

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

DIREKTOR: PROF. DR. MED. C. JUNGHANß

KOMBINIERTE VAKZINE-IMMUNCHECKPOINT- INHIBITION IM MURINEN *MLH1*-ASSOZIIERTEN TUMORGENESEMODELL

INAUGURALDISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES DOKTOR DER MEDIZIN

DER

UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

ERSTGUTACHTER: PROF. DR. MED. H. BLÄKER

ZWEITGUTACHTER: PRIV.-DOZ. DR. RER. NAT. C. MALETZKI

DRITTGUTACHTER: PRIV.-DOZ. DR. MED. A. ZIMPFER

EINRICHTUNG: UNI LEIPZIG

EINRICHTUNG: UNI ROSTOCK

EINRICHTUNG: UNI ROSTOCK

VORGELEGT VON

STEFFEN HAHN (GEB. KUNTOFF) | GEB. AM 12.05.1986 IN SPREMBERG

ROSTOCK | 11.04.2021 , VERTEIDIGT 2022

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00004078

Publikationen

Originalarbeiten

1. Salewski I, Gladbach YS, Kuntoff S, Irmischer N, Hahn O, Junghanss C, Maletzki C. *In vivo vaccination with cell line-derived whole tumor lysates: neoantigen quality, not quantity matters*. J Transl Med. 2020 Oct 21;18(1):402.
2. Salewski I*, Kuntoff S*, Kuemmel A, Feldtmann R, Felix SB, Henze L, Junghanss C, Maletzki C. *Combined vaccine-immune-checkpoint inhibition constitutes a promising strategy for treatment of dMMR tumors*. Cancer Immunol Immunother (Under review)

* Beide Autoren trugen gleichwertig bei

Kongressbeiträge

1. Maletzki C, Kuntoff S, Salewski I, Junghanss C. *Effective tumor growth control by combined vaccine-immune-checkpoint inhibition in Mlh1^{-/-} mice*. Vortrag; Annals of Oncology (2020) 31 (suppl_4): S245-S259
2. Salewski I, Kuntoff S, Junghanss C, Maletzki C. *Combined vaccine-immune-checkpoint inhibition significantly improves survival of Mlh1^{-/-} mice via immune modulation*. DGHO 2020

I. INHALTSVERZEICHNIS

I.	INHALTSVERZEICHNIS	3
II.	EINLEITUNG	6
2.1	KOLOREKTALES KARZINOM – INZIDENZ UND EPIDEMIOLOGIE	6
2.2	MECHANISMEN DER TUMORGENESE	7
2.2.1	CHROMOSOMALE INSTABILITÄT (CIN)	8
2.2.2	CPG-INSEL METHYLIERUNGSPHÄNOTYP (<i>CIMP</i>)	8
2.2.3	MIKROSATELLITENINSTABILITÄT (MSI)	8
2.3	<i>DNA-MISMATCH</i> -REPARATUR-DEFIZIENZ (MMR-D)	9
2.4	LYNCH SYNDROM	10
2.5	DER MOLEKULARE PHÄNOTYP MSI UND DEREN KLINISCHE RELEVANZ	11
2.6	MÖGLICHE THERAPEUTISCHE ANSÄTZE	12
2.7	ATEZOLIZUMAB IN DER THERAPIE	16
2.8	PRÄKLINISCHES MURINES <i>MLH1</i> KNOCK-OUT MODELL	16
2.9	SPEZIFISCHE VORARBEITEN IM <i>MLH1</i> KNOCK-OUT MODELL – AKTIVE IMMUNOTHERAPIE	17
2.10	ZIELSETZUNG	17
III.	MATERIAL	19
3.1	LABORGERÄTE	19
3.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN	20
3.3	CHEMIKALIEN	22
3.4	MEDIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN	23
3.5	ANTIKÖRPER	24
3.6	<i>PRIMER</i>	24
3.7	<i>KITS</i>	24
3.8	<i>SOFTWARE</i>	24
3.9	STATISTIK	25
IV.	METHODEN	26
4.1	TIEREXPERIMENTELLE METHODEN	26
4.1.1	TIERHALTUNG UND VERSUCHSTIERE	26
4.1.2	GEWINNUNG DER VAKZINE	26
4.1.2.1	DIAGNOSTIK UND QUANTIFIZIERUNG DER TUMOREN	27
4.1.2.2	<i>MONITORING</i> & VERSUCHSABSCHLUSS	27
4.1.3	AUFARBEITUNG VON GIT	28

4.1.4	AUFARBEITUNG LYMPHATISCHER ORGANE (MILZ UND THYMUS)	29
4.1.5	ZELLZAHLBESTIMMUNG MITTELS NEUBAUER-ZÄHLKAMMER	29
4.1.6	KRYOKONSERVIERUNG	29
4.1.7	BLUTAUFARBEITUNG.....	30
4.2	VERSUCHSAUFBAU UND VORARBEITEN.....	30
4.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	31
4.3.1	ISOLIERUNG VON <i>gDNA</i> AUS ZELLEN.....	31
4.3.2	KONZENTRATIONSMESSUNG DER <i>gDNA</i>	32
4.3.3	POLYMERASE-KETTENREAKTION (<i>PCR</i>)	32
4.3.4	FRAGMENTLÄNGENANALYSE	35
4.3.4.1	METHODIK	35
4.3.4.2	DURCHFÜHRUNG.....	36
4.4	IMMUNFLUORESCENZ-FÄRBUNG	37
4.4.1	METHODIK	37
4.4.2	ABLAUF	37
4.4.3	KONFOKALE LASER- <i>SCANNING</i> MIKROSKOPIE	38
4.5	IMMUNPHÄNOTYPISIERUNG MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE	39
4.5.1	PRINZIP DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE.....	40
4.5.2	ABLAUF	40
4.6	RADIOLOGISCHES VERFAHREN: PET / CT	42
4.6.1	PRINZIPIEN	42
4.6.2	ABLAUF	43
V.	ERGEBNISSE	44
5.1	ÜBERLEBENSWAHRSCHEINLICHKEITEN	44
5.2	TUMORWACHSTUM UND GRÖßENENTWICKLUNG IM PET / CT	45
5.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE ERGEBNISSE – FRAGMENTLÄNGENANALYSE	48
5.4	ANALYSE DES TUMORMIKROMILIEUS.....	50
5.5	IMMUNMONITORING UND NACHWEIS IMMUNOLOGISCHER VERÄNDERUNGEN.....	52
VI.	DISKUSSION	56
6.1	GRUNDSÄTZLICHE LIMITATIONEN DER VERSUCHE UND DES MAUSMODELLS	56
6.2	THERAPIEEINFLÜSSE AUF DAS GESAMTÜBERLEBEN UND TUMORWACHSTUM.....	61
6.3	THERAPIEEINFLÜSSE AUF IMMUNOLOGISCHER UND MOLEKULARER EBENE	64
6.4	EFFEKTE AUF DIE MSI	68
6.5	WEITERE MÖGLICHE THERAPEUTISCHE ANGRIFFSPUNKTE	69
6.6	MÖGLICHE TOXIZITÄT BEI DER KOMBINATIONSTHERAPIE.....	74

VII.	ZUSAMMENFASSUNG.....	77
VIII.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	79
IX.	TABELLENVERZEICHNIS.....	81
X.	LITERATURVERZEICHNIS.....	82
XI.	DANKSAGUNG	100
XII.	ANHANG.....	101
12.1	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	101
12.2	ABKÜRZUNGEN	102
12.3	ANTIKÖRPER.....	103
12.4	<i>PRIMER</i>	104
12.5	THESEN.....	107
12.6	LEBENS LAUF.....	108

II. EINLEITUNG

2.1 KOLOREKTALES KARZINOM – INZIDENZ UND EPIDEMIOLOGIE

Das kolorektale Karzinom (*colorectal cancer, CRC*) ist in vielen Ländern die zweit- oder dritthäufigste Tumorentität [1–3], die Inzidenz schwankt global erheblich [4]. Auch wird ein Einfluss der westlichen Diät [5,6] und des Lebensstils diskutiert [7], was durch Ergebnisse von Migrationsstudien untermauert wird [8]. Dies belegt, dass nicht-genetische Ursachen führend sind und der Krankheitsverlauf durch Prävention und Edukation in einer erfolgversprechenden Altersgruppe positiv beeinflusst werden kann [9]. In den *USA* zum Beispiel steigt die Inzidenz bei unter 50 Jährigen überproportional, wodurch dort ein *Screening* bei jüngeren Menschen diskutiert wird [10,11]. Generell ist die Inzidenz beim Mann höher als bei der Frau und steigt mit höherem Alter erheblich. So ist das *CRC* in der Altersgruppe der 40 - 59 Jährigen der zweithäufigste Grund für Tumor-assoziiertes Versterben und der dritthäufigste in der Altersgruppe der 20 - 39 Jährigen [12–14]. In Deutschland liegt die Ein-Jahres-Inzidenz des *CRC* bei Männern bei rund 300.000, bei den Frauen sind es etwa 250.000 Neuerkrankungen pro Jahr [4].

Estimated age-standardized incidence rates (World) in 2018, Colorectum, both sexes, all ages

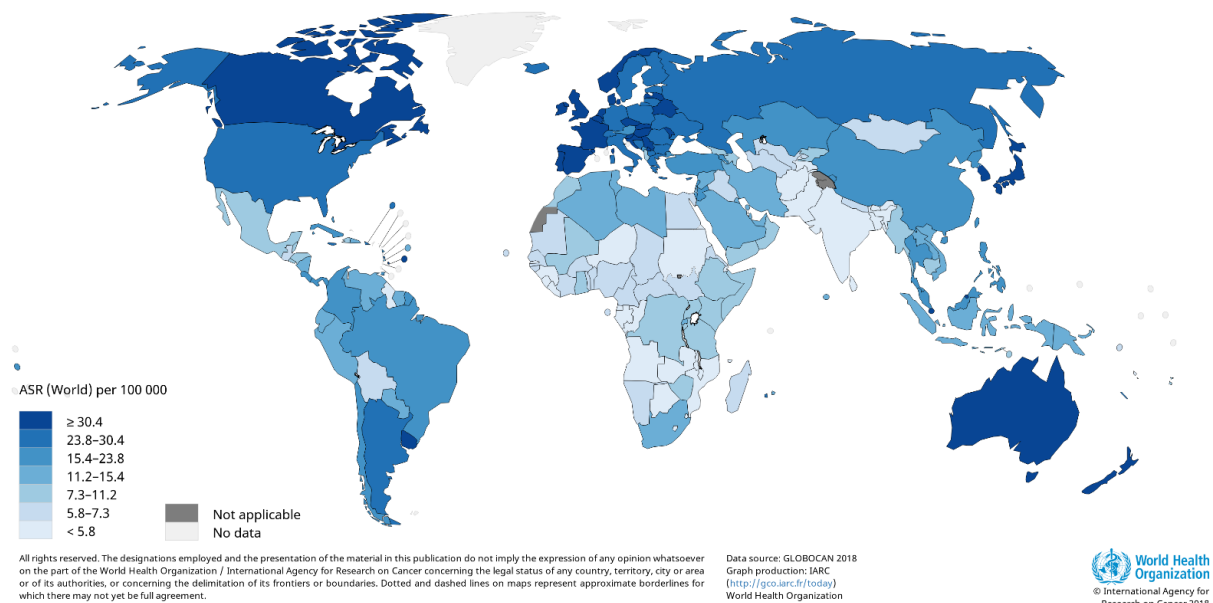


Abbildung 1: weltweite Inzidenz von CRC, 2018. (Quelle: [1])

Angenommene altersstandardisierte Inzidenzrate 2018 für *CRC*, alters- und geschlechtsunabhängig.

Es gibt zwei Häufigkeitspeaks der Erstmanifestationen: bei sporadischen *CRC* zwischen dem 60. - 65. Lebensjahr (= *late-onset*), bei hereditären *CRC* zwischen dem 20. - 50. Lebensjahr (= *early-onset*) [15]. Es hat sich gezeigt, dass etwa 15 – 20 % der *early-onset-CRC* Fälle

aufgrund von *Mismatch-Reparatur* Defizienz (MMR-D) entstehen [16–19] und gehäuft linksseitig auftreten [15,20]. Diese Tumoren werden unter dem häufigsten hereditären Tumorprädispositionssyndrom - namentlich Lynch Syndrom - zusammengefasst. Die molekularen Grundlagen, die kausal für die Entstehung Lynch-assoziiierter Tumoren verantwortlich sind, werden nachfolgend im Abschnitt 2.3 dargelegt.

2.2 MECHANISMEN DER TUMORGENESE

Schäden an der Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, *DNA*) in Zellen entstehen mit der Zeit als Resultat von externen (alkylierende Verbindungen, polyzyklische Kohlenwasserstoffe, Benzo[a]pyren) und internen reaktiven Metaboliten wie reaktive Sauerstoff- und Nitrospezies (ROS / NOS). Ein weiterer Faktor für *DNA*-Schäden sind Fehler, die während des normalen *DNA*-Metabolismus oder durch fehlerhafte *DNA*-Prozessierung entstehen, was die *DNA*-Replikation, Rekombination und Reparatur miteinschließt [21].

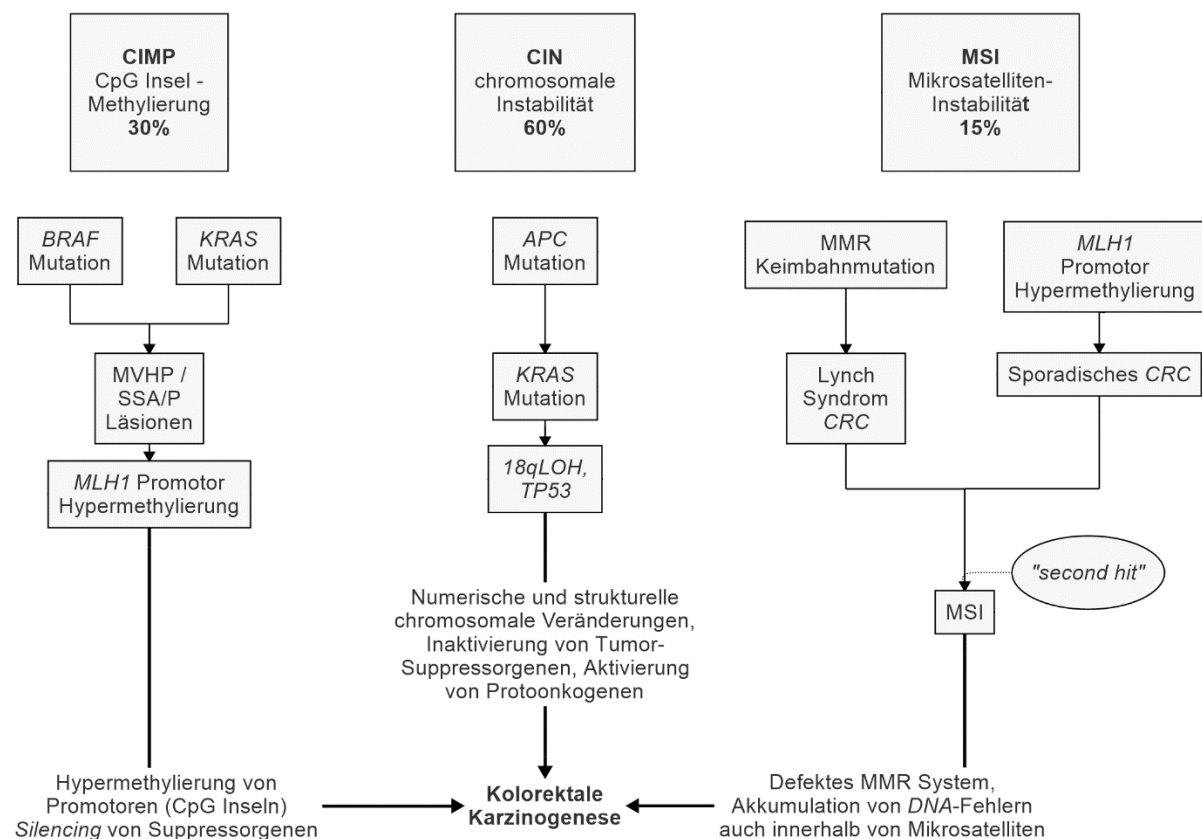


Abbildung 2: Genese von CRC. (Adaptiert nach: [22])

Das *CRC* entwickelt sich langsam, meist über mehrere Jahre und zeigt zytologisch je nach Differenzierung verschiedene Stadien: Beginnend mit einzelnen Kryptenläsionen, entwickeln sich Adenome und schließlich maligne Karzinome mit dem Potential zur Invasion und Metastasierung [22,23] – diese stufenweise Tumorgenese wird auch Adenom-Karzinom-Sequenz genannt. Somit beruht die maligne Transformation und Progression des *CRC* - wie bei den

meisten soliden Tumoren - auf einem Mehrstufenprozess, mit fortschreitender Akkumulation von genetischen und epigenetischen Veränderungen. Auf molekularer Ebene kann die CRC-Pathogenese in drei verschiedenen Subgruppen klassifiziert werden [24,25], wie im Folgenden erläutert.

2.2.1 CHROMOSOMALE INSTABILITÄT (CIN)

Bereits 1990 wurde dieser Tumorgenesezug als ein Mehrschrittmodell beschrieben [26]. Hierbei führt eine schrittweise Progression von sich aus dysplastischem Epithel entwickelnden Adenomen in mehreren Etappen zu einem invasiven Tumor (Adenom-Karzinom-Sequenz). Dieser Prozess wird durch die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie *Adenomatous polyposis coli (APC)*, *Deleted in Colorectal Carcinoma (DCC)* und *Tumorprotein 53 (TP53)* sowie durch die Aktivierung von Protoonkogenen wie *Kirsten rat sarcoma viral oncogene (K-ras)* unterhalten. Diese Akkumulation von chromosomalen und genetischen Veränderungen spiegeln sich in namensgebender chromosomaler Instabilität wieder, welche mit einer Aneuploidie assoziiert ist.

2.2.2 CPG-INSEL METHYLIERUNGSPHÄNOTYP (CIMP)

Beim CpG Insel-Methylierungsphänotyp (*CpG-island methylator phenotype, CIMP*) liegen vorwiegend epigenetische Veränderungen vor: Methylierungen von CpG-reichen Regionen (CpG-Inseln) im Promotorbereich von Genen (z.B. *MutL homolog 1 [MLH1]*, *O⁶-Methylguanin-DNS-Methyltransferase [MGMT]*, *CDK-Inhibitor 2A [cyclin dependent kinase inhibitor 2A, p16-INK4]*), häufig begleitet von Mutationen in *BRAF*- oder *K-ras*-Protoonkogenen [27].

2.2.3 MIKROSATELLITENINSTABILITÄT (MSI)

Mikrosatelliteninstabilität (MSI) ist eine direkte Folge der funktionellen Inaktivierung des *DNA-Mismatch-Reparatur (MMR) Systems*, welches für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase verantwortlich ist. Keimbahnmutationen in einem der MMR Gene (*MutL homolog 1 [MLH1]*, *MutS homolog 2 [MSH2]*, *MSH6*, *PMS1 Homolog 2 [PMS2]*), sowie teilweise in Kombination mit dem epithelialen Zelladhäsionsmolekül *EpCAM*) oder epigenetische Mechanismen wie (Hyper)Methylierungen (in diesem Fall ist ausschließlich *MLH1* betroffen) bilden die Ursache von MMR-Defizienz. MSI führt zu Längenvariationen (Insertionen / Deletionen) kurzer repetitiver Sequenzabschnitte (sogenannter Mikrosatelliten). Diese sind sowohl in nicht-kodierenden, als auch kodierenden Genabschnitten insbesondere von Tumorsuppressorgenen lokalisiert, wie beispielsweise *transforming growth factor beta receptor 2 [TGFβRII]*, *absent in melanoma 2 [AIM2]* und *Bcl-2-associated X protein [BAX]*. Zusätzlich können Mutationen in anderen Genen begünstigt werden (z.B. *APC* oder *K-ras*), welche die

Tumorprogression fördern. Bei Patienten mit Lynch Syndrom ist in über 90 % der Tumoren eine MSI nachweisbar, welche mit spezifischen klinischen Charakteristika assoziiert werden können [28]. Zum Nachweis oder Ausschluss von MSI wird das *Bethesda Panel* angewandt, bestehend aus fünf bis zehn Mikrosatellitenmarkern, die sehr sensitiv für MSI sind. In Abhängigkeit der Anzahl der betroffenen Marker werden Tumoren entweder als MSI-high, MSI-low oder mikrosatellitenstabil klassifiziert, wie in folgender Tabelle dargelegt [29–32]:

Tabelle 1: Definition von MSS sowie MSI in CRC anhand des Bethesda Panels.

Typ	Anzahl an veränderten Mikrosatelliten-Loci / getesteten Loci (%)	% aller CRC
MSI-H	2/5 (40)	10–15
MSI-L	1–3/10 (10–30)	10–15
MSS	0/5–10 (0)	70–80

MSI-H = high-frequency MSI; MSI-L = low-frequency MSI; MSS = Mikrosatelliten-stabil

2.3 DNA-MISMATCH-REPARATUR-DEFIZIENZ (MMR-D)

Die *DNA-Mismatch-Reparatur* (MMR) ist biologisch hochkonserviert und hat physiologisch die essentielle Bedeutung der Gewährleistung genomweiter Stabilität, um u.a. kurzfristig die Mutagenese und langfristig die Karzinogenese zu verhindern [33]. Durch sie werden bei neu replizierter *DNA* eventuell vorkommende Basen-Basen-Fehlpaarungen, sowie Insertionen oder Deletionen, wie zuvor im Abschnitt 2.2.3. beschrieben, behoben [34]. Es gibt zwei verschiedene heterodimere Komplexe, welche unterschiedliche Funktionen besitzen:

1. MutS assoziierte Proteine *MSH2–MSH3* und *MSH2–MSH6*
2. MutL assoziierte Proteine mit *MLH1–PMS1* (humanes *PMS2*) und *MLH1–MLH3* (humanes *PMS1*)
3. sowie andere Proteine [35]

In früheren Studien zeigte sich, dass eine homologe Rekombination unterbunden wird [36] und durch MMR-Proteine zelluläre Prozesse angestoßen werden, welche in einer Apoptose münden können [37,38]. Es wurde nachgewiesen, dass Chemotherapeutika wie Cisplatin ähnliche Effekte auslösen [39]. Bei etwa 15 % [40,41] der *CRC* liegt eine MMR-D vor, welche durch zwei zugrunde liegende Mechanismen getriggert wird:

- hereditäre MMR-Keimbahn-Mutation
- sporadische Hypermethylierung der *MLH1*-Promotor-Region

Bei einem Defekt in einem der MMR-Gene kommt es zur Akkumulation von Replikationsfehlern, wie in Abbildung 3 dargestellt. In der Literatur wird eine Mutation, welche eine erhöhte Mutationsneigung auslöst, als „Mutator-Mutation“ bezeichnen [25,42]. Der daraus resultierende Mutatorphänotyp erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass die Zelle durch Mutationen in bestimmten (z.B. wachstumsregulierenden) Genen Schritt für Schritt entartet [42].

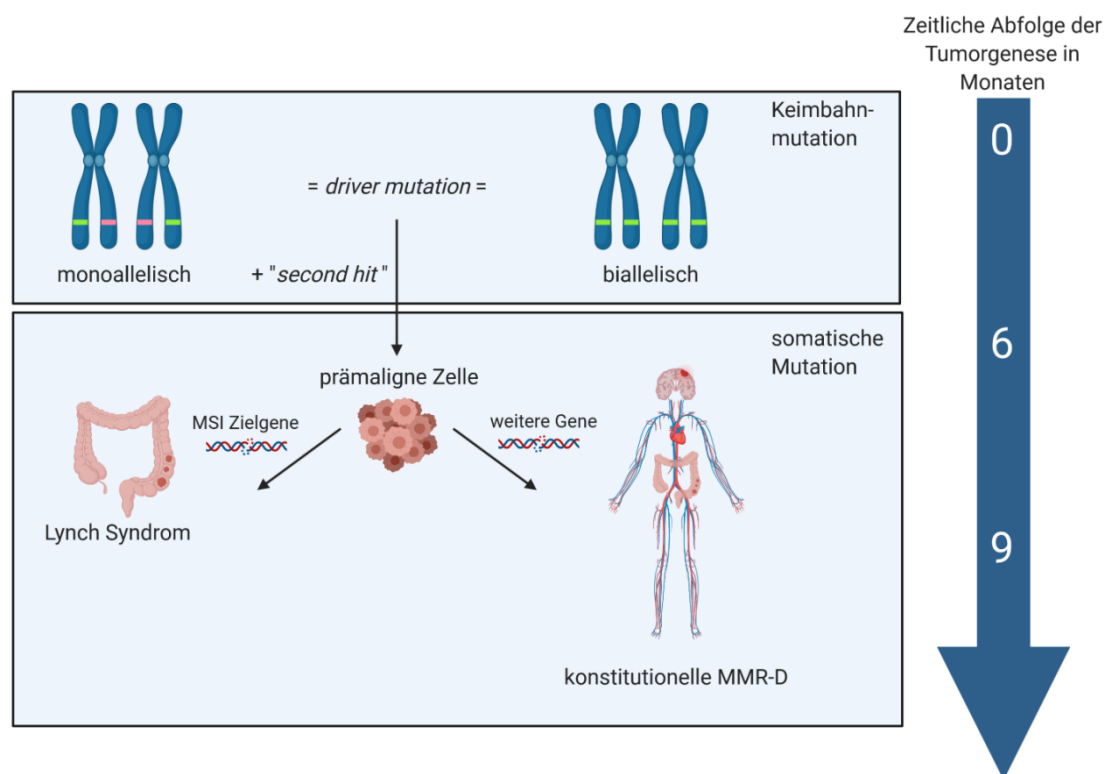


Abbildung 3: Bedeutung des MMR-Systems bei der Genese MMR-D-assoziierter Tumoren in Abhängigkeit der vorliegenden mono- oder biallelischen Keimbahnmutationen. (Quelle: eigene Erstellung)

2.4 LYNCH SYNDROM

Das Lynch Syndrom ist ein autosomal dominant vererbtes Syndrom mit unvollständiger Penetranz und ist ursächlich für zwei bis drei Prozent aller CRC verantwortlich [32,43–45]. Es ist oft vergesellschaftet mit weiteren Karzinomen, wie in Tabelle 2 aufgeführt [46,47]. Früher wurde der Begriff „hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom“ synonym mit dem Lynch Syndrom verwendet. Nun ist es eher ein klinischer Begriff, welcher ein weites Spektrum an familiär-assozierten CRC-Formen einschließt.

Tabelle 2: Lebenszeitrisiko und Tumorspektrum bei Patienten mit Lynch Syndrom.

Tumor	Risiko Männer [%]	Risiko Frauen [%]
kolorektales Karzinom	34-73	32-59
Endometriumkarzinom		39-50
Ovarialkarzinom		7-8
Magenkarzinom	1-6	
Karzinom des Nierenbeckens/Harnleiters	2-8	
Gallengangskarzinom	1-4	
Dünndarmkarzinom	1-4	
ZNS-Tumor	ca. 2	

Anamnestisch kann anhand der Amsterdam- und *Bethesda*-Kriterien [48] der Verdacht auf ein Lynch Syndrom verstärkt werden. Sind die Kriterien erfüllt, so schließen sich spezielle molekulargenetische Untersuchungen an [32,49]. *Next Generation Sequencing* kann perspektivisch zur Identifikation einer MMR-D / MSI genutzt werden [50–54].

Ungefähr 70,0 % der Patienten mit Lynch Syndrom tragen eine *MLH1* oder *MSH2* Keimbahnmutation in sich [55,56] (seltener auch *MSH6*, *EPCAM*, *PMS2*, *MLH3* [17,44,57–60] sowie weitere [61]). Dies führt zur Akkumulation somatischer Mutationen, da die Reparaturprozesse gestört werden [60]. In der Konsequenz sind die Tumoren häufig hyper- oder ultra-hypermutiert.

Die Penetranz des Krankheitsbildes ist mit über 80,0 % sehr hoch und abhängig vom Geschlecht (höheres Risiko für Männer) und der Art des betroffenen MMR-Gens (höheres Risiko bei *MSH2*-Mutationen, niedrigere Penetranz bei *PMS2*-Mutationen) [62]. Die kumulative zehn Jahres Inzidenz eines *CRC* bei Patienten mit Lynch Syndrom variiert von 4,1 % bis 18,4 % [63]. Ein weiteres typisches Merkmal ist das Auftreten von multiplen Tumoren. Das Lynch Syndrom zeigt keine auffällige Häufung von Polypen wie andere hereditäre *CRC* Syndrome (z.B. familiäre adenomatöse Polyposis). Die Anzahl der Adenome variiert beim Lynch Syndrom von einem bis einige wenige [64] und erschwert hierdurch die Abgrenzung zum sporadischen *CRC*. Die Progression vom Adenom zum Karzinom verläuft bei Patienten mit Lynch Syndrom deutlich schneller (i.d.R. unter drei Jahren) als bei sporadischem *CRC* (≤ 15 Jahre). Zudem sind die Adenome größer und weisen einen höheren Dysplasiegrad auf. Weiterhin zeigen sie, im Vergleich zu Patienten mit sporadischem *CRC*, einen erhöhten Anteil mit villösem Wachstumsmuster auf. Histopathologisch zeigt sich beim Lynch-assoziierten *CRC* überwiegend ein schlecht differenzierter, muzinöser Tumor mit starker Lymphozyteninfiltration und lymphoiden Aggregaten am Tumorrand [22,27,65].

Lynch-assoziierte Karzinome zeigen überdies ein verdrängendes Wachstumsverhalten. Patienten mit Lynch-assoziierten Karzinomen und sporadischen MSI-*CRC* haben eine bessere Prognose als Patienten, welche an einem sporadischen MSS-*CRC* erkrankt sind [66,67].

Aktuelle Untersuchungen zeigen zusätzlich, dass bei Patienten mit Lynch Syndrom mindestens zwei distinkte Subtypen vorkommen, weshalb diese entweder dem Subtyp G1 (= hoch immunogen) oder G2 (= wenig immunogen) zugeordnet werden [44,68].

2.5 DER MOLEKULARE PHÄNOTYP MSI UND DEREN KLINISCHE RELEVANZ

Mikrosatelliten (sogenannte *short tandem repeats*) sind definiert durch viele (meist zehn – 60) repetitive Wiederholungen derselben Base oder einer Basensequenz mit einer Länge von ein bis sechs, meist nicht-kodierender, genomweiter Basen [69,70]. Die Anzahl der Motivwiederholungen kann individuell variieren (Polymorphismus), ist aber in allen Zellen eines

Organismus gleich [71]. Aufgrund ihrer repetitiven Struktur sind Mikrosatellitensequenzen besonders anfällig für *DNA*-Replikationsfehler – entweder in Form von Insertionen / Deletionen oder durch Verrutschen der *DNA*-Polymerase bei der Replikation (*DNA Slippage*).

In gesunden Zellen werden diese Basenfehlpaarungen (=Mismatch) durch das MMR System erkannt und korrigiert [72]. Mutationen oder epigenetische Veränderungen führen zum Funktionsverlust des Reparatursystems und somit zur MMR-D. In der Konsequenz akkumulieren die betroffenen Zellen bei jeder Replikation Mutationen, welche sich häufig in kodierenden Mikrosatelliten von Tumorsuppressorgen manifestieren. Dies äußert sich – wie zuvor beschrieben - klinisch in Form des molekularen Phänotyps MSI. Charakteristisch für MSI-Tumoren ist eine Längendifferenz in Mikrosatelliten zwischen Tumor- und Normalgewebe [73].

Tritt MSI in nicht-kodierenden Bereichen von Genen auf, bleibt diese oftmals ohne Konsequenzen. In einigen Genen jedoch befinden sich die Mikrosatelliten, welche meistens Mononukleotidsequenzen sind, in kodierenden Regionen und eine MSI kann hier zu veränderter Proteinexpression führen. Die meisten identifizierten Mutationen in MMR-Genen sind Deletionen oder Insertionen von einem oder mehreren Nukleotiden, die zu Leserasterverschiebungen (*frameshift mutation*) führen. Zudem kommen Punktmutationen vor, die Fehlsinn-Mutationen (*missense mutation*) oder Unsinn-Mutationen (*nonsense mutation*) zur Folge haben. Seltener kommen stille Mutationen (*silent mutation*) oder Spleiß-Mutationen vor. Auch konnte demonstriert werden, dass genomische *Rearrangements* im Sinne großer Deletionen und Duplikationen eine wesentliche Rolle bei Keimbahnmutationen von MMR-Genen spielen [74]. Lynch Syndrom-Patienten tragen eine heterozygote Keimbahnmutation in einem der MMR-Gene. Sie besitzen folglich pro Zelle je ein intaktes und ein defektes Allel. Der Funktionsverlust von MMR-Genen erfolgt im Wesentlichen entsprechend der Inaktivierung von Tumorsuppressorgen (Knudson-"two-hit"-Theorie [75]). Das heißt bei Vorliegen einer Keimbahnmutation (*first hit*) wird das verbleibende unveränderte Allel durch somatische Mutationen, Verlust der Heterozygotie (*loss of heterozygosity*) oder durch Hypermethylierung inaktiviert (*second hit*, wie in Abbildung 3 dargestellt), wobei letztere ausschließlich beim sporadischen Pendant auftritt [76]. Die Inaktivierung des zweiten Allels führt zu einem Anstieg des Krebsrisikos, man spricht dann von einem Mutatorphänotyp [60,70,77].

2.6 MÖGLICHE THERAPEUTISCHE ANSÄTZE

Krebszellen sind in der Lage, die Aktivität und Funktion von Immunzellen aktiv zu hemmen. Dies erfolgt über verschiedene Mechanismen, wie der Sekretion immunsuppressiver Zytokine (Interleukin-10 [IL10], *transforming growth factor beta*) und durch Herunterregulation von Hauptgewebeverträglichkeitskomplex Klasse 1 (*major histocompatibility complex*, MHC-Klasse I) auf der Tumorzelloberfläche. Ein weiterer, erst vor einigen Jahren beschriebener

Mechanismus basiert auf der Expression spezifischer Immuncheckpoint-Moleküle wie *programmed cell death 1* (PD-1 - CD279), *programmed death ligand 1* (PD-L1) oder *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (CTLA-4 - CD152). Die physiologische Funktion dieser Proteine ist die Regulation der Intensität einer Immunantwort über eine Modulation der T-Zell-Aktivierung oder der T-Zell-Effektorfunktion. PD-1 kann auf aktivierten T-, B- und natürlichen Killer (NK)-Zellen, Monozyten sowie dendritischen Zellen (*dendritic cells*, DC) exprimiert sein. Es ist ein 55 kDa schwerer und 288 Aminosäuren umfassender Transmembranrezeptor mit β -Faltblattstruktur sowie einer Bindungsstelle aus der Immunglobulin-Superfamilie. PD-1 weist strukturelle Ähnlichkeit mit anderen inhibitorischen Molekülen wie CTLA-4 auf. Bei Rezeptor-Liganden-Interaktion und gleichzeitigem T-Zellrezeptorsignal wird eine Signalkaskade ausgelöst, welche mit Phosphorylierungen an zytoplasmatischen Tyrosinresten und Bindung der Phosphatasen SHP1/2 endet. Es folgt eine Dephosphorylierung verschiedener Tyrosinkinasen (ZAP-70, *etc.*) und Inhibition des T-Zellrezeptorsignals [78]. Dies äußert sich in der Hemmung der IL2 Produktion, der Hemmung des Glukosestoffwechsels und Inhibition von Proteinkinase B (AKT) und assoziierter Phosphoinositid-3-Kinase(PI3K)-Signalwege, die mit der Effektor-Funktion von T-Zellen verbunden sind [79].

Bisher bekannte Liganden von PD-1 sind PD-L1 (B7-H1, CD274) und PD-L2 (B7-DC, CD273). PD-L2 kommt nur auf Makrophagen und DC vor [80]. PD-L1 hingegen ist konstitutiv auf ruhenden und aktivierten B und T-Zellen, myeloischen Suppressorzellen (*Myeloid-derived suppressor cells*, MDSC), DC sowie Makrophagen detektierbar. Funktionell moduliert PD-L1 die Thymozyten-Reifung [81], sowie die Produktion von Zytokinen wie IL10 und vermittelt eine Apoptose von T-Zellen, mit Beteiligung der Fas-FasL-Interaktion und IL10 [82,83].

Aufgrund der hohen Immunogenität MMR-D-assoziierter Tumoren zeigen diese oftmals eine besonders hohe Abundanz an Immuncheckpointmolekülen (u.a. PD-1 sowie PD-L1) [50,84–86]. Dies stellt einen Ansatzpunkt für Immuncheckpoint-Inhibitoren (ICI) dar. Die Rationale hierfür wird in Abbildung 4 dargelegt. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Parameter, wie Anzahl, Art und Lokalisation von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (sogenannte Interferon- γ [IFN γ] Signatur), bei bestimmten Tumorentitäten mit einem Therapieerfolg von ICI assoziiert sind [67,87,88]. Dieser „*Immunoscore*“ wurde ursprünglich von Galon *et al.* entwickelt [89–91]. Anhand der Anzahl an CD3⁺ bzw. CD3⁺CD8⁺ T-Zellen im Tumorzentrum und -rand, wird eine Einschätzung eines möglichen Therapieerfolges gegeben. Eine starke Korrelation zwischen hoher Expression von PD-1 Liganden und dem „*Immunoscore*“ wurde gezeigt [87]. Dies hat bereits im Jahre 2017 zur Zulassung des anti-PD1-Inhibitors Pembrolizumab in der Therapie MMR-D-assoziierter nicht-resektabler bzw. metastasierter Tumoren geführt, welche 2020 für die Erstlinientherapie erweitert wurde. Korrelationen mit der Expression von PD-1 Liganden (PD-L1 oder PD-L2), mit der Tumormutationslast (*tumor mutation burden*, TMB) sowie den Tumor-infiltrierenden Lymphozyten sind aktuell intensiv beforschte Kandidaten als

Marker für die ICI [67,92–97]. Tumoren mit einer hohen intratumorale Mutationslast (=hyper- bzw. ultramutiert) tragen eine Vielzahl an Neoantigenen auf ihrer Oberfläche, welche grundsätzlich von T-Zellen als fremd erkannt werden können und folglich einen therapeutischen Angriffspunkt darstellen.

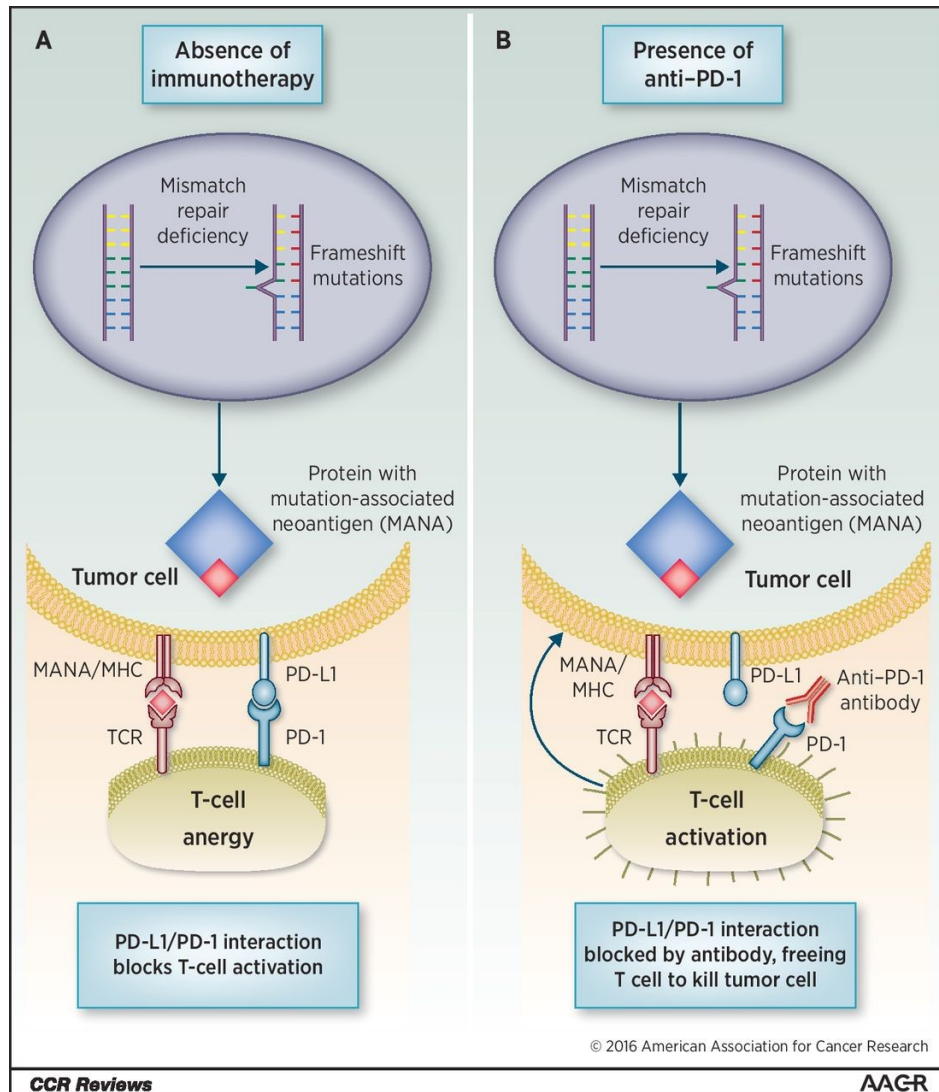


Abbildung 4: PD-1/PD-L1-Interaktion als Immunescape-Mechanismus. (Quelle: [84])

Die Restauration der Immunabwehr durch monoklonale Antikörper (AK), welche spezifisch gegen Immuncheckpoint-Moleküle gerichtet sind, war ein Durchbruch in der Krebstherapie [98,99]. In vielen klinischen Studien wurde in den letzten Jahren untersucht, welches Potential dieser Therapieansatz besitzt. Heute weiß man, dass zielgerichtete Immuntherapien eine sichere und effektive Therapieoption darstellen - auch nach Ausschöpfen vorheriger Behandlungsstrategien.

Ebenso gibt es erste Ansätze der Kombination von ICI mit traditioneller Radiotherapie [100], chinesischer Medizin [101], sowie Indolamin-2,3-Dioxygenase(IDO)-Inhibitoren [102]. Somit ist eine Kombination aus etablierten Verfahren und einer ICI ein denkbarer Therapieansatz,

wie in Abbildung 5 dargelegt. Die Kombination mit Chemotherapeutika wie Gemcitabin (2',2'-Difluordesoxycytidin, ein Cytidin-Analogon) wird erfolgreich angewandt [103–105]. In einer vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Immuntherapien gut mit diesem Zytostatikum kombinierbar sind und zur Verlängerung des Gesamtüberlebens bei *Mlh1*^{-/-} Mäusen führen [106].

