffen und bleiben dem Immunsystem, als Folge von Immunsuppression, verborgen (89). Durch das Fehlen von Tumorantigenen auf der Zelloberfläche können die CTL die Tumorzellen nicht erkennen und erfolgreich eliminieren (90).

Zusätzlich wird mit Hilfe der TAM und Treg versucht, die Immuntoleranz aufrecht zu erhalten (Abb. 6). TAMs und Treg inhibieren ihrerseits die Sekretion von IL-2 aus DC und inhibieren NK-Zellen sowie T-Effektorzellen (75,91).

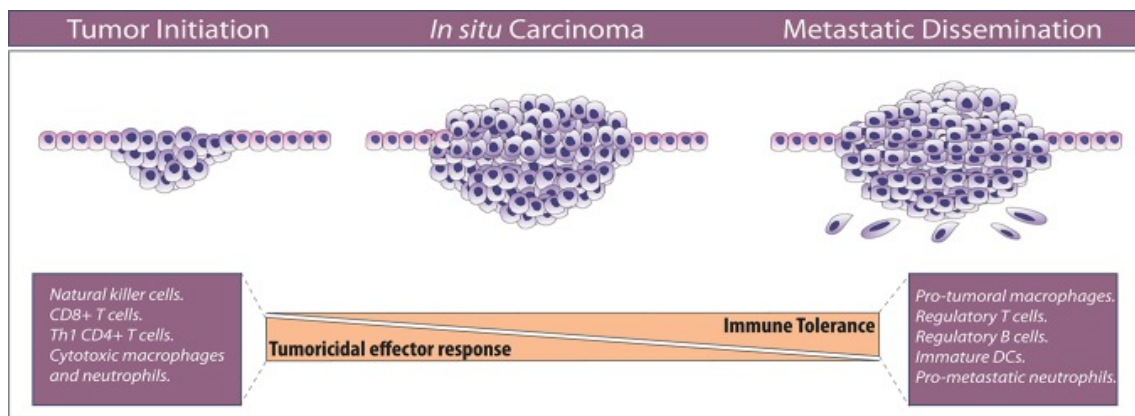


Abbildung 6 Verlauf der Tumorentwicklung und der Einfluss von Immunzellen.

Von der Tumorentwicklung bis zur Metastasierung kommt es zu einem immunologischen Wandel. Während zu Anfang die antitumoralen Effektorzellen (NK-Zellen, CD8+-T-Zellen, Th1-Zellen und Typ1-Makrophagen) dominieren, entwickelt der Tumor Escape-Mechanismen, welche in eine Immuntoleranz mündet. Beteiligt sind dabei zahlreiche Zellen. Dadurch kommt es zur unkontrollierten Proliferation und schließlich zur Metastasierung. Quelle: (75)

2.4.3 Immuntherapie solider Tumoren

Eine möglichst selektive und kurative Therapie ist Ziel bei jeder malignen Erkrankung. Bei den Standard-Therapien, wie Chirurgie, Radiatio und Chemotherapie, wird meist auch gesundes Gewebe in Mitleidenschaft gezogen. Aus diesem Grund werden immunologische Therapieansätze zunehmend präklinisch und teilweise bereits auch schon klinisch eingesetzt, mit dem Ziel, Tumorzellen gezielt zu eliminieren (92).

Zwei prinzipielle Mechanismen werden in der Immuntherapie unterschieden, die passive und die aktive Immuntherapie. Als passiv wird das direkte Applizieren spezifischer Antikörper, wie Trastuzumab (anti-HER2neu-Ak) oder Rituximab (anti-CD20-Ak), und der Transfer von CTL oder NK-Zellen bezeichnet. Die breiteste klinische Anwendung haben gegenwärtig Immuncheckpoint-Inhibitoren (z.B. anti-PD1/anti-PD-L1-Ak/anti-CTLA-4-Ak), welche innerhalb kürzester Zeit die Immuntherapie revolutioniert haben. Der Wirkmechanismus dieser monoklonalen Antikörper basiert auf der Hemmung der Rezeptor-Liganden-Bindung („*Breaking the breaks*“) zur Restoration der Immunantwort. Immuncheckpoint-Moleküle wie CTLA-4 und PD-L1 haben physiologische Funktionen beim Schutz vor Autoimmunität. Im Kontext von malignen Erkrankungen führen diese Moleküle jedoch zur Suppression antitumoraler Immunantworten. Vor diesem Hintergrund stellt die gezielte Blockade von Immuncheckpoint-Molekülen, welche sowohl auf tumor- als auch Immunzellen nachweisbar sind, einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz dar (93,94). Allerdings wirken Immuncheckpoint-Inhibitoren nur bei Tumoren, die stark mit T-Zellen infiltriert sind (sogenannte „immunologisch heiße Tumoren“). Bei geringer oder fehlender T-Zellinfiltration ist die Immuncheckpoint-Inhibitor-Therapie in der Regel wirkungslos. Hierbei stellen aktive Ansätze, wie beispielsweise Vakzinierungsstrategien eine gute Option dar. Vakzinen aktivieren die spezifische Immunantwort des Körpers und können (theoretisch) sowohl prophylaktisch, als auch therapeutisch appliziert werden. Zu unterscheiden sind Peptid-basierte und Gesamttumorlysate-Vakzinen (95).

Bei den Protein-/Peptid-Vakzinen werden Tumor-assoziierte oder –spezifische (Neo-) Antigene injiziert, welche das Immunsystem durch gesteigerte Produktion von Antikörpern und CTL stimulieren sollen. Ebenfalls zu den spezifischen Vakzinen zählen die DC-Vakzine. Hierbei werden DC verabreicht, welche Peptide, ganze Proteine oder TumormRNA/-DNA enthalten (89,96).

Gesamtumorlysate-Vakzine können aus autologem oder allogenen Tumormaterial bestehen. Der Vorteil dieses Ansatzes ist das breite Spektrum Tumor-assoziierten Antigene, welche dem Immunsystem präsentiert werden. Hierbei werden Vakzine aus Antigenen des Patienten-eigenen Tumors eingesetzt. Allogene Vakzine wiederum bestehen aus Tumor-Antigenen anderer Patienten oder Zelllinien desselben Tumors (96).

Um die Effizienz von Vakzinen zu erhöhen, können diese mit weiteren immunstimulierenden Substanzen (z.B. bakterielle/virale/synthetische Adjuvantien) oder auch bestimmten zytostatischen Substanzen (s. 2.4.4.) kombiniert werden. In der Vergangenheit wurden bereits verschiedene Kombinationsstrategien präklinisch, sowie teilweise auch klinisch validiert (96,97).

2.4.4 Chemo-Immuntherapie solider Tumoren

Durch den zytotoxischen Effekt von Chemotherapeutika auf die Tumorzellen werden vermehrt Tumor-assoziierte Antigene in den Lymphknoten eingeschwemmt. Da Chemotherapeutika jedoch nicht nur Tumorzellen, sondern auch gesunde Zellen angreifen, kommt es häufig zu Neutropenie, Lymphopenie, Thrombozytopenie und Anämie, wodurch eine Immunsuppression bedingt ist (98). Daher wurde lange Zeit von der Chemo-Immun-Kombinationstherapie abgeraten.

Die zytotoxische Wirkung der Chemotherapeutika ist häufig Folge von DNA-Schäden während des Zellzyklus. Diese umfassen u.a. DNA-Doppelstrangbrüche durch Inkorporation falscher Basen in die DNA. Dies führt zur Hemmung der Replikation und Transkription, sowie zur Induktion von Apoptose. Auch Nekrose, Autophagie, Seneszenz oder mitotische Katastrophen können ausgelöst werden, sodass zytostatische Therapien folglich verschiedene Formen von Zelltod induzieren. Der ausgelöste Zelltod kann entweder immunogen oder nicht immunogen sein. Bei erstgenanntem werden intrazelluläre Moleküle, wie das Calretikulin, High Mobility Group B1, ATP oder Nukleinsäuren an die Oberfläche transloziert oder sezerniert. Diese wirken als *Damage Associated Molecular Patterns* und werden von Phagozyten erkannt. In der Folge wird eine nicht-adaptive Immunreaktion ausgelöst. Gleichzeitig werden vermehrt Neoantigene freigesetzt, welche spezifisch das adaptive Immunsystem aktivieren. Diese können sekundär als körpereigene Vakzine wirken (97).

Ogleich die meisten Chemotherapeutika keinen immunogenen Zelltod auslösen, gibt es eine Reihe zytostatischer Substanzen, für die in der Vergangenheit immunmodulatorische Aktivitäten beschrieben wurden (97). Zu diesen zählen Taxane, Bleomycin,

Cyclophosphamid (CPX) und Doxorubicin. Darüber hinaus gibt es Evidenz für die positive Wirkung des Nukleosidanalogons Gemcitabin. Hauptindikation für Gemcitabin sind neben dem Pankreaskarzinom, auch lokal fortgeschrittene oder metastasierte nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome, Harnblasen-, Mamma- und Ovarialkarzinome (99–101). So konnte zusätzlich gezeigt werden, dass Gemcitabin das Tumorantigen-spezifische „Priming“ durch verstärkte Antigenpräsentation, T-Zellexpansion und –Infiltration fördert (98,102). Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass dieser immunstimulierende Effekt T-Zellspezifisch ist, da unter Gemcitabinbehandlung sowohl die B-Zellproliferation, als auch die Aktivität myeloider Suppressorzellen gehemmt wurde (98,103).

Somit lassen sich die indirekten Chemotherapie-assoziierte Effekte, wie folgt, zusammenfassen: Infolge der Induktion von immunogenem Zelltod werden mehr (Neo-)Antigen-spezifische T-Zellen, vor allem Th1 Zellen aktiviert. TAM sezernieren ihrerseits vermehrt IL-12 und zytotoxische Effekte gegenüber residuellen Tumorzellen werden durch aktivierte NK- und CD8⁺-Zellen ausgelöst (Abb. 7) (97,104–106). Somit können bestimmte Chemotherapeutika, je nach Applikationsart, Dosis und Intervall die Immunreaktion verstärken und additiv zur Immuntherapie wirken.

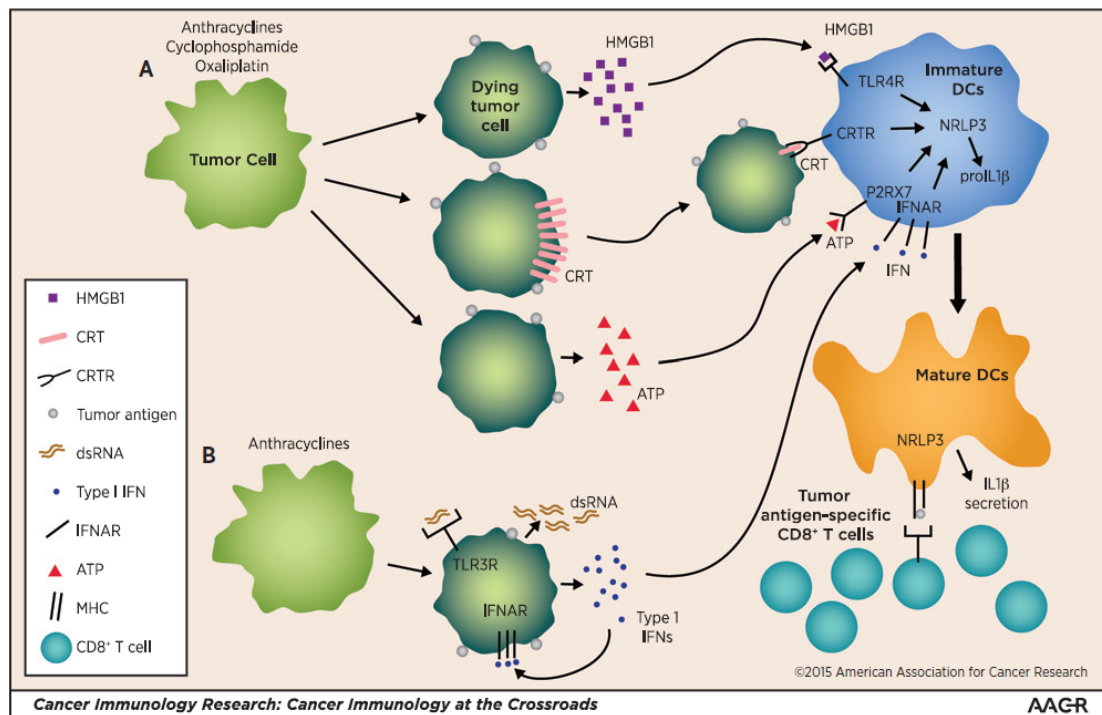


Abbildung 7: Wirkmechanismus der Chemo-Immuntherapie.

Bestimmte Zytostatika induzieren in Tumorzellen einen immunogenen Zelltod. Dies führt zur verstärkten Freisetzung Zelltod-assoziiierter Moleküle (z.B. HMGB1, Calretikulin), sowie Tumorantigenen und schließlich zur Aktivierung Antigen-spezifischer T-Zellen. Quelle:(107)

3 Zielstellung

In der vorliegenden Arbeit wurde unter Anwendung des präklinischen MLH1^{-/-} Modells die Effizienz einer kombinierten Chemo-Immuntherapie untersucht. Diese Untersuchungen basieren auf einer vorangegangenen Studie, in der ein Gesamt-Tumorlysate eines gastrointestinalen MLH1^{-/-} Tumors eingesetzt wurde. Im Rahmen dieser Vorarbeiten wurde die grundsätzliche Wirksamkeit zellulärer Vakzinen im präklinischen Modell erstmals experimentell aufgezeigt. Die repetitive Gabe des Tumorkvakzins beeinflusste sowohl die Tumorgenese (= prophylaktischer Ansatz), als auch das Tumorstachstum (= therapeutischer Ansatz) durch Stimulation bzw. Modulation des Immunsystems.

Ausgehend von diesen Arbeiten sollte der immuntherapeutische Ansatz durch Kombination mit Chemotherapeutika weiterentwickelt werden. Als Chemotherapeutika wurden Gemcitabin sowie CPX eingesetzt, dessen immunstimulierende Potenz in der Literatur belegt ist.

Hinsichtlich der prophylaktischen Gabe sollte die tumorfreie Zeit verlängert und die Tumorzinzidenz reduziert werden. Bei dem therapeutischen Ansatz standen die Verbesserung des Therapieschemas und somit auch die Überlebenszeitverlängerung durch effizientere Tumorstachstumskontrolle im Vordergrund. Das Tumorstachstum wurde anhand hochauflösender bildgebender Verfahren erfasst. Zusätzlich erfolgten longitudinale immunologisch-phänotypische, sowie funktionelle Analysen, um potentiell Therapie-assoziierte immunologische Veränderungen zu identifizieren. Das Tumormikromilieu wurde anhand immunfluoreszenzmikroskopischer Färbungen detailliert untersucht, welche dazu beitragen, den Einfluss der gewählten Therapieschemata auch auf lokaler Ebene zu erfassen. Schließlich erfolgte der molekularpathologische Nachweis von Mutationen in Zielgenen der murinen MSI-Tumorgenese, mit dem Ziel, neue Marker für weiterführende spezifische Therapieansätze zu identifizieren.

Mithilfe dieses komplexen Methodenspektrums sollte einerseits das immuntherapeutische Potential der gewählten Therapieschemata suffizient erfasst und andererseits die Grundlage für weiterführende Therapiestudien geschaffen werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Laborgeräte

Laborgeräte	Hersteller	Hauptsitz
ABI3100 Sequencer	Thermo Fisher Scientific GmbH	Waltham, USA
BD FACSTM Universal Loader	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
Brutschrank	Heraeus instruments	Hanau, Deutschland
Captair™ (Abzug)	Erlab simpler safer	Val de Reuil Cedex, Frankreich
Captair™chem (Abzug)	Erlab simpler safer	Val de Reuil Cedex, Frankreich
Eismaschine	Scotsman	Mailand, Italien
Feuchte Kammer	UMR Eigenbau	Rostock, Deutschland
Freezing Container, Nalgene® Mr. Frosty	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Gamma-Bestrahlungsanlage	Gammabestrahlungsanlage IBL 673	
Gefrierschrank -80°C	Liebherr Deutschland GmbH, Biberach Kryotec-Kryosafe GmbH	Hamburg, Deutschland
Glomax-Gerät	Promega Bio Systems Sunnyvale	Sunnyvale, USA
Isoflurananlage		
Kühlschrank (4°C) / Gefrierschrank (-20°C)	Elektrolux	Stockholm, Schweden
Kühlschrank (4°C) / Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr	Bulle FR, Schweiz
Lichtmikroskop (Nikon Eclipse TE200)	Nikon	Tokio, Japan
Mikroskop (Immunfluoreszenz)	Zeiss	Jena, Deutschland
Multistepper	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Nano Drop 1000 Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Neubauer Zählerkammer	Marienfeld	Lauda Königshofen, Deutschland
PET/CT	Siemens	München, Deutschland
Pipetboy (accu-jet pro)	Brand	Wertheim, Deutschland
Pipetten (2.5µl, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Sprout Mini-Zentrifuge	Heathrow Scientific	Vernon Hills, USA
Sterile Werkbank Hera-safe™	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA

Thermal Cycler	Bio - Rad	Hercules, USA
C1000TM		
Thermomixer Comfort	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Vortex-Gerät reax top	Heidolph	Schwabach, Deutschland
Waage MP-300	Kern	Reinach, Schweiz
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH	Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge 5418	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Rotina 35R	Hettich	Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Rotina 38R	Hettich	Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Rotina 420	Hettich	Tuttlingen, Deutschland

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller	Hauptsitz
6 well Zellkulturplatte Cel-lstarTM	Greiner bio-One	Kremsmünster, Österreich
96-Well 340µl Storage Platte (FACS-Platte)	Corning	NY, USA
96-Well ELISpot-Platten (MultiCreen Filter Plates), steril	Merck Millipore	Burlington, USA
96-Well PCR-Platte (Halbrand)	Sarstedt Ag & Co	Nümbrecht, Deutschland
96-Well Platte mit F-bottom, steril	Greiner bio-One	Kremsmünster, Österreich
96-Well Platte mit U-bottom, steril	Greiner bio-One	Kremsmünster, Österreich
Cell Strainer (100µm Poren-größe) steril	Greiner bio-One	Kremsmünster, Österreich
EASY strainerTM		
Chirurgisches Besteck-Set (chirurgische Schere, chirurgische und anatomische Pinzette)	Aesculap AG	Tuttlingen Deutschland
Combitips advanced, steril (5ml, 10ml)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Dako Pen	Dako	Glostrup, Dänemark
Deckgläser (22 x 22 mm)	iDL	Nidderau, Deutschland
Deckgläser (24 x 32 mm)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
End-to-End Kapillare 20µl K2E	Sarstedt AG & Co	Nümbrecht, Deutschland
Falcon Tube (15ml, 50ml)	Greiner bio-One	Kremsmünster, Österreich
NuncTM KryoTubeTM Vials	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Objektträger (76 x 26mm)	Engelbrecht	Edermünde, Deutschland
Pasteur Pipetten (150mm)	Assistent Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG	Sondheim vor der Rhön, Deutschland
	FischerScientific	Ontario, Kanada

Pasteur Pipetten (250mm)	Assistent Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG	Sondheim vor der Rhön, Deutschland
PCR-Reaktionstubes (Low Tube)	Fischer Scientific	Ontario, Kanada
PCR-Reaktionstubes-Deckel (flat cap)	Bio-Rad	Hercules, USA
PCR-Reaktionstubes-Deckel (flat cap)	Bio-Rad	Hercules, USA
Peha-soft nitrile fino puderfrei Einmal-Handschuh, unsteril	Paul Hartmann AG	Heidenheim, Deutschland
Pipetten	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
	Bioenzym	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Probengefäß 1,3ml K3E	Sarstedt AG & Co	Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß, braun (1,5ml)	Sarstedt Ag & Co	Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße, safe-lock tubes (1,5ml)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Serologische Pipette, steril (5ml, 10ml, 25ml, 50ml)	Greiner bio-One	Kremsmünster, Österreich
Skalpell präzisa plus, steril	Dahlhausen	Köln, Deutschland
Sterile Spritzen	Braun	Melsungen, Deutschland
Tissue-Tek Cryomold	Sakura Finetek Europe B.V.	Alphen aan den Rijn, Niederlande
U-100 Insulin-Spritzen	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg, Deutschland
Zellkulturflaschen 200ml	Greiner bio-One	Kremsmünster, Österreich

4.1.3 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller	Hauptsitz
96% Ethanol	Walter CMP	Kiel, Deutschland
Aceton	Fisher Scientific	Ontario, Kanada
Ammoniumchlorid	Merck	Darmstadt, Deutschland
Bacillol AF (Flächendesinfektionsmittel)	Hartmann	Heidenheim, Deutschland
BCIP/NBT (Western Blue Substrat for Alkaline Phosphatase)	Sigma Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Substrat-Lösung		
Bradfordreagenz	Bio-Rad	Hercules, USA
Cyclophosphamid (CPX)	ZAP UMR	Rostock, Deutschland
Roti-Mount Fluorcare DAPI Medium	Roth	Karlsruhe, Deutschland
DFS-Taq DNA Polymerase	Bioron	Römerberg, Deutschland
DMEM/Ham's F12 (1:1)	PAA	Pasching, Österreich

DMSO (dimethyl sulfoxide)	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
dNTP 10mM	Bioron	Römerberg, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	Pam-Biotech	Aidenbach, Deutschland
Gemcitabin	VEZ Universität Rostock	Rostock, Deutschland
Cyclophosphamid	Appliedbiosystems by Thermo Fisher Scientific	Woolston, UK
GeneScan™ 500 LIZ™ Size Standard	Merck	Darmstadt, Deutschland
HCl (Salzsäure)	ThermoFisher Scientific GmbH	Waltham, USA
HiDi Formamide	Biolegend	SanDiego, USA
Intracellular Straining Perm Wash Buffer	Abbvie	North Chicago, Illinois, USA
Isofluran Forene®	Walter CMP	Kiel, Deutschland
Isopropanol	Bela-pharm GmbH & Co. KG	Vechta, Deutschland
Ketamin 10%	Pan-Biotech	Aidenbach, Deutschland
L-Glutamin	JT Baker	Deventer, Niederlande
Methanol	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Deutschland
Phosphat buffered saline (pH7,4)	Bioron	Römerberg, Deutschland
Reac. Buffer for DFS-Taq, High Taq	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Roti-Mount FluorCare DAPI 15ml	Promega	Madison, USA
Streptavidin-ALP	Sakura Finetek Europe	AJ Alphen aan den Rijn, Niederlande
Tissue Tek O.C.T. Compound Containing	Bioline	Luckenwalde, Deutschland
TRISure™	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Deutschland
Trypan blau (0.02 %)	Biochrom GmbH	Berlin, Deutschland
Trypsin/EDTA (0.25%/0.02%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Deutschland
Tween		

4.1.4 Antikörper

Eine Übersicht der verwendeten Antikörper findet sich im Anhang unter Punkt 13.4.

4.1.5 Medien, Puffer, Lösungen

1 M Tris/HCl	12,1 g Tris ad 100ml Aqua dest + pH-Einstellung mit HCl auf 8,0
2 % BSA in PBS	2 g BSA in 100ml PBS
50 mM NaOH	0,2 g NaOH Plätzchen ad 100 ml Aqua dest.
70 % Ethanol	36 ml 96 % Ethanol 15 ml Aqua dest.
Erythrozyten-Lyse-Puffer	0,16 M Ammoniumchlorid + 0,17 M TRIS Verhältnis 1:10
FluoroFix™ Buffer	ready-to-use
10X Intracellular Staining Perm Wash Buffer	5 ml Buffer + 45 ml A. dest; Verhältnis 1:10
Freezing Medium	45 ml FKS (90 % final) 5 ml DMSO (10 % final)
PBS	80,00 g Natriumchlorid 2,00 g Kaliumchlorid 18,05 g Dinatriumhydrogenphosphat 2 x H ₂ O 2,00 g Kaliumhydrogenphosphat ad 1000 ml Aqua dest.
PBS-Tween	2,5 M Natriumchlorid 0,05 M Kaliumchlorid 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat-dihydrat 0,04 M Kaliumhydrogenphosphat 0,5 % v/v Tween20 Aqua dest. ad 2000 ml
Vollmedium	500 ml DMEM/Ham's F12 (1:1) 50 ml FKS (final: 10%) 6-8 ml L-Glutamin (final: 20 mM)

4.1.6 Kits

Kit	Bestandteile	Hersteller	Hauptsitz
Wizard® Genomic DNA Purification Kit	Nuclei Lysis Solution RNase Solution Precipitation Solution DNA Rehydration Solution	Promega	Woods, USA

4.1.7 Primer

Eine Übersicht der verwendeten Primer findet sich im Anhang unter Punkt 13.5.

4.1.8 Software

Software	Programm
FACS-Analyse	CellQuest software (BD Pharmingen)
Fragmentanalyse	GeneMapper v4.1
NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific
PET/CT Auswertung	Inveon Research Workplace 4.2 software
Textprogramm	Microsoft Office (Excel, Word, PowerPoint)
Statistik	Sigma-Stat 3.0

4.1.9 Zelllinien

Zelllinie	Wachstum	Ursprung	Beschreibung
MLH^{-/-} A7450 T1 M1	Adhärenz	epithelial	Allograft eines gastrointestinalen MLH1 ^{-/-} Tumors (MLH1 ^{-/-} A7450; A – Allograft, 7450 – Mausnummer, aus welcher der Tumor ursprünglich isoliert wurde)
MLH1^{-/-} 328	Adhärenz	epithelial	Zelllinie direkt aus primärem GIT etabliert
MLH1^{-/-} 1351	Suspension	lymphoid	Zelllinie ist direkt aus einem Milzlymphom etabliert
YAC-1	Suspension	lymphoid	Lymphoblasten-Zelllinie eines Maus-Lymphoms. Zielzellen für NK-Zellen

4.1.10 Versuchstiere

MLH1^{-/-}-Mausmodell

Die Tiere stammten aus eigener Zucht der Zentralen Versuchstierhaltung des Instituts für Experimentelle Chirurgie (Direktorin: Prof. Dr. med. B. Vollmar)

Die Untersuchungen erfolgten an weiblichen und männlichen homozygoten MLH1^{-/-} Mäusen (Stamm: B6.129-Mlh1^{tm1}Rak). Alle Untersuchungen wurden durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern genehmigt (AZ: 7221.3-1.1-053/12 bzw. -1-026/17). Da die homozygoten Nachkommen infertil sind, werden heterozygote Tiere verpaart. Alle lebenden Nachkommen wurden mittels Schwanzspitzenbiopsie genotypisiert, da ausschließlich homozygote MLH1^{-/-} Tiere in die eigentlichen (Therapie-) Versuche eingeschlossen wurden.

Die Tiere wurden in speziellen Filterkäfigen, mit maximal vier Tieren pro Käfig, unter freiem Zugang von Wasser und Standardfutter (autoklavierte Pellets), in einem zwölfstündigen Tag-/Nachtzyklus bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes (max. 80

Wochen) gehalten (=SPF nahe Haltung). Vor dem eigentlichen Versuchsbeginn erfolgte eine einwöchige Adaption an die Haltungs- und Versuchsbedingungen. Den Versuchstieren wurden Nagehölzer, Nestbaumaterialien, Mausiglus und Papierrollen als Enrichment zur Verfügung gestellt.

Die in dieser Arbeit verwendeten $MLH1^{-/-}$ Mäuse tragen eine dominant negative Nullmutation im *Mlh1* Gen (Exon 2 Deletion). Sie sind somit homozygot negativ für alle MMR Proteine und zeigen einen starken Tumorphänotyp. Spontan entwickeln sich zwischen dem fünften und siebten Lebensmonat Lymphome, wobei entweder Thymome oder andere generalisierte Lymphome auftreten. GIT entwickeln sich erst später, etwa nach acht Monaten.

Zwei MMR-D-assozierten Tumoren wurden spezifisch an diesem Modell untersucht: das Lynch-Syndrom und die CMMR-D.

4.2 Methoden

4.2.1 *In vivo* Untersuchungen

4.2.1.1 prophylaktische Vakzine

Mäuse, die acht bis zehn Wochen alt waren und klinisch keine Anzeichen auf eine Tumorentwicklung zeigten, erhielten repetitive prophylaktische Vakzine, welche entweder in Monotherapie oder Kombination mit einmaliger Chemotherapie appliziert wurden (Tab. 1). Die Vakzinierung erfolgte durch subkutane (s.c.) Injektion des Tumorlysates aus einem MLH1^{-/-} A7450 Allograft. Dabei wurden 10 mg/kg Körpergewicht einmal pro Woche für vier Wochen (q7dx4) verabreicht. Die Tiere erhielten daraufhin acht weitere monatliche Applikationen der Vakzine (à 2,5 mg/kg KG Tumorlysate) (Σ 12 Applikationen). Bei der kombinierten Gabe mit den Chemotherapeutika Gemcitabin bzw. CPX wurden diese einmalig vor der ersten Vakzinierung intraperitoneal in einer Dosis von 100 bzw. 120 mg/kg KG appliziert.

Die maximale Behandlungszeit betrug 224 Tage. Die Tiere verblieben bis zur Ausbildung klinisch-pathologischer Veränderungen (Gewichtsverlust, vorgewölbtes Abdomen, beginnende Moribundität) im Versuch. Sollten die Tiere auch nach dieser Behandlungszeit keine Anzeichen einer Tumorentwicklung gezeigt haben, so wurden die Tiere noch maximal neun weitere Monate nachbeobachtet.

Vor Beginn der Therapie, sowie im Verlauf wurden Blutproben durch Punktion des retrobulbären Venenplexus (pro Entnahme max. 50 µl Vollblut) gewonnen. Die Blutentnahmen erfolgten unter kurzer Isoflurannarkose. Das entnommene Blut wurde einerseits zur Gewinnung von Plasma und andererseits für immunologisch-funktionelle Analysen eingesetzt, wie nachfolgend unter Punkt 4.2.2.6 dargelegt.

Tabelle 1: Unterteilung der Prophylaxegruppen.

Gruppe	Intervention
1 (Kontrollgruppe)	keine
2 (Kontrollgruppe)	Chemo (Gemcitabin 100 mg/kg KG), einmalig
3 (Prophylaxegruppe)	Vakzine mit MLH1 ^{-/-} A7450 Lysat (10 bzw. 2,5 mg/kg KG, s.c.), repetitiv
4 (Prophylaxegruppe)	Chemo-Immuntherapie (Gemcitabin 100 mg/kg KG, i.p., MLH1 ^{-/-} A7450 T1 M1 Lysat (10 mg/kg KG, s.c.), alternierend
5 (Prophylaxegruppe)	Chemo-Immuntherapie (CPX 120 mg/kg KG, i.p., MLH1 ^{-/-} A7450 T1 M1 Lysat (10 mg/kg KG, s.c.), alternierend

4.2.1.2 therapeutische Vakzine

Mäuse die acht bis elf Monate alte waren und Anzeichen eines gastrointestinalen Tumors, wie ein leichter, stetiger Gewichtsverlust über zwei Wochen, leicht struppiges Fell und einen veränderten Habitus zeigten, wurden mit der Positronen Emissions Tomographie/Computertomographie (PET/CT) untersucht. Dabei wurde der Bauchraum auf Tumorherde gescreent und die Tumoranzahl, -größe und -lokalisation untersucht. Die Analyse wurde unter Verwendung des Glukoseanalogon Fluor-Deoxyglukose (F-18-FDG) durchgeführt, welches den gesteigerten Umsatz von Glukose nachweist und somit Tumorgewebe identifizieren lässt. Die kontrastverstärkte Computertomographie dient zusätzlich zur Bestimmung der Durchblutung des Tumorgewebes.

