

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

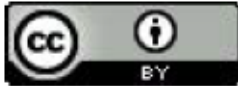
# **Kombinierte zielgerichtete Immuntherapie im präklinischen murinen *Mlh1*<sup>-/-</sup> Tumormodell**

Inauguraldissertation zur  
Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin  
der Universitätsmedizin Rostock

*vorgelegt von*

**Julia Henne**  
aus Rostock

eingereicht am 18.06.2024



Dieses Werk ist lizenziert unter einer  
Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz.

## **Gutachter**

Erstgutachter:

PD Dr. Claudia Maletzki

Einrichtung:

Zentrum für Innere Medizin, Klinik für Hämatologie, Onkologie und  
Palliativmedizin, Universitätsklinik Rostock

Zweitgutachter:

Univ.-Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

Einrichtung:

Institut für Experimentelle Chirurgie, Zentrale Versuchstierhaltung,  
Universitätsmedizin Rostock

Drittgutachter:

Priv. Doz. Dr. med. Friederike Braulke

Einrichtung:

Universitätsmedizin Göttingen, UniversitätsKrebszentrum

eingereicht am:

18.06.2024

verteidigt am:

14.01.2025

---

## PUBLIKATIONEN

### Originalarbeiten

1. Salewski I\*, **Henne J\***, Engster L, Schneider B, Lemcke H, Skorska A, Berlin P, Henze L, Junghanss C, Maletzki C. Combined Gemcitabine and Immune-Checkpoint Inhibition Conquers Anti-PD-L1 Resistance in Low-Immunogenic Mismatch Repair-Deficient Tumors. *Int J Mol Sci.* 2021 Jun 1;22(11): 5990.  
**\*geteilte Erstautorenschaft**  
(IF 2021: 6,208)
2. Salewski I, **Henne J**, Engster L, Krone P, Schneider B, Redwanz C, Lemcke H, Henze L, Junghanss C, Maletzki C. CDK4/6 blockade provides an alternative approach for treatment of mismatch-repair deficient tumors. *Oncoimmunology.* 2022 Jul 11;11(1): 2094583.  
(IF 2022: 7,723)
3. Krone P, Wolff A, Teichmann J, Maennicke J, **Henne J**, Engster L, Salewski I, Bergmann W, Junghanss C, Maletzki C. Short-term immune-checkpoint inhibition partially rescues perturbed bone marrow hematopoiesis in mismatch-repair deficient tumors. *Oncoimmunology.* 2023 Jun 28;12(1):2230669.  
(IF 2023: 7,723)

### Kongressbeiträge

1. Krone P, Salewski I, **Henne J**, Engster L, Schneider B, Redwanz C, Junghanss C, Maletzki C. CDK4/6 Blockade als alternativer Ansatz zur Behandlung Mismatch-Reparatur-defizienter Tumoren. DGHO-Jahrestagung 2022. 07. – 10. Oktober 2022
2. Salewski I, Engster L, **Henne J**, Henze L, Junghanss C, Maletzki C. CDK4/6 blockade is as effective as immune-checkpoint inhibition in tumor growth control of Mlh1<sup>-/-</sup> and Msh2loxP/loxP villin-Cre mice. EMSO Annual Meeting, Paris 2021; *Annals of Oncology* (2021) 32 (suppl\_5): S361-S375. 10.1016/annonc/annonc684

---

# Inhaltsverzeichnis

|   |      |
|---|------|
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....   | VII  |
| TABELLENVERZEICHNIS .....   | VIII |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....  | IX   |
| <br>  |      |
| 1. EINLEITUNG .....   | 1    |
| 1.1. Mismatch-Repair-Defizienz .....                                | 1    |
| 1.1.1. Ätiologie .....  | 1    |
| 1.1.2. Klinisches Bild.....   | 4    |
| 1.1.2.1. Das Lynch-Syndrom .....                                    | 5    |
| 1.1.2.2. Konstitutionelle Mismatch-Repair-Defizienz.....            | 6    |
| 1.1.3. Diagnostik und Prävention .....                              | 6    |
| 1.1.4. Therapie und Prognose .....                                  | 7    |
| 1.1.5. MMR-knockout-Modelle.....                                    | 8    |
| 1.2. Tumormikromilieu .....   | 10   |
| 1.2.1. Das Tumormikromilieu und Immunescape-Mechanismen .....       | 10   |
| 1.2.2. Immuncheckpoint-Inhibition .....                             | 11   |
| 1.2.3. Zellzyklusinhibition .....                                   | 13   |
| 1.2.3.1. Immunstimulation durch Zellzyklusinhibition .....          | 14   |
| <br>  |      |
| 2. ZIELSTELLUNGEN .....   | 16   |
| <br>  |      |
| 3. MATERIAL UND METHODEN.....                                       | 17   |
| 3.1. Material .....   | 17   |
| 3.1.1. Laborgeräte .....  | 17   |
| 3.1.2. Verbrauchsmaterialien.....                                   | 18   |
| 3.1.3. Chemikalien .....  | 20   |
| 3.1.4. Medien, Puffer, Lösungen .....                               | 22   |
| 3.1.5. Antikörper.....  | 23   |
| 3.1.6. Kits .....   | 23   |
| 3.1.7. Primer .....   | 23   |
| 3.1.8. Software.....  | 23   |
| 3.1.9. Statistik.....   | 23   |
| 3.2. Methoden – <i>in vivo</i> .....                                | 25   |
| 3.2.1. Tierzucht und -haltung .....                                 | 25   |
| 3.2.2. Behandlungsprotokoll .....                                   | 25   |
| 3.2.3. Monitoring .....   | 27   |
| 3.2.3.1. Bildgebung mittels PET/CT.....                             | 27   |
| 3.2.3.2. Immunphänotypisierung des peripheren Blutes.....           | 28   |
| 3.2.4. Organaufbereitung.....                                       | 28   |
| 3.2.5. Analysen mittels Durchflusszytometrie .....                  | 30   |
| 3.2.5.1. Allgemeines Funktionsprinzip der Durchflusszytometrie..... | 30   |
| 3.2.5.2. Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie.....    | 30   |