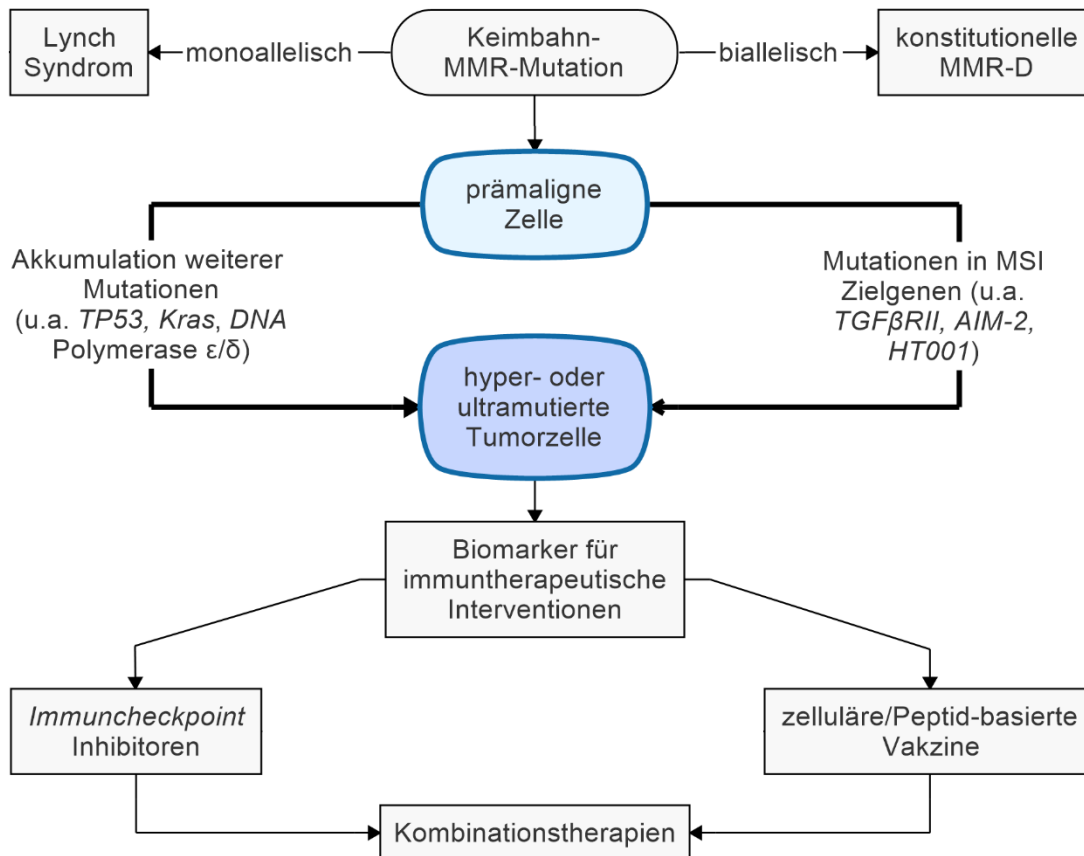


Abbildung 5: Ätiologie und mögliche Behandlungskonzepte bei MMR-D-assoziierten Tumoren. (Quelle: eigene Erstellung)

Neben der Wirkung als Ligand für PD-1 scheint PD-L1 – abhängig von seiner räumlichen Orientierung [107] – auch an den Liganden B7.1 (CD80) binden zu können und dort T-Zellen zusätzlich hemmend zu beeinflussen [108,109]. Demnach bindet B7.1 (CD80) neben dem kostimulatorischen Molekül CD28 mit PD-L1 einen funktionell inhibitorischen Liganden, wobei die Dissoziationskonstante sogar mit 1,7 µM relativ stärker ist als die der B7.1 Verbindung zu CD28 mit 4 µM [110]. Indirekt bedeutet dies, dass in der Gegenwart beider Moleküle in gleicher Konzentration die T-Zelle eher PD-L1 bindet und damit ein inhibitorisches Signal empfängt, beziehungsweise kostimulatorische Signale nicht empfangen kann [111,112]. Daneben gibt es Hinweise auf eine bidirektionale Wirkung von PD-L1, welches über die zytoplasmatische Domäne als Rezeptor fungiert [110]. Demnach vermittelt PD-L1 auch anti-apoptotische Signale an der Zielzelle und schützt diese vor dem Zelltod. In Abwesenheit von PD-1 führt die

Interaktion von PD-L1 mit B7.1 zu einer verstärkten Aktivierung im murinen Modell, was die Komplexität der Wirkungsweise unterstreicht [100].

2.7 ATEZOLIZUMAB IN DER THERAPIE

Atezolizumab ist ein voll-humanisierter monoklonaler AK des IgG1 Isotyps. Die Halbwertszeit beträgt etwa 27 Tage und ist damit vergleichbar mit anderen ICI. Atezolizumab ist gerichtet gegen das PD-L1-Protein. Somit wird die PD-1/PD-L1 Rezeptor-Liganden-Interaktion gestört, welche sonst eine dauerhafte T-Zell-Aktivierung unterbindet, um eine überschießende Immunreaktion zu verhindern [82,83,113–115]. PD-L1 bindet auch an CD80 Rezeptoren (B7-1Rs) - Atezolizumab unterbindet dies, was eine Reaktivierung der Immunantwort im Tumor bewirkt. Weiterhin findet eine Hochregulation des T-Zell-*Primings* mit verstärkter Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten (*cytotoxic T lymphocytes*, CTL) in den Lymphknoten statt. Es ist bereits zugelassen für die Erstlinientherapie des metastasierten nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms, des fortgeschrittenen Urothelkarzinoms (hier in der Zweitlinie), sowie seit Januar 2020 auch für die Erstlinientherapie dreifach-negativer Mammakarzinome mit nachgewiesener PD-L1 Expression >1 %. Obgleich die initialen Ansprechraten sehr gut sind, zeigen die aktuellen Studien auch, dass nur bei einem Teil der Patienten eine Langzeitremission erzielt wird [93]. Die Identifikation aussagekräftiger prädiktiver Biomarker ist Gegenstand aktueller Forschung.

2.8 PRÄKLINISCHES MURINES *MLH1* KNOCK-OUT MODELL

Da Mutationen der *Mlh* und *Msh* Gene zu Funktionsstörungen in den MMR Proteinen führen, sind entsprechende *knock-out* Mäuse ein geeignetes Modell zur Erforschung der MMR-D [116]. *Mlh1*^{-/-} Mäuse (Stamm: B6.129-*Mlh1*^{tm1Rak}) tragen eine dominant negative Nullmutation im *Mlh1*-Gen (Exon 2 Deletion), sind folglich homozygot negativ für das *Mlh1*-Protein und zeigen einen starken Tumorphänotyp [117]. Die Tumorgenese verläuft zweistufig, mit primärer Entwicklung von hochmalignen T- und B-Zell-*non*-Hodgkin Lymphomen (ca. 60 % der Tiere; Altersgipfel zwischen dem vierten und achten Lebensmonat) und einer zeitlich verzögerten gastrointestinalen Tumorgenese (ca. 40 % der Tiere; ab dem neunten Lebensmonat). Die Lymphome unterscheiden sich primär anhand ihrer klinischen Manifestation: etwa 1/3 aller Lymphome entwickeln sich im Thymus und 2/3 treten als generalisierte Lymphome auf. Weiterhin entwickelt ein geringer Teil der Tiere prä-maligne Hautläsionen und andere Tumoren [118]. Eine weitere Konsequenz der *Mlh1*-Defizienz ist die, beide Geschlechter betreffende, Infertilität. Daher werden in der Zucht ausschließlich heterozygote Tiere eingesetzt und verpaart.

Erfahrungen aus Studien an MMR-D Modellen konnten die enorme Bedeutung der MMR-Proteine in verschiedenen biologischen Abläufen von Säugetieren aufzeigen. Diese umfassen die

somatische Hypermethylierung sowie den Klassenwechsel bei der Reifung von B-Zellen [119,120]. Weiterhin wurde auch die Bedeutung des MutS β Komplexes für die Förderung von *triplet repeats* über die *DNA-Polymerase β* beschrieben, was die Vielfältigkeit und Komplexität der Interaktionen unterstreicht, da sie mit einer Vielzahl (mindestens 40) an neurologischen Erkrankungen assoziiert sind [121,122]. Durch die MMR-D wird eine Hypermethylierung begünstigt, wie im Abschnitt 2.2 sowie 2.6 ausführlich erläutert, welche beim *CRC* in einer Vielzahl von Neoantigenen auf der Zelloberfläche münden kann [117].

2.9 SPEZIFISCHE VORARBEITEN IM *MLH1* KNOCK-OUT MODELL – AKTIVE IMMUNOTHERAPIE

Um die spezifische Immunantwort des Körpers zu aktivieren, können Vakzine sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch appliziert werden. Zu unterscheiden sind hierbei Peptid-basierte, Gesamttumorslysate- [123] sowie *DNA*-Vakzine [124]. In vorangegangenen Studien, in welcher ein gastrointestinales Gesamttumor-Lysat eingesetzt wurde, konnte die grundsätzliche Wirksamkeit zellulärer Vakzine im *Mlh1*-Modell experimentell aufgezeigt werden [125,126]. Die repetitive Gabe des Tumorzins beeinflusste sowohl die Tumorentstehung, als auch das Tumorzinswachstum durch Stimulation bzw. Modulation des Immunsystems. Hinsichtlich des Therapieansprechens zeigten sich Unterschiede, welche die klinische Situation sehr gut abbilden und Hinweise auf ein Entitäten-spezifisches Mutationsprofil untermauern. So konnte die gastrointestinale Tumorentstehung deutlich verzögert werden. Die Lymphomagenese wurde demgegenüber nur marginal beeinflusst [125].

Nach therapeutischer Intervention wurde in den Tumorzinsresektaten eine erhöhte intratumorale Mutationslast, sowie eine verstärkte Abundanz der Immuncheckpoint-Moleküle PD-L1 und LAG-3 auf infiltrierenden Immunzellen nachgewiesen [125]. Letztere stellt sehr wahrscheinlich einen erworbenen *escape*-Mechanismus und damit ein zusätzliches therapeutisches Ziel für eine ICI dar [127]. ICI scheinen abhängig von heterogenen Mutationsprofilen, der *TMB*, vom Tumorstadium sowie vom Ausmaß der Immunsuppression im Tumormikromilieu zu wirken [68,128].

Diese umfassenden Vorarbeiten stellten eine ideale Ausgangsbasis für die vorliegende Arbeit dar, in welcher der Vakzine-basierte Therapieansatz durch Kombination mit einem ICI verbessert werden sollte.

2.10 ZIELSETZUNG

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirksamkeit einer kombinierten Immuntherapie, bestehend aus Atezolizumab und eines *Mlh1*^{-/-} A7450 Lysates im präklinischen *Mlh1*^{-/-} Tumorentstehungsmodell zu untersuchen. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass die alleinige Gabe des Tumorslysates das Gesamtüberleben zwar verbessert, jedoch auch zu

einer Hochregulation von Immuncheckpointmolekülen im Tumor führt [126]. Damit wurde PD-L1 als potentielle therapeutische Zielstruktur identifiziert und deren Relevanz für die kombinierte Immuntherapie *in vivo* evaluiert.

Wir vermuteten folglich, dass die Kombination der Therapeutika der Einzelgabe überlegen ist und das Gesamtüberleben signifikant verlängert. Aufgrund fehlender Voruntersuchungen wurde zunächst die Wirksamkeit der Atezolizumab-Monotherapie untersucht. Hierzu wurden zwei unterschiedliche Schemata evaluiert. Basierend auf diesen Ergebnissen erfolgte anschließend die kombinierte Immuntherapie mit einem Tumorlysat, welches repetitiv appliziert wurde.

Um die Effizienz der eingesetzten kombinierten Immuntherapie zu beurteilen, wurden folgende Parameter untersucht:

- Kontinuierliches *Monitoring* und Erfassung des Allgemeinbefindens (Habitus, Sozialverhalten, Gewicht)
- Gesamtüberleben anhand von Kaplan-Meier-Kurven
- Longitudinale Quantifizierung des Tumorwachstums durch ^{18}F -FDG-basierte PET / CT Untersuchungen
- *Monitoring* des Immunstatus anhand von durchflusszytometrischen Analysen, durch longitudinale Messungen aus dem peripheren Blut
- Veränderungen im Tumormikromilieu anhand von immunhistochemischen Verfahren
- MSI Status und Nachweis von kodierenden Mikrosatellitenmutationen anhand von Fragmentlängenanalysen

Wir erhoffen uns mit diesem Ansatz einen Beitrag zur Entwicklung neuer therapeutischer Konzepte für Patienten mit Lynch Syndrom, sowie anderen Patienten, die an einem MMR-D - assoziierten Tumor erkrankt sind, zu generieren.

III. MATERIAL

3.1 LABORGERÄTE

Laborgeräte	Hersteller	Hauptsitz
3500 Genetic Analyzer	Thermo Fisher Scientific GmbH	Waltham, USA
BD FACSVerse™	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
Digital Dry Bath	Bio-Rad Laboratories GmbH	Hercules, USA
Flockeneisbereiter AF 80	Scotsman	Mailand, Italien
Feuchte Kammer	UMR Eigenbau	Rostock, Deutschland
Freezing Container, Nalgene™ Mr. Frosty™	Thermo Fisher Scientific GmbH	Waltham, USA
Gamma-Bestrahlungsanlage	Gammabestrahlungsanlage IBL 673	Hamburg, Deutschland
Gefrierschrank -80 °C	Liebherr Deutschland GmbH, Kryotec-Kryosafe GmbH	Bulle, Schweiz Hamburg, Deutschland
Isoflurananlage (PET)	Groppler	Deggendorf, Deutschland
Kleinschüttler MS1	IKA-Werke GmbH & Co. KG	Staufen, Deutschland
Kryostat CM1850 S	Leica	Wetzlar, Deutschland
Kühlschrank (4 °C) / Gefrierschrank (-20 °C)	Elektrolux	Stockholm, Schweden
Kühlschrank (4 °C) / Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr	Bulle FR, Schweiz
Laser-Scanning Mikroskop LSM 780	Carl Zeiss Microscopy GmbH	Jena, Deutschland
Lichtmikroskop (Nikon E-clipse™ TE200)	Nikon	Tokio, Japan
Multipette™ M4	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

NanoDrop™ ND-1000 Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific GmbH	Waltham, USA
Narkoseinduktionskammer	Patterson Scientific	Waukesha, USA
Neubauer Zählerkammer	Marienfeld	Lauda Königshofen, Deutschland
PET / CT	Siemens	München, Deutschland
pH-Meter S20 SevenEasy™	Mettler-Toledo GmbH	Gießen, Deutschland
Accu-Jet™ pro	Brand	Wertheim, Deutschland
Pipetten (2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Sprout™ Mini-Zentrifuge	Biozym Scientific GmbH	Oldendorf, Deutschland
Werkbank Herasafe™ (steril)	Thermo Fisher Scientific GmbH	Waltham, USA
Stickstofftank Apollo™	Cryotherm GmbH & Co. KG	Kirchen, Deutschland
Thermocycler C1000™	Bio-Rad Laboratories GmbH	Hercules, USA
Thermomixer comfort™	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Reax top™ Vortex-Gerät	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

3.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Verbrauchsmaterialien	Hersteller	Hauptsitz
6-well Zellkulturplatte Cellstar™	Greiner bio-one	Kremsmünster, Österreich
96-well 340 µl Storage Platte	Corning	New York, USA
96-well PCR-Platte (Halbrand)	Sarstedt AG & Co. KG	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
Alu-Folie 20 µm Stärke	Roth	Karlsruhe, Deutschland
MicroAMP™ Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific GmbH	Waltham, USA
Cell Strainer EASY strainer™	Greiner bio-one	Kremsmünster, Österreich
Chirurgisches Besteck-Set (chirurgische Schere, chirurgische und anatomische Pinzette)	Aesculap AG	Tuttlingen, Deutschland
Combitips advanced, steril (5 ml, 10 ml)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Dako Pen	Dako	Glostrup, Dänemark
Deckgläser (22 x 22 mm)	iDL	Nidderau, Deutschland
Deckgläser (24 x 32 mm)	iDL	Nidderau, Deutschland
End-to-End Kapillare 20 µl	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
Falcon™, konische Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Thermo Fisher Scientific GmbH GmbH	Waltham, USA
Nunc™ Kryotube™ Vials	Thermo Fisher Scientific GmbH GmbH	Waltham, USA
Objektträger (76 x 26 mm)	Engelbrecht	Edermünde, Deutschland
Pasteur Pipetten (150 mm)	Hecht Glaswarenfabrik GmbH & Co KG	Sondheim vor der Rhön, Deutschland
Pasteur Pipetten (250 mm)	Hecht Glaswarenfabrik GmbH & Co KG	Sondheim vor der Rhön, Deutschland
PCR- Reaktionsgefäß (flat tube)	Bio-Rad Laboratories GmbH	Hercules, USA
PCR- Reaktionsgefäß-Deckel (flat cap)	Bio-Rad Laboratories GmbH	Hercules, USA
Peha-soft nitrile fino puderfrei Handschuh, unsteril	Paul Hartmann AG	Heidenheim, Deutschland
Pipetten Research	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipetten Research plus	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Probengefäß 1,3 ml	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland

Reaktionsgefäß (1,5 ml)	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße, <i>safe-lock</i> (1,5 ml)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Serologische Pipette, steril (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Greiner bio-one	Kremsmünster, Österreich
Skalpell präzisa plus, steril	Dahlhausen	Köln, Deutschland
Spritzen, steril	Braun	Melsungen, Deutschland
Tissue-Tek Cryomold™	Sakura Finetek Europe B.V.	Alphen aan den Rijn, Niederlande

3.3 CHEMIKALIEN

Chemikalien	Hersteller	Hauptsitz
96 % Ethanol	Walter CMP	Kiel, Deutschland
Aceton	JTBaker	Waltham, USA
Ammoniumchlorid	Merck KGA	Darmstadt, Deutschland
<i>Aqua dest.</i>	SGWater - Analge	Barsbüttel, Deutschland
Bacillol AF	Hartmann	Heidenheim, Deutschland
Dako <i>Fluorescent Mounting Medium</i>	Dako	Glostrup, Dänemark
DFS-<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Bioron GmbH	Römerberg, Deutschland
DMSO (dimethyl sulfoxid)	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
dNTP 10 mM	Bioron GmbH	Ludwigshafen, Deutschland
Gemcitabin	VEZ Universität Rostock	Rostock, Deutschland
GeneScan™ 500 LIZ™	Applied Biosystems, Fisher Scientific GmbH	Waltham, USA
HCl	Merck	Darmstadt, Deutschland
HiDi™ Formamid	ThermoFisher Scientific GmbH	Waltham, USA
<i>Intracellular Straining Permeabilization Wash Buffer</i>	Biolegend	San Diego, USA
Isofluran Forane™	AbbVie GmbH & Co. KG	Wiesbaden, Deutschland
Isopropanol	Walter CMP	Kiel, Deutschland
Ketamin / Xylazin (90 / 6 mg/kg KG)	Bela-pharm GmbH & Co. KG	Vechta, Deutschland
Methanol	JT Baker	Deventer, Niederlande

NaOH	Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Phosphat buffered saline (pH 7,4)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Deutschland
Polymer POP-4™	Applied Biosystems, Fisher Scientific GmbH	Waltham, USA
Puffer 10x mit EDTA	Applied Biosystems, Fisher Scientific GmbH	Waltham, USA
Reaction Buffer for DFS-Taq, High Taq (5 U/μl)	Bioron	Ludwigshafen, Deutschland
Roti-Mount FluorCare™ DAPI 15 ml	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Tissue Tek O.C.T. Compound™	Sakura Finetek Europe	AJ Alphen aan den Rijn, Niederlande
Trypan blau (0,02 %)	Sigma-Aldrich	Hamburg, Deutschland

3.4 MEDIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN

Produkt	Zusammensetzung
1 M Tris/HCl	12,10 g Tris <i>ad</i> 100 ml <i>Aqua dest.</i> + pH-Einstellung mit HCl auf 8,00
2 % BSA in 1x PBS	2 g BSA in 100 ml PBS
50 mM NaOH	0,20 g NaOH <i>ad</i> 100 ml <i>Aqua dest.</i>
70 % Ethanol	36 ml 96 % Ethanol 15 ml <i>Aqua dest.</i>
Erythrozyten-Lyse-Puffer Fix Perm™	0,16 M Ammoniumchlorid + 0,17 M TRIS; Verhältnis 1:10 5 ml <i>Intracellular Straining Perm Wash Buffer</i> <i>ad</i> 50 ml <i>Aqua dest.</i> Verhältnis 1:10
Freezing Medium	45 ml FKS (90 % final) 5 ml DMSO (10 % final)
PBS	80,00 g Natriumchlorid 2,00 g Kaliumchlorid 18,00 g Dinatr.hydrogenphosphat 2x H ₂ O

	2,00 g Kaliumhydrogenphosphat <i>ad</i> 1000 ml <i>Aqua dest.</i>
PBS-Tween	2,50 M Natriumchlorid 0,05 M Kaliumchlorid 0,20 M Dinatriumhydrogenphosphat-dihydrat 0,04 M Kaliumhydrogenphosphat 0,50 % V/V Tween20 <i>Aqua dest. ad</i> 2000 ml
Trypanblau-Lösung (pH 7,4)	0,16 % (W/V) Trypan-Blau 150 mM NaCl
Vollmedium	500 ml DMEM/Ham's F12 (1:1) 50 ml FBS (final: 10 %) 6 - 8 ml L-Glutamin (final: 20 mM)

3.5 ANTIKÖRPER

Eine Übersicht der verwendeten AK findet sich im Anhang unter 12.3.

3.6 PRIMER

Eine Übersicht der verwendeten *Primer* findet sich im Anhang unter 12.4.

3.7 KITS

Kit	Bestandteile	Hersteller	Standort
Wizard™ Genomic DNA Purification Kit	<i>Nuclei Lysis Solution</i> <i>RNase Solution</i> <i>Precipitation Solution</i> <i>DNA Rehydration Solution</i>	Promega	Woods, USA

3.8 SOFTWARE

Diese Arbeit wurde mittels Microsoft Office Word™ 2019 angefertigt. Die Erstellung der Graphen erfolgte mittels GraphPad™ Prism Version 5.0a. Statistische Analysen wurden mit Hilfe des Programms GraphPad™ Prism Version 5.0a durchgeführt.

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten fand mit dem Programm BD™ FACSSuite™ statt. Zur Fragmentlängenanalyse wurde GeneMapper™ Version 4.1 genutzt. Die Volumenmessung der Tumoren nach PET / CT Messung und die Bestimmung der *SUV* wurden mittels Inveon Research Workplace™ 4.2 *Software* durchgeführt.

Zur Erstellung von Illustrationen wurden Biorender™ sowie Adobe™ Illustrator™ CS5 genutzt. Mindjet™ MindManager™ 2019 diente der Erstellung von Schautafeln.

Das Literaturverzeichnis wurde mithilfe des Programms Citavi™ 6 erstellt.

Außerdem fand folgende Internet-Ressource Verwendung:

Pubmed <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>

3.9 STATISTIK

Die Charakterisierung der metrischen, normalverteilten Ergebnisse fand zunächst durch die Angabe von Mittelwert und Standardabweichung (*standard deviation*, *SD*) statt. Die metrischen, nicht normalverteilten Ergebnisse wurden durch Median, Maximum und Minimum charakterisiert. Als Streuungsmaß diente die Spannweite (Minimum-Maximum).

Zur Untersuchung von Signifikanzen wurde die Einweg-Varianzanalyse angewandt, anhand derer der Einfluss einer unabhängigen Variablen in verschiedenen Gruppen auf eine weitere Variable geprüft wurde. Nach Ermittlung eines signifikanten Unterschiedes zwischen den Gruppen wurden weiterführende *Post-hoc*-Tests eingesetzt. Sie ermöglichen durch gruppenweise Vergleiche eine Aussage darüber, welche Gruppen-Mittelwerte signifikant verschieden sind. Hierbei gibt es eine Vielzahl an verfügbaren Tests, welche sich in zu testenden Stichprobenumfängen, der zu untersuchenden Größen (Mittelwertpaar vs. überspannten Mittelwert) sowie ihrer Konservativität (Begünstigung der Nullhypothesen-Annahme) unterscheiden. Es wurden somit sowohl der *Bonferroni*-Test auf kleinsten signifikanten Unterschied sowie der *Dunnett*-Test angewandt, da oft kleine sowie ungleiche Stichprobenumfänge zu prüfen waren. Sofern nicht anders angegeben, gelten die in den Graphen angegebenen p-Werte für den *Bonferroni*- als auch *Dunnett*-Test gleichermaßen. Statistische Unterschiede wurden auch mithilfe des parametrischen T-Tests berechnet. Das Signifikanzniveau wurde mit 0,05 definiert, so dass ein Test bei $p < 0,05$ als statistisch signifikant bezeichnet wurde.

Überlebenskurven wurden anhand von Kaplan-Meier-Kurven in der *log-rank survival* Analyse dargestellt. Der *log-rank*-Test ist ein nichtparametrischer Test zum Vergleich von Überlebensraten in zwei oder mehr unverbundenen Stichproben, bei dem sich Signifikanzen zwischen einzelnen Behandlungsgruppen berechnen lassen.

IV. METHODEN

4.1 TIEREXPERIMENTELLE METHODEN

4.1.1 TIERHALTUNG UND VERSUCHSTIERE

Das *Mlh1*^{-/-} Modell stellt ein relevantes Modell der humanen MMR-D-assoziierten Tumorgenese dar. Die Tiere stammen aus eigener Zucht (>F5 Generationen) der zentralen Versuchstierhaltung des Instituts für experimentelle Chirurgie (Direktorin: Prof. Dr. med. B. Vollmar) der Universitätsmedizin Rostock und wurden ursprünglich als Embryonen vom *National Cancer Institute Mouse Repository* bezogen (Frederick, MD; USA). Die Mäuse wurden in speziellen Filterkäfigen in pathogen-freien Spezialräumen 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 (maximal 80 Wochen) gehalten (spezifisch pathogenfrei-nahe Haltung). Alle Versuche wurden vorab durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern mit dem Aktenzeichen 7221.3-1-026/17 genehmigt.

Die Untersuchungen erfolgten an weiblichen und männlichen homozygoten *Mlh1*^{-/-} Mäusen (Stamm: B6.129-*Mlh1*^{tm1Rak}). Da die homozygoten Nachkommen infertil sind, wurden heterozygote Versuchstiere verpaart. Bei allen lebenden Nachkommen wurden mittels Schwanzspitzenbiopsie im Laufe der vierten bis fünften Lebenswoche eine Genotypisierung vorgenommen, da ausschließlich homozygote *Mlh1*^{-/-} Mäuse in die eigentlichen Versuche eingeschlossen wurden. Hierzu wurden die Tiere in eine Fixationsröhre gelegt, die Gefäße oberhalb der Schwanzspitze gestaut und die Schwanzspitze mithilfe einer Klinge entnommen (ca. 3 – 4 mm), eventuell austretendes Blut wurde abgetupft. Somit wurde eine Gewebeentnahme im Sinne des Paragraphen sechs des Tierschutzgesetzes vorgenommen. Die Anzahl homozygoter Nachkommen folgt der Mendel'schen Verteilung und liegt bei ca. 24 %. Die Mäuse weisen ein normales Wachstum, jedoch aufgrund der Tumorentwicklung eine verkürzte Lebenserwartung auf [118].

4.1.2 GEWINNUNG DER VAKZINE

Zur Gewinnung der Vakzine wurden Tumorstückchen des *Mlh1*^{-/-}A7450 *Allografts* subkutan in je zwei Flanken von heterozygoten *Mlh1* Mäusen unter Allgemeinanästhesie implantiert (Abbildung 6). Nach Erreichen der maximalen Tumorgroße (1500 mm³) wurden die Tumoren reseziert, in Einzelzellsuspension überführt und gewaschen. Anschließend wurde das Tumorsat durch repetitive Gefrier-/Tauzyklen (N=4; flüssiges N₂ / 56 °C, á fünf Minuten, zusätzlich

60 Gy Bestrahlung) hergestellt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration anhand der *Bradford* Methode wurden die Lysate in Aliquote bei minus 80°C bis zur weiteren Verwendung asserviert.

Mlh1^{-/-} Maus

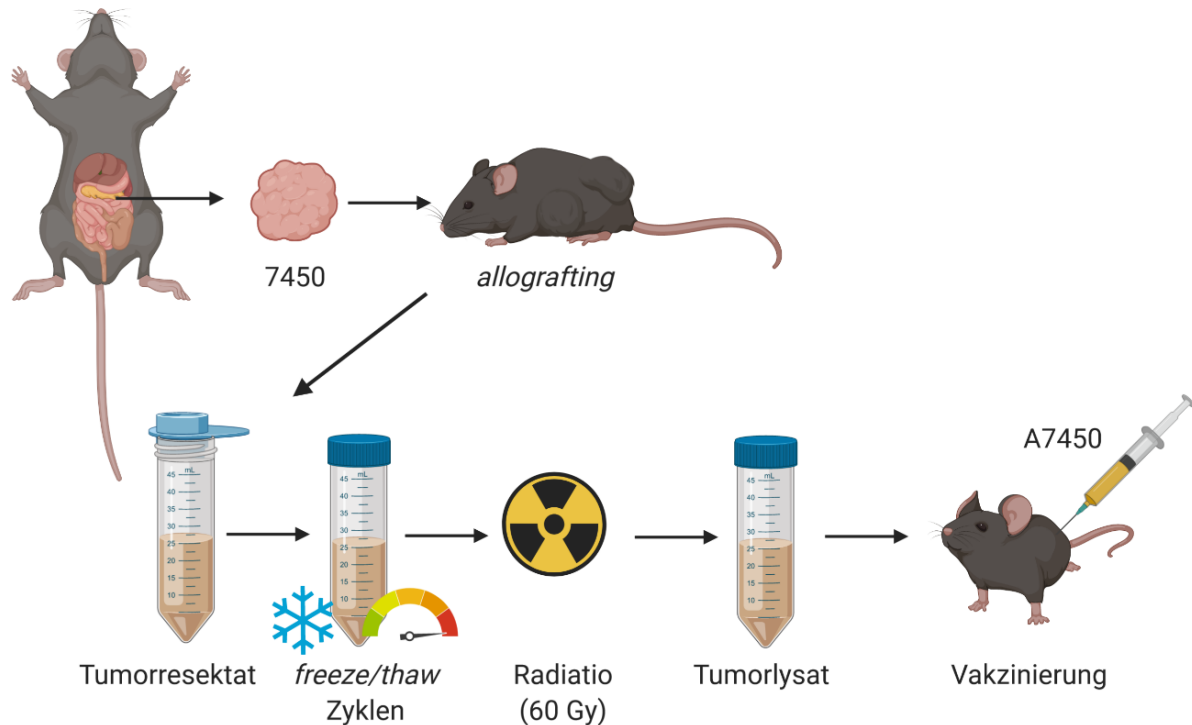


Abbildung 6: Herstellungsablauf der Vakzine. (Quelle: eigene Erstellung)

Tumoresektate eines *Mlh1*^{-/-} A7450 Allografts wurden *Mlh1*^{+/-} Mäusen implantiert. Tumoren mit einer Kantenlänge von 1cm wurden reseziert und in Einzelzellsuspension überführt. Die Tumorlysat herstellung erfolgte durch repetitive Gefrier-/Taufzyklen (N=4; flüssiges N₂ / 56 °C, á fünf Minuten, zusätzlich 60 Gy Bestrahlung). Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford Methode) und Asservation der Lysate in Aliquote bei -80 °C.

4.1.2.1 DIAGNOSTIK UND QUANTIFIZIERUNG DER TUMOREN

Zur Tumordiagnostik wurden neben immunologischen (Phänotypisierung des peripheren Blutes mittels Durchflusszytometrie) auch bildgebende Verfahren in Form von ¹⁸F-FDG PET / CT (Siehe Abschnitt 4.6) angewandt, um die Tiere in die therapeutische Behandlungsgruppe zu überführen.

4.1.2.2 MONITORING & VERSUCHSABSCHLUSS

Nach Erreichen des dritten Lebensmonats wurden die Tiere stetig kontrolliert. Dabei wurde besonders auf das Gewicht (zweimalige Messung wöchentlich), den Allgemeinzustand, das Sozialverhalten im Käfig, das Fell und die Vergrößerung von Organen, ersichtlich durch ein vorgewölbtes Abdomen (Leber und Milz) oder durch eine Schnappatmung (Thymus), geachtet. Lag eine gravierende Verschlechterung des Allgemeinzustandes sowie eine schnelle

Gewichtsreduktion vor, beziehungsweise befand sich die Maus - ohne Anzeichen auf eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes - bereits länger als 45 Wochen im Versuch, so wurde die Maus mittels Injektion von Ketamin / Xylazin (90 / 6 mg/kg Körpergewicht [KG] *i.p.*) narkotisiert und eine retrobulbäre Blutentnahme durchgeführt. Das Tier verstarb in tiefer Narkose durch Entbluten. Der Bauchraum und der Thorax wurden anschließend mittels einer medianen Längslaparotomie und einer Thorakotomie eröffnet. Augenscheinlich war nun bei der Inspektion des eröffneten Abdomens ein generalisiertes Lymphom von einem GIT unterscheidbar. Mäuse mit einem GIT wiesen einerseits eine normal große Milz und Leber auf, andererseits fanden sich bei Inspektion des Gastrointestinaltrakts primär im Dünndarm Tumorknoten. Nun wurde der betroffene Darmabschnitt reseziert, die Tumorknoten in einer Petrischale sorgfältig vom umliegenden gesunden Darmgewebe abgesetzt und jene Knoten unter sterilen Bedingungen zweigeteilt. Nach erfolgreichem Transport in steriler 1x PBS-Lösung in einem 50 ml Falcon Röhrchen auf Eis, wurde das Gewebe weiter aufbereitet (Siehe Abschnitt 4.1.3). Bei Mäusen mit Lymphomen fanden sich bei der Obduktion zwei unterschiedliche pathologische Bilder: Das *Non-Hodgkin-Lymphom* präsentierte sich mit einer deutlich vergrößerten Milz und Leber, der GI-Trakt war vollkommen unauffällig. Hier wurde die Milz entnommen und unter sterilen Bedingungen für weiterführende Untersuchungen bearbeitet (Siehe Abschnitt 4.1.4). Lag ein Thymom vor, war das Abdomen unauffällig. Im eröffneten Thorax fand sich ein deutlich vergrößerter Thymus, der im fortgeschrittenen Zustand mehr als die Hälfte des Thorax ausfüllte. Der Thymus wurde reseziert und die Zellen ebenfalls unter sterilen Bedingungen asserviert.

4.1.3 AUFARBEITUNG VON GIT

Das Tumorgewebe wurde in steriler 1x PBS-Lösung in einem 50 ml Falcon Röhrchen auf Eis transportiert. Unter sterilen Bedingungen wurde das Tumorgewebe nun halbiert, eine Hälfte wurde in Tissue-Tek™ eingebettet und direkt in flüssigem Stickstoff kryokonserviert – die endgültige Lagerung fand schließlich in einer minus 80 °C Kühleinheit statt. Die andere Hälfte wurde durch einen *Cell Strainer* mit 100 µm Porengröße homogenisiert und in 1x PBS aufgenommen. Die resultierende Zellsuspension wurde zentrifugiert (Relative Zentrifugalbeschleunigung [RCF]: 300 m/s^2 , acht Minuten) und der Überstand dekantiert. Anschließend wurde das Pellet in 5 ml 1x PBS gelöst und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellsuspension konnte nun für die entsprechenden Fragestellungen weiter prozessiert werden.

4.1.4 AUFARBEITUNG LYMPHATISCHER ORGANE (MILZ UND THYMUS)

Die entnommene Milz oder der Thymus wurde in steriler 1x PBS-Lösung in einem 50 ml Falcon Röhrchen auf Eis transportiert. Unter sterilen Bedingungen wurde das Gewebe durch einen *Cell Strainer* (100 µm Porengröße) homogenisiert und in steriler 1x PBS-Lösung gelöst. Es folgte eine Zentrifugation (RCF: 300 m/s^2 , acht Minuten) und der Überstand wurde dekantiert. Das Pellet wurde dann größenabhängig in 5 - 10 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer resuspendiert und bei Raumtemperatur (RT) für fünf bis acht Minuten unter gelegentlichem Schütteln inkubiert.

Durch die Zugabe von 5 ml 1x PBS wurde die Reaktion abgestoppt, anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation der Zellsuspension bei 300 m/s^2 RCF für acht Minuten. Der Überstand wurde abermals dekantiert und das Pellet größenabhängig in 20 ml – 30 ml 1x PBS resuspendiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer, die Zellen wurden für die entsprechenden Fragestellungen weiter prozessiert.

4.1.5 ZELLZAHLBESTIMMUNG MITTELS NEUBAUER-ZÄHLKAMMER

Zunächst wurden in einer unsterilen 96-well Platte mit flachem Boden 50 µl der Zellsuspension mit 50 µl Tryptanblau vermischt. Die Neubauer-Zählkammer wurde mit 10 µl dieser Suspension beschickt. Mittels eines Lichtmikroskops unter polarisiertem Licht und eines 20x Objektivs wurden die Zellen in zwei der vier Gruppenquadrate, welche in 16 Kleinquadraten unterteilt sind, ausgezählt. Die gezählte Zellzahl wurde durch die Anzahl der ausgezählten Großquadrate dividiert, mit dem Verdünnungsfaktor und dem Kammerfaktor (10^4) multipliziert. Auf diese Weise erhält man die Anzahl der Zellen pro ml.

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ausgezählte Großquadrate}} * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{Kammerfaktor}$$

4.1.6 KRYOKONSERVIERUNG

Es wurde ein *Freezing*-Medium, bestehend aus 90 % FKS und 10 % DMSO, genutzt, um die Zellen darin langfristig vital zu asservieren. Hierzu wurden die Zellen nach der Zellzahlbestimmung abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und mit 1 ml des *Freezing*-Mediums unverzüglich in ein KryoTube™ überführt.

Die Zellsuspension mit dem *Freezing*-Medium im KryoTube™ wurde in einen Gefrierbehälter (Nalgene™ Mr. Frosty™) überführt und sofort bei minus 80 °C gelagert. Dieser Behälter gewährleistet eine Abkühlrate der Zellen von einem Grad pro Minute, was die gegenwärtig optimale Geschwindigkeit für die Konservierung von Zellen darstellt [129].

Der Gefrierbehälter wird mit 100 % Isopropanol befüllt, welches alle fünf Nutzungszyklen ersetzt wurde, um gemäß der Herstellerempfehlung die optimalen Ergebnisse zu gewährleisten.

Anschließend wurden die Zellen dauerhaft in flüssigem Stickstoff bei minus 190 °C in der Gasphase gelagert.

4.1.7 BLUTAUFARBEITUNG

Durch Punktion des retrobulbären Venenplexus (pro Entnahme maximal 50 µl Vollblut) wurde unter kurzer Isoflurannarkose am Tag 28, 56, 84 und 112 Blut entnommen.

Das entnommene Vollblut wurde zunächst bei 8 m/s^2 RCF für acht Minuten zentrifugiert und das Plasma entnommen. Jenes Plasma wurde unverzüglich tiefgefroren und in einer minus 80 °C Kühleinheit gelagert.

Das verbliebene Blut wurde in 600 µl 1x PBS gelöst und zur Verwendung für die Durchflusszytometrie genutzt, wie im Abschnitt 4.5.2 beschrieben.

4.2 VERSUCHSAUFBAU UND VORARBEITEN

Es wurde ein therapeutischer Ansatz im *Mlh1*^{-/-} Tumorgenesemodell verfolgt.

Nach der Tumordiagnostik mittels immunologischer (durchflusszytometrische Phänotypisierung) bzw. bildgebender Verfahren (¹⁸F-FDG PET / CT) wurden die Tiere in die jeweilige therapeutische Behandlungsgruppe überführt.

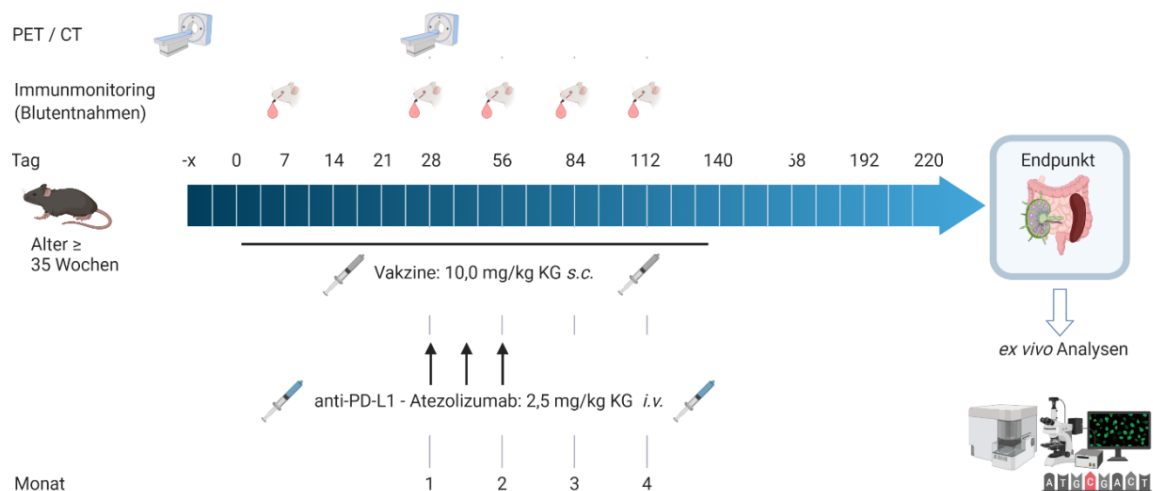


Abbildung 7: Darstellung des Versuchsablaufs. (Quelle: eigene Erstellung)
 Eingeschlossen wurden auffällige Tiere mit einem Alter ≥ 35 Wochen. PET / CT Untersuchung vor Therapiebeginn und erneut nach 28 bis 40 Tagen. Repetitive Blutentnahme an Tag 28, 56, 84, 112 sowie am Endpunkt. Repetitive Gabe des *Mlh1*^{-/-} A7450 Tumorstammes s.c. vier Mal im Abstand von sieben Tagen dann 14-tägig (Σ zwölf Applikationen). Ggf. Gabe des anti-PD-L1-AK Atezolizumab i.v. einmalig bzw. drei Mal im Abstand von 14 Tagen. Am Endpunkt neben Blut- auch Organentnahmen und weitere Prozessierung. Ex vivo Analysen wurden, wie ab Abschnitt 4.3 beschrieben, durchgeführt.

Hierbei erfolgte zunächst die repetitive Gabe des *Mlh1*^{-/-} A7450 Tumorstammes (10 mg/kg KG; s.c.) vier Mal im Abstand von sieben Tagen dann 14-tägig (Σ zwölf Applikationen), sowie ggf. die sequentielle Therapie mit einem ICI. Aufgrund unserer Vorbefunde fokussierten wir uns

auf einen anti-PD-L1-AK (Atezolizumab, muriner Klon: 6E11, 40; 2,5 mg/kg KG, einmalig bzw. drei Mal im Abstand von 14 Tagen; *i.v.*).

Tabelle 3: Angewandte Therapiegruppen der Untersuchung.

Gruppe	Intervention
1	Atezolizumab (2,5 mg/kg KG; <i>i.v.</i>), einmalige bzw. dreimalige Gabe
2	Vakzine mit <i>Mlh1</i> ^{-/-} A7450 Lysat (10 mg/kg KG; <i>s.c.</i>)
3	Kombinierte Immuntherapie mit Atezolizumab (2,5 mg/kg KG; <i>i.v.</i>) sowie <i>Mlh1</i> ^{-/-} A7450 Lysat (10 mg/kg KG; <i>s.c.</i>)

4.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

4.3.1 ISOLIERUNG VON *gDNA* AUS ZELLEN

Für die *gDNA*-Isolation wurden aus den Tumorzellsuspensionen des GIT und der Lymphome eine Million Zellen entnommen. Die Zellsuspension wurde vier Minuten bei 8 m/s^2 RCF zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Pellet konnte dann bei minus 20 °C gelagert werden. Im ersten Schritt 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 mit Hilfe des Vortex-Gerätes durchmischt. Anschließend inkubierte die Probe 30 Minuten bei 37 °C im *Thermocycler*. Für fünf Minuten wurde anschließend die Probe bei RT heruntergekühlt und 200 µl „*Precipitation Solution*“ zugegeben. Dies wurde dann 20 Sekunden auf hoher Stufe *vortexed* und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde es vier Minuten bei 1.000 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 fassendes Eppendorf-Gefäß überführt, in welchem bereits 600 µl Isopropanol vorgelegt wurde.