Die Tiere wurden in zwei Kontroll- und zwei Therapiegruppen eingeteilt (Tab. 2). Die Vakzine wurde in einer Dosis von 10 mg/kg KG einmal wöchentlich für vier Wochen und danach 14-tägig appliziert (q14dx8) (Σ 12 Applikationen). Bei der kombinierten Chemo-Vakzine wurde in Analogie zum Vorgehen bei der Prophylaxe zusätzlich 100 mg/kg KG Gemcitabin 24h vor der ersten Vakzine einmalig i.p. verabreicht. Die Tiere verblieben bis zur Verschlechterung des Allgemeinzustandes, jedoch maximal sechs Monate nach Therapieende (= Tag 210) im Versuch.

Vor Beginn der Therapie, sowie im Verlauf wurde Blut durch Punktion des retrobulbären Venenplexus entnommen. Dies erfolgte unter einer Isoflurannarkose.

Das entnommene Blut wurde einerseits zur Gewinnung von Plasma und andererseits für immunologisch-funktionelle Analysen eingesetzt, wie nachfolgend unter Punkt 4.2.2.6 dargelegt.

Tabelle 2: Unterteilung der Therapiegruppen

Gruppe	Intervention
1 (Kontrollgruppe)	keine
2 (Kontrollgruppe)	Chemo (Gemcitabin 100 mg/kg KG, i.p.), einmalig
3 (Therapiegruppe)	Vakzine mit MLH1 ^{-/-} A7450 T1 M1 Lysat (10 mg/kg KG, s.c.)
4 (Therapiegruppe)	Chemo-Immuntherapie (Gemcitabin 100 mg/kg KG, i.p., MLH1 ^{-/-} A7450 T1 M1 Lysat (10 mg/kg KG, s.c.), alternierend

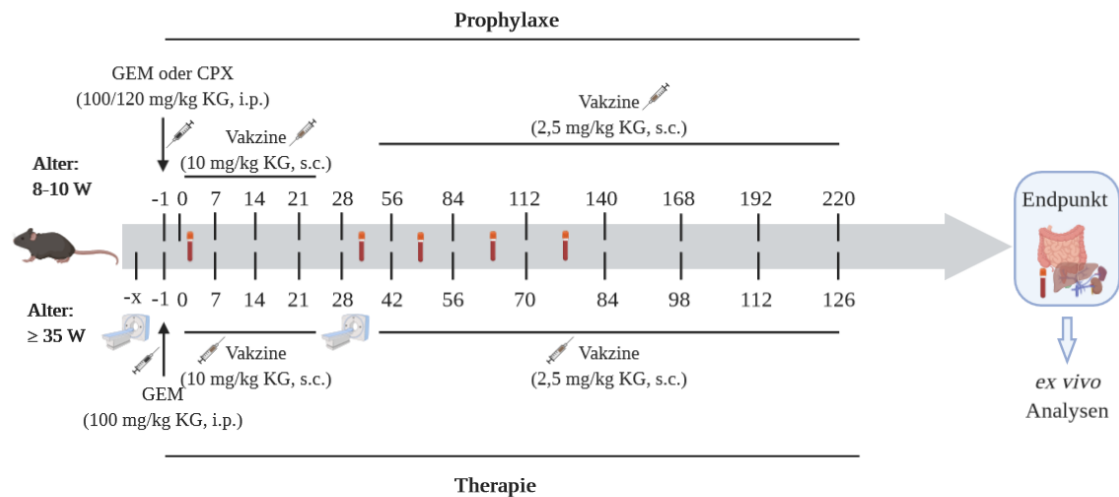


Abbildung 8 Behandlungsschema der Prophylaxe- und Therapie-Gruppen.

4.2.1.3 Monitoring und Probenentnahme

Nach Erreichen des dritten Lebensmonats wurden die Tiere stetig, jedoch mindestens drei bis viermal pro Woche kontrolliert. Dabei wurde besonders auf das Gewicht (Messung ein-zweimal wöchentlich), den Allgemeinzustand, das Fell und die Vergrößerung lymphatischer Organe, ersichtlich durch ein vorgewölbtes Abdomen (Leber und Milz) oder durch eine beginnende Schnappatmung (Thymus), geachtet. Lag eine starke Verschlechterung des Allgemeinzustandes und/oder eine schnelle Gewichtsreduktion vor, beziehungsweise befand sich die Maus bereits länger als 45 Wochen im Versuch, ohne Anzeichen auf eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes, so wurde das Tier mittels Keta-
min/Xylazin (90/6 mg/kg KG, i.p.) und einer anschließenden retrobulbären Blutentnahme (entbluten) aus dem Versuch genommen. Über eine mediane Laparotomie und einer Thorakotomie wurden der Bauchraum und Thorax eröffnet. Bereits der erste Blick in das eröffnete Abdomen ließ ein generalisiertes Lymphom von einem GIT unterscheiden. Mäuse mit GIT wiesen eine normalgroße Milz und Leber auf, bei Inspektion des Gastrointestinaltrakts fanden sich im Dünndarm (häufiger als im Kolon) Tumorknoten. Der betroffene Darmabschnitt wurde reseziert, anschließend der Tumorknoten in einer Petrischale sorgfältig vom umliegenden gesunden Darmgewebe abgesetzt und dieser unter sterilen Bedingungen zweigeteilt. Ein Teil des nativen Gewebes wurde in Tissue Tek eingebettet bei minus 80°C für histologische Schnittpräparate weggefroren. Das restliche Tumorgewebe wurde durch ein 100 µm Zellsieb filtriert und für weiterführenden Untersuchungen asserviert.

Bei Tieren, die ein Lymphom entwickelt hatten, fanden sich bei der Obduktion zwei unterschiedliche pathologische Bilder. MLH1^{-/-}-assoziierte Non-Hodgkin-Lymphom präsentieren sich mit einer deutlich vergrößerten Milz und Leber, der GI-Trakt ist vollkommen unauffällig. Bei Vorliegen eines generalisierten Lymphoms wurde die Milz entnommen und unter sterilen Bedingungen für weiterführende Untersuchungen weiter prozessiert. Im Falle einer malignen Transformation im Thymus war das Abdomen häufig unauffällig. Im eröffneten Thoraxraum befand sich ein vergrößerter Thymus, der im fortgeschrittenen Zustand mehr als die Hälfte des Thorax ausfüllte. Der Thymus wurde reseziert und die Zellen ebenfalls unter sterilen Bedingungen für nachfolgende Untersuchungen sowohl nativ, als auch vital asserviert.

4.2.2 Zellbiologische Arbeiten

4.2.2.1 Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) unter sterilen Bedingungen in Vollmedium (= DMEM/Ham's F12, + zehn 10% FKS, + 1% P/S, + 6mM L-Glutamin; VM) kultiviert. Bei allen vier Zelllinien (MLH1^{-/-} A7450 T1 M1, MLH1^{-/-} 328, MLH1^{-/-} 1351 und YAC-1) wurde zweimal pro Woche unter sterilen Bedingungen ein Mediumwechsel durchgeführt.

4.2.2.2 Zellernte

Das Medium wurde unter sterilen Bedingungen abgesaugt, die Zellen mit 5 ml 1x phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) gespült, erneut abgesaugt und 2-3 ml 1x Trypsin/ Ethylenediamintetraessigsäure (EDTA) hinzugegeben. Dies inkubierte für 5-15 min im Brutschrank. Sobald die Zellen sich gut vom Boden der Flasche abgelöst hatten, wurde die Reaktion mit 20-30 ml 1x PBS oder VM abgestoppt und so die Zellen in einer Suspension aufgenommen. Diese wurde in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und anschließend die Zellzahl mittels Neubauerzählkammer bestimmt.

4.2.2.3 Zellzahlbestimmung mittels Neubauerzählkammer

Aus der Zellsuspension wurden 50 µl entnommen, in eine unsterile 96-well Platte mit flachem Boden überführt und 50 µl Trypanblau zugegeben. Von dieser Suspension wurden 10 µl in die Neubauer-Zählkammer überführt. Unter dem Mikroskop wurden Zellen in zwei der vier Gruppenquadrate, welche in 16 Kleinquadraten unterteilt sind, gezählt. Die Anzahl der gezählten Zellen wurde durch die Anzahl der ausgezählten

Großquadrate dividiert und mit der Verdünnung (1:2) und dem Kammerfaktor (10^4) multipliziert. Auf diese Weise erhält man die Zellzahl pro ml.

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{Ausgezählte Quadrate}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerfaktor} (10^4)$$

4.2.2.4 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Um Zellen langfristig vital zu asservieren, wurden diese in Freezing-Medium (FM), bestehend aus 90 % FKS und 10 % DMSO aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in einen Freezing Container überführt und bei minus 80°C pro min um minus ein Grad heruntergekühlt. Anschließend wurden die Zellen dauerhaft in flüssigem Stickstoff bei minus 190°C in der Gasphase gelagert.

Sollten die Zellen rekultiviert werden, wurden diese bei Raumtemperatur aufgetaut, mit VM versetzt und mittels Zentrifugation (180 x g, 8 min) pelletiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen erneut in VM resuspendiert.

4.2.2.5 Herstellung von Tumorlysaten und Proteinbestimmung

Tumoren, die als Allograft in MLH1^{+/-} expandiert und deren maximale Tumorgroße erreicht wurde, wurden explantiert, das Tumorgewebe homogenisiert und durch Zentrifugation pelletiert (200 x g, 10 min). Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 5-10 ml steriler 1x PBS-Lösung aufgenommen. Anschließend folgten ein Hitzestress bei 42°C im Wasserbad für 5 min und vier Gefrier- (flüssiges N₂)/Tau- (56°C Wasserbad) Zyklen für je 5 min. Das resultierende Lysat wurde mit 60 Gy (Strahlenquelle: ¹³⁷Cs) bestrahlt. Zuletzt folgte die Proteinbestimmung nach Bradford. Im ersten Schritt wurde aus dem Lysat eine 1:100er Verdünnung hergestellt. Nun konnte unsteril weitergearbeitet werden. Aus der 100er Verdünnung wurden 400er, 600er und 800er Verdünnungen angesetzt. Bei jedem neuen Probelauf musste eine neue Eichkurve mit einer Standardverdünnungsreihe von 1-25 µg/ml erstellt werden. Für diese wurde erst eine Bovines Serumalbumin (BSA) -Stammlösung aus 15,7 mg BSA und 11,1 ml A. dest. gemischt. Für die Verdünnungsreihe wurden dann die Konzentrationen 0, 1, 2, 4, 6, 9, 12, 16, 20, 25 µg/ml aus der BSA-Stammlösung hergestellt. Je 800 µl der Standardverdünnungsreihe und der 400er, 600er und 800er Verdünnung des Lysates wurden mit 200 µl Bradfordreagenz versetzt. Rasch wurden die Proben der Standardreihe in Duplikaten und die drei Verdünnungsreihen des Lysates in Triplikaten auf eine 96-Wellplatte mit flachem Boden pipettiert. Hierbei wurden je 200 µl aufgetragen und anschließend die Proben im Glomax

bei einer Extinktion von 600 nm gemessen. Schließlich wurde anhand der Standardkurve die Proteinkonzentration berechnet und Aliquots á 200 µg bei minus 80 °C asserviert.

4.2.2.6 Gewinnung von Plasma und Erythrozytenlyse aus peripherem Blut

Ein Teil des Blutes wurde zur Isolation von Plasma verwendet. Hierzu wurde das Blut für 8 min bei 2000 x g zentrifugiert, der zellfreie Überstand abpipettiert und das Plasma umgehend bei minus 80°C asserviert. Das verbleibende Blut wurde einerseits für durchflusszytometrische Analysen (s. Punkt 4.2.3) und andererseits für funktionelle Analysen eingesetzt. Bei letztgenanntem erfolgte zunächst eine Erythrozytenlyse. Hierzu wurden 5 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer in ein 50 ml Falconröhrchen vorgelegt und das Blut darin resuspendiert. Bei Raumtemperatur inkubierte das Blut unter gelegentlichem Schütteln für 5-8 min. Die Reaktion wurde mit 5 ml 1x PBS abgestoppt und anschließend die Zellsuspension bei 500 x g für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend erneut in 3 ml 1x PBS resuspendiert, die Probe gewaschen (500 x g, 8 min), der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1,5 ml VM aufgenommen. Die Leukozyten wurden gezählt und Aus diesem konnten nun Zellen für den ELISpot eingesät (s. Punkt 4.2.4) werden.

4.2.2.7 Probenasservierung und Herstellen einer Einzelzellsuspension aus GIT

Das Tumorgewebe wurde in steriler 1x PBS-Lösung auf Eis transportiert, unter sterilen Bedingungen zerteilt und ca. die Hälfte des Gewebes nativ in TissueTek eingebettet. Dieses wurde kurz in flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend bei minus 80°C asserviert. Die zweite Hälfte wurde durch ein Zellsieb (100 µm Porengröße) gedrückt, um das Gewebe zu homogenisieren. Die resultierende Zellsuspension wurde zentrifugiert (180 x g, 8 min) und der Überstand abgesaugt. Anschließend wurde das Pellet in 20 ml 1x PBS gelöst und die Zellzahl mittels Neubauerzählkammer bestimmt. Die Zellsuspension konnte nun weiter prozessiert werden.

4.2.2.8 Herstellen einer Einzelzellsuspension aus lymphatischen Organen

Milz sowie Thymusgewebe wurden in steriler 1x PBS-Lösung eingebettet auf Eis transportiert, unter sterilen Bedingungen durch ein Zellsieb (100 µm Porengröße) prozessiert und in 1x PBS gelöst. Das Homogenat wurde zentrifugiert (1200 x g, 8 min) und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde in 5-10 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer resuspendiert und bei Raumtemperatur für 5-8 min unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Durch die Zugabe von 5 ml 1x PBS wurde die Reaktion unterbrochen und die

Zellsuspension erneut bei 1200 x g für 8 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 20 ml 1x PBS resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels Neubauerzählkammer bestimmt und die Zellen für die entsprechende Fragestellung weiter prozessiert.

4.2.3 Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie

Allgemeines Funktionsprinzip

Um die Untergruppen der Lymphozyten besser differenzieren zu können, werden die Zellen mit unterschiedlich fluoreszierenden Antikörpern markiert, welche spezifisch an Oberflächenantigene oder intrazelluläre Antigene binden.

Die Zellen wandern nacheinander durch eine dünne Messkammer im Durchflusszytometer. Die Messkammer wird auch Flusszelle genannt und entsteht durch die hydrodynamische Fokussierung, wodurch die Flüssigkeit in Tröpfchen unterteilt wird. Die Tröpfchen sind klein, sodass nur eine Zelle pro Tröpfchen vorliegt. Die Zellen werden beim Passieren der Messkammer von einem Laser bestrahlt, wobei das Fluoreszenzsignal angeregt und registriert wird. Auf diese Weise wird die Anzahl der passierenden Zellen erhoben. Anschließend wird das Ergebnis grafisch dargestellt.

In dieser Arbeit wurden alle durchflusszytometrischen Analysen am BD FACS Verse™ durchgeführt. Hierzu wurden 20.000 Events im Live Gate gemessen und mithilfe der BD FACSuite™ Software ausgewertet.

Durchführung

Mithilfe der Durchflusszytometrie wurde ein immunologisches Verlaufsscreening aus dem peripheren Blut, sowie eine Endpunktbestimmung aus der Milz durchgeführt. Hierfür wurden 30 µl Blut/Well bzw. 1×10^5 Splenozyten/Well pipettiert und mit den entsprechenden Antikörpermixen versetzt. Es wurden die entsprechenden, mit unterschiedlichen Fluorochromen markierten, Antikörper-Gemische (2 µg/AK; Tab. 3) in einer 96-Well Platte mit konischem Boden vorgelegt und anschließend die jeweilige Zellsuspension zugegeben. Dies inkubierte bei 4°C für 30 min. Anschließend erfolgte die Erythrozytenlyse (s. Punkt 4.2.2.6). Im Falle einer intrazellulären Färbung wurden die Proben zunächst 20min mit 1x FluoroFix™ Buffer fixiert, gewaschen (300 x g, 8 min) und mit 200 µl Fix/Perm Solution permeabilisiert (15 min, 4°C). Anschließend wurde die Platte bei 500 x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 200 µl 1x PBS bzw. AK-Lösung für die intrazelluläre Färbung gelöst. Hierfür wurde das AK-Gemisch in 1x

Fix/Perm Solution angesetzt. Anschließend wurden 100 µl Färbeansatz pro Well (mit je 1 µg/AK) hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 40 min (RT) wurde die Reaktion mit 100 µl 1x PBS abgestoppt und die Platte bei 300 x g 8 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 200 µl 1x PBS resuspendiert. Die Proben wurden anschließend am BD FACSVerse™ gemessen.

Tabelle 3: Antikörpermixe FACS-Analyse

Färbeansatz extrazellulär			
Mix 1	CD44 FITC	CD62L PE	CD197 APC
Mix 2	CD3 FITC	CD4 PE	CD25 APC
Mix 3	CD3 FITC	CD8 PE	CD25 APC
Mix 4	TCR FITC	NK1.1 PE	CD178 APC
Mix 5	CD11b FITC	Gr1 PE	CD127 APC
Mix 6	CD69 FITC	CD166 PE	CD19 APC
Mix 7			
-Tumor	CD104 FITC	PD-L1 PE	CD279 APC
-Blut	CD3 FITC		
Mix 8	IL17 FITC	LAG-3 PE	IDO-1 APC
Mix 9	CD200R FITC		CD117 APC
Intrazelluläre Färbung			
Mix 1	CD152 (CTLA-4) PE		
Mix 2		IL17A FITC	IDO-1 APC

4.2.4 ELISpot (Enzyme-Linked Immunospot Assay)

Allgemeines Funktionsprinzip

Immunzellen sezernieren nach Stimulation durch Antigene (Peptide, Tumorzellantigene oder virale Antigene), welche von MHC I präsentiert werden, Zytokine. Das heißt alle Zellen, die potentiell auf ein bestimmtes Antigen reagieren, können anhand ihrer Zytokinproduktion detektiert werden. Der ELISpot ist ein sehr sensibler Immunoassay, welcher die Detektion von sezernierten Zytokinen auf Einzelzellebene erlaubt.

Diese Methode wird eingesetzt, um präformierte oder Therapie-induzierte Immunantworten, beispielsweise aus dem peripheren Blut oder sekundären lymphatischen Organen, nachzuweisen. Der Nachweis basiert auf einer von Antikörper und durch Enzyme vermittelten Farbstoffreaktion. Die Größe und Intensität jedes individuellen Spots repräsentiert den Anteil sezernierter Zytokine pro Zelle.

Durchführung

Im ersten Schritt wurde die ELISpot-Platte mit dem anti-IFN- γ Antikörper (Klon: AN18) beschichtet. Hierfür wurde die Platte unter sterilen Bedingungen mit 15 μ l einer 35%igen Ethanollösung pro Well befeuchtet. Dies inkubierte maximal 1 min bei RT. Die Platte wurde fünfmal mit 200 μ l/Well sterilem Wasser gewaschen. Der Antikörper wurde 1:66 in 1x PBS gelöst und 50 μ l des Antikörpergemischs/Well aufgetragen. Die Platte inkubierte bei 4-8°C über Nacht. Am darauffolgenden Tag wurde der Inhalt der Platte dekantiert, die Platte einmal mit 200 μ l Medium/Well gewaschen, 100 μ l Medium/Well zugegeben, welches für eine Stunde inkubierte (= Blockierung unspezifischer Bindungsstellen). Die Platte konnte dann bei minus 20°C asserviert werden.

Für die Analyse wurde die Platte auf RT erwärmt. Die Tumorzellen (Zellen der vier Zelllinien MLH1^{-/-} A7450 T1 M1, MLH1^{-/-} 328, MLH1^{-/-} 1351 und YAC-1) geerntet und die Zellzahl wie zuvor unter Punkt 4.2.2.3 dargelegt, erhoben. Als Effektorzellen dienten die gewonnenen Lymphozyten aus dem peripheren Blut und der Milz. Pro Well wurden 10.000 Zielzellen in Triplikaten auf die ELISpot-Platte aufgetragen und mit Leukozyten/Splenozyten versetzt (= 50.000 Zellen/Well). Die Platte inkubierte über Nacht im Brutschrank.

Am folgenden Tag wurden die Zellen und das Medium verworfen, die Platte fünfmal mit 200 μ l/Well PBS gewaschen und der biotinylierte Detektionsantikörper RA-6A2 (Verdünnung: 1:2000 mit 1x PBS-Tween20) hinzugefügt. Nach vier h Inkubation bei RT, folgten vier Waschschrte mit 1x PBS-Tween20. Im nächsten Schritt wurde Streptavidin-ALP 1:1000 mit PBS verdünnt und 100 μ l/Well aufgetragen. Dies inkubierte 2 h bei RT. Es folgten vier Waschschrte mit 1x PBS. Anschließend wurden 50 μ l BCIP/NBT Substrat-Lösung pro Well zugefügt, welches eine h bei RT inkubierte. Mit Hilfe dieser Indikatorsubstanz konnte die enzymatisch-vermittelte Farbstoffreaktion (Blaufärbung) nachgewiesen werden. Die Farbstoffreaktion wurde durch Zugabe von Leitungswasser abgestoppt. Die Platte trocknete dann und die Spots wurden mithilfe des ELISpot Readers quantifiziert.

4.2.5 Immunfluoreszenz-Färbung

Allgemeines Funktionsprinzip

Mithilfe der Immunfluoreszenzfärbung ist es möglich, das Tumormikromilieu detailliert zu untersuchen. Das Prinzip beruht auf Antikörpern, welche mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert wurden und nach spezifischer Bindung an das gesuchte Antigen unter

dem Fluoreszenzmikroskop aufleuchten. In dieser Arbeit wurden verschiedene Subpopulationen Tumor-infiltrierender Immunzellen qualitativ und quantitativ detektiert.

Durchführung

Das Tumorgewebe wurde in Tissue Tek eingebettet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei minus 80°C asserviert. Zur Herstellung von Kryostatschnitten wurde das Gewebe aufgeblickt und 4 µm dicke Schnitte hergestellt. Die Schnitte wurden für ca. 30 min an der Luft getrocknet. Die Fixierung auf dem Objektträger erfolgte mit Methanol für 8-10 min. Anschließend wurden die Objektträger kurz luftgetrocknet und je zwei Objektträger Rücken an Rücken bei minus 20°C zunächst weggefroren. Für die Färbung wurden die Objektträger mit 1x PBS gewaschen, mit dem Dakopen ein Fettrand um die Schnitte gezogen und mittels 2%igem BSA (50 µl pro Schnitt) die unspezifischen Bindungsstellen blockiert (Feuchtkammer, 1h, RT). Anschließend wurden 50 µl des Antikörper-Gemisches (final: 1:50; Tab. 4) aufgetragen und über Nacht in einer dunklen Feuchtkammer bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die nicht gebundenen AK mittels 1x PBS wieder entfernt. Hierfür wurden die Objektträger mindestens dreimal mit 1x PBS gespült. Zum Abschluss wurde eine Kernfärbung mittels DAPI durchgeführt, welches in die DNA interkaliert, und die Schnitte mit einem Deckgläschen unter Zugabe von Eindeckmedium luftblasenfrei eingedeckt. Die mikroskopische Dokumentation erfolgte am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (Zeiss, LSM 780).

Tabelle 4: Antikörpermixe für die Immunfluoreszenzfärbung

Färbeansätze	
CD11b - FITC	Gr1 - PE
CD104 - FITC	CD4 - PE
CD104 - FITC	CD8 - PE
CD104 - FITC	LAG-3 - PE
PD1 - FITC	NK 1.1 - PE
CD11b - FITC	PD-L1 - PE
CD11c - FITC	Gr1 - PE

4.2.6 Molekularbiologische Methoden

4.2.6.1 DNA Extraktion aus Mausschwanzgewebe

Die Schwanzspitze wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 500 µl NaOH versetzt und bei 97°C für eine h im Thermocycler inkubiert. Anschließend wurde 50 µl einer Tris/HCl-

Lösung zugeführt und die Probe gut gevortext. Dabei sollte sich das Gewebe fast auflösen. Die Probe wurde dann eine min bei 3000 x g zentrifugiert, um Knochen und Fellreste zu entfernen. Am NanoDrop wurde die DNA-Konzentration bei 260 nm bestimmt. Optimal ist eine Konzentration im Bereich zwischen 50 und 100 ng/μl. Die Proben konnten bei minus 20°C asserviert oder direkt zur Genotypisierung eingesetzt werden.

4.2.6.2 gDNA-Isolation aus Tumorgewebe

In Vorbereitung auf die gDNA-Isolation wurden aus den in Einzelzellsuspension überführten Tumoren (GIT und Lymphom (Milz, Thymus)) je Präparat eine Mio. Zellen entnommen. Die Zellsuspension wurde acht min bei 14000 x g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das trockene Pellet wurde bis zur weiteren Prozessierung bei minus 20°C gelagert. Anschließend wurde das Pellet in 600 μl „Nuclei Lysis Solution“ gelöst, um die Zellen zu lysieren. Es wurden 3 μl „RNase Solution“ zugegeben und dies gut durchmischt. Anschließend inkubierte die Probe 30 min bei 37°C im Thermocycler. Für fünf min wurde anschließend die Probe bei RT heruntergekühlt und 200 μl „Precipitation Solution“ zugegeben. Dies wurde dann 20 Sekunden auf hoher Stufe gevortext und dann fünf min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde vier min auf höchster Stufe (14000 x g) zentrifugiert, wobei die Proteine ein weißes Pellet bilden. Im Überstand befand sich nun die DNA. Dieser wurde vorsichtig abgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, in welchem bereits 600 μl Isopropanol vorgelegt waren. Der Mix wurde so lange geschwenkt, bis die DNA eine sichtbare Masse ergab. Für eine min wurde dann bei maximaler Stufe zentrifugiert und die DNA als kleines Pellet am Boden des 1,5 ml Reaktionsgefäß sichtbar. Vorsichtig wurde der Überstand abgenommen, das Pellet in 600 μl 70%igen Ethanol gelöst und das Gefäß ausgiebig geschwenkt, um die DNA gut zu waschen. Erneut folgte eine Zentrifugation bei maximaler Stufe für eine min. Der Überstand wurde sehr vorsichtig abgenommen und das Pellet bei umgedrehten 1,5 ml Reaktionsgefäß auf einer absorbierenden Oberfläche 15 min luftgetrocknet. Zuletzt wurde das Pellet im 30 μl „DNA Rehydration Solution“ resuspendiert und bei 65°C eine h lang im Thermocycler rehydriert. Am NanoDrop wurde schließlich die gDNA-Konzentration bei 260 nm gemessen. Für die nachfolgende PCR und Fragmentlängenanalyse wurden die Proben auf eine Konzentration von 25 ng/μl verdünnt. Die gDNA wurde bei minus 20°C asserviert.

4.2.6.3 Semiquantitative PCR

Allgemeines Funktionsprinzip

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht eine gezielte Amplifikation geringster Mengen von DNA. Durch sich wiederholende Amplifikationszyklen (Denaturierung, Primer-Anlagerung, Elongation) können innerhalb kurzer Zeit große Mengen eines bestimmten DNA-Abschnitts gewonnen werden. Da nach jedem Zyklus die bereits bestehenden und die neu synthetisierten DNA-Abschnitte amplifiziert werden, steigt die Menge exponentiell an. Markiert werden die gewünschten DNA-Abschnitte mittels Primer, wobei jeweils ein Primer für den Leitstrang und einer für den Folgestrang der DNA ausgewählt wird. Diese beiden Primer lagern sich dann jeweils am Ende des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts an.

Die Methode zeugt von einer hohen Geschwindigkeit, Einfachheit und breiten Anwendbarkeit, da sie in jeden Abschnitt der DNA angewendet werden kann und ist somit ein wichtiger Bestandteil der Genanalyse.

Durchführung Genotypisierung

Pro PCR-Reaktion wurden ca. 50 ng DNA benötigt. Der Mastermix wurde, wie in Tab. 5 beschrieben, vorbereitet und die DNA im Thermal Cycler C1000TM vervielfältigt. Zusätzlich wurde eine Positiv-Kontrolle mit wildtypischer MLH1 DNA, beziehungsweise MLH1-knockout DNA, und eine Negativ-Kontrolle ohne DNA untersucht. Die PCR-Produkte konnten dann entsprechend der Basenpaar-Größe untersucht und somit eine Einteilung in homozygot *knockout*, Wildtyp und heterozygot vorgenommen werden.

Tabelle 5: PCR Multiplex-Ansatz

Volumen [µl] / Ansatz	Reagenz
1,0 µl	DNA
2,5 µl	PCR-Puffer
0,5 µl	dNTPs
0,5 µl	MLH1 mouse forward Primer
0,5 µl	MLH1 mouse reverse Primer 1
0,5 µl	MLH1 mouse reverse Primer 2
0,2 µl	Taq-Polymerase
25,0 µl	<i>Aqua dest.</i>

Tabelle 6: Ablauf der PCR-Reaktion

Reaktion	Temperatur	Zeit [min]
Initiale Denaturierung	94°C	3:00
Denaturierung	94°C	1:00
Primeranlagerung	65°C	2:00
Strangsynthese	72°C	1:00
Abschluss der Synthese	72°C	4:00
Lagerung	4°C	Unendlich

35 Zyklen

4.2.6.4 PCR zum Nachweis kodierender und nicht-kodierender Mikrosatelliten

Durchführung

Zunächst wurde ein Mastermix aus den einzelnen PCR Komponenten hergestellt (Tab. 7). Pro Ansatz wurde 1 µl DNA (= 25 ng) des Probenmaterials vorgelegt und 11,5 µl des Multiplexes zugeführt. Dies wurde kurz anzentrifugiert. Im Thermal Cycler C1000™ erfolgte die Amplifikation (35 Zyklen), wodurch es zu einer exponentiellen Amplifikation der DNA-Abschnitte kam (Tab. 8).

Tabelle 7: PCR Multiplex Ansatz

Volumen [µl] / Ansatz	Reagenz
1,0 µl	gDNA
2,5 µl	PCR-Puffer
0,5 µl	dNTPs
0,5 µl	forward Primer
0,5 µl	reverse Primer
0,2 µl	Taq-Polymerase
19,8 µl	Aqua dest.

Tabelle 8: Ablauf der PCR-Reaktion

Reaktion	Temperatur	Zeit [min]
Initiale Denaturierung	94°C	4:00
Denaturierung	94°C	0:30
Primeranlagerung	58°C	0:45
Strangsynthese	72°C	0:30
Abschluss der Synthese	72°C	6:00
Lagerung	4°C	unendlich

35 Zyklen

4.2.6.5 Aufarbeitung der PCR-Produkte für die Fragmentlängenanalyse am ABI3100 Sequencer

Die PCR-Produkte wurden in der 96-Well-Platte mit rundem Boden 1:10 mit *Aqua dest.* verdünnt. Unter dem Abzug wurde der HiDi-LIZ-Mix mit 24 µl HiDi und 0,3 µl LIZ pro Probe angesetzt. Aus der Probenverdünnung wurden dann 1 µl der Probe pro Well einer 96-Well-Platte vorgelegt und 24 µl HiDi-LIZ-Mix pro Well hinzugefügt. Die Platte wurde dann im ABI3100 Sequencer eingelesen. Mit Hilfe des Genomsequencer-Auswertungsprogramms konnten die Proben nun auf Mutationen in MS untersucht werden. Leserastermutationen konnten dabei aufgrund ihrer veränderten Produktlänge detektiert werden.