|          |   |    |
|----------|---|----|
| 3.2.6.   | Herstellung von Gefrierschnitten.....   | 33 |
| 3.2.7.   | Immunfluoreszenzfärbung der Tumorschnitte.....                                | 33 |
| 3.2.8.   | Fragmentlängenanalyse.....  | 34 |
| 3.2.8.1. | <i>gDNA-Isolation aus Tumorzellproben</i> .....                               | 34 |
| 3.2.8.2. | <i>Polymerase-Kettenreaktion</i> .....  | 35 |
| 3.2.8.3. | <i>Aufarbeitung der PCR-Produkte für Fragmentlängenanalysen</i> .....         | 36 |
| 3.3.     | <b>Methoden – in vitro</b> .....  | 37 |
| 3.3.1.   | Zellbiologische Methoden.....   | 37 |
| 3.3.1.1. | <i>Verwendete Zelllinien</i> .....  | 37 |
| 3.3.1.2. | <i>Auftauen und Kryokonservierung von Zellen</i> .....                        | 37 |
| 3.3.1.3. | <i>ZK-Mediumwechsel, Zellzahlbestimmung und Aussäen von Zellen</i> .....      | 38 |
| 3.3.2.   | Kristallviolett- und Calcein-AM-Färbung zur IC <sub>50</sub> -Bestimmung..... | 38 |
| 3.3.3.   | Behandlung mit Zellzyklusinhibitoren.....                                     | 39 |
| 3.3.4.   | Analysen mittels Durchflusszytometrie.....                                    | 39 |
| 3.3.4.1. | <i>Immunogener Zelltod</i> .....  | 39 |
| 3.3.4.2. | <i>Immunphänotypisierung</i> .....  | 40 |
| 3.3.4.3. | <i>Zellzyklusanalyse</i> .....  | 40 |
| 3.3.4.4. | <i>Nachweis apoptotischer und nekrotischer Zellen</i> .....                   | 41 |
| 3.3.4.5. | <i>Ko-Kulturversuch</i> .....   | 41 |
| 4.       | <b>ERGEBNISSE</b> .....   | 43 |
| 4.1.     | <b>In vitro Analysen</b> .....  | 43 |
| 4.1.1.   | Immunogener Zelltod.....  | 43 |
| 4.1.2.   | Immunphänotypisierung.....  | 44 |
| 4.1.3.   | Zellzyklusanalyse.....  | 47 |
| 4.1.4.   | Nachweis apoptotischer und nekrotischer Zellen.....                           | 49 |
| 4.1.5.   | Ko-Kulturversuch.....   | 50 |
| 4.2.     | <b>In vivo Analysen</b> .....   | 52 |
| 4.2.1.   | Gesamtüberleben.....  | 52 |
| 4.2.2.   | Einfluss auf das Tumorwachstum.....   | 54 |
| 4.2.3.   | Phänotypisierung.....   | 55 |
| 4.2.4.   | Immunfluoreszenz.....   | 58 |
| 4.2.5.   | Histologische Untersuchung der Lebern.....                                    | 62 |
| 4.2.6.   | Fragmentlängenanalyse.....  | 63 |
| 4.2.6.1. | <i>Untersuchung nicht-kodierender Mikrosateliten</i> .....                    | 63 |
| 4.2.6.2. | <i>Untersuchung kodierender Mikrosateliten</i> .....                          | 64 |
| 4.2.7.   | Expressionslevel der Gene <i>Myc</i> und <i>Mxd4</i> .....                    | 64 |
| 5.       | <b>DISKUSSION</b> .....   | 65 |
| 5.1.     | <b>CDKI-Einfluss auf murine dMMR-Tumorzellen</b> .....                        | 65 |
| 5.1.1.   | Induzierbarkeit eines Zellzyklusarrest.....                                   | 66 |
| 5.1.2.   | Einfluss auf die Abundanz der Immuncheckpoint-Moleküle.....                   | 67 |
| 5.1.3.   | Induzierbarkeit von apoptotischem und nekrotischem Zelltod.....               | 68 |
| 5.1.4.   | Induzierbarkeit von immunogenem Zelltod.....                                  | 70 |
| 5.1.5.   | Interpretation der zelllinienspezifischen Ergebnisse.....                     | 70 |

---

|   |     |
|---|-----|
| <b>5.2. CDK4/6-Blockade als Alternative zur Immuncheckpoint-Inhibition</b> .....                        | 73  |
| 5.2.1. Reduziertes Tumorwachstum und verlängertes Gesamtüberleben .....                                 | 73  |
| 5.2.1.1. <i>Limitierte Wirksamkeit bei der Lymphombehandlung</i> .....                                  | 75  |
| 5.2.2. Verstärkte Immunmodulation durch die Kombinationsbehandlung .....                                | 76  |
| 5.2.3. Überlegenheit der Abemaciclibbehandlung .....  | 77  |
| 5.2.3.1. <i>Abemaciclib-induzierte Veränderung des Tumormikromilieus</i> .....                          | 77  |
| 5.2.3.2. <i>Abemaciclib-induzierte Aktivierung des Wnt-<math>\beta</math>-Signalweges</i> .....         | 78  |
| 5.2.3.3. <i>Potenzielle Toxizität der Kombinationstherapie</i> .....                                    | 80  |
| 5.2.4. Potenzielle Resistenzentwicklung gegenüber CDKIs .....   | 82  |
| 5.2.5. Stellenwert der personalisierten Medizin .....   | 83  |
| 5.2.6. Übertragbarkeit präklinischer Studien auf die klinische Anwendung .....                          | 84  |
| 5.2.6.1. <i>Generelle Limitationen von Mausmodellen</i> .....   | 84  |
| 5.2.6.2. <i>Übertragbarkeit des gewählten <math>Mlh1^{-/-}</math> Modells auf das Lynch-Syndrom</i> ... | 86  |
| <br>  |     |
| <b>6. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b> .....  | 88  |
| <b>7. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....  | 90  |
| <b>8. ANHANG</b> .....  | 116 |
| 8.1. <b>Anmerkung</b> .....   | 116 |
| 8.2. <b>Ergänzende Abbildungen</b> .....  | 116 |
| 8.3. <b>Antikörper</b> .....  | 118 |
| 8.4. <b>Primer</b> .....  | 121 |
| 8.5. <b>Thesen</b> .....  | 125 |
| <br>  |     |
| <b>9. LEBENS LAUF</b> .....   | 126 |
| <b>10. EIDESSTAATLICHE ERKLÄRUNG</b> .....  | 128 |
| <b>11. DANKSAGUNG</b> .....   | 129 |

---

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

|               |   |     |
|---------------|---|-----|
| Abbildung 1:  | Struktur und Funktion der MMR-Proteine.....   | 2   |
| Abbildung 2:  | Immunogenität von MSI- vs. MSS-Tumoren.....   | 4   |
| Abbildung 3:  | Diagnostischer Algorithmus des Lynch-Syndroms.....  | 7   |
| Abbildung 4:  | Überwindung tumoraler Immunescape-Mechanismen mittels<br>Immunecheckpoint-Inhibition.....   | 12  |
| Abbildung 5:  | Funktion und Blockade zellzyklusregulierender CDKs.....   | 13  |
| Abbildung 6:  | Immunmodulatorische Eigenschaften von Abemaciclib.....  | 14  |
| Abbildung 7:  | Behandlungsprotokoll und Verlaufskontrollen.....  | 27  |
| Abbildung 8:  | Anteil CalR <sup>+</sup> Zellen nach CDKI-Behandlung.....   | 44  |
| Abbildung 9:  | Phänotypisierung der Zelllinie <i>Mlh1</i> <sup>-/-</sup> A7450 T1 M1 nach<br>CDKI-Behandlung.....  | 45  |
| Abbildung 10: | Phänotypisierung der Zelllinie <i>Mlh1</i> <sup>-/-</sup> 328 nach CDKI-Behandlung.....   | 45  |
| Abbildung 11: | Phänotypisierung der Zelllinie <i>Mlh1</i> <sup>-/-</sup> 1351 nach CDKI-Behandlung.....  | 47  |
| Abbildung 12: | Zellzyklusanalyse der Zelllinien <i>Mlh1</i> <sup>-/-</sup> A7450 T1 M1, <i>Mlh1</i> <sup>-/-</sup> 328 und<br><i>Mlh1</i> <sup>-/-</sup> 1351 nach CDKI-Behandlung.....                              | 48  |
| Abbildung 13: | Nachweis apoptotischer und nekrotischer Zellen der Zelllinien <i>Mlh1</i> <sup>-/-</sup><br>A7450 T1 M1, <i>Mlh1</i> <sup>-/-</sup> 328 und <i>Mlh1</i> <sup>-/-</sup> 1351 nach CDKI-Behandlung..... | 49  |
| Abbildung 14: | Ko-Kultur: Anteil residualer Zellen der Linien <i>Mlh1</i> <sup>-/-</sup> A7450 T1 M1 und<br><i>Mlh1</i> <sup>-/-</sup> 328.....  | 50  |
| Abbildung 15: | Ko-Kultur: Phänotypisierung der murinen Leukozyten.....   | 51  |
| Abbildung 16: | Kaplan-Meier-Kurve. Gesamtüberleben der Tiere mit gastrointestinalen<br>Tumoren (links) und mit Lymphomen (rechts).....   | 53  |
| Abbildung 17: | Quantitative PET/CT-Auswertung.....   | 54  |
| Abbildung 18: | Quantitative PET/CT-Auswertung einzelner Versuchstiere.....   | 55  |
| Abbildung 19: | Immunphänotypisierung der Milzen.....   | 57  |
| Abbildung 20: | Immunphänotypisierung der Tumore.....   | 58  |
| Abbildung 21: | Immunfluoreszenzmikroskopie gastrointestinaler Tumorpräparate von<br><i>Mlh1</i> <sup>-/-</sup> Mäusen.....   | 59  |
| Abbildung 22: | Quantitative Auswertung der Infiltration durch T-Zellen.....  | 60  |
| Abbildung 23: | Semiquantitative Auswertung der Infiltration durch Tumor-assoziierte<br>Makrophagen und durch regulatorische Granulozyten.....  | 61  |
| Abbildung 24: | Quantitative Auswertung der Infiltration durch IRF5 <sup>+</sup> Zellen.....  | 61  |
| Abbildung 25: | HE-gefärbte Leberpräparate.....   | 62  |
| Abbildung 26: | Elektropherogramm der Fragmentlängenanalyse der <i>Mlh1</i> <sup>-/-</sup> Tumore.....  | 63  |
| Abbildung 27: | Expressionslevel der Gene <i>Myc</i> und <i>Mxd4</i> im Tumorgewebe.....  | 64  |
| Abbildung 28: | Immunphänotypisierung des peripheren Blutes.....  | 116 |
| Abbildung 29: | Nicht-kodierende MS-Mutationsfrequenz von Tumoren.....  | 117 |
| Abbildung 30: | Kodierende MS-Mutationsfrequenzen.....  | 117 |
| Abbildung 31: | <i>Score Sheet</i> .....  | 118 |