Der Mix wurde so lange geschwenkt, bis die *DNA* eine sichtbare Struktur bildete. Es folgte eine Zentrifugation (1.000 x *g*, eine Minute), woraufhin die *DNA* als kleines Pellet am Boden des Eppendorf-Gefäßes sichtbar wurde. Vorsichtig wurde der Überstand abgenommen. Das entstandene Pellet wurde mit 600 µl 70 % Ethanol versetzt (Verdünnung hergestellt mit nuklease-freiem Wasser) und das Eppendorf-Gefäß ausgiebig geschwenkt, um die *DNA* gut zu waschen. Erneut folgte eine Zentrifugation bei 1.000 x *g* für eine Minute. Der Überstand wurde sehr vorsichtig abgenommen und das Pellet bei umgedrehten Eppendorf-Gefäß auf einer absorbierenden Oberfläche 15 Minuten luftgetrocknet. Zuletzt wurde das Pellet im 30 µl „*DNA Rehydration Solution*“ resuspendiert und bei 65 °C eine Stunde lang im *Thermocycler* oder über Nacht bei 4 °C rehydriert.

4.3.2 KONZENTRATIONSMESSUNG DER *gDNA*

Für die nachfolgende *PCR* und Fragmentlängenanalyse wurden 25 ng *gDNA* benötigt, so dass zunächst die Ausgangskonzentration bestimmt werden musste sowie ggf. die Verdünnung mit gereinigtem, nukleasefreiem *Aqua dest.* erfolgte.

Die *gDNA* Konzentrationsmessung wurde photometrisch mit dem Thermo Scientific™ Nano-Drop™ 1000 Spektralphotometer durchgeführt. Hierzu wurde 1 µl der *gDNA*-Lösung im Analysebereich des Gerätes, welches aus rostfreiem Edelstahl sowie Quarzfaser besteht, mit UV-Licht in einem Wellenlängenbereich zwischen 220 und 750 nm bestrahlt. Der Tropfen des Analyten lag nun genau in dem 0,2 mm langen Messspalt zwischen dem sendenden Teil der Messanordnung und dem messenden Abschnitt, beide jeweils 1 mm lang. Ein gepulstes Xenon-Licht diente als Lichtquelle, eine lineare *charge-coupled device*-Einheit wurde zur Absorptionsmessung genutzt und mittels *PC-Software*-Kopplung zur Konzentrationsmessung weitergereicht. Die *DNA* absorbiert nun entsprechend ihrer Konzentration Licht, wobei das Absorptionsmaximum bei 260 nm liegt. *DNA*-Verunreinigungen lassen sich durch zusätzliche Absorption bei 320 nm nachweisen. Weiterhin zeigt das Verhältnis (*Ratio*) der Absorptionen bei 260 nm sowie 280 nm die Anwesenheit von Proteinen und / oder Salzen. Das Verhältnis sollte im Idealfall zwischen 1,7 und 1,9 liegen und dient folglich als Maß für die Verlässlichkeit der Daten [130]. Das Photometer musste vor jeder Messreihe mit einer Leerprobe kalibriert werden. Hierbei wurden die Absorptionsspektren der verschiedenen Wellenlängen der Leerprobe gemessen und im internen Speicher hinterlegt.

Bei einer Messung des Analyten wird die Lichtintensität des Lichtes gemessen, welches durch diesen dringt. Durch folgenden Zusammenhang lässt sich die Absorption bestimmen:

$$Absorption = -\log \frac{Intensität_{Probe}}{Intensität_{Leerwert}}$$

Somit ist die Messung der Absorption durch die Probe sowie auch der Leerwert essentiell. Das Gerät nutzt das Lambert-Beer Gesetz, um die Absorption in Bezug zur Konzentration des Analyten zu setzen und diese wie folgt zu berechnen:

$$A = E * b * c$$

Hierbei ist A die absolute Absorption, E der Wellenlängen-abhängige Extinktionskoeffizient [*L/mol* × *cm*], b die Pfadlänge [cm] und c die Konzentration des Analyten [mol/l].

Endgültig konnte die *gDNA* dann bei minus 20 °C in Ursprungskonzentration dauerhaft oder kurzfristig in verdünnter 25 ng/µl *gDNA*-Konzentration bei 4 °C gelagert werden.

4.3.3 POLYMERASE-KETTENREAKTION (*PCR*)

Die Amplifikation spezifischer *DNA*-Fragmente wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, *PCR*) durchgeführt. Die *PCR* macht es möglich, aus einigen

wenigen *DNA*-Molekülen bestimmte spezifische *DNA*-Fragmente anzureichern [131]. Hierzu werden zunächst Oligonukleotide (*Primer*) benötigt, welche von beiden Seiten das Zielfragment eingrenzen und folglich spezifisch erzeugt werden [132,133]. Jene dienen einer hitzestabilen *DNA*-Polymerase als Ansatzpunkt der Synthese und binden jeweils am 5'-Ende der gewünschten Sequenz [134,135]. Diese Polymerase stammt ursprünglich aus dem hitzereisistenten Bakterium *Thermus aquaticus* und heißt *Taq*-Polymerase.

Die Neusynthese der *DNA*-Fragmente geschieht zyklisch. Ein initialer Denaturierungsschritt (bei 94 °C) zerlegt die doppelsträngige *DNA* in ihre einzelsträngigen Komponenten. Im anschließenden Hybridisierungsschritt („*annealing*“) lagert sich der *Primer* spezifisch an seine komplementäre Sequenz innerhalb der *DNA* an. Die hierfür nötige Reaktionstemperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur des eingesetzten *Primers* [136,137] und stellt sich in folgender Formel dar:

$$T_a = 0,3 \times T_M + 0,7 \times T_{M'} - 14,9$$

Hierbei ist T_M die Schmelztemperatur des *PCR*-Produkts.

Von hier aus hängt im Syntheseschritt bei 72 °C die *Taq*-Polymerase in 3'-Richtung neue Nukleotide gemäß der Vorgabe im Matrizenstrang an, bis die Reaktion stoppt. Dies geschieht in den ersten Syntheseschritten durch Beginn des nächsten Zyklus bzw. in nachfolgenden Zyklen durch Erreichen des Endes des Gegenprimers und damit des Endes des in einem vorhergehenden Zyklus synthetisierten *PCR*-Produktes. Durch mehrfache Wiederholung dieses Zyklus [138] (in der Regel zwischen 25 und 40 Zyklen), kommt es jeweils zur Verdopplung des gewünschten *DNA*-Fragmentes, wie in Tabelle 5 aufgeführt.

Hierbei kamen für jedes gewünschte *PCR*-Produkt spezifische *Primer* zum Einsatz (Siehe Abschnitt 12.4). Die Oligonukleotide, die für die Amplifikation von Klonierungsfragmenten benötigt wurden, waren zumeist mit terminalen Sequenzen für Restriktionsendonukleasen versehen. Die Reaktion fand in einem Volumen von 12,5 µl statt (Tabelle 4).

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

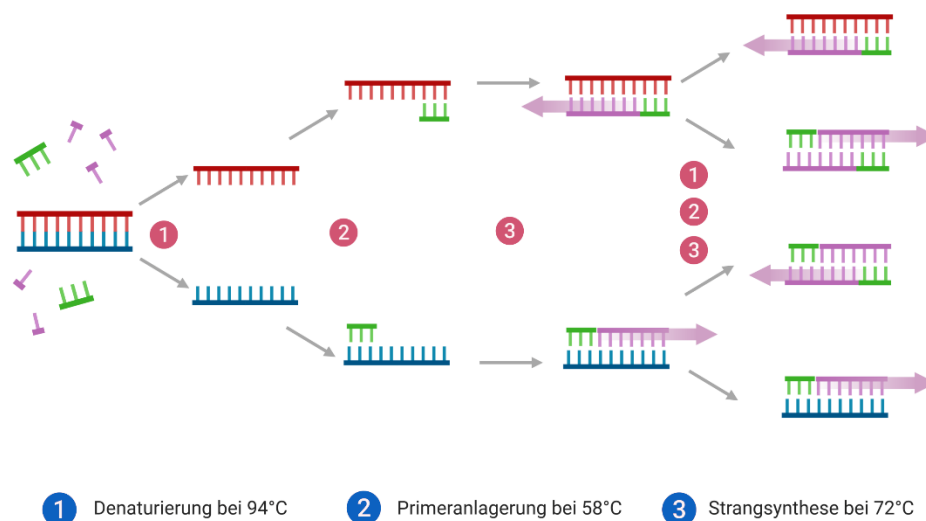


Abbildung 8: Ablauf des genutzten PCR-Schemas. (Quelle: eigene Erstellung)

Tabelle 4: Reaktionsansatz für die PCR pro Reagenz.

Agens	Volumen [µl]
DNA (bei 25 ng gDNA/µl)	1,00
10x Puffer inkl. MgCl₂ (final: 2,5 mM)	1,25
5'-Primer (10 µM)	0,25
3'-Primer (10 µM)	0,25
dNTP	0,25
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,10
nukleasefreies Aqua dest.	ad 12,50

Nach einem anfänglichen Denaturierungsschritt bei 94 °C erfolgte im genutzten *PCR*-Modus folgende Reaktion:

Tabelle 5: Ablauf der PCR-Reaktion.

Temperatur [°C]	Reaktion	Zeit [min]	
94	Initiale Denaturierung	1:00	
94	Denaturierung	0:30	} 35 Zyklen [138]
58	Primeranlagerung	0:45	
72	Strangsynthese	0:30	
72	Syntheseabschluss	6:00	
4	Lagerung	unendlich	

Die so gewonnenen *PCR*-Produkte wurden zunächst in einer unsterilen 96 *well*-Platte mit rundem Boden 1:10 verdünnt mit *RNAse*-freiem destilliertem Wasser. 1,3 µl dieser verdünnten *PCR*-Produkte wurden in eine 96-*well* Platte für die Fragmentlängenanalyse überführt. Zu

jeder Probe wurde 24 µl des LIZ 500™ / Hi-Di™ *Formamide* Mix hinzugegeben und die Platte versiegelt. Die Proben wurden bis zur Fragmentlängenanalyse durch das molekularpathologische Labor des Instituts für Pathologie der Universität Rostock im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

4.3.4 FRAGMENTLÄNGENANALYSE

4.3.4.1 METHODIK

Aus Tumoren, die nach Therapie resektabel waren, wurde die *gDNA* isoliert (Ablauf siehe Abschnitt 4.3.1) und ein von uns etabliertes *Panel* zum Nachweis von Mutationen in 47 kodierenden Mikrosatellitenmarker (*coding microsatellite, cMS*) sowie zehn nicht-kodierenden Mikrosatellitenmarker (*non-coding microsatellite, ncMS*) angewandt. Die Auswahl der zu analysierenden Gene resultierte aus Voruntersuchungen [106,139,140], in denen für die jeweiligen Marker eine Mutationsfrequenz von mindestens 20 % in lymphoiden und / oder gastrointestinalen Tumorsektaten bzw. davon abgeleiteten Zelllinien nachgewiesen wurde, welche auf eine hohe Relevanz für die murine MSI-Karzinogenese schließen lassen [106].

Die Elektrophorese erfolgte hierbei in einer Kapillare, welche mit Polymer als Geläquivalent gefüllt wurde. Die Kapillare wurde zur Analyse jeweils neu mit auf Zellulosebasis beruhendem Polymer befüllt. Die Kapillare wird in das jeweilige Probengefäß eingeführt, gewaschen und in den Kathodenpuffer getaucht. Nach dem Anlegen der Betriebsspannung erfolgt die Auftrennung der *DNA* ihrer Größe nach in der Kapillare. Die Detektion der Fragmentlängen geschieht durch einen Laser mit einer Wellenlänge von 505 nm. Hierzu werden die in der Kapillare vorbeiströmenden *DNA*-Fragmente durch den Laser an einem durchsichtigen Teilstück optisch angeregt. Die an den *DNA*-Fragmenten gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe strahlen Licht zurück, das von Fotozellen aufgenommen und final als Signal an den angeschlossenen Computer weitergereicht wird. Grundlage hierfür ist, dass für die Fragmentanalyse farbmarkierte *Primer* eingesetzt werden, so dass auch die resultierenden *short tandem repeats*-Fragmente eine entsprechende Markierung tragen. Zur Sequenzierung werden fluoreszenzmarkierte Nukleotide eingesetzt. Bei der Fragmentanalyse muss zusätzlich zu jeder Probe ein in der Regel rot markierter Längenstandard zugegeben werden, so dass für jede Fragmentbande eine Größenzuordnung möglich ist. Wir nutzten hierfür GeneScan™ 500 LIZ™. Es besitzt 36 einzelsträngige, markierte Fragmente unterschiedlich langer Nukleotide. Darüber wurde eine Größenbestimmung von *DNA*-Fragmenten im Bereich von 20 – 500 Nukleotiden gewährleistet. Die Proben wurden vor der elektrokinetischen Injektion mit einem Mix aus LIZ 500™ / Hi-Di™ Formamid versetzt. Das Hi-Di™ Formamid, bestehend aus hochdeionisiertem Formamid, diente der Proben-Resuspendierung. Die Auswertung der vom Sequenzierer gelieferten Rohdaten geschah im angeschlossenen Computer mittels des GeneScan™ Programms von

Applied Biosystems™, welches aus den eingehenden Rohdaten die Größe und Farbe der detektierten Banden berechnete.

4.3.4.2 DURCHFÜHRUNG

Zur Fragmentlängenanalyse mittels Elektrophorese wurde ein ABI PRISM™ 3500 *Genetic Analyzer* mit einem achtfachen Kapillarsystem eingesetzt:

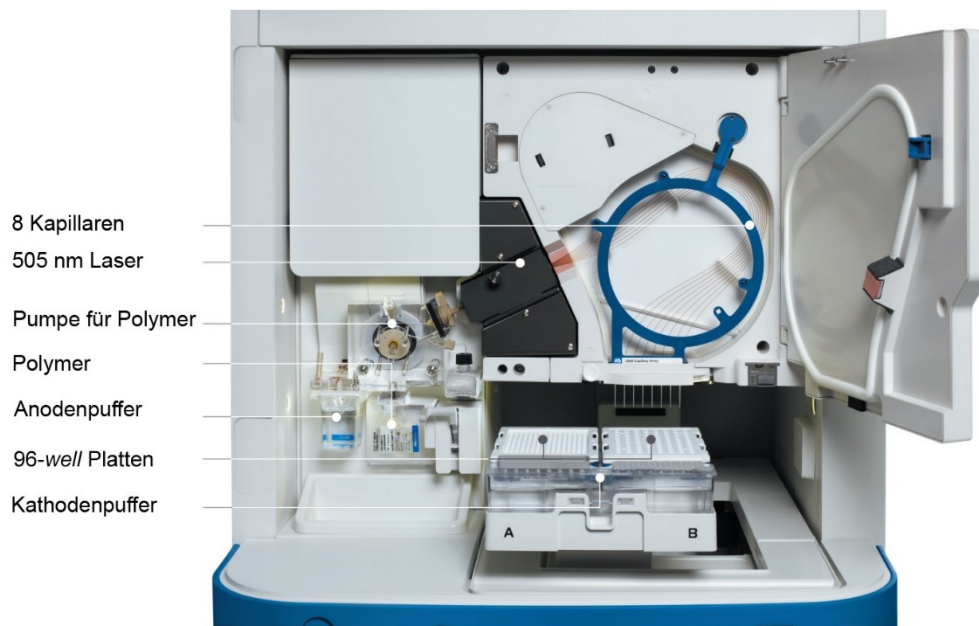


Abbildung 9: Aufbau des verwendeten ABI PRISM™ 3500. (Quelle: eigene Erstellung)

Vor der Durchführung der Fragmentlängenanalyse müssen zunächst zwei Kalibrierungsschritte erfolgen: Zum einen eine räumliche, um die Position der Signale jeder einzelnen Kapillare auf dem *charge-coupled device*-Sensor auszurichten. Hierbei liegt der Zielwert bei einer Abweichung von maximal zwei Pixeln auf dem Sensor bei einer durchschnittlichen Höhe der *Peaks* der Polymerlösung bei 6400 RFU. Zum anderen muss eine Spektralkalibrierung mit *PCR*-Fragmenten der entsprechenden drei Fluoreszenzfarbstoffe 6-Carboxyfluorescein (6-FAM), Hexachlorfluorescein (HEX) und 5-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) durchgeführt werden, um mittels mathematischer Funktionen, auf Basis einer Faltungsmatrix, Überlappungen der farbspezifischen Fluoreszenzemissionsspektren zu korrigieren und somit Messfehler zu vermeiden. Die Spektralkalibrierung gliedert sich in die folgenden Abschnitte:

- Vorheizen der Reaktionszone auf mindestens 50 °C für 30 Minuten und Vorbereitung der Standardkalibrationsplatte
- Laden des Standards in die 96-well Platte (je Kapillare eine Probe)
- Einbau der 96-well Platte in das Gerät mittels Aufnahmeschiene
- Durchführung des Laufs zur Spektralkalibrierung und Prüfung der Matrix

4.4 IMMUNFLUORESCENZ-FÄRBUNG

4.4.1 METHODIK

Mittels der Immunfluoreszenzfärbung ist es seit über 50 Jahren möglich [141], zelluläre Infiltrate qualitativ und quantitativ zu detektieren [142]. Zur Untersuchung der Schnitte wurde die Methode der direkten Immunfluoreszenz angewandt.

4.4.2 ABLAUF

Das Tumorgewebe wurde, wie im Abschnitt 4.1.3 beschrieben, in Tissue Tek™ eingebettet, in flüssigem Stickstoff kryokonserviert und bei minus 80 °C dauerhaft gelagert. Für die Gefrierschnitte wurde das Gewebe aufgeblickt und mittels eines Kryostaten (Leica™ CM1850S) 5 µm dicke Schnitte hergestellt. Die Schnitte wurden für ca. 30 Minuten an der Luft getrocknet. Die Fixierung auf dem Objektträger erfolgte mittels Methanol für acht bis zehn Minuten. Anschließend wurden die Objektträger zwei Minuten erneut luftgetrocknet und je zwei Objektträger Rücken an Rücken bei minus 20 °C gelagert. Für die Färbung wurden die Objektträger bei RT erst mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurde um die Gewebsschnitte mit dem Dako Pen™ eine Wasser-abweisende Barriere gezogen. Schließlich wurden mittels 2 % bovinen Serumalbumin (BSA) in 1x PBS (50 µl pro Schnitt) die unspezifischen Bindungsstellen der Zellen blockiert. Es folgte eine Inkubation in einer dunklen Feuchtkammer bei RT für eine Stunde. Durch die Inkubation der Schnitte in einer feuchten Kammer wurde das Ausbleichen der Chromophore sowie das Verdunsten der Reagenzien und folglich eine unspezifische Färbung verhindert. Anschließend wurde das BSA vorsichtig abgeklopft, 50 µl des AK-Gemisches (Tabelle 6) 1:50 verdünnt aufgetragen und über Nacht (ca. zwölf Stunden) bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die nicht gebundenen AK mittels 1x PBS wieder entfernt. Hierfür wurden die Objektträger mindestens dreimal mit frischem 1x PBS gespült. Zum Abschluss wurde eine Kernfärbung mittels Roti™-Mount FluorCare™ DAPI durchgeführt und die Schnitte mit einem Deckgläschen luftblasenfrei abgedeckt. Roti™-Mount FluorCare™ DAPI ist ein wasserlösliches Einschlussmittel mit Ausbleichschutz für Fluoreszenzfarbstoffe, es enthält gebrauchsfertiges 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI). Die Gegenfärbung der Zellkerne und der Eindeckvorgang konnten somit in einem Schritt erfolgen. DAPI hat eine maximale Anregung bei 360 nm und eine maximale Emission bei 460 nm [143]. Bei allen Schritten, die für die Färbung der Gewebeschnitte notwendig waren, wurde darauf geachtet, mögliche Lichtexpositionen auf ein Minimum zu begrenzen. Die mikroskopische Dokumentation erfolgte an einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop-System (Zeiss™ LSM 780) mittels eines 20x Objektivs.

4.4.3 KONFOKALE LASER-SCANNING MIKROSKOPIE

Hierbei handelt es sich um ein Lichtmikroskop, bei dem mittels eines Lasers monochromatisches Licht mit einer definierten Wellenlänge und regelbarer Intensität über einen Strahlenteiler und einem beweglichen Linsensystem punktförmig das Präparat rastert. Durch ein vorge-schaltetes Objektiv wird der Laserstrahl fokussiert und das zurückgeworfene Licht passiert eine Lochblende vor dem Detektor. Diese Lochblende stellt sicher, dass nur Abbildungs-informationen aus der gewünschten und eingestellten Ebene passieren können. Die mit einem spezifischen Fluorochrom markierten AK können das Licht absorbieren und senden ein Teil des Lichtes mit einer größeren Wellenlänge und kleineren Intensität wieder zurück [144].

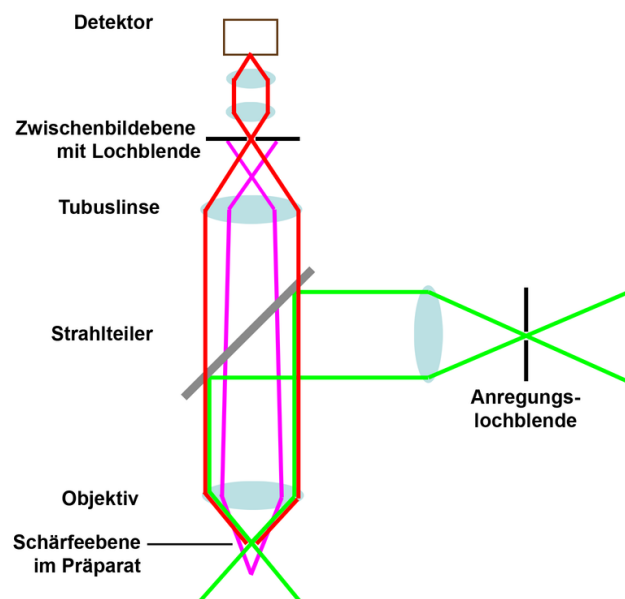


Abbildung 10: Aufbau eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops. (Quelle: Dietzel65, wikimedia.org, Creative Commons 3.0 CC-BY Lizenz)

Um die Photonen, welche mit geringer Intensität von den Fluorochromen zurückgesandt werden, ausreichend detektieren zu können, wird das Signal mittels eines *Photomultipliers* verstärkt. Dort treffen die Photonen außen auf die Photokathodenschicht des *Photomultipliers* und lösen Elektronen aus deren Oberfläche. Es folgt eine Beschleunigung der freigesetzten Photoelektronen in einem elektrischen Feld. Diese treffen auf Dynoden genannte Elektroden, aus deren Oberfläche jedes auftreffende Elektron mehrere Sekundärelektronen freisetzt. Somit nimmt die Anzahl der Elektronen von Dynode zu Dynode exponentiell zu. Üblicherweise werden in einem *Photomultiplier* zehn Dynoden verbaut, um das Signal ausreichend zu verstärken [145].

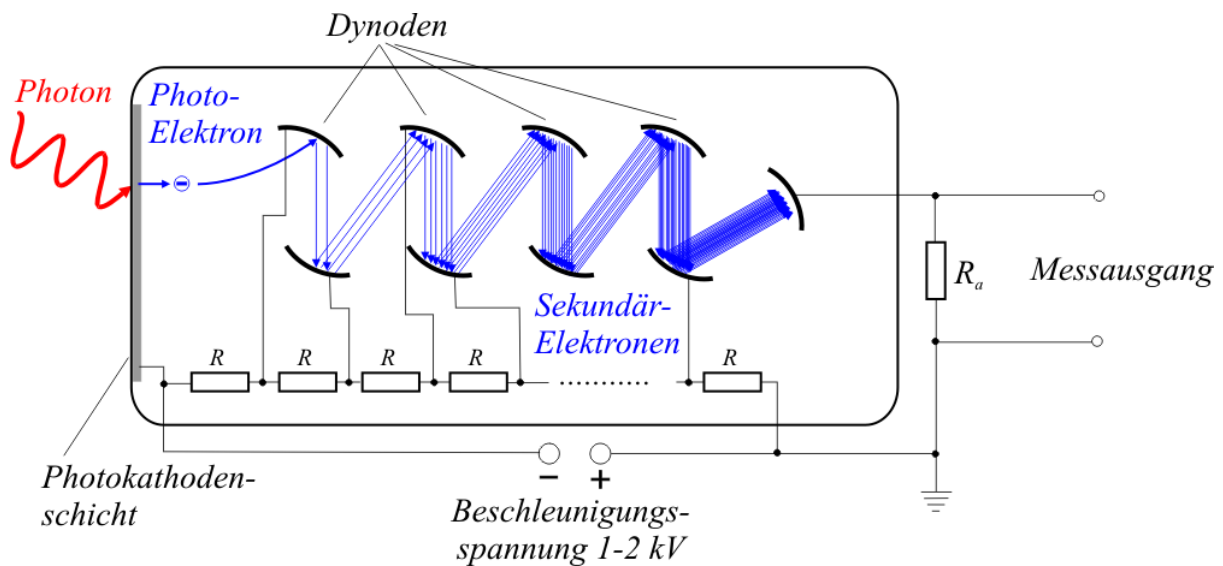


Abbildung 11: Aufbau einer Photomultiplier-Einheit. (Quelle: Jan Krieger, public domain)

In unserer Arbeit haben wir mit dem LSM 780 (Carl Zeiss GmbH™) gearbeitet, dieses nutzt einen 32 Kanal-GaAsP-Photokathoden [146] Detektor mit einer Quantenausbeute von 45 % sowie zwei weitere *Photomultiplier*-Kanäle. Die Quantenausbeute beschreibt das Verhältnis zwischen der Anzahl der emittierten und absorbierten Photonen - Die Differenz bildet der Auger-Effekt, als strahlungsloser Übergang eines Elektrons in der Elektronenhülle eines angeregten Atoms.

Tabelle 6: Immunfluoreszenz-Färbeansätze für die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.

Antikörper 1	Antikörper 2
CD11b FITC	Gr1 PE
CD104 FITC	CD4 PE
CD104 FITC	CD8 PE
CD104 FITC	LAG 3 PE
PD1 FITC	NK1.1 PE
CD11b FITC	PD-L1 PE
CD11c FITC	Gr1 PE

4.5 IMMUNPHÄNOTYPISIERUNG MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Unter Anwendung der Durchflusszytometrie wurde ein immunologisches Verlaufsscreening aus dem peripheren Blut, sowie eine Endpunktbestimmung der Prozesse und Zellen der Milz und des gastrointestinalen Tumors durchgeführt. Somit konnte eine gezielte Immunphänotypisierung vorgenommen werden [147].

4.5.1 PRINZIP DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, um Zellen, die einzeln in hoher Geschwindigkeit an einem oder mehreren Laserstrahlen vorbeifließen, nach ihrer Emission von optischen Signalen zu analysieren [148,149]. In dieser Arbeit haben wir mit Fluoreszenz-markierten Zellen gearbeitet, welche zusätzlich in Hinblick auf ihre Fluoreszenz analysiert wurden und Rückschlüsse auf immunologische Prozesse ermöglichten [150].

Bei diesem Vorgang tritt die Probe in den Mikrokanal einer hochpräzisen Küvette aus Glas oder Quarz ein, wo sie durch einen Hüllstrom fokussiert wird. Somit wird jede Zelle einzeln nacheinander durch den Messbereich von Laserstrahlen geführt [151]. Beim genutzten Gerät waren Laser mit 405, 488 sowie 640 nm Wellenlänge verbaut. Detektoren werten das dabei ausgesandte Streulicht sowie Fluoreszenzsignal aus. Die Gesamtschau jeder einzelnen der analysierten Zellen, welche in großer Anzahl in kurzer Zeit im sub-Millisekunden-Zeitrahmen analysiert werden, erlaubt Rückschlüsse über die untersuchten Zell-Populationen. Die Größe und Konfiguration der Zelle korrelieren mit der Menge und Art des gestreuten Lichts. Hierbei werden zwei Arten der Streuung unterschieden: Das Vorwärtstreulicht hängt vom Volumen der Zelle ab und ist ein Maß für die Beugung des Lichts im spitzen Winkel. Das Seitwärtstreulicht wird von der Granularität der Zelle und der Größe und Struktur beeinflusst und ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel [149].

4.5.2 ABLAUF

Alle durchflusszytometrischen Messungen erfolgten auf einem BD™ FACSVerse™ und wurden mit dem BD™ FACSuite™ Programm ausgewertet. Als Fluoreszenzfarbstoffe dienten FITC (Fluoresceinisothiocyanat), PE (Phycoerythrin) oder APC (Allophycocyanin), wie in Tabelle 7 aufgeführt. Alle Schritte, die für die Färbung der Zellen notwendig waren, wurden bei 4 °C durchgeführt und es wurde darauf geachtet, mögliche Lichtexpositionen auf ein Minimum zu begrenzen. Die mit unterschiedlichen Fluorochromen markierten AK-Gemische (Tabelle 7) wurden in einer 96-well Platte mit flachem Boden vorgelegt und pro well wurde 50 µl Zellsuspension (30 µl Vollblut bzw. 1 x 10⁶ Splenozyten in 600 µl 1x PBS verdünnt) zugegeben. Dies inkubierte bei 4 °C für 30 Minuten im Dunklen. Es folgte die Erythrozytenlyse – sofern sie nicht bereits zuvor unter sterilen Bedingungen durchgeführt wurde – durch Zugabe von 200 µl Lysepuffer pro well für Probe eins bis sieben sowie für Probe zehn. Probe acht und neun wurden gleichzeitig mit 200 µl *Fix / Perm Solution* permeabilisiert. Vom erhältlichen permeabilisierenden und fixierenden Puffer, bei 2 °C – 8 °C dunkel gelagert, wurde vor Nutzung eine 1:10 Verdünnung mit destilliertem Wasser hergestellt. Er gewährleistet eine gleichzeitige Färbung von extra- sowie intrazellulären Bestandteilen [152]. Dies inkubierte bei 4 °C für 15 Minuten in Dunkelheit. Anschließend wurde die Platte mit 500 x g zentrifugiert (fünf Minuten, RT), der

Überstand dekantiert und das Pellet der Proben eins bis sieben und zehn in 200 µl 1x PBS gelöst. Gleichzeitig wurde die intrazelluläre Färbung bei Probe acht und neun durchgeführt. Hierbei wurden 100 µl Färbeansatz pro well (Tabelle 7) mit je 1 µg/AK pipettiert. Nach 60-minütiger Inkubation im Dunklen bei RT wurde die Reaktion mit 100 µl 1x PBS abgestoppt und die 96-well-Platte bei 1785 m/s^2 RCF für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 200 µl 1x PBS resuspendiert. Die Proben wurden anschließend am BD FACSVerse™ gemessen.

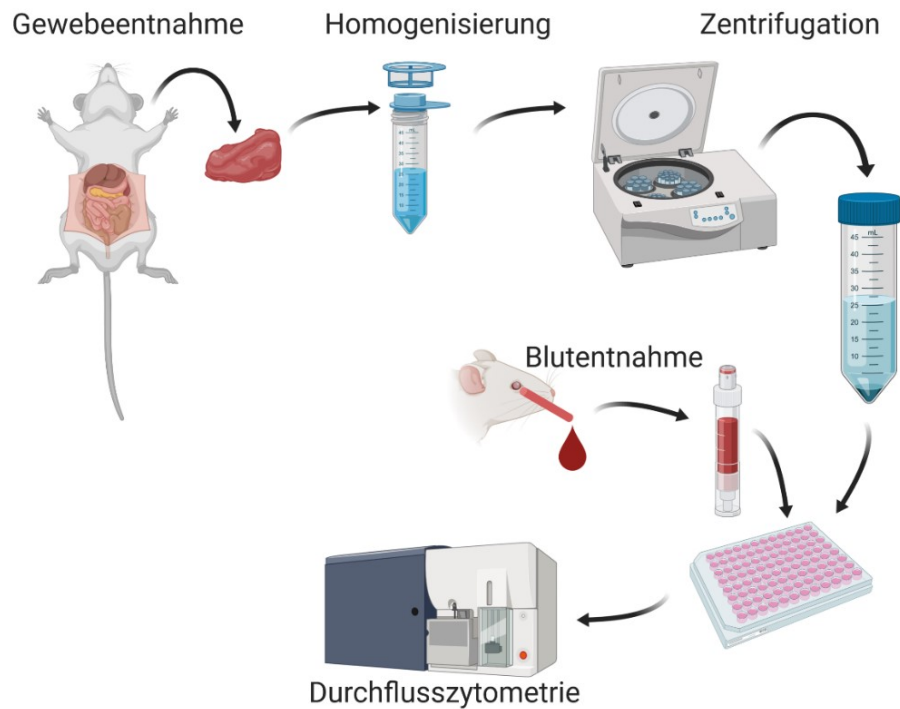


Abbildung 12: Ablauf der Durchflusszytometrie. (Quelle: eigene Erstellung)

Tabelle 7: Färbeansätze für die Durchflusszytometrie.

Färbeansatz	Färbung
Färbeansatz 1	ungefärbte Probe
Färbeansatz 2	CD44 FITC/CD62L PE/CCR7 APC
Färbeansatz 3	CD3 FITC/CD4 PE/CD25 APC
Färbeansatz 4	CD3 FITC/CD8 PE/CD25 APC/CD4 PE-Cy7
Färbeansatz 5	γ/δ TCR FITC/NK1.1 PE/CD178 APC
Färbeansatz 6	CD11b FITC/Gr1 PE/CD127 APC
Färbeansatz 7	CD69 FITC/CD166 PE/CD19 APC/CD83 PE-Cy7
Färbeansatz 8	CD152 PE/Cy7
Färbeansatz 9	IL17A FITC/IDO-1 APC
Färbeansatz 10	CD200R FITC/MHC-I PE/CD117 APC

4.6 RADIOLOGISCHES VERFAHREN: PET / CT

4.6.1 PRINZIPIEN

Beim PET / CT werden die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und die Computertomographie (CT) miteinander kombiniert. Beide Untersuchungen können fast zeitgleich durchgeführt werden und durch Überlagerung beider Daten wird ein Fusionsbild erstellt, in welchem sich die Informationen aus beiden Verfahren ergänzen.

PET ist bei der richtigen Fragestellung ein hochsensitives Verfahren und wird in der Onkologie häufig eingesetzt [153]. Aktivitätsanreicherungen lassen sich jedoch anatomisch nicht immer gut lokalisieren. Grund hierfür ist einerseits, dass in erster Linie Stoffwechselprozesse aufgezeigt werden, andererseits ist nur eine Ortsauflösung von 1,4 mm gegeben, welche durch neue Ansätze verbessert wurde [154–156].

Das genutzte PET / CT-Gerät kombiniert eine hohe Ortsauflösung (maximale effektive Auflösung 20,0 µm beim CT bzw. 5,0 mm beim PET [157]) und eine detailreiche Anatomiedarstellung des CT-Geräts mit hochsensitiven Stoffwechselinformationen aus der PET.

Der in der Onkologie mit Abstand am häufigsten verwendete *Tracer* ist ^{18}F -2-Fluor-2-desoxy-D-glucose (^{18}F -FDG)[158]. Die physikalische Halbwertszeit von ^{18}F beträgt 110 Minuten. ^{18}F -FDG wird als radioaktives Isotop in Zellen mit hohem bzw. erhöhtem Glukosestoffwechsel verstoffwechselt und gespeichert (z.B. Gehirn, Leber, aber auch Tumorzellen). Desoxyglukose wird ebenfalls wie unmarkierte Glukose in die Zelle transportiert, verbleibt dort aber in phosphorylierter Form und wird nicht wie andere Glukosemetabolite verstoffwechselt.

FDG wird analog zu Glukose über membranständige Glukosetransporter in die Zelle transportiert und dort phosphoryliert. Es kommt intrazellulär zu einem „*Trapping*“ [159]: phosphoryliertes FDG kann nicht weiter verstoffwechselt werden und die Zelle auch nicht mehr in nennenswertem Umfang verlassen. Im Vergleich zu physiologischem Gewebe, weisen maligne Tumoren durch ihre hohe proliferative Aktivität [160] und auch durch das hypoxische Umgebungsmilieu eine deutlich erhöhte Glukoseaufnahme auf (= Warburg-Effekt [161,162]). Dies ist die Rationale der ^{18}F -FDG-PET mit einer erhöhten FDG-Speicherung als Hinweis auf malignes Gewebe. Im PET wird durch einen intravenös injizierten radioaktiven *Tracer* eine Stoffwechselaktivität dargestellt. Ein *Tracer* ist definiert als Kopplung einer organspezifischen Substanz ohne pharmakologische Wirkung mit einem Radionuklid. Bei der PET handelt es sich um ein nichtinvasives Verfahren zur Quantifizierung von biochemischen Fluss- und Stoffwechselraten. Dabei ist eine Zuordnung einer ggf. erhöhten Aufnahme zu einer spezifischen anatomischen Lokalisation schwierig, da nur eine funktionelle Darstellung des Stoffwechsels vorliegt, wie bereits oben angedeutet. Die Höhe der aufgenommenen markierten Glukose ist ein Maß für den intrazellulären Glukosestoffwechsel. Ein erhöhter Glukoseverbrauch durch

unkontrolliertes vermehrtes Wachstum, gesteigerte anaerobe Glykolyse und eine erhöhte Anzahl von Glut1-5 Transportern sind typische Eigenschaften vieler Tumorzellen [163]. Tumoren verschiedener Entitäten exprimieren mehr Glucose-Transporter in höheren Stadieneinteilungen [164,165].

Der *standardized uptake value* (*SUV*)-Wert beschreibt den Tumor-Glukosestoffwechsel semi-quantitativ. Der *SUV*-Wert ist das Verhältnis zur injizierten Aktivität und errechnet sich wie folgt:

$$SUV = \frac{\text{radioaktive Gewebskonzentration [MBq]}}{\text{applizierte Dosis [Gy]} * \text{Körpergewicht [kg]}}$$

Ein *SUV* > 2,5 außerhalb parenchymatösen Organen zeigt bei dem hier benutzten PET / CT Gerät im Regelfall einen hochgradigen Malignitätsverdacht an, während ein *SUV* > 3,0 als Malignom-typisch bezeichnet wird [166–169].

SUV-Werte werden farbkodiert und dann ggf. am Monitor in Grauschattierungen dargestellt.

4.6.2 ABLAUF

Die Versuchstiere wurden durch Inhalationsanästhesie mittels Isofluran (1,5 – 2,5 %) und Sauerstoff in Narkose versetzt. Sie erhielten gewichtsabhängig im Durchschnitt eine Radiopharmakon-Dosis in Höhe von 16,0 MBq ¹⁸F-FDG über eine Stunde über einen Mikrokatheter in der Schwanzvene. Anschließend wurden die Tiere in gestreckter Lage im Inveon™ PET / CT *Scanner* für etwa 15 Minuten untersucht. Dabei wurde die Atmung kontinuierlich überwacht und ein Wärmeerhalt, durch ein auf 38,0 °C vorgeheiztes Wärmeelement am Untersuchungstisch, sichergestellt. Die CT Daten wurden mittels Feldkamp-Algorithmus rekonstruiert. Die PET Daten wurden zunächst durch ein *Fourier rebinning*-Analyse (*FORE* [170]) in einen 2D Datensatz überführt und anschließend mittels des *subset expectation maximization* (*OSEM*) Algorithmus mit 16 Unterklassen und vier Iterationszyklen weiterverarbeitet, um die Qualität zu steigern [171,172]. Mittels der CT Daten wurde abschließend eine Abschwächungskorrektur durchgeführt. Die Volumenmessung und Bestimmung der *SUV* wurden durch die Inveon™ Research Workplace™ *Software* durchgeführt.

V. ERGEBNISSE

Die Vorbefunde, in denen das Vakzin erstmals im *Mlh1^{-/-}* Modell eingesetzt wurde, konnten bestätigt werden [126,173]. Dieser Vakzine-basierte Ansatz wurde nun um Kombinationstherapien mit einem murinen anti-PD-L1-AK in ein- oder dreimaliger Gabe erweitert. Die Ergebnisse sind nachfolgend dargestellt. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde gezeigt, dass die therapeutische dreimalige Gabe des anti-PD-L1-AK - allein oder in Kombination mit der Vakzine - das Tumorstadium verzögert und das Tumormikromilieu signifikant beeinflusst.

5.1 ÜBERLEBENSWAHRSCHEINLICHKEITEN

Anhand von Kaplan-Meier-Überlebenskurven in der *log-rank survival* Analyse (Abbildung 13 und 14), ist das Gesamtüberleben der einzelnen Therapiegruppen im Vergleich zu den Kontrolltieren dargestellt. Sowohl die Vakzine-Monotherapie, als auch deren Kombination mit anti-PD-L1 verlängern das Gesamtüberleben signifikant.

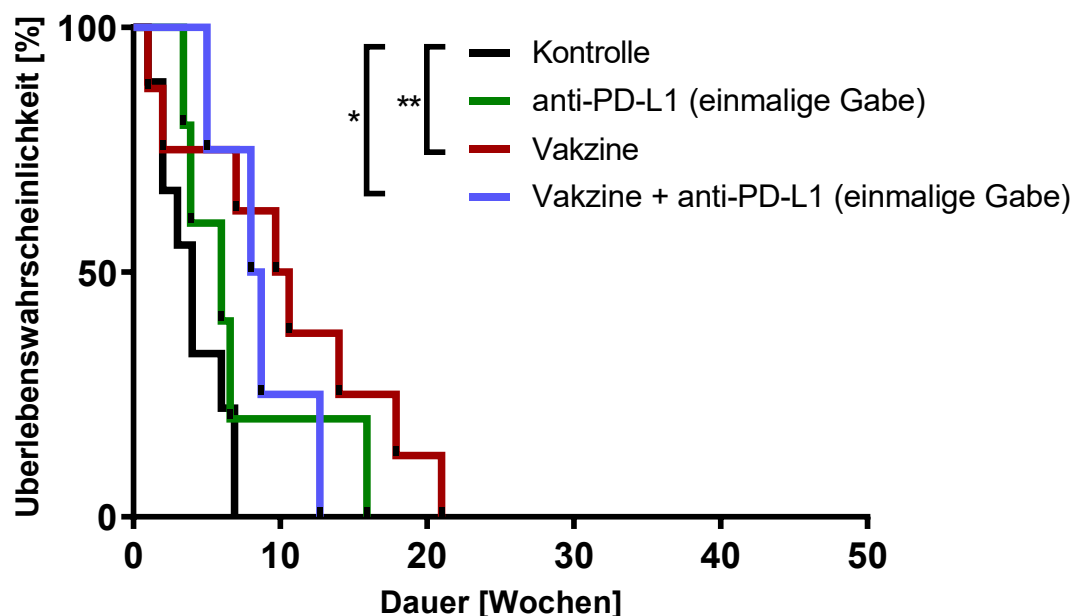


Abbildung 13: Kaplan-Meier-Überlebenskurve (log-rank-Analyse) ausgewählter Therapiegruppen (einmalige AK-Intervention). (Quelle: eigene Erstellung)
Mlh1^{-/-} Mäuse erhielten einmalig Atezolizumab (2,5 mg/kg KG, i.v., n = 5 Tiere), repetitive Vakzine (10,0 mg/kg KG, s.c., n = 8 Tiere), sowie deren Kombination (n = 4 Tiere, alternierend, beginnend mit Vakzine). Kontrolltiere erhielten keine Intervention (n = 8 Tiere). Die Tiere wurden anhand von definierten Abbruchkriterien (humane Endpunkte) getötet. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; one-way ANOVA (Bonferroni- sowie Dunnett-Test als Post-hoc-Tests).