5 Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnte zunächst gezeigt werden, dass sowohl die prophylaktische, als auch therapeutische Gabe des Vakzins die Tumorzinzidenz und das -wachstum verzögern. Damit wurden die Vorbefunde, in denen das Vakzin erstmals im $MLH1^{-/-}$ Modell eingesetzt wurde, bestätigt (108). Dieser Vakzine-basierte Ansatz wurde nun um eine Kombinationstherapie, bestehend aus niedrigdosierter Chemotherapie mit Gemcitabin oder CPX, erweitert. Die Ergebnisse sind nachfolgend dargestellt.

5.1 $MLH1$ Genotypisierung

Um $MLH1^{-/-}$ Nachkommen zu erzeugen, wurden heterozygote Tiere verpaart. Zur Bestimmung des Genotyps erfolgte eine $MLH1$ -spezifische Genotypisierung an Mausschwanzspitzenbiopsien vier bis fünf Wochen alter Tiere. Von dem erhaltenen Gewebe wurde zunächst die DNA extrahiert und anschließend eine PCR durchgeführt. Die PCR Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und somit eine Unterteilung in Wildtyp, Heterozygot oder Homozygot für das $MLH1$ -Gen möglich. Für die eigentlichen Versuche wurden ausschließlich homozygot negative Tiere, welche die spezifische klinische Symptomatik entwickelten, eingesetzt.

In der Gelelektrophorese wurde zusätzlich zur Probe, eine Kontrolle mit wildtypischer $MLH1$ DNA, beziehungsweise $MLH1$ -*knockout* DNA, und eine Negativ-Kontrolle ohne DNA untersucht. In Abb. 9 sind repräsentative Ergebnisse einer typischen Genotypisierung dargestellt. Die Anzahl homozygoter Nachkommen folgt der Mendel'schen Verteilung und liegt bei ca. 24%.

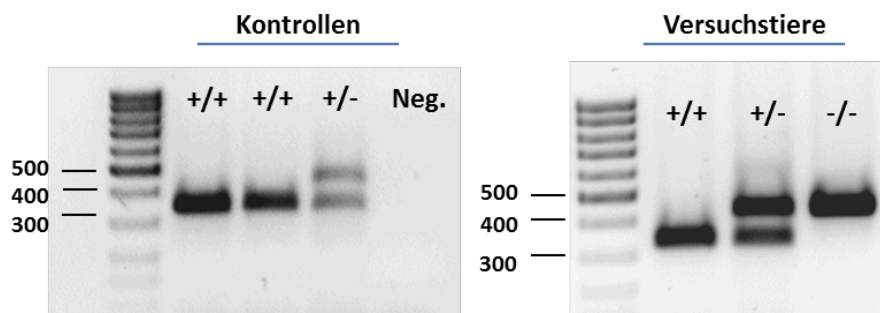


Abbildung 9 $MLH1$ Genotypisierung.

DNA wurde aus Mausschwanzgewebe extrahiert und mittels $MLH1$ -spezifischer Primer in einer Endpunkt-PCR amplifiziert. Dargestellt ist ein repräsentatives Bild einer Agarose-Gelelektrophorese, links: Kontrollen, rechts: experimentelle Versuchstiere. +/+ Wildtyp; +/- heterozygot; -/- homozygot knockout $MLH1$.

5.2 Prophylaktische Chemo-Immuntherapie

Zunächst erhielten MLH1^{-/-} Mäuse, die klinisch noch keine Anzeichen für eine Tumorentwicklung aufwiesen, eine prophylaktische Chemo-Vakzine. Die Zytostatika Gemcitabin bzw. CPX wurden jeweils 24 h vor der ersten Vakzine, in einer Dosis von 100 mg/kg KG bzw. 120 mg/kg KG, intraperitoneal appliziert. Zusätzlich erhielten Tiere ausschließlich die repetitiven Gaben des Vakzins, um die Effekte der Kombination zu eruieren.

5.2.1 Tumorzinzidenz, Überleben und Verteilung der Tumoren

MLH1^{-/-} Tiere entwickeln spontan in einem medianen Alter von $25,3 \pm 11,7$ Wochen Lymphome und im Alter von $35,5 \pm 9,3$ Wochen Tumoren im Gastrointestinaltrakt. Die prophylaktische Gabe des Vakzins verzögerte die Tumorgenese, im Vergleich zur Kontrolle, um ca. $11,9 \pm 0,8$ Wochen. Insgesamt waren 15,4 % der Tiere durch die alleinige Vakzinierung, bis zum Versuchsende (80 Wochen), tumorfrei. Die kombinierte Gabe mit niedrig-dosierter Chemotherapie führte, in Abhängigkeit des eingesetzten Zytostatikums, zur weiteren Verzögerung der Tumorgenese und somit auch zur Überlebensverlängerung (Abb. 10). 33,0 % der Mäuse waren durch eine Präkonditionierung mit Gemcitabin bis zum experimentellen Endpunkt tumorfrei. Die kombinierte Gabe mit CPX erzielte bei 11,1 % der Tiere eine Tumorfreiheit.

Mit Hilfe der Kaplan-Meier-Überlebenskurve in der Logrank *Survival* Analyse wurde die Überlebenszeit der einzelnen Gruppen veranschaulicht. Der Logrank-Test bietet die Möglichkeit, zwei Überlebenskurven miteinander zu vergleichen und dabei die Signifikanz beider Kurven zu überprüfen.

Beide Kombinationstherapien verlängerten das Gesamtüberleben signifikant ($p < 0,001$). Ebenfalls liegt $p < 0,01$, beim Vergleich der Vakzine-Monotherapie mit der Gemcitabin Kombinationstherapie, vor. Somit ist auch hier ein Signifikanzniveau von 1% erreicht. Wie in Abb. 10 zu erkennen ist, führte insbesondere die Kombinationstherapie mit Gemcitabin zu einem deutlich besseren Überleben, als die Monotherapie und die Kontrolle.

Zusammenfassend verlängert die Präkonditionierung mit einem Chemotherapeutikum (Gemitabin oder CPX) die tumorfreie Zeit und somit auch das Überleben.

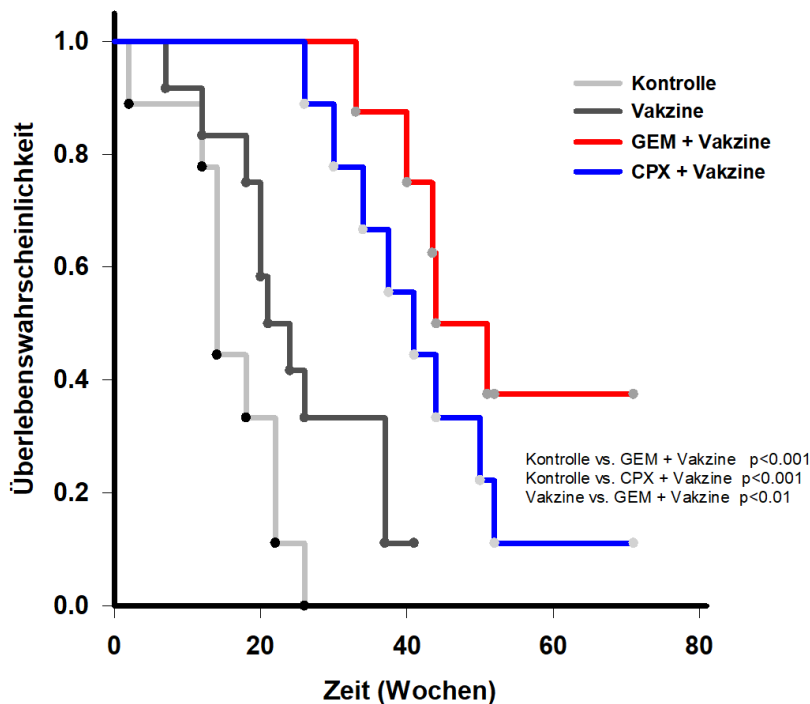


Abbildung 10 Kaplan-Meier Überlebenskurve (Log rank Analyse) von $MLH1^{-/-}$ Mäusen in der Prophylaxe.

Die Tiere erhielten eine Chemo-Immuntherapie aus Gemcitabin (100 mg/kg KG, i.p., $n = 9$ Mäuse) oder CPX (120 mg/kg KG, i.p., $n = 9$ Mäuse) 24 h vor der ersten Vakzine. Anschließend folgte die repetitive Gabe der Vakzine im entsprechenden Rhythmus. Sechs Tiere erhielten eine Vakzine-Monotherapie (10 mg/kg KG, s.c.). Den Kontrolltieren ($n = 4$) wurde einmalig Gemcitabin (100 mg/kg KG, i.p) verabreicht bzw. erhielten keine Therapie. Die Tiere wurden anhand von definierten Abbruchkriterien (humane Endpunkte) getötet. Diese umfassen u.a. eine Gewichtsreduktion $\geq 15\%$; rektale Blutung, sowie stark verändertes Sozialverhalten, welche Anzeichen für eine Schmerzsymptomatik darstellen.

Hinsichtlich der Verteilung der einzelnen Tumoren zeigten sich ebenfalls Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Tab. 9). Unter der Vakzine-Monotherapie entwickelten sich weniger GIT (3/10), diese traten im Alter von $42,0 \pm 8,5$ Wochen auf. Bei 5/10 Tieren entwickelten sich Lymphome, welche im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren mit $30,8 \pm 10,0$ Wochen später auftraten.

Bei den mit Gemcitabin präkonditionierten Mäusen entwickelten sich häufiger GIT als Lymphome (GIT bei 4/9 Mäusen vs. Lymphome bei 2/9 Mäusen). Während die GIT im Alter von $53,4 \pm 14,1$ Wochen detektierbar waren, entwickelten sich die Lymphome bereits im Alter von $23,5 \pm 13,4$ Wochen. Dies entspricht der Tumorzinzidenz der Kontrolltiere. Folglich beeinflusst diese Form der Chemo-Vakzine ausschließlich die gastrointestinale Tumorgenese.

Bei der CPX-Vakzine-Kombitherapie entwickelten sich bei zwei von neun Mäusen GIT (33,3%). Das mediane Alter, in dem GIT nachweisbar waren, lag bei $47,7 \pm 5,9$ Wochen. Bei dieser Kombitherapie traten vermehrt Lymphome (55,5%), jedoch im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren, leicht verzögert im Alter von $34,3 \pm 6,9$ Wochen auf. Die alleinige und einmalige Applikation von Gemcitabin beeinflusste die Tumorentwicklung nicht. Da CPX in der Kombination keinen Überlebensvorteil erzielte, wurde auf die alleinige Gabe ohne Vakzine verzichtet. Alle Tiere der Gemcitabin-Kontrollgruppe entwickelten Tumoren, welche sowohl hinsichtlich des zeitlichen Auftretens (Lymphome: $26,7 \pm 9,3$ Wochen; GIT: $36,8 \pm 6,8$ Wochen), als auch der Verteilung mit den unbehandelten Kontrolltieren vergleichbar war. Folglich wurden die Daten beider Kontrollgruppen zusammengefasst. 3,2 % der Kontrolltiere entwickelten ein erweitertes Tumorspektrum, wie beispielsweise Tumoren der Haut oder Niere. Diese seltenen, i.d.R. benignen Tumoren sind bereits in der Literatur dokumentiert (62,64,109) und stellen eine direkte Folge des generalisierten MLH1 *knockouts* und der damit einhergehenden MMR-D dar.

Tabelle 9: Tumorentwicklung unter prophylaktischer Chemo-Immuntherapie im Vergleich zur Kontrolle

Prophylaxe- gruppe	Alter bei Tumoraufreten [Wochen \pm SD]		Tumortyp [%]			Tumorfrei [%]
	<i>Lymphom</i>	<i>GIT</i>	<i>Lymphom</i>	<i>GIT</i>	<i>Andere</i>	
Kontrolle*	25,3 \pm 11,7	35,5 \pm 9,3	62,1	34,7	3,2	0,0
Vakzine	30,2 \pm 10,0	47,4 \pm 8,5	51,7	33,3	0,0	15,0
GEM + Vakzine	23,5 \pm 13,4	53,4 \pm 14,1	22,2	44,4	0,0	33,3
CPX + Vakzine	34,3 \pm 6,9	47,7 \pm 5,9	55,5	33,3	0,0	11,1

* - unbehandelt bzw. 1x Gemcitabin, keine Vakzine.

5.2.2 Immunmonitoring und Nachweis immunologischer Veränderungen unter Chemo-Immuntherapie

Das Immunmonitoring wurde vor Beginn und während der prophylaktischen Therapie regelmäßig durchgeführt. Hierfür wurde peripheres Blut durch Punktion des retrobulbären Venenkomplexes entnommen, dieses mithilfe spezifischer Antikörper gefärbt und schließlich durchflusszytometrisch untersucht. Ziel war es, Veränderungen im Blut und somit die Auswirkungen der Prophylaxe auf das Immunsystem zu dokumentieren.

Bei allen Kontrolltieren kam es im Verlauf zu einem leichten Abfall, sowohl der CD3⁺/CD4⁺ T-Helferzellen, als auch der CD3⁺/CD8⁺ CTL im Blut. Die Vakzine-Monotherapie führte zu einem leichten Anstieg der CD3⁺/CD4⁺ T-Helferzellen und der CD3⁺/CD8⁺ CTL.

Die Kombitherapie aus Gemcitabin und Vakzine hatte ähnliche Effekte. Der Anteil CD3⁺/CD4⁺ T-Helferzellen und CD3⁺/CD8⁺ CTL im Blut stieg transient. Demgegenüber wurden ab Tag 63 weniger T-Helferzellen nachgewiesen. Die CTL stiegen nach einem zeitweiligen Abfall wieder an. NK-Zellen, sowie PD-1⁺ und LAG-3⁺ Lymphozyten stiegen im Verlauf der Behandlung ebenfalls an (*Daten nicht gezeigt*). Die lymphozytäre PD-L1 Expression reduzierte sich geringfügig, bis zum Ende der Therapie. Der Anteil an B-Lymphozyten sowie γ/δ T-Zellen nahm im Verlauf leicht ab (*Daten nicht gezeigt*).

Die Präkonditionierung mit CPX hatte keinen Einfluss auf CD3⁺/CD4⁺ T-Helferzellen, der Anteil an CD3⁺/CD8⁺ CTL hingegen war bis zum Versuchsende leicht erhöht (Abb. 11). Während auch hier die NK-Zellen und PD-1 leicht anstiegen, kam es zum Abfall von LAG-3 und PD-L1. Auch die B-Lymphozyten verminderten sich (*Daten nicht gezeigt*).

Interessanterweise war der Anteil an MDSC bei allen Versuchsgruppen unverändert. Bei allen Tieren kam es im Verlauf zu einem Anstieg dieser Zellen, mit tendenziell höheren Werten bei Tieren, welche die CPX-Vakzine-Kombination erhielten (Abb. 11).

Zusammenfassend konnte eine positive Modulation der Immunantwort durch die prophylaktischen Kombinationstherapien aufgezeigt werden.

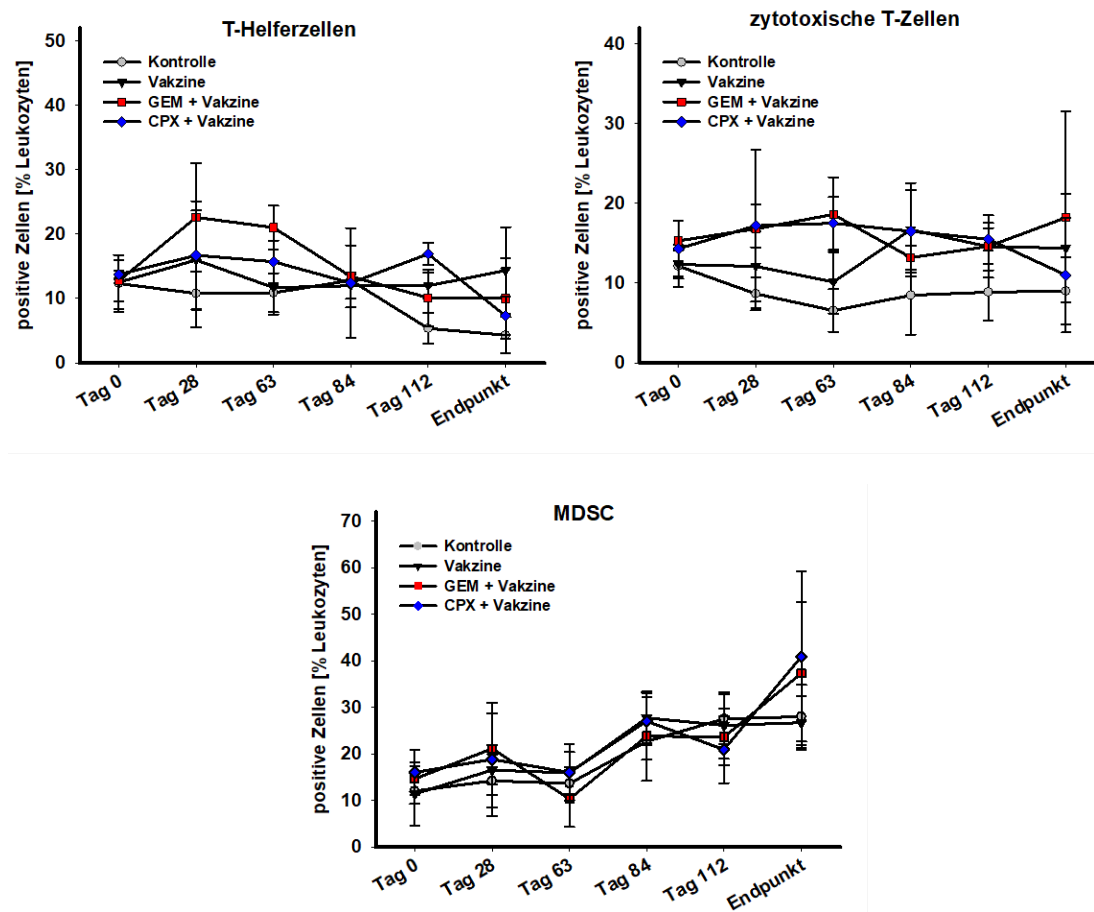


Abbildung 11 Immunphänotypisierung des peripheren Blutes von $MLH1^{-/-}$ Mäusen in der Prophylaxe.

Quantitative Darstellung des Anteils positiver Zellen von Tieren nach prophylaktischer Chemo-Immuntherapie (GEM + Vakzine; CPX + Vakzine) im Vergleich zu Tieren, die eine Vakzine-Monotherapie erhielten, sowie Kontrolltieren (Gemcitabin bzw. keine Intervention). Die Messung erfolgte im Durchflusszytometer. Pro Messung wurden 20.000 Ereignissen erfasst. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD. $N = 4 - 6$ Tiere/Gruppe.

Um ein umfassendes Bild der immunologischen Veränderungen infolge der Prophylaxe zu erhalten, wurde am Endpunkt das Milzgewebe untersucht. Hierfür wurde die Milz entnommen und wie bereits beschrieben (Punkt 4.2.2.8) für die immunologischen Untersuchungen aufbereitet.

Die Vakzine-Monotherapie führte zu einem leichten Anstieg der T-Helferzellen, der Anteil an CTL und MDSC war im Vergleich zur Kontrolle unverändert. Ebenso waren nur marginale Unterschiede hinsichtlich der PD-1 und LAG-3 Expression detektierbar.

Demgegenüber wurde infolge der Chemo-Vakzine mit Gemcitabin vermehrt T-Helfer- und CTL nachgewiesen, gleichzeitig nahm der Anteil an MDSC ab. Ebenfalls wurde ein geringerer Anteil von Treg und Immuncheckpoint-Molekülen (LAG-3- und PD-L1) auf den Leukozyten erfasst.

Die Chemo-Immuntherapie mit CPX zeigte ähnliche Effekte, mit einem Anstieg an T-Helferzellen und CTL. Im Vergleich zur Prophylaxe mit Gemcitabin waren jedoch mehr MDSC nachweisbar. Lediglich der Anteil an Zellen, die LAG-3 exprimierten, war signifikant verringert und wurde bei weniger als 10 % der Zellen nachgewiesen.

Alle Behandlungen führten zu einer Abnahme von Treg (Abb. 12).

Insgesamt zeigt sich, dass sowohl die Vakzine-Monotherapie als auch Chemo-Vakzine zur Modulation des Immunsystems führt, welche u.a. charakterisiert durch einen Anstieg an T-Zellen und Abnahme regulatorischer Zellen, sowie Immuncheckpoint-Molekülen auf der Zelloberfläche. Diese Veränderungen stehen somit in direktem Zusammenhang mit der Therapie.

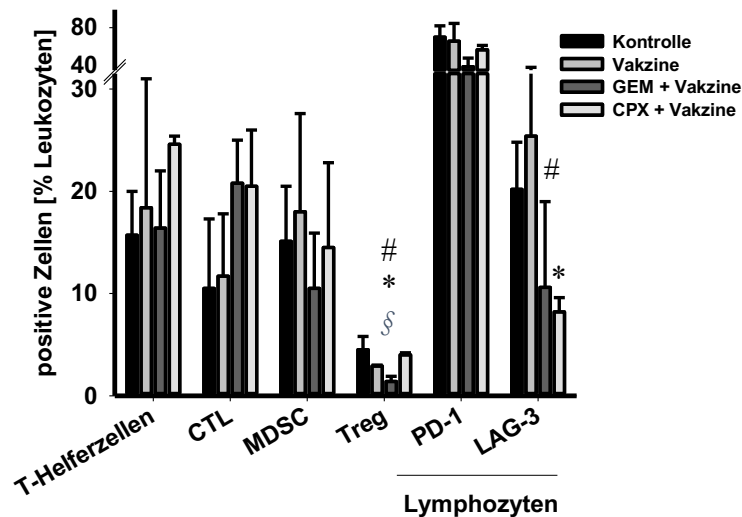


Abbildung 12 Immunphänotypisierung der Milz in der Prophylaxe.

Quantitative Darstellung des Anteils positiver Zellen von Tieren nach prophylaktischer Chemo-Immuntherapie (GEM + Vakzine; CPX + Vakzine) im Vergleich zu Tieren, die eine Vakzine-Monotherapie erhielten, sowie Kontrolltieren (Gemcitabin bzw. keine Intervention). Die Messung erfolgte im Durchflusszytometer. Pro Messung wurden 20.000 Ereignissen erfasst. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD; $N = 4 - 7$ Tiere/Gruppe. * $p < 0.05$ vs. Kontrolle; # $p < 0.05$ vs. Vakzine; § $p < 0.05$ vs. CPX + Vakzine; (Holm Sidak Methode)

In Ergänzung zu der durchflusszytometrischen Phänotypisierung wurden Zytokine aus Blutplasma zum Versuchsende erfasst. In Abb. 13 dargestellt sind IL-6 (von Monozyten und Makrophagen sezerniert), IL-10 (von Treg und Th2-Zellen sezerniert) und IL-13 (von Th2 sezerniert). Die Vakzine-Monotherapie und die Chemo-Vakzine mit Gemcitabin reduzierte im Vergleich zur Kontrolle die Sekretion von IL-6 und IL-10 und führte zur erhöhten IL-13 Produktion. Demgegenüber wurden nach Chemo-Immuntherapie mit CPX erhöhte Level an IL6 nachweisbar. IL13 zeigte ein inverses Profil, dieses Th2-

Zytokin war gegenüber Kontrolltieren nicht erhöht. Betrachtet man diese drei Interleukine im Einzelnen, unter Berücksichtigung der Klinik, und vergleicht die Zytokinlevel bei tumorfreien und tumortragenden Tieren, so sind die Unterschiede deutlicher ausgeprägt. Mäuse, die erfolgreich prophylaktisch behandelt wurden, haben deutlich niedrigere IL6, IL10 und IL13-Level als Mäuse, die Tumoren entwickelt haben (Abb. 13, unten).

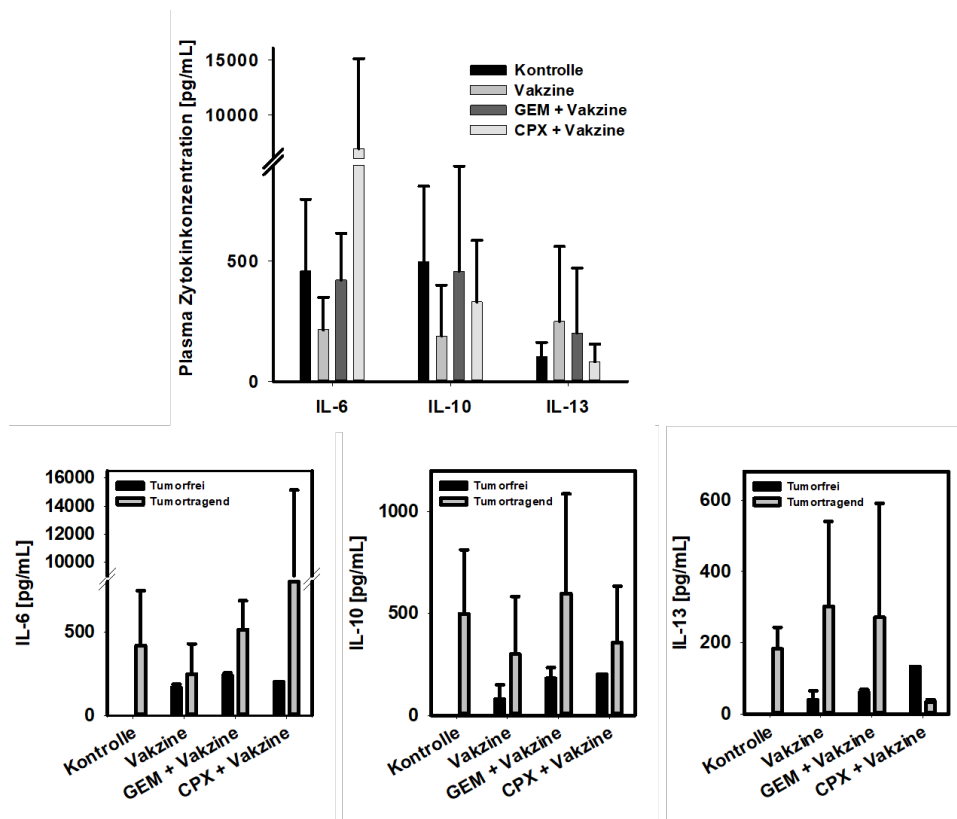


Abbildung 13 Plasmazytokinlevel von $MLH1^{-/-}$ Mäusen in der Prophylaxe.

Oben: Quantitative Analyse von IL-6, IL-10 und IL-13 im Blutplasma von Tieren nach prophylaktischer Chemo-Immuntherapie (GEM + Vakzine; CPX + Vakzine) im Vergleich zu Tieren, die eine Vakzine-Monotherapie erhielten, sowie Kontrolltieren (Gemcitabin bzw. keine Intervention). Unten: Darstellung unterschiedlicher Zytokinlevel zwischen tumorfreien und tumortragenden Tieren. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD; $N = 3 - 4$ Tiere/Gruppe.

5.3 Therapeutische Chemo-Immuntherapie

Die therapeutische Chemo-Vakzine wurde ausschließlich an Tieren durchgeführt, die GIT entwickelten. Bei Tumorverdacht wurde bei Mäusen, welche über 30 Wochen alt waren, ein PET/CT durchgeführt. Bei Bestätigung der Diagnose wurde die Therapie begonnen. Ausgehend von den Vorbefunden in der prophylaktischen Situation, wurde für die therapeutische Chemo-Immuntherapie das Zytostatikum Gemcitabin verwendet. Hierbei erhielten die Tiere einmalig 24 h vor der ersten Vakzine Gemcitabin, gefolgt von

repetitiven Gaben des Vakzins. Dieses wurde viermal wöchentlich und danach im 14-tägigen Rhythmus acht weitere Male appliziert.

5.3.1 Tumorwachstum und Überleben

Vor Beginn und im Verlauf der Therapie wurden Tumorwachstum und die Anzahl der Tumorherde im Abdomen mit Hilfe des ^{18}F -FDG PET/CT untersucht, um die Größe (Volumen) und Anzahl der einzelnen Tumoren zu quantifizieren.

Aufgrund des progredienten Wachstums wurde bei Kontrolltieren nur ein initiales PET/CT durchgeführt, eine Verlaufsmessung erfolgte ausschließlich bei den Therapiegruppen. Diese wurden vor Beginn der Untersuchungen randomisiert. $\text{MLH1}^{-/-}$ Mäuse, die eine Vakzine-Monotherapie erhielten, hatten vor Therapiebeginn im Durchschnitt $3,5 \pm 1,7$ Tumorknoten. Das mittlere Tumolvolumen betrug $93,4 \pm 74,8 \text{ mm}^3$. Eine ähnliche Verteilung zeigte sich auch in der Chemo-Immuntherapie-Gruppe. Im Durchschnitt konnten $3,0 \pm 1,7$ Tumorknoten bei den Mäusen nachgewiesen werden, welche ein mittleres Volumen von $110,1 \pm 90,6 \text{ mm}^3$ hatten.

Die wiederholten PET/CT-Untersuchungen nach 28 bis 40 Tagen zeigten ein vergleichbares Ergebnis bei beiden Therapiegruppen (Abb. 14). Sowohl die Vakzine-Monotherapie, als auch die Chemo-Immuntherapie führte zur partiellen Remission um 31 % bzw. 26 %. Bei einem Tier kam es durch die Chemo-Immuntherapie zur kompletten Remission, welche bis zum Versuchsende (über 40 Wochen) aufrechterhalten blieb.

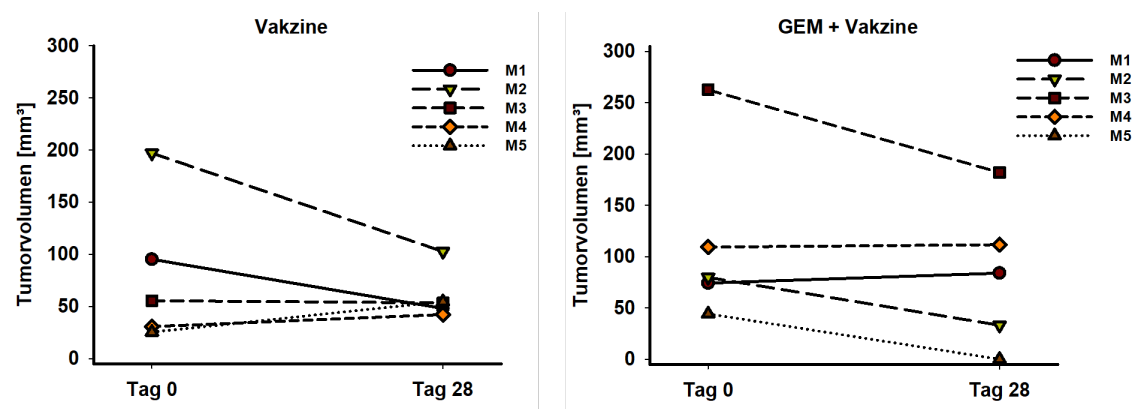


Abbildung 14 Quantitative Analyse des Tumolvolumen [mm^3] von $\text{MLH1}^{-/-}$ Mäusen in der Therapie.

Das Tumorwachstum und die Anzahl der Tumorherde im Abdomen wurden mit Hilfe des ^{18}F -FDG PET/CT quantifiziert. Die Messung erfolgte vor Therapiebeginn (= Tag 0), sowie im Verlauf bei Tieren nach therapeutischer (Chemo-)Immuntherapie (Vakzine, GEM + Vakzine) ($N = 5$ Tiere/Gruppe). links: Vakzine-Monotherapie; rechts: Chemo-Immuntherapie; M – Maus.