---

## TABELLENVERZEICHNIS

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 1: Klinischer Phänotyp des Lynch-Syndroms in Abhängigkeit des betroffenen MMR-Gens (modifiziert nach [27, 34]) ..... | 5  |
| Tabelle 2: Versuchsgruppen .....   | 26 |
| Tabelle 3: Verwendete Antikörper für die <i>in vivo</i> Phänotypisierung (BD FACSuite™) .....                                | 31 |
| Tabelle 4: Verwendete Antikörper für die <i>in vivo</i> Phänotypisierung (Cytex® Aurora) .....                               | 32 |
| Tabelle 5: Verwendete primäre Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung .....   | 33 |
| Tabelle 6: PCR-Ansatz .....  | 35 |
| Tabelle 7: Zeitlicher Ablauf der PCR .....   | 36 |
| Tabelle 8: Verwendete CDKIs mit Konzentrationsangaben .....  | 40 |
| Tabelle 9: Statistische Daten des Gesamtüberlebens .....   | 53 |

---

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|        |  |        |   |
|--------|--|--------|---|
| 5-FU   | <i>5-Fluoruracil</i>                             | MLH1   | <i>MutL Homolog 1</i>                               |
| Abema  | <i>Abemaciclib</i>                               | MMR    | <i>mismatch repair</i>                              |
| BSA    | <i>bovines Serumalbumin</i>                      | MS     | <i>Mikrosatelitten</i>                              |
| CalR   | <i>Calreticulin</i>                              | MSH    | <i>MutS Homolog</i>                                 |
| CDK    | <i>cyclin-dependent kinase</i>                   | MSI    | <i>Mikrosatelitteninstabilität</i>                  |
| CDKI   | <i>cyclin-dependent kinase inhibitors</i>        | MSI-H  | <i>MSI-high</i>                                     |
| CLL    | <i>Chronisch lymphatische Leukämie</i>           | MSS    | <i>Mikrosatelittenstabilität</i>                    |
| CMMR-D | <i>constitutional MMR deficiency</i>             | MXD4   | <i>MAX Dimerization Protein 4</i>                   |
| cMS    | <i>kodierende Mikrosatelitten</i>                | NCAPD2 | <i>non-SMC condensin I complex, subunit D2</i>      |
| CRC    | <i>colorectal cancer</i>                         | ncMS   | <i>nicht-kodierende Mikrosatelitten</i>             |
| CTL    | <i>cytotoxic t cell</i>                          | NHL    | <i>Non-Hodgkin-Lymphome</i>                         |
| CTLA-4 | <i>cytotoxic lymphocyte associated protein 4</i> | Palbo  | <i>Palbociclib</i>                                  |
| DC     | <i>dendritic cell</i>                            | PBS    | <i>phosphate buffered saline</i>                    |
| Dina   | <i>Dinaciclib</i>                                | PCNA   | <i>proliferating cell nuclear antigene</i>          |
| dMMR   | <i>defiziente MMR</i>                            | PCR    | <i>polymerase chain reaction</i>                    |
| DMSO   | <i>Dimethylsulfoxid</i>                          | PD-1   | <i>programmed death 1</i>                           |
| dNTP   | <i>desoxyNukleotidtriphosphate</i>               | PD-L1  | <i>PD-1-Ligand</i>                                  |
| EDTA   | <i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>              | PFA    | <i>Paraformaldehyd</i>                              |
| ER     | <i>Endoplasmatisches Retikulum</i>               | PI     | <i>Propidiumiodid</i>                               |
| FDA    | <i>Food and Drug Administration</i>              | RASAL2 | <i>RAS protein activator like 2</i>                 |
| FKS    | <i>fetales Kälberserum</i>                       | RB     | <i>Retinoblastom</i>                                |
| FMT    | <i>fäkale Mikrobiota-Transplantation</i>         | RECIST | <i>response evaluation criteria in solid tumors</i> |
| GSK-3  | <i>Glykogen-Synthase-Kinase 3</i>                | RFC    | <i>Replikationsfaktor C</i>                         |
| HE     | <i>Hämatoxylin-Eosin</i>                         | ROI    | <i>region of interest</i>                           |
| ICD    | <i>immunogenic cell death</i>                    | RT     | <i>Raumtemperatur</i>                               |
| ICI    | <i>Immunchekpoint-Inhibitor</i>                  | SDS    | <i>sodium dodecyl phosphate</i>                     |
| IFN    | <i>Interferon</i>                                | SR     | <i>Sarkoplasmatisches Retikulum</i>                 |
| IL     | <i>Interleukin</i>                               | SUV    | <i>standardized uptake value</i>                    |
| IRF5   | <i>Interferon Regulatory Factor 5</i>            | TAM    | <i>Tumor-assoziierte Makrophagen</i>                |
| irRC   | <i>immune-related response criteria</i>          | TIL    | <i>tumorinfiltrierende Lymphozyten</i>              |
| Kon    | <i>Kontrolle</i>                                 | TME    | <i>tumor microenvironment</i>                       |
| KV     | <i>Kristallviolett</i>                           | Tregs  | <i>regulatorische T-Zellen</i>                      |
| LAG-3  | <i>lymphocyte activation gene 3</i>              | WHO    | <i>World Health Organization</i>                    |
| LS     | <i>Lynch-Syndrom</i>                             | ZK     | <i>Zellkultur</i>                                   |
| Mdm2   | <i>mouse double minute 2 homolog</i>             |        |   |
| MDSC   | <i>myeloid derived suppressor cell</i>           |        |   |

---

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Mismatch-Repair-Defizienz

---

In einer einzigen menschlichen Zelle entstehen täglich 10.000 bis 1 Mio. DNA-Schäden. Um den Organismus vor den daraus resultierenden Mutationen und einer möglichen malignen Entartungen zu schützen, verfügt er über ein komplexes DNA-Reparatursystem. Ein wichtiger Bestandteil dieses Systems sind die Mismatch-Repair (MMR)-Proteine. Ihre Aufgabe ist es, Basenfehlpaarungen, Deletionen und Insertionen, die während der Replikation entstehen, zu erkennen und zu korrigieren. Sind diese Proteine in ihrer Funktion eingeschränkt, hat dies fatale Konsequenzen: Replikationsfehler und Mutationen können akkumulieren und schließlich zu einer Tumorgenese führen. In diesem Fall spricht man auch von einer defizienten MMR (dMMR). Die dMMR ist, mit Entitäten-spezifischen Prävalenzen, ursächlich für 16 % aller soliden Tumore [1–3].