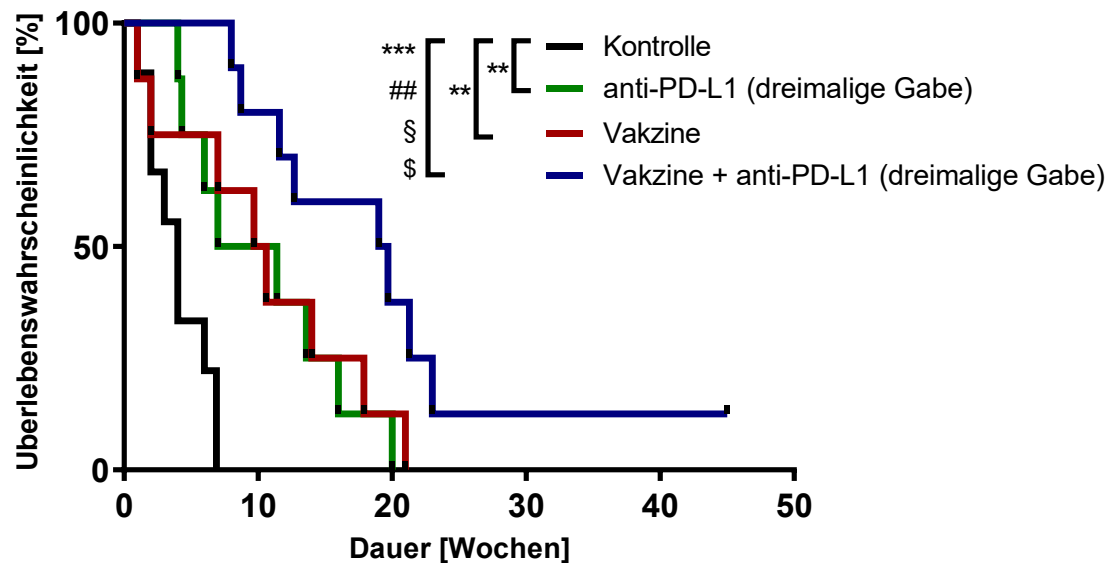


Abbildung 14: Kaplan-Meier-Überlebenskurve (log-rank-Analyse) ausgewählter Therapiegruppen (dreimalige AK-Intervention). (Quelle: eigene Erstellung)

*Mlh1^{-/-} Mäuse erhielten dreimalige Gabe Atezolizumab im Abstand von 14 Tagen (2,5 mg/kg KG, i.v., n = 8 Tiere), repetitive Vakzine (10,0 mg/kg KG, s.c., n = 10 Tiere), sowie deren Kombination (n = 8 Tiere, alternierend, beginnend mit Vakzine). Kontrolltiere erhielten keine Intervention (n = 8 Tiere). Die Tiere wurden anhand von definierten Abbruchkriterien (humane Endpunkte) getötet. ** p<0,01; *** p<0,001; ## p<0,01; § p<0,05 vs. anti-PD-L1; § p<0,05; one-way ANOVA (Bonferroni- sowie Dunnett-Test als Post-hoc-Tests).*

Unbehandelte Kontrolltiere hatten ab Diagnosestellung ein medianes Überleben von vier Wochen. Im Rahmen der ersten Untersuchungen wurde Atezolizumab als anti-PD-L1-AK einmalig appliziert. Dabei zeigte sich, dass die alleinige Gabe das Gesamtüberleben nur marginal verbesserte (Abbildung 13). Das mediane Gesamtüberleben betrug sechs Wochen und war damit im Vergleich zur Kontrollgruppe nur marginal besser. Folglich wurde die Anzahl der Injektionen auf drei erhöht. Dies führte bei Monotherapie mit drei Applikationen zur Verlängerung des Gesamtüberlebens auf neun Wochen im Median. Diese Verlängerung des Gesamtüberlebens war interessanterweise nahezu identisch mit der Vakzine-Monotherapie (zehn Wochen). Im Falle der Kombinationstherapie wurde eine signifikante Verbesserung erzielt (Abbildung 14). Das mediane Überleben betrug 20 Wochen. 30 % der Tiere waren langzeitüberlebend.

Ausgehend von diesen Befunden erfolgten alle weiteren Analysen ausschließlich an Tieren, welche dreimalig mit anti-PD-L1-AK, sowohl in Mono- als auch Kombinationstherapie mit der Vakzine behandelt wurden.

5.2 TUMORWACHSTUM UND GRÖßENENTWICKLUNG IM PET / CT

Vor Beginn und im Verlauf der Therapie wurde die Größenentwicklung und die Anzahl der Tumorherde im Abdomen longitudinal (aufgrund des progredienten Wachstums) mit Hilfe des ¹⁸F-FDG-PET / CT untersucht, um die Größe (Volumen) und Anzahl der einzelnen Tumoren zu quantifizieren, wie im Abschnitt 4.6.2 dargestellt.

Alle Mäuse der verschiedenen Therapiegruppen wiesen zum Diagnosezeitpunkt eine ähnliche, nicht signifikant unterschiedliche Tumorgröße von im Median $57,7 \pm 29,9 \text{ mm}^3$ auf.

Die wiederholten PET / CT-Untersuchungen nach ca. 35 Tagen zeigten eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikante Reduktion der Tumorgröße in allen Therapiegruppen, welche bei der Kombinationstherapie auch signifikant in Bezug zum Therapiebeginn ist (Abbildung 15).

Im Vergleich zur Tumorgröße der Kontrollgruppe am Tag 35, zeigte sich bei der alleinigen Gabe der Vakzine eine Tumorgößenreduktion im Durchschnitt um 34,3 %, bei der alleinigen dreimaligen Gabe des anti-PD-L1-AK um 63,2 % und bei der kombinierten Vakzine-Immuncheckpoint-Therapie um 70,1 %.

Tumoren der Kontrollgruppe hatten am Tag 35 im Median eine Größe von $93,7 \pm 26,4 \text{ mm}^3$. Die Tumoren der Vakzine-Monotherapie waren im Median $61,6 \pm 43,2 \text{ mm}^3$ groß, bei der anti-PD-L1-AK Therapie wurden im Median $34,5 \pm 32,4 \text{ mm}^3$ gemessen und bei der Kombinationstherapie $28,0 \pm 17,7 \text{ mm}^3$. Somit konnte die deutlichste Tumorgößenreduktion in der kombinierten Vakzine-Immuncheckpoint-Therapiegruppe nachgewiesen werden.

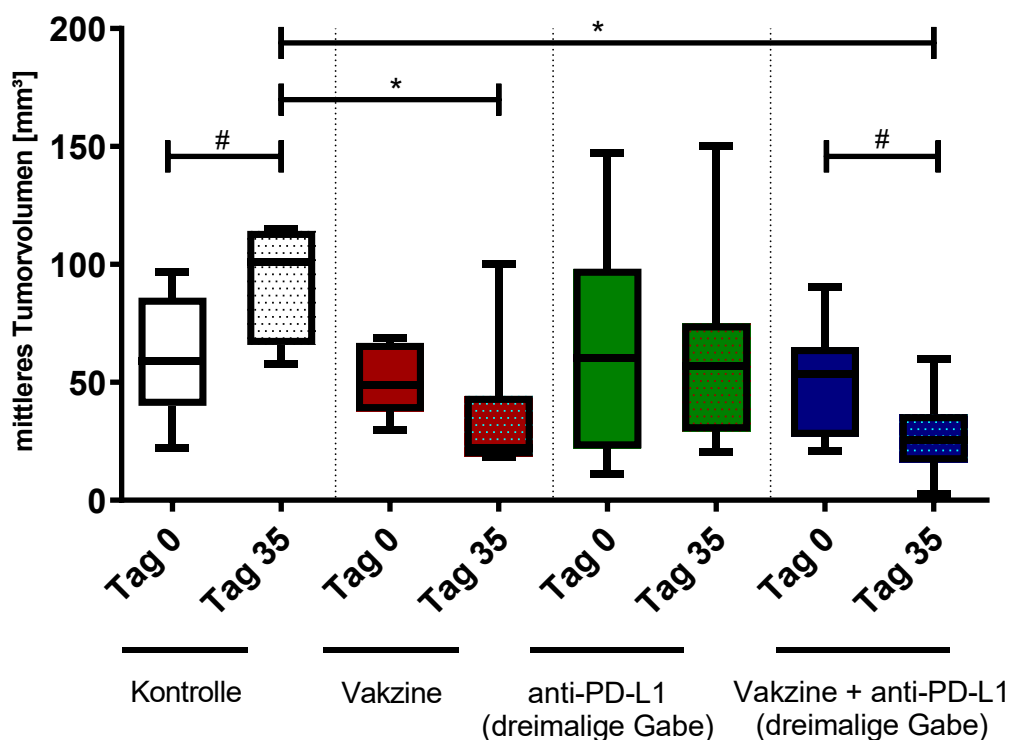


Abbildung 15: Tumorgößenentwicklung bei $Mlh1^{-/-}$ Mäusen im PET / CT. (Quelle: eigene Erstellung)

$Mlh1^{-/-}$ Mäuse erhielten dreimalige Gabe Atezolizumab im Abstand von 14 Tagen ($2,5 \text{ mg/kg KG}$, i.v., $n = 8$ Tiere), repetitive Vakzine ($10,0 \text{ mg/kg KG}$, s.c., $n = 10$ Tiere), sowie deren Kombination ($n = 8$ Tiere, alternierend, beginnend mit Vakzine). Kontrolltiere erhielten keine Intervention ($n = 8$ Tiere). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD. * $p < 0,05$; # $p < 0,05$; one-way ANOVA (Bonferroni- sowie Dunnett-Test als Post-hoc-Tests).

Repräsentative invertierte - sonst unbearbeitete und beispielhafte – PET / CT Darstellungen werden im Folgenden dargestellt:

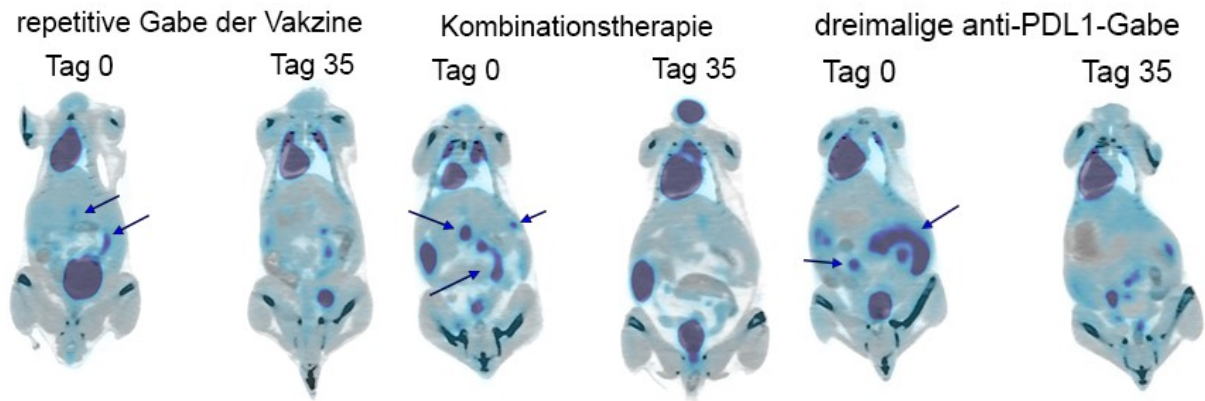


Abbildung 16: koronare Ansichten invertierter PET / CT Fusionsdarstellungen. (Quelle: eigene Erstellung)

Darstellung in vergleichbarer Schnittebene in koronarer Ausrichtung. Die Pfeile zeigen auf typische ^{18}F -FDG Mehranreicherungen im Gastrointestinaltrakt. Ein Tumorregress nach jeweils 35 Tagen ist erkennbar.

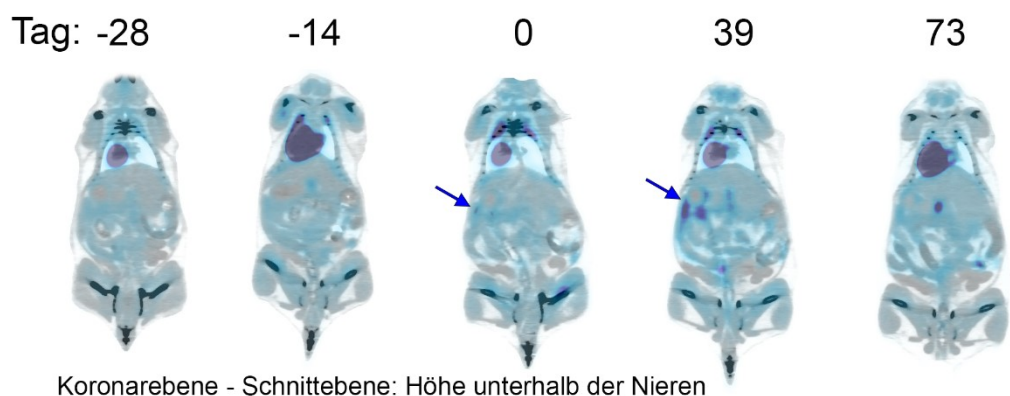
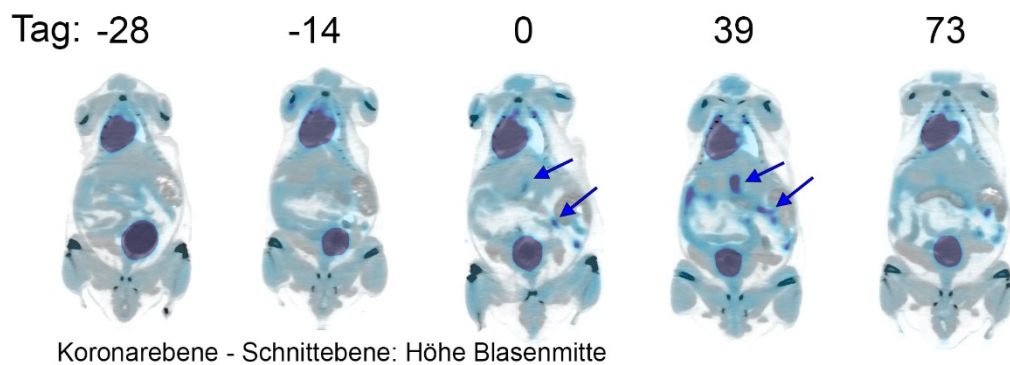


Abbildung 17: koronare Ansichten verschiedener Schnittebenen invertierter PET / CT Fusionsdarstellungen im zeitlichen Verlauf einer $\text{Mlh1}^{-/-}$ Maus, welche mit der Kombinationstherapie behandelt wurde. (Quelle: eigene Erstellung)

Darstellung jeweils in vergleichbarer Schnittebene in koronarer Ausrichtung derselben Maus. Die Pfeile zeigen auf typische ^{18}F -FDG Mehranreicherungen im Gastrointestinaltrakt. Ein Tumorregress nach 73 Tagen ist erkennbar. Die Maus lebte noch 45 Wochen nach Therapiebeginn und war tumorfrei.

5.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE ERGEBNISSE – FRAGMENTLÄNGENANALYSE

Wie im Abschnitt 2.2.3 ausgeführt, dient die MSI als molekularer Marker für die Diagnose des Lynch Syndroms sowie von sporadischen MMR-D-assoziierten CRC. Zahlreiche Marker, sowohl in *cMS*- als auch in *ncMS*-Genabschnitten, sind bereits bekannt und wurden als pathogenetisch relevante Marker für humane MMR-D Tumoren beschrieben [174]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde einerseits das Mutationsspektrum von *ncMS*-Marker in *Mlh1*^{-/-}-assoziierten GIT erfasst und andererseits deren Relevanz in der murinen Tumorgenese eruiert. Bei der Fragmentlängenanalyse wurden insgesamt 47 Marker eingeschlossen [126]. Das Mutationsspektrum wurde an insgesamt 30 GIT untersucht, wovon 19 als Kontrollgruppe dienen. Weiterhin wurden vier GIT-Proben der Vakzine-Gruppe, drei der anti-PD-L1-Gruppe sowie fünf der Kombinationsgruppe zugeordnet.

Bei den *ncMS*-Mononukleotidrepeats wurden *Frameshift*mutationen vor allem in den Marker *Bat24*, *Bat26*, *Bat30*, *Bat59*, *AA003063*, sowie *AC096777* detektiert und damit eine hochgradige MSI in den Tumormustern bestätigt. Hinsichtlich der *cMS*-Marker traten Therapie-unabhängig vor allem bei *Kcnma1*, *Ercc5*, *Rfc3*, *Akt3*, *Clock* sowie *Il1f9* häufig Abweichungen vom Wildtyp (wt) auf.

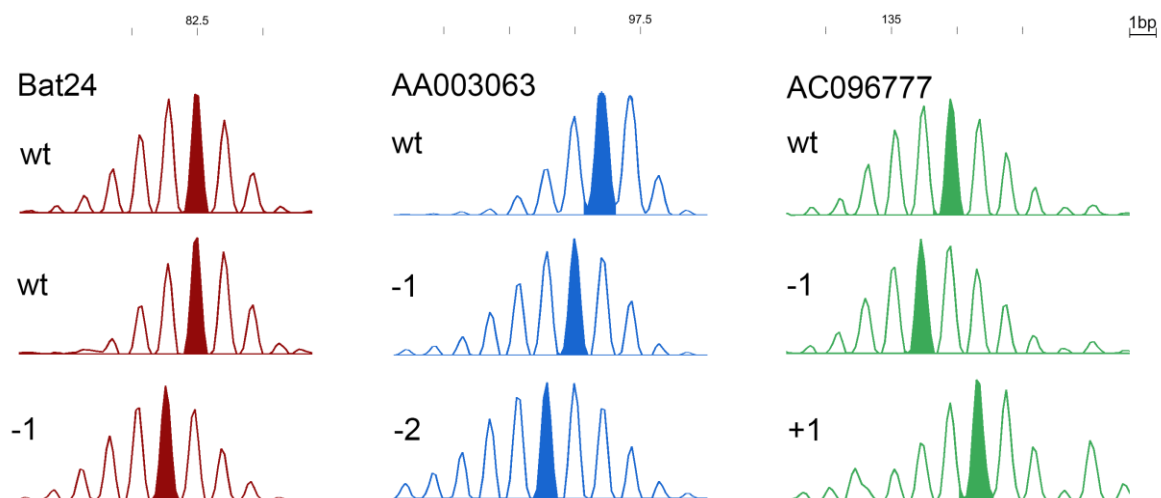


Abbildung 18: Elektropherogramm von Frameshift-Mutationen repräsentativer Marker in nicht-ko-dierenden Genabschnitten. (Quelle: eigene Erstellung)

In der jeweils oberen Reihe sind Elektropherogramme von Normalgewebe dargestellt und entsprechend der Wildtyp des jeweiligen Genabschnitts dreier *ncMS* Marker (*Bat24*, *AA003063*, *AC096777*). In der mittleren sowie unteren Reihe sind Elektropherogramme von Versuchstier-Gewebe dargestellt. Die charakteristischen, biallelischen Deletionen bzw. Insertionen sind der Wildtyp-DNA gegenübergestellt mit nivellierter Peakhöhe in RFU [relativen Fluoreszenzeinheiten]. wt = Wildtyp; - = Deletion; + = Insertion.

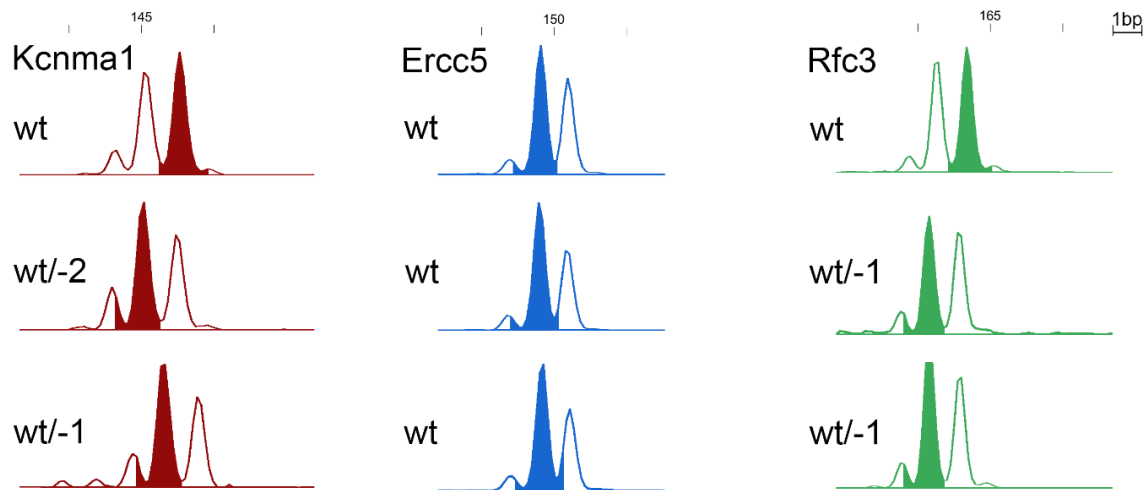


Abbildung 19: Elektropherogramm von Frameshift-Mutationen repräsentativer Marker in kodierenden Genabschnitten. (Quelle: eigene Erstellung)

In der jeweils oberen Reihe ist Normalgewebe dargestellt und entsprechend der Wildtyp des jeweiligen Genabschnitts dreier cMS Marker (*Kcnma1*, *Ercc5*, *Rfc3*). Die charakteristischen, monoallelischen Deletionen sind der Wildtyp-DNA gegenübergestellt mit nivellierter Peakhöhe in RFU [relativen Fluoreszenzeinheiten]. (Dargestellt mit "minus" + Zahl der Shifts). wt = Wildtyp; - = Deletion.

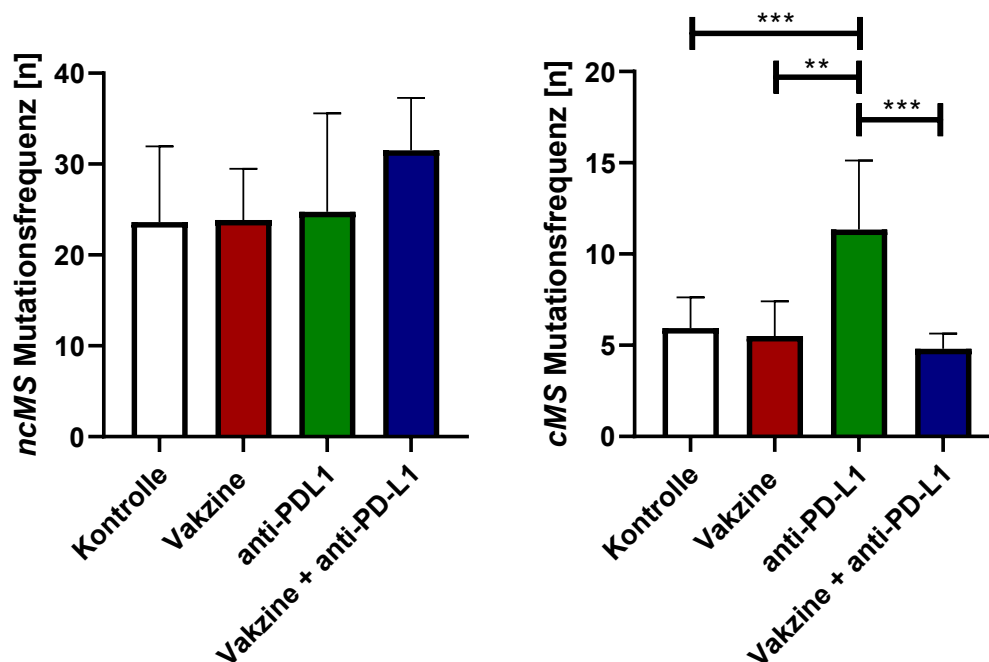


Abbildung 20: absolute Mutationsfrequenz in ncMS und cMS Genabschnitten. (Quelle: eigene Erstellung)

Kumulative Analyse von 47 cMS-Marker sowie von 10 ncMS-Marker. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD; $n = 3 - 19$ Tiere/Gruppe; ** $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; one-way ANOVA (Bonferroni- sowie Dunnett-Test als Post-hoc-Tests).

Wie in Abbildung 20 dargestellt, zeigte sich eine hochsignifikante Häufung der absoluten Mutationsfrequenz bei Tumoren von Tieren, welche ausschließlich den anti-PD-L1-AK erhielten. Dies bezieht sich auf die kumulative Anzahl der erfassten Marker in kodierenden Genabschnitten. Da die ncMS den Großteil des menschlichen Genoms ausmachen und auch besonders anfällig für Mutationen sind, dienten die Marker in ncMS-Abschnitten als interne

Qualitätskontrolle und ergänzten die histologischen Analysen zur Sicherung der Diagnose. Wie zu erwarten, gab es hier keine signifikanten Abweichungen zwischen den verschiedenen Gruppen.

In der gesonderten Einzelbetrachtung der relativen Mutationsfrequenz jedes Markers konnten drei Gruppen differenziert werden, wie in Abbildung 21 exemplarisch dargestellt. Die Mutationsfrequenz der Marker *NKtr1* und *Kcnma1* war bei Kontrolltumoren sehr gering. Nach Therapie waren vermehrt Mutationen in diesen Genen detektierbar, jedoch unabhängig von der Therapieart. Demgegenüber waren einzelne Mutationen in MSI *target*-Genen wie *Spen* nach der Therapie nicht mehr nachweisbar.

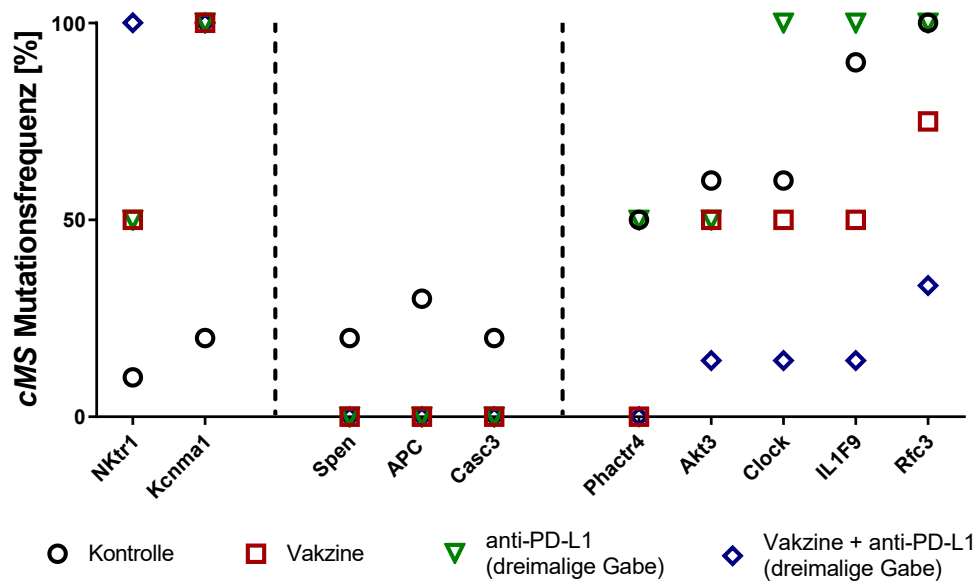
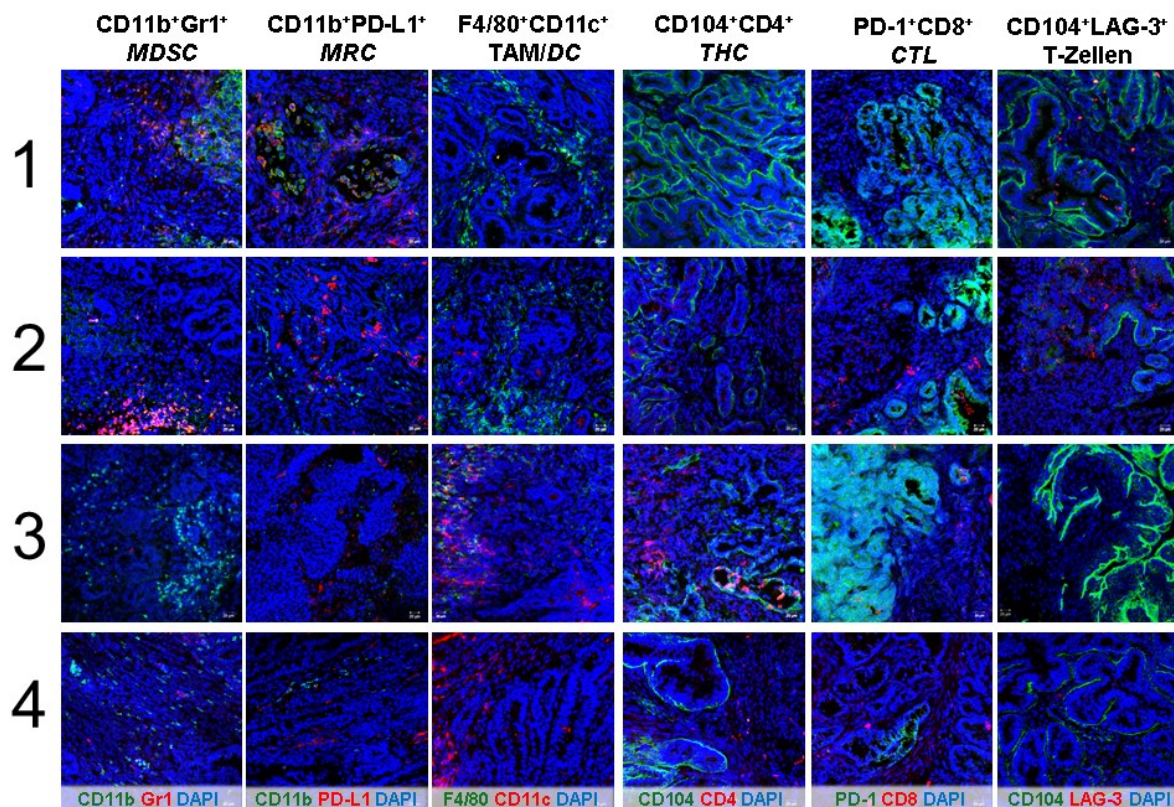


Abbildung 21: Darstellung der relativen Mutationsfrequenz in kodierenden Genabschnitten exemplarisch ausgewählter muriner Gene. (Quelle: eigene Erstellung)
Übersicht der gemittelten relativen Mutationsfrequenz von cMS-Abschnitten in einer Analyse von 47 Markern, geordnet nach Gruppen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD; $n = 3 - 9$ Tiere/Gruppe.

5.4 ANALYSE DES TUMORMIKROMILIEUS

Nach Versuchsende wurden residuelle Tumoren entnommen, kryokonserviert und gefriereschnitten, wie im Abschnitt 4.4.2 beschrieben. Diese jeweils 5 μ m dicken Gewebeschnitte wurden gefärbt und mittels eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops untersucht, um die lokalen Veränderungen im Tumormikromilieu näher zu untersuchen. Um Rückschlüsse auf eine erfolgreiche Rekrutierung immunologischer Effektorzellen nach der Therapie zu erhalten, lag ein Hauptaugenmerk auf der Erfassung der Art der infiltrierenden Lymphozyten sowie deren Anzahl im Tumorgewebe. Die für Tumoren typischen *escape*-Mechanismen, welche im Abschnitt 2.6 näher erläutert wurden, und die damit verbundene Immuntoleranz dem Tumor gegenüber, sollten durch die Therapie reduziert bzw. im Idealfall aufgehoben werden. Anhand verschiedener spezifischer AK konnten Zellen in den Präparaten dargestellt und quantifiziert werden, wie in Abbildung 22 sowie Abbildung 23 dargestellt.



1 – Kontrolle ; 2 – Vakzine ; 3 – anti-PD-L1 (dreimalige Gabe) ; 4 – Vakzine + anti-PD-L1 (dreimalige Gabe)

Abbildung 22: Fluoreszenzmikroskopie mittels eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops von GIT-Präparaten aus *Mlh1*^{-/-} Mäusen. (Quelle: eigene Erstellung)

Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von 5 µm Dünnschnittpräparaten aus kryokonserviertem Gewebe nach Kombinationstherapie (repetitive Gabe von Vakzine sowie dreimalige Gabe eines anti-PD-L1-AK) im Vergleich zu Tieren, welche eine Vakzine-Monotherapie erhielten, zu Tieren, welche ausschließlich dreimalig mit dem anti-PD-L1-AK behandelt wurden, sowie zu unbehandelten Kontrolltieren (n = 3 – 5 Tiere/Gruppe). Die Aufnahmen erfolgten am Laser-Scanning-Mikroskop. Originalvergrößerung 20x. Nach Methanolfixierung und Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Schnitte mittels Fluorochrom-markierten monoklonalen AK und DAPI (Kernfärbung) gefärbt. MDSC – myeloide Suppressorzellen; MRC – myeloide, regulatorische Zellen; TAM – tumor-assoziierte Makrophagen; DC – dendritische Zellen; THC – T-Helfer-Zellen; CTL – zytotoxische T-Zellen.

Hinsichtlich der infiltrierenden MDSC (CD11b⁺Gr1⁺) zeigte sich eine signifikante Reduktion im Tumormilieu infolge der Therapie, welche sich bereits durch die Vakzine-Monotherapie als signifikant darstellt, am stärksten jedoch unter der Kombinationstherapie ausfiel. Es dominierte dabei der granulozytäre Gr1⁺ Anteil. PD-L1 kann auch auf myeloischen Zellen exprimiert sein und hat dabei regulatorische Effekte. Therapie-unabhängig waren im Vergleich zur Kontrollgruppe hochsignifikant nahezu keine PD-L1⁺ myeloiden Zellen (CD11b⁺/PD-L1⁺) mehr nachweisbar. Der Anteil F4/80⁺ Tumor-assoziiierter Makrophagen (TAM) war sowohl in Kontrolltumoren, als auch nach Vakzine-Monotherapie relativ hoch. Unter Mono- aber vor allem bei der Kombinationstherapie mit dem anti-PD-L1-AK zeigte sich ein hochsignifikanter Abfall der F4/80⁺ TAM. CD104⁺ Zellen als Tumormarker ließen die Tumorbinnenstruktur gut erkennen. Es zeigte sich ein aufgelockerter Tumor bei den Therapiegruppen, mit höherem Anteil an zellulären Infiltraten.

Darüber hinaus war unter ICI-Therapie auch PD-L1 im Tumor signifikant herunterreguliert. CD11c wird physiologisch auf der Oberfläche von Makrophagen, Monozyten, dendritischen Zellen, sowie teilweise auch auf B-Zellen exprimiert [175]. Infolge der Kombinationstherapie zeigte sich ein signifikanter Anstieg von CD11c⁺ Zellen, nach Vakzine- und anti-PD-L1 Monotherapie zeigte sich ein steigender Trend.

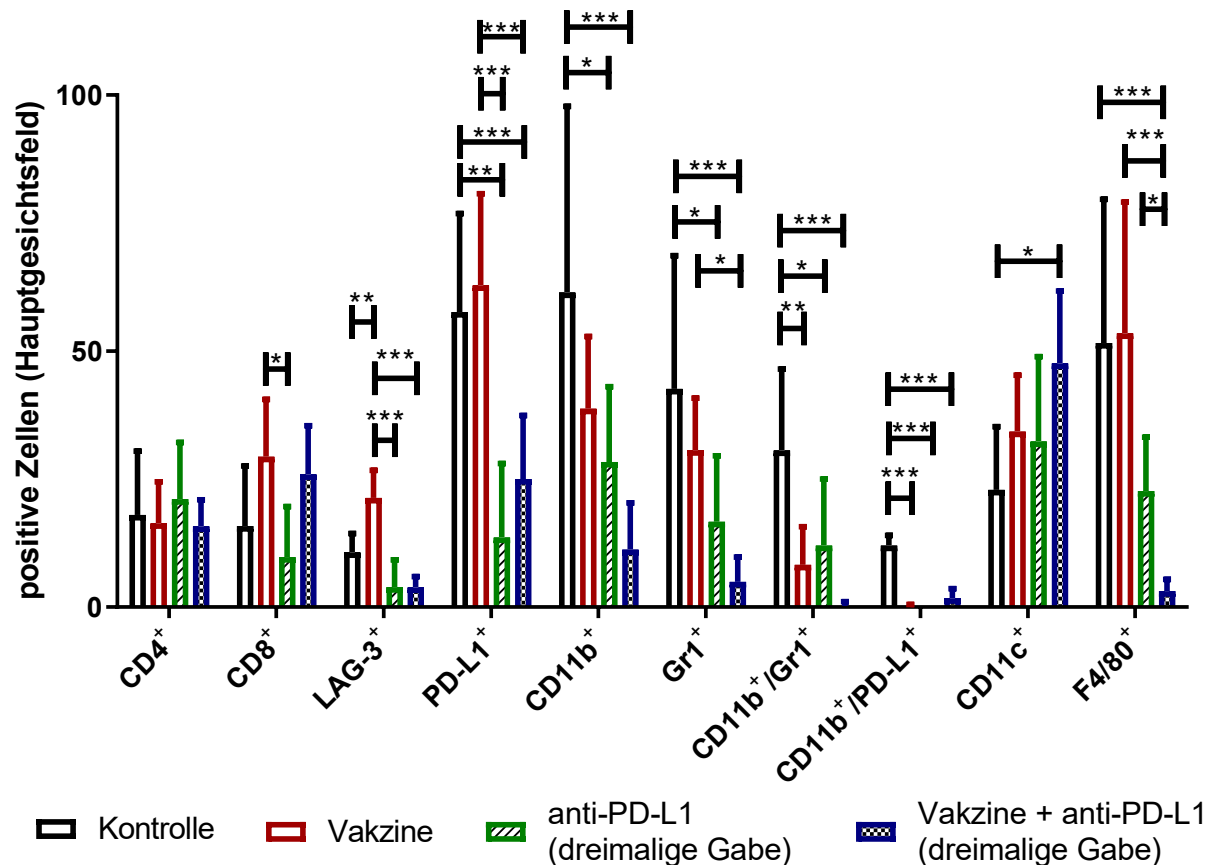


Abbildung 23: Quantitative Analyse des Anteils Tumor-infiltrierender Zellen mittels eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops. (Quelle: eigene Erstellung)

GIT Präparate von Mh1^{-/-} Mäusen nach Kombinationstherapie (repetitive Gabe von Vakzine sowie dreimalige Gabe eines anti-PD-L1-AK) im Vergleich zu Tieren, die eine Vakzine-Monotherapie erhielten, zu Tieren, die ausschließlich dreimalig mit dem anti-PD-L1-AK behandelt wurden, sowie zu unbehandelten Kontrolltieren. (n = 3 – 5 Tiere/Gruppe). Dargestellt ist die Anzahl positiver Zellen pro Hauptgesichtsfeld. Die Daten wurden in fünf unterschiedlichen Feldern erhoben. Angegeben sind die Mittelwerte ± SD. * p<0,05; ** p<0,005; *** p<0,001; one-way ANOVA (Bonferroni- sowie Dunnett-Test als Post-hoc-Tests).

5.5 IMMUNMONITORING UND NACHWEIS IMMUNOLOGISCHER VERÄNDERUNGEN

Das Immunmonitoring wurde vor Beginn und während der Therapie regelmäßig alle 28 Tage bis zum Endpunkt durchgeführt, wie im Abschnitt 4.1.7 dargestellt. Ziel war es, Veränderungen im Blut und somit die Auswirkungen der Therapie auf das murine Immunsystem zu dokumentieren.

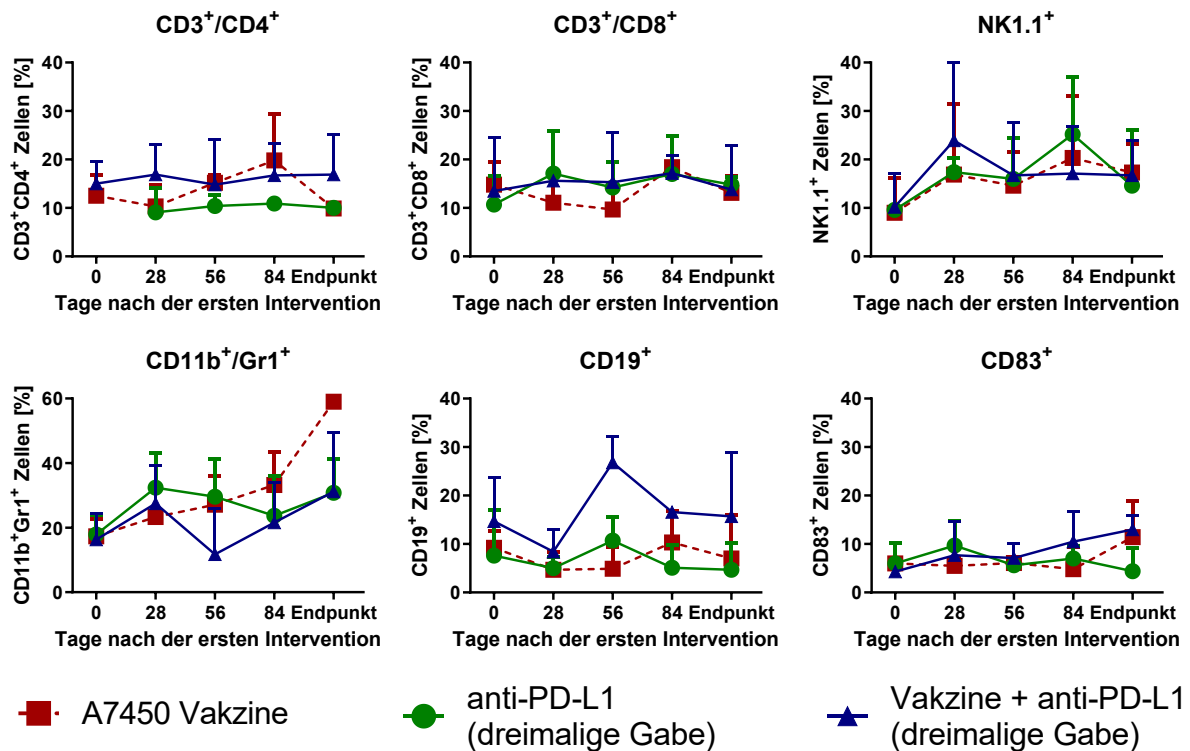


Abbildung 24: Darstellung immunologischer Parameter im peripheren Blut der jeweiligen Therapiegruppen von *Mlh1^{-/-}* Mäusen. (Quelle: eigene Erstellung)

Quantitative Darstellung des Anteils positiver Zellen nach Kombinationstherapie (repetitive Gabe von Vakzine sowie dreimalige Gabe eines anti-PD-L1-AK) im Vergleich zu Tieren, die eine Vakzine-Monotherapie erhielten, sowie zu Tieren, die ausschließlich mit dem anti-PD-L1-AK behandelt wurden. Die Messungen erfolgten im Durchflusszytometer, pro Messung wurden 50.000 events im live gate erfasst. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD, $n = 5 - 8$ Tiere/Gruppe.

Anhand der longitudinalen Analyse wurde gezeigt, dass der Anteil $CD3^+/CD4^+$ T-Helferzellen bei Mäusen, welche die Vakzine erhielten, bis zum 84. Tag nach Therapiebeginn anstieg, jedoch zum Versuchsende abnahm. Dieser Trend ließ sich weder bei der alleinigen Gabe des anti-PD-L1-AK noch bei der Kombinationstherapie erkennen. Der Anteil $CD3^+/CD8^+$ CTL stieg in allen Therapiegruppen transient, jedoch nicht signifikant. Die NK-Zellen stiegen kontinuierlich mit Maxima am Tag 84 in der jeweiligen Monotherapie (Vakzine bzw. anti-PD-L1), sowie initialem Anstieg mit Maxima am Tag 28 in der Kombinationstherapie.

Der Anteil $CD11b^+/Gr1^+$ MDSC nahm in allen Gruppen zu, mit Endpunkten nahe der Verdoppelung bis zur Verdreifachung (Vakzine) der Ausgangswerte. $CD19^+$ B-Lymphozyten wurden vermehrt im Blut von Tieren detektiert, welche die Kombinationstherapie erhielten. Die Vakzine- bzw. anti-PD-L1-Monotherapie führten demgegenüber zu einer kontinuierlichen Abnahme an $CD19^+$ Zellen. CD83 wird u.a. auf aktivierten Lymphozyten und DC exprimiert. Der Anteil $CD83^+$ Zellen stieg zum Versuchsende bei Tieren, welche entweder die Vakzine oder deren Kombination erhielten.