5.3.2 Überlebenszeitanalyse

Die Überlebenszeit der Therapietiere wurde mit Hilfe der Kaplan-Meier-Überlebenskurve dargestellt. Die Befunde der PET/CT, hinsichtlich des Tumorwachstums, resultierten in ein verlängertes Gesamtüberleben beider Therapiegruppen, im Vergleich zu den Kontrolltieren, welche innerhalb von fünf Wochen nach Diagnosestellung verstarben. Sowohl beim Vergleich der Kontrolle mit der Vakzine-Monotherapie, als auch der Kontrolle mit der Chemo-Vakzine liegt $p < 0,05$ (Abb. 15). Somit ist ein statistisch signifikanter Unterschied mit einem Signifikanzniveau bei 5 % erbracht.

Beim direkten Vergleich beider Therapien zeigt sich zunächst kein Überlebensvorteil durch die Kombination innerhalb der ersten 15 Wochen nach Therapiebeginn. Betrachtet man jedoch den Gesamtversuchszeitraum, so ist das Langzeitüberleben bei Tieren, die die Chemo-Vakzine erhielten mit bis zu über 40 Wochen verbessert.

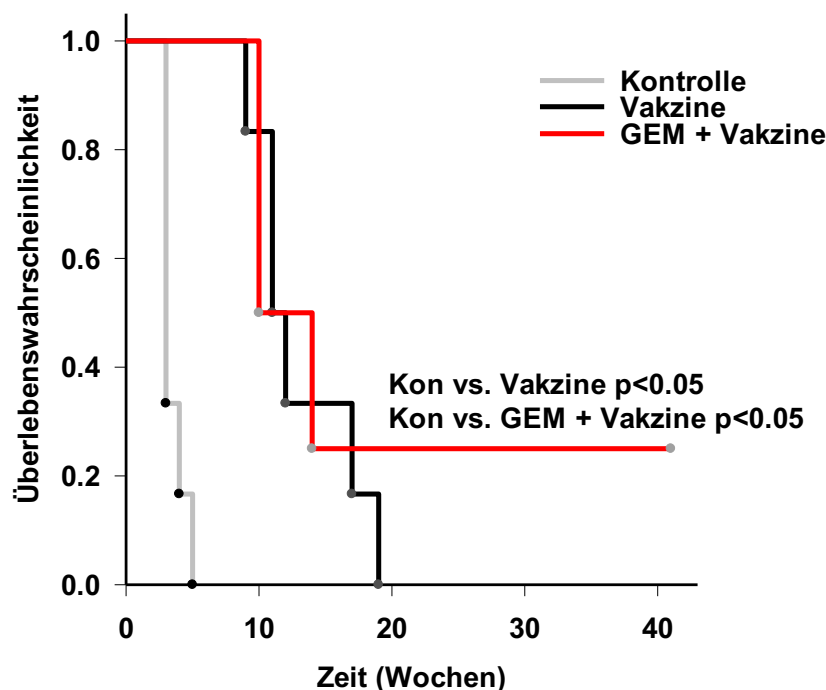


Abbildung 15 Kaplan-Meier Überlebenskurve in der Log rank Analyse von *MLH1*^{-/-} Mäusen in der Therapie.

Tiere mit gesicherten GIT erhielten entweder eine Chemo-Immuntherapie ($N = 5$), bestehend aus einer einmaligen Gabe Gemcitabin (100 mg/kg KG, i.p.) 24 h vor der ersten Vakzine (10 mg/kg KG, s.c.) oder ausschließlich die Vakzine (10 mg/kg KG, s.c.). Den Kontrolltieren wurde einmalig Gemcitabin (100 mg/kg KG, i.p.) ($N = 3$) appliziert bzw. keine Intervention vorgenommen ($n = 5$). Die Tiere wurden anhand von definierten Abbruchkriterien (humane Endpunkte) getötet. Diese umfassen u.a. eine Gewichtsreduktion $\geq 15\%$; rektale Blutung, sowie stark verändertes Sozialverhalten, welche Anzeichen für eine Schmerzsymptomatik darstellen.

5.3.3 Immunmonitoring

Der Immunstatus der Tiere wurde regelmäßig während der Therapie und am Endpunkt erfasst. Aufgrund der kurzen Überlebenszeit der Kontrolltiere erfolgte nur ein direkter Vergleich zwischen den beiden Therapiegruppen. Ziel war es, die Veränderungen im Blut und somit die Auswirkung der Therapie auf das Immunsystem zu dokumentieren.

Unter der Vakzine-Monotherapie kam es zu einem kontinuierlichen Anstieg der CD3⁺/CD8⁺ CTL, der MDSC und einer Hochregulation von PD-L1 auf Lymphozyten (Abb. 16). Durch die Chemo-Vakzine wurde im Blut eine signifikant verringerte Anzahl an zirkulierenden MDSC, sowie PD-L1 und LAG-3 positiven Immunzellen nachgewiesen. Die CD3⁺/CD8⁺ CTL stiegen im Verlauf der Therapie bis zum Endpunkt deutlich an. Zum Versuchsende wurde im Blut beider Therapiegruppen vermehrt LAG-3 detektiert.

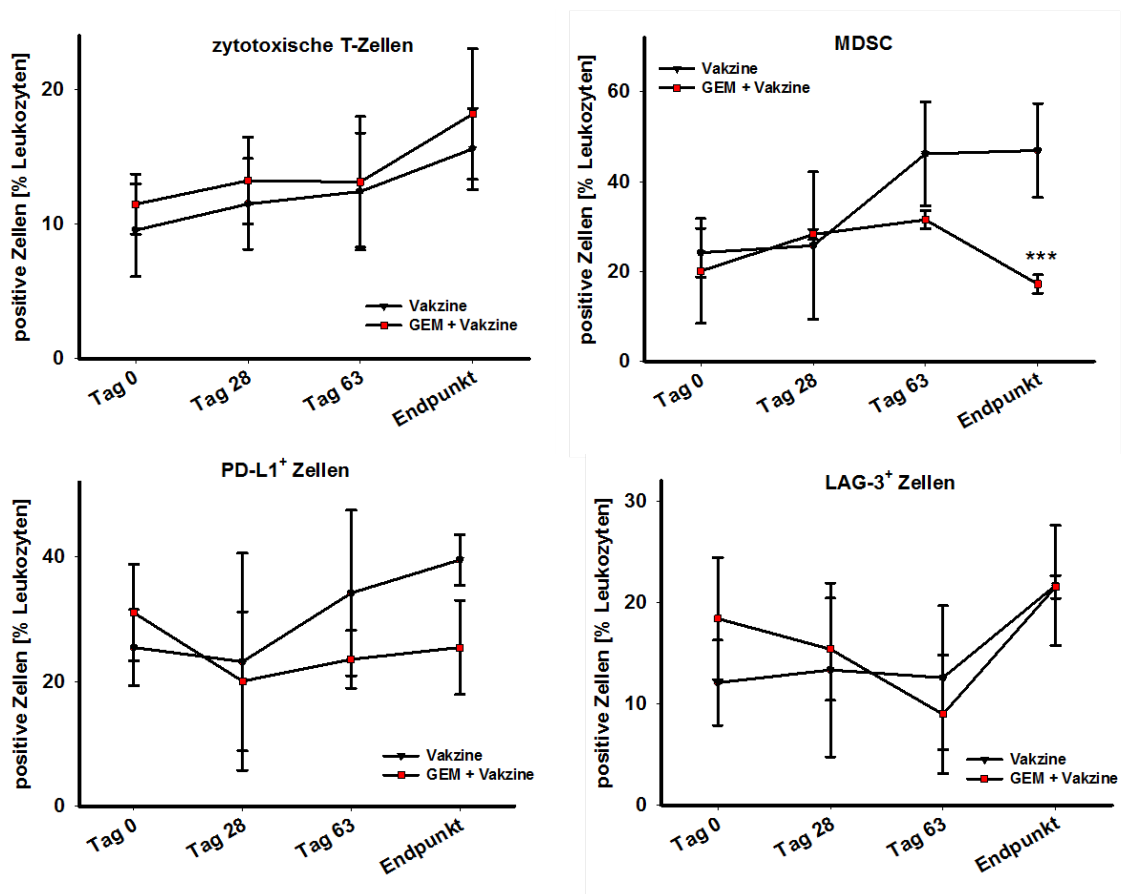


Abbildung 16 Immunphänotypisierung des peripheren Blutes von MLH1^{-/-} Mäusen in der Therapie.

Quantitative Darstellung des Anteils positiver Zellen von Tieren nach therapeutischer Chemo-Immuntherapie (GEM + Vakzine) im Vergleich zu Tieren, die ausschließlich mit Tumorstellen geimpft wurden. Die Untersuchung des Immunstatus wurde regelmäßig während der Therapie und am Endpunkt durchgeführt. Die Messung erfolgte im Durchflusszytometer. Pro Messung wurden 20.000 Ereignisse erfasst. Angegeben sind die Mittelwerte ± SD. N = 4 – 7 Tiere/Gruppe. *** $p < 0.001$ vs. Kontrolle; T-test

In ergänzenden Analysen erfolgte die Immunphänotypisierung der Milz nach Versuchsabschluss. Es wurde ein ähnlicher Immunphänotyp, wie im Blut, nachgewiesen. Milzzellen der Kontrolltiere hatten ca. 25% T-Zellen und ca. 5% Treg. Immuncheckpoint-Moleküle wie PD-1 und LAG-3 waren ebenfalls auf Lymphozyten nachweisbar (Abb. 17). Infolge der Vakzine-Monotherapie war die Anzahl der T-Helferzellen und CTL etwas höher, als in der Kontrollgruppe. MDSC waren ebenfalls leicht erhöht und der Anteil an Treg leicht reduziert. Die Chemo-Vakzine erzielte ähnliche Effekte, mit signifikant mehr infiltrierenden T-Zellen ($CD3^+CD4^+$ und $CD3^+CD8^+$). Die MDSC und die Treg wiederum wurden durch die kombinierte Gabe deutlich gesenkt (Abb. 17). Keine der beiden Therapien hatten einen Einfluss auf die Abundanz von Immuncheckpoint-Molekülen (PD-L1 und LAG-3).

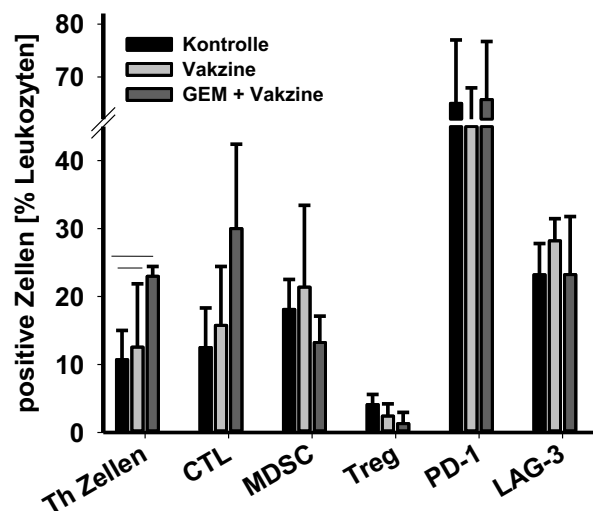


Abbildung 17 Immunphänotyp der Milz von $MLH1^{-/-}$ Mäusen in der Therapie.

*Quantitative Darstellung des Anteils positiver Zellen von Tieren nach therapeutischer Chemo-Immuntherapie (GEM + Vakzine), im Vergleich zu Tieren, die ausschließlich mit Tumorstellen geimpft wurden bzw. keine Intervention erhielten. Die Untersuchung des Immunstatus wurde am Endpunkt durchgeführt. Die Messung erfolgte im Durchflusszytometer. Pro Messung wurden 20.000 Ereignissen erfasst. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD; $N = 5 - 7$; $*p < 0.05$ vs. Kontrolle; one-way ANOVA (Holm Sidak Methode).*

Das zum Versuchsende gewonnene Plasma wurde nachfolgend weiter untersucht, um die Plasmakonzentrationen unterschiedlicher Zytokine zu bestimmen. Dabei zeigten sich, einhergehend mit den *in vivo* Befunden, Unterschiede zwischen den Kontroll- und Therapietieren (Abb. 18). Beide Therapieschemata führten zu einer verminderten Produktion des antiinflammatorischen und von Th2-Zellen sezernierten IL10. Ähnliches gilt für IL-13, sowie die CC-Chemokine Eotaxin und RANTES (*regulated and normal T cell*

expressed and secreted), welche von CD8⁺ CTL und neutrophilen bzw. eosinophilen Granulozyten sezerniert werden. *Monocyte chemotactic protein 1* (MCP1) wird von Monozyten, T-Gedächtniszellen und DC sezerniert und war in beiden Therapiegruppen erhöht. Dies war besonders bei der alleinigen Vakzinetherapie zu erkennen. MCP1 induziert die Migration von Monozyten, NK-Zellen und DC in Gewebe.

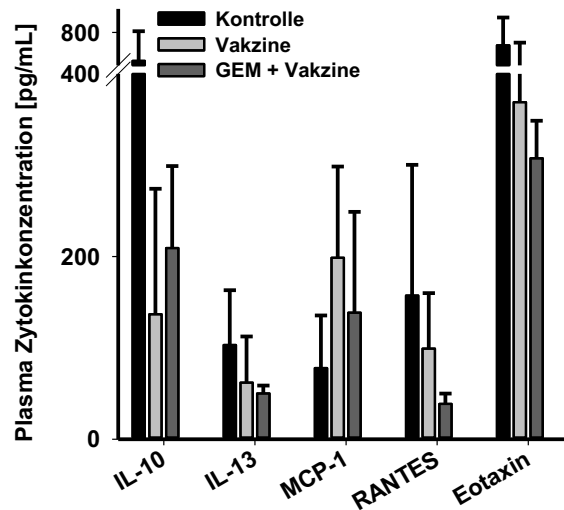


Abbildung 18 Plasmazytokinkonzentrationen von *MLH1*^{-/-} Mäusen in der Therapie.

Quantitative Darstellung von IL-10, IL-13, MCP-1, RANTES und Eotaxin nach therapeutischer Chemo-Immuntherapie (GEM + Vakzine) im Vergleich zu Tieren, die ausschließlich mit Tumorstellen geimpft wurden bzw. keine Intervention erhielten. Die Erhebung der Zytokinlevel erfolgte am Endpunkt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD; N = 3 - 5 Tiere/Gruppe.

5.3.4 ELISpot IFN γ -Assays

Um die Spezifität der antitumoralen Immunantwort zu untersuchen, wurde die antigen-induzierte Freisetzung von IFN γ aus Splenozyten nach Ko-Kultivierung mit malignen Zellen (*MLH1*^{-/-} A7450 T1 M1, *MLH1*^{-/-} 328, *MLH1*^{-/-} 1351) mittels ELISpot bestimmt. Zusätzlich wurden YAC-1 Zellen als Zielzellen eingesetzt, um die NK-Zellreaktivität nachzuweisen bzw. auszuschließen.

Splenozyten der Kontrolltiere zeigten eine geringe Reaktivität gegenüber allen *MLH1*^{-/-} Zielzellen, welche nur schwach höher war, als gegen YAC-1 Zellen. Somit war die spontane Reaktivität primär auf NK-Zellen zurückzuführen. Infolge der Vakzine-Monotherapie wurde eine erhöhte Reaktivität gegen alle Zielzellen detektiert (Abb. 19). Diese war insbesondere nach Ko-Kultur mit *MLH1*^{-/-} 328 Zellen und *MLH1*^{-/-} 1351 Lymphomzellen deutlich ausgeprägt. Lymphozyten aus Tieren, welche die Chemo-Vakzine erhielten, reagierten mit deutlich stärkerer IFN γ -Freisetzung nach Ko-Kultur mit *MLH1*^{-/-} 328 und

MLH^{-/-} A7450 T1 M1 Zellen und erkannten somit Zielantigene auf den Epithelzellen gastrointestinalen Ursprungs. NK-Zellreaktivitäten wurden nicht detektiert.

Die Reaktivität der Splenozyten insbesondere gegen MLH^{-/-} A7450 T1 M1 und MLH^{-/-} 328 Zellen lässt darauf schließen, dass die Tumorzellen ähnliche Tumor-spezifische Antigene als Zielstruktur für die Lymphozyten aufweisen. Durch die Kombinationstherapie konnten mehr Antigen-spezifische T-Zellantworten induziert werden, als durch die alleinige Vakzine.

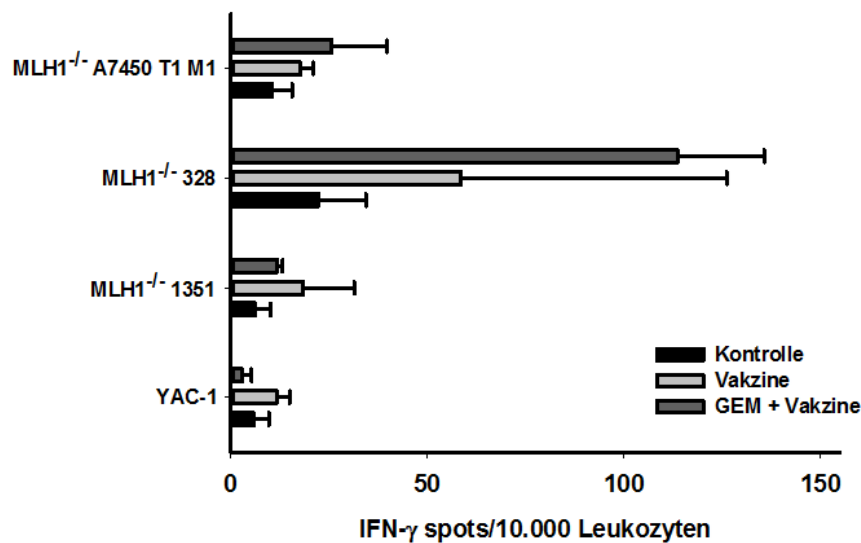


Abbildung 19 ELISpot IFN γ -Assay zum Nachweis Antigen-spezifischer Immunantworten.

Splenozyten (= Effektorzellen) wurden mit vier verschiedenen Tumorzelllinien (MLH^{-/-} A7450 T1M1, MLH^{-/-} 328, MLH^{-/-} 1351, YAC-1) ko-kultiviert und anschließend die Anzahl INF γ -sezernierender Zellen bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD; N = 5 Tiere/Gruppe.

5.4 Veränderungen des Tumormikromilieus

Gewonnene Tumorpräparate von prophylaktisch und therapeutisch behandelten Tieren wurden weiter prozessiert, um die lokalen Veränderungen im Tumormikromilieu näher zu untersuchen. Hierzu wurden Gewebeschnitte mithilfe der Immunfluoreszenz analysiert.

Von besonderem Interesse war es, sowohl die Art der infiltrierenden Lymphozyten, als auch deren Anzahl im Tumor zu erfassen und so potentiell Rückschlüsse auf eine erfolgreiche Rekrutierung immunologischer Effektorzellen nach Therapie zu erhalten. Die für Tumoren typischen *Escape-Mechanismen* und die damit verbundene Immuntoleranz dem Tumor gegenüber, sollten durch die Therapie reduziert bzw. im Idealfall aufgehoben

werden. Unter Einsatz spezifischer Antikörper konnten Zellen im Präparat dargestellt und quantifiziert werden.

5.4.1 Tumormikromilieu nach prophylaktischer (Chemo-) Vakzine

MLH1^{-/-}-assoziierte Tumoren zeigen eine natürliche Infiltration, insbesondere von MDSC (Abb. 20). Der Anteil CTL und T-Helferzellen ist demgegenüber gering. Durch die prophylaktische Vakzine waren die Tumoren stark mit CD11c⁺ DC infiltriert, NK-Zellen und CTL waren kaum nachweisbar (Abb. 20).

Die Präkonditionierung mit Gemcitabin vor der Vakzine resultierte in eine erhöhte Infiltration von CD11c⁺ DC, bei gleichzeitiger Reduktion CD11b⁺ Makrophagen und Elimination von MDSC. CTL waren vereinzelt detektierbar, NK-Zellen wurden nicht erfasst. Ein ähnliches Bild zeigte die Kombinationstherapie aus CPX und Vakzine. Wobei der Anteil infiltrierender NK-Zellen im Vergleich zur GEM-Vakzin-Kombination geringer war. Ähnliches gilt für CD11c⁺ DC.

PD-L1⁺-Zellen wurden insbesondere nach kombinierter Chemo-Vakzine, sowohl mit Gemcitabin, als auch CPX nachgewiesen.

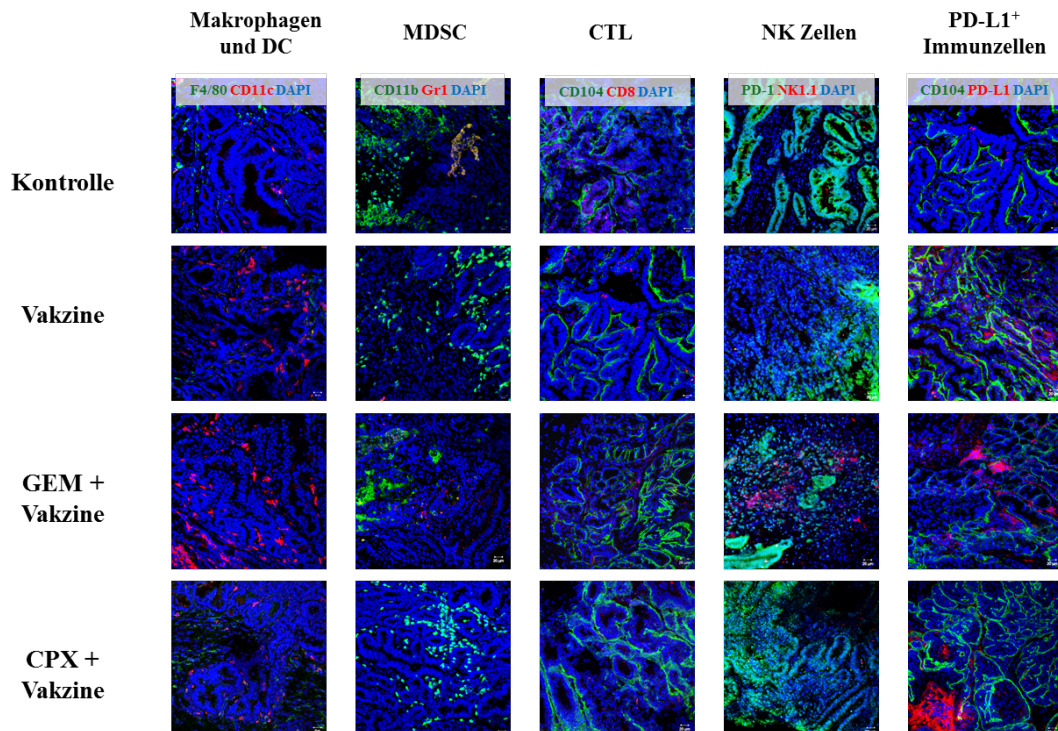


Abbildung 20 Fluoreszenzmikroskopie von GIT-Präparaten aus *MLH1*^{-/-} Mäusen in der Prophylaxe.

Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von vier μm Dünnschnittpräparaten nach prophylaktischer Chemo-Immuntherapie (GEM + Vakzine; CPX + Vakzine) im Vergleich zu Tieren, die eine Vakzine-Monotherapie erhielten, sowie Kontrolltieren (Gemcitabin bzw. keine Intervention). DAPI - Kernfärbung. Die Aufnahmen erfolgten am konfokalen Laserscanning Mikroskop (Zeiss). Originalvergrößerung 20x. DC – dendritische Zellen; MDSC – myeloide Suppressorzellen; CTL – zytotoxische T-Zellen; NK – natürliche Killerzellen.

5.4.2 Tumormikromilieu nach therapeutischer (Chemo-) Vakzine

Sowohl die Vakzine-Monotherapie, als auch die Chemo-Vakzine führten zu einer verstärkten Immunzellinfiltration. In beiden Therapiegruppen kam es zu einem Anstieg an infiltrierenden CD4^+ und CD8^+ T-Zellen, letztere insbesondere nach vorangegangener Chemo-Immuntherapie (Abb. 21). Interessanterweise führten beide Therapieschemata aber auch zu einer Hochregulation von LAG-3^+ und PD-L1^+ auf den Lymphozyten. $\text{CD11b}^+\text{PD-L1}^+$ myeloide Zellen, die vermutlich suppressiv wirken, wurden ausschließlich nach Vakzine-Monotherapie detektiert. Weitere Unterschiede konnten hinsichtlich der infiltrierenden MDSC ($\text{CD11b}^+\text{Gr1}^+$) identifiziert werden. Durch die Vakzine-Monotherapie reduzierte sich die Anzahl auf $6,3 \pm 6,9$ Zellen/Gesichtsfeld (vs. Kontrolle: $53,1 \pm 63,1$ Zellen/Gesichtsfeld). Dieser Effekt war nach kombinierter Chemo-Vakzine noch deutlicher ausgeprägt, mit lediglich $2,0 \pm 3,8$ Zellen/Gesichtsfeld. Bei den noch residuellen myeloiden Zellen handelte es sich Großteils um Gr1^+ , CD11b^- Granulozyten. Die

CD11b⁺ Zellen exprimierten kein PD-L1 auf der Oberfläche. Die Infiltration von CD11c⁺ DC stieg nach der Vakzine-Monotherapie auf $107,5 \pm 70,1$ Zellen/Gesichtsfeld und auf $58,2 \pm 31,1$ Zellen/Gesichtsfeld nach der Chemo-Vakzine (vs. Kontrolle: $45,0 \pm 16,5$ Zellen/Gesichtsfeld). Hingegen führten beide Therapieschemata zu einer tendenziellen Abnahme F4/80⁺ Tumor-assoziiierter Makrophagen (Abb. 21 und 22).

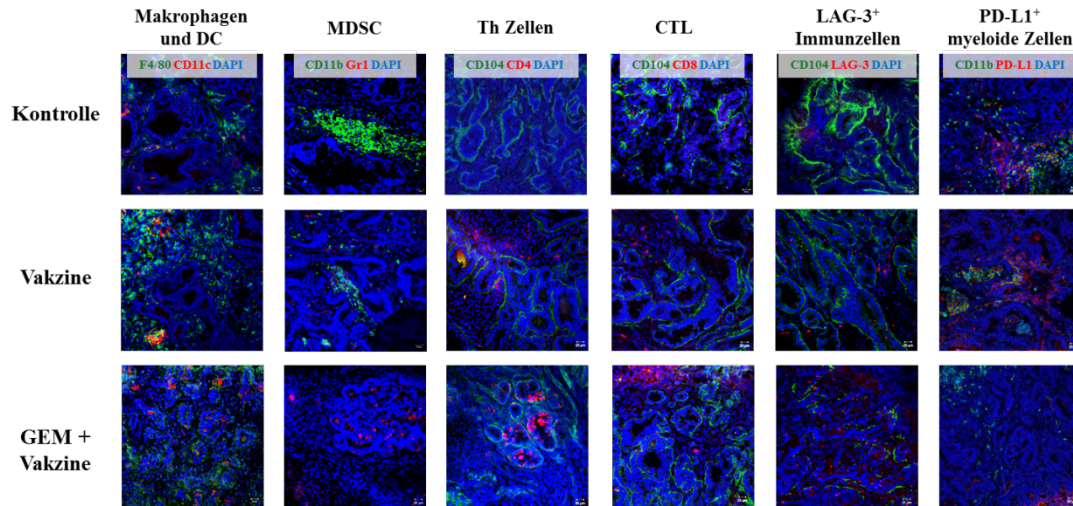


Abbildung 21 Fluoreszenzmikroskopie von GIT-Präparaten aus *MLH1*^{-/-} Mäusen in der Therapie.

Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von 4 μ m Dünnschnittpräparaten nach therapeutischer Chemo-Immuntherapie (GEM + Vakzine) im Vergleich zu Tieren, die ausschließlich mit Tumorstellen geimpft wurden, bzw. keine Intervention erhielten. DAPI - Kernfärbung. Die Aufnahmen erfolgten am konfokalen Laserscanning Mikroskop (Zeiss). Originalvergrößerung 20x. DC – dendritische Zellen; MDSC – myeloide Suppressorzellen; CTL – zytotoxische T-Zellen; NK – Natürliche Killerzellen.

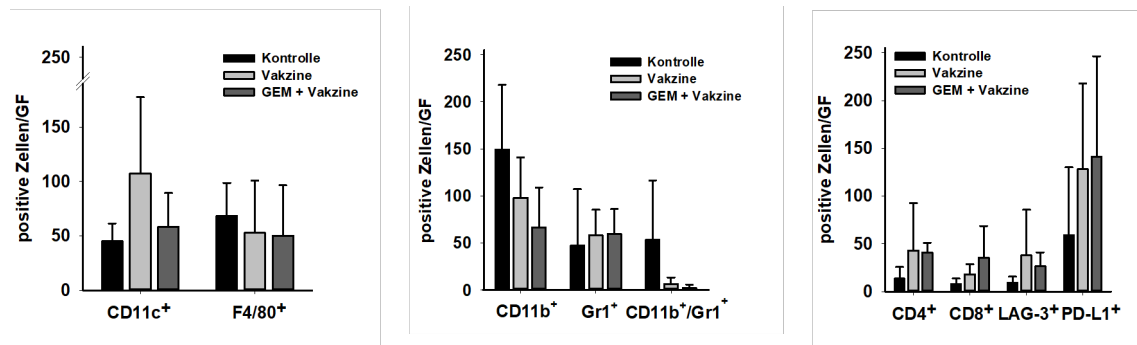


Abbildung 22 Quantitative Analyse des Anteils Tumor-infiltrierender Zellen.

GIT-Präparate von *MLH1*^{-/-} Mäusen nach therapeutischer Chemo-Immuntherapie (GEM + Vakzine) im Vergleich zu Tieren, die ausschließlich mit Tumorstellen behandelt wurden bzw. keine Intervention erhielten (N = 3 – 5 Tiere/Gruppe). Dargestellt ist die Anzahl positiver Zellen/Gesichtsfeld. Die Daten wurden in fünf unterschiedlichen Feldern erhoben. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD.

5.5 Nachweis von MSI im Tumorgewebe

Bei Vorliegen einer MMR-D kommt es zu Längenveränderungen in MS, welche nicht korrigiert werden können (=MSI). MSI ist ein molekularer Marker für die Diagnose des Lynch Syndroms, sowie sporadischen MMR-D-assoziierten CRC. Neben der hohen Sensitivität und Spezifität bei MMR-D Tumoren, ermöglichen die MSI-Marker die Einteilung in MSI-H, MSI-L und MSS, was wiederum für die Prognosebestimmung ein wichtiger Faktor ist. Für das murine System sind bereits einige Marker, sowohl in kodierenden, als auch nicht-kodierenden Genabschnitten, bekannt und wurden als pathogenetisch relevant für MMR-D Tumoren beschrieben (110–113). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde (I) einerseits das Mutationsspektrum kodierender MS-Marker in *MLH1*^{-/-}-assoziierten Tumoren erfasst und (II) zusätzlich neue Marker identifiziert, welche Relevanz in der murinen Tumorgenese haben. In die Fragmentlängenanalyse wurden insgesamt 44 Marker eingeschlossen, das Mutationsspektrum wurde an insgesamt 109 Tumoren unterschiedlichen Ursprungs (GIT, Lymphome) untersucht.