### 1.1.1. Ätiologie

Das MMR-System kommt ubiquitär in allen Organismen vor, sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten [4]. Die Struktur und Funktion der MMR in humanen Zellen ist von der des Bakteriums *E.coli* abgeleitet, da diese Homologien zur eukaryotischen MMR zeigen. In *E. coli* gibt es drei Homodimere für die Reparatur: MutS, MutL und MutH [3]. Im Gegensatz zu Prokaryoten werden die eukaryotischen Homologe durch Heterodimere gebildet (s. Abbildung 1).

Für MutS sind beim Menschen fünf MutS Homologe (MSH) bekannt: MSH2 und MSH6, die den Komplex hMutSa bilden; MSH3, der zusammen mit MSH2 hMutß bildet; sowie MSH4 und MSH5, welche einen Komplex bilden, der an der Meiose, nicht aber an der DNA-Reparatur beteiligt ist. hMutSa und hMutSß obliegt gemeinsam die Aufgabe, Basenfehlpaarungen, Insertionen und Deletionen zu erkennen, an diese zu binden und daraufhin das MutL Homolog zu rekrutieren.

Bisher wurden vier MutL Homologe identifiziert: MutL Homolog 1 (MLH1), MLH3, PMS2 und PMS1, die ebenfalls Heterodimere bilden. hMutLß wird von MLH1 und PMS1 gebildet; hMutLa von MLH1 und PMS2. hMutLa bildet einen tetrameren Komplex mit hMutSa oder hMutSß. Durch das proliferating cell nuclear antigene (PCNA) sowie den Replikationsfaktor C (RFC) wird die Endonukleaseaktivität von hMutLa aktiviert, so dass nun ATP-abhängig die Inzision in den fehlerhaften Tochterstrang erfolgen kann. Anschließend folgt die

Exzision des Segmentes durch die von MSH2 oder MLH1 aktivierte Exonuklease 1. Die entstandene Exzisionslücke wird durch die DNA Polymerase  $\delta$  resynthetisiert [5–8].

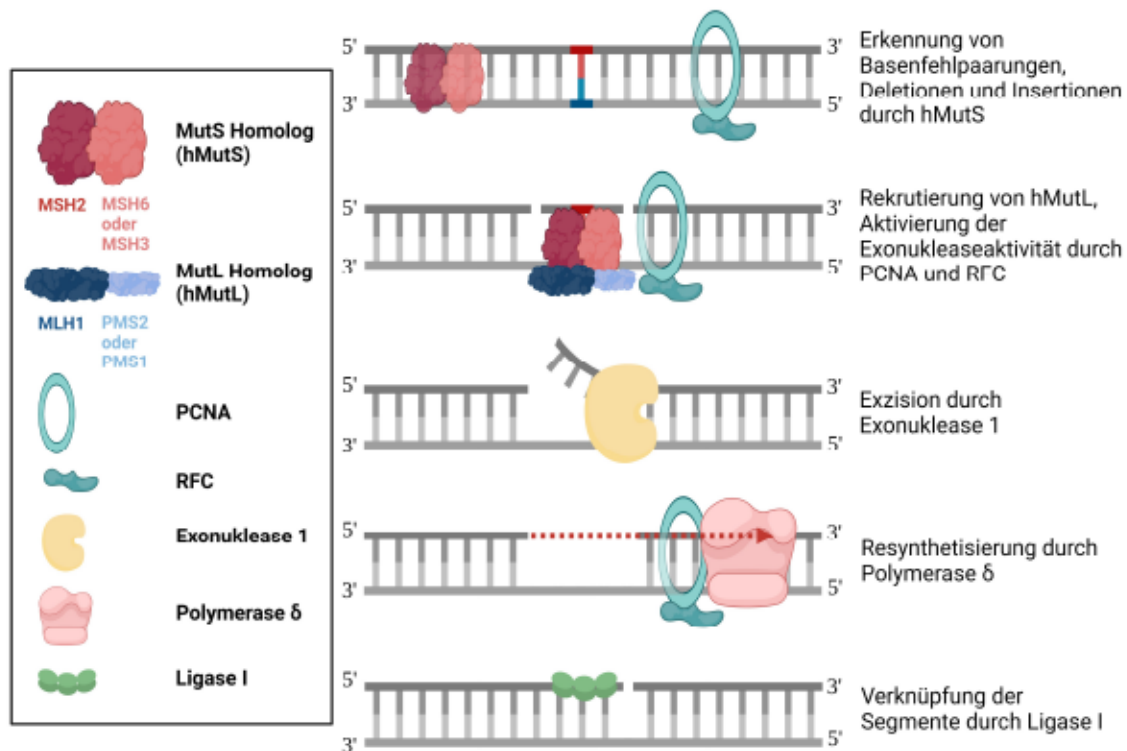


Abbildung 1 | Struktur und Funktion der MMR-Proteine.

Die MMR-Proteine liegen u.a. als Heterodimere (hMutS sowie hMutL) vor. Nach Erkennung von Basenfehlpaarungen, Insertionen oder Deletionen durch hMutS wird hMutL rekrutiert und es entsteht ein tetramerer Komplex. Durch PCNA sowie RFC wird die Exonukleaseaktivität von hMutL aktiviert. Die nach der Inzision aktivierte Exonuklease 1 exzidiert die fehlerhaften Segmente. Die Resynthese der Stränge erfolgt durch die Polymerase  $\delta$ , gefolgt von der Verknüpfung der neuen Segmente durch die Ligase I.

Quelle: erstellt mit *Biorender.com*, modifiziert nach [7]

*MMR: Mismatch-Repair; hMutS: MutS Homolog; hMutL: MutL Homolog; PCNA: proliferating cell nuclear antigene; RFC: Replikationsfaktor C*

Der Funktionsverlust führt zur Akkumulation von Mutationen und es resultiert ein ausgeprägter Tumorphänotyp. Zu den häufigsten, durch eine dMMR bedingten, Tumorentitäten zählen das kolorektale Karzinom (colorectal cancer, CRC), das Endometriumkarzinom, das Magenkarzinom sowie das Ovarial- und Urothelkarzinom [1, 9–11].

DMMR tritt sowohl hereditär als auch sporadisch auf. Bei der erstgenannten Form liegt eine heterozygote MMR-Keimbahnmutation vor. Das mutierte Allel ist somit in jeder Körperzelle vorhanden und kann an folgende Generationen vererbt werden. Das resultierende klinische Bild wird auch als Lynch-Syndrom (LS) bezeichnet. Dabei wird ein mutiertes Allel von den

Eltern vererbt, während ein Wildtypallel die Zelle vor dem vollkommenen Funktionsverlust des kodierten Proteins bewahrt. Nach der Knudson'schen double-hit-Hypothese führt erst der somatische Verlust des Wildtypallels zum tatsächlichen Funktionsverlust. Bei Vorliegen von zwei mutierten MMR-Kopien ist das resultierende Protein inaktiv und die Wahrscheinlichkeit einer Tumorentstehung steigt enorm. In 80-90 % der Fälle sind die Gene *MLH1* und *MSH2* betroffen, *MSH6*-Genmutationen umfassen ca. 10 % aller Fälle. Neuere Studien weisen Mutationen im *PMS2*-Gen mit einem Anteil von mehr als 6 % eine größere Bedeutung zu als bisher angenommen [12–15].