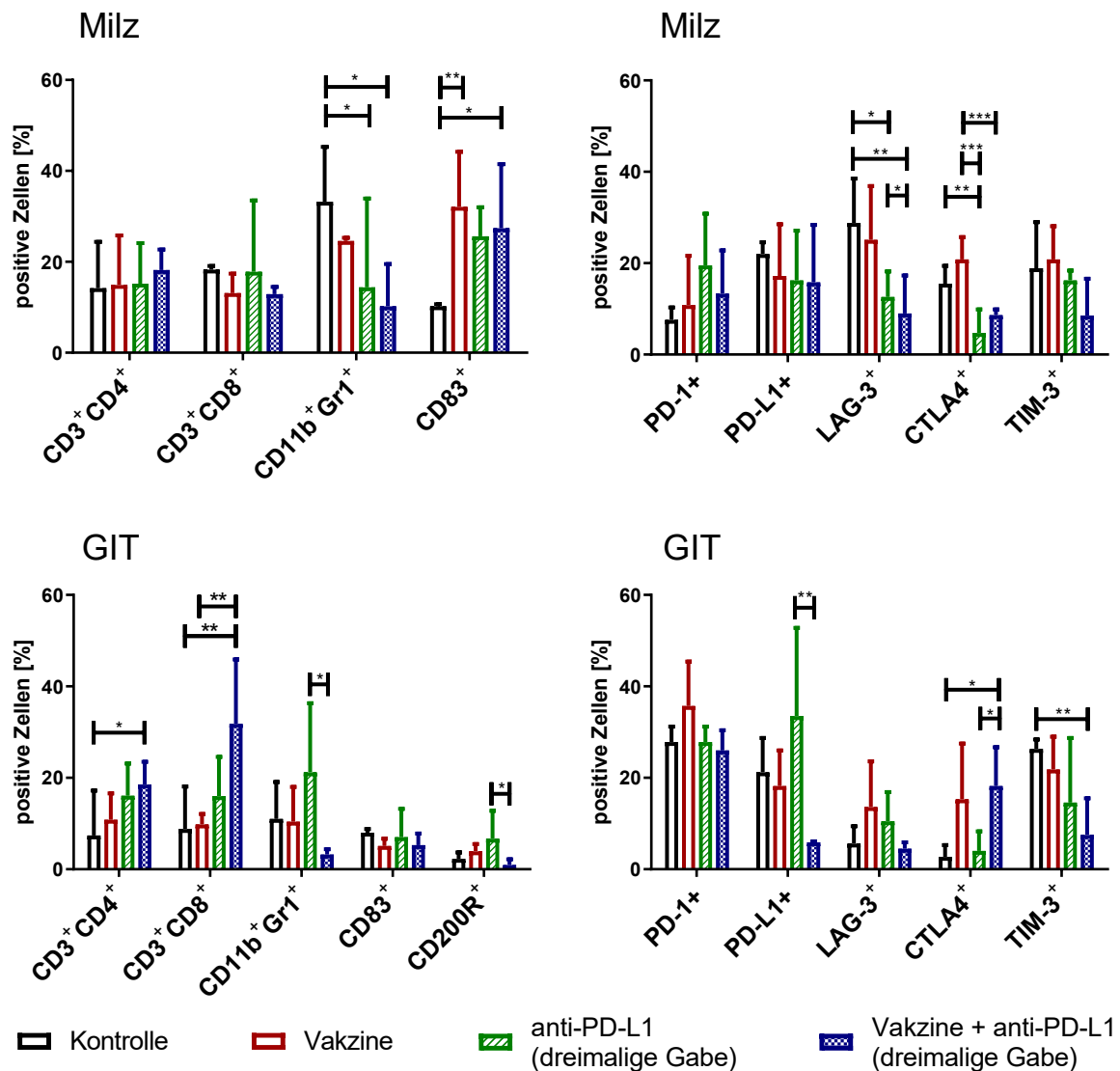


Abbildung 25: Darstellung immunologischer Parameter der Milz und des GIT von *Mlh1*^{-/-} Mäusen. (Quelle: eigene Erstellung)

Quantitative Darstellung des Anteils positiver Zellen nach Kombinationstherapie (repetitive Gabe von Vakzine sowie dreimalige Gabe eines anti-PD-L1-AK) im Vergleich zu Tieren, die eine Vakzine-Monotherapie erhielten, sowie zu Tieren, die ausschließlich mit dem anti-PD-L1-AK behandelt wurden. Die Messungen erfolgten im Durchflusszytometer, pro Messung wurden 50.000 events im live gate erfasst. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD, $n = 4 - 9$ Tiere/Gruppe; * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$; one-way ANOVA (Bonferroni- sowie Dunnett-Test als Post-hoc-Tests).

Im Rahmen des Immunmonitorings wurden den Tieren final die Milz und der GIT entnommen, *in vitro* weiter prozessiert, wie im Abschnitt 4.1.3 erläutert, und infiltrierende Zellen anschließend durchflusszytometrisch erfasst (Abbildung 25).

Bei der Untersuchung der Milz zeigte sich folgendes Bild:

Der Anteil CD3⁺CD4⁺ und CD3⁺CD8⁺ T-Zellen veränderte sich durch die Therapie nur marginal. Die Anzahl der MDSC nahm Therapie-bedingt ab, was sich signifikant darstellt bei alleiniger anti-PD-L1-AK-Gabe sowie bei der Kombinationstherapie im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei den CD83⁺ Zellen war eine signifikante Zunahme bei Mäusen, welche

ausschließlich Vakzine erhielten und bei der Kombinationstherapie zu erkennen – es ist ein steigender Trend ersichtlich. PD-1⁺ Zellen wurden ebenfalls vermehrt detektiert, vor allem bei der alleinigen Gabe des anti-PD-L1-AK. Bei den PD-L1⁺ Zellen zeigte sich ein inverser Trend mit Therapie-unabhängiger leichter Reduktion. Eine signifikante Reduktion der LAG-3⁺ Zellen war insbesondere nach Behandlung mit dem anti-PD-L1-AK, sowie nach Kombinationstherapie zu erkennen. Dies galt in vergleichbarer Weise für CTLA-4⁺ Zellen mit Signifikanzen. Die TIM-3⁺ Zellen folgten ebenfalls diesem Trend, hier allerdings ohne Signifikanzen, zudem führte die Kombinationstherapie zu einem stärkeren Abfall.

Bei der Untersuchung der GI-Tumoren zeigte sich folgendes Bild:

Tumor-infiltrierende CD3⁺CD4⁺ und CD3⁺CD8⁺ T-Zellen wurden nach Therapie vermehrt detektiert, mit jeweils stärkster und signifikanter Zunahme bei den Tieren der Kombinationstherapie. Zusätzlich kam es zu einer signifikanten Reduktion der MDSC nach Kombinationstherapie. Die alleinige Gabe des anti-PD-L1-AK führte zu einer erhöhten Infiltration. Eine ähnliche Verteilung wurde bei den CD200R⁺ Zellen detektiert, mit ebenfalls signifikanter Reduktion infolge der Kombinationstherapie. Hinsichtlich der Abundanz von Immuncheckpoint-Molekülen können weitere Unterschiede aufgezeigt werden. Während der Anteil von PD-1⁺ Zellen bei allen Therapiegruppen nahezu unverändert blieb, zeigten sich bei den PD-L1⁺ Zellen Differenzen: die alleinige anti-PD-L1-AK-Gabe induzierte PD-L1, bei der Kombinationstherapie war dieses Molekül signifikant vermindert nachweisbar. Die LAG-3⁺ Zellen waren bei den Tieren der Kombinationsgruppe auf Niveau der Kontrollgruppe, bei den übrigen Gruppen war LAG-3 tendenziell erhöht. Bei den CTLA-4⁺ Zellen zeigte sich ein steigender Trend bei Tieren mit alleiniger Vakzine-Gabe sowie eine signifikante Erhöhung in der Kombinationsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur alleinigen anti-PD-L1-AK-Gabe. Die alleinige anti-PD-L1-AK-Gabe hatte keinen Einfluss auf die Abundanz von CTLA-4⁺ Zellen und blieb in etwa auf dem Niveau der Kontrollgruppe. Die TIM-3⁺ Zellen waren bei der Kombinationsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant herunterreguliert.

Insgesamt konnte somit eine Modulation des Tumormikromilieus aufgezeigt werden, welche mit dem klinischen Verlauf korrelierte. Insbesondere die Kombinationstherapie führte zu den stärksten Veränderungen des Tumormikromilieus.

VI. DISKUSSION

Das Ziel der vorliegenden Dissertationsschrift war es, die Wirksamkeit einer kombinierten Immuntherapie, bestehend aus Atezolizumab und eines *Mlh1*^{-/-} A7450 Lysates im präklinischen *Mlh1*^{-/-} Tumorgenese-Modell zu untersuchen.

Hierzu wurde eine Vielzahl von longitudinalen Untersuchungen, wie im Abschnitt 4.1 und 4.2 dargelegt, durchgeführt. In Vorstudien konnte bereits gezeigt werden, dass eine therapeutische Applikation der Tumorstoffimpfung zu einem signifikant besseren Überleben von *Mlh1*^{-/-} Mäusen führt. Jedoch können im Verlauf der Therapie Resistenzen entstehen, die schließlich zur Tumorstoffprogression führen [125,126,173]. Folglich sollten durch die kombinierte Immuntherapie die Stoffimpfung-induzierten Resistenzmechanismen überwunden bzw. entgegengewirkt werden, um letztlich eine komplette Tumorstoffremission zu erreichen. Die Hauptzielgröße stellte hierbei das Überleben dar, wobei *Mlh1*^{-/-} Mäuse mit einem GIT – ohne therapeutische Intervention – im Median innerhalb von vier Wochen nach Diagnosestellung verstarben.

Eine Wachstumsverzögerung bzw. partielle Remission würde die generelle Wirksamkeit der Immuntherapie bestätigen und experimentell belegen, dass MMR-D-assoziierte Tumoren – wenngleich Entitäten-spezifisch – erfolgreich mit einer Kombinationstherapie behandelt werden können. Dies konnten wir mit den vorliegenden Ergebnissen untermauern und wird im Folgenden diskutiert.

6.1 GRUNDSÄTZLICHE LIMITATIONEN DER VERSUCHE UND DES MAUSMODELLS

Die *in vivo* Untersuchungen erfolgten an homozygoten *Mlh1*^{-/-} Mäusen. Diese tragen eine biallelische MMR-D und entwickeln ein entsprechend komplexes Tumorspektrum, weshalb sie ein besseres Modell für die humane cMMR-D als für das Lynch Syndrom darstellen. Bis auf wenige Ausnahmen kombinieren die *Mlh1*^{-/-} Mäuse Schlüsselemente beider Syndrome. Es konnte gezeigt werden [176], dass *Mlh1*^{-/-} Tumoren

- ultra-hyper- oder hypermutiert sind,
- ein Entitäten-spezifisches, individuelles Mutationsprofil aufweisen sowie
- verschiedene Mutationen in MSI-*target* Genen aufweisen.

Weiterhin gibt es zunehmend Evidenz für individuelle Verlaufsunterschiede je nach zugrunde liegender MMR-D [177,178]. Dies ist eine mögliche Schwachstelle in unserer Untersuchung, da alle Versuchstiere dieselbe Keimbahnmutation im *Mlh1*^{-/-} Gen trugen. Beim Menschen ist das Keimbahn-Mutationsspektrum ungleich vielfältiger (u.a. *MLH1*, *MSH2*, *EpCAM*, *PMS2*) und heterogener, wie in Abschnitt 2.2.3 und Abbildung 26 aufgezeigt. Folglich entwickeln Patienten je nach Ausprägung verschiedenste klinische Symptome sowie variablen Organbefall und Krankheitsbeginn. Ein direkter Vergleich zur humanen Tumorstoffgenese ist somit nur schwer

möglich. Wie im Abschnitt 2.4 angedeutet, werden mindestens zwei distinkte Subtypen des Lynch Syndroms nach ihrer Immunogenität und Signatur unterschieden [44,68]:

- Subtyp G1 (= hoch immunogen)
- Subtyp G2 (= wenig immunogen)

Einerseits wird der Subtyp G1 vermehrt auf Basis einer *MLH1* Keimbahnmutation beschrieben, andererseits kommt es zu einer verminderten Expression von PD-1- und CTLA-4-Immuncheckpoint-Proteinen. Die sporadische MSI mit starker Lymphozyteninfiltration ist hingegen mit vermehrter Abundanz von Immuncheckpoint-Proteinen verbunden. Dies ist therapeutisch bei der Wahl der geeigneten ICI zu berücksichtigen [68]. Neben der Tatsache, dass bei MMR-D die Tumoren ultra-hypermutiert sind und somit eine Immunogenität aufweisen, werden Immun-*escape*-Mechanismen beobachtet mit verminderter Antigenpräsentation und Lymphozyteninfiltration. Somit scheint die Kombinationsgabe von Vakzine und ICI als weitere Therapieoption erfolgsversprechend. Folglich wurde jener Ansatz in dieser Studie angewandt.

Um Mausmodelle zu generieren, welche noch besser das Tumorspektrum eines Lynch Syndroms nachahmen, wurden weitere Ansätze beschrieben: Hierbei werden homozygote *Mlh1*^{-/-} Mäuse mit Mäusen verpaart, welche heterozygote *knock-out* Keimbahn-Mutationen in Tumorsuppressor-Genen oder in Onkogenen aufweisen, welche bei CRC gehäuft mutiert sind (z.B. *APC*, *TP53* oder *KRAS*) [116]. Ähnlich wie beim humanen MSI-positiven CRC zeigen dann auch diese Mäuse somatische Mutationen im verbleibenden wt-Allel [179,180].

So zeigte sich beispielsweise, dass Mutationen in MutSα bzw. MutLα bedeutsam bei der DNA-Reparatur sind (Siehe Abschnitt 2.3). Der MutSα-Proteinkomplex (*MSH2 / MSH6*) scheint gegenüber MutLα (*MLH1 / PMS2*) relevanter für die Aufrechterhaltung eines funktionierenden MMR-Systems zu sein, da es mögliche Nukleotid-*Mismatches* schlechter erkennt als MutLα [178]. Eine Malfunktion des MutSα-Proteinkomplexes könnte zu einer höheren *TMB* führen, welche möglicherweise abhängig von der Gewebshistologie durch sekundäre DNA-Reparaturmechanismen ausgeglichen werden könnte [178]. Auch gibt es Hinweise, dass 60 % der in einer Studie untersuchten MSI-*H* Tumoren keine MMR-Mutation enthielten [178]. Dabei sind jedoch hereditäre von sporadischen Tumoren abzugrenzen. Bei der hereditären Form war in ca. 90 % der Fälle immunhistochemisch ein Verlust mindestens eines MMR-Proteins nachweisbar. In einer weiteren Studie, in welche 100.000 Fälle mit 100 Krebsarten eingeschlossen wurden, konnte gezeigt werden, dass die *TMB* altersabhängig variiert. Beim direkten Vergleich von pädiatrischen (zehn Jahre alt) vs. adulten / geriatrischen (90 Jahre alt) Patienten, kam es zu einer Erhöhung der *TMB* um das 2,5 Fache [181]. Auch hier konnten Promotermutationen von *PMS2* in Zusammenhang mit erhöhter *TMB* gebracht werden. Interessanterweise waren 83 % der MSI-*H* Tumoren auch mit hoher *TMB* assoziiert, allerdings zeigten nur 16 % der Tumoren mit hoher *TMB* eine MSI-*H*. Dies wurde auf die unterschiedlichen Tumorentitäten

zurückgeführt, beim GIT beispielsweise war MSI-*H* nahezu stets vergesellschaftet mit hoher *TMB* [181].

MutSβ (*MSH2-MSH3*) oder MutLγ (*MLH1-MLH3*) haben hingegen eine nachrangige Bedeutung für die *TMB* und führen zu einem mildereren Tumorphänotyp [182,183]. Auch ist bekannt, dass der Grad der MSI und die *TMB* einen prädiktiven Wert bei der Einschätzung einer erfolgreichen ICI Therapie besitzen [178]. Wie oben angedeutet, variiert die *TMB* signifikant je nachdem welches Heterodimer der MMR Proteine betroffen ist. *MLH1 / PMS2* scheinen mit einer niedrigeren *TMB* einherzugehen, wie in Abbildung 26 ersichtlich [178]. In Voruntersuchungen wurde bereits die *TMB* bei ausgewählten *Mlh1*-assoziierten murinen Tumoren untersucht. Hierbei wurde bei allen Tumoren eine hohe Mutationslast bestätigt, jedoch zeigten sich auch Unterschiede zwischen den einzelnen Tumoren, welche die Heterogenität reflektieren. Daher erscheint ein darauf basierendes *MLH1*^{-/-} Tumormodell folgerichtig. Neuere Therapieansätze, welche auf der durch Promotor-Hypomethylierung basierenden Reaktivierung von *MLH1* aufbauen, werden aktuell beforscht und im Abschnitt 6.5 weiter diskutiert.

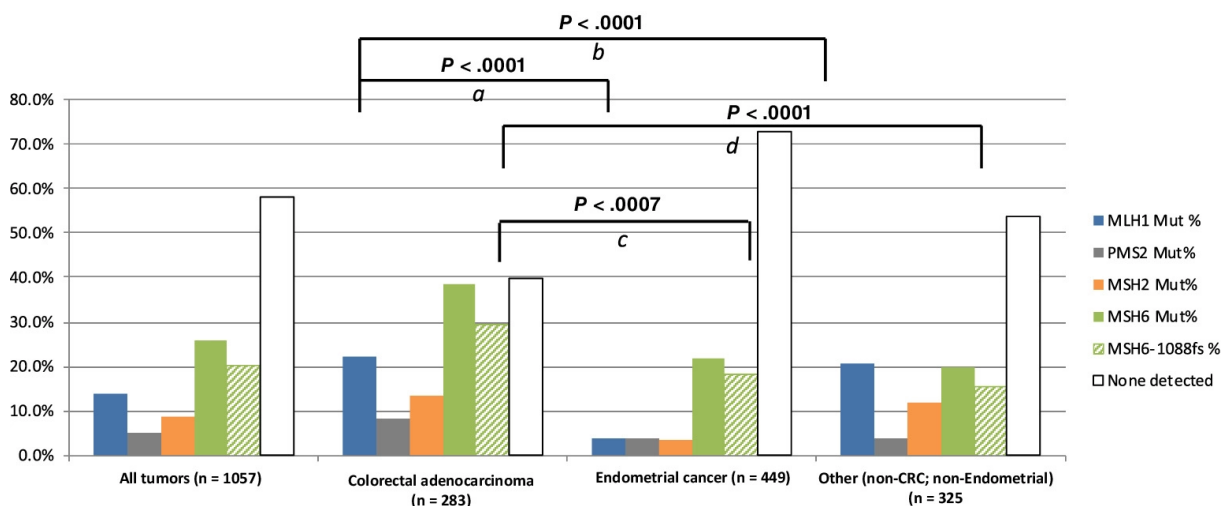


Abbildung 26: MMR-Genmutationsrate nach Tumorhistologie und Tumorgenen sortiert. (Quelle: [178])

Es zeigen sich höhere Mutationsraten und möglicherweise eine höhere *TMB* bei *MSH2/MSH6* im Vergleich zu *MLH1/PMS2*.

Eine weitere Limitation stellen die Haltungsbedingungen der Versuchstiere dar. Alle Tiere erhielten definierte, autoklavierte und standardisierte Nahrungspellets, welche nur in begrenztem Maße das natürliche Mikrobiom fördern. Nach neueren Studien verdichten sich Hinweise, dass das Mikrobiom mit seinen $3,8 \times 10^{13}$ Bakterien, deren Konzentration im Kolon mit 10^{11} Bakterien/ml am höchsten ist [184], sowie die Entwicklung von Polypen und *CRC* in einem Zusammenhang stehen könnte [185–187] – es als „driver“ [188] für eine *CRC* fungieren könnte. Viele der Studien basieren allerdings auf fäkalen Stuhlproben, welche nicht mit dem vitalen Mikrobiom übereinstimmen müssen [189–191]. Patienten mit einem übermäßigen Vorkommen des Bakteriums *Fusobacterium nucleatum*, welches einen Teil des humanen

Mikrobioms darstellt, waren z.B. stärker betroffen von somatischen Mutationen und CRC [192] und deren Überlebensdauer war verkürzt [193]. *F. nucleatum* besitzt drei Virulenzfaktoren: *Fusobacterium adhesin A* (bindet an E-cadherin, aktiviert *NF-κB* [*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*] mit Produktion von proinflammatorischen Zytokinen sowie von Onkogenen wie *c-Myc* und *Cyclin D1* [194,195]), Lipopolysaccharid (Modulation der *microRNA*-Expression) sowie *Fanconi-assoziiertes Protein 2* (supprimiert über den TIGIT Rezeptor NK- und T-Zellen) [196,197]. Es wird angenommen, dass Proteine des Bakteriums *MDSC* rekrutieren und die T-Zell-Proliferation u.a. über eine G1-Zellzyklus-Blockade hemmen [198]. In den rekrutierten *MDSC* werden durch *F. nucleatum* auch Immuncheckpoint-Moleküle hochreguliert [192,199,200]. Bei Patienten mit übermäßigem Vorkommen an *F. nucleatum* wurde eine Reihe von spezifischen molekularen Tumoreffekten detektiert wie *CIMP*, MSI sowie genetische Mutationen in *BRAF*, *CHD7*, *CHD8* und *TP53* [192,193]. Eine Untersuchung von Bakterien im Stuhl von Mäusen als Marker ist in der Literatur noch nicht beschrieben worden. Es erscheint auch im angewandten Mausmodell nicht sinnvoll bzw. praktikabel. Die Genese von CRC ist, wie oben erläutert und in Abbildung 27 dargestellt, komplex und multifaktoriell, was im angewandten Mausmodell nur bedingt adressiert werden konnte. In einer Gegenüberstellung von CRC-Tumorgewebe mit angrenzendem Normalgewebe konnten Anhaltspunkte für eine Interaktion zwischen Mikrobiom und Zellsignalwegen gesammelt werden, welche eine Karzinogenese fördern könnten [201].

Obwohl *Mih1*^{-/-} Mäuse ein intaktes Immunsystem haben, fehlte durch die artifizielle spezifisch pathogenfrei-nahe Haltung Kontakt zu Mikroorganismen. Daher entwickeln diese Mäuse kein mit dem Menschen vergleichbares Mikrobiom. Da das Mikrobiom jedoch aus o.g. Gründen relevant für die Tumorgenese und Therapie ist, sollte in den zukünftigen Versuchen über eine eventuelle zusätzliche Applikation von Pro- und Präbiotika (wie z.B. Ballaststoffe) nachgedacht werden.

Präbiotika unterstützen die Proliferation und Differenzierung des Mikrobioms und anfallende kurzkettige Fettsäuren können das Immunsystem lokal aktivieren [202,203]. Falls in weiteren Therapieansätzen eine Kombinationstherapie mit Chemotherapeutika angedacht ist, so könnten Probiotika unterstützende Effekte entfalten, allerdings mit noch niedriger Evidenz [204].

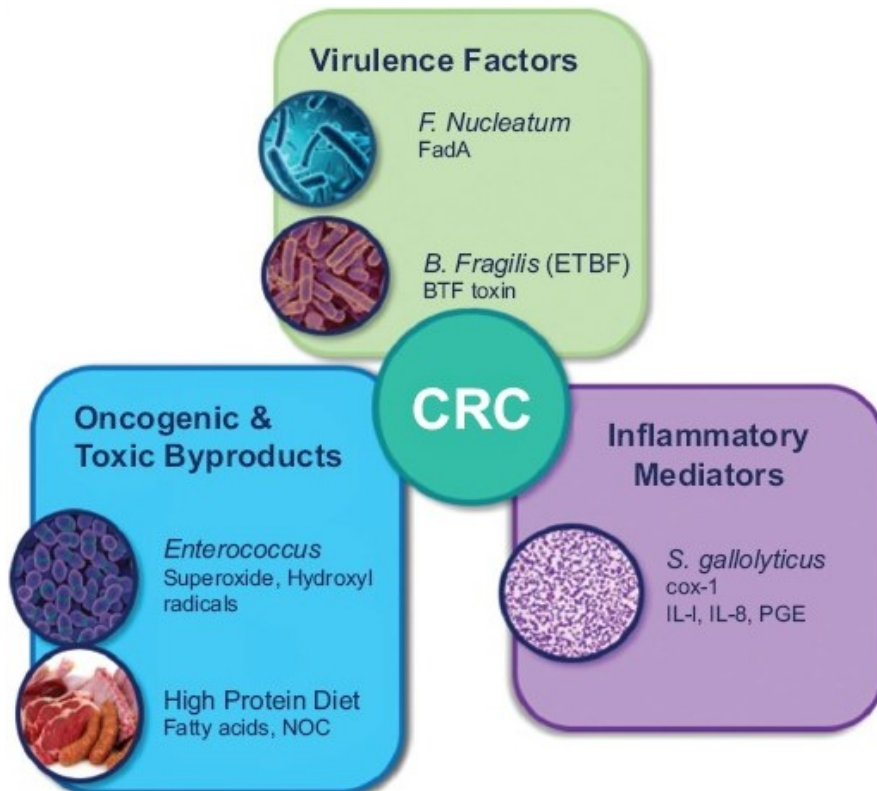


Abbildung 27: Darstellung möglicher Einflussfaktoren des Mikrobioms auf CRC. (Quelle: [196]) Sowohl verschiedene Virulenzfaktoren, inflammatorische Mediatoren als auch toxische und onkogene Nebenprodukte beeinflussen die Gene eines sich möglicherweise entwickelnden CRC.

Bereits vor Dekaden fand *Burkitt* Hinweise dafür, dass die von industrialisierten Ländern präferentiell eingenommene Ernährung, bestehend aus tendenziell wenig Ballaststoffen und vielen verarbeiteten Kohlenhydraten, einer der wichtigsten Lebensstil-basierten Risikofaktoren für die CRC-Genese darstellen könnte [205]. Folgende Studien identifizierten eine Korrelation zwischen dem Konsum von rotem Fleisch und dem Auftreten von CRC [206]. Wie in Abschnitt 2.1 und Abbildung 1 dargelegt, ist ein augenscheinlicher Zusammenhang naheliegend. Überaus interessante Ergebnisse veröffentlichte eine Forschungsgruppe, welche 100 *Msh2*^{-/-} und 60 wt-Mäuse einer von vier Diäten für sechs Monate unterwarf [207]. Hier zeigte sich ein Trend zu verbesserter Überlebenswahrscheinlichkeit und niedrigerer Genese von gastrointestinalen Tumoren und Lymphomen bei *Msh2*^{-/-} Mäusen, welche einer Diät unterworfen wurden, die mit einem hohen Konsum von rotem Fleisch einherging [207]. Da diese Mäuse ebenfalls MMR-defizient waren, lassen sich diese Ergebnisse theoretisch auch auf die von uns genutzten *Mlh1*^{-/-} Mäuse übertragen.

Es ist bekannt, dass *Mlh1*^{-/-} Mäuse eine geschlechtsspezifische Prävalenz von GIT haben. Während weibliche Mäuse vorwiegend Lymphome entwickeln, ist mit 80 % der GIT bei männlichen Mäusen häufig vorkommend [176]. Neben hormonellen Einflüssen wie einer Östrogen-*pathway* Aktivierung vs. Androgen-*pathway* Aktivierung können X-chromosomal-spezifische Veränderungen eine Rationale für diese Prävalenzunterschiede sein. Eventuell sind

Mutationstyp und Mutationsrate auf dem X-Chromosom ein Entitäten-spezifisches Charakteristikum von Lymphomen und einem Teil von GIT-Primarien. Die Geschlechterverteilung in unserer Studie war homogen. Wie im Abschnitt 4.1.1 dargelegt, folgt die Anzahl homozygoter Nachkommen der Mendel'schen Verteilung und liegt bei ca. 24 %. Zur Reduktion der Anzahl an Versuchstieren wäre ein präferenzzieller Einschluss v.a. von männlichen Versuchstieren zur Eruierung von GIT-assoziierten Tumoren in Folgestudien denkbar.

Auch ein Wechsel des Mausmodells ist vorstellbar und wird innerhalb der Arbeitsgruppe aktuell untersucht. B6.Cg*Msh2*^{LoxP/LoxP};TgTg(Vil1-cre) Mäuse entwickeln aufgrund eines gewebespezifischen *knock-outs* ausschließlich GIT-Tumoren. Die Ergänzung um ein weiteres klinisch relevantes Modell kann in jedem Fall helfen, den Einfluss der unterschiedlichen MMR-Gene, sowie spezifischer therapeutischer Interventionen auf die Karzinogenese zu untersuchen.

6.2 THERAPIEEINFLÜSSE AUF DAS GESAMTÜBERLEBEN UND TUMORWACHSTUM

Die Hauptzielgröße für die Untersuchung der Wirksamkeit der kombinierten Vakzine-Immuntherapie stellte das Überleben dar. Aus Voruntersuchungen konnte die Wirksamkeit der Vakzine-Gabe belegt werden [102,125,126,174], sie galt in unserer Untersuchung als Maßstab. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde Atezolizumab als anti-PD-L1-AK (Klon: 6E11) zunächst einmalig appliziert. Dabei zeigte sich, dass die alleinige und einmalige Gabe des AK das Gesamtüberleben nur marginal verbesserte und zu einem schlechteren Outcome im Vergleich zu der Vakzine-Monotherapie führt. Folglich wurde die Anzahl der Injektionen auf drei erhöht und damit das Gesamtüberleben verbessert. Die einmalige Gabe vom anti-PD-L1-AK könnte zu geringe und zu kurz wirksame Plasma- und Gewebespiegel ergeben haben, was sich bei dreimaliger AK-Gabe gebessert haben könnte. Da die Halbwertszeit von Atezolizumab beim Menschen 27 Tage beträgt, ist somit ein ausreichend langer Wirkspiegel auch bei 14-tägiger Gabe zu vermuten [208]. Es gab Untersuchungen an zwei Mausmodellen mit chimären anti-PD-L1-AK, um Wechselwirkungen mit dem murinen Fcγ zu unterbinden und die Immunogenität zu minimieren [209]. Es konnte dort eine klare Dosisabhängigkeit für Wirkung und Gewebspenetration bei nichtlinearer Pharmakokinetik gezeigt werden, auch war die Distribution zu dem Tumorgewebe dosis- und zeitabhängig [209]. So gab es eine positive Korrelation zwischen AK-Dosis und Dauer der PD-L1 Sättigung von im peripheren Blut zirkulierenden Lymphozyten [209]. Es kann geschlussfolgert werden, dass bei mehrmaliger AK-Gabe Lymphozyten länger zirkulieren. Es ist jedoch nicht klar, in welchem Maße die im peripheren Blut zirkulierenden Lymphozyten das Tumormikromilieu hinsichtlich der PD-L1-Sättigung widerspiegeln.

Hinsichtlich der von uns genutzten dreimaligen AK Gabe alle 14 Tage kann auch dieser Rhythmus diskutiert werden. In einer klinischen Studie wurden drei Applikationsrhythmen von zwei

bis vier Wochen mit entsprechend angepasster Dosis untersucht [210]. Es konnten hierbei keine relevanten Unterschiede in der Sicherheit und Wirksamkeit gefunden werden. In vielen klinischen Studien wird hingegen oft ein *Setting* mit zweiwöchiger Gabe (bei sechs Zyklen) angewandt [211]. In weiteren Studien wurden anti-PD-L1-AK 14-tägig mit bis zu 16 Zyklen gegeben, hierbei ergaben sich bei neun Prozent der Patienten schwere Nebenwirkungen [212]. Es ist bedenkenswert, auch in Folgeuntersuchungen dosisadaptiert häufiger den AK zu applizieren, um eine Wirkverstärkung zu erreichen. Beachtlich ist, dass in dieser Untersuchung nur eine objektive klinische Besserung in sechs bis 17 Prozent der Fällen abhängig von der Tumorentität eintrat [212]. Dies lässt vermuten, dass die interindividuellen Wirkunterschiede nicht durch Dosissteigerungen angeglichen werden können. Auch in unserer Untersuchung fiel auf, dass durch die alleinige anti-PD-L1-Gabe die *intratumorale* Immunantwort nur mäßig erhöht wurde. Die Kombinationstherapie führte zu stärkeren Immunantworten, wie im Abschnitt 5.4 sowie 5.5 zusammengefasst wurde.

Zur Einschätzung der Tumorgößenentwicklung wurde ein ^{18}F -FDG-PET / CT genutzt, wie im Abschnitt 4.6 beschrieben, welches auch regelhaft und zuverlässig in weiteren Mausstudien angewandt wird [213]. Es gibt jedoch auch andere Ansätze, welche u.a. auf ^{18}F]FETMSUPPLY als Marker setzen, welcher den A₃ Adenosin-Rezeptor als Zielstruktur adressiert. Dieser wird als möglicher Tumormarker diskutiert, da er sehr stark in humanem CRC und in Zelllinien exprimiert wird [158]. Es zeigten sich jedoch keine überzeugenden Ergebnisse bei *Xenograft*-Modellen. Dies wird erklärt durch die ungenügende Pharmakokinetik und sinkende Rezeptorexpression im Gewebe [158].

Im klinischen Alltag ist das ^{18}F -FDG-PET / CT noch kein Standardverfahren in der Diagnostik [214], da es u.a. eine niedrige Spezifität besitzt. So werden z.B. fünf bis acht Prozent der CRC Patienten fälschlicherweise in ein zu hohes Krankheitsstadium eingestuft [215]. Dies könnte durch ein lokal erhöhtes Entzündungsgeschehen erklärbar sein [216]. Auch gibt es Ansätze mit ^{64}Cu]Atezolizumab als Marker im Mausmodell, um direkt die PD-L1 Expression in Tumoren zu detektieren [217]. Dies gelang und kann als mögliche Option gelten. Es wurden allerdings nur mittelmäßig starke Anreicherungen *ex vivo* im Darm nachgewiesen bei niedrigen Fallzahlen (vier Proben) in der Studie [217].

Auch wurde in *Nature* 2019 eine Studie publiziert, in welcher ^{89}Zr]Atezolizumab als Marker im klinischen Modell bei 22 Patienten mit verschiedenen nicht-CRC-Karzinomen angewandt wurde [218]. Hier konnten reliable Signale im lymphoiden sowie entzündlichen Gewebe aufgezeichnet werden. Die Aufnahme des *Tracers* im Tumorgewebe war leider heterogen, so dass eine Eignung zur Bildgebung derzeit fraglich erscheint.

Die Tumorgößenentwicklung zeigt eine zum Teil große Varianz der Werte. Dies betrifft vor allem die Folgeuntersuchungen am Tag 35 nach Vakzine- und alleiniger anti-PD-L1-Therapie, was auf mögliche Therapieversager hindeuten könnte. Auffällig ist, dass bei den

Untersuchungen am Tag 35 bei der Kombinationstherapie die *SD* eine recht kleine Spannweite aufwies. Dies kann auf ein konsistentes Ansprechen deuten und unterstreicht die Überlegenheit der neuartigen Kombinationstherapie in dieser Studie. Je Gruppe wurden nur zwischen acht bis zehn Tiere eingeschlossen, was eine hohe *SD* generell wahrscheinlicher macht. Weiterhin wurde in dieser Arbeit eine gewisse Konsistenz der Beurteilung angestrebt: Zum einen wurden standardisierte Befundungsmonitore und Programmeinstellungen genutzt. Zum anderen wurden die Analysen nur von einem Befunder durchgeführt. Bei der Befundung stellte sich zum Teil das Problem, dass die Milz der Tiere eine starke und großflächige Signalanreicherung aufwies. Diese Signalanreicherung reichte oft bis weit *ventrolateral*, was der anatomisch-physiologischen Lage des GIT sehr nahe kam. Das Signal im ^{18}F -FDG-PET / CT war folglich anatomisch schlecht von GIT-Regionen zu trennen, trotz Evaluation in allen drei Raumebenen. Es blieb in Einzelfällen die Frage, wie weit die Signalanreicherung der Milz und dem GIT zuzurechnen wäre, was zu größeren vermuteten GIT führen konnte. Da für eine große Spreizung nur wenige Fehlmessungen ausreichen und nur wenige Tiere eingeschlossen waren, ließe sich hieraus die hohe *SD* erklären. Große Spreizungen fanden sich in zwei der drei Fällen bei den Folgeuntersuchungen. Dies ließe sich dadurch erklären, dass zu jenem Zeitpunkt die Tumorgenese so weit fortgeschritten gewesen sein könnte, dass die Milz entsprechende Signalanreicherungen zeigte. Dies hätte Fehlmessungen zur Folge, wie oben beschrieben. Ein generelles Problem bei der Auswertung der ^{18}F -FDG-PET / CT-Daten ist die Subjektivität durch den Befunder. Zur Vermeidung dieser Fehler sollte in Folgeuntersuchungen einerseits die Zahl der Versuchstiere erhöht werden. Zum anderen könnten drei Befunder unabhängig voneinander die Messungen und Beurteilungen durchführen und es könnte der Mittelwert davon herangezogen werden. Weiterhin wurde in ersten klinischen Untersuchungen auch die Anwendung einer *point spread*-genannten Funktion untersucht, welche helfen kann den Parallax-Effekt auszugleichen [219]. Hierbei konnte eine höhere Sensitivität als bei konventioneller PET / CT Aufnahme nachgewiesen werden [219]. Somit könnte ein besseres Erkennen von frühen *CRC*-Stadien und Lymphknotenmetastasen ermöglicht werden. Das neue Verfahren kann als denkbare Alternative zur angewandten konventionellen Methodik gelten und die Befundungsqualität verbessern.

Auch werden Ansätze beschrieben, bei denen Fluoreszenz-markierte AK zur Darstellung von PD-L1 exprimierenden Tumoren angewandt wurden [220]. Dadurch wäre eine kostengünstigere und engmaschigere PD-L1-selektive Therapieüberwachung möglich. In der Literatur wird die PD-L1-Expression als ein prädiktiver Marker für den Therapieerfolg mit anti-PD-L1-AK diskutiert [93,221,222]. Auch könnten Therapieversager evaluiert werden, was relevant ist, da weniger als die Hälfte der Patienten auf anti-PD-L1-AK mit einer klinischen Verbesserung reagierten [223,224]. Möglicherweise kommt dies durch fehlende PD-L1 Expression auf der Tumoroberfläche zustande. Weiterhin ist die PD-L1 Expression ein dynamischer Prozess,

welcher zu unterschiedlichen Effektivitäten und Responsivitäten der Therapie mit individuellen Variabilitäten führt. Die Evaluation der PD-L1-Expression *in vivo* kann somit helfen, Patienten zu identifizieren, welche wiederum von der Therapie profitieren könnten [222].

6.3 THERAPIEEINFLÜSSE AUF IMMUNOLOGISCHER UND MOLEKULARER EBENE

Es wurden in der Arbeit eine Reihe von longitudinalen Untersuchungsmethoden angewandt, um den Verlauf der Tumorentwicklung und seine Auswirkungen auf das Immunsystem zu untersuchen. Dabei wurden auch immunologische Veränderungen im peripheren Blut und Organen, sowie das Tumormikromilieu untersucht, wie in Abschnitt 5.4 und 5.5 dargestellt. Das Tumormikromilieu spielt eine große Rolle bei der Progression des Tumors und ist gleichzeitig bedeutsam bei deren Bekämpfung. Hierbei spielen zelluläre Komponenten, Signalmoleküle, Metaboliten, physikalische Umgebungsbedingungen wie pH-Wert, Oxygenierung aber auch weitere Faktoren wie das Mikrobiom eine große Rolle [225]. Bei der Auswertung der immunologischen Veränderungen gab es eine Reihe von Entwicklungen, welche im Folgenden diskutiert werden sollen.

Bei der Transformation von einer normalen Körperzelle hin zu einer entarteten, streuenden Zelle spielt das körpereigene Immunsystem eine herausragende Rolle, um das Tumorstreuen sowie -streuung zu kontrollieren [226,227]. Verschiedene infiltrierende Zelltypen mit verschiedensten Wirkungen auf die Tumorseprogression und die klinische Entwicklung wurden beschrieben [228]. Es gibt zudem einige Hinweise, dass speziell eine verstärkte Infiltration von CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen bei den meisten Tumorentitäten mit einer günstigeren Prognose korreliert [228]. Ausnahme hiervon bildet z.B. das gastrale Karzinom – hier wurde ein inverser Effekt beobachtet [229]. Beim metastasierten CRC ist eine starke Expression von PD-1 mit einem schlechteren *Outcome* assoziiert, wobei eine gewisse Dissoziation der Expression zwischen Metastase und Primarius beschrieben wurde [230]. Beim primären CRC hingegen sind PD-(L)1 exprimierende T-Lymphozyten mit einem verlängerten Überleben assoziiert, was mit dem intestinalen Mikrobiom und Immunsystem in Zusammenhang gebracht wird [231,232]. PD-1 wird u.a. von aktivierten Lymphozyten exprimiert und kann durch Liganden-Interaktion die Aktivität von CTL supprimieren [233,234]. Eine hohe Anzahl an CTL ist bei einer Vielzahl von Karzinomen, inklusive des CRC, mit einer verbesserten Prognose assoziiert [235].

Wir erwarteten eine erhöhte T-Zell-Abundanz im Tumormikromilieu. Es wurde vermutet, dass die Zahl und Aktivität der CTL zunimmt, was den Überlebensvorteil dieser Versuchsgruppen erklären könnte. Es konnte sich tatsächlich unter Kombinationstherapie eine erhöhte Zahl der CD8⁺ CTL zeigen lassen. Hingegen führte die alleinige anti-PD-L1-Gabe zu einer Abnahme der CD8⁺ CTL. Eventuell stellte die zusätzliche Vakzinierung einen nötigen Stimulus für CTL dar [236]. Eine synergistische Komponente beider Therapiekomponenten wäre ein denkbarer

Erklärungsansatz. Bisher wurden kaum Studien zur Kombination aus ICI und Vakzine veröffentlicht – es werden aber aktuell viele klinische Studien verfolgt, da es sich um einen neuartigen und vielversprechenden Ansatz handelt [236]. Es zeigten sich verstärkte Zelllyse, Tumorsuppression sowie verbessertes Überleben bei ersten Vakzinierungen im *CRC* Tiermodell mit löslichen PD-1 und Tumorgenen [237].

MSI-*H*-assoziierte Neoplasien zeichnen sich im Vergleich zu MSS Tumoren u.a. durch eine hohe Anzahl an Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (*tumor-infiltrating lymphocytes, TIL*) aus [45]. Speziell beim *CRC* wurde der Einfluss von CD3⁺ und CD8⁺ *TIL* intensiv untersucht und im Rahmen eines *Staging*-Systems (*Immunoscore*, wie bereits im Abschnitt 2.6 angesprochen) integriert [238].