5.5.1 Nachweis von MSI in nicht-kodierenden Markern zur Bestätigung der Diagnose

Da die nicht-kodierenden Abschnitte den Großteil des menschlichen Genoms ausmachen und auch besonders anfällig für Mutationen sind, dienen die Marker in nicht-kodierenden Genabschnitten als interne Qualitätskontrolle und ergänzend zu den histologischen Analysen zur Sicherung der Diagnose. Mononukleotidrepeats sind anfälliger für Mutationen als Dinukleotidrepeats. Dies zeigte sich auch bei den insgesamt zehn untersuchten Markern (repräsentative Darstellung in Abb. 23). Zu den Mononukleotidrepeats zählen beispielsweise *Bat30* (A₃₀ Wiederholungen; 91,2% MSI), *Bat59* (A₅₉ Wiederholungen; 98,0% MSI), *Bat26* (A₂₆ Wiederholungen; 96,2% MSI) und *U12235* (A₂₄ Wiederholungen; 63,0% MSI). Ebenfalls zeigt sich, dass die Repeatlänge mit dem Ausmaß an MSI korreliert. Als Dinukleotidmarker wurden *D1Mit79* (CA₃₁ Wiederholungen; 47,7% MSI) und *D15Mit93* (CA₃₂ Wiederholungen; 28,8% MSI) untersucht. Darüber hinaus zeigten sich Unterschiede zwischen Lymphomen und GIT. Während die Marker *D1Mit79* und *D15Mit93* bei 22,9% und 17,4% der Lymphome eine MSI aufwiesen, konnte bei 23,0% und 10,1% der analysierten GIT eine MSI nachgewiesen werden.

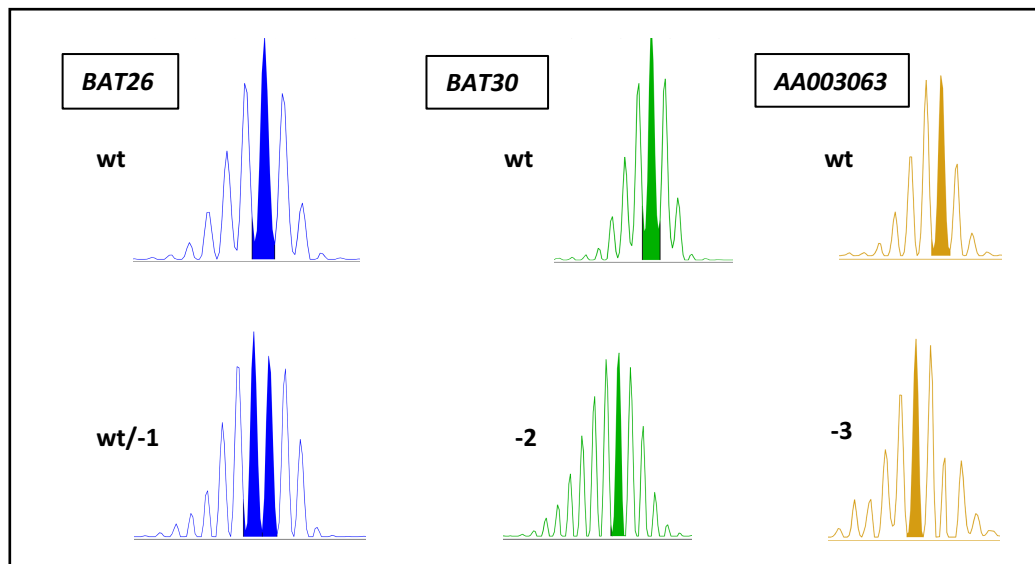


Abbildung 23 MSI Analyse der *MLH1*^{-/-} Tumoren mit nicht-codierenden Markern.

Repräsentative Darstellung von drei nicht-kodierenden MS-Markern (*BAT26*, *BAT30*, *AA003063*). Die charakteristischen, teilweise biallelischen Deletionen sind der Wildtyp-DNA gegenübergestellt. (dargestellt mit „minus“ + Zahl der Shifts). wt – Wildtyp; - – Deletion.

5.5.2 Detektion von MSI in kodierenden Mikrosatelliten

Wir untersuchten an 109 *MLH1*^{-/-} Mäusen 28 Marker in kodierenden Genabschnitten, deren Mutationsfrequenz in einer vorangegangenen Studie bereits erfasst wurde (113). Durchschnittlich lag bei 17% der getesteten Marker eine Mutation in den kodierenden MS vor. Deletionen wurden häufiger detektiert als Insertionen.

Die Häufigkeit der MSI unterschied sich zwischen den Markern. Betrachtet man die Gesamtzahl untersuchter Tumoren (GIT und Lymphome), so wurden einige Entitäten-übergreifende kodierende MS Mutationen, sogenannte *shared mutations* nachgewiesen. Zu den am häufigsten mutierten Markern zählen *Phactr4* (25,7%), *Senp6* (37,6%), *Sdccag1* (41,1%), *Rasal2* (41,7%) und *Rfc3* (65,6%) vor.

Die Subgruppenanalyse lässt Unterschiede zwischen GIT und Lymphomen erkennen. GIT hatten häufiger Mutationen in den kodierenden MS von *Senp6*, *Phactr4* und *Rfc3*. Bei den Lymphomen wurden demgegenüber hauptsächlich Mutationen in *Tmem60*, *Sdccag1* und *Rasal2* identifiziert. Dies ist in Übereinstimmung mit dem unterschiedlichen klinischen Verlauf und der entsprechend differenten Organmanifestation.

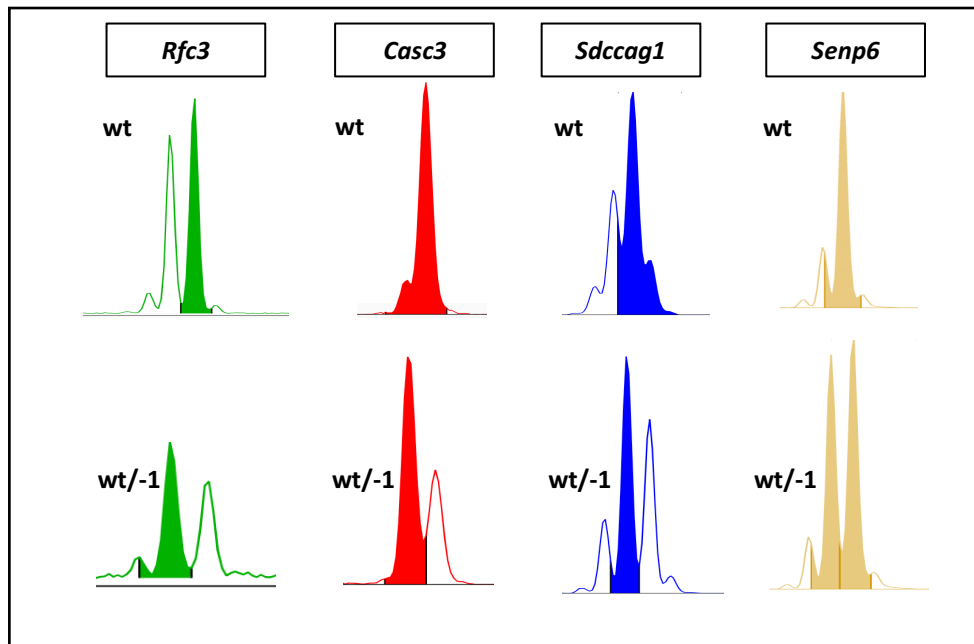


Abbildung 24 MSI Analyse der $MLH1^{-/-}$ Tumoren mit codierenden Markern.

Repräsentative Darstellung von kodierenden MS Markern. Typisch für die kodierenden Genabschnitte sind monoallelische Deletionen (ein Allel Wildtyp / Deletion des zweiten Allels). wt – Wildtyp; - – Deletion.

5.5.3 Identifikation neuer Marker mit potentieller Relevanz für die Tumorgenese

Um das Spektrum der Marker für MSI zu erweitern, wurde das Mutationsprofil von fünf neuen kodierenden MS-Markern zunächst an den drei etablierten $MLH1^{-/-}$ Zelllinien A7450 T1 M1, 328 und 1351, sowie nachfolgend an 55 primären $MLH1^{-/-}$ Tumoren untersucht.

Aufgrund des hohen Anteils an Tumorzellen eignen sich etablierte Zelllinien, die grundlegend molekular charakterisiert sind, im Gegensatz zu Primärtumoren gut zur Identifikation neuer Mutationen in kodierenden MS Markern. In den vorliegenden Untersuchungen konnte bei allen fünf Markern, in mindestens einer Linie eine Frameshiftmutation nachgewiesen werden (Tab. 10). Alle drei Zelllinien tragen eine *Akt3* (*AKT serine/threonine kinase 3*) Mutation, welche sehr wahrscheinlich pathogenetisch relevant ist. Darüber hinaus wurde bei 2/3 Linien eine *Interleukin 1 Familien Mitglied 9* (interleukin-1 family member 9; *Il1f9* oder *IL-36γ*), (A_{10} repeat), bzw. *split ends* (*Spen*), (A_8 repeat), Mutation detektiert.

Tabelle 10: Identifikation von Mutationen innerhalb neuer kodierender MS-Marker bei *MLH1*^{-/-} Tumorzellen.

	<i>Dnaja2</i>	<i>Il1f9</i>	<i>Clock</i>	<i>Akt3</i>	<i>Spen</i>
MLH1^{-/-} A7450 T1M1	wt	wt/-1	wt	wt/-1	wt
MLH1^{-/-} 328	wt	wt	wt	wt/-1	wt/-1
MLH1^{-/-} 1351	wt/-1	wt/-1	wt/-1	wt/-1	wt/-1

Dargestellt ist die Mutationsfrequenz der einzelnen Marker an den drei Zelllinien (*MLH1*^{-/-} A7450 T1 M1, *MLH1*^{-/-} 328, *MLH1*^{-/-} 1351). wt – Wildtyp; - – Deletion.

Anschließend wurde die Fragmentlängenanalyse an 55 *MLH1*^{-/-} Tumoren (38 GIT, 15 Lymphome und zwei Andere) durchgeführt, um zu überprüfen, ob die detektierten Mutationen in den Markern *DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member C2 (DNAJC2)*, *IL1F9*, *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput (Clock)*, *Akt3* und *Spen* auch im Primärgewebe nachweisbar sind. Untersucht wurden sowohl therapierte Mäuse, als auch Kontrollmäuse. Insgesamt wurden GI-Tumorproben von 21 Kontrolltieren, sechs Tieren der Prophylaxe (3 x Vakzine, 2 x Gemcitabin + Vakzine, 1 x CPX + Vakzine) und elf Tieren der Therapiegruppen (3 x Vakzine, 5 x Gemcitabin + Vakzine, 3 x Gemcitabin) untersucht. Proben (N = 15) von Tieren, die ein Lymphom entwickelten, gliederten sich wie folgt: 4 x Kontrolle, 11 x Prophylaxegruppe (7 x Gemcitabin + Vakzine, 4 x Gemcitabin). Hierbei zeigte sich, dass die Mutationen grundsätzlich im Primärgewebe nachweisbar sind, die Mutationsfrequenz jedoch variiert (Tab. 11). In Analogie zu den *in vitro* Befunden der Zelllinien wurde erneut die höchste Mutationsfrequenz in *Akt3* beobachtet. 65,5 % aller Tumoren tragen eine Frameshiftmutation im T₈-Repeat. In Tab. 12 ist die hohe Anzahl an MSI in *Akt3*, sowohl beim GIT, als auch bei Lymphomen in allen Gruppen dargestellt. Ein Drittel aller Tumoren hatte zusätzlich Mutationen in *IL1F9* bzw. *Clock*. Somit sind alle fünf Marker relevant für die *MLH1*^{-/-}-assoziierte murine Tumorgenese.

Tabelle 11: Fragmentlängenanalyse neuer Marker an 55 primären *MLH1*^{-/-} Tumorproben 1.

Art der Mutation/ Frequenz [%]	<i>Dnaja2</i>	<i>Il1f9</i>	<i>Clock</i>	<i>Akt3</i>	<i>Spen</i>
wt/-1	10,3	34,5	29,3	63,8	15,5
wt/-2	1,7	0,0	1,7	0,0	0,0
wt/+1	3,4	0,0	0,0	0,0	0,0
-1	1,7	0,0	0,0	1,7	1,7
1	1,7	0,0	0,0	0,0	0,0
Gesamt	18,8	34,5	31,0	65,5	17,2

Verteilung der einzelnen Tumorproben: GIT (N = 38), Milzlymphome (N = 6), Leberlymphome (N = 6), Thymome (N = 6), Hauttumoren (N = 1), Hals-/Brusttumoren (N = 1). Dargestellt ist die Mutationsfrequenz pro untersuchtem Marker in den 55 Gewebeproben. wt – Wildtyp; - – Deletion; + – Insertion.

Tabelle 12: Fragmentlängenanalyse neuer Marker an 55 primären *MLH1*^{-/-} Tumorproben 2.

MSI Frequenz [%]		<i>Dnaja2</i>	<i>Il1f9</i>	<i>Clock</i>	<i>Akt3</i>	<i>Spen</i>
GIT (n=38)	Kontrolle*	23	43	62	57	24
	Prophylaxe*	17	33	33	50	33
	Therapie*	9	18	9	64	27
Lymphom (n=15)	Kontrolle [#]	0	25	50	75	25
	Prophylaxe [#]	36	45	9	100	9
	Therapie [#]	0	67	0	33	0
Andere (n=2)	Therapie	0	0	0	0	0

Detaillierte Auflistung der MSI Häufigkeit in % in den Gewebeproben von GIT, Lymphom und anderen Tumoren. *Kontrolle (N = 21), *Prophylaxe (N = 6), *Therapie (N = 11), [#]Kontrolle (N = 4), [#]Prophylaxe (N = 11), [#]Therapie (N = 3).

6 Diskussion

MMR-D-assoziierte Tumoren präsentieren eine Vielzahl Tumor-spezifischer Antigene (Frameshiftproteine) auf der Zelloberfläche, die vom Immunsystem erkannt werden (20). Aufgrund der hohen Tumorimmunogenität haben diese Tumoren verschiedene *escape*-Mechanismen entwickelt, um sich dem Immunsystem zu entziehen (89). Folglich zielen immuntherapeutische Konzepte primär auf Reaktivierung bereits präformierter Neoantigen-spezifischer Immunantworten ab, um Tumoren möglichst effektiv zu eliminieren. Ein möglicher Ansatz ist die Applikation Tumor-assoziiierter oder -spezifischer (Neo-) Antigene (aktive Immuntherapie) in Form von Tumorstoffen, um das Immunsystem zu stimulieren. Die Effizienz eines solchen Vakzins bei MMR-D-assoziierten Tumoren konnte in einer vorangegangenen Studie der Arbeitsgruppe an dem MLH1^{-/-} Mausmodell aufgezeigt werden (108). Im Rahmen dieser Vorarbeiten wurde bestätigt, dass die repetitive Gabe eines Gesamtstoffs sowohl die Tumorentstehung, als auch das Tumorstadium, durch Aktivierung des Immunsystems, verzögern. In der vorliegenden Dissertationsschrift sollte dieser Ansatz durch kombiniert Chemo-Immuntherapie weiterentwickelt und verbessert werden.

Die Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert.

6.1 Gemcitabin und Cyclophosphamid als immunmodulatorisch wirksame Chemotherapeutika und deren Anwendbarkeit in Kombination mit Immuntherapie

Untersuchungen zur Wirksamkeit von Arzneimitteln erfolgen typischerweise an Tiermodellen. Jedoch ist die Wirksamkeit einiger Chemotherapeutika nicht direkt vom murinen auf das humane System übertragbar (114).

Unter anderem spielt die Toxizität der Medikamente eine entscheidende Rolle. In einem Report von 2002 wurde die Toxizität an Mensch und Maus, ausgehend von Ergebnissen des *International Life Sciences Institute (ILSI)* und der multinationalen *pharmaceutical company*, verglichen. Hierbei stimmt die Toxizität bei Nagetieren lediglich in 43% der Toxizität beim Menschen überein. Dies beruht auf den biochemischen und physiologischen Unterschieden zwischen Mensch und Nagetier. Insbesondere Unterschiede bei Absorption, Distribution, Metabolismus und Exkretion sind hauptverantwortlich (115,116). Dennoch sind Nagetiermodelle aktuell noch sehr weit verbreitet, um neue Therapiestrategien für Tumorkranke präklinisch zu evaluieren. Dies gilt in identischer Weise für das in dieser Arbeit verwendete MLH1^{-/-} *knockout* Modell, welches ein klinisch

relevantes Modell der MMR-D-assoziierten Tumorgenese darstellt. MMR-D-assoziierte Tumoren treten, wie eingangs bereits beschrieben, sowohl sporadisch als auch hereditär im Kontext des Lynch Syndroms, sowie der CMMR-D auf. Lynch Syndrom Patienten entwickeln häufig in frühen Jahren CRC, aber auch andere Tumoren. Das Tumorspektrum von CMMR-D Patienten ist entsprechend komplex und umfasst neben hämatologischen Neoplasien auch Glioblastome, sowie gastrointestinale Tumoren. Dies stellt eine besondere Herausforderung für die Therapie dar. MMR-D-assoziierte bzw. MSI-H Tumoren stellen einen eigenen molekularen Subtyp dar, verschiedene Arbeiten konnten zeigen, dass damit einhergehend auch das Ansprechen auf bestimmte zytostatische Therapien (z.B. 5-FU vs. Irinotecan) anders ist, als bei MSS Tumoren (52,59,117–119).

In dieser Arbeit wurden zwei aus der Klinik bekannte Substanzen *in vivo* für eine kombinierte Chemo-Immuntherapie eingesetzt: der Antimetabolit Gemcitabin und das Alkylanz CPX. Beide Substanzen wurden jeweils 24 h vor Beginn der Vakzine appliziert. Dieses Vorgehen orientiert sich an einer Arbeit aus der Literatur, in der CPX erfolgreich im Rahmen einer Chemo-Immuntherapie im murinen Mammakarzinom-Modell eingesetzt wurde. Hierbei erhielten Mäuse ein HER2/neu positives Tumorzelllysate als subkutane Impfung. Zusätzlich wurde 24 h vor der ersten Vakzine CPX systemisch appliziert. Mit der Kombinationstherapie konnte eine Regression spontaner Mammakarzinome erreicht werden (120). Ziel dieses kombinierten Ansatzes ist, zytostatische Effekte in der therapeutischen Situation zu verstärken und gleichzeitig immunmodulatorisch, durch Elimination bestimmter Suppressorzellen, sowohl in der prophylaktischen, als auch therapeutischen Situation, zu wirken.

Gemcitabin ist ein Pyrimidin-Antagonist und wirkt durch den Einbau falscher Basen hemmend auf die DNA-Replikation. In vorangegangenen Arbeiten konnte die gute Wirksamkeit von Gemcitabin gegenüber MMR-D/MSI-H Zellen bereits aufgezeigt werden, welche den Einsatz in der vorliegenden Arbeit rechtfertigen. In einer Studie von Pelosof et al. wurden MSI-H und MSS Zelllinien auf unterschiedliche Chemotherapeutika getestet (121). Hierbei zeigte sich, dass MSI-H Zellen besonders gut auf Gemcitabin ansprechen (IC_{50} 80–350 nM), während MSS Zellen resistent gegenüber Gemcitabin sind ($IC_{50} \geq 1250$ nM). In Übereinstimmung mit der Literatur zeigten in Voruntersuchungen die MLH1^{-/-} Zellen ebenfalls ein gutes Ansprechen auf das Gemcitabin (122). Zwei Transporter, *human concentrative nucleoside transporter* und *human equilibrative nucleoside transporter*, stellten sich als relevant für die Aufnahme von Gemcitabin in die Zelle heraus. Die Cytidin-Desaminase und Desoxycytidin Kinase wiederum haben einen wichtigen Einfluss auf den Metabolismus von Gemcitabin. Jedoch ergaben sich keine

Zusammenhänge zwischen dem erhöhten Ansprechen auf Gemcitabin und den Transportern oder dem Metabolismus. Der Mechanismus für das bessere Ansprechen ist bisher noch unbekannt (121).

Neben seiner zytotoxischen hat Gemcitabin auch eine immunstimulierende Wirkung. Diese beruht, wie zuvor in der Einleitung (Punkt 2.4.4) dargelegt, u.a. auf der spezifischen Reduktion von MDSC. Durch die Induktion von immunogenem Zelltod in Tumorzellen werden überdies vermehrt Tumorantigene freigesetzt, welche von professionellen APC aufgenommen, prozessiert und schließlich T-Zellen präsentiert werden. Dies führt es zu einer Aktivierung und Expansion Antigen-spezifischer CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen, aber auch aktivierter NK-Zellen (98,123,124).

In der vorliegenden Arbeit wurde Gemcitabin niedrig dosiert (100 mg/kg KG, i.p.) sowohl prophylaktisch, als auch therapeutisch verabreicht, sodass weniger die zytotoxische und mehr die immunstimulierende Wirkung im Vordergrund stand. In anderen Studien wurden teilweise höhere Dosen appliziert (120 mg/kg KG i.p.) (98,123).

Durch die regelmäßigen Blutuntersuchungen, sowohl in der Prophylaxe als auch in der Therapie, wurde die Auswirkung der Therapie auf den Immunstatus beobachtet. In der Prophylaxe führte die Kombinationstherapie aus Vakzine und Gemcitabin, wie erwartet, zu einem Anstieg der CTL und NK-Zellen. Jedoch, entgegen der erwarteten immunmodulatorischen Wirkung von Gemcitabin, wurden auch vermehrt MDSC im peripheren Blut detektiert. In der Milz hingegen waren weniger MDSC vorhanden. Interessanterweise hatte die kombinierte Chemo-Immuntherapie einen Einfluss auf die Infiltration von MDSC in den Tumor. Im Vergleich zur Vakzine-Monotherapie wurden ausschließlich nach Kombinationsbehandlung weniger MDSC im Tumormikromilieu nachgewiesen. Damit erzielte die einmalige Applikation von Gemcitabin auch Langzeiteffekte.

Während in der Therapie die Vakzine-Monotherapie zu einem kontinuierlichen Anstieg der CTL und der MDSC führte, zeigte die Chemo-Vakzine eine signifikant verringerte Anzahl an zirkulierenden MDSC und einen deutlichen Anstieg der CTL. Das gleiche Bild zeigte sich bei der Immunphänotypisierung der Milz und bei der Untersuchung des Tumormikromilieus.

Somit bestätigt sich die Hypothese, dass Gemcitabin zusätzlich immunmodulatorisch wirksam ist.

Wie erklärt sich jedoch die fehlende Suppression von MDSC in der Prophylaxe? Sowohl in der Prophylaxe, als auch in der Kombinationstherapie wurde Gemcitabin einmalig 24 h vor der ersten Vakzine verabreicht. Daher kann der unterschiedliche Effekt nicht auf der Dosis beruhen. Für den prophylaktischen Ansatz wurden sehr junge Tiere in die

Untersuchungen eingeschlossen, die noch keine Anzeichen auf eine Tumorentwicklung und damit Immunsuppression aufwiesen. Es besteht somit die Möglichkeit, dass Gemcitabin zu früh appliziert wurde und die Anzahl an MDSC noch zu gering war, um deutlichere Effekte hervorzurufen. In zukünftigen Studien könnte daher eine Modulation des Therapieprotokolls helfen, MDSC effektiv zu eliminieren. Gegebenenfalls ist auch eine wiederholte Gabe in Erwägung zu ziehen. In Anbetracht der Gesamtversuchsdauer (80 Wochen) wären monatliche Applikationen alternierend zur Vakzine durchaus realistisch. Neben dem Gemcitabin wurde auch CPX in Kombination mit der Vakzine appliziert. CPX wurde ursprünglich eingesetzt, um die Angiogenese von Tumoren im Endstadium zu hemmen (125).

Das Alkylanz CPX besitzt, ähnlich wie Gemcitabin ebenfalls immunmodulatorische Eigenschaften, die primär auf der Inhibition von Treg basieren (126–128). Daneben sind auch Effekte auf NK-Zellen, DC und MDSC beschrieben. CPX induziert DC, welche vermehrt IL-12 und vermindert IL-10 produzieren. Somit wird die T-Zell-Antwort verbessert und die Treg-Expansion unterdrückt. Im Gegensatz zu Gemcitabin scheint CPX allerdings MDSC zu induzieren. Bezüglich der NK-Zellen finden sich widersprüchliche Daten. Einerseits wird über eine verminderte Anzahl von NK-Zellen durch CPX berichtet, andererseits entfällt die hemmende Wirkung von Treg auf die NK-Zellen, wodurch die NK-Zell-Aktivität wieder ansteigt. Hinzu kommt, dass CPX die T-Zell Immunantwort über den PD-1-PD-L1 Signalweg hemmt (129–132).

Wir injizierten prophylaktisch einmalig i.p. 120 mg/kg KG CPX 24 h vor der ersten Vakzine. CPX zeigte hierbei auch entgegengesetzte Wirkungen. Wir konnten eine Unterdrückung der Immuntoleranz nachweisen (Anstieg von CTL, NK-Zellen, Abfall von LAG-3). Die Anzahl an MDSC in der Prophylaxe war bei CPX deutlich höher, als beim Gemcitabin und bestätigt damit Angaben aus der Literatur (123,131).

Aufgrund der fehlenden Suppression von MDSC und der geringeren immunmodulierenden Wirkung als Gemcitabin, ist CPX keine gute Alternative zum Gemcitabin. Möglich wäre jedoch eine kombinierte Gabe von Gemcitabin, CPX und Vakzinen in einer weiteren Studie zu testen, da auf diese Weise sowohl die Suppression der Treg, als auch der MDSC und somit wichtiger immunsupprimierender Zellen vereint werden könnte.

Auch die Vakzinierung könnte durch Änderungen bei der Applikationsform möglicherweise verbessert werden. Einerseits könnte die s.c.-Injektion durch eine i.p.-Injektion ersetzt werden. Beispielsweise erwies sich die i.p.-Injektion bei DC-Vakzinen als vorteilhaft, da auf diesem Weg die abdominalen Lymphknoten besser erreicht werden (133).

Auch eine intratumorale Injektion von Vakzinen könnte das Outcome verbessern. In einer klinischen Studie Phase eins konnte gezeigt werden, dass eine intratumorale Injektion von DC-Vakzinen die Produktion von spezifischen Zytokinen erhöhte und das Überleben der Patienten verlängerte (134).

6.2 Einfluss der prophylaktischen Chemo-Immuntherapie auf die Entwicklung von MLH1^{-/-} Tumoren und das Gesamtüberleben

Das Spektrum hereditärer MMR-D-assoziiierter Tumoren ist sehr komplex und variiert stark zwischen den einzelnen Krankheitssyndromen (Lynch Syndrom und CMMR-D). MLH1^{-/-} Mäuse entwickeln hämatologische Neoplasien (Lymphome; mittleres Erkrankungsalter: 3,8 Monate) und Lynch Syndrom-assoziierte Karzinome (GIT; mittleres Erkrankungsalter: ca. 8,0 Monate) und vereinen damit Charakteristika beider Krankheitsbilder (113,135). Als interessant erwies sich die Häufigkeit der unterschiedlichen Malignitäten in der Prophylaxegruppe.

Die alleinige Vakzine verzögerte die Tumorentwicklung, insbesondere bei den GIT, aber teilweise auch den Lymphomen, und verhinderte die Bildung anderer Karzinome, beispielsweise der Haut (108). Wurde zusätzlich mit Gemcitabin präkonditioniert, so konnte primär die Entwicklung der GIT verzögert werden (um ca. 18 Wochen). Die wenigen Lymphome, welche sich unter dieser Prophylaxe entwickelten, traten besonders früh auf. Die Ursachen hierfür sind nicht vollständig geklärt. In allen Ansätzen wurde ein Tumorslysate eingesetzt, welches aus einem GIT gewonnen wurde. Entsprechend wurde – unabhängig vom Gemcitabin – die Genese gastrointestinaler Tumoren stärker gehemmt, als die der Lymphome. Gleichzeitig konnten wir zeigen, dass das Mutationsprofil zwischen beiden Entitäten heterogen ist und nur wenige „shared“ Antigene vorhanden sind (136). Daher ist es wahrscheinlich, dass primär Immunantworten gegen Antigene gebildet wurden, die von GIT präsentiert werden, weshalb, in der Konsequenz, primär die Genese von GIT beeinflusst wurde.

Die CPX-Vakzine-Kombitherapie beeinflusste interessanterweise primär die Lymphomagenese. Insgesamt zeigte sich ein ähnliches Tumorspektrum wie unter der Vakzine-Monotherapie, jedoch mit deutlich verzögertem Auftreten der Lymphome. Die alleinige Gabe der Zytostatika hatte keinen Einfluss auf die Tumorentwicklung bzw. das -spektrum. Daher wurden die Ergebnisse dieser Prophylaxegruppe mit den unbehandelten Kontrollen zusammengefasst.

MMR-D Tumorzellen akquirieren bei jeder Teilung neue Mutationen. In der Konsequenz entstehen hyper- oder ultrahypermutierte Tumoren (137,138). Da die Vakzinierung mit Tumorlysat nur dann wirksam ist, wenn diese vor einem Tumor-assoziierten Ereignis verabreicht werden, sollten prophylaktische Vakzine möglichst früh appliziert werden, um den maximalen Effekt zu erzielen. Dies zeigten auch andere Vakzine-Studien, beispielsweise die prophylaktische Injektion des Totimpfstoffs bei Humanen Papilloma-Virus (HPV)-assoziierten Karzinomen (139) oder von DC-Vakzinen beim Pankreas-Karzinom (140).

Dies könnte bei Patienten mit Lynch Syndrom und CMMR-D eine wesentliche Rolle spielen. Bei beiden Krankheitsbildern ist die Tumorgenese akzeleriert - charakterisiert durch eine verkürzte Adenom-Karzinom-Sequenz.

Bei Lynch-Anlageträgern zeigte sich, dass durch eine prophylaktische Applikation von Ibuprofen oder Aspirin, das Risiko ein CRC zu entwickeln, gesenkt wird (141). Beide Medikamente hemmen die Cyclooxygenase 2, welche möglicherweise in MMR-D-assoziierten Tumoren überexprimiert ist. Aspirin verringert zusätzlich die Anzahl der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten. Beide Mechanismen sind jedoch unabhängig von der Keimbahnmutation und gelten auch für das sporadische CRC (142,143).

Den DC-Vakzinen wird eine wichtige Rolle in der Immuntherapie zugeschrieben. DC sind professionelle Antigen-präsentierende Zellen und besitzen daher die Fähigkeit Peptide, beispielsweise Tumor-spezifische Antigene, effizient dem Immunsystem zu präsentieren. Hierzu werden DC *ex vivo* entnommen und mit den spezifischen Antigenen beladen. Beispielsweise wurden DC-Vakzine in einer klinischen Phase I Pilotstudie beim Wilms-Tumor eingesetzt. Hierfür wurden DC mit dem Wilms Tumor Gen 1 Antigen beladen und anschließend s.c. in Axilla- oder Leistenregion injiziert. Zusätzlich verabreichte man Gemcitabin. Dadurch konnte der Progress von lokal fortgeschrittenen Tumoren und nicht metastasierten Tumoren eingeschränkt werden (144).

Gemeinsam mit der intensiven präventiven Diagnostik könnte die prophylaktische Applikation einer Tumorstoffvakzine in Zukunft zu einem besseren Outcome der betroffenen Patienten führen (145,146).

6.3 Einfluss der therapeutischen Chemo-Immuntherapie auf Tumorwachstum und Gesamtüberleben

In der Vorstudie konnte bereits gezeigt werden, dass eine therapeutische Applikation der Tumorstoffvakzine zu einem signifikant besseren Überleben von MLH1^{-/-} Mäusen führt (108).