Bei einem Großteil der dMMR-assoziierten Karzinome ist keine Keimbahnmutation nachweisbar, hier handelt es sich um sporadische Formen. Der Funktionsverlust der MMR-Proteine bei diesem Kollektiv beruht auf einer epigenetischen Inaktivierung des *MLH1*-Gens durch eine Promotorhypermethylierung.

Der verbleibende Anteil an dMMR-Tumoren, die weder eine Keimbahnmutation noch eine *MLH1*-Promotormethylierung aufweisen, verfügt über biallelische somatische Mutationen, die hauptsächlich *MLH1* und *MSH2* betreffen [15–18].

Eine Defizienz der MMR-Proteine zeigt sich typischerweise in Mikrosateliten (MS)-Regionen. MS sind kurze, hochrepetitive DNA-Sequenzen, die sowohl in nicht-kodierenden als auch in kodierenden Regionen des Genoms vorkommen und sich mit einer Länge von 1-6 Basenpaaren ca. 10-60 Mal wiederholen. Aufgrund ihres repetitiven Musters sind MS besonders anfällig für Replikationsfehler und daher aufgrund ihrer hohen Mutationsrate auf DNA-Reparatursysteme angewiesen, wofür sie hauptsächlich das MMR-System nutzen. Ist dies aufgrund einer dMMR nicht mehr möglich, kommt es zu Leserasterverschiebungen durch Deletionen oder Insertionen. Diese MS-Längenveränderung wird auch als Mikrosateliteninstabilität (MSI) bezeichnet [19–22].

Tritt eine MSI in kodierenden Gensequenzen auf, werden Gene inaktiviert oder funktionslose Proteine translatiert, die an wichtigen zellulären Prozessen beteiligt sind. Hierzu gehören Gene der Signaltransduktion (*TGFBRII*, *IGFIIR*, *PTEN*), der Apoptose (*BAX*, *CASP5*), der DNA-Reparatur (*MSH3*, *MSH6*, *MBD4*) oder der Immunüberwachung (*B2M*). Das mit 90 % am häufigsten betroffene Gen ist *TGFBRII*, das für den Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ , ein potenter Inhibitor des epithelialen Zellwachstums, kodiert [23–25].

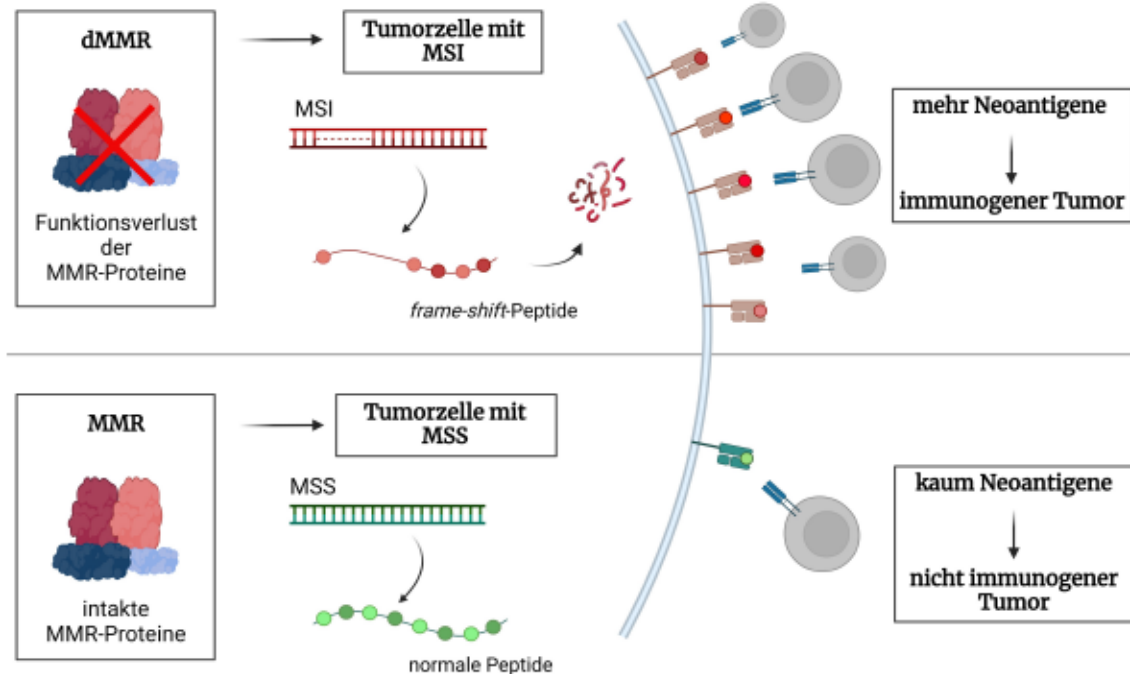


Abbildung 2 | Immunogenität von MSI- vs. MSS-Tumoren.

Durch eine dMMR kommt es zu Leserasterverschiebung in MS-Regionen, resultierend in einer MSI. Durch die Akkumulation von Mutationen werden vermehrt frame-shift-Peptide translatiert, welche über MHC-I-Moleküle dem Immunsystem präsentiert werden und somit T-Lymphozyten aktivieren. Bei intakter MMR werden keine MSI-spezifischen Neoantigene präsentiert. Eine Immunantwort bleibt sehr wahrscheinlich aus.

Quelle: erstellt mit *Biorender.com*, modifiziert nach [26]

*MSI: Mikrosatelliteninstabilität/mikrosatelliteninstabil; MSS: Mikrosatellitenstabilität/mikrosatellitenstabil; MS: Mikrosatelliten; MMR: Mismatch-Repair*

Unabhängig von der Genese führt eine dMMR und die daraus resultierende MSI fast immer zum sogenannten Mutatorphänotyp. Multiple akkumulierte Mutationen führen während der Translation zu sogenannten frame-shift-Peptiden, die an der Oberfläche maligner Zellen als Neoantigene präsentiert und vom Immunsystem erkannt werden (s. Abbildung 2). Aufgrund der hohen Abundanz an Neoantigenen und der dadurch resultierenden hohen Immunogenität sind dMMR-assoziierte Tumore prädestiniert für Immuntherapien [27, 28].

### 1.1.2. Klinisches Bild

Eine epidemiologische Metaanalyse im Jahr 2020 hat die Prävalenz einer dMMR und einer hohen MSI-Rate (MSI-high, MSI-H) unter soliden Tumoren untersucht. Es ergab sich, dass bei 16 % der soliden Tumore eine dMMR/MSI-H vorlag. Bei einer Prävalenz solider Tumore von ca. 3 Mio. im Jahr 2019 in Deutschland entspräche dies 480.000 betroffenen Patienten.

Das Krankheitsbild der Patienten ist sehr heterogen. Während bei den sporadischen Formen eher Frauen über 60 Jahre betroffen sind, ist das Patientenkollektiv bei LS-Betroffenen deutlich jünger [1, 29, 30].