Eine hohe Expression von PD-L1 im Tumormikromilieu kann im Rahmen eines Immun-escape-Mechanismus zu einer T-Zell-Immunität und zur Schwächung der Immunabwehr führen. Dies ist die Rationale für den Einsatz des anti-PD-L1-AK zur Re-Sensibilisierung der *TIL* in unserem Versuchsansatz. Der prognostische Wert der PD-L1-Expression beim *CRC* ist allerdings unklar und wird aktuell kontrovers diskutiert [224,231,239–241]. Es wurde in einer Studie mit 53 *CRC* Patienten nachgewiesen, dass eine Vielzahl von CD8⁺-Zellen mit niedriger PD-1 Expression sowie mit verlängertem Überleben korrelierten [230], was in weiteren Studien noch gegensätzlich diskutiert wird [231,242]. In Vorversuchen zeigte sich, dass die PD-L1-Expression auf einwandernden Zellen durch die alleinige therapeutische Vakzinierung im Tumormikromilieu hochreguliert wird [125]. In unserer Untersuchung fand sich eine gleichartige Tendenz bei der alleinigen therapeutischen Vakzinierung. Die Kombinationstherapie hingegen führte zu einer signifikanten Reduktion der PD-L1 Expression (Abbildung 23), was sich konkordant zur durchflusszytometrischen Endpunkt-Messung des GIT darstellt (Abbildung 25). Dies könnte durch eine Minderexpression oder eine Apoptose / Destruktion von PD-L1-tragenden Zellen erklärbar sein. Diese PD-L1-Herunterregulation kann eine Rationale für den Überlebensvorteil bei der Kombinationstherapie darstellen.

CD11c wird auf der Oberfläche von Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und DC exprimiert [175,243]. In den Therapiegruppen zeigte sich ein steigender Trend, unter Kombinationstherapie ein signifikanter Anstieg von CD11c⁺-Zellen, welcher die Überlegenheit der Kombinationstherapie erklären könnte.

Makrophagen wie auch DC wurden in der Literatur im Zusammenhang mit *CRC* näher untersucht, speziell die TAM, welche durch Zytokine, Metaboliten und *Checkpoint*-Moleküle die Immunreaktion beeinflussen und protumoral wirken können [244].

TAM sind ebenfalls im hochreaktiven Tumormikromilieu nachweisbar. Sie supprimieren die einwandernden Immunzellen über den *NF-κB*-Signalweg und stellen einen Immun-escape-Mechanismus dar [245,246]. TAM stellen die Hauptpopulation der dort einwandernden Immunzellen [247]. Abhängig der dort präsentierten Stimuli und Signale differenzieren sie sich

reversibel in den M1 oder M2-Subtyp [248–251]. Sie kommen aber meist in der M2-Form vor [252]. In der M2-Form führen sie u.a. zu einer verstärkten *Angiogenese* und fördern das Tumorstadium durch Suppression der T-Zell-vermittelten Immunantwort [248,253,254]. Andere Studien fanden gegenteilige Effekte im *CRC* [255,256]. Es wird vermutet, dass die Effekte abhängig von der Sauerstoffkonzentration im Gewebe sind [257,258]. So zeigen TAM in wenig hypoxischen Milieu antitumorale Effekte bei niedriger Konzentration Tumor-sezernierter Zytokine [259]. Im fortgeschrittenen Tumorstadium finden sich allerdings eher TAM des M2-Typs [260]. Zumindest theoretisch ließen sich Therapien ableiten, bei denen über Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren der *NF-κB*-Signalweg gehemmt wird. Folglich würde die Differenzierung hin zu M2 gemindert, was zur verstärkten Tumorbekämpfung führen könnte [261]. Ein solch gezielter Eingriff ist aber noch nicht in der Praxis beschrieben worden und erscheint schwer umsetzbar. F4/80⁺ wird als Marker für TAM beschrieben [262,263].

Unter der Kombinationstherapie zeigte sich in dieser Arbeit eine signifikante Reduktion der TAM. Auf der Zelloberfläche der TAM werden auch u.a. PD-1 Rezeptoren exprimiert. In Studien konnte gezeigt werden, dass die PD-1/PD-L1 Blockade durch anti-PD-L1-AK *in vivo* zu einer verstärkten phagozytären Aktivität der Makrophagen führte, auch war das Tumorstadium verlangsamt und es zeigte sich ein verlängertes Überleben [264]. Diese direkten Effekte von anti-PD-L1-AK auf TAM können eine Rationale für die signifikante Reduktion der F4/80⁺ Zellen im Tumormikromilieu darstellen und das verbesserte Überleben der Tiere – zumindest partiell – erklären. Durch die oben genannten möglichen protumoralen Effekte ließe sich ebenfalls der Überlebensvorteil bei der Kombinationstherapie erklären.

Es wird beschrieben, dass fortgeschrittene Karzinome verstärkt *MDSC* rekrutieren, welche phänotypisch sehr unterschiedlich aber funktionell ähnlich sind [265,266]. Populationen von unreifen Gr1⁺ Zellen waren im Mausmodell in der Lage eine CD8⁺ T-Zell-Toleranz auszulösen, welche durch Induktion einer Antigen-spezifischen Anergie verursacht wird [267]. In unseren Versuchsgruppen waren *MDSC* signifikant herunterreguliert, was ebenfalls zur Verbesserung der Überlebenswahrscheinlichkeit geführt haben könnte. Es gibt Untersuchungen, wonach Zytokine wie IL10 und IL13 zur Expansion von *MDSC* führen [268,269]. Es konnten auch Korrelationen zwischen dem Maß der F4/80 Expression und hohen *MDSC* Spiegeln gezeigt werden [270], was sich teilweise auch anhand unserer Daten zeigen lässt. Gerade die Kombinationstherapie scheint hier sehr wirksam zu sein, was deren therapeutische Überlegenheit zum Teil erklären könnte.

Infolge der Therapie wurde ein Anstieg der *MDSC* im peripheren Blut detektiert, welche aber unter Kombinationstherapie geringer ausfiel. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit PD-L1 und LAG-3 nicht simultan auf dieser Zellpopulation erhoben wurde, können diesbezüglich keine weiteren Aussagen getroffen werden. Es wird beschrieben, dass PD-L1 hochreguliert wird und LAG-3 abnimmt [271].

Im Milzgewebe und dem GIT kam es zu einem signifikanten Abfall der *MDSC* bei der Kombinationstherapie. Auch in der Fluoreszenzmikroskopie des Tumorgewebes zeigte sich eine signifikante Reduktion der *MDSC*, auch hier am stärksten bei der Kombinationstherapie. Vermutlich ergab sich dort, durch die vielfältigen und möglicherweise synergistischen Interaktionen, eine Repression der *MDSC*.

Die sich vom Knochenmark ableitenden $CD11c^+$ DC können gewebspezifische Antigene aufnehmen und naiven $CD8^+$ T-Zellen präsentieren [267]. Diese waren im Tumorgewebe am stärksten und signifikant unter Kombinationstherapie erhöht und könnten zum Therapieeffekt beigetragen haben.

In der Gesamtschau unserer Ergebnisse zeigt sich ein vielfältiges Bild. Anhand verschiedener immunologischer Parameter ließen sich denkbare Korrelate und Erklärungsansätze für die besseren klinischen Ergebnisse der Kombinationstherapie aufzeigen. Es stellt sich eine Kombination aus immunsuppressiven und -stimulatorischen Aspekten der Immunantwort dar. Dies verhält sich konkordant zu aktuellen Studienergebnissen, wonach es antagonistische Effekte zu geben scheint [272]. Wir konnten einen Trend zur Zunahme von $CD8^+$ Zellen und einen im Vergleich niedrigeren Anstieg von $CD4^+$ Zellen feststellen. Dies steht konträr zu anderen Studienergebnissen, bei denen neben $CD8^+$ vor allem die $CD4^+$ Zellen stärker anstiegen [273,274]. Der vor allem bei der Kombinationstherapie signifikante Anstieg von $CD8^+$ Zellen unterstreicht die Immunogenität *Mlh1*^{-/-}-assoziiierter Tumoren [273]. Ebenfalls scheint die angewandte kombinierte Immuntherapie mit den gezeigten molekularen Antworten den hoch-immunologischen Aspekt des MSI-CRC zu bestätigen. Die kombinierte Immuntherapie erscheint im Lichte der Ergebnisse als vielversprechender und aktuell intensiv beforschter Ansatz [236,275]. Gerade die Kombination mit Vakzine erscheint zur Verstärkung der Immunantwort sinnvoll [275]. Auch konnte gezeigt werden, dass es nicht auf die Quantität, sondern die Qualität der Antigene einer Vakzine ankommt [276]. Ein auch von uns genutztes Tumorlysate aus A7450 *Allograft* zeigte dort ein verbessertes Ansprechen sowie überlegene klinische Endpunkte im Vergleich zu einer anderen Zelllinie [276]. Die Fähigkeit zur Induktion einer robusten und anhaltenden Immunreaktion u.a. mittels Aktivierung einer stabilen T-Zell-Antwort sowie einer Modifikation des Tumormikromilieus erscheint essentiell. Die Effektivität der Vakzine ließe sich möglicherweise weiter verbessern. Zum einen wäre eine Kombination mit Adjuvantien denkbar, um eine verstärkte Immunstimulation zu gewährleisten. Zum anderen wäre eine Kombination verschiedener Lysate denkbar. Hierbei kommt es, wie oben ausgeführt, nicht unbedingt auf die Menge an, sondern auf deren Immunogenität. Ein ideales Tumorantigen wäre eines, welches stark und möglichst exklusiv im Tumorgewebe möglichst vieler Organismen exprimiert wird, um die Toxizität zu minimieren.

6.4 EFFEKTE AUF DIE MSI

Eine direkte Konsequenz von MSI ist die Akkumulation von *gDNA*-Mutationen, welche häufig Mikrosatelliten betrifft und folglich zu einem MSI Phänotyp führt. Die MSI betrifft *Mono*- sowie *Dinukleotid*-Wiederholungen sowohl in murinen Tumoren wie auch bei Patienten mit Lynch Syndrom [277]. Es gibt jedoch Anzeichen, dass die Mutationsfrequenz bei *Msh2*-defizienten Mäusen höher ist, als bei *Pms2*-defizienten. Dabei zeigten sich zwischen beiden Gruppen dezente Tendenzen zugunsten zum überwiegenden Vorkommen von Deletionen oder Insertionen, was zu unterschiedlichen Tumorspektren führen kann. Diese Mutationsvariationen könnten auch Differenzen erklären, welche bei *MSH2* und *PMS2*-Keimbahnmutationen zu beobachten sind [278]. Es gibt Unterschiede im MSI Phänotyp von murinen und humanen Tumoren. Zunächst kann dies an der kürzeren Lebenszeit von MMR-D Mäusen im Vergleich zu Patienten und an Umweltfaktoren wie Ernährung und *modifier*-Genen liegen. Auch manifestiert sich der GIT an verschiedenen anatomischen Orten: beim Menschen ist oft das Kolon betroffen, bei murinen GIT der Dünndarm [277]. Es wird vermutet, dass die kodierenden *Mononukleotid*-Wiederholungen weniger anfällig sind für Mutationen [277]. Ebenso wird vermutet, dass bei MMR-*knockout* Mäusen eher eine MSI-L zu beobachten ist, im Vergleich zu MSI-H beim Menschen. Dies kann eventuell durch weniger sensitive murine *Dinukleotid*-MSI-Marker zu erklären sein, welche häufig eingesetzt werden [277]. Die Nutzung einer Kombination aus *Mono*- sowie *Dinukleotid*-MSI-Marker wird als sensitiver beschrieben [279], da *Mononukleotid*-Wiederholungen bei MSI unspezifischer sind [280]. Gerade CA_n *Primer* wie *D1Mit79* zeigten geringere Sensitivitäten [279]. Daher wurde in dieser Arbeit eine Kombination aus *Mono*- sowie *Dinukleotid*-MSI-Marker genutzt.

Wie im Abschnitt 5.3 dargestellt, traten unter den untersuchten kodierenden MSI-Marker vor allem bei *Kcnma1*, *Ercc5*, *Rfc3*, *Akt3*, *Clock* sowie *Il1f9* häufig Abweichungen vom Wildtyp auf. Hierbei ist es schwierig zu eruieren, welche der Mutationen zuerst auftraten und ob die Mutationsreihenfolge bedeutsam als Treiber für die Tumorgenese ist.

In neueren Ansätzen, bei denen mit *next generation DNA sequencing* gearbeitet wird, konnte gezeigt werden, dass dadurch die Sensitivität bei der Erkennung von MSI weiter steigt [53]. Mutationen in MSI *target*-Genen wie *Spen*, welche in Kontrolltumoren häufig auftraten, waren nach der Therapie nicht mehr nachweisbar. Dies könnte darauf hindeuten, dass entsprechende Klone durch die Therapie gezielt eliminiert wurden. Dies war häufiger bei der Kombinationstherapie zu beobachten. Bestimmte (aggressive) Sub-Klone könnten durch die Kombinationstherapie eliminiert worden sein und dadurch ebenfalls das bessere Überleben erklären.

6.5 WEITERE MÖGLICHE THERAPEUTISCHE ANGRIFFSPUNKTE

In einer bereits 2009 durchgeführten systematischen Metaanalyse mit 3.690 eingeschlossenen Patienten wurde geschlussfolgert, dass eine adjuvante Chemotherapie bei MSI-*H* keine Überlebensvorteile bietet und MSI-*H* folglich ein prädiktiver Marker für eine Chemoresistenz wäre [281]. Weiteren klinischen Studien zufolge sprechen MMR-D-assoziierte CRC schlechter auf eine 5-Fluorouracil (5-FU)-basierte Chemotherapie an als MMR-profiziente Tumoren [17]. Einer der Gründe hierfür könnte sein, dass die Tumor-Stammzellen durch Resistenzen oder molekulare Variationen nicht vollständig eliminiert werden [282]. Es wird berichtet, dass im murinen CRC Zellkulturmodell PD-L1 nach 5-FU Therapie hochreguliert wird, was zur Unwirksamkeit der andauernden 5-FU Therapie beitragen könnte. Es wird diskutiert, dass eine Blockade der PD-1/PD-L1 Interaktion diesem Effekt entgegenwirken könnte [113]. Eine Reihe von klinischen Studien wurden hierzu kürzlich durchgeführt [283–286]. Auch gibt es erste Ansätze zur Gabe von Tumorstammvakzinen, welche gut verträglich waren und zu einer steigenden Anzahl an zirkulierenden CTL und erhöhter Lebenserwartung führten [103,173]. Dies erscheint schlüssig durch die im Abschnitt 6.3 diskutierten Aspekte. Interessanterweise führte eine Phase III Zulassungsstudie zu Ipilimumab (anti-CTLA-4-AK) mit 676 Patienten zur Erkenntnis, dass eine Kombination von Ipilimumab mit einer Glykopeptid-100-Vakzine zu geringen aber signifikanten unerklärlichen Verschlechterungen der Krankheitskontrolle führte [287]. Auch wäre eine 5-FU Therapie zusammen mit einem ICI eine denkbare Option.

Es wurde in dieser Arbeit eine Gesamttumor-Vakzine eines *Mlh1*^{-/-} A7450 *Allografts* verwandt, was im Abschnitt 4.1.2 näher erläutert wurde. In einer parallelen Studie wurden zwei unterschiedliche Vakzine aus *Mlh1*^{-/-}-abgeleiteten Zelllinien eingesetzt und deren therapeutisches Potential *in vivo* eruiert. Die Zelllinie 328 wurde aus einem ultra-hypermultierten GIT mit aggressiver Wachstumscharakteristik etabliert. Die Zelllinie A7450 T1 M1 hingegen wurde nach *Allografting* des dazu gehörigen *Primarius* 7450 *ex vivo* etabliert. Im Rahmen dieser vergleichenden Analyse zeigte sich, dass Tumoren, die das 328 Vakzin enthielten, schneller progressiert waren, als Tumoren, die mit dem A7450 T1 M1 Lysat vakziniert wurden. Ersteres führte überdies zu einem signifikant verminderten medianen Überleben [176,276]. Parallel dazu wurde auch eine, dem hier verwendeten *Allograft* A7450 abgeleitete Zelllinie als Vakzin *in vivo* eingesetzt. Diese Zelllinie entstand aus einem hypermutierten GIT, mit jedoch deutlich geringerer Mutationslast (A7450: 39 Mutationen/Mb vs. 328: 943 Mutationen/Mb) [125]. Dies unterstreicht die Relevanz der Tumorantigenqualität gegenüber der reinen Quantität.

Die Nutzung von Zelllinien gegenüber *Allografts* zur Vakzine-Herstellung bietet verschiedene Vorteile: Zum einen dienen sie als unlimitierte Quelle für Neoantigene. Zum anderen ist eine standardisierte Herstellung der Vakzine im großen Maßstab gewährleistet und kostengünstig umsetzbar [276,288].

Es konnte gezeigt werden, dass nicht die Menge an Antigenen, sondern deren Immunogenität für die Immunreaktion von großer Bedeutung ist – wie bereits erwähnt [276]. Auch konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus ICI und *low-dose* Chemotherapie einen Überlebensvorteil brachte. Möglicherweise könnte eine *low-dose* Chemotherapie die Reaktivierung des Immunsystems gegen den *Mlh1*^{-/-} Tumor unterstützen.

Neben der in unserer Arbeit genutzten Gesamttumor-Vakzine, wäre eine Kombination oder ein Wechsel auf eine Peptid-basierte Vakzine denkbar. Ziel jeder Tumor-Vakzine ist u.a. die Proliferation und Aktivierung von T-Zellen, vor allem von CTL, welche die Tumorzellen spezifisch erkennen und eliminieren können. Peptid-basierte-DC-Vakzine sind bereits seit über 15 Jahren in der (prä)klinischen Forschung [289,290]. Ihnen wird eine wichtige Rolle in der Immuntherapie zugeschrieben. DC sind professionelle Antigen-präsentierende Zellen und besitzen folglich die Fähigkeit, Peptide wie Tumor-spezifische Antigene effizient dem Immunsystem zu präsentieren. Sie bieten die Möglichkeit Tumor-spezifische T-Zell-Immunantworten auszulösen. Dies geschieht über die Erkennung und Elimination von Peptid-basierten Antigenfragmenten in Tumorzellen [291]. Sie stellen ein breites Spektrum an (potentiell) immunologisch relevanten MHC-Klasse I/II-restringierten Antigenen zur Verfügung. Somit können sowohl CD4⁺, als auch CD8⁺-vermittelte T-Zellantworten initiiert bzw. präformiert werden. Supprimierte Immunantworten könnten verstärkt werden [292–297].

In bisherigen Studien wurde häufig das karzinoembryonale Antigen genutzt, um tumorassoziierte Antigen-spezifische CTL zu induzieren [298]. Leider ergaben sich - trotz vielversprechender Effekte im Tiermodell [299] - nur in einem kleinen Teil der behandelten Patienten klinische Verbesserungen [289,290]. Dies könnte eventuell auch an fehlenden oder nicht ausreichenden Adjuvantien liegen [300]. Neuere Ansätze mit personalisierten Peptiden sind erfolgversprechend [301,302]. In unserer Arbeitsgruppe wird auch erwogen, auf eine Peptid-basierte Vakzine umzusteigen. Ein Grund hierfür liegt in der Tatsache, dass der für unser angewandtes Gesamttumorlysate benötigte 7450-Klon endlich ist.

Es gibt auch präventive Ansätze von DC Vakzine beim murinen pankreatisch-duktalen Adenokarzinom. Hierbei wurden *ex vivo* allogene DC-Vorläuferzellen mit Tumorantigenen beladen. Dabei ergab sich klinisch ein verlängertes Überleben, geringeres Tumolvolumen, vermehrte Tumorzell-Apoptose und es waren vermehrt CD8⁺ T-Zellen nachweisbar [303]. Neu an diesem Ansatz war die *intraperitoneale* (*i.p.*) Applikation in höherer Dosierung mit präventiven Effekten, so dass eine adjuvante Therapie denkbar wäre. Leider gab es in der Studie keine Zytokin-Evaluation, auch fehlte ein direkter Vergleich der *i.p.* Applikation mit anderen Applikationsformen [303]. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass DC-Vakzine auf diesem Weg die abdominalen Lymphknoten besser erreichten und dadurch die Absorption der DC gesteigert werden konnte. Dies erscheint insbesondere bei großen Mengen an zu applizierenden DC vorteilhaft [304]. Folglich könnte in zukünftigen Versuchsansätzen eine Änderung bei der

Applikationsform möglicherweise zu verbesserten Ergebnissen führen. Einerseits könnte die *s.c.* Injektion durch eine *i.p.* Injektion ersetzt werden. Andererseits wäre auch eine *intratumorale* (*i.t.*) Applikation denkbar [305–309]. Diese stellt jedoch aufgrund der anatomischen Lage des Darms eine besondere Herausforderung dar und ist daher eher bei oberflächlich lokalisierten Tumoren, wie dem malignen Melanom vorstellbar. In den bislang durchgeführten Studien konnte die Sicherheit und Wirksamkeit durch Steigerung von spezifischen Zytokinen und T-Zellen, sowie eine Überlebenssteigerung infolge *i.t.* Injektion gezeigt werden [306,309].

Mittlerweile befinden sich ICI im Zentrum der Forschung, eine Kombination aus beiden Ansätzen erscheint sinnvoll [310]. In einer 2019 in *Oncoimmunology* [311] veröffentlichten Studie wurde eine Dreifachtherapie von anti-PD-L1, anti-OX40 (CD134) AK [312] und GVAX™ im murinen Glioblastommodell untersucht. Für eine bessere Standardisierung der Vakzine und um Schwierigkeiten bei der Etablierung einer Primärkultur autologer Tumorzellen für die Transduktion zu umgehen, wurden autologe Tumorzellen durch allogene Karzinomzellen einer Zelllinie genutzt. GVAX™ ist ein Vertreter dieses Ansatzes, es besteht aus Gesamttumorslysate. Hierbei werden bestrahlte allogene Tumorzelllinien durch eine virale Transfektion genetisch so modifiziert, dass sie Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktoren sezernieren. Durch eine folgende *Radiatio* wird eine unkontrollierte Zellteilung unterbunden. Dieser Ansatz führte zu signifikanten Therapieerfolgen mit Langzeitheilung aller Versuchstiere der Therapiegruppe [311]. Glioblastome unterscheiden sich in vielen Punkten vom *CRC*, u.a. in einer niedrigen *TMB* und Immunogenität. Benefizielle Effekte einer Kombinationstherapie sind allerdings bei der Behandlung eines *CRC* vorstellbar, wie im Abschnitt 6.3 diskutiert.

Eine Kombinationstherapie von monoklonalen anti-CTLA-4-AK mit anti-PD-1-AK bei humanen Melanomen führte zu signifikanten klinischen Verbesserungen [313]. Es wird angenommen, dass gleichartig auf die T-Zell-Aktivierung wirkende Agenzien synergistisch wirksam sein können [311]. Ebenso führte die Kombinationstherapie von anti-CTLA-4-AK mit anti-PD-1-AK beim epithelialen Ovarialkarzinom zu einer verbesserten Ansprechrate. Die progressionsfreie Überlebenszeit konnte ebenfalls verlängert werden [314]. In weiteren klinischen Studien zeigte sich ein gutes Ansprechen einer Kombinationstherapie [313,315,316]. Weiterhin gibt es Überlegungen, inwieweit eine Kombinationstherapie als Induktionstherapie stattfinden könnte und dann mit einer besser verträglichen Monotherapie mit anti-PD-1-AK fortgeführt wird [314]. Leider wurden bei Kombinationstherapien vermehrt schwere Nebenwirkungen festgestellt, insbesondere Erhöhung von Pankreasenzymen. Dies zeigte sich auch in einer klinischen Studie mit 119 Fällen von *MSI-H CRC*, hier traten bei 32 % der Patienten schwere Nebenwirkungen auf [317]. Zugleich war der Effekt nicht langanhaltend.

Bei unserem Ansatz der Kombination mit der Vakzine haben wir teilweise ein Langzeitüberleben erzielt, toxische Nebenwirkungen wurden nicht beobachtet.

Darüber hinaus gibt es Ansätze, *DC* mit Tumorzell-assoziierten Antigenen zu beladen und somit gleichzeitig mittels einer Vielzahl an tumorassoziierten Antigenen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellantworten zu initiieren [318]. Dies wäre zumindest theoretisch effektiver als eine Peptid-basierte-*DC*-Vakzine. Die Vakzinierung mit vollständigen attenuierten Tumorzellen hat den Vorteil, dass nicht Einzelantigene, sondern das gesamte antigene *Repertoire* einer Zelle als Immunstimulanz eingesetzt wird.

Neuere Forschungen zu *DNA*-Vakzine bei *CRC* in Phase I Studien zeigten nur wenige Nebenwirkungen [319]. Bei einer *DNA*-Vakzine wird ein Plasmid mit einem modifizierten karzi-noembryonalen Gen eingebracht. Dies zeigt eine starke immunstimulierende Wirkung. Vor allem *CTL* werden dabei stärker stimuliert als durch Vakzine aus Gesamttumorlysate oder Peptiden [320,321].

Bei der von uns genutzten Kombinationstherapie zeigte sich eine mögliche immunstimulierende Wirkung, u.a. durch verstärkte Tumordinfiltration von *CTL* im Vergleich zur reinen anti-PD-L1-Therapie. Vor diesem Hintergrund werden zunehmend Kombinationsstrategien (prä-)klinisch evaluiert. Ein wesentlicher Vorteil dieser Form der Immuntherapie ist deren sichere und vergleichsweise nebenwirkungsarme Anwendbarkeit. Daraus ergeben sich verschiedene Möglichkeiten für den Einsatz multimodaler Therapiekonzepte, wie z.B. die Kombination mit niedrig-dosierter Chemotherapie. Die Rationale hierfür basiert auf der Beobachtung, dass bestimmte zytostatisch wirkende Substanzen, wie z.B. das Nukleosidanalogen Gemcitabin positive Effekte haben. Durch Induktion von immunogenem Zelltod kann sowohl eine Th1-Polarisation unterstützt werden, als auch direkt die Immunogenität von Tumorzellen durch verstärkte Antigenpräsentation und Interaktion mit PD1/PD-L1 erhöht werden [103–105,322]. Darüber hinaus gibt es Hinweise auf einen ähnlichen Wirkmechanismus bei dem Einsatz sogenannter *Cyclin*-abhängiger Kinase-Inhibitoren (*Cyclin-dependent Kinase inhibitor*; *CDKi*). Diese wurden ursprünglich als antineoplastisch wirkende Zellzyklusregulatoren entwickelt [322–324]. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass der selektive *CDKi* 4/6 Abemaciclib, sowie der Pan-*CDKi* Dinaciclib das Tumormikromilieu durch gezielte T-Zellaktivierung moduliert. Diese Effekte wurden durch die Kombination mit einem anti-PD-L1-AK verstärkt [322,325]. Diese Beobachtung eröffnet einen ganz neuen Ansatz in der Immuntherapie – insbesondere für Tumoren, welche nur bedingt auf eine alleinige ICI ansprechen.

Nach neueren Studien gibt es Anhaltspunkte dafür, dass Abemaciclib eine verstärkte T-Zell Aktivierung und verstärkte Antigenpräsentation von Tumorzellen bewirkt [105,326]. Dieser Ansatz der Kombination mit *CDKi* könnte in folgenden Untersuchungen in Erwägung gezogen werden.

Weiterhin gibt es Zytokin-basierte Therapieansätze, welche auf die Steigerung der Proliferationsrate sowie der Überlebenszeit von Effektor-T-Zellen zielen. Erste Ansätze umfassten Hochdosis-IL2 Gaben mit etwa 15 – 20 % Ansprechrate [327,328]. Diese Ansätze wurden

weiter verbessert durch eine Kombinationstherapie mit Peptid-basierter Vakzine [329,330]. Dabei limitierten allerdings die Nebenwirkungen wie vaskuläre *Leakage* oder Hypotension die Therapie. Durch die Hochdosis-IL2 Therapie waren auch potentiell suppressiv-wirkende CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ T_{reg} im Tumor vermehrt, was die limitierte Wirkung der Therapie erklären könnte [331,332]. Es konnte in weiteren Studien mit murinen Kombinationstherapien gezeigt werden, dass eine Kombination aus Zytokin-basierten Therapieansätzen mit Vakzine und anti-PD-L1 Gabe im CRC-Tumormodell synergistisch wirken. Dabei konnte keine dosisabhängige Toxizität nachgewiesen werden [332], was im folgenden Abschnitt 6.6 weiter diskutiert wird. Die vielfältigen im Abschnitt 6.3 diskutierten Aspekte und Effekte infolge der von uns durchgeführten Kombinationstherapie fügen sich konkordant zu diesen positiven Studienergebnissen.

In einer kürzlich publizierten Arbeit wurde gezeigt, dass nur rund zehn Prozent der Tumor-infiltrierenden CD8⁺ CTL in humanen Tumoren (u.a. mit MSS CRC) tatsächlich tumorreaktiv sind [333]. Bei zwei von vier Patienten konnten trotz T-Zell-Infiltration keine Reaktivitäten nachgewiesen werden. Dies verdeutlicht, dass die intrinsische T-Zell-Antwort sehr variabel sein kann und abhängig vom T-Zell-Rezeptor-*Repertoire* ist [333]. Möglicherweise fehlte die T-Zell-Antwort, da sich das Antigen veränderte oder ein *MHC*-Allel fehlte, was bei drei von vier Tumoren nachweisbar war. Dies könnte kausal für das Therapieversagen einer anti-PD-L1 Therapie sein, daher wäre eine Wiederholung solcher Studien mit größeren Kohorten wünschenswert. Es könnte von entscheidender Bedeutung sein, die Variabilität der T-Zell-Rezeptoren zu steigern, um das klinische Ergebnis einer entsprechenden Therapie zu verbessern. In unserer Studie waren CD8⁺ CTL vor allem bei alleiniger Vakzine-Gabe und unter Kombinationstherapie erhöht. In unserer Untersuchung wurde nicht explizit die Reaktivität der T-Zellen untersucht. Eine Inklusion dieses Aspektes ist für folgende Studien ebenfalls wünschenswert. Die ICI Therapie besitzt, wie im folgenden Abschnitt näher erläutert, ein hohes Nebenwirkungspotential, demgegenüber wird nicht bei allen Patienten ein Behandlungsvorteil erzielt [212] und es werden hohe Kosten verursacht. Weiterhin gibt es Ansätze einer Kombinations-Vakzine, welche sowohl eine PD-L1-Domäne als auch nitrierte T-Zell-Epitope trägt [334]. Diese Studie stellte dabei auch antitumorale Effekte fest [334]. Weiterhin gab es eine verstärkte Lymphozyteninfiltration und eine verminderte Anzahl an T_{reg} im Tumor, auch war eine Hochregulation von PD-L1 im Tumorgewebe feststellbar [334]. Dies könnte eine weitere Behandlungsoption für Patienten darstellen, bei welchen eine ICI Therapie nicht wirksam ist. Hypomethylierende Agenzien kamen bisher experimentell bei der Behandlung von myeloiden Tumorentitäten und in ersten Ansätzen auch bei der Behandlung von soliden Tumoren zum Einsatz [335]. Dabei konnte das *MLH1 Silencing* aufgehoben und Tumor-supprimierende Gene reaktiviert werden [336–339]. Es wird angenommen, dass neben der *DNA* Hypomethylierung auch die Hypomethylierung von repressiven Histonen in den Promotor-Bereichen bei

der Immuncheckpoint-Expression bedeutsam sein können. Folglich wären sie als diagnostischer Biomarker für CRC denkbar [340,341]. Hypomethylierende Agenzien sind *Cytidin*-Analoge, welche die Funktion der *DNA*-Methyltransferase I einschränken. Dies führt zur passiven Demethylierung bei sich teilenden Zellen und zur Re-Expression von bedeutsamen Genen [342]. Eine Niedrigdosis-Therapie kann nachhaltige Veränderungen der Genexpression bewirken. Sie ist vergesellschaftet mit einer verringerten Tumorigenität und dauerhaften Verringerung von genomweiten Promotor-*DNA*-Methylierungen bei Mäusen. Eine breite therapeutische Anwendung lässt sich somit erahnen [336,343]. Diese Therapie scheint auch Tumorzell-Subpopulationen als Ziel zu adressieren, welche durch herkömmliche Therapieansätze oft schwer zu therapieren sind. Jene Tumorzell-Subpopulationen, sogenannte Tumor-initiiierende Zellen, stehen im Verdacht, für eine anhaltende Tumorerneuerung verantwortlich zu sein [344–347]. Demgegenüber treten bei höheren Dosen zügig *DNA*-Schäden, toxische Effekte und Zellzyklus-Arreste auf [343]. Dies wäre ein weiterer denkbarer Behandlungsansatz. Allerdings gibt es auch Berichte über Resistenzentwicklungen gegenüber hypomethylierender Agenzien, was mit einer rapiden klinischen Verschlechterung vergesellschaftet ist [348,349]. Als Grund hierfür käme eine insuffiziente Medikamentenaufnahme durch veränderten Membrantransport, Enzymstörungen durch fehlende Kinasen oder ein verstärkter Abbau durch Desaminasen in Betracht. Diese Mechanismen könnten das Therapieversagen *in vitro* erklären [350], als Erklärung *in vivo* konnten sie noch nicht validiert werden [351]. Erste Studien belegen, dass auch Vincristin, welches als Chemotherapeutikum bereits bei der Behandlung des CRC genutzt wird, ähnliche demethylierende Wirkungen aufweist [352].

6.6 MÖGLICHE TOXIZITÄT BEI DER KOMBINATIONSTHERAPIE

Durch die vergleichsweise niedrige Dosis und geringe Anzahl der Applikationen erwarteten und sahen wir ein geringes Nebenwirkungsprofil unserer ICI Therapie. Es ist bekannt, dass Leberveränderungen und -funktionsstörungen eine häufige Nebenwirkung bei der Therapie von ICI sind [353]. Auch ist belegt, dass die Zahl der CD8⁺ Zellen positiv mit Schäden am Leberparenchym korreliert [353]. Unter unserer Therapie war die Anzahl an CD8⁺ Zellen im GIT signifikant erhöht, was einen additiven Effekt bei der Leberschädigung darstellen könnte. Es wird derzeit vermutet, dass diese durch die Immunreaktion-vermittelte Leberschädigung von den bereits bekannten Medikamenten-induzierten Leberschädigungen zu unterscheiden ist. In der murinen Leber tragen Hepatozyten, hepatische Adipozyten, sinusoidale Epithelzellen sowie Kupffer-Zellen PD-L1-Rezeptoren und wären somit die adressierten Ziele [353]. Die Kombination von verschiedenen ICI verstärkte in mehreren Studien diese Effekte, deren Ursache aktuell unbekannt ist, eine Potenzierung der einzelnen Effekte wird aber vermutet [353]. Weitere Studien zeigten eine hepatische Komplikationsrate im Bereich zwischen drei und

acht Prozent bei Gabe von ICI [354,355]. Beispielhaft führte die Kombination von Ipilimumab, einem CTLA-4 Inhibitor, mit dem Indolamin-2,3-Dioxygenase 1-Inhibitor Epacadostat zur signifikanten Zunahme der Leberschädigung [353]. Ähnliches wurde in klinischen Studien berichtet, als CTLA-4 Inhibitoren zusammen mit PD-1 Inhibitoren gegeben wurden [313]. In einer Übersichtsarbeit kam es in fünf Prozent der Fälle bei anti-PD-L1 Monotherapie und in 18 % bei anti-PD-L1/CTLA-4 Kombinationstherapie zu schweren Nebenwirkungen wie abnormen Enzymwerten [356].

Ein therapeutisches *drug management* könnte über mögliche toxische Medikamentenkonzentrationen Aussagen geben. Ein solches wurde in unserem Therapieansatz nicht implementiert, wäre aber eine Option. Auch Leberfunktions- und Enzymkontrollen können angezeigt sein, da über Erhöhungen verschiedener Enzyme wie der Aspartat-Aminotransferase / Alanin-Aminotransferase sowie Blutwerte wie Bilirubin berichtet wird [353]. Zudem wurde beschrieben, dass durch ICI Therapie Gene verstärkt exprimiert werden, welche mit einer Hepatozyten-Apoptose assoziiert sind [353]. Eine dahingehende spezielle Analyse könnte auch hierüber Anhaltspunkte liefern. In einer folgenden Studie wäre es denkbar, die ICI und Vakzine in verschiedenen Dosen zu geben und dabei die Plasmaspiegel der Arzneistoffe und Leberenzyme zu überwachen.

Im Rahmen der vorliegenden Studie konnten klinisch keine eindeutigen toxischen Effekte beobachtet werden. Allenfalls wurde an einzelnen Tieren beobachtet, dass sich die Nieren in normaler Größe aber in bräunlich-schwärzlichen Verfärbungen präsentierten. Eine histologische Untersuchung der Nieren bzw. Leber der Tiere wäre ebenso wie die o.g. Blutuntersuchungen auf Leber-, Nieren- sowie Entzündungsparameter desiderabel. Es liegt eine großangelegte *big-data* Analyse von 3.290 zugelassenen Medikamenten und Formulierungen mit über einer Million gemeldeten schweren Komplikationen in den letzten 70 Jahren vor. Dort wurde im automatisierten Vergleich zwischen Menschen und u.a. Mäusen ein generelles Übereinstimmen der Vorhersagen hinsichtlich der Toxizität bestätigt [357]. In einer weiteren Studie mit geringerem Datenumfang konnte die Konkordanz der Toxizität zwischen Nagetieren und Menschen lediglich mit 43 % quantifiziert werden [358]. Möglicherweise beruht dies auf physiologischen sowie biochemischen Unterschieden zwischen den Spezies. Insbesondere Unterschiede bei Liberation, Absorption, Distribution, Metabolismus und Exkretion können hierfür verantwortlich sein [358,359].

In einer Metaanalyse, welche 21 klinische Studien umfasste, konnte festgestellt werden, dass ICI unabhängig vom Probandenalter gut verträglich waren. Es konnten aber Unterschiede in deren Wirksamkeit im Sinne von *(Non)Respondern* gezeigt werden [360]. Demnach waren rund 25 % der Probanden bei klinischen Krebs-assoziierten Studien ältere Menschen über 65 Jahren [361]. 61 % der neuauftretenden Krebsfällen betrafen aber die über 65-Jährigen [361]. Ausschlusskriterien zur Studienteilnahme wie Organfunktionsstörungen sind mögliche

Ursachen [358,359,362]. Dieser Aspekt betrifft unsere Arbeit insofern, als dass unsere Mäuse bei Tumorgenese mit etwa neun Lebensmonaten schon älter waren. Dabei ist bekannt, dass mit steigendem Alter die Immunantwort, welche durch die Gabe von ICI induziert wird, abgeschwächt ist [360].

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Dissertationsschrift die grundsätzliche Wirksamkeit der Vakzine-Monotherapie bestätigt und deren bessere Wirksamkeit in Kombination mit dem anti-PD-L1-AK bei guter Verträglichkeit aufgezeigt werden. Die Beobachtung, dass bei 30 % der Tiere, welche die Kombinationstherapie erhielten, eine komplette Remission erzielt wurde, ist vielversprechend. Dies ist eine solide Basis für weiterführende Untersuchungen, um den kombinierten Ansatz weiter zu verbessern.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Das kolorektale Karzinom ist in vielen Ländern die zweit- oder dritthäufigste Tumorentität mit über einer Million Patienten weltweit. Es hat sich gezeigt, dass etwa 15 – 20 % der *early-onset* Fälle aufgrund von *Mismatch*-Reparatur Defizienz (MMR-D) entstehen, womit auch das autosomal dominant vererbte Lynch Syndrom assoziiert ist. Kausal-molekular für die Entstehung Lynch-assoziiierter Tumoren sind Keimbahnmutationen in *DNA-Mismatch*-Reparaturgenen wie z.B. *MutL homolog 1 (MLH1)*, welche zu einer Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) führen. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit ein etabliertes murines präklinisches Modell der spontanen MMR-D-assoziierten Tumorgenese (*Mlh1*^{-/-} *gene knockout* Mäuse) eingesetzt und daran die Wirksamkeit einer kombinierten Immuncheckpoint-Vakzine-Therapie eruiert. Dieser Ansatz basiert auf Vorarbeiten der Arbeitsgruppe, in denen bereits gezeigt werden konnte, dass die alleinige, repetitive Gabe einer Tumorstelle (aus Lysat eines *Mlh1*^{-/-} gastrointestinalen Tumors) das Gesamtüberleben von *Mlh1*^{-/-} Mäusen signifikant gegenüber Kontrolltieren verlängert. Ausgehend von diesen Befunden wurde der Vakzine-basierte therapeutische Ansatz um die Gabe des Immuncheckpoint-Inhibitors Atezolizumab (anti-PD-L1 Antikörper, dreimalige *i.v.* Gabe im Abstand von zwei Wochen) erweitert.

Die Mäuse wurden nach Bestätigung einer Tumorgenese durch eine ¹⁸F-FDG-PET / CT Untersuchung randomisiert und entsprechend therapiert. Eine engmaschige Verlaufskontrolle der Tiere wurde mittels Durchflusszytometrie aus peripherem Blut zur Bestimmung des Immunstatus und mittels ¹⁸F-FDG-PET / CT zur approximativen Bestimmung der Tumormassentwicklung durchgeführt. Am Versuchsende wurde den Tieren die Milz, der gastrointestinale Tumor sowie auffällige Lymphknoten entnommen. Aus dem Tumorgewebe wurde einerseits die *gDNA* isoliert und daraus mittels Fragmentlängenanalyse von Genen, welche anhand von Vorversuchen als vielversprechende Marker identifiziert wurden, die MSI bestimmt. Andererseits wurden die Gewebezellen zur Endpunktbestimmung einer durchflusszytometrischen Analyse unterworfen. Zudem wurde das Tumorgewebe kryokonserviert, um das Tumormikromilieu zu erfassen.

Sowohl die Monotherapie mit dem anti-PD-L1-AK und der Vakzine, als auch die Kombinationstherapie führten zur signifikanten Reduktion der Tumormasse und damit einhergehend signifikanten Überlebenszeitverlängerung. Das mediane Gesamtüberleben konnte von vier Wochen bei der Kontrollgruppe auf neun bzw. elf Wochen durch die Monotherapie mit dem anti-PD-L1 Antikörper bzw. der Vakzine gesteigert werden. Bei der kombinierten Vakzine-Immuncheckpoint-Therapie, betrug das Gesamtüberleben im Median 19 Wochen. Bei 30 % der Tiere kam es zur kompletten Tumorremission und damit auch zum Langzeitüberleben (>25 Wochen). Die therapeutischen Effekte waren auch auf immunologischer Ebene nachweisbar. Insbesondere nach der Kombinationstherapie wurden in der Milz weniger myeloide

Suppressorzellen, aber auch signifikante Reduktionen der LAG-3⁺ sowie CTLA-4⁺ Zellen erfasst. Im Tumorgewebe ließ sich ein signifikanter Anstieg der CTL sowie CTLA-4⁺ Zellen feststellen. Die TIM-3⁺ Zellen, sowie myeloide Suppressorzellen, tumorassoziierte Makrophagen und PD-L1⁺ Zellen waren deutlich reduziert. Dies lässt auf eine erfolgreiche Induktion adaptiver immunologischer Prozesse schließen.

Im Rahmen der weiterführenden Untersuchungen wurden relevante kodierende MSI-Marker identifiziert, welche zur Analyse der MSI herangezogen werden. Als häufig mutierte Zielgene mit Relevanz für die Onkogenese muriner *Mlh1*-assoziierter Tumoren konnten *Kcnma1*, *Ercc5*, *Rfc3* sowie *Akt3* identifiziert werden. Darüber hinaus wurden signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Therapieschemata festgestellt. Auch waren einige Mutationen im Vergleich zur Kontrollgruppe nach Therapie nicht mehr detektierbar, was auf eine erfolgreiche Elimination jener mutierter Tumorzellklone hindeutet.

Bei einzelnen Tieren im Versuch kam es zu makroskopisch-anatomischen Veränderungen des Leber- und Nierenparenchyms, welche auch in der Literatur beschrieben worden sind bzw. aktuell beforscht werden und als Nebenwirkungen gewertet werden können. Die weitere Untersuchung dieses Aspektes, die Verwendung von weiteren Vakzinen sowie die Kombination mit weiteren Therapeutika wie z.B. einer niedrigdosierten Chemotherapie kann als Ansatz für eine weitergehende Forschung gesehen werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Kombinationstherapie, bestehend aus repetitiver Vakzine-Gabe und dreimaliger Gabe von anti-PD-L1-Antikörper, zu einer signifikanten Reduktion der Tumorgröße, zu einer signifikanten Lebensverlängerung sowie zu immunologischen Veränderungen des Tumormikromilieus führt.