Durch die Kombinationstherapie mit Gemcitabin 24 h vor der ersten Vakzine erhofften wir uns eine Verbesserung der Überlebenszeit und eine Reduktion der Tumormasse. Jedoch konnten wir in den Ergebnissen keine signifikante Verbesserung nachweisen. Betrachtet man die Tumorremission, so erzielte die Vakzine-Monotherapie sogar eine bessere Remission, als die Chemo-Immuntherapie (31% vs. 26%). Die Mäuse der Vakzine-Monotherapie wiesen Anfangs einerseits dezent mehr Tumorknoten auf, das Tumolvolumen war jedoch geringer als das der Chemo-Immuntherapie ($3,5 \pm 1,7$ Tumorknoten und $93,4 \pm 74,8 \text{ mm}^3$ Tumolvolumen vs. $3,0 \pm 1,7$ Tumorknoten und $110,1 \pm 90,6 \text{ mm}^3$ Tumolvolumen). Jedoch erzielte die Kombinationstherapie bei einem Tier eine komplette und bis zum Erreichen des experimentellen Endpunktes anhaltende Tumorremission. Im Vergleich zu den anderen Tieren war der Tumor bei diesem Tier besonders klein ($< 50 \text{ mm}^3$), was eine mögliche Erklärung für das gute Ansprechen darstellt.

In einer klinischen Studie zum Mammakarzinom stellte sich die Tumorgröße als wichtiges Maß für das Ansprechen der neoadjuvanten Chemotherapie heraus (147). Die durchschnittlich geringere Tumormasse bei der Vakzine-Monotherapie könnte ein Grund für das bessere Ansprechen dieser Therapie, im Vergleich zur Chemo-Immuntherapie sein.

In Hinblick auf das Gesamtüberleben erzielte die Chemo-Immuntherapie einen Vorteil, da das Überleben über die 40. Lebenswoche hinaus erreicht wurde. Die therapeutischen Vorteile könnten auf die zusätzlich immunstimulierende Wirkung von Gemcitabin zurückzuführen sein. Vor allem die MDSC konnten unter der Kombinationstherapie deutlich gesenkt werden. Zusätzlich wurde weniger PD-L1 auf zirkulierenden Lymphozyten nachgewiesen.

Eine Möglichkeit zur Verbesserung des *outcomes* wäre eine Erhöhung der Dosis und/oder eine mehrmalige Applikation von Gemcitabin. Auch andere Kombinationen von Chemo-Immuntherapie, beispielsweise mit Immuncheckpoint-Inhibitoren könnten in Zukunft bessere Ergebnisse erzielen. Weiterhin sollte diesbezüglich geforscht werden, da die Tumorremission und langanhaltende Remissionsfreiheit eines Tieres zeigt, dass dies ein richtiger Therapieweg sein kann.

6.4 Auswirkungen der prophylaktischen und therapeutischen Chemo-Immuntherapie auf das Tumormikromilieu

Das Tumormikromilieu hat sich als ein komplexes, einzigartiges und eigenständiges immunologisches „Organ“ herausgestellt, welches häufig einen immunsuppressiven Charakter aufweist.

Das Tumormikromilieu von Lynch Syndrom Patienten wurde mikroskopisch untersucht und ergab Unterschiede zu den murinen GIT. Bezüglich des Tumormikromilieus von CMMR-D Patienten finden sich derzeit keine vergleichenden Daten.

Ein spezifisches Charakteristikum MSI-H-assoziiierter Neoplasien ist deren, im Vergleich zu MSS Tumoren hohe Anzahl Tumor-infiltrierender Lymphozyten. Hierbei zeigte sich eine sehr hohe Anzahl an CTL, welche sich besonders an der Invasionsfront des Tumors anreichern, und eine moderate Anzahl von T-Helferzellen (148–150). Ursächlich hierfür ist die vermehrte Produktion von Neoantigenen. Die Idee ist, dass diese Neoantigene spezifisch für jeden Tumor und relevant für das Tumormikromilieu sind, wenn diese prozessiert und von APC den T-Zellen präsentiert werden (151–153). Es zeigte sich auch, dass die Anzahl von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten mit der Anzahl an Frameshiftmutationen korreliert (154).

Neben den Neoantigenen trägt beispielsweise auch die Produktion von immunregulatorischen Zytokinen und Chemokinen zur Entwicklung eines immunologischen Tumormikromilieus bei (40).

Doch die Frage ist: „Wie können sich MMR-D-assoziierte Tumoren dem Immunsystem entziehen?“ Die Antwort findet sich bei der Untersuchung des Mikromilieus. Denn auf den Tumor-infiltrierenden Lymphozyten zeigt sich eine dramatische Überexpression von Immuncheckpoint-Molekülen, wie PD-1, CTLA-4, IDO und LAG-3, welche sich im Stroma und in der Invasionsfront befinden (40,155). Durch Schaffung eines lokalen immunsuppressiven Mikromilieus schützt der Tumor sich vor dem Immunsystem. Immuncheckpoint-Moleküle sind physiologischerweise für die Selbsttoleranz zuständig und dienen dem Schutz von Autoimmunreaktionen. Jedoch können die Immuncheckpoint-Moleküle durch Tumorzellen dysreguliert werden. Zu den zwei am Besten erforschten Immuncheckpoint-Rezeptoren zählen CTLA4 und PD-1. Beide gehören zu den inhibierenden Rezeptoren (93). Die Hauptaufgabe von CTLA4 liegt in der Hemmung der T-Helferzellaktivität und der Steigerung der von Treg verursachten Immunsuppression (156). Die Regulation der T-Zellaktivität, beispielsweise bei einer Entzündungsreaktion im Gewebe auf Infektion oder Autoimmunität, ist die Hauptaufgabe von PD1. Dies wird unter anderem über die vermehrte Produktion von Zytokinen, wie IFN γ und IL2, eine verminderte Expression von Zellwachstumsproteinen oder durch Veränderung der Interaktion mit den DCs und anderen Zielzellen erreicht. PD1 ist jedoch nicht nur auf den T-Lymphozyten zu finden, sondern auch auf NK-Zellen und B-Lymphozyten, wodurch die Zelllyse limitiert wird (155,157,158). In Melanomen wird vermutet, dass die erhöhte PD-L1-Expression auf den Tumorzellen und die vermehrte T-Zell-Infiltration auf eine hohe IFN γ -

Produktion durch die aktivierten T-Zellen zurückzuführen ist. Durch Bindung von PD-1 und PD-L1 kommt es zur Hemmung der T-Zell-Aktivität, wodurch die antitumorale Wirkung inhibiert wird. Es gilt, dass MMR-D-assoziierte Tumoren mehr PD-L1 exprimieren, als deren Pendant und eine erhöhte IFN γ -Produktion von T-Zellen aufweisen. Jedoch wird nur eine geringe Anzahl von PD-L1 auf den Tumorzellen und ein Großteil von PD-L1 auf MDSC exprimiert.

Interessanterweise führte in der vorliegenden Arbeit sowohl die therapeutische Vakzine-Monotherapie, als auch die therapeutische Chemo-Immuntherapie mit Gemcitabin zu einer Hochregulation von PD-L1 und LAG-3 auf den peripheren, sowie Tumor-infiltrierenden Lymphozyten. Die durch die Therapie deutlich reduzierten infiltrierenden MDSC exprimierten ausschließlich unter der Vakzine-Monotherapie vermehrt PD-L1.

LAG-3 inhibiert aktivierte T-Zellen und findet sich vermehrt an der Oberfläche von Treg, wo es für eine verstärkte immunsuppressive Aktivität sorgt (93,159).

Das Tumormikromilieu von unbehandelten MLH1^{-/-} Mäusen weist Unterschiede zum humanen Pendant auf. Die CTL und T-Helferzellen werden hier nur in einem bestimmten Ausmaß und die NK-Zellen in einer absoluten Minderheit nachgewiesen. Letzteres ist darauf zurückzuführen, dass MLH1^{-/-} Tumoren MHC-I positiv sind (113). Die CD11b⁺ Granulozyten und CD200R⁺ Tumor-assoziierte (M2) Makrophagen infiltrieren den Tumor stark. Beide Zelltypen fördern die Tumorprogression. Auch hier findet sich eine starke Expression von Immuncheckpoint-Molekülen. Während CTLA4 auf den Tumorzellen vermehrt exprimiert wird, sind PD-1 und PD-L1 auf den Stromazellen und den Tumor-infiltrierenden Lymphozyten erhöht. Interessant ist, dass LAG-3 nahezu nicht exprimiert wird (113,160).

In der prophylaktischen Situation zeigte sich durch die kombinierte Gabe von Gemcitabin und Vakzine folgendes Bild: CD11c⁺ DC infiltrierten vermehrt, CD11b⁺ Makrophagen vermindert den Tumor und MDSC wurden effektiv eliminiert. Dies kann als erfolgreiche Immunmodulation interpretiert werden. CTL waren vereinzelt detektierbar, NK-Zellen wurden nicht erfasst. Durch die Kombination von CPX und Vakzine zeigte sich ein ähnliches Bild, jedoch infiltrierten CD11c⁺ DC weniger stark den Tumor. PD-L1⁺-Zellen wurden ebenfalls nachgewiesen.

Infolge der therapeutischen Chemo-Immuntherapie mit Gemcitabin veränderte sich das immunhistologische Bild dahingehend, dass es zu einem deutlichen Anstieg der CTL und T-Helferzellen kam. Somit zeigte sich, dass ein proentzündlicher Prozess stattfindet. LAG-3⁺ und PD-L1⁺ wurden auf den Lymphozyten hochreguliert und die MDSC

reduzierten sich stark. DCs waren nach Kombitherapie nur marginal vermehrt detektierbar, der Anteil Tumor-assoziiierter Makrophagen nahm ab.

Da Mäuse prinzipiell in einer anderen Umgebung leben als Menschen und dabei Kontakt zu anderen Antigenen haben, finden sich Unterschiede im Immunsystem. Daher ist es auch verständlich, dass nicht jede neue Erkenntnis automatisch vom präklinischen Mausmodell auf das humane System übertragen werden kann. Die allgemeine Struktur des Immunsystems beider Lebewesen stimmt überein. Jedoch ist beispielsweise die Anzahl an neutrophilen Granulozyten im menschlichen Blut besonders hoch, während Mäuse eine höhere Anzahl an Lymphozyten besitzen. Weiter Unterschiede finden sich unter anderem bei der Expression von Immunglobulinen, beim Klassenwechsel, bei der Entwicklung und Regulation von T-Zellen, sowie der Expression von Zytokinen und Chemokinen (161).

Auch bei der Expression von Oberflächenmolekülen auf dem Tumor zeigen sich Unterschiede. Der Transferrin-Rezeptor CD71 und FasL sind bei MLH1^{-/-} Zellen vermehrt exprimiert, während diese im humanen System nicht zu finden sind. FasL ermöglicht, durch die Induktion von Apoptose bei den Immunzellen, dem Tumor ein immunprivilegiertes Mikromilieu (162,163).

Aufgrund der Überexpression von Immuncheckpoint-Molekülen könnten Immuncheckpoint-Inhibitoren effizient zur Therapie eingesetzt werden. Alle vier oben beschriebenen Immuncheckpoint-Moleküle, welche bei MMR-D-assoziierten Tumoren überexprimiert sind, werden aktuell in Studien getestet. PD-1 und PD-L1 Inhibitoren wurden bereits in der Therapie von malignem Melanom, nicht-kleinzelligem Bronchial-Karzinom, Nierenzell-Karzinom, klassischem Hodgkin-Lymphom, Plattenepithel-Karzinomen des Kopf-Hals-Bereichs sowie fortgeschrittenem Urothel-Karzinom eingesetzt. Seit 2017 ist diese Therapie mit anti-PD-1 auch für MMR-D-assoziierte Tumoren zugelassen. Die Zulassung durch die FDA erfolgte damit auch erstmals aufgrund eines spezifischen Biomarkers (=MMR-D/MSI-H), unabhängig von der Organmanifestation. Insgesamt wurden 15 verschiedene Tumorentitäten bei 149 Patienten identifiziert, die über fünf klinische Studien eingeschrieben wurden. Von den 149 Patienten, die den anti-PD-1 Antikörper Pembrolizumab in den Studien erhielten, erreichten 39,6% ein vollständiges oder teilweises Ansprechen (164–167).

Vor diesem Hintergrund sind Kombinationsstrategien mit Immuncheckpoint-Inhibitoren besonders vielversprechend für die Therapie MMR-D-assoziiierter Tumoren. Eine

wesentliche Komponente ist dabei das weitere Erforschen der spezifischen immunologischen Mechanismen im Tumormikromilieu, um auf diese Weise weitere Angriffspunkte für eine Immuntherapie zu identifizieren (40,155,168–170).

6.5 Identifikation neuer MSI-Zielgene der murinen MLH1^{-/-} Tumorgenese

Aktuell gibt es nur sehr wenige Daten zum murinen Mutanom und der damit einhergehenden relevanten Mutationen für die Tumorgenese. In einer Studie von Woerner et al., konnten sechs Gene (*Elavl3*, *Tmem107*, *Glis2*, *Sdccag1*, *Senp6*, *Rfc3*) in unterschiedlichen murinen MMR-D GIT identifiziert werden (112). Dabei stimmten *Rfc3* und *Elavl3* mit dem humanen System in Länge und Typ überein. Beide Gene sind häufig mutiert bei humanen MMR-D-assoziierten Endometrium- und Magen-Karzinomen. Aufgrund von Überlappungen hinsichtlich der auftretenden Mutationen während der Onkogenese, können partiell Aussagen von Maus auf Mensch übertragen werden.

In dieser Arbeit wurde einerseits das Mutationsprofil bereits bekannter Zielgene bei unterschiedlichen MLH1^{-/-} Tumoren erfasst und andererseits auch neue, potentiell relevante Zielgene untersucht. Die am Häufigsten mutierten Gene waren *Phactr4* (25,7 %), *Senp6* (37,6 %), *Sdccag1* (41,1 %), *Rasal2* (41,7 %) und *Rfc3* (65,6 %). Mutationen wurden Entitäten-übergreifend, jedoch mit unterschiedlicher Frequenz bei den GIT und NHL detektiert, einhergehend mit dem klinischen Verlauf. Während *Senp6*, *Phactr4* und *Rfc3* häufiger bei GIT mutiert waren, waren Mutationen in *Tmem60*, *Sdccag1* und *Rasal2* meist mit NHL assoziiert.

Ebenfalls konnten fünf weitere Gene als potentielle Marker identifiziert werden, welche homolog zur Sequenz des Menschen sind.

Das am Häufigsten betroffene Gen ist *Akt3*. Mutationen in diesem Gen scheinen ursächlich für die Onkogenese von MMR-D Tumoren verantwortlich zu sein. Es kodiert für das Enzym *RAC-gamma serine/threonine-protein kinase* und ist beteiligt an zahlreichen Prozessen wie Zellwachstum, Proliferation, Angiogenese und Metabolismus, es schützt vor Apoptose und DNA-Schädigung und sorgt für Genomstabilität und -motilität (171,172). Auch das zur Interleukinfamilie zählende Il1f9, welches von *Interleukin 36 gamma* Gen kodiert wird, wurde als häufiges Zielgen identifiziert. Es ist eines der drei agonistisch wirksamen Zytokine welches vom *Interleukin 36 gamma* Gen kodiert wird. Alle drei Zytokine wirken über den gleichen Rezeptor und lösen die gleiche Signalkaskade aus, sie aktivieren beispielsweise *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF-κB) und *mitogen-activated protein Kinase* (MAPK). Besonders stark sind die Gene

in der Haut und Lunge exprimiert, aber auch im Darm sind sie zu finden. Sie werden einerseits auf den Epithelzellen und andererseits auf Immunzellen exprimiert, wobei sie sowohl die angeborene, als auch die erworbene Immunantwort stimulieren. Unter anderem stimuliert IL-36 das Reifen der Th1-Zellen und die Sekretion von IFN- γ , es fördert die Entwicklung von CD4⁺ T-Zellen zu Th17-Zellen und die Expansion von IL-17-sezierenden CD4⁺ Gedächtniszellen. Ein wichtiger Unterschied zu anderen Interleukinen ist die Expression auf den naiven T-Zellen. Somit ist IL-36 vor allem an der frühen Immunantwort beteiligt (173).

Clock ist ein Gen, welches für CLOCK, einem Transkriptionsfaktor kodiert. CLOCK reguliert über die Kontrolle von anderen CLOCK-Proteinen die zirkadiane Rhythmik und steht im Zusammenhang mit Karzinomen. In der Studie von Alhopuro et al. wurde *Clock* als ein MSI Zielgen identifiziert. Auch wir konnten bei insgesamt 31 % der Tumoren eine Mutation im *Clock*-Gen nachweisen (174).

Das *Spen*-Gen kodiert für die *msx2-interacting* Proteine. Die Proteine sind wichtige Ko-Faktoren, beispielsweise von den Estrogenrezeptoren und beteiligt an der Transkription von Regressoren. Auch an der Regulation zahlreicher Signalwege, wie Notch, TCF/LEF und EGFR ist *Spen* beteiligt. *Spen* kann das Tumorwachstum hemmen und ist somit ein Tumorsuppressorgen. Vor allem in der Therapie des Mammakarzinoms hat *Spen* Aufmerksamkeit erlangt, da es ein wichtiger Regulator der ER-abhängigen Transkription von Apoptose-assoziierten Genen und ein Angriffspunkt für die Tamoxifentherapie darstellt (175). Da bisher nicht nur im Mammakarzinom, sondern auch im Zervix- und Endometrium-Karzinom vermehrt Mutationen im *Spen*-Gen nachgewiesen wurden, wird auch in vielen weiteren Karzinomen ein Zusammenhang mit diesem Gen vermutet (176). Bei 17,2% aller untersuchten Gewebeproben wiesen wir eine Mutation im *Spen*-Gen nach.

Schließlich wurde noch das Gen *Dnajc2*, welches für das Protein *DnaJ homolog subfamily C member 2* kodiert, erfasst. Das Protein kann sowohl als Chaperon, als auch als Regulator für Chromatin wirksam sein und reguliert die Transkription in Stammzellen (177). *Dnajc2* Mutationen stehen vor allem im Zusammenhang mit der akuten und chronischen myeloischen Leukämie (178,179). Ebenfalls wurden bei MMR-D-assoziierten Tumoren Mutationen in *Dnajc2* nachgewiesen (180) Auch wir konnten bei 18,8% der Gewebeproben eine Mutation nachweisen.

Damit wurden in dieser Arbeit neue Zielgene der murinen MLH1^{-/-} Tumorgenese identifiziert, welche neben der Relevanz bei der Tumorentstehung auch potentielle Zielstrukturen für nachfolgende Neoantigen-spezifische Peptid-basierte Ansätze darstellen.

6.6 Kritische Beurteilung der Vor- und Nachteile des verwendeten MLH1^{-/-} Mausmodells

Der Leitspruch von Jacques Monod und François Jacob lautete „*Anything found to be true of E. coli. must also be true of elephants.*” (181), und beschreibt die Einheitlichkeit der Organismen, als Basis von Forschungsmodellen in der Biologie. Beim Übertragen bestimmter Aussagen von einem, auf einen anderen Organismus spielt neben der Einheitlichkeit jedoch auch die Diversität eine wichtige Rolle. Besonders das Mausmodell hat sich im Laufe der Jahre als ein bewährtes Studienmodell für Basisforschung biologischer Prozesse herausgestellt.

Es gibt zahlreiche Vorteile, welche das Mausmodell in der Forschung so populär gemacht haben. Mäuse sind klein, haben eine hohe Reproduktionsrate und kurze Generationszeit, sie sind leicht zu transportieren und einfach in der Haltung, wobei ihre Umwelt gut beeinflussbar ist. Das murine Genom ist sehr gut mittels Sequenzierung erforscht. Es zeigte sich, dass die Gene von Mäusen zum Großteil mit den humanen übereinstimmen, etwa 85% der protein-kodierenden Genabschnitte. Auch die zahlreichen Möglichkeiten das murine Genom zu manipulieren, machen Mäuse zu einem idealen Forschungsmodell (182).

So spielte das Mausmodell beispielsweise bei der Erforschung immunologischer Prozesse, wie MHC Gene, T-Zellrezeptoren und der Produktion regulierender Antikörper eine wichtige Rolle.

Mensch und Maus entwickelten sich evolutionär jedoch nicht gleichwertig, wodurch nicht alle Aussagen einheitlich für beide Organismen gelten (161,183). Die evolutionären Unterschiede entstanden durch Anpassung der Organismen an die Umwelt. Werden die evolutionären Ereignisse verstanden und in die Untersuchungen miteinbezogen, können die Probleme vorausgesagt und mitgerechnet werden (184). Daher sollten Forschungsergebnisse präklinischer Untersuchungen stets kritisch hinterfragt werden.

Einer der wichtigsten Unterschiede zwischen Menschen und Mäusen ist die Größe. Diese spielt eine wichtige Rolle bei zahlreichen Abläufen im Körper, wie auch auf Grundumsatz und biologisch-ökologischen Merkmalen. Die Unterschiede im Grundumsatz betreffen zahlreiche anatomische, physiologische und biochemische Aspekte. Mäuse verfügen beispielsweise über eine hohe Dichte an Mitochondrien in der Zelle. In Bezug auf die biologisch-ökologischen Merkmale spielt die Größe ebenfalls eine wichtige Rolle. Sie beeinflusst das Alter der Geschlechtsreife, die Schwangerschaftsdauer, das Geburtenintervall, wie viel Energie in Reproduktion investiert wird und die Lebenserwartung und -dauer.

Durchschnittlich leben Wild- und Labormäuse etwa drei bis vier Jahre, wobei die Lebenserwartung bei Wildmäusen deutlich niedriger ist (natürliche Selektion). Obwohl Labormäuse eine längere Lebenserwartung haben, wird die Lebensdauer durch Entwicklung maligner Prozesse und Erkrankungen ebenfalls verkürzt. Auch hinsichtlich des Mikrobioms, dem damit assoziierten Auftreten von Tumoren im Gastrointestinaltrakt, sowie deren anatomischer Lage (Duodenum vs. Kolon), finden sich Unterschiede zwischen humanen und murinen System. Die Unterschiede sind jedoch nicht nur auf genetische und epigenetische Ursachen zurückzuführen (114).

Auch die Umwelt spielt eine entscheidende Rolle, beispielsweise beim Mikrobiom (114). Im menschlichen Darm befinden sich etwa 100 Trillionen Mikroorganismen (Bakterien, Viren und Pilze), welche ab dem ersten Lebensabschnitt gesammelt werden. Die Mutter übergibt die kommensale Flora von Haut, Vagina und Stuhl auf das Neugeborene. Das Mikrobiom ist durch Umwelteinflüsse, wie Infektionen, Ernährungsformen und Lebensstil dauerhaft im Wandel, wodurch sich eine Dysbalance mit Entzündung und Karzinogenese im Darm entwickeln kann. Auch das Mikromilieu des Tumors ist durch die Immunreaktion und Entzündung definiert und hat einen großen Einfluss auf die Regulation und Zusammensetzung des Mikrobioms. Daher wird die Applikation von Probiotika oder Stuhltransplantationen als vorteilhaft in Bezug auf chronische Entzündungen und Genotoxizität gesehen (185). Das Mikrobiom hat auch einen wesentlichen Einfluss auf Metabolismus, Effektivität und Toxizität von Medikamenten (182,185,186).

Beispielsweise wird ein übermäßiges Vorkommen des Bakteriums *Fusobacterium nucleatum*, welche ein Teil des humanen Mikrobioms darstellen, im Zusammenhang mit der CRC Genese gesehen, da die Proteine des Bakteriums MDSC rekrutieren und die T-Zell-Proliferation hemmen. In den rekrutierten MDSC werden durch *F. nucleatum* auch Immuncheckpoint-Moleküle hochreguliert (155,187,188).

Obwohl MLH1^{-/-} Mäuse ein intaktes Immunsystem haben, wurden diese in einer SPF-nahen Haltung gehalten, wobei jeglicher Kontakt mit Mikroorganismen fehlte. Daher entwickeln diese Mäuse kein Mikrobiom, welches mit dem humanen vergleichbar ist. Da das Mikrobiom jedoch aus Gründen, welche oben beschrieben wurden, relevant für Tumorgenese und Therapie ist, sollte in den folgenden Versuchen über eine eventuelle zusätzliche Applikation von Probiotika nachgedacht werden.

Das MLH1^{-/-} Mausmodell ist in vielerlei Hinsicht ein gut untersuchtes, präklinisches Modell, welches die Tumorgenese des Lynch Syndroms und der CMMR-D besser verstehen lässt. Da der Großteil der Patienten entweder eine MLH1- oder MSH2-

Keimbahnmutation tragen, lässt das Modell in Hinsicht auf Tumorentwicklung und Therapie Rückschlüsse ziehen (109). Jedoch unterscheidet sich das Tumorspektrum zwischen MLH1^{-/-} Mäusen und betroffenen Patienten. Obwohl das Lynch Syndrom und die CMMR-D ein sehr breites Tumorspektrum aufweisen (Endometrium-, Ovarial-Karzinom, Glioblastome, Leukämien, etc.), entwickeln MLH1^{-/-} Mäuse, neben den GIT, am häufigsten Lymphome (Thymome und Non-Hodgkin-Lymphome) (43,53). Die Anzahl der sich spontan entwickelnden Tumoren bei den MLH1^{-/-} Mäusen zeigte eine ähnliche Verteilung zwischen GIT und Lymphomen: 51 % Lymphome/Thymome, 47 % GIT und 2 % andere Tumore (Haut-, Kopfhaltumoren). Somit bestätigte sich die Tumorverteilung aus den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe (113).

7 Zusammenfassung

Das Lynch Syndrom ist das häufigste Tumorprädispositionssyndrom und umfasst ca. 2-3 % aller kolorektalen Karzinome (CRC). Ausgehend von einer monoallelischen Keimbahnmutation in einem der DNA Mismatch Reparatur (MMR) Gene, tragen somatische Mutationen im zweiten Allel ursächlich zur Tumorgenese bei. Ein weiteres, sehr seltenes und komplexes Krankheitsbild ist die konstitutionelle MMR-Defizienz (CMMR-D), welche aufgrund einer biallelischen Keimbahnmutation entsteht. Beiden Syndromen liegt eine MMR-D als Ursache für die maligne Transformation zugrunde. Ein Charakteristikum MMR-D-assoziiierter Tumoren ist Mikrosatelliteninstabilität (MSI) und die damit einhergehende hohe Abundanz an Neoantigenen, welche auf der Tumorzelloberfläche präsentiert und von T-Zellen erkannt werden. Damit stellen MMR-D-assoziierte Tumoren ideale Zielstrukturen für immuntherapeutische Interventionen dar.

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit ein murines präklinisches Modell der spontanen MMR-D-assoziierten Tumorgenese ($MLH1^{-/-}$ *gene knockout* Mäuse) eingesetzt und die Wirksamkeit einer kombinierten Chemo-Immuntherapie eruiert. Dieser Ansatz basiert auf Vorarbeiten der Arbeitsgruppe, in denen gezeigt werden konnte, dass die alleinige Gabe eines Tumorstimulus (= Gesamtumorlysate eines $MLH1^{-/-}$ gastrointestinalen Tumors (GIT)) das Gesamtüberleben von $MLH1^{-/-}$ Mäusen signifikant verlängert. Ausgehend von diesen Befunden wurde der Vakzine-basierte Ansatz um die Zytostatika Gemcitabin bzw. Cyclophosphamid (CPX), sowohl in der prophylaktischen, als auch therapeutischen Situation erweitert.

Für den prophylaktischen Ansatz erhielten tumorfreie Tiere einmalig 24 h vor der eigentlichen Vakzine Gemcitabin (100 mg/kg KG, i.p., -24 h) oder CPX (120 mg/kg KG, i.p., -24 h), gefolgt von repetitiven Injektionen des Vakzins (10 mg/kg KG, s.c.). Bei der therapeutischen Gabe wurden Tiere mit gesicherten Tumoren (mittels ^{18}F -FDG PET/CT) mit Gemcitabin (100 mg/kg KG, i.p., -24 h) präkonditioniert und anschließend vakziniert (10 mg/kg KG, s.c.). Der Einfluss der Therapie auf das Tumorstadium wurde im Verlauf wiederholt mittels PET/CT erfasst. Die regelmäßigen Blutentnahmen und eine postmortale Untersuchung der Milz ermöglichten das Immunmonitoring (durchflusszytometrische Phänotypisierung, $IFN\gamma$ Freisetzung mittels ELISpot). Das Tumormikromilieu wurde mithilfe der Immunfluoreszenz untersucht.

Die prophylaktische Kombinationstherapie mit Gemcitabin verzögerte, im Vergleich zur Vakzinemono- oder Kombinationstherapie mit CPX, die Tumorentwicklung und verlängerte das Gesamtüberleben (Mediane Überlebenszeit: 53,4 vs. 47,4 vs. 47,7 Wochen). Unter dieser Kombinationstherapie blieben 33,3 % der Mäuse bis zum Erreichen des

experimentellen Endpunktes tumorfrei. Diese Effekte wurden auch auf immunologischer Ebene, durch erhöhte Anzahl an CTL und NK-Zellen im peripheren Blut, bestätigt. Jedoch wurden ebenfalls mehr PD-L1⁺ Leukozyten und myeloide Suppressorzellen (*myeloid-derived suppressor cells*, MDSC) detektiert, welche vermutlich einen erworbenen Resistenzmechanismus darstellen. In den resultierenden Tumorresektaten wurden ebenfalls vermehrt NK-Zellen, sowie teilweise auch T-Zellen detektiert, bei gleichzeitiger Reduktion von Makrophagen und MDSC.

Die therapeutische Chemo-Immuntherapie zeigte, im Vergleich zur Vakzine-Monotherapie, nur einen geringen Einfluss auf das Gesamtüberleben (Mediane Überlebenszeit: 12,0 Wochen (GEM + Vakzin) vs. 11,5 Wochen (Vakzin) vs. 3,0 Wochen (Kontrolle)). Die Tumoranzahl und Größe war zwischen beiden Therapiegruppen vergleichbar. Bei einem Tier erzielte die Kombinationstherapie eine komplette Tumorremission. Dieses Tier blieb bis zum Erreichen des experimentellen Endpunktes tumorfrei. Hinsichtlich des Tumormikromilieus zeigten sich jedoch teilweise deutliche Unterschiede zwischen den Therapiegruppen, mit Anstieg der infiltrierenden T-Zellen und einer Reduktion der MDSC insbesondere nach Chemo-Immuntherapie. Gleichzeitig wurde eine verstärkte lymphozytäre Reaktivität im IFN γ – ELISpot gegen MLH1^{-/-} Zielzellen detektiert, welche die erfolgreiche Stimulation des Immunsystems durch beide Therapieschemata (Vakzine und Chemo-Immuntherapie) bestätigte.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Arbeit adressierte die Identifikation neuer potentieller MSI-Zielgene der murinen MLH1-Tumorgenese. Unter Verwendung verschiedener maligner Zell- und Gewebeproben (Kontrolle und Therapie) wurden fünf neue Tumorspezifische MSI-Marker identifiziert, sowie deren Mutationsfrequenz und Verteilung in unterschiedlichen Tumoren (GIT und Lymphome) untersucht. *Akt3* wurde als häufig mutiertes Zielgen mit Relevanz für die Onkogenese muriner MLH1-assoziiierter Tumoren identifiziert.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die kombinierte Chemo-Immuntherapie die Tumorzinzidenz und das -wachstum sowohl in der prophylaktischen, als auch therapeutischen Situation verzögert, bedingt durch die positive Modulation des Immunsystems und transiente Reduktion immunsuppressiver Zellen. Ausgehend von diesen Befunden zielen aktuelle Arbeiten auf weitere Kombinationsstrategien, u.a. durch Einsatz von Immuncheckpoint-Inhibitoren, um den vorgestellten Ansatz noch weiter zu verbessern.