### 1.1.2.1. Das Lynch-Syndrom

Das LS folgt einem autosomal-dominanten Erbgang und betrifft Männer und Frauen gleichermaßen. Die Prävalenz in der Allgemeinbevölkerung wird laut Studien auf 1 zu 279 geschätzt und ist damit das häufigste Tumorprädispositionssyndrom. Das kumulative Lebenszeitrisko, ein Karzinom zu entwickeln, liegt bei 70-80 %. Der klinische Phänotyp und das Lebenszeitrisko, an einem Tumor zu erkranken, variieren in Abhängigkeit der betroffenen Gene [31–33]. Die wichtigsten Charakteristika sind in Tabelle 1 dargestellt:

**Tabelle 1** | Klinischer Phänotyp des Lynch-Syndroms in Abhängigkeit des betroffenen MMR-Gens (modifiziert nach [27, 34]).

| Mutiertes Gen   | Klinischer Phänotyp  | Mutationshäufigkeit<br>Lebenszeitrisko    |
|---|--|---|
| <i>MLH1</i>   | Klassisches LS mit Tendenz zum CRC, extrakolische Manifestationen seltener als bei <i>MSH2</i> -Mutationen | 15 - 40 %<br>♂: 27 - 74 %<br>♀: 22 - 53 % |
| <i>MSH2</i>   | Klassisches LS mit Tendenz zum CRC, häufig extrakolische Manifestationen, Muir-Torre-Syndrom               | 20 - 40 %<br>♂: 27 - 74 %<br>♀: 22 - 53 % |
| <i>MSH6</i>   | Endometriumkarzinome, manchmal MSI-L   | 12 - 35 %<br>♂+♀: 10 - 22 %               |
| <i>PMS2</i>   | Niedrige Tumorinzidenz, höheres Alter bei Erstmanifestation, Polypen, Turcot-Syndrom                       | 5 - 25 %<br>♂+♀: 10 - 22 %                |
| <i>EPCAM</i>  | Siehe <i>MSH2</i> -Mutation  | < 10 %                                    |
| <b>Biallelische Mutation (alle MMR-Gene involviert)</b> | Konstitutionelle dMMR (s. 1.1.2.2.)  |   |

*MMR*: Mismatch-Repair; *LS*: Lynch-Syndrom; *CRC*: Kolorektales Karzinom; *MSI-L*: MSI-low, geringe Mikrosateliteninstabilität

Neben dem Alter bei Erstmanifestation und der häufigeren Lokalisation im rechten Hemikolon unterscheiden sich LS-assoziierte Tumore von sporadischen CRCs durch die hohe Rate an syn- und metachronen Tumoren.

Pathologisch stellen sich Karzinome und Vorläuferläsionen beim LS, neben der MSI, als schlechter differenziert dar und weisen vermehrt villöse Komponenten auf. Ein weiteres pathologisches Hauptmerkmal sind vermehrte lymphozytäre Infiltrationen, bedingt durch die hohe Immunogenität.

### *1.1.2.2. Konstitutionelle Mismatch-Repair-Defizienz*

Biallelische MMR-Mutationen führen zur konstitutionellen MMR-Defizienz (constitutional MMR deficiency, CMMR-D). Dieses seltene Tumorprädispositionssyndrom folgt einem autosomal-rezessiven Erbgang und ist mit einer hohen Penetranz sowie einem frühen Erkrankungsalter (häufig < 2 Jahren) vergesellschaftet [27]. Typisch für die CMMR-D ist das gehäufte Auftreten von hämatologischen Neoplasien sowie Hirntumoren. LS-typische Malignitäten sind ebenfalls beschrieben. Bei fast allen CMMR-D-Fällen treten Merkmale einer Neurofibromatose Typ 1 auf: z.B. multiple Café-au-lait-Flecken, Lisch-Knötchen oder Neurofibrome.

Die CMMR-D tritt vor allem in Familien mit einer gehäuften Prävalenz von LS-typischen Karzinomen sowie im Zusammenhang mit Konsanguinität auf.

Aufgrund der Seltenheit des Syndroms sind nur einige hundert Fälle in der Literatur beschrieben. Dies liegt allerdings auch daran, dass die CMMR-D häufig übersehen und fehldiagnostiziert wird. So lassen Studien aus Jordanien, wo Konsanguinität gehäuft vorkommt, vermuten, dass dort jedes zweite Glioblastoma multiforme auf eine CMMR-D zurückzuführen ist [35–38].

### **1.1.3. Diagnostik und Prävention**

Um Patienten mit Verdacht auf ein LS zu selektieren, wurden die Amsterdam- sowie die revidierten Bethesda-Kriterien entwickelt [35–42]. Bei gesunden Anlageträgern, die alle Amsterdam-Kriterien erfüllen, kann eine alleinige Keimbahnanalyse zum Nachweis der spezifischen MMR-Mutation erfolgen. Selbiges gilt für Angehörige von Keimbahnmutationsträgern, welche präventiv untersucht werden sollen. Bestätigt sich die Verdachtsdiagnose, werden die Patienten in das Vorsorgeprogramm aufgenommen.

Bei bereits erkrankten Personen umfasst die Diagnostik den immunhistochemischen Nachweis des Ausfalls der MMR-Proteine (MLH1, PMS2, MSH2 und MSH6) sowie eine MSI-Analyse unter Verwendung des Bethesda-Panels [10]: zwei Mononukleotide (*BAT-25*,

*BAT-26*) und drei Dinukleotide (*D2S123*, *D5S346*, *D7S250*) [41]. Wenn mehr als 30 % der Marker oder  $\geq 2$  Marker eine Instabilität aufweisen, wird der Tumor als MSI-H eingestuft.

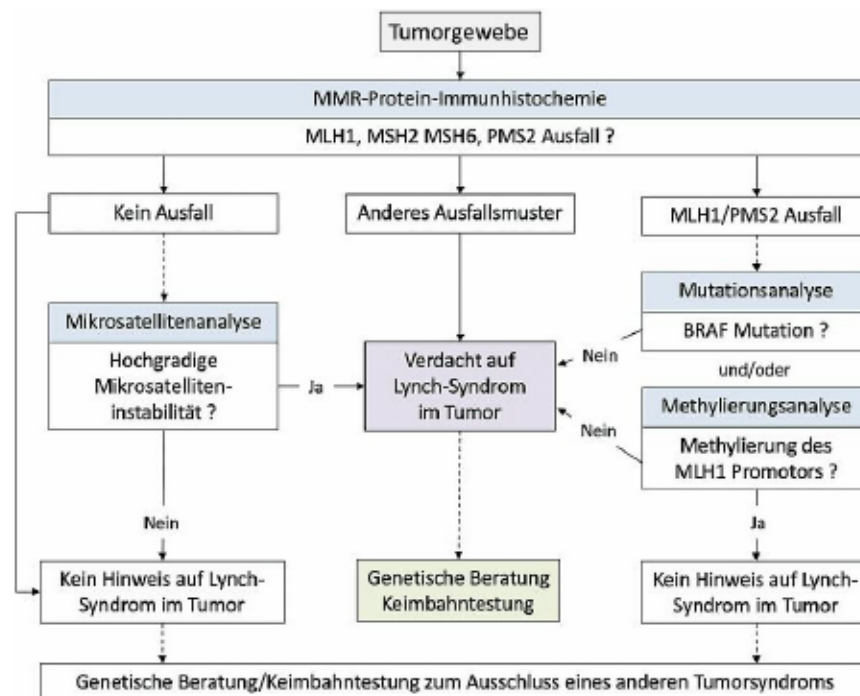


Abbildung 3 | Diagnostischer Algorithmus des Lynch-Syndroms.