VIII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: WELTWEITE INZIDENZ VON CRC, 2018. (QUELLE: [1])	6
ABBILDUNG 2: GENESE VON CRC. (ADAPTIERT NACH: [22])	7
ABBILDUNG 3: BEDEUTUNG DES MMR-SYSTEMS BEI DER GENESE MMR-D-ASSOZIIERTER TUMOREN IN ABHÄNGIGKEIT DER VORLIEGENDEN MONO- ODER BIALLELISCHEN KEIMBAHNMUTATIONEN. (QUELLE: EIGENE ERSTELLUNG)	10
ABBILDUNG 4: PD-1/PD-L1-INTERAKTION ALS IMMUNESCAPE-MECHANISMUS. (QUELLE: [84]) .	14
ABBILDUNG 5: ÄTIOLOGIE UND MÖGLICHE BEHANDLUNGSKONZEPTE BEI MMR-D-ASSOZIIERTEN TUMOREN. (QUELLE: EIGENE ERSTELLUNG).....	15
ABBILDUNG 6: HERSTELLUNGSABLAUF DER VAKZINE. (QUELLE: EIGENE ERSTELLUNG)	27
ABBILDUNG 7: DARSTELLUNG DES VERSUCHSABLAUFS. (QUELLE: EIGENE ERSTELLUNG).....	30
ABBILDUNG 8: ABLAUF DES GENUTZTEN PCR-SCHEMAS. (QUELLE: EIGENE ERSTELLUNG).....	34
ABBILDUNG 9: AUFBAU DES VERWENDETEN ABI PRISM™ 3500. (QUELLE: EIGENE ERSTELLUNG)	36
ABBILDUNG 10: AUFBAU EINES KONFOKALEN LASER-SCANNING-MIKROSKOPS. (QUELLE: DIETZEL65, WIKIMEDIA.ORG, CREATIVE COMMONS 3.0 CC-BY LIZENZ).....	38
ABBILDUNG 11: AUFBAU EINER PHOTOMULTIPLIERTER-EINHEIT. (QUELLE: JAN KRIEGER, PUBLIC DOMAIN)	39
ABBILDUNG 12: ABLAUF DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE. (QUELLE: EIGENE ERSTELLUNG).....	41
ABBILDUNG 13: KAPLAN-MEIER-ÜBERLEBENSKURVE (LOG-RANK-ANALYSE) AUSGEWÄHLTER THERAPIEGRUPPEN (EINMALIGE AK-INTERVENTION). (QUELLE: EIGENE ERSTELLUNG).....	44
ABBILDUNG 14: KAPLAN-MEIER-ÜBERLEBENSKURVE (LOG-RANK-ANALYSE) AUSGEWÄHLTER THERAPIEGRUPPEN (DREIMALIGE AK-INTERVENTION). (QUELLE: EIGENE ERSTELLUNG).....	45
ABBILDUNG 15: TUMORGRÖßENENTWICKLUNG BEI MLH1 ^{-/-} MÄUSEN IM PET / CT. (QUELLE: EIGENE ERSTELLUNG)	46
ABBILDUNG 16: KORONARE ANSICHTEN INVERTIERTER PET / CT FUSIONSDARSTELLUNGEN. (QUELLE: EIGENE ERSTELLUNG)	47
ABBILDUNG 17: KORONARE ANSICHTEN VERSCHIEDENER SCHNITTEBENEN INVERTIERTER PET / CT FUSIONSDARSTELLUNGEN IM ZEITLICHEN VERLAUF EINER MLH1 ^{-/-} MAUS, WELCHE MIT DER KOMBINATIONSTHERAPIE BEHANDELT WURDE. (QUELLE: EIGENE ERSTELLUNG).....	47
ABBILDUNG 18: ELEKTROPHEROGRAMM VON FRAMESHIFT-MUTATIONEN REPRÄSENTATIVER MARKER IN NICHT-KODIERENDEN GENABSCHNITTEN. (QUELLE: EIGENE ERSTELLUNG).....	48

ABBILDUNG 19: ELEKTROPHEROGRAMM VON FRAMESHIFT-MUTATIONEN REPRÄSENTATIVER MARKER IN KODIERENDEN GENABSCHNITTEN. (QUELLE: EIGENE ERSTELLUNG) .	49
ABBILDUNG 20: ABSOLUTE MUTATIONSFREQUENZ IN NCMS UND CMS GENABSCHNITTEN. (QUELLE: EIGENE ERSTELLUNG)	49
ABBILDUNG 21: DARSTELLUNG DER RELATIVEN MUTATIONSFREQUENZ IN KODIERENDEN GENABSCHNITTEN EXEMPLARISCH AUSGEWÄHLTER MURINER GENE. (QUELLE: EIGENE ERSTELLUNG)	50
ABBILDUNG 22: FLUORESCENZMIKROSKOPIE MITTELS EINES KONFOKALEN LASER-SCANNING-MIKROSKOPS VON GIT-PRÄPARATEN AUS MLH1 ^{-/-} MÄUSEN. (QUELLE: EIGENE ERSTELLUNG).....	51
ABBILDUNG 23: QUANTITATIVE ANALYSE DES ANTEILS TUMOR-INFILTRIERENDER ZELLEN MITTELS EINES KONFOKALEN LASER-SCANNING-MIKROSKOPS. (QUELLE: EIGENE ERSTELLUNG).....	52
ABBILDUNG 24: DARSTELLUNG IMMUNOLOGISCHER PARAMETER IM PERIPHEREN BLUT DER JEWEILIGEN THERAPIEGRUPPEN VON MLH1 ^{-/-} MÄUSEN. (QUELLE: EIGENE ERSTELLUNG).....	53
ABBILDUNG 25: DARSTELLUNG IMMUNOLOGISCHER PARAMETER DER MILZ UND DES GIT VON MLH1 ^{-/-} MÄUSEN. (QUELLE: EIGENE ERSTELLUNG)	54
ABBILDUNG 26: MMR-GENMUTATIONSRATE NACH TUMORHISTOLOGIE UND TUMORGENEN SORTIERT. (QUELLE: [178])	58
ABBILDUNG 27: DARSTELLUNG MÖGLICHER EINFLUSSFAKTOREN DES MIKROBIOMS AUF CRC. (QUELLE: [196]).....	60

IX. TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1:	DEFINITION VON MSS SOWIE MSI IN CRC ANHAND DES BETHESDA PANELS.....	9
TABELLE 2:	LEBENSZEITRISIKO UND TUMORSPEKTRUM BEI PATIENTEN MIT LYNCH SYNDROM.	10
TABELLE 3:	ANGEWANDTE THERAPIEGRUPPEN DER UNTERSUCHUNG.....	31
TABELLE 4:	REAKTIONSANSATZ FÜR DIE PCR PRO REAGENZ.	34
TABELLE 5:	ABLAUF DER PCR-REAKTION.....	34
TABELLE 6:	IMMUNFLUORESCENZ-FÄRBEANSÄTZE FÜR DIE KONFOKALE LASER-SCANNING- MIKROSKOPIE.	39
TABELLE 7:	FÄRBEANSÄTZE FÜR DIE DURCHFLUSSZYTOMETRIE.....	41

X. Literaturverzeichnis

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I et al (2018) Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur J Cancer* 103: 356–387
 2. Torre L A, Bray F, Siegel R L et al (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65(2): 87–108
 3. Zheng Z-X, Zheng R-S, Zhang S-W et al (2014) Colorectal cancer incidence and mortality in China, 2010. *Asian Pac J Cancer Prev* 15(19): 8455–8460
 4. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I et al (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68(6): 394–424
 5. Vano Y-A, Rodrigues M-J, Schneider S-M (2009) Lien épidémiologique entre comportement alimentaire et cancer: exemple du cancer colorectal. *Bull Cancer* 96(6): 647–658
 6. Lucas C, Barnich N, Nguyen H T T (2017) Microbiota, Inflammation and Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 18(6)
 7. Brenner H, Kloor M, Pox C P (2014) Colorectal cancer. *The Lancet* 383(9927): 1490–1502
 8. Kamangar F, Dores G M, Anderson W F (2006) Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol* 24(14): 2137–2150
 9. Arnold M, Sierra M S, Laversanne M et al (2017) Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* 66(4): 683–691
 10. Murphy C C, Sandler R S, Sanoff H K et al (2017) Decrease in Incidence of Colorectal Cancer Among Individuals 50 Years or Older After Recommendations for Population-based Screening. *Clin Gastroenterol Hepatol* 15(6): 903-909.e6
 11. Siegel R L, Fedewa S A, Anderson W F et al (2017) Colorectal Cancer Incidence Patterns in the United States, 1974-2013. *J Natl Cancer Inst* 109(8)
 12. Siegel R L, Miller K D, Fedewa S A et al (2017) Colorectal cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 67(3): 177–193
 13. Hagggar F A, Boushey R P (2009) Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal Surg* 22(4): 191–197
 14. Siegel R L, Miller K D, Jemal A (2017) Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 67(1): 7–30
 15. Patel S G, Ahnen D J (2018) Colorectal Cancer in the Young. *Curr Gastroenterol Rep* 20(4): 15
 16. Strum W B, Boland C R (2019) Clinical and Genetic Characteristics of Colorectal Cancer in Persons under 50 Years of Age: A Review. *Dig Dis Sci* 64(11): 3059–3065
 17. Gelsomino F, Barbolini M, Spallanzani A et al (2016) The evolving role of microsatellite instability in colorectal cancer: A review. *Cancer Treat Rev* 51: 19–26
 18. Goldstein J, Tran B, Ensor J et al (2014) Multicenter retrospective analysis of metastatic colorectal cancer (CRC) with high-level microsatellite instability (MSI-H). *Ann Oncol* 25(5): 1032–1038
 19. Koopman M, Kortman G A M, Mekenkamp L et al (2009) Deficient mismatch repair system in patients with sporadic advanced colorectal cancer. *Br J Cancer* 100(2): 266–273
 20. Chen F W, Sundaram V, Chew T A et al (2017) Advanced-Stage Colorectal Cancer in Persons Younger Than 50 Years Not Associated With Longer Duration of Symptoms or Time to Diagnosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 15(5): 728-737.e3
 21. Deschoolmeester V, Baay M, Specenier P et al (2010) A Review of the Most Promising Biomarkers in Colorectal Cancer: One Step Closer to Targeted Therapy. *Oncologist*
-

- 15(7): 699–731
22. Jass J R (2006) Colorectal cancer: a multipathway disease. *Crit Rev Oncog* 12(3-4): 273–287
 23. Michor F, Iwasa Y, Lengauer C et al (2005) Dynamics of colorectal cancer. *Semin Cancer Biol* 15(6): 484–493
 24. (2012) Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487(7407): 330–337
 25. Ionov Y, Peinado M A, Malkhosyan S et al (1993) Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 363(6429): 558–561
 26. Fearon E R, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61(5): 759–767
 27. Jass J R (2007) Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 50(1): 113–130
 28. Bacher J W, Sievers C K, Albrecht D M et al (2015) Improved Detection of Microsatellite Instability in Early Colorectal Lesions. *PLoS ONE* 10(8): e0132727
 29. Boland C R, Thibodeau S N, Hamilton S R et al (1998) 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* 58(22): 5248–5257
 30. Pawlik T M, Raut C P, Rodriguez-Bigas M A (2004) Colorectal carcinogenesis: MSI-H versus MSI-L. *Dis Markers* 20(4-5): 199–206
 31. Raut C P, Pawlik T M, Rodriguez-Bigas M A (2004) Clinicopathologic features in colorectal cancer patients with microsatellite instability. *Mutat Res* 568(2): 275–282
 32. Coelho H, Jones-Hughes T, Snowsill T et al (2017) A systematic review of test accuracy studies evaluating molecular micro-satellite instability testing for the detection of individuals with lynch syndrome. *BMC Cancer* 17(1): 836
 33. Pan X-M, Yang W-Z, Xu G-H et al (2011) The association between MLH1 -93 GA polymorphism of DNA mismatch repair and cancer susceptibility: a meta-analysis. *Mutagenesis* 26(5): 667–673
 34. Sameer A S, Nissar S, Fatima K (2014) Mismatch repair pathway: molecules, functions, and role in colorectal carcinogenesis. *Eur J Cancer Prev* 23(4): 246–257
 35. Andersen P L, Xu F, Xiao W (2008) Eukaryotic DNA damage tolerance and translesion synthesis through covalent modifications of PCNA. *Cell Res* 18(1): 162–173
 36. Myung K, Datta A, Chen C et al (2001) SGS1, the *Saccharomyces cerevisiae* homologue of BLM and WRN, suppresses genome instability and homeologous recombination. *Nat Genet* 27(1): 113–116
 37. Stojic L, Brun R, Jiricny J (2004) Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA Repair (Amst)* 3(8-9): 1091–1101
 38. Brown K D, Rathi A, Kamath R et al (2003) The mismatch repair system is required for S-phase checkpoint activation. *Nat Genet* 33(1): 80–84
 39. Negureanu L, Salsbury F R (2012) The molecular origin of the MMR-dependent apoptosis pathway from dynamics analysis of MutSα-DNA complexes. *J Biomol Struct Dyn* 30(3): 347–361
 40. Lindor N M, Petersen G M, Hadley D W et al (2006) Recommendations for the care of individuals with an inherited predisposition to Lynch syndrome: a systematic review. *JAMA* 296(12): 1507–1517
 41. Wang C, van Rijnsoever M, Grieu F et al (2003) Prognostic significance of microsatellite instability and Ki-ras mutation type in stage II colorectal cancer. *Oncology* 64(3): 259–265
-

42. Beckman R A, Loeb L A (2006) Efficiency of carcinogenesis with and without a mutator mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(38): 14140–14145
 43. Lee J, Xiao Y-Y, Sun Y Y et al (2017) Prevalence and characteristics of hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome in immigrant Asian colorectal cancer patients. *BMC Cancer* 17
 44. Binder H, Hopp L, Schweiger M R et al (2017) Genomic and transcriptomic heterogeneity of colorectal tumours arising in Lynch syndrome. *J Pathol* 243(2): 242–254
 45. Chang L, Chang M, Chang H M et al (2017) Expanding Role of Microsatellite Instability in Diagnosis and Treatment of Colorectal Cancers. *J Gastrointest Cancer* 48(4): 305–313
 46. Steinke V, Engel C, Büttner R et al (2013) Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)/Lynch syndrome. *Dtsch Arztebl Int* 110(3): 32–38
 47. Niskakoski A, Pasanen A, Porkka N et al (2018) Converging endometrial and ovarian tumorigenesis in Lynch syndrome: Shared origin of synchronous carcinomas. *Gynecol Oncol* 150(1): 92–98
 48. Umar A, Boland C R, Terdiman J P et al (2004) Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 96(4): 261–268
 49. Snowsill T, Coelho H, Huxley N et al (2017) Molecular testing for Lynch syndrome in people with colorectal cancer: systematic reviews and economic evaluation. *Health Technol Assess* 21(51): 1–238
 50. Zhang L, Peng Y, Peng G (2018) Mismatch repair-based stratification for immune checkpoint blockade therapy. *Am J Cancer Res* 8(10): 1977–1988
 51. Vanderwalde A, Spetzler D, Xiao N et al (2018) Microsatellite instability status determined by next-generation sequencing and compared with PD-L1 and tumor mutational burden in 11,348 patients. *Cancer Med* 7(3): 746–756
 52. Dietmaier W, Büttner R, Rüschhoff J (2019) Mikrosatelliteninstabilität : Aktueller Überblick über Methoden und Anwendungen. *Pathologe* 40(3): 313–327
 53. Salipante S J, Scroggins S M, Hampel H L et al (2014) Microsatellite instability detection by next generation sequencing. *Clin Chem* 60(9): 1192–1199
 54. Prince A E R, Cadigan R J, Henderson G E et al (2017) Is there evidence that we should screen the general population for Lynch syndrome with genetic testing? A systematic review. *Pharmgenomics Pers Med* 10: 49–60
 55. Seppälä T, Pylvänäinen K, Evans D G et al (2017) Colorectal cancer incidence in path_MLH1 carriers subjected to different follow-up protocols: a Prospective Lynch Syndrome Database report. *Hered Cancer Clin Pract* 15: 18
 56. Møller P, Seppälä T, Bernstein I et al (2017) Cancer incidence and survival in Lynch syndrome patients receiving colonoscopic and gynaecological surveillance: first report from the prospective Lynch syndrome database. *Gut* 66(3): 464–472
 57. Liu H-X, Zhou X-L, Liu T et al (2003) The role of hMLH3 in familial colorectal cancer. *Cancer Res* 63(8): 1894–1899
 58. Hou J, Zhao L, Zhang D et al (2018) Prognostic Value of Mismatch Repair Genes for Patients With Colorectal Cancer: Meta-Analysis. *Technol Cancer Res Treat* 17
 59. Olkinuora A, Nieminen T T, Mårtensson E et al (2019) Biallelic germline nonsense variant of MLH3 underlies polyposis predisposition. *Genet Med* 21(8): 1868–1873
 60. Mäki-Nevala S, Valo S, Ristimäki A et al (2019) DNA methylation changes and somatic mutations as tumorigenic events in Lynch syndrome-associated adenomas retaining mismatch repair protein expression. *EBioMedicine* 39: 280–291
 61. Djansugurova L, Zhunussova G, Khussainova E et al (2015) Association of DCC, MLH1, GSTT1, GSTM1, and TP53 gene polymorphisms with colorectal cancer in Kazakhstan. *Tumour Biol* 36(1): 279–289
-

62. Biller L H, Syngal S, Yurgelun M B (2019) Recent advances in Lynch syndrome. *Fam Cancer* 18(2): 211–219
 63. Engel C, Vasen H F, Seppälä T et al (2018) No Difference in Colorectal Cancer Incidence or Stage at Detection by Colonoscopy Among 3 Countries With Different Lynch Syndrome Surveillance Policies. *Gastroenterology* 155(5): 1400–1409.e2
 64. Argillander T E, Koornstra J J, van Kouwen M et al (2018) Features of incident colorectal cancer in Lynch syndrome. *United European Gastroenterol J* 6(8): 1215–1222
 65. Blanes A, Diaz-Cano S J (2006) Complementary analysis of microsatellite tumor profile and mismatch repair defects in colorectal carcinomas. *World J Gastroenterol* 12(37): 5932–5940
 66. Gryfe R, Kim H, Hsieh E T et al (2000) Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 342(2): 69–77
 67. Arora S, Velichinskii R, Lesh R W et al (2019) Existing and Emerging Biomarkers for Immune Checkpoint Immunotherapy in Solid Tumors. *Adv Ther* 36(10): 2638–2678
 68. Seth S, Ager A, Arends M J et al (2018) Lynch syndrome - cancer pathways, heterogeneity and immune escape. *J Pathol* 246(2): 129–133
 69. Sahin I H, Akce M, Alese O et al (2019) Immune checkpoint inhibitors for the treatment of MSI-H/MMR-D colorectal cancer and a perspective on resistance mechanisms. *Br J Cancer* 121(10): 809–818
 70. Evrard C, Tachon G, Randrian V et al (2019) Microsatellite Instability: Diagnosis, Heterogeneity, Discordance, and Clinical Impact in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* 11(10)
 71. Donald N, Malik S, McGuire J L et al (2018) The association of low penetrance genetic risk modifiers with colorectal cancer in lynch syndrome patients: a systematic review and meta-analysis. *Fam Cancer* 17(1): 43–52
 72. Hsieh P, Zhang Y (2017) The Devil is in the details for DNA mismatch repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114(14): 3552–3554
 73. Baretti M, Le D T (2018) DNA mismatch repair in cancer. *Pharmacol Ther* 189: 45–62
 74. Momma T, Gonda K, Akama Y et al (2019) MLH1 germline mutation associated with Lynch syndrome in a family followed for more than 45 years. *BMC Med Genet* 20(1): 67
 75. Knudson A G (1996) Hereditary cancer: two hits revisited. *J Cancer Res Clin Oncol* 122(3): 135–140
 76. Tuupanen S, Karhu A, Järvinen H et al (2007) No evidence for dual role of loss of heterozygosity in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Oncogene* 26(17): 2513–2517
 77. Kondelin J, Salokas K, Saarinen L et al (2018) Comprehensive evaluation of coding region point mutations in microsatellite-unstable colorectal cancer. *EMBO Mol Med* 10(9)
 78. Okazaki T, Honjo T (2007) PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int Immunol* 19(7): 813–824
 79. Zak K M, Grudnik P, Magiera K et al (2017) Structural Biology of the Immune Checkpoint Receptor PD-1 and Its Ligands PD-L1/PD-L2. *Structure* 25(8): 1163–1174
 80. Lázár-Molnár E, Scandiuizzi L, Basu I et al (2017) Structure-guided development of a high-affinity human Programmed Cell Death-1: Implications for tumor immunotherapy. *EBioMedicine* 17: 30–44
 81. Cheng X, Veverka V, Radhakrishnan A et al (2013) Structure and interactions of the human programmed cell death 1 receptor. *J Biol Chem* 288(17): 11771–11785
 82. Dong H, Strome S E, Salomao D R et al (2002) Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 8(8): 793–800
 83. Liu X, Wu X, Cao S et al (2016) B7-H1 antibodies lose antitumor activity due to activation of p38 MAPK that leads to apoptosis of tumor-reactive CD8+ T cells. *Sci Rep* 6: 36722
 84. Dudley J C, Lin M-T, Le D T et al (2016) Microsatellite Instability as a Biomarker for PD-1 Blockade. *Clin Cancer Res* 22(4): 813–820
-

85. Llosa N J, Cruise M, Tam A et al (2015) The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov* 5(1): 43–51
 86. Schwitalle Y, Kloor M, Eiermann S et al (2008) Immune response against frameshift-induced neopeptides in HNPCC patients and healthy HNPCC mutation carriers. *Gastroenterology* 134(4): 988–997
 87. Ishii H, Azuma K, Kawahara A et al (2017) Programmed cell death-ligand 1 expression and immunoscore in stage II and III non-small cell lung cancer patients receiving adjuvant chemotherapy. *Oncotarget* 8(37): 61618–61625
 88. Emens L A, Silverstein S C, Khleif S et al (2012) Toward integrative cancer immunotherapy: targeting the tumor microenvironment. *J Transl Med* 10: 70
 89. Galon J, Mlecnik B, Bindea G et al (2014) Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J Pathol* 232(2): 199–209
 90. Galon J, Angell H K, Bedognetti D et al (2013) The continuum of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive, and mechanistic signatures. *Immunity* 39(1): 11–26
 91. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F et al (2006) Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313(5795): 1960–1964
 92. Cohen R, Rousseau B, Vidal J et al (2019) Immune Checkpoint Inhibition in Colorectal Cancer: Microsatellite Instability and Beyond. *Target Oncol*
 93. Herbst R S, Soria J-C, Kowanetz M et al (2014) Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 515(7528): 563–567
 94. Powles T, Eder J P, Fine G D et al (2014) MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature* 515(7528): 558–562
 95. Taube J M, Klein A, Brahmer J R et al (2014) Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res* 20(19): 5064–5074
 96. Ansell S M, Lesokhin A M, Borrello I et al (2015) PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 372(4): 311–319
 97. Topalian S L, Hodi F S, Brahmer J R et al (2012) Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 366(26): 2443–2454
 98. Basile D, Garattini S K, Bonotto M et al (2017) Immunotherapy for colorectal cancer: where are we heading? *Expert Opin Biol Ther* 17(6): 709–721
 99. Azoury S C, Straughan D M, Shukla V (2015) Immune Checkpoint Inhibitors for Cancer Therapy: Clinical Efficacy and Safety. *Curr Cancer Drug Targets* 15(6): 452–462
 100. Deng L, Liang H, Burnette B et al (2014) Radiation and anti-PD-L1 antibody combinatorial therapy induces T cell-mediated depletion of myeloid-derived suppressor cells and tumor regression. *Oncoimmunology* 3: e28499
 101. Li J-X, Huang J-M, Jiang Z-B et al (2019) Current Clinical Progress of PD-1/PD-L1 Immunotherapy and Potential Combination Treatment in Non-Small Cell Lung Cancer. *Integr Cancer Ther* 18: 1534735419890020
 102. Maletzki C, Scheinplug P, Witt A et al (2019) Targeting Immune-Related Molecules in Cancer Therapy: A Comprehensive In Vitro Analysis on Patient-Derived Tumor Models. *Biomed Res Int* 2019: 4938285
 103. Konduri V, Li D, Halpert M M et al (2016) Chemo-immunotherapy mediates durable cure of orthotopic KrasG12D/p53-/- pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncoimmunology* 5(9): e1213933
 104. Liu W M, Fowler D W, Smith P et al (2010) Pre-treatment with chemotherapy can enhance the antigenicity and immunogenicity of tumours by promoting adaptive immune responses. *Br J Cancer* 102(1): 115–123
-

105. Goel S, DeCristo M J, Watt A C et al (2017) CDK4/6 inhibition triggers anti-tumour immunity. *Nature* 548(7668): 471–475
106. Maletzki C, Huehns M, Bauer I et al (2017) Frameshift mutational target gene analysis identifies similarities and differences in constitutional mismatch repair-deficiency and Lynch syndrome. *Mol Carcinog* 56(7): 1753–1764
107. Chaudhri A, Xiao Y, Klee A N et al (2018) PD-L1 Binds to B7-1 Only In Cis on the Same Cell Surface. *Cancer Immunol Res* 6(8): 921–929
108. Keir M E, Butte M J, Freeman G J et al (2008) PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 26: 677–704
109. Latchman Y E, Liang S C, Wu Y et al (2004) PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(29): 10691–10696
110. Azuma T, Yao S, Zhu G et al (2008) B7-H1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells. *Blood* 111(7): 3635–3643
111. Chen R, Ganesan A, Okoye I et al (2019) Targeting B7-1 in immunotherapy. *Med Res Rev*
112. Bhatia S, Edidin M, Almo S C et al (2006) B7-1 and B7-2: similar costimulatory ligands with different biochemical, oligomeric and signaling properties. *Immunol Lett* 104(1-2): 70–75
113. van der Kraak L, Goel G, Ramanan K et al (2016) 5-Fluorouracil upregulates cell surface B7-H1 (PD-L1) expression in gastrointestinal cancers. *J Immunother Cancer* 4: 65
114. Topalian S L, Drake C G, Pardoll D M (2012) Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol* 24(2): 207–212
115. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y et al (2002) Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(19): 12293–12297
116. Lee K, Tosti E, Edelmann W (2016) Mouse models of DNA mismatch repair in cancer research. *DNA Repair (Amst)* 38: 140–146
117. Pussila M, Törönen P, Einarsdottir E et al (2018) Mlh1 deficiency in normal mouse colon mucosa associates with chromosomally unstable colon cancer. *Carcinogenesis* 39(6): 788–797
118. Edelmann W, Yang K, Kuraguchi M et al (1999) Tumorigenesis in Mlh1 and Mlh1/Apc1638N mutant mice. *Cancer Res* 59(6): 1301–1307
119. Chahwan R, Edelmann W, Scharff M D et al (2012) AIDing antibody diversity by error-prone mismatch repair. *Semin Immunol* 24(4): 293–300
120. Zanotti K J, Gearhart P J (2016) Antibody diversification caused by disrupted mismatch repair and promiscuous DNA polymerases. *DNA Repair (Amst)* 38: 110–116
121. Guo J, Chen L, Li G-M (2017) DNA mismatch repair in trinucleotide repeat instability. *Sci China Life Sci* 60(10): 1087–1092
122. Schmidt M H M, Pearson C E (2016) Disease-associated repeat instability and mismatch repair. *DNA Repair (Amst)* 38: 117–126
123. Lollini P-L, Cavallo F, Nanni P et al (2006) Vaccines for tumour prevention. *Nat Rev Cancer* 6(3): 204–216
124. Yang B, Jeang J, Yang A et al (2014) DNA vaccine for cancer immunotherapy. *Hum Vaccin Immunother* 10(11): 3153–3164
125. Maletzki C, Gladbach Y S, Hamed M et al (2018) Cellular vaccination of MLH1-/- mice - an immunotherapeutic proof of concept study. *Oncoimmunology* 7(3): e1408748
126. Maletzki C, Wiegele L, Nassar I et al (2019) Chemo-immunotherapy improves long-term survival in a preclinical model of MMR-D-related cancer. *J Immunother Cancer* 7(1): 8
127. Dosset M, Vargas T R, Lagrange A et al (2018) PD-1/PD-L1 pathway: an adaptive

- immune resistance mechanism to immunogenic chemotherapy in colorectal cancer. *Oncoimmunology* 7(6): e1433981
128. Quiroga D, Lysterly H K, Morse M A (2016) Deficient Mismatch Repair and the Role of Immunotherapy in Metastatic Colorectal Cancer. *Curr Treat Options Oncol* 17(8): 41
129. Schulte J, Reski R (2004) High throughput cryopreservation of 140,000 *Physcomitrella patens* mutants. *Plant Biol (Stuttg)* 6(2): 119–127
130. Li X, Wu Y, Zhang L et al (2014) Comparison of three common DNA concentration measurement methods. *Anal Biochem* 451: 18–24
131. Saiki R K, Scharf S, Faloona F et al (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230(4732): 1350–1354
132. Chuang L-Y, Cheng Y-H, Yang C-H (2013) Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnol Lett* 35(10): 1541–1549
133. Nybo K (2013) Primer design. *BioTechniques* 54(5): 249–250
134. Eom S H, Wang J, Steitz T A (1996) Structure of Taq polymerase with DNA at the polymerase active site. *Nature* 382(6588): 278–281
135. Kalle E, Kubista M, Rensing C (2014) Multi-template polymerase chain reaction. *Biomol Detect Quantif* 2: 11–29
136. Rychlik W, Spencer W J, Rhoads R E (1990) Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Res* 18(21): 6409–6412
137. Rychlik W (1995) Priming efficiency in PCR. *BioTechniques* 18(1): 84-6, 88-90
138. Lorenz T C (2012) Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp* (63): e3998
139. Garbe Y, Maletzki C, Linnebacher M (2011) An MSI tumor specific frameshift mutation in a coding microsatellite of MSH3 encodes for HLA-A0201-restricted CD8+ cytotoxic T cell epitopes. *PLoS ONE* 6(11): e26517
140. Maletzki C, Schmidt F, Dirks W G et al (2013) Frameshift-derived neoantigens constitute immunotherapeutic targets for patients with microsatellite-unstable haematological malignancies: frameshift peptides for treating MSI+ blood cancers. *Eur J Cancer* 49(11): 2587–2595
141. COONS A H (1961) The beginnings of immunofluorescence. *J Immunol* 87: 499–503
142. Vries N L de, van Unen V, Ijsselstein M E et al (2019) High-dimensional cytometric analysis of colorectal cancer reveals novel mediators of antitumour immunity. *Gut*
143. Omelon S, Georgiou J, Habraken W (2016) A cautionary (spectral) tail: red-shifted fluorescence by DAPI-DAPI interactions. *Biochem Soc Trans* 44(1): 46–49
144. Paddock S W, Eliceiri K W (2014) Laser scanning confocal microscopy: history, applications, and related optical sectioning techniques. *Methods Mol Biol* 1075: 9–47
145. Nwaneshiudu A, Kuschal C, Sakamoto F H et al (2012) Introduction to confocal microscopy. *J Invest Dermatol* 132(12): e3
146. Bayguinov P O, Oakley D M, Shih C-C et al (2018) Modern Laser Scanning Confocal Microscopy. *Curr Protoc Cytom* 85(1): e39
147. Ma C S, Tangye S G (2019) Flow Cytometric-Based Analysis of Defects in Lymphocyte Differentiation and Function Due to Inborn Errors of Immunity. *Front Immunol* 10: 2108
148. Adan A, Alizada G, Kiraz Y et al (2017) Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol* 37(2): 163–176
149. McKinnon K M (2018) Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol* 120: 5.1.1-5.1.11
150. Guner A, Kim H-I (2019) Biomarkers for Evaluating the Inflammation Status in Patients with Cancer. *J Gastric Cancer* 19(3): 254–277
151. Nolan J P, Condello D (2013) Spectral flow cytometry. *Curr Protoc Cytom* Chapter 1:
-

Unit1.27

152. Japink D, Leers M P G, Sosef M N et al (2009) CEA in activated macrophages. New diagnostic possibilities for tumor markers in early colorectal cancer. *Anticancer Res* 29(8): 3245–3251
153. Bomanji J B, Costa D C, Ell P J (2001) Clinical role of positron emission tomography in oncology. *The Lancet Oncology* 2(3): 157–164
154. Haidar M, Baassiri A, Maroun G et al (2018) New era of PET/CT in breast cancer: high-resolution PET/dfCT. *Nucl Med Commun* 39(11): 1039–1044
155. Beyer T, Pietrzyk U, Knoess C et al (2008) Multi-modality imaging of uveal melanomas using combined PET/CT, high-resolution PET and MR imaging. *Nuklearmedizin* 47(2): 73–79
156. Gutman F, Alberini J-L, Wartski M et al (2005) Incidental colonic focal lesions detected by FDG PET/CT. *AJR Am J Roentgenol* 185(2): 495–500
157. Magota K, Kubo N, Kuge Y et al (2011) Performance characterization of the Inveon pre-clinical small-animal PET/SPECT/CT system for multimodality imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 38(4): 742–752
158. Balber T, Singer J, Berroterán-Infante N et al (2018) Preclinical In Vitro and In Vivo Evaluation of ¹⁸FFE@SUPPY for Cancer PET Imaging: Limitations of a Xenograft Model for Colorectal Cancer. *Contrast Media Mol Imaging* 2018: 1269830
159. Rudroff T, Kindred J H, Kalliokoski K K (2015) ¹⁸F-FDG positron emission tomography--an established clinical tool opening a new window into exercise physiology. *J Appl Physiol* 118(10): 1181–1190
160. Marín D, Sabater B (2017) The cancer Warburg effect may be a testable example of the minimum entropy production rate principle. *Phys Biol* 14(2): 24001
161. Fu Y, Liu S, Yin S et al (2017) The reverse Warburg effect is likely to be an Achilles' heel of cancer that can be exploited for cancer therapy. *Oncotarget* 8(34): 57813–57825
162. Liberti M V, Locasale J W (2016) The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci* 41(3): 211–218
163. Ancey P-B, Contat C, Meylan E (2018) Glucose transporters in cancer - from tumor cells to the tumor microenvironment. *FEBS J* 285(16): 2926–2943
164. Ambrosetti D, Dufies M, Dadone B et al (2018) The two glycolytic markers GLUT1 and MCT1 correlate with tumor grade and survival in clear-cell renal cell carcinoma. *PLoS ONE* 13(2): e0193477
165. Panda A, Bandyopadhyay A, Mohiddin G et al (2019) Can Increased Metabolic Status be a Grading Tool for Oral Squamous Cell Carcinoma? A Glucose Transporter 1 Immun-expression Study. *Niger J Surg* 25(2): 203–207
166. Nakaigawa N, Kondo K, Tateishi U et al (2016) FDG PET/CT as a prognostic biomarker in the era of molecular-targeting therapies: max SUVmax predicts survival of patients with advanced renal cell carcinoma. *BMC Cancer* 16: 67
167. Lee J W, Cho A, Yun M et al (2015) Prognostic value of pretreatment FDG PET in pediatric neuroblastoma. *Eur J Radiol* 84(12): 2633–2639
168. Lopez Guerra J L, Gladish G, Komaki R et al (2012) Large decreases in standardized uptake values after definitive radiation are associated with better survival of patients with locally advanced non-small cell lung cancer. *J Nucl Med* 53(2): 225–233
169. Cerfolio R J, Bryant A S (2006) Maximum standardized uptake values on positron emission tomography of esophageal cancer predicts stage, tumor biology, and survival. *Ann Thorac Surg* 82(2): 391-4; discussion 394-5
170. Matej S, Karp J S, Lewitt R M et al (1998) Performance of the Fourier rebinning algorithm for PET with large acceptance angles. *Phys Med Biol* 43(4): 787–795
171. Bao Q, Newport D, Chen M et al (2009) Performance Evaluation of the Inveon Dedicated

- PET Preclinical Tomograph Based on the NEMA-NU4 Standards. *J Nucl Med* 50(3): 401–408
172. Visser E P, Disselhorst J A, Brom M et al (2009) Spatial resolution and sensitivity of the Inveon small-animal PET scanner. *J Nucl Med* 50(1): 139–147
173. Maletzki C, Gladbach Y S, Hamed M et al (2018) Cellular vaccination of MLH1-/- mice - an immunotherapeutic proof of concept study. *Oncoimmunology* 7(3): e1408748
174. Maletzki C, Beyrich F, Hühns M et al (2016) The mutational profile and infiltration pattern of murine MLH1-/- tumors: concurrences, disparities and cell line establishment for functional analysis. *Oncotarget* 7(33): 53583–53598
175. Nagorsen D, Voigt S, Berg E et al (2007) Tumor-infiltrating macrophages and dendritic cells in human colorectal cancer: relation to local regulatory T cells, systemic T-cell response against tumor-associated antigens and survival. *J Transl Med* 5: 62
176. Gladbach Y S, Wiegele L, Hamed M et al (2019) Unraveling the Heterogeneous Mutational Signature of Spontaneously Developing Tumors in MLH1-/- Mice. *Cancers (Basel)* 11(10)
177. Salem M, Grothey A, Goldberg R et al (2018) Association between tumor mutation burden (TMB) and MLH1, PMS2, MSH2, and MSH6 alterations in 395 microsatellite instability-high (MSI-High) gastrointestinal (GI) tumors. *Annals of Oncology* 29: v109
178. Salem M E, Bodor J N, Puccini A et al (2020) Relationship between MLH1, PMS2, MSH2 and MSH6 gene-specific alterations and tumor mutational burden in 1057 microsatellite instability-high solid tumors. *Int J Cancer*
179. Kuraguchi M, Yang K, Wong E et al (2001) The distinct spectra of tumor-associated Apc mutations in mismatch repair-deficient Apc1638N mice define the roles of MSH3 and MSH6 in DNA repair and intestinal tumorigenesis. *Cancer Res* 61(21): 7934–7942
180. Smits R, Hofland N, Edelmann W et al (2000) Somatic Apc mutations are selected upon their capacity to inactivate the β -catenin downregulating activity. *Genes Chromosom. Cancer* 29(3): 229–239
181. Chalmers Z R, Connelly C F, Fabrizio D et al (2017) Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med* 9(1): 34
182. Chen P-C, Dudley S, Hagen W et al (2005) Contributions by MutL homologues Mlh3 and Pms2 to DNA mismatch repair and tumor suppression in the mouse. *Cancer Res* 65(19): 8662–8670
183. Edelmann W, Umar A, Yang K et al (2000) The DNA mismatch repair genes Msh3 and Msh6 cooperate in intestinal tumor suppression. *Cancer Res* 60(4): 803–807
184. Sender R, Fuchs S, Milo R (2016) Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol* 14(8): e1002533
185. Peters B A, Dominianni C, Shapiro J A et al (2016) The gut microbiota in conventional and serrated precursors of colorectal cancer. *Microbiome* 4(1): 69
186. Burns M B, Lynch J, Starr T K et al (2015) Virulence genes are a signature of the microbiome in the colorectal tumor microenvironment. *Genome Med* 7(1): 55
187. Sanapareddy N, Legge R M, Jovov B et al (2012) Increased rectal microbial richness is associated with the presence of colorectal adenomas in humans. *ISME J* 6(10): 1858–1868
188. Saus E, Iraola-Guzmán S, Willis J R et al (2019) Microbiome and colorectal cancer: Roles in carcinogenesis and clinical potential. *Mol Aspects Med* 69: 93–106
189. Yu L C-H, Wei S-C, Ni Y-H (2018) Impact of microbiota in colorectal carcinogenesis: lessons from experimental models. *Intest Res* 16(3): 346–357
190. Zoetendal E G, Wright A von, Vilpponen-Salmela T et al (2002) Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Appl Environ Microbiol* 68(7): 3401–3407
-

191. Flemer B, Lynch D B, Brown J M R et al (2017) Tumour-associated and non-tumour-associated microbiota in colorectal cancer. *Gut* 66(4): 633–643
192. Tahara T, Yamamoto E, Suzuki H et al (2014) Fusobacterium in colonic flora and molecular features of colorectal carcinoma. *Cancer Res* 74(5): 1311–1318
193. Mima K, Nishihara R, Qian Z R et al (2016) Fusobacterium nucleatum in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis. *Gut* 65(12): 1973–1980
194. Proença M A, Biselli J M, Succi M et al (2018) Relationship between Fusobacterium nucleatum, inflammatory mediators and microRNAs in colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 24(47): 5351–5365
195. Rubinstein M R, Wang X, Liu W et al (2013) Fusobacterium nucleatum promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ β -catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host Microbe* 14(2): 195–206
196. Watson K M, Gaulke C A, Tsikitis V L (2020) Understanding the microbiome: a primer on the role of the microbiome in colorectal neoplasia. *Ann Gastroenterol* 33(3): 223–236
197. Yang Y, Weng W, Peng J et al (2017) Fusobacterium nucleatum Increases Proliferation of Colorectal Cancer Cells and Tumor Development in Mice by Activating Toll-Like Receptor 4 Signaling to Nuclear Factor- κ B, and Up-regulating Expression of MicroRNA-21. *Gastroenterology* 152(4): 851-866.e24
198. Shenker B J, Datar S (1995) Fusobacterium nucleatum inhibits human T-cell activation by arresting cells in the mid-G1 phase of the cell cycle. *Infect Immun* 63(12): 4830–4836
199. Kostic A D, Chun E, Robertson L et al (2013) Fusobacterium nucleatum potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host Microbe* 14(2): 207–215
200. Xiao Y, Freeman G J (2015) The microsatellite instable subset of colorectal cancer is a particularly good candidate for checkpoint blockade immunotherapy. *Cancer Discov* 5(1): 16–18
201. Sheng Q-S, He K-X, Li J-J et al (2020) Comparison of Gut Microbiome in Human Colorectal Cancer in Paired Tumor and Adjacent Normal Tissues. *Onco Targets Ther* 13: 635–646
202. Almeida C V de, Camargo M R de, Russo E et al (2019) Role of diet and gut microbiota on colorectal cancer immunomodulation. *World J Gastroenterol* 25(2): 151–162
203. Pandey K R, Naik S R, Vakil B V (2015) Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *J Food Sci Technol* 52(12): 7577–7587
204. Wei D, Heus P, van de Wetering F T et al (2018) Probiotics for the prevention or treatment of chemotherapy- or radiotherapy-related diarrhoea in people with cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 8: CD008831
205. Burkitt D P (1971) Epidemiology of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 28(1): 3–13
206. Armstrong B, Doll R (1975) Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices. *Int J Cancer* 15(4): 617–631
207. Winter J M, Hu Y, Young G P et al (2014) Role of Red Meat and Resistant Starch in Promutagenic Adduct Formation, MGMT Repair, Thymic Lymphoma and Intestinal Tumorigenesis in Msh2 -Deficient Mice. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 7(4-6): 299–313
208. Stroh M, Winter H, Marchand M et al (2017) Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Atezolizumab in Metastatic Urothelial Carcinoma. *Clin Pharmacol Ther* 102(2): 305–312
209. Deng R, Bumbaca D, Pastuskovas C V et al (2016) Preclinical pharmacokinetics, pharmacodynamics, tissue distribution, and tumor penetration of anti-PD-L1 monoclonal antibody, an immune checkpoint inhibitor. *MAbs* 8(3): 593–603
210. Morrissey K M, Marchand M, Patel H et al (2019) Alternative dosing regimens for