8 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1 ABLAUF DES MMR-MECHANISMUS.....	7
ABBILDUNG 2 ÄTHIOLOGIE DES CRC	10
ABBILDUNG 3 MOLEKULARE KLASSIFIKATION DES CRC.	10
ABBILDUNG 4 ABLAUF DER HNPCC-DIAGNOSTIK.	13
ABBILDUNG 5 ENTWICKLUNG DES TUMORMIKROMILIEUS.....	17
ABBILDUNG 6 VERLAUF DER TUMORENTWICKLUNG UND DER EINFLUSS VON IMMUNZELLEN.....	18
ABBILDUNG 7: WIRKMECHANISMUS DER CHEMO-IMMUNTHERAPIE.	21
ABBILDUNG 8 BEHANDLUNGSSCHEMA DER PROPHYLAXE- UND THERAPIE-GRUPPEN.	32
ABBILDUNG 9 MLH1 GENOTYPISIERUNG.	44
ABBILDUNG 10 KAPLAN-MEIER ÜBERLEBENSKURVE (LOG RANK ANALYSE) VON MLH1 ^{-/-} MÄUSEN IN DER PROPHYLAXE.....	46
ABBILDUNG 11 IMMUNPHÄNOTYPISIERUNG DES PERIPHEREN BLUTES VON MLH1 ^{-/-} MÄUSEN IN DER PROPHYLAXE.....	49
ABBILDUNG 12 IMMUNPHÄNOTYPISIERUNG DER MILZ IN DER PROPHYLAXE.	50
ABBILDUNG 13 PLASMAZYTOKINLEVEL VON MLH1 ^{-/-} MÄUSEN IN DER PROPHYLAXE.	51
ABBILDUNG 14 QUANTITATIVE ANALYSE DES TUMORVOLUMEN [mm ³] VON MLH1 ^{-/-} MÄUSEN IN DER THERAPIE.	52
ABBILDUNG 15 KAPLAN-MEIER ÜBERLEBENSKURVE IN DER LOG RANK ANALYSE VON MLH1 ^{-/-} MÄUSEN IN DER THERAPIE.....	53
ABBILDUNG 16 IMMUNPHÄNOTYPISIERUNG DES PERIPHEREN BLUTES VON MLH1 ^{-/-} MÄUSEN IN DER THERAPIE.	54
ABBILDUNG 17 IMMUNPHÄNOTYP DER MILZ VON MLH1 ^{-/-} MÄUSEN IN DER THERAPIE.	55
ABBILDUNG 18 PLASMAZYTOKINKONZENTRATIONEN VON MLH1 ^{-/-} MÄUSEN IN DER THERAPIE.	56
ABBILDUNG 19 ELISPOT IFN γ -ASSAY ZUM NACHWEIS ANTIGEN-SPEZIFISCHER IMMUNANTWORTEN.....	57
ABBILDUNG 20 FLUORESZENZMIKROSKOPIE VON GIT-PRÄPARATEN AUS MLH1 ^{-/-} MÄUSEN IN DER PROPHYLAXE.....	59
ABBILDUNG 21 FLUORESZENZMIKROSKOPIE VON GIT-PRÄPARATEN AUS MLH1 ^{-/-} MÄUSEN IN DER THERAPIE.	60
ABBILDUNG 22 QUANTITATIVE ANALYSE DES ANTEILS TUMOR-INFILTRIERENDER ZELLEN.....	60
ABBILDUNG 23 MSI ANALYSE DER MLH1 ^{-/-} TUMOREN MIT NICHT-CODIERENDEN MARKERN.....	62
ABBILDUNG 24 MSI ANALYSE DER MLH1 ^{-/-} TUMOREN MIT CODIERENDEN MARKERN.	63

9 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: UNTERTEILUNG DER PROPHYLAXEGRUPPEN.....	30
TABELLE 2: UNTERTEILUNG DER THERAPIEGRUPPEN	31
TABELLE 3: ANTIKÖRPERMIXE FACS-ANALYSE.....	37
TABELLE 4: ANTIKÖRPERMIXE FÜR DIE IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNG.....	39
TABELLE 5: PCR MULTIPLEX-ANSATZ.....	41
TABELLE 6: ABLAUF DER PCR-REAKTION	42
TABELLE 7: PCR MULTIPLEX ANSATZ.....	42
TABELLE 8: ABLAUF DER PCR-REAKTION	42
TABELLE 9: TUMORENTWICKLUNG UNTER PROPHYLAKTISCHER CHEMO- IMMUNTHERAPIE IM VERGLEICH ZUR KONTROLLE	47
TABELLE 10: IDENTIFIKATION VON MUTATIONEN INNERHALB NEUER KODIERENDER MS-MARKER BEI MLH1^{-/-} TUMORZELLEN.....	64
TABELLE 11: FRAGMENTLÄNGENANALYSE NEUER MARKER AN 55 PRIMÄREN MLH1^{-/-} TUMORPROBEN 1.....	65
TABELLE 12: FRAGMENTLÄNGENANALYSE NEUER MARKER AN 55 PRIMÄREN MLH1^{-/-} TUMORPROBEN 2.....	65

10 Literaturverzeichnis

1. Jascur T, Boland CR. Structure and function of the components of the human DNA mismatch repair system. *Int J Cancer*. 2006;119(9):2030–5.
2. Chen J, Sadowski I. Identification of the mismatch repair genes PMS2 and MLH1 as p53 target genes by using serial analysis of binding elements. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(13):4813–8.
3. Li Z, Scherer SJ, Ronai D, Iglesias-Ussel MD, Peled JU, Bardwell PD, et al. Examination of Msh6- and Msh3-deficient mice in class switching reveals overlapping and distinct roles of MutS homologues in antibody diversification. *J Exp Med*. 2004;200(1):47–59.
4. Peña-Díaz J, Jiricny J. Mammalian mismatch repair: error-free or error-prone? *Trends Biochem Sci*. 2012 May 1;37(5):206–14.
5. Modrich P. Mismatch Repair in Replication Fidelity, Genetic Recombination, and Cancer Biology. *Annu Rev Biochem*. 1996;65(1):101–33.
6. Gradia S, Acharya S, Fishel R. The human mismatch recognition complex hMSH2-hMSH6 functions as a novel molecular switch. *Cell*. 1997;91(7):995–1005.
7. Jiricny J. Postreplicative mismatch repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(4):1–23.
8. Thomas DC, Roberts JD, Kunkel TA. Heteroduplex repair in extracts of human HeLa cells. *J Biol Chem*. 1991;266(6):3744–51.
9. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JPJ, et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(12):6870–5.
10. Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, Ma A, Lutterbaugh JD, Periyasamy S, et al. Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(15):8698–702.
11. Dzantiev L, Constantin N, Genschel J, Iyer RR, Burgers PM, Modrich P. A defined human system that supports bidirectional mismatch-provoked excision. *Mol Cell*. 2004;15(1):31–41.
12. Guo S, Presnell SR, Yuan F, Zhang Y, Gu L, Li GM. Differential Requirement for Proliferating Cell Nuclear Antigen in 5' and 3' Nick-directed Excision in Human Mismatch Repair. *J Biol Chem*. 2004;279(17):16912–7.
13. Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 May;7(5):335–46.
14. Yeeles JTP, Janska A, Early A, Diffley JFX. How the Eukaryotic Replisome Achieves Rapid and Efficient DNA Replication. *Mol Cell*. 2017 Jan;65(1):105–16.
15. Andrianova MA, Bazykin GA, Nikolaev SI, Seplyarskiy VB. Human mismatch repair system balances mutation rates between strands by removing more mismatches from the lagging strand. *Genome Res*. 2017;27(8):1336–43.
16. Imai K, Yamamoto H. Carcinogenesis and microsatellite instability: The interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis*. 2008;29(4):673–80.
17. Moreira L, Balaguer F, Lindor N, de la Chapelle A, Hampel H, Aaltonen LA, et al. Identification of Lynch Syndrome Among Patients With Colorectal Cancer. *JAMA*. 2012 Oct 17;308(15):1555.
18. Shia J, Tang LH, Vakiani E, Guillem JG, Stadler ZK, Soslow RA, et al. Immunohistochemistry as first-line screening for detecting colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: a 2-antibody panel may be as predictive as a 4-antibody panel. *Am J Surg Pathol*. 2009

- Nov;33(11):1639–45.
19. Ligtenberg MJL, Kuiper RP, Chan TL, Goossens M, Hebeda KM, Voorendt M, et al. Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat Genet.* 2009 Jan;41(1):112–7.
20. Lynch HT, Snyder CL, Shaw TG, Heinen CD, Hitchins MP. Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(3):181–94.
21. Kofler R, Schlötterer C, Luschützky E, Lelley T. Survey of microsatellite clustering in eight fully sequenced species sheds light on the origin of compound microsatellites. *BMC Genomics.* 2008;9:1–14.
22. Vilar E, Gruber SB. Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence. *Nat Rev Clin Oncol.* 2010;7(3):153–62.
23. Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R, Rüschoff J. Diagnostic microsatellite instability: Definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res.* 1997;57(21):4749–56.
24. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst.* 2004 Feb 18;96(4):261–8.
25. Shia J. Immunohistochemistry versus Microsatellite Instability Testing For Screening Colorectal Cancer Patients at Risk For Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome. *J Mol Diagnostics .* 2008 Jul;10(4):293–300.
26. Perucho M, Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Burr RW, et al. Correspondence re: C. R. Boland et al., A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for Cancer Detection and Familial Predisposition: Development of International Criteria for the Determination of Microsatellite Instability in Color. *Cancer Res.* 1999;59(1):249–56.
27. De'angelis GL, Bottarelli L, Azzoni C, De'angelis N, Leandro G, Di Mario F, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Acta Biomed.* 2018;89(2):97–101.
28. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394–424.
29. Rohani-Rasaf M, Abdollahi M, Jazayeri S, Kalantari N, Asadi-Lari M. Correlation of cancer incidence with diet, smoking and socio-economic position across 22 Districts of Tehran in 2008. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2013;14(3):1669–76.
30. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature .* 1998 Dec 17;396(6712):643–9.
31. Pino MS, Chung DC. NIH Public Access THE CHROMOSOMAL INSTABILITY PATHWAY IN COLON. *Gastroenterol* 138(6) 2059–2072. 2010;138(6):2059–72.
32. Tariq K, Ghias K. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer Biol Med.* 2016;13(1):120–35.
33. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015 Nov;21(11):1350–6.
34. Müller MF, Ibrahim AEK, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch.* 2016;469(2):125–34.
35. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, et al. Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Prim.* 2015;1:15065.
36. Snyder C, Hampel H. Hereditary Colorectal Cancer Syndromes. *Semin Oncol Nurs.* 2019;35(1):58–78.
37. Rahner N, Steinke V. Hereditary Cancer Syndromes. *Dtsch Aerzteblatt Online.*

- 2008 Oct 10;105(41):706–14.
38. Jenkins MA, Hayashi S, O'Shea A-M, Burgart LJ, Smyrk TC, Shimizu D, et al. Pathology features in Bethesda guidelines predict colorectal cancer microsatellite instability: a population-based study. *Gastroenterology*. 2007 Jul;133(1):48–56.
39. Merok MA, Ahlquist T, Røyrvik EC, Tufteland KF, Hektoen M, Sjø OH, et al. Microsatellite instability has a positive prognostic impact on stage II colorectal cancer after complete resection: results from a large, consecutive Norwegian series. *Ann Oncol*. 2013 May;24(5):1274–82.
40. Llosa NJ, Cruise M, Tam A, Wicks EC, Hechenbleikner EM, Taube JM, et al. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov*. 2015;5(1):43–51.
41. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe A. S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.1. AWMF Registrierungsnummer: 021/007OL. 2019. p. 1–328.
42. Engel C, Rahner N, Schulmann K, Holinski-Feder E, Goecke TO, Schackert HK, et al. Efficacy of Annual Colonoscopic Surveillance in Individuals With Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2010;8(2):174–82.
43. Kohlmann W, Gruber SB. Lynch Syndrome. *GeneReviews®*. 1993.
44. Steinke V, Engel C, Büttner R, Schackert HK, Schmiegeler WH, Propping P. Erblischer Darmkrebs ohne Polyposis. *Dtsch Arztebl Int*. 2013;110(3):32–8.
45. Vasen HFA, Mecklin JP, Meera Khan P, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum*. 1991 May;34(5):424–5.
46. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology*. 1999 Jun;116(6):1453–6.
47. Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Srivastava S, Jass JR, et al. A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: Meeting Highlights and Bethesda Guidelines. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 1997 Dec 3;89(23):1758–62.
48. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998 Nov 15;58(22):5248–57.
49. Vasen HFA, Möslin G, Alonso A, Bernstein I, Bertario L, Blanco I, et al. Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). *J Med Genet*. 2007;44(6):353–62.
50. Schmeler KM, Lynch HT, Chen L, Munsell MF, Soliman PT, Clark MB, et al. Prophylactic surgery to reduce the risk of gynecologic cancers in the Lynch syndrome. *N Engl J Med*. 2006 Jan 19;354(3):261–9.
51. Ricciardone MD, Özçelik T, Cevher B, Özdağ H, Tuncer M, Gürgey A, et al. Human MLH1 deficiency predisposes to hematological malignancy and neurofibromatosis type 1. *Cancer Res*. 1999 Jan 15;59(2):290–3.
52. Bodo S, Colas C, Buhard O, Collura A, Tinat J, Lavoine N, et al. Diagnosis of Constitutional Mismatch Repair-Deficiency Syndrome Based on Microsatellite Instability and Lymphocyte Tolerance to Methylating Agents. *Gastroenterology*. 2015;149(4):1017–29.
53. Wimmer K, Kratz CP. Constitutional mismatch repair-deficiency syndrome.

- Haematologica. 2010 May;95(5):699–701.
54. Wimmer K, Etzler J. Constitutional mismatch repair-deficiency syndrome: have we so far seen only the tip of an iceberg? *Hum Genet.* 2008 Sep 18;124(2):105–22.
55. Ripperger T, Beger C, Rahner N, Sykora KW, Bockmeyer CL, Lehmann U, et al. Constitutional mismatch repair deficiency and childhood leukemia/lymphoma--report on a novel biallelic MSH6 mutation. *Haematologica.* 2010 May;95(5):841–4.
56. Peters A, Born H, Ettinger R, Levonian P, Jedele KB. Compound heterozygosity for MSH6 mutations in a pediatric lymphoma patient. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2009 Feb;31(2):113–5.
57. Scott RH, Homfray T, Huxter NL, Mitton SG, Nash R, Potter MN, et al. Familial T-cell non-Hodgkin lymphoma caused by biallelic MSH2 mutations. *J Med Genet.* 2007 Jul;44(7):e83.
58. Scott RH, Mansour S, Pritchard-Jones K, Kumar D, MacSweeney F, Rahman N. Medulloblastoma, acute myelocytic leukemia and colonic carcinomas in a child with biallelic MSH6 mutations. *Nat Clin Pract Oncol.* 2007 Feb;4(2):130–4.
59. Vasen HFA, Ghorbanoghli Z, Bourdeaut F, Cabaret O, Caron O, Duval A, et al. Guidelines for surveillance of individuals with constitutional mismatch repair-deficiency proposed by the European Consortium “Care for CMMR-D”(C4CMMR-D). *J Med Genet.* 2014;51(5):283–93.
60. Edelmann L, Edelmann W. Loss of DNA mismatch repair function and cancer predisposition in the mouse: Animal models for human hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Am J Med Genet.* 2004 Aug 15;129C(1):91–9.
61. de Wind N, Dekker M, Berns A, Radman M, te Riele H. Inactivation of the mouse Msh2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer. *Cell.* 1995 Jul 28;82(2):321–30.
62. Baker SM, Plug AW, Prolla TA, Bronner CE, Harris AC, Yao X, et al. Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. *Nat Genet.* 1996 Jul;13(3):336–42.
63. Edelmann W, Cohen PE, Kane M, Lau K, Morrow B, Bennett S, et al. Meiotic pachytene arrest in MLH1-deficient mice. *Cell.* 1996;85(7):1125–34.
64. Prolla TA, Baker SM, Harris AC, Tsao JL, Yao X, Bronner CE, et al. Tumour susceptibility and spontaneous mutation in mice deficient in Mlh1, Pms1 and Pms2 DNA mismatch repair. *Nat Genet.* 1998 Mar;18(3):276–9.
65. Kolodner RD, Tytell JD, Schmeits JL, Kane MF, Gupta RD, Weger J, et al. Germ-line msh6 mutations in colorectal cancer families. *Cancer Res.* 1999 Oct 15;59(20):5068–74.
66. Baker SM, Bronner CE, Zhang L, Plug AW, Robatzek M, Warren G, et al. Male mice defective in the DNA mismatch repair gene PMS2 exhibit abnormal chromosome synapsis in meiosis. *Cell.* 1995 Jul 28;82(2):309–19.
67. K.J. Bühling, J. Lepenies KW. Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie. 4. Auflage. Hamburg, Berlin, Kiel: Elsevier; 2008. 546 p.
68. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 2002 Nov 1;23(11):549–55.
69. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017 Jul 24;14(7):399–416.
70. Ng THS, Britton GJ, Hill E V., Verhagen J, Burton BR, Wraith DC. Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. *Front Immunol.* 2013;4:129.
71. McIntire RH, Morales PJ, Petroff MG, Colonna M, Hunt JS. Recombinant HLA-

- G5 and -G6 drive U937 myelomonocytic cell production of TGF-beta1. *J Leukoc Biol.* 2004 Dec;76(6):1220–8.
72. Rubtsov YP, Rasmussen JP, Chi EY, Fontenot J, Castelli L, Ye X, et al. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity.* 2008 Apr;28(4):546–58.
73. Speiser DE, Ho P-C, Verdeil G. Regulatory circuits of T cell function in cancer. *Nat Rev Immunol.* 2016 Oct 16;16(10):599–611.
74. Donadon M, Hudspeth K, Cimino M, Di Tommaso L, Preti M, Tentorio P, et al. Increased Infiltration of Natural Killer and T Cells in Colorectal Liver Metastases Improves Patient Overall Survival. *J Gastrointest Surg.* 2017 Aug 23;21(8):1226–36.
75. Gonzalez H, Hagerling C, Werb Z. Roles of the immune system in cancer: From tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev.* 2018;32(19–20):1267–84.
76. Kalams SA, Walker BD. The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med.* 1998 Dec 21;188(12):2199–204.
77. Pardoll DM, Topalian SL. The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Curr Opin Immunol.* 1998 Oct;10(5):588–94.
78. Cerwenka A, Bakker AB., McClanahan T, Wagner J, Wu J, Phillips JH, et al. Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity.* 2000 Jun;12(6):721–7.
79. Marcus A, Gowen BG, Thompson TW, Iannello A, Ardolino M, Deng W, et al. Recognition of tumors by the innate immune system and natural killer cells. *Adv Immunol.* 2014;122:91–128.
80. de Visser KE, Korets L V., Coussens LM. De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell.* 2005 May;7(5):411–23.
81. Mildner A, Jung S. Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity.* 2014 May 15;40(5):642–56.
82. Tran Janco JM, Lamichhane P, Karyampudi L, Knutson KL. Tumor-infiltrating dendritic cells in cancer pathogenesis. *J Immunol.* 2015 Apr 1;194(7):2985–91.
83. Gabrilovich DI. Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol Res.* 2017 Jan 3;5(1):3–8.
84. Mandruzzato S, Brandau S, Britten CM, Bronte V, Damuzzo V, Gouttefangeas C, et al. Toward harmonized phenotyping of human myeloid-derived suppressor cells by flow cytometry: results from an interim study. *Cancer Immunol Immunother.* 2016 Feb;65(2):161–9.
85. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol.* 2012 Mar 22;12(4):253–68.
86. Tartour E, Pere H, Maillere B, Terme M, Merillon N, Taieb J, et al. Angiogenesis and immunity: a bidirectional link potentially relevant for the monitoring of antiangiogenic therapy and the development of novel therapeutic combination with immunotherapy. *Cancer Metastasis Rev.* 2011 Mar;30(1):83–95.
87. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med.* 2013 Nov;19(11):1423–37.
88. Gonzalez H, Robles I, Werb Z. Innate and acquired immune surveillance in the postdissemination phase of metastasis. *FEBS J.* 2018 Feb;285(4):654–64.
89. Palucka AK, Coussens LM. The Basis of Oncoimmunology. *Cell.* 2016 Mar 10;164(6):1233–47.
90. McGranahan N, Rosenthal R, Hiley CT, Rowan AJ, Watkins TBK, Wilson GA, et al. Allele-Specific HLA Loss and Immune Escape in Lung Cancer Evolution. *Cell.* 2017 Nov 30;171(6):1259–1271.e11.
91. Frydrychowicz M, Boruckowski M, Koleccka-Bednarczyk A, Dworacki G. The

- Dual Role of Treg in Cancer. *Scand J Immunol.* 2017 Dec;86(6):436–43.
92. Mocellin S, Mandruzzato S, Bronte V, Lise M, Nitti D. Part I: Vaccines for solid tumours. *Lancet Oncol.* 2004 Nov;5(11):681–9.
93. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2012 Apr 22;12(4):252–64.
94. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell.* 2015 Apr 13;27(4):450–61.
95. Lollini P-L, Cavallo F, Nanni P, Forni G. Vaccines for tumour prevention. *Nat Rev Cancer.* 2006 Mar;6(3):204–16.
96. Guo C, Manjili MH, Subjeck JR, Sarkar D, Fisher PB, Wang XY. Therapeutic cancer vaccines. Past, present, and future. Vol. 119, *Advances in Cancer Research.* 2013. 421–475 p.
97. Nowak AK, Lake RA, Robinson BWS. Combined chemoimmunotherapy of solid tumours: Improving vaccines? *Adv Drug Deliv Rev.* 2006 Oct 1;58(8):975–90.
98. Nowak AK, Robinson BWS, Lake RA. Gemcitabine exerts a selective effect on the humoral immune response: Implications for combination chemo-immunotherapy. *Cancer Res.* 2002;62(8):2353–8.
99. Seufferlein T, Porzner M, Becker T, Budach V, Ceyhan G, Esposito I, et al. S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom. *Z Gastroenterol.* 2013;51(12):1395–440.
100. Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF) DK e. V (DKG) und DK (DKH). S3-Leitlinie Früherkennung , Nachsorge des Harnblasenkarzinoms. S3-Leitlinie. 2016;(November):1–94.
101. Maletzki C, Wiegele L, Nassar I, Stenzel J, Junghanss C. Chemo-immunotherapy improves long- term survival in a preclinical model of MMR-D-related cancer. 2019;1–14.
102. Nowak AK, Robinson BWS, Lake RA. Synergy between chemotherapy and immunotherapy in the treatment of established murine solid tumors. *Cancer Res.* 2003;63(15):4490–6.
103. Yoyen-Ermis D, Ozturk-Atar K, Kursunel MA, Aydin C, Ozkazanc D, Gurbuz MU, et al. Tumor-Induced Myeloid Cells Are Reduced by Gemcitabine-Loaded PAMAM Dendrimers Decorated with Anti-Flt1 Antibody. *Mol Pharm.* 2018 Apr;15(4):1526–33.
104. Machiels JPH, Todd Reilly RT, Emens LA, Ercolini AM, Lei RY, Weintraub D, et al. Cyclophosphamide, doxorubicin, and paclitaxel enhance the antitumor immune response of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor-secreting whole-cell vaccines in HER-2/neu tolerized mice. *Cancer Res.* 2001;61(9):3689–97.
105. Mullins DW, Burger CJ, Elgert KD. Paclitaxel enhances macrophage IL-12 production in tumor-bearing hosts through nitric oxide. *J Immunol.* 1999 Jun 1;162(11):6811–8.
106. Dauer M, Herten J, Bauer C, Renner F, Schad K, Schnurr M, et al. Chemosensitization of Pancreatic Carcinoma Cells to Enhance T Cell-Mediated Cytotoxicity Induced by Tumor Lysate-Pulsed Dendritic Cells. *J Immunother.* 2005 Jul;28(4):332–42.
107. Emens LA, Middleton G. The interplay of immunotherapy and chemotherapy: Harnessing potential synergies. *Cancer Immunol Res.* 2015;3(5):436–43.
108. Maletzki C, Gladbach YS, Hamed M, Fuellen G, Semmler M-L, Stenzel J, et al. Cellular vaccination of MLH1 –/– mice – an immunotherapeutic proof of concept study. *Oncoimmunology.* 2017 Mar 4;7(3):e1408748.
109. Edelmann W, Yang K, Kuraguchi M, Heyer J, Lia M, Kneitz B, et al.

- Tumorigenesis in Mlh1 and Mlh1/Apc1638N mutant mice. *Cancer Res.* 1999;59(6):1301–7.
110. Woerner SM, Gebert J, Yuan YP, Sutter C, Ridder R, Bork P, et al. Systematic identification of genes with coding microsatellites mutated in DNA mismatch repair-deficient cancer cells. *Int J Cancer.* 2001;93(1):12–9.
111. Chalastanis A, Penard-Lacronique V, Svrcek M, Defaweux V, Antoine N, Buhard O, et al. Azathioprine-Induced Carcinogenesis in Mice According to Msh2 Genotype. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2010 Nov 17;102(22):1731–40.
112. Woerner SM, Tosti E, Yuan YP, Kloor M, Bork P, Edelmann W, et al. Detection of coding microsatellite frameshift mutations in DNA mismatch repair-deficient mouse intestinal tumors. *Mol Carcinog.* 2015 Nov;54(11):1376–86.
113. Maletzki C, Beyrich F, Hühns M, Klar E, Linnebacher M. The mutational profile and infiltration pattern of murine MLH1^{-/-} tumors: concurrences, disparities and cell line establishment for functional analysis. *Oncotarget.* 2016 Aug 16;7(33).
114. Perlman RL. Mouse models of human disease: An evolutionary perspective. *Evol Med public Heal.* 2016;2016(1):170–6.
115. Shanks N, Greek R, Greek J. Are animal models predictive for humans? *Philos Ethics, Humanit Med.* 2009 Jan 15;4(1):2.
116. Olson H, Betton G, Robinson D, Thomas K, Monro A, Kolaja G, et al. Concordance of the Toxicity of Pharmaceuticals in Humans and in Animals. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2000 Aug;32(1):56–67.
117. Jover R. Mismatch repair status in the prediction of benefit from adjuvant fluorouracil chemotherapy in colorectal cancer. *Gut.* 2006 Jun 1;55(6):848–55.
118. Tajima A, Hess MT, Cabrera BL, Kolodner RD, Carethers JM. The mismatch repair complex hMutSa recognizes 5-fluorouracil-modified DNA: Implications for chemosensitivity and resistance. *Gastroenterology.* 2004 Dec;127(6):1678–84.
119. Carethers JM, Chauhan DP, Fink D, Nebel S, Bresalier RS, Howell SB, et al. Mismatch repair proficiency and in vitro response to 5-fluorouracil. *Gastroenterology.* 1999 Jul;117(1):123–31.
120. Aricò E, Sestili P, Carpinelli G, Canese R, Cecchetti S, Schiavoni G, et al. Chemo-immunotherapy induces tumor regression in a mouse model of spontaneous mammary carcinogenesis. *Oncotarget.* 2016 Sep 13;7(37):59754–65.
121. Pelosof L, Yerram SR, Ahuja N, Delmas A, Danilova L, Herman JG, et al. CHFR silencing or microsatellite instability is associated with increased antitumor activity of docetaxel or gemcitabine in colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2014;134(3):596–605.
122. Maletzki C, Wiegele L, Nassar I, Stenzel J, Junghanss C. Chemo-immunotherapy improves long-term survival in a preclinical model of MMR-D-related cancer. *J Immunother Cancer.* 2019;7(1):1–14.
123. Suzuki E, Kapoor V, Jassar AS, Kaiser LR, Albelda SM. Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1⁺/CD11b⁺ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clin Cancer Res.* 2005 Sep 15;11(18):6713–21.
124. Le HK, Graham L, Cha E, Morales JK, Manjili MH, Bear HD. Gemcitabine directly inhibits myeloid derived suppressor cells in BALB/c mice bearing 4T1 mammary carcinoma and augments expansion of T cells from tumor-bearing mice. *Int Immunopharmacol.* 2009 Jul;9(7–8):900–9.
125. Browder T, Butterfield CE, Kräling BM, Shi B, Marshall B, O'Reilly MS, et al. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res.* 2000 Apr 1;60(7):1878–86.
126. Scurr M, Bloom A, Pembroke T, Srinivasan R, Brown C, Smart K, et al. Escalating Regulation of 5T4-Specific IFN- + CD4⁺ T Cells Distinguishes Colorectal Cancer

- Patients from Healthy Controls and Provides a Target for In Vivo Therapy. *Cancer Immunol Res.* 2013 Dec 1;1(6):416–25.
127. Ge Y, Domschke C, Stoiber N, Schott S, Heil J, Rom J, et al. Metronomic cyclophosphamide treatment in metastasized breast cancer patients: immunological effects and clinical outcome. *Cancer Immunol Immunother.* 2012 Mar 14;61(3):353–62.
128. Le DT, Jaffee EM. Regulatory T-cell Modulation Using Cyclophosphamide in Vaccine Approaches: A Current Perspective. *Cancer Res.* 2012 Jul 15;72(14):3439–44.
129. Radojcic V, Bezak KB, Skarica M, Pletneva MA, Yoshimura K, Schulick RD, et al. Cyclophosphamide resets dendritic cell homeostasis and enhances antitumor immunity through effects that extend beyond regulatory T cell elimination. *Cancer Immunol Immunother.* 2010 Jan 10;59(1):137–48.
130. Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, Ladoire S, Roux S, Martin F, et al. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2007 May 8;56(5):641–8.
131. Sevko A, Sade-Feldman M, Kanterman J, Michels T, Falk CS, Umansky L, et al. Cyclophosphamide Promotes Chronic Inflammation–Dependent Immunosuppression and Prevents Antitumor Response in Melanoma. *J Invest Dermatol.* 2013 Jun;133(6):1610–9.
132. Ding Z-C, Lu X, Yu M, Lemos H, Huang L, Chandler P, et al. Immunosuppressive Myeloid Cells Induced by Chemotherapy Attenuate Antitumor CD4⁺ T-Cell Responses through the PD-1-PD-L1 Axis. *Cancer Res.* 2014 Jul 1;74(13):3441–53.
133. Wang B, Sun C, Wang S, Shang N, Shangguan J, Figini M, et al. Mouse dendritic cell migration in abdominal lymph nodes by intraperitoneal administration. *Am J Transl Res.* 2018;10(9):2859–67.
134. Subbiah V, Murthy R, Hong DS, Prins RM, Hosing C, Hendricks K, et al. Cytokines Produced by Dendritic Cells Administered Intratumorally Correlate with Clinical Outcome in Patients with Diverse Cancers. *Clin Cancer Res.* 2018 Aug 15;24(16):3845–56.
135. Lee K, Tosti E, Edelmann W. Mouse models of DNA mismatch repair in cancer research. *DNA Repair (Amst).* 2016;38:140–6.
136. Gladbach, Wiegele, Hamed, Merkschläger, Fuellen, Junghanss, et al. Unraveling the Heterogeneous Mutational Signature of Spontaneously Developing Tumors in MLH1^{–/–} Mice. *Cancers (Basel).* 2019;11(10):1485.
137. Yuza K, Nagahashi M, Watanabe S, Takabe K, Wakai T. Hypermutation and microsatellite instability in gastrointestinal cancers. *Oncotarget.* 2017 Dec 19;8(67):112103–15.
138. Shlien A, Campbell BB, de Borja R, Alexandrov LB, Merico D, Wedge D, et al. Combined hereditary and somatic mutations of replication error repair genes result in rapid onset of ultra-hypermutated cancers. *Nat Genet.* 2015 Mar 2;47(3):257–62.
139. Arbyn M, Xu L, Simoens C, Martin-Hirsch PP. Prophylactic vaccination against human papillomaviruses to prevent cervical cancer and its precursors. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018 May 9;5:CD009069.
140. Shangguan A, Shang N, Figini M, Pan L, Yang J, Ma Q, et al. Prophylactic dendritic cell vaccination controls pancreatic cancer growth in a mouse model. *Cytotherapy.* 2020;22(1):6–15.
141. Ait Ouakrim D, Dashti SG, Chau R, Buchanan DD, Clendenning M, Rosty C, et al. Aspirin, Ibuprofen, and the Risk of Colorectal Cancer in Lynch Syndrome. *J*