Quelle: [41]

LS: Lynch-Syndrom

#### 1.1.4. Therapie und Prognose

Die Erstlinientherapien richtet sich derzeit in der Regel nicht nach dem MSI-Status, sondern nach dem UICC-Stadium der Erkrankung [42]. So wird z.B. das CRC im Rahmen eines LS genauso behandelt wie das sporadische CRC. Die einzige kurative Maßnahme ist die chirurgische Resektion, zusätzlich wird ab Stadium III immer eine adjuvante Chemotherapie empfohlen. Studien haben gezeigt, dass CRCs mit einer dMMR/MSI weniger gut auf die Standardchemotherapeutika ansprechen als MSS-CRCs, so dass in diesen Fällen im Stadium II von einer adjuvanten Chemotherapie abgeraten wird. Als Ursache wird eine Resistenz gegen die verwendeten Therapeutika 5-Fluoruracil (5-FU) und platinhaltige Zytostatika vermutet [43–46]. Als weitere Erstlinientherapie für das metastasierte MSI-CRC sind seit 2020 auch immuntherapeutische Behandlungen zugelassen. Aufgrund der bereits erwähnten hohen Immunogenität dMMR-assoziierter Tumore sowie der hohen basalen Expression von

Immuncheckpoint-Molekülen, werden Immuncheckpoint-Inhibitoren (ICIs) eingesetzt [47]. Neben dem ICI Pembrolizumab, sind für das metastasierte CRC weitere ICIs zugelassen, allerdings nur in der Zweitlinientherapie (s. 1.2.2.).

Insgesamt haben dMMR/MSI-Tumore im Vergleich zum MSS-Pendant eine, vermutlich immunologisch vermittelte, günstigere Prognose [10, 43].

### 1.1.5. MMR-knockout-Modelle

Zur Durchführung präklinischer Studien zur dMMR wurden verschiedene Mausmodelle etabliert. Dabei handelt es sich um knockout-Mäuse, die häufig eine homozygote Deletion eines MMR-Gens tragen.

*Mlh1*<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen, ebenso wie *Msh2*<sup>-/-</sup> Mäuse, eine deutlich verkürzte Lebenserwartung von bis zu 12 Monaten sowie einen ausgeprägten Tumorphänotyp. So entwickeln mindestens 90 % der Tiere sowohl extraintestinale als auch intestinale Manifestationen. Die Tiere zeigen eine hohe Inzidenz von MSI-H-Tumoren des Gastrointestinaltraktes, sowie von T-Zell-Lymphomen und Hauttumoren. Im Gegensatz zur humanen Kanzerogenese sind gastrointestinale Tumore der Mäuse jedoch eher im Dünndarm als im Kolon lokalisiert [48, 49].

#### Vorarbeiten der Arbeitsgruppe an der *Mlh1*<sup>-/-</sup> Mauslinie

Bereits durchgeführte Studien konnten zeigen, dass die *Mlh1*<sup>-/-</sup> Tiere zwei Häufigkeitsgipfel bei der Tumorentstehung aufweisen, welche häufig nach dem „Entweder-Oder“-Prinzip ablaufen [50]. Diese sind charakterisiert durch eine frühe Lymphomagenese oder eine eher spätere Entwicklung von intestinalen Tumoren. Weibliche Tiere entwickelten häufiger T-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) im Thymus oder der Milz, welche sich durch ein äußerst aggressives Wachstum auszeichnen. Im Gegensatz dazu waren ca. 80 % der Tiere, die einen gastrointestinalen Tumor entwickelten, männlich. Hier war die Tumorgenese neben dem späteren Auftreten durch eine häufige Lokalisation im Duodenum charakterisiert.

Molekularbiologische Untersuchungen konnten zeigen, dass die Tumore eine hohe Mutationslast aufwiesen, welche eine weite Spanne von 39-943 Mutationen/Megabase umfasste. >10 Mutationen/Megabase werden als hypermutiert, >100 Mutationen/Megabase werden als ultra-hypermutiert bezeichnet.

Das *Mlh1*-knockout-Modell stellt nicht nur ein geeignetes Modell für das LS sowie dMMR-assoziierte, gastrointestinale Tumore dar, sondern weist darüber hinaus aufgrund der

biallelischen Mutation, dem Auftreten ultra-hypermutierter Neoplasien sowie der Lymphomagenese auch Analogien zur CMMR-D auf.

### 1.2. Tumorimmunologie

---

Die Tumorimmunologie hat in den jüngsten Jahrzehnten wesentliche Erkenntnisse erbracht und damit auch zur Entstehung neuer Therapieoptionen in der Krebsbehandlung beigetragen. Die Anfänge der Tumorimmunologie lassen sich bereits auf das 19. Jahrhundert zurückdatieren. 1891 beobachtete der Arzt William B. Coley spontane Tumorregressionen bei Krebspatienten im Zusammenhang mit dem Auftreten von Erysipelen. Daraus schlussfolgerte er, dass die Aktivierung des Immunsystems Einfluss auf das Tumorwachstum hatte und begann, Sarkompatienten mit nicht-resektablen Tumoren inaktivierte Bakterien zu injizieren (*Streptococcus pyogenes* und *Serratia marcescens* = *Coley's Toxin*) [51–53]. Obwohl es ihm gelang, eine Tumorregression bei vielen Patienten zu induzieren, wurde seine Methode zur damaligen Zeit verkannt, da ein tiefgehendes Verständnis der Tumorimmunologie fehlte. Erst durch die Erkenntnisse der letzten Jahrzehnte konnte Coleys ursprüngliche Idee einer immunvermittelten Krebstherapie wieder aufgegriffen und weiterentwickelt werden. Ab der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurde immer mehr Wissen rund um das Immunsystem und dessen Einfluss auf Tumorgenese und -progress akquiriert: so wurde 1967 erstmals die Existenz und Bedeutung von T-Zellen beschrieben, 1981 wurde die erste Vakzine entwickelt, welche auf Oberflächenmolekülen basierte, 1987 wurde das erste Immuncheckpoint-Molekül identifiziert [54]. Durch den stetigen Zuwachs an immunologischem Wissen eröffnete sich so das Feld der zielgerichteten Immuntherapie für diverse Entitäten.

#### 1.2.1. Das Tumormikromilieu und Immunescape-Mechanismen

Forschungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass die Entwicklung und der Verlauf einer Krebserkrankung nicht nur von den neoplastischen Zellen selbst, sondern auch von deren Interaktion mit dem Tumormikromilieu (tumor microenvironment, TME) abhängt. Dieses setzt sich u.a. aus dem umgebenden Stroma, Blutgefäßen und infiltrierenden Immunzellen zusammen. Letztere umfassen sowohl tumorinfiltrierende Lymphozyten (TILs), darunter antitumorale CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen und CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen (cytotoxic T cells, CTLs), als auch protumorale Makrophagen, regulatorische T-Zellen (Tregs) und myeloide Suppressorzellen (myeloid-derived suppressor cells, MDSCs) [55, 56].

Tumore haben verschiedene Immunescape-Mechanismen entwickelt, um sich der Überwachung durch das Immunsystem zu entziehen. Zu diesen zählen u.a. das Tumorstroma, die Sekretion immunsuppressiver Interleukine wie IL-10 und TGF- $\beta$ , so wie der Verlust der

MHC-I-Expression von Tumorzellen. In einer Studie konnte bei 78 % der CRC-Proben mit einer dMMR ein MHC-I-Verlust nachgewiesen werden [57–59].