- atezolizumab: an example of model-informed drug development in the postmarketing setting. *Cancer Chemother Pharmacol* 84(6): 1257–1267
211. Schmid P, Adams S, Rugo H S et al (2018) Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* 379(22): 2108–2121
212. Brahmer J R, Tykodi S S, Chow L Q M et al (2012) Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 366(26): 2455–2465
213. Maitra R, Thavornwatanayong T, Venkatesh M K et al (2019) Development and Characterization of a Genetic Mouse Model of KRAS Mutated Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 20(22)
214. van Cutsem E, Verheul H M W, Flamen P et al (2016) Imaging in Colorectal Cancer: Progress and Challenges for the Clinicians. *Cancers (Basel)* 8(9)
215. Culverwell A D, Chowdhury F U, Scarsbrook A F (2012) Optimizing the role of FDG PET-CT for potentially operable metastatic colorectal cancer. *Abdom Imaging* 37(6): 1021–1031
216. Tirumani S H, Kim K W, Nishino M et al (2014) Update on the role of imaging in management of metastatic colorectal cancer. *Radiographics* 34(7): 1908–1928
217. Lesniak W G, Chatterjee S, Gabrielson M et al (2016) PD-L1 Detection in Tumors Using (64)CuAtezolizumab with PET. *Bioconjug Chem* 27(9): 2103–2110
218. Bensch F, van der Veen E L, Lub-de Hooge M N et al (2018) 89Zr-atezolizumab imaging as a non-invasive approach to assess clinical response to PD-L1 blockade in cancer. *Nat Med* 24(12): 1852–1858
219. Hotta M, Minamimoto R, Yano H et al (2018) Diagnostic performance of 18F-FDG PET/CT using point spread function reconstruction on initial staging of rectal cancer: a comparison study with conventional PET/CT and pelvic MRI. *Cancer Imaging* 18(1): 4
220. Zhang M, Jiang H, Zhang R et al (2019) Near-infrared fluorescence-labeled anti-PD-L1-mAb for tumor imaging in human colorectal cancer xenografted mice. *J Cell Biochem* 120(6): 10239–10247
221. Patel S P, Kurzrock R (2015) PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer Ther* 14(4): 847–856
222. Teng F, Meng X, Kong L et al (2018) Progress and challenges of predictive biomarkers of anti PD-1/PD-L1 immunotherapy: A systematic review. *Cancer Lett* 414: 166–173
223. Schumacher T N, Kesmir C, van Buuren M M (2015) Biomarkers in cancer immunotherapy. *Cancer Cell* 27(1): 12–14
224. Valentini A M, Di Pinto F, Cariola F et al (2018) PD-L1 expression in colorectal cancer defines three subsets of tumor immune microenvironments. *Oncotarget* 9(9): 8584–8596
225. Janssen E, Subtil B, La Jara Ortiz F de et al (2020) Combinatorial Immunotherapies for Metastatic Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*
226. Hanahan D, Weinberg R A (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5): 646–674
227. Giraldo N A, Becht E, Vano Y et al (2015) The immune response in cancer: from immunology to pathology to immunotherapy. *Virchows Arch* 467(2): 127–135
228. Fridman W H, Pagès F, Sautès-Fridman C et al (2012) The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 12(4): 298–306
229. Thompson E D, Zahurak M, Murphy A et al (2017) Patterns of PD-L1 expression and CD8 T cell infiltration in gastric adenocarcinomas and associated immune stroma. *Gut* 66(5): 794–801
230. Kollmann D, Schweiger T, Schwarz S et al (2017) PD1-positive tumor-infiltrating lymphocytes are associated with poor clinical outcome after pulmonary metastasectomy for colorectal cancer. *Oncoimmunology* 6(9): e1331194
231. Droeser R A, Hirt C, Viehl C T et al (2013) Clinical impact of programmed cell death ligand
-

- 1 expression in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 49(9): 2233–2242
232. Li Y, Liang L, Dai W et al (2016) Prognostic impact of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand 1 (PD-L1) expression in cancer cells and tumor infiltrating lymphocytes in colorectal cancer. *Mol Cancer* 15(1): 55
233. Chen L (2004) Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol* 4(5): 336–347
234. Zou W, Chen L (2008) Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 8(6): 467–477
235. Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A et al (2011) Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *JCO* 29(6): 610–618
236. Wagner S, Mullins C S, Linnebacher M (2018) Colorectal cancer vaccines: Tumor-associated antigens vs neoantigens. *World J Gastroenterol* 24(48): 5418–5432
237. Liu C, Lu Z, Xie Y et al (2018) Soluble PD-1-based vaccine targeting MUC1 VNTR and survivin improves anti-tumor effect. *Immunol Lett* 200: 33–42
238. Mlecnik B, Bindea G, Angell H K et al (2016) Integrative Analyses of Colorectal Cancer Show Immunoscore Is a Stronger Predictor of Patient Survival Than Microsatellite Instability. *Immunity* 44(3): 698–711
239. Song M, Chen D, Lu B et al (2013) PTEN loss increases PD-L1 protein expression and affects the correlation between PD-L1 expression and clinical parameters in colorectal cancer. *PLoS ONE* 8(6): e65821
240. Thompson R H, Gillett M D, Cheville J C et al (2004) Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(49): 17174–17179
241. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M et al (2007) Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(9): 3360–3365
242. Saigusa S, Toiyama Y, Tanaka K et al (2016) Implication of programmed cell death ligand 1 expression in tumor recurrence and prognosis in rectal cancer with neoadjuvant chemoradiotherapy. *Int J Clin Oncol* 21(5): 946–952
243. Xiao C-X, Wang H-H, Shi Y et al (2013) Distribution of bone-marrow-derived endothelial and immune cells in a murine colitis-associated colorectal cancer model. *PLoS ONE* 8(9): e73666
244. Noy R, Pollard J W (2014) Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* 41(1): 49–61
245. Whiteside T L (2008) The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene* 27(45): 5904–5912
246. Yahaya M A F, Lila M A M, Ismail S et al (2019) Tumour-Associated Macrophages (TAMs) in Colon Cancer and How to Reeducate Them. *J Immunol Res* 2019: 2368249
247. MANTOVANI A, SOZZANI S, LOCATI M et al (2002) Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 23(11): 549–555
248. Qian B-Z, Pollard J W (2010) Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141(1): 39–51
249. Pollard J W (2004) Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 4(1): 71–78
250. Mantovani A (2005) Cancer: inflammation by remote control. *Nature* 435(7043): 752–753
251. Mantovani A, Sica A, Sozzani S et al (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25(12): 677–686
252. Biswas S K, Gangi L, Paul S et al (2006) A distinct and unique transcriptional program
-

- expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood* 107(5): 2112–2122
253. Liu Y, Cao X (2015) The origin and function of tumor-associated macrophages. *Cell Mol Immunol* 12(1): 1–4
254. Yang L, Zhang Y (2017) Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application. *J Hematol Oncol* 10(1): 58
255. Forssell J, Oberg A, Henriksson M L et al (2007) High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer. *Clin Cancer Res* 13(5): 1472–1479
256. Bingle L, Brown N J, Lewis C E (2002) The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 196(3): 254–265
257. Mantovani A, Sica A, Allavena P et al (2009) Tumor-associated macrophages and the related myeloid-derived suppressor cells as a paradigm of the diversity of macrophage activation. *Hum Immunol* 70(5): 325–330
258. Erreni M, Mantovani A, Allavena P (2011) Tumor-associated Macrophages (TAM) and Inflammation in Colorectal Cancer. *Cancer Microenviron* 4(2): 141–154
259. Greten F R, Eckmann L, Greten T F et al (2004) IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 118(3): 285–296
260. Dunn G P, Old L J, Schreiber R D (2004) The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 22: 329–360
261. van Ginderachter J A, Movahedi K, van den Bossche J et al (2008) Macrophages, PPARs, and Cancer. *PPAR Res* 2008: 169414
262. Cortés M, Sanchez-Moral L, Barrios O de et al (2017) Tumor-associated macrophages (TAMs) depend on ZEB1 for their cancer-promoting roles. *EMBO J* 36(22): 3336–3355
263. Liang P, Henning S M, Schokrpur S et al (2016) Effect of Dietary Omega-3 Fatty Acids on Tumor-Associated Macrophages and Prostate Cancer Progression. *Prostate* 76(14): 1293–1302
264. Gordon S R, Maute R L, Dulken B W et al (2017) PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature* 545(7655): 495–499
265. Terzić J, Grivennikov S, Karin E et al (2010) Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* 138(6): 2101–2114.e5
266. Gabrilovich D I, Nagaraj S (2009) Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9(3): 162–174
267. Kusmartsev S, Nagaraj S, Gabrilovich D I (2005) Tumor-associated CD8+ T cell tolerance induced by bone marrow-derived immature myeloid cells. *J Immunol* 175(7): 4583–4592
268. Sinha P, Clements V K, Fulton A M et al (2007) Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* 67(9): 4507–4513
269. Terabe M, Matsui S, Park J-M et al (2003) Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *J Exp Med* 198(11): 1741–1752
270. Huang B, Pan P-Y, Li Q et al (2006) Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res* 66(2): 1123–1131
271. Elashi A A, Sasidharan Nair V, Taha R Z et al (2019) DNA methylation of immune checkpoints in the peripheral blood of breast and colorectal cancer patients. *Oncoimmunology* 8(2): e1542918
272. Strasser K, Birnleitner H, Beer A et al (2019) Immunological differences between colorectal cancer and normal mucosa uncover a prognostically relevant immune cell profile. *Oncoimmunology* 8(2): e1537693
-

273. Koch M, Beckhove P, op den Winkel J et al (2006) Tumor infiltrating T lymphocytes in colorectal cancer: Tumor-selective activation and cytotoxic activity in situ. *Ann Surg* 244(6): 986-92; discussion 992-3
274. Sinicrope F A, Rego R L, Ansell S M et al (2009) Intraepithelial effector (CD3+)/regulatory (FoxP3+) T-cell ratio predicts a clinical outcome of human colon carcinoma. *Gastroenterology* 137(4): 1270–1279
275. Breakstone R (2021) Colon cancer and immunotherapy-can we go beyond microsatellite instability? *Transl Gastroenterol Hepatol*: 12
276. Salewski I, Gladbach Y S, Kuntz S et al (2020) In vivo vaccination with cell line-derived whole tumor lysates: neoantigen quality, not quantity matters. *J Transl Med* 18
277. Woerner S M, Tosti E, Yuan Y P et al (2015) Detection of coding microsatellite frameshift mutations in DNA mismatch repair-deficient mouse intestinal tumors. *Mol Carcinog* 54(11): 1376–1386
278. Andrew S E, Xu X S, Baross-Francis A et al (2000) Mutagenesis in PMS2- and MSH2-deficient mice indicates differential protection from transversions and frameshifts. *Carcinogenesis* 21(7): 1291–1295
279. Kabbarah O, Mallon M A, Pfeifer J D et al (2003) A panel of repeat markers for detection of microsatellite instability in murine tumors. *Mol Carcinog* 38(4): 155–159
280. Dietmaier W (2010) Mikrosatelliteninstabilität. Ein neuer prädiktiver Marker (?). *Pathologe* 31 Suppl 2: 268–273
281. Des Guetz G, Schischmanoff O, Nicolas P et al (2009) Does microsatellite instability predict the efficacy of adjuvant chemotherapy in colorectal cancer? A systematic review with meta-analysis. *Eur J Cancer* 45(10): 1890–1896
282. Parizadeh S M, Jafarzadeh-Esfahani R, Hassanian S M et al (2019) Targeting cancer stem cells as therapeutic approach in the treatment of colorectal cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 110: 75–83
283. Nikanjam M, Patel H, Kurzrock R (2017) Dosing immunotherapy combinations: Analysis of 3,526 patients for toxicity and response patterns. *Oncoimmunology* 6(8): e1338997
284. Harris S J, Brown J, Lopez J et al (2016) Immuno-oncology combinations: raising the tail of the survival curve. *Cancer Biol Med* 13(2): 171–193
285. Morrissey K M, Yuraszek T M, Li C-C et al (2016) Immunotherapy and Novel Combinations in Oncology: Current Landscape, Challenges, and Opportunities. *Clin Transl Sci* 9(2): 89–104
286. Liu X, He S, Wu H et al (2019) Blocking the PD-1/PD-L1 axis enhanced cisplatin chemotherapy in osteosarcoma in vitro and in vivo. *Environ Health Prev Med* 24(1): 79
287. Hodi F S, O'Day S J, McDermott D F et al (2010) Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363(8): 711–723
288. Seledtsov V I, Goncharov A G, Seledtsova G V (2015) Clinically feasible approaches to potentiating cancer cell-based immunotherapies. *Hum Vaccin Immunother* 11(4): 851–869
289. Rosenberg S A, Yang J C, Restifo N P (2004) Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 10(9): 909–915
290. Nagorsen D, Thiel E (2006) Clinical and immunologic responses to active specific cancer vaccines in human colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 12(10): 3064–3069
291. Parizadeh S M, Jafarzadeh-Esfahani R, Ghandehari M et al (2019) Personalized Peptide-based Vaccination for Treatment of Colorectal Cancer: Rational and Progress. *Curr Drug Targets* 20(14): 1486–1495
292. Chiang C L-L, Coukos G, Kandalaft L E (2015) Whole Tumor Antigen Vaccines: Where Are We? *Vaccines (Basel)* 3(2): 344–372
293. González F E, Gleisner A, Falcón-Beas F et al (2014) Tumor cell lysates as immunogenic
-

- sources for cancer vaccine design. *Hum Vaccin Immunother* 10(11): 3261–3269
294. Wirth T C, Kühnel F (2017) Neoantigen Targeting-Dawn of a New Era in Cancer Immunotherapy? *Front Immunol* 8: 1848
295. Srinivasan P, Wu X, Basu M et al (2018) PD-L1 checkpoint inhibition and anti-CTLA-4 whole tumor cell vaccination counter adaptive immune resistance: A mouse neuroblastoma model that mimics human disease. *PLoS Med* 15(1): e1002497
296. Turajlic S, Litchfield K, Xu H et al (2017) Insertion-and-deletion-derived tumour-specific neoantigens and the immunogenic phenotype: a pan-cancer analysis. *Lancet Oncol* 18(8): 1009–1021
297. Aurisicchio L, Pallocca M, Ciliberto G et al (2018) The perfect personalized cancer therapy: cancer vaccines against neoantigens. *J Exp Clin Cancer Res* 37(1): 86
298. Kajihara M, Takakura K, Kanai T et al (2016) Dendritic cell-based cancer immunotherapy for colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 22(17): 4275–4286
299. Gubin M M, Zhang X, Schuster H et al (2014) Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature* 515(7528): 577–581
300. Khong H, Overwijk W W (2016) Adjuvants for peptide-based cancer vaccines. *J Immunother Cancer* 4: 56
301. Kibe S, Yutani S, Motoyama S et al (2014) Phase II study of personalized peptide vaccination for previously treated advanced colorectal cancer. *Cancer Immunol Res* 2(12): 1154–1162
302. Sasada T, Kibe S, Akagi Y et al (2015) Personalized peptide vaccination for advanced colorectal cancer. *Oncoimmunology* 4(5): e1005512
303. Shangguan A, Shang N, Figini M et al (2020) Prophylactic dendritic cell vaccination controls pancreatic cancer growth in a mouse model. *Cytotherapy* 22(1): 6–15
304. Wang B, Sun C, Wang S et al (2018) Mouse dendritic cell migration in abdominal lymph nodes by intraperitoneal administration. *Am J Transl Res* 10(9): 2859–2867
305. Subbiah V, Murthy R, Hong D S et al (2018) Cytokines Produced by Dendritic Cells Administered Intratumorally Correlate with Clinical Outcome in Patients with Diverse Cancers. *Clin Cancer Res* 24(16): 3845–3856
306. Lee J M, Lee M-H, Garon E et al (2017) Phase I Trial of Intratumoral Injection of CCL21 Gene-Modified Dendritic Cells in Lung Cancer Elicits Tumor-Specific Immune Responses and CD8+ T-cell Infiltration. *Clin Cancer Res* 23(16): 4556–4568
307. Meng W S, Salgia N J, Pham N B et al (2020) A drug delivery perspective on intratumoral-immunotherapy in renal cell carcinoma. *Urol Oncol*
308. Marabelle A, Tselikas L, Baere T de et al (2017) Intratumoral immunotherapy: using the tumor as the remedy. *Ann Oncol* 28(suppl_12): xii33-xii43
309. Ishida E, Lee J, Campbell J S et al (2019) Intratumoral delivery of an HPV vaccine elicits a broad anti-tumor immune response that translates into a potent anti-tumor effect in a preclinical murine HPV model. *Cancer Immunol Immunother* 68(8): 1273–1286
310. Tanaka H, Hazama S, Iida M et al (2017) miR-125b-1 and miR-378a are predictive biomarkers for the efficacy of vaccine treatment against colorectal cancer. *Cancer Sci* 108(11): 2229–2238
311. Jahan N, Talat H, Alonso A et al (2019) Triple combination immunotherapy with GVAX, anti-PD-1 monoclonal antibody, and agonist anti-OX40 monoclonal antibody is highly effective against murine intracranial glioma. *Oncoimmunology* 8(5): e1577108
312. Aspeslagh S, Postel-Vinay S, Rusakiewicz S et al (2016) Rationale for anti-OX40 cancer immunotherapy. *Eur J Cancer* 52: 50–66
313. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R et al (2015) Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med* 373(1): 23–34
314. Zamarin D, Burger R A, Sill M W et al (2020) Randomized Phase II Trial of Nivolumab
-

- Versus Nivolumab and Ipilimumab for Recurrent or Persistent Ovarian Cancer: An NRG Oncology Study. *JCO* 38(16): 1814–1823
315. Overman M J, McDermott R, Leach J L et al (2017) Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (Check-Mate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *The Lancet Oncology* 18(9): 1182–1191
316. Ghisoni E, Imbimbo M, Zimmermann S et al (2019) Ovarian Cancer Immunotherapy: Turning up the Heat. *Int J Mol Sci* 20(12)
317. Overman M J, Lonardi S, Wong K Y M et al (2018) Durable Clinical Benefit With Nivolumab Plus Ipilimumab in DNA Mismatch Repair-Deficient/Microsatellite Instability-High Metastatic Colorectal Cancer. *JCO* 36(8): 773–779
318. Gruijil T D de, van den Eertwegh A J M, Pinedo H M et al (2008) Whole-cell cancer vaccination: from autologous to allogeneic tumor- and dendritic cell-based vaccines. *Cancer Immunol Immunother* 57(10): 1569–1577
319. Staff C, Mozaffari F, Haller B K et al (2011) A Phase I safety study of plasmid DNA immunization targeting carcinoembryonic antigen in colorectal cancer patients. *Vaccine* 29(39): 6817–6822
320. Cui Z (2005) DNA Vaccine. In: *Non-Viral Vectors for Gene Therapy, Second Edition: Part 2*. Elsevier, S. 257–289
321. Anderson R J, Schneider J (2007) Plasmid DNA and viral vector-based vaccines for the treatment of cancer. *Vaccine* 25 Suppl 2: B24–34
322. Hossain D M S, Javaid S, Cai M et al (2018) Dinaciclib induces immunogenic cell death and enhances anti-PD1-mediated tumor suppression. *J Clin Invest* 128(2): 644–654
323. Deshpande A, Sicinski P, Hinds P W (2005) Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene* 24(17): 2909–2915
324. Sherr C J, Beach D, Shapiro G I (2016) Targeting CDK4 and CDK6: From Discovery to Therapy. *Cancer Discov* 6(4): 353–367
325. Schaer D A, Beckmann R P, Dempsey J A et al (2018) The CDK4/6 Inhibitor Abemaciclib Induces a T Cell Inflamed Tumor Microenvironment and Enhances the Efficacy of PD-L1 Checkpoint Blockade. *Cell Rep* 22(11): 2978–2994
326. Schaer D A, Beckmann R P, Dempsey J A et al (2018) The CDK4/6 Inhibitor Abemaciclib Induces a T Cell Inflamed Tumor Microenvironment and Enhances the Efficacy of PD-L1 Checkpoint Blockade. *Cell Rep* 22(11): 2978–2994
327. Atkins M B, Lotze M T, Dutcher J P et al (1999) High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *JCO* 17(7): 2105–2116
328. Rosenberg S A (1994) Treatment of 283 Consecutive Patients With Metastatic Melanoma or Renal Cell Cancer Using High-Dose Bolus Interleukin 2. *JAMA* 271(12): 907
329. Smith F O, Downey S G, Klapper J A et al (2008) Treatment of metastatic melanoma using interleukin-2 alone or in conjunction with vaccines. *Clin Cancer Res* 14(17): 5610–5618
330. Schwartzentruber D J, Lawson D H, Richards J M et al (2011) gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma. *N Engl J Med* 364(22): 2119–2127
331. Ahmadzadeh M, Rosenberg S A (2006) IL-2 administration increases CD4⁺ CD25(hi) Foxp3⁺ regulatory T cells in cancer patients. *Blood* 107(6): 2409–2414
332. Sharma M, Khong H, Fa'ak F et al (2020) Bempegaldesleukin selectively depletes intra-tumoral Tregs and potentiates T cell-mediated cancer therapy. *Nat Commun* 11(1): 661
333. Scheper W, Kelderman S, Fanchi L F et al (2019) Low and variable tumor reactivity of the intratumoral TCR repertoire in human cancers. *Nat Med* 25(1): 89–94
334. Tian H, Kang Y, Song X et al (2020) PDL1-targeted vaccine exhibits potent antitumor
-

- activity by simultaneously blocking PD1/PDL1 pathway and activating PDL1-specific immune responses. *Cancer Lett* 476: 170–182
335. Cowan L A, Talwar S, Yang A S (2010) Will DNA methylation inhibitors work in solid tumors? A review of the clinical experience with azacitidine and decitabine in solid tumors. *Epigenomics* 2(1): 71–86
336. Hesson L B, Patil V, Sloane M A et al (2013) Reassembly of nucleosomes at the MLH1 promoter initiates resiliencing following decitabine exposure. *PLoS Genet* 9(7): e1003636
337. Daskalakis M, Nguyen T T, Nguyen C et al (2002) Demethylation of a hypermethylated P15/INK4B gene in patients with myelodysplastic syndrome by 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) treatment. *Blood* 100(8): 2957–2964
338. Blum W, Klisovic R B, Hackanson B et al (2007) Phase I study of decitabine alone or in combination with valproic acid in acute myeloid leukemia. *JCO* 25(25): 3884–3891
339. Das S, Moran B, Perry A S (2018) Assessing DNA Methylation in Cancer Stem Cells. *Methods Mol Biol* 1692: 157–178
340. Sasidharan Nair V, Toor S M, Taha R Z et al (2018) DNA methylation and repressive histones in the promoters of PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, TIGIT, PD-L1, and galectin-9 genes in human colorectal cancer. *Clin Epigenetics* 10(1): 104
341. Sasidharan Nair V, El Salhat H, Taha R Z et al (2018) DNA methylation and repressive H3K9 and H3K27 trimethylation in the promoter regions of PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, TIGIT, and PD-L1 genes in human primary breast cancer. *Clin Epigenetics* 10: 78
342. Ehrlich M (2009) DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics* 1(2): 239–259
343. Tsai H-C, Li H, van Neste L et al (2012) Transient low doses of DNA-demethylating agents exert durable antitumor effects on hematological and epithelial tumor cells. *Cancer Cell* 21(3): 430–446
344. Jordan C T, Guzman M L, Noble M (2006) Cancer stem cells. *N Engl J Med* 355(12): 1253–1261
345. Toh T B, Lim J J, Chow E K-H (2017) Epigenetics in cancer stem cells. *Mol Cancer* 16(1): 29
346. Nassar D, Blanpain C (2016) Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. *Annu Rev Pathol* 11: 47–76
347. Dawood S, Austin L, Cristofanilli M (2014) Cancer stem cells: implications for cancer therapy. *Oncology (Williston Park, N Y)* 28(12): 1101-7, 1110
348. Prébet T, Gore S D, Esterni B et al (2011) Outcome of high-risk myelodysplastic syndrome after azacitidine treatment failure. *JCO* 29(24): 3322–3327
349. Jabbour E, Garcia-Manero G, Batty N et al (2010) Outcome of patients with myelodysplastic syndrome after failure of decitabine therapy. *Cancer* 116(16): 3830–3834
350. Qin T, Jelinek J, Si J et al (2009) Mechanisms of resistance to 5-aza-2'-deoxycytidine in human cancer cell lines. *Blood* 113(3): 659–667
351. Qin T, Castoro R, El Ahdab S et al (2011) Mechanisms of resistance to decitabine in the myelodysplastic syndrome. *PLoS ONE* 6(8): e23372
352. Moon J W, Lee S K, Lee J O et al (2014) Identification of novel hypermethylated genes and demethylating effect of vincristine in colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 33: 4
353. Affolter T, Llewellyn H P, Bartlett D W et al (2019) Inhibition of immune checkpoints PD-1, CTLA-4, and IDO1 coordinately induces immune-mediated liver injury in mice. *PLoS ONE* 14(5): e0217276
354. Kim K W, Ramaiya N H, Krajewski K M et al (2013) Ipilimumab associated hepatitis: imaging and clinicopathologic findings. *Invest New Drugs* 31(4): 1071–1077
355. Di Giacomo A M, Biagioli M, Maio M (2010) The emerging toxicity profiles of anti-CTLA-4 antibodies across clinical indications. *Semin Oncol* 37(5): 499–507
356. Ganesh K, Stadler Z K, Cercek A et al (2019) Immunotherapy in colorectal cancer:

- rationale, challenges and potential. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16(6): 361–375
357. Clark M, Steger-Hartmann T (2018) A big data approach to the concordance of the toxicity of pharmaceuticals in animals and humans. *Regul Toxicol Pharmacol* 96: 94–105
358. Olson H, Betton G, Robinson D et al (2000) Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul Toxicol Pharmacol* 32(1): 56–67
359. Shanks N, Greek R, Greek J (2009) Are animal models predictive for humans? *Philos Ethics Humanit Med* 4: 2
360. Poropatich K, Fontanarosa J, Samant S et al (2017) Cancer Immunotherapies: Are They as Effective in the Elderly? *Drugs Aging* 34(8): 567–581
361. Lewis J H, Kilgore M L, Goldman D P et al (2003) Participation of patients 65 years of age or older in cancer clinical trials. *JCO* 21(7): 1383–1389
362. Mangoni A A, Jansen P A F, Jackson S H D (2013) Under-representation of older adults in pharmacokinetic and pharmacodynamic studies: a solvable problem? *Expert Rev Clin Pharmacol* 6(1): 35–39

XI. DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. C. Junghanß, Direktor der medizinischen Klinik III – Klinik für Hämatologie, Onkologie und Palliativmedizin, herzlich für die Aufnahme in sein Forschungsteam, für die positive und objektive Kritik bei den Vorträgen sowie für die Rückmeldungen bei den wöchentlichen Labortreffen. Mein besonderer und tief empfundener Dank gilt Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. C. Maletzki. Durch sie bin ich in die Laborarbeit eingeführt worden, welche anfangs sicher noch ausbaufähig war. Sie glaubte fest an die von ihr proklamierte „steile Lernkurve“, welche sich dann auch einstellte. Auch ihr stets offenes Ohr, ihre zugewandte Art und Positivität - auch zwischen Tür und Angel - beeindruckten mich nachhaltig. Es ist schade, wenn solch ein großes Projekt endet – die wundervolle Zeit mit ihr wird bleiben und hat sicher auch meinen Blick auf die Forschung und den unermüdlichen Einsatz der dort Tätigen verändert!

Ich danke auch Frau Prof. Dr. med. B. Vollmar für die Möglichkeit, am Rudolf-Zenker-Institut für experimentelle Chirurgie arbeiten zu dürfen. 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 molekularpathologischen Labor des Instituts für Pathologie der Universität Rostock danken. Die zahlreichen Fragmentlängenanalysen waren dank ihrer Hilfe möglich und der Austausch war stets sehr herzlich und unkompliziert.

Nicht vergessen möchte ich das wundervolle Laborteam: Weibo, mit dem ich an langen und dunklen Wintertagen das eine oder andere Mal allein im Labor war und den schönen Gespräche zwischen den Versuchen mit ihm. Auch Nina, Inken und Theresa waren stets ideale Laborpartner - gut gelaunt haben wir die Zeit im Labor immer mit viel Rücksichtnahme und mit anregenden und unterhaltsamen Gesprächen und Tipps über anstehende Kulturveranstaltungen verbracht.

Rike, mein Dank ist ganz dein – du hast mich stets so liebevoll und mit vollem Herzen unterstützt und hast verständnisvoll das eine oder andere Mal kurzfristig ausgeholfen – was wäre diese Arbeit ohne dich!

Zu guter Letzt möchte ich mich in besonderem Maße herzlichst bei meinen Eltern bedanken, ohne deren jahrelange Unterstützung Vieles nicht möglich gewesen wäre.

XII. ANHANG

12.1 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.

Rostock

(Abgabedatum)

(Vollständige Unterschrift)

12.2 ABKÜRZUNGEN

5-FU	5-Fluorouracil
¹⁸ F-FDG	¹⁸ F-2-Fluor-2-desoxy-D-glucose
AK	Antikörper
CDKi	<i>Cyclin-dependent Kinase inhibitor</i>
CRC	<i>colorectal cancer</i>
CTL	<i>cytotoxic T-Lymphocyte</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
DC	<i>dendritic cell</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
gDNA	<i>genomic deoxyribonucleic acid</i>
FACS™	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FDC	<i>follicular dendritic cells</i>
FDG	2-Fluor-2-desoxy-D-glucose
ggf.	gegebenenfalls
GIT	gastrointestinaler Tumor
KG	Körpergewicht
ICI	Immuncheckpointinhibitoren
<i>i.p.</i>	<i>intraperitoneal</i>
<i>i.t.</i>	<i>intratumoral</i>
<i>i.v.</i>	<i>intravenös</i>
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
MDSC	<i>myeloid-derived suppressor cell</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MLH	<i>MutL homolog</i>
MMR	<i>DNA-Mismatch-Reparatur</i>
MMR-D	<i>DNA-Mismatch-Reparatur-Defizienz</i>
MSI	Mikrosatelliten-instabil
MSI-H	Mikrosatelliten-instabil <i>high-frequency</i>
MSI-L	Mikrosatelliten-instabil <i>low-frequency</i>
MSS	Mikrosatelliten-stabil
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
MLH	<i>MutL homolog</i>

<i>MSH</i>	<i>MutS homolog</i>
<i>PBS</i>	<i>phosphate buffered saline</i>
<i>PCR</i>	<i>polymerase chain reaction</i>
<i>PD-1</i>	<i>programmed cell death 1</i>
<i>PD-L1</i>	<i>programmed cell death-ligand 1</i>
PET / CT	Positronen-Emissions-Tomographie / Computertomographie
RCF	Relative Zentrifugalbeschleunigung
<i>RFU</i>	<i>relative fluorescence unit</i>
RT	Raumtemperatur
<i>s.c.</i>	<i>subkutan</i>
<i>SD</i>	<i>standard deviation</i>
<i>SUV</i>	<i>standardized uptake value</i>
TAM	tumorassoziierte Makrophagen
<i>TMB</i>	<i>tumor mutational burden</i>
<i>TIL</i>	<i>tumor-infiltrating lymphocytes</i>
wt	Wildtyp

12.3 ANTIKÖRPER

Antikörper	Konjugat	Spezifität	Klon	Hersteller
CD11b	FITC	Maus	M1/70.15.11.5	Immuno Tools
CD11c	PE	Maus	N418	BioLegend
CD152	PE	Maus	UC10-4B9	BioLegend
CD19	APC	Maus	LT19	ImmunoTools
CD200R	FITC	Maus	OX-110	BioLegend
CD279 (PD-1)	FITC	Maus	4F12	Biolegend
CD3	FITC	Maus	MEM-57	Immuno Tools
CD4	PE	Maus	GK1.5	Immuno Tools
CD8	PE	Maus	LT8	Immuno Tools
CD83	PE/Cy7	Maus	Michel-19	BioLegend
Gr-1	PE	Maus	RB6-8C5	ImmunoTools
IDO-1	APC	Maus	2E2/IDO1	BioLegend
LAG 3	PE	Maus	C9B7W	BioLegend
NK 1.1	PE	Maus	PK136	BioScience
PD-L1 (CD274)	PE	Maus	10F.9G2	BioLegend

12.4 PRIMER

Gen	Repeat	Primer-Sequenz [5'>3']	Produktgröße [BP]
AA003063	A ₂₃	F: 6-FAM-ACGTCAAAAATCAATGTTAGG R: CAGCAAGGGTCCCTGTCTTA	87
AC096777	T ₂₇	F: 6-Fam-TACAGAGGATTGTCCTCTTGGAG R: GCTGCTTCACTTGGACATTGGCT	138
Bat24	A ₂₄	F: 6-Fam-CATAGACCCAGTGCTCATCTTCGT R: CATTCGGTGGAAAGCTCTGA	98
Bat26	A ₂₆	F: 6-Fam-TCACCATCCATTGCACAGTT R: CTGCGAGAAGGTACTCACCC	134
Bat30	A ₃₀	F: Hex-ATTTGGCTTTCAAGCATCCATA R: GGGAAGACTGCTTAGGGAAGA	82
Bat59	A ₅₉	F: Hex-GTAATCCCTTTATTCCATTTAGCA R: GGCTCACAACCATCCGTAACAAGA	189
D1Mit79	CA ₃₁	F: TAMRA-GACCTGGAAGTTGGAAACCA R: TGATCCAGAACCTCTGCCTT	150
D15Mit93	CA ₃₂	F: TAMRA-AAGAATTGGGGTGGGTAAGG R: CATGTGCAGAATACTTACACATATGC	144
L24372	A ₂₇	F: TAMRA-GGGAAGACTGCTTAGGGAAGA R: ATTTGGCTTTCAAGCATCCATA	90
U12235	A ₂₄	F: Hex-GCTCATCTTCGTTCCCTGTC R: CATTCGGTGGAAAGCTCTGA	86
Gen	Repeat	Primer-Sequenz [5'>3']	Produktgröße [BP]
Apc	A ₈	F: FAM-ATTTCTCTGGATCGCCTTT R: GCGAATCTTTCCCGTAATCA	189
Tmem60	A ₉	F: FAM-CTTTGACCCTCGACATGGAT R: CAGCCAGTAAGGCCCATAAA	164
Senp6	A ₁₁	F: HEX-GCTGTGACTGATTGAGTGC R: GCCATTCTCACTTTGGGTTC	177
Phactr4	A ₁₀	F: TAMRA-ATCTTCAAGCCGTGGAAATG R: TTTAATGCAGCAGGCTCAG	185

Aste1	A ₈	F: GAAGCCTGGTCCACAGACTC R: AGGCTGGCAACCTTTTTCTT	199
Mdm2	A ₈	F: TAMRA-CGCAGGACAAAGACGAGAGT R: TCATTTGGATTGGCTGTCTG	198
Fasl	A ₈	F: TCACCAACCAAAGCCTTAAAGT R: TCCCTGTAAATGGGCCACA	59
Kit	A ₈	F: TCAGCCTGACGTGCATTGAT R: AGAACTCGTGAGGCCATTGC	108
Rasa12	A ₈	F: FAM-CAAACCTGGCGACCAGTCACAC R: TAGCCTTCCACCTCTTCATAGCA	
Tcf7l2	T ₈	F: HEX-CACCTTGTATGTAGCGAACGCA R: TCAACTTGCCGTGAGCATTAGA	119
Bend5	A ₈	F: FAM-CTGGGGAACAGATGTTCTGA R: CTCTGACGATGCTGAGCTTG	113
Asnsd1	A ₈	F: AGTGAAGCAAGGTTGTTGGC R: GCCCTCACAGCAACAAAAGT	83
Nktr1	A ₉	F: HEX-GCGAGACACTCTGATGGTCA R: TGTCTTCTGCAATGTTTCTGC	95
Acvr2a	A ₉	F: Tamra-GTTGCCATTTGAGGAGGAAA R: CAGCATGTTTCTGCCAATAATC	109
Il18	A ₈	F: GGACACTTTCTTGCTTGCCA R: TCCCCACCTAACTTTGATGTAAG	124
Supt16	A ₈	F: FAM-TGAGAAAGTTCGGCATAGCA R: AGAAGGATCTGCCCCAGCTA	85
C8a	T ₈	F: TAMRA-CCTGGCGGATACTTCAATCT R: ACACCAGCTGAGTGGGACTT	100
Grb14	A ₁₀	F: GCATTTGCAGCTTTTCAGTG R: CGTCCTGCTCTGCTCTTCTT	147
Kcnma1	A ₁₀	F: TGACGTCACAGATCCCAAAA R: TAACAAGGGGTCATGCCTCA	157
Ptpn21	A ₈	F: FAM-TTTGAAAGGTGTCTGGGTACG R: CGCTCTGGTGGACACTTCTT	176
Rfc3	A ₁₀	F: HEX-TTGGCAGTAGTGATTTGGTGA R: AGGAGCAGTTTACCTGGGATT	165
Sdccag1	A ₁₁	F: FAM-GCATAGGCTGACAGGCTGAGAT R: TGCCAGCATTGAGAACAGTGAT	132

Casc3	C ₈	F: TAMRA-TGTCACACTTCCATAGAAACACACC R: GAGGACTCCCCAGCCGGT	140
Mdc1	C ₈	F: HEX-GAAAGGCTGGTTGCTTCTTG R: ACTGATGATCTCGCCCATCT	188
Akt3	T ₈	F: GGGCCAGATGATGCAAAAGA R: ACATCTTGCCAGTTTACTCCAG	65
Spen	A ₈	F: GGTGTTTTGCTGAGGGAAGG R: AGGATCCTGGCAGTCTTTGG	129
Il1f9	A ₁₀	F: GCACCAGAACAAGATCACGA R: CCAGCTCTCTCGTGTTCCAT	87
Clock	T ₈	F: TGTTAGAGGCTCTTGATGGTTT R: ACTTCCATCTGTCATGATCGC	50
Dnajc2	A ₈	F: CAAGTGTTTTCTCCAGTGTTTGA R: CGAGGAGTTCATATCACCAAGC	84
Tgfbr2*	A ₄ GA ₄	F: CATTACTCTGGAGACGGTTTGC R: TCGTTGCACTCTTCCATGTTAC	153
Mlh1		F: TGT CAA TAG GCT GCC CTA GG	500 <i>knockout</i>
Maus		R1: TGG AAG GAT TGG AGC TAC GG	350 wt
		R2: TTT TCA GTG CAG CCT ATG CTC	350 + 500 heterozygot

*(189); # Originalprimer aus PCR Protokoll NCI mouse repository (strain number: 01XA2)

12.5 THESEN

1. Die Tumorgenese des kolorektalen Karzinoms (*CRC*) verläuft langsam und stufenweise, mit fortschreitender Akkumulation (epi)genetischer Veränderungen.
2. Bei fünf bis zehn Prozent aller *CRC*-Patienten liegt eine hereditäre Ursache der Erkrankung zugrunde. Das Lynch Syndrom ist dabei das häufigste Tumorprädispositionssyndrom (ca. zwei bis drei Prozent aller *CRC*-Fälle).
3. Monoallelische Keimbahnmutationen in einem der *DNA Mismatch* Reparatur (MMR)-Gene (v.a. *MLH1* und *MSH2*) sind oft Ursache des Lynch Syndroms.
4. Biallelische Keimbahnmutationen in einem der MMR-Gene bedingen die seltene konstitutionelle MMR-Defizienz (MMR-D).
5. Ein diagnostischer Marker für MMR-D-assoziierte Tumoren ist die Mikrosatelliteninstabilität (MSI).
6. Charakteristisch für MMR-D-assoziierte Tumoren ist eine hohe Abundanz an Immuncheckpointmolekülen wie PD-1 und PD-L1.
7. MMR-D-assoziierte Tumoren sind aufgrund der hohen Immunogenität und histologischen Besonderheiten besonders geeignet für eine Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern wie z.B. Atezolizumab.
8. *Mlh1*^{-/-} Mäuse zeigen einen starken Tumorphänotyp und sind geeignete präklinische Tumormodelle für die Erforschung der MMR-D.
9. Eine kombinierte Immuntherapie mit Atezolizumab sowie Tumorlysat steigert die Überlebenswahrscheinlichkeit und verändert das Tumormikromilieu auf immunologischer Ebene u.a. durch Stimulation und Modulation von Immunantworten.
10. Die kombinierte Immuntherapie mit Atezolizumab sowie Tumorlysat ist der Monotherapie therapeutisch hinsichtlich der Überlebenswahrscheinlichkeit überlegen.
11. Die Erforschung der spezifischen immunologischen Mechanismen im Tumormikromilieu ist essenziell, um weitere mögliche Angriffspunkte für eine Immuntherapie zu identifizieren und deren Effektivität zu steigern.
12. Die vergleichsweise niedrige Dosis und geringe Anzahl der Medikamenten-Applikationen minimieren die Nebenwirkungen der Therapie.
13. Ein *Monitoring* mittels ¹⁸F-FDG-PET / CT objektiviert den Therapieerfolg makroskopisch.
14. Die Identifikation MSI-spezifischer Zielgene der murinen *Mlh1*-Tumorgenese hilft, die Mechanismen der Tumorgenese besser zu verstehen und schafft die Grundlage für prospektive Peptid-basierte therapeutische Ansätze.

12.6 LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Steffen Hahn, geb. Kuntoff
Kontakt: Lüneburger Straße 13
18057 Rostock, Deutschland
(0049) 171 / 3875523
steffenkuntoff@gmx.de
Geburtsdatum und -ort: 12.05.1986, Spremberg
Familienstand: verheiratet

Schulische Ausbildung

1992-1998 Grete-Walter-Grundschule Sellessen
1998-2002 Gymnasium Welzow
2002-2005 Gymnasium Spremberg, Abschluss: Abitur (1,9)

Grundwehrdienst

08/2005 - 10/2005 Grundwehrdienst in Storkow, Feldjäger
10/2005 - 02/2006 Wehrpflichtiger, Tätigkeit als Fernmelder im Postamt des
Einsatzführungskommandos der Bundeswehr in Potsdam

Studium

10/2006 - 03/2011 Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Zahnmedizin
ab 10/2016 Universität Rostock, Humanmedizin, Semestersprecher

Weiterbildung

04/2010 - 10/2010 Teilnahme am Curriculum „zahnärztliche Hypnose“ der deutschen Gesellschaft für zahnärztliche Hypnose e.V.
07/2010 Teilnahme an Seminaren in Timmendorfer Strand u.a.
„Körpersprache – im Umgang mit Patienten und Mitarbeitern“
09/2011 - 09/2013 Ausbildung zum Rettungsassistenten
10/2016 - 11/2016 Seminar „Konfliktmanagement“ (Prof. Dittmer)
09/2017 Teilnahme am 17. Rostocker Präparierkurs zu Lid-Tränenwegs- sowie Orbitalchirurgie (Prof. Wree et Lünemann)
03/2018 Seminar „Erfolgreich mit Persönlichkeit“ in Erfurt
01/2019 Seminar „schneller lesen“ in Hannover
08/2019 Seminar „Präsentieren – Überzeugen – Begeistern“ in Berlin
12/2020 Teilnahme am WONCA / DEGAM Jahreskongress

03/2021 Teilnahme am arriba Symposium „personalisierte Medizin“

Berufliche Laufbahn

11/2013 - 08/2016 Anstellung als Rettungsassistent beim DRK Rostock

Stipendien

10/2016 - heute Stipendium der Stiftung Begabtenförderung berufliche Bildung

03/2020 – heute Stipendium der deutschen Stiftung für Allgemeinmedizin und Familienmedizin (Nachwuchsakademie der DESAM)

Engagement

04/2011 - heute Mitglied bei „Astronomischer Verein Rostock e.V.“

10/2014 - heute Mitglied im Verein „Junge Opernfreunde Hamburg e.V.“

Sprachkenntnisse

Deutsch Muttersprache

Englisch Fließend (Unicert II Zertifikat 2011)

Latein Latinum

Russisch Grundkenntnisse

Spanisch Grundkenntnisse

Chinesisch Grundkenntnisse (gesprochene Sprache)