- Natl Cancer Inst. 2015 Sep 24;107(9):djv170.
142. Chan AT, Ogino S, Fuchs CS. Aspirin and the Risk of Colorectal Cancer in Relation to the Expression of COX-2. *N Engl J Med*. 2007 May 24;356(21):2131–42.
143. Cao Y, Nishihara R, Qian ZR, Song M, Mima K, Inamura K, et al. Regular Aspirin Use Associates With Lower Risk of Colorectal Cancers With Low Numbers of Tumor-Infiltrating Lymphocytes. *Gastroenterology*. 2016 Nov;151(5):879-892.e4.
144. Mayanagi S, Kitago M, Sakurai T, Matsuda T, Fujita T, Higuchi H, et al. Phase I pilot study of Wilms tumor gene 1 peptide-pulsed dendritic cell vaccination combined with gemcitabine in pancreatic cancer. *Cancer Sci*. 2015 Apr;106(4):397–406.
145. Amayiri N, Tabori U, Campbell B, Bakry D, Aronson M, Durno C, et al. High frequency of mismatch repair deficiency among pediatric high grade gliomas in Jordan. *Int J Cancer*. 2016 Jan 15;138(2):380–5.
146. Durno CA, Aronson M, Tabori U, Malkin D, Gallinger S, Chan HSL. Oncologic surveillance for subjects with biallelic mismatch repair gene mutations: 10 year follow-up of a kindred. *Pediatr Blood Cancer*. 2012 Oct;59(4):652–6.
147. Samuel O, Olayide A, Ganiyu R, Olufemi H, Halimat A. Relationship between tumour size and response to neoadjuvant chemotherapy among breast cancer patients in a tertiary center in Nigeria. *Malawi Med J*. 2018 Mar 28;30(1):13–6.
148. Smyrk TC, Watson P, Kaul K, Lynch HT. Tumor-infiltrating lymphocytes are a marker for microsatellite instability in colorectal carcinoma. *Cancer*. 2001 Jun 15;91(12):2417–22.
149. Dolcetti R, Viel A, Doglioni C, Russo A, Guidoboni M, Capozzi E, et al. High Prevalence of Activated Intraepithelial Cytotoxic T Lymphocytes and Increased Neoplastic Cell Apoptosis in Colorectal Carcinomas with Microsatellite Instability. *Am J Pathol*. 1999 Jun;154(6):1805–13.
150. Phillips SM, Banerjee A, Feakins R, Li SR, Bustin SA, Dorudi S. Tumour-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer with microsatellite instability are activated and cytotoxic. *Br J Surg*. 2004 Apr;91(4):469–75.
151. Maby P, Tougeron D, Hamieh M, Mlecnik B, Kora H, Bindea G, et al. Correlation between Density of CD8+ T-cell Infiltrate in Microsatellite Unstable Colorectal Cancers and Frameshift Mutations: A Rationale for Personalized Immunotherapy. *Cancer Res*. 2015 Sep 1;75(17):3446–55.
152. van Rooij N, van Buuren MM, Philips D, Velds A, Toebes M, Heemskerk B, et al. Tumor Exome Analysis Reveals Neoantigen-Specific T-Cell Reactivity in an Ipilimumab-Responsive Melanoma. *J Clin Oncol*. 2013 Nov 10;31(32):e439–42.
153. Segal NH, Parsons DW, Peggs KS, Velculescu V, Kinzler KW, Vogelstein B, et al. Epitope landscape in breast and colorectal cancer. *Cancer Res*. 2008 Feb 1;68(3):889–92.
154. Pinheiro M, Pinto C, Peixoto A, Veiga I, Lopes P, Henrique R, et al. Target gene mutational pattern in Lynch syndrome colorectal carcinomas according to tumour location and germline mutation. *Br J Cancer*. 2015 Aug 11;113(4):686–92.
155. Xiao Y, Freeman GJ. The microsatellite instable subset of colorectal cancer is a particularly good candidate for checkpoint blockade immunotherapy. *Cancer Discov*. 2015;5(1):16–8.
156. Peggs KS, Quezada SA, Chambers CA, Korman AJ, Allison JP. Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *J Exp Med*. 2009 Aug 3;206(8):1717–25.
157. Keir ME, Liang SC, Guleria I, Latchman YE, Qipo A, Albacker LA, et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med*. 2006 Apr

- 17;203(4):883–95.
158. Terme M, Ullrich E, Aymeric L, Meinhardt K, Desbois M, Delahaye N, et al. IL-18 Induces PD-1-Dependent Immunosuppression in Cancer. *Cancer Res.* 2011 Aug 15;71(16):5393–9.
159. Grosso JF, Kelleher CC, Harris TJ, Maris CH, Hipkiss EL, De Marzo A, et al. LAG-3 regulates CD8⁺ T cell accumulation and effector function in murine self- and tumor-tolerance systems. *J Clin Invest.* 2007 Nov 1;117(11):3383–92.
160. Rygiel TP, Meyaard L. CD200R signaling in tumor tolerance and inflammation: A tricky balance. *Curr Opin Immunol.* 2012 Apr;24(2):233–8.
161. Mestas J, Hughes CCW. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *J Immunol.* 2004;172(5):2731–8.
162. Lettau M, Paulsen M, Kabelitz D, Janssen O. FasL Expression and Reverse Signalling. In: *Results and problems in cell differentiation.* 2009. p. 49–61.
163. Houston AM, Michael-Robinson JM, Walsh MD, Cummings MC, Ryan AE, Lincoln D, et al. The “Fas counterattack” is not an active mode of tumor immune evasion in colorectal cancer with high-level microsatellite instability. *Hum Pathol.* 2008 Feb;39(2):243–50.
164. U.S. FOOD & DRUG. FDA grants accelerated approval to pembrolizumab for first tissue/site agnostic indication. 2017.
165. Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science (80-).* 2017 Jul 28;357(6349):409–13.
166. Diaz L, Marabelle A, Kim TW, Geva R, Van Cutsem E, André T, et al. 386PEfficacy of pembrolizumab in phase 2 KEYNOTE-164 and KEYNOTE-158 studies of microsatellite instability high cancers. *Ann Oncol.* 2017 Sep 1;28(suppl 5).
167. Seiwert TY, Burtneß B, Mehra R, Weiss J, Berger R, Eder JP, et al. Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial. *Lancet Oncol.* 2016 Jul;17(7):956–65.
168. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N Engl J Med.* 2012 Jun 28;366(26):2443–54.
169. Topalian SL, Sznol M, McDermott DF, Kluger HM, Carvajal RD, Sharfman WH, et al. Survival, Durable Tumor Remission, and Long-Term Safety in Patients With Advanced Melanoma Receiving Nivolumab. *J Clin Oncol.* 2014 Apr 1;32(10):1020–30.
170. Hamid O, Robert C, Daud A, Hodi FS, Hwu W-J, Kefford R, et al. Safety and Tumor Responses with Lambrolizumab (Anti-PD-1) in Melanoma. *N Engl J Med.* 2013 Jul 11;369(2):134–44.
171. Nakatani K, Sakaue H, Thompson DA, Weigel RJ, Roth RA. Identification of a Human Akt3 (Protein Kinase B γ) Which Contains the Regulatory Serine Phosphorylation Site. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Apr 21;257(3):906–10.
172. Romano G. The role of the dysfunctional akt-related pathway in cancer: establishment and maintenance of a malignant cell phenotype, resistance to therapy, and future strategies for drug development. *Scientifica (Cairo).* 2013;2013:317186.
173. Gabay C, Towne JE. Regulation and function of interleukin-36 cytokines in homeostasis and pathological conditions. Vol. 97, *Journal of Leukocyte Biology.* 2015. p. 645–52.
174. Alhopuro P, Björklund M, Sammalkorpi H, Turunen M, Tuupanen S, Biström M,

- et al. Mutations in the circadian gene CLOCK in colorectal cancer. *Mol Cancer Res.* 2010;8(7):952–60.
175. Legare S, Cavallone L, Mamo A, Chabot C, Sirois I, Magliocco A, et al. The Estrogen Receptor Cofactor SPEN Functions as a Tumor Suppressor and Candidate Biomarker of Drug Responsiveness in Hormone-Dependent Breast Cancers. *Cancer Res.* 2015 Oct 15;75(20):4351–63.
176. Ariyoshi M, Schwabe JWR. A conserved structural motif reveals the essential transcriptional repression function of spen proteins and their role in developmental signaling. *Genes Dev.* 2003;17(15):1909–20.
177. Helary L, Castille J, Passet B, Vaiman A, Beauvallet C, Jaffrezic F, et al. DNAJC2 is required for mouse early embryonic development. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019 Aug 13;516(1):258–63.
178. Greiner J, Ringhoffer M, Taniguchi M, Hauser T, Schmitt A, Döhner H, et al. Characterization of several leukemia-associated antigens inducing humoral immune responses in acute and chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer.* 2003 Aug 20;106(2):224–31.
179. Greiner J, Ringhoffer M, Taniguchi M, Li L, Schmitt A, Shiku H, et al. mRNA expression of leukemia-associated antigens in patients with acute myeloid leukemia for the development of specific immunotherapies. *Int J Cancer.* 2004 Feb 20;108(5):704–11.
180. Tricoli J V, Boardman LA, Patidar R, Sindiri S, Jang JS, Walsh WD, et al. A mutational comparison of adult and adolescent and young adult (AYA) colon cancer. *Cancer.* 2018 Mar 1;124(5):1070–82.
181. Monod J, Jacob F. General Conclusions: Teleonomic Mechanisms in Cellular Metabolism, Growth, and Differentiation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1961 Jan 1;26:389–401.
182. Uhl EW, Warner NJ. Mouse Models as Predictors of Human Responses: Evolutionary Medicine. *Curr Pathobiol Rep.* 2015;3(3):219–23.
183. Bailey M, Christoforidou Z, Lewis MC. The evolutionary basis for differences between the immune systems of man, mouse, pig and ruminants. *Vet Immunol Immunopathol.* 2013 Mar 15;152(1–2):13–9.
184. Enard W. Mouse models of human evolution. *Curr Opin Genet Dev.* 2014 Dec;29:75–80.
185. Gagnière J, Raisch J, Veziant J, Barnich N, Bonnet R, Buc E, et al. Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2016;22(2):501–18.
186. Schwabe RF, Jobin C. The microbiome and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2013 Nov 17;13(11):800–12.
187. Tahara T, Yamamoto E, Suzuki H, Maruyama R, Chung W, Garriga J, et al. Fusobacterium in Colonic Flora and Molecular Features of Colorectal Carcinoma. *Cancer Res.* 2014 Mar 1;74(5):1311–8.
188. Kostic AD, Chun E, Robertson L, Glickman JN, Gallini CA, Michaud M, et al. Fusobacterium nucleatum Potentiates Intestinal Tumorigenesis and Modulates the Tumor-Immune Microenvironment. *Cell Host Microbe.* 2013 Aug 14;14(2):207–15.
189. Kohonen-Corish MRJ, Daniel JJ, te Riele H, Buffinton GD, Dahlstrom JE. Susceptibility of Msh2-deficient mice to inflammation-associated colorectal tumors. *Cancer Res.* 2002 Apr 1;62(7):2092–7.
190. Evrard, Tachon, Randrian, Karayan-Tapon, Tougeron. Microsatellite Instability: Diagnosis, Heterogeneity, Discordance, and Clinical Impact in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel).* 2019 Oct 15;11(10):1567.

11 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. C. Junghanß, Direktor der Medizinischen Klinik III – Klinik für Hämatologie, Onkologie und Palliativmedizin, danke ich für die Aufnahme in sein Forschungsteam und für die positive und objektive Kritik bei den Vorträgen.

Ein unbeschreiblich großes Dankeschön geht an Frau PD Dr. rer. nat. C. Maletzki. Ich habe durch sie ein wahnsinnig spannendes und zukunftsträchtiges Thema erhalten. Sie ist mir immer mit Rat und Tat beiseite gestanden und hat mir alle notwendigen Fähigkeiten und Fertigkeiten für das Arbeiten im Labor beigebracht. Durch ihren tollen Charakter war die gemeinsame Arbeit eine schöne Zeit, die ich nicht missen möchte. Sie ist mir ein großes Vorbild, da sie mir unter anderem auch gezeigt hat, wie man trotz der vielen Arbeit, auch eine tolle Mutter sein kann. Ich bewundere sie, für die Arbeit die sie leistet, und freue mich auch in Zukunft noch viele Ergebnisse aus Ihrer Forschung verfolgen zu können.

Auch Frau Univ.-Prof. Dr. med. B. Vollmar möchte ich für die Möglichkeit, am Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie arbeiten zu dürfen, danken.

Für die Aufzucht der Mäuse danke ich Frau Ilona Klamfuss.

Ich danke auch dem Team der Core Facility Multimodale Kleintierbildgebung, insbesondere Herrn Dr. rer. nat. J. Stenzel, Frau Joanna Förster und Frau Anne Rupp.

Ebenfalls möchte ich Frau Dr. rer. nat. M. Hühns und Herrn Dr. phil. nat. B. Schneider vom Institut für Pathologie danken. Die zahlreichen Fragmentanalysen waren dank ihrer Hilfe möglich.

Hanna Kehnscherper danke ich für die lustige Zeit und für die Unterstützung.

Anschließend möchte ich mich auch bei meinen großartigen Eltern bedanken. Über das ganze Studium haben sie mich durch dick und dünn begleitet und sind mir immer zur Seite gestanden. Ihr seid für mich die wichtigsten Menschen auf der Welt und meine großen Vorbilder.

Auch bei meinen Großeltern, die mich aus der Ferne immer unterstützt haben, möchte ich mich bedanken. Ich bin wahnsinnig glücklich, dass ich euch habe, bleibt so fit und gesund.

Zuletzt noch ein großes Dankeschön an meine Freunde, Isabelle, Florina, Karolis, Johanna, Insa und Nati. Ihr wart mir immer eine Säule in der Brandung, wurdet ein Teil meiner Familie und habt mir Rostock, in der Ferne der Heimat, zu einem zu Hause gemacht.

12 eidesstattliche Versicherung

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Graz

(Abgabedatum)

(Vollständige Unterschrift)

13 Anhang

13.1 Thesen

1. Bei fünf bis zehn % aller Patienten mit kolorektalem Karzinom liegt eine hereditäre Ursache der Erkrankung zugrunde. Das Lynch Syndrom ist dabei das häufigste Tumoprädispositionssyndrom (ca. 2-3 %).
2. Monoallelische Keimbahnmutationen in einem der DNA Mismatch Reparatur (MMR) Gene (v.a. *MLH1* und *MSH2*) sind zumeist Ursache des Lynch Syndroms. Das Tumorspektrum umfasst neben Kolorektalen Karzinomen auch Endometrium-, Ovarial-, Magen-, Haut- und Urothel-Karzinome. Typisch ist das Auftreten vor dem 45. Lebensjahr.
3. Biallelische Keimbahnmutationen in einem der DNA MMR Gene bedingen ein sehr seltenes und komplexes Krankheitsbild, die konstitutionelle MMR-Defizienz (CMMR-D).
4. Ein Charakteristikum MMR-D-assoziierter Tumoren ist die Mikrosatelliteninstabilität (MSI) und die damit einhergehende hohe Abundanz an Neoantigenen.
5. MSI dient als diagnostische Marker für die MMR-D.
6. MMR-D-assozierten Tumoren sind aufgrund der hohen Immunogenität und histologischen Besonderheiten besonders geeignet für eine Immuntherapie.
7. Das *MLH1*^{-/-} *gene knockout* Mausmodell ist ein präklinisches Modell für die Erforschung der MMR-D und Durchführung von Therapiestudien.
8. Die prophylaktische Chemo-Immuntherapie mit Gemcitabin und Tumorstellenantigenen verbessert, durch die verzögerte Tumorentwicklung und Modulation des Immunsystems, das Gesamtüberleben von *MLH1*^{-/-} Mäusen.
9. Die therapeutische Chemo-Immuntherapie hat im Vergleich zur Vakzine-Monotherapie einen geringen Einfluss auf das Gesamtüberleben.
10. Beide Therapieschemata (Vakzine und Chemo-Vakzine) stimulieren nachweislich das Immunsystem und beeinflussen das Tumormikromilieu positiv.
11. Wesentlich ist die weitere Erforschung der spezifischen immunologischen Mechanismen im Tumormikromilieu, um weitere Angriffspunkte für eine Immuntherapie zu identifizieren.
12. Die Identifikation MSI-spezifischer Zielgene der murinen *MLH1*-Tumorgenese hilft einerseits, die Mechanismen der Tumorgenese besser zu verstehen und schafft andererseits die Basis für nachfolgende Peptid-basierte Ansätze.

13.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Adresse: Ruinenweg 12, 8051 Graz
Telefonnummer: +436769442963
E-Mail-Adresse: leonie.wiegele@uni-rostock.de
Geburtsdatum: 07.03.1996
Geburtsort: Leoben
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: Österreich
Sprachkenntnisse: Englisch, Französisch

Akademische Laufbahn

2002-2006 Volksschule bei den Ursulinen Graz

2006-2014 Unter- und Oberstufe am Gymnasium der Ursulinen Graz

2013 Fachbereichsarbeit im Fach Biologie zum Thema Grundlagen und Methoden pränataler Untersuchungen
Auszeichnung mit dem Dr. Hans Riegel-Fachpreis

2014 Matura am Gymnasium der Ursulinen Graz
Immatrikulation an der Universitätsmedizin Rostock

2016 1. Staatsexamen

2019 2. Staatsexamen

Praktika

2013 Praktikum am Humangenetischen Institut Graz

2015 Pflegepraktikum an der Unfallchirurgie im LKH Feldbach/Fürstenfeld (30 Tage)

Pflegepraktikum an der Allgemeinchirurgie und Gynäkologie im LKH Feldbach/Fürstenfeld (60 Tage)

2017 Famulatur an der Allgemein- und Viszeralchirurgie im LKH Feldbach/Fürstenfeld (30 Tage)
Famulatur an der Universitätsklinik für Chirurgie Graz - Klinische Abteilung für Gefäßchirurgie (30 Tage)
Famulatur beim niedergelassenen Allgemeinmediziner (14 Tage)

2018 Famulatur beim niedergelassenen Allgemeinmediziner (14 Tage)
Famulatur an der Universitätsklinik Graz - klinische Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe (14 Tage)

2019 Famulatur an der Universitätsklinik Graz – klinische Abteilung für Orthopädie und Traumatologie (14 Tage)

13.3 Abkürzungsverzeichnis

A

AK	<i>Antikörper</i>
<i>Akt3</i>	<i>AKT serine/threonine kinase 3</i>
APC	<i>Allophycocyanin</i>
APC	<i>antigen presenting cells, antigenpräsentierenden Zellen</i>

B

BSA	<i>Bovines Serumalbumin</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>

C

CFS	<i>cancer family syndrome</i>
<i>Clock</i>	<i>Circadian Locomotor Output Cycles Kaput</i>
MMR-D	<i>Konstitutionelle Mismatch Reparatur-Defizienz; constitutional MMR-</i>
<i>CMS</i>	<i>Consensus Molecular Subtypes</i>
CPX	<i>Cyclophosphamid</i>
CRC	<i>kolorektales Karzinom, colorectal cancer</i>
CTL	<i>zytotoxische T-Zellen, cytotoxic T-Lymphocyte</i>
CTLA4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4</i>
CT	<i>Computertomographie</i>

D

DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
<i>DNAJC2</i>	<i>DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member C2</i>
DC	<i>dendritischen Zellen, dendritic cells</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>

E

EDTA	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>
ELISpot	<i>Enzyme Linked Immuno Spot Assay</i>
EPCAM	<i>epithelial cell adhesion molecule</i>
Exo1	<i>Exonuclease 1</i>

F

FAP	<i>familiäre adenomatöse Polyposis</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FKS	<i>Fetales Kälberserum</i>
FM	<i>Freezing-Medium</i>
F-18-FDG	<i>Fluorodeoxyglucose</i>

G

Gem	<i>Gemcitabin</i>
Gy	<i>Gray</i>

H

hMLH	<i>human Mut L Homologus</i>
hMSH	<i>human MutS Homologus</i>
HNPCC	<i>hereditary non-polyposis colorectal cancer, Hereditäres non-polypöses Kolonkarzinom</i>

I

i.p.	<i>intraperitoneal</i>
IC ₅₀	<i>mittlere inhibitorische Konzentration</i>
IFN	<i>Interferon</i>
IL	<i>Interleukin</i>
Il1f9	<i>Interleukin 1 Familien Mitglied 9; interleukin-1 family member 9</i>

K

KG	<i>Körpergewicht</i>
----	----------------------

L

LAG-3	<i>Lymphozytenaktivierungsgen 3</i>
-------	-------------------------------------

M

MDSC	<i>myeloide Suppressorzellen; myeloid-derived suppressor cells</i>
MMR	<i>Mismatch Reperatur</i>
MMR-D	<i>MMR-Defizienz</i>
MS	<i>Mikrosatellit</i>
MSI	<i>Mikrosatelliteninstabilität</i>
MSI-H	<i>MSI-high; hochgradige Mikrosatelliteninstabilität</i>
MSI-L	<i>MSI-low; niedriggradige Mikrosatelliteninstabilität</i>
MSS	<i>MSI-Stabil</i>
Mut	<i>mutator</i>
MCP1	<i>monocyte chemotactic protein 1</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein Kinase</i>
M-MDSC	<i>monocytic MDSC</i>

N

NF1	<i>Neurofibromatose Typ1</i>
NK-Zellen	<i>Natürliche Killerzellen</i>
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>

P

PBS	<i>phosphatgepufferte Salzlösung</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear Antigen</i>
PCR	<i>Polymerase-Kettenreaktion</i>
PD-1	<i>programmed cell death 1</i>
PD-L1	<i>programmed cell death 1 ligand 1</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PET	<i>Positronen Emissions Tomographie</i>
PMN-MDSC	<i>polymorphonuclear MDSC</i>

R

RFC	<i>Replikationsfaktor C</i>
RPA1	<i>Replikationsprotein 1</i>
RANTES	<i>regulated and normal T cell expressed and secreted</i>
RT	<i>Raumtemperatur</i>

S

s.c.	<i>subkutan</i>
Spen	<i>split ends</i>

T

TAM	<i>Tumor-assoziierte Makrophagen</i>
Th1	<i>T-Helferzellen</i>
Treg	<i>regulatorischen CD4⁺-T-Zellen</i>

V

VM	<i>Vollmedium</i>
VEGF	<i>vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren</i>

W

wt	<i>wild type, Wildtyp</i>
----	---------------------------

13.4 Antikörper

Antigen	Konjugat	Spezifität	Klon	Hersteller
CD104	FITC	mouse	346-11A	BioLegend
CD11b	FITC	mouse	M1	ImmunoTools
CD200R	FITC	mouse	OX-110	BioLegend
CD3e	FITC	mouse	MEM-57	ImmunoTools
CD44	FITC	mouse	IM7	BioLegend
CD69	FITC	mouse	H1.2F3	BioLegend
CD8	FITC	mouse	LT8	Immunotools
IL17A	FITC	mouse	17F3	Biolegend
PD1	FITC	mouse	4F12	Biolegend
γ/δ TCR	FITC	mouse	B1	Immunotoole
CD11c	PE	mouse	N418	BioLegend
CD166	PE	mouse	3A6	Biolegend
CD4	PE	mouse	GK1.5	Immuno Tools
CD62L	PE	mouse	FMC46	Immunotools
CD8	PE	mouse	RPA-T8	Immuno Tools
Gr1	PE	mouse	RB6-8C5	ImmunoTools
PD-L1	PE	mouse	10F.9G2	BioLegend
CD152 (CTLA-4)	PE	mouse	UC10-4B9	BioLegend
LAG-3	PE	mouse	C9B7W	BioLegend
NK1.1	PE	mouse	PK136	Immunotools
CD117	APC	mouse	2B8	Biolegend
CD127	APC	mouse	A7R34	BioLegend
CD178	APC	mouse	10F2	Biolegend

CD19	APC	mouse	LT19	ImmunoTools
CD197	APC	mouse	4B12	BioLegend
CD25	APC	mouse	MEM-181	ImmunoTools
CD279	APC	mouse	29F.1A12	BioLegend
IDO-1	APC	mouse	2E2/IDO1	BioLegend
mAb AN18 (Anti-mouse INF-gamma)		mouse		Mabtech
mAb R4-6A2- (Anti mouse INF-gamma)	Biotin	mouse		Mabtech

13.5 Primer

Gen	Repeat	Primer-Sequenz [5'>3']	Produkt- größe[BP]
Apc	A ₈	F: ATTTCTCTGGATCGCCTTT R: GCGAATCTTTCCCGTAATCA	189
Tmem60	A ₉	F: CTTTGACCCTCGACATGGAT R: CAGCCAGTAAGGCCCATAAA	164
Senp6	A ₁₁	F: GCTGTGACTGATTCGAGTGC R: GCCATTCTCACTTTGGGTTC	177
Phactr4	A ₁₀	F: ATCTTCAAGCCGTGGAAATG R: TTAAATGCAGCAGGCTCAG	185
Aste1	A ₈	F: GAAGCCTGGTCCACAGACTC R: AGGCTGGCAACCTTTTTCTT	199
Bat30	A ₃₀	F: ATTTGGCTTTCAAGCATCCATA R: GGGAAGACTGCTTAGGGAAGA	82
Bat59	A ₅₉	F: GTAATCCCTTTATTCCATTAGCA R: GGCTCACAACCATCCGTAACAAGA	189
Mdm2	A ₈	F: CGCAGGACAAAGACGAGAGT R: TCATTTGGATTGGCTGTCTG	198
AA003063	A ₂₃	F: ACGTCAAAAATCAATGTTAGG R: CAGCAAGGGTCCCTGTCTTA	87
U12235	A ₂₄	F: GCTCATCTTCGTTCCCTGTC R: CATTCCGGTGGAAAGCTCTGA	86
L24372	A ₂₇	F: GGGAAGACTGCTTAGGGAAGA R: ATTTGGCTTTCAAGCATCCATA	90
AC096777	T ₂₇	F: TACAGAGGATTGTCCTCTTGGAG R: GCTGCTTCACTTGGACATTGGCT	138
Fasl	A ₈	F: TCACCAACCAAAGCCTTAAAGT R: TCCCTGTAAATGGGCCACA	59
Kit	A ₈	F: TCAGCCTGACGTGCATTGAT R: AGAACTCGTGAGGCCATTGC	108
Rasal2	A ₈	F: CAAACTGGCGACCAGTCACAC R: TAGCCTTCCACCTCTTCATAGCA	151

Tcf7l2	T ₈	F: CACCTTGTATGTAGCGAACGCA R: TCAACTTGCCGTGAGCATTAGA	119
Bend5	A ₈	F: CTGGGGAACAGATGTTCTGA R: CTCTGACGATGCTGAGCTTG	113
Asnsd1	A ₈	F: AGTGAAGCAAGGTTGTTGGC R: GCCCTCACAGCAACAAAAGT	83
Nktr1	A ₉	F: GCGAGACACTCTGATGGTCA R: TGTCTTCTGCAATGTTTCTGC	95
Il18	A ₈	F: GGACACTTTCTTGCTTGCCA R: TCCCCACCTAACTTTGATGTAAG	124
Supt16	A ₈	F: TGAGAAAGTTCGGCATAGCA R: AGAAGGATCTGCCCCAGCTA	85
C8a	T ₈	F: CCTGGCGGATACTTCAATCT R: ACACCAGCTGAGTGGGACTT	100
Grb14	A ₁₀	F: GCATTTGCAGCTTTTCAGTG R: CGTCTGCTCTGCTCTTCTT	147
Ptpn21	A ₈	F: TTTGAAAGGTGTCTGGGTACG R: CGCTCTGGTGGACACTTCTT	176
Rfc3	A ₁₀	F: TTGGCAGTAGTGATTTGGTGA R: AGGAGCAGTTTACCTGGGATT	165
BAT26	A ₂₆	F: TCACCATCCATTGCACAGTT R: CTGCGAGAAGGTACTCACCC	134
D1Mit79	CA ₃₁	F: GACCTGGAAGTTGGAAACCA R: TGATCCAGAACCTCTGCCTT	150
BAT24	A ₂₄	F: CATAGACCCAGTGCTCATCTTCGT R: CATTGCGGTGGAAAGCTCTGA	98
D15Mit93	CA ₃₂	F: AAGAATTGGGGTGGGTAAGG R: CATGTGCAGAATACTTACACATATGC	144
Sdccag1	A ₁₁	F: GCATAGGCTGACAGGCTGAGAT R: TGCCAGCATTGAGAACAGTGAT	132
Casc3	C ₈	F: TGTCACACTTCCATAGAAACACACC R: GAGGACTCCCCAGCCGGT	140
Mbd6	G ₈	F: CCCTCTTCTTTCCAGCCAGT R: TGGAGGGATCTGGAGACTCT	171
Lig4	A ₉	F: TGAAGCCAAGGTGCTTACAG R: TGGGTTATTAAGTGAAGAAGGCT	133
Taf1b	A ₈	F: CATGTGACAACTTACGAA GAATCA R: TCCTTTCTTGGATCCTGAGC'	180
Mrpl37	A ₈	F: CGTGTCTTCCAGTTCCTGGT R: GAAATCAACAGGCCCAACAG	171
Mdc1	C ₈	F: GAAAGGCTGGTTGCTTCTTG R: ACTGATGATCTCGCCCATCT	188
Ercc5	A ₉	F: CTCAGAGTGGTGGCACGAAG R: CATCCACCACAGGCCTGAG	152
Casc5	A ₈	F: CAATGATGCAATGGAAGTACT R: TTTCTCTCTGAGTGGGCCAG	124
Akt3	T ₈	F: GGGCCAGATGATGCAAAAGA	65

Spen	A_8	R: ACATCTTGCCAGTTTACTCCAG	129
		F: GGTGTTTTTGCTGAGGGAAGG R: AGGATCCTGGCAGTCTTTGG	
Il1f9	A_{10}	F: GCACCAGAACAAGATCACGA R: CCAGCTCTCTCGTGTTCCAT	87
Clock	T_8	F: TGT TAGAGGCTCTTGATGGTTT R: ACTTCCATCTGTCATGATCGC	50
Dnajc2	A_8	F: CAAGTGTTTTCTCCAGTGTTTGA R: CGAGGAGTTCATATCACCAAGC	84
Tgfbβ2*	A_4GA_4	F: CATTACTCTGGAGACGGTTTGC R: TCGTTGCACTCTTCCATGTTAC	153
MLH1 mouse#		F: TGT CAA TAG GCT GCC CTA GG R1: TGG AAG GAT TGG AGC TAC GG R2: TTT TCA GTG CAG CCT ATG CTC	500 Knock- out 350 Wildtyp 350 + 500 Heterozygot

*(189); # Originalprimer aus PCR Protokoll NCI Mouse Repository (Strain Number: 01XA2)