Wird dieses immunsuppressive Milieu über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten, so kommt es zu einer sogenannten T-Zell-Erschöpfung, charakterisiert durch eine Dysfunktion der T-Lymphozyten sowie einer vermehrten Expression der inhibitorischen Checkpointmoleküle programmed death 1 (PD-1), cytotoxic T lymphocyte associated protein 4 (CTLA-4) und lymphocyte activation gene 3 (LAG-3). PD-1 kommt auf der Oberfläche aktivierter T- und B-Lymphozyten sowie einiger Tumore vor. Nach Bindung des T-Zellrezeptors an MHC-I, kommt es zur Ausschüttung inflammatorischer Zytokine wie Interferon (IFN)- $\gamma$ , die wiederum die Expression des PD-1-Liganden (PD-L1) auf der Tumorzelle induzieren. Durch die Bindung von PD-1 an PD-L1, also einer direkten Interaktion zwischen Tumorzelle und CTL, wird eine zielgerichtete Immunantwort unterdrückt [60–65]. Ein weiteres zentrales Checkpointmolekül ist CTLA-4, welches sowohl von aktivierten CD4<sup>+</sup> als auch von CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert wird. Eine permanente CTLA-4-Expression konnte für Tregs nachgewiesen werden, welche durch Sekretion immunsuppressiver Zytokine indirekt PD-L1 auf dendritischen Zellen (dendritic cells, DCs) induzieren. Neben der Inhibition der T-Zellfunktion verhindern Immuncheckpoints die Bildung von T-Gedächtniszellen, wodurch eine andauernde Tumormuninität unterbunden wird [66–69].

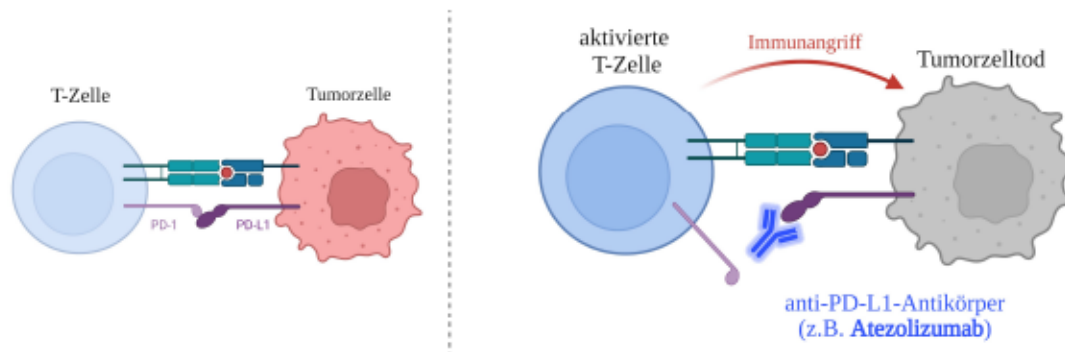
Weitere Immunescape-Mechanismen im TME umfassen die Akkumulation und Invasion von MDSCs. MDSCs bilden eine heterogene Gruppe aus unterschiedlichen unreifen, myeloiden Vorläuferzellen von DCs, Makrophagen, und Granulozyten. Darüber hinaus wurden kürzlich Zusammenhänge zwischen MDSCs und der Expression von Immuncheckpoint-Molekülen entdeckt. Demnach zeigen tumorinfiltrierende MDSCs eine hohe Expression von PD-1, PD-L1 und CTLA-4. Zusätzlich wird vermutet, dass MDSCs in Tumorzellen PD-L1 induzieren können und somit global immunsupprimierend wirken [60, 71–73].

### 1.2.2. Immuncheckpoint-Inhibition

Die Immuntherapie hat sich in den letzten Jahren neben der Chirurgie, Chemotherapie und Radiatio zunehmend als vierte Säule der Krebstherapie etabliert. Während konventionelle Therapien primär die Tumorzellen selbst als Zielstrukturen haben, steht bei der Immuntherapie die Modulation des Immunsystems im Vordergrund, um dessen antitumorale Eigenschaften zu verstärken. Ein wesentlicher Bestandteil hierbei ist die Überwindung der

beschriebenen Immunescape-Mechanismen, was durch die Blockade von Checkpointmolekülen mittels ICIs effektiv erreicht werden kann (s. Abbildung 4).

Seit der ersten Zulassung eines ICIs (CTLA-4-Inhibitor: Ipilimumab, 2011 [54]) durch die FDA, folgen immer mehr Präparate, die zunehmend die moderne Krebstherapie revolutionieren.



**Abbildung 4 | Überwindung tumoraler Immunescape-Mechanismen mittels Immuncheckpoint-Inhibition.**

Um der Immunüberwachung zu entgehen, kommt es auf der Tumorzelloberfläche zu einer vermehrten Expression von Immuncheckpoint-Molekülen wie PD-L1. Nach Bindung seines Rezeptors PD-1, welcher sich auf T-Zellen befindet, wird die T-Zelle inaktiviert. Durch eine Therapie mit ICIs wie Atezolizumab wird die Blockade blockiert, so dass es zu einem Angriff der T-Zellen gegen den Tumor kommen kann.

Quelle: erstellt mit *Biorender.com*, modifiziert nach [74]

*ICI: Immuncheckpoint-Inhibitor*

Studien haben gezeigt, dass ICIs bei dMMR/MSI-H-Patienten aufgrund der hohen Tumorimmunogenität besonders wirksam sind [47, 75–80]. So liegt das Therapieansprechen bei einer Behandlung mit dem PD-1-Inhibitor Pembrolizumab entitätenübergreifend im Mittel bei ca. 60 %, während Patienten mit einem MSS-CRC nahezu kein Ansprechen zeigten [81]. Basierend auf diesen und zahlreichen weiteren Studien, erfolgten in den letzten Jahren seitens der FDA Zulassungen von ICIs für dMMR/MSI-assoziierte Tumore: Nivolumab (PD-1-Inhibitor) als Monotherapie für das metastasierte dMMR/MSI-CRC als Zweitlinientherapie (2017), Ipilimumab (CTLA-4-Inhibitor) in Kombination mit Nivolumab für das metastasierte dMMR/MSI-CRC als Zweitlinientherapie (2018), Dostarlimab für dMMR-assoziierte solide Tumore als Zweitlinientherapie (2021) sowie Pembrolizumab als Monotherapie für das metastasierte MSI-CRC als Erstlinientherapie (2020) [28]. PD-L1-Inhibitoren sind bislang für dieses Patientenkollektiv noch nicht zugelassen.

### 1.2.3. Zellzyklusinhibition

Ein wichtiges Merkmal maligner Zellen ist die Dysregulation des Zellzyklus, die zu einer anhaltenden und unkontrollierten Proliferation führt. Essentielle Regulatoren des Zellzyklus sind Cyclin-abhängige Kinasen (cyclin-dependent kinases, CDKs), die mit ihrem jeweiligen Cyclin einen Komplex bilden. Sie kontrollieren den Übergang einer Zellzyklusphase in die nächste (G<sub>1</sub>-, S (DNA-Synthese)-, G<sub>2</sub>- und M (Mitose)-Phase), wobei für jede Phase spezifische CDKs verantwortlich sind. Eine Übersicht ist in Abbildung 5 dargestellt. Der molekulare Vorgang wird hier kurz anhand der G<sub>1</sub>-Phase umrissen [82]: Der Übergang der G<sub>1</sub>- in die S-Phase wird durch CDK4, CDK6 und CDK2 reguliert. Nachdem diese durch extrazelluläre Signale aktiviert wurden, phosphorylieren sie ihr zentrales Substrat, das Retinoblastom (RB)-Protein. Das RB-Protein ist ein wachstumshemmender Tumorsuppressor und blockiert den Transkriptionsfaktor E2F. Die Phosphorylierung des RB-Proteins ermöglicht dessen Dissoziation von E2F und damit die Transkription von Genen, die für den Übergang in die S-Phase und die DNA-Synthese benötigt werden. Die Inhibition der CDKs durch Zellzyklusinhibitoren (cyclin-dependent kinase inhibitors, CDKIs) führt zu einem Zellzyklusarrest, der in der Krebstherapie genutzt werden kann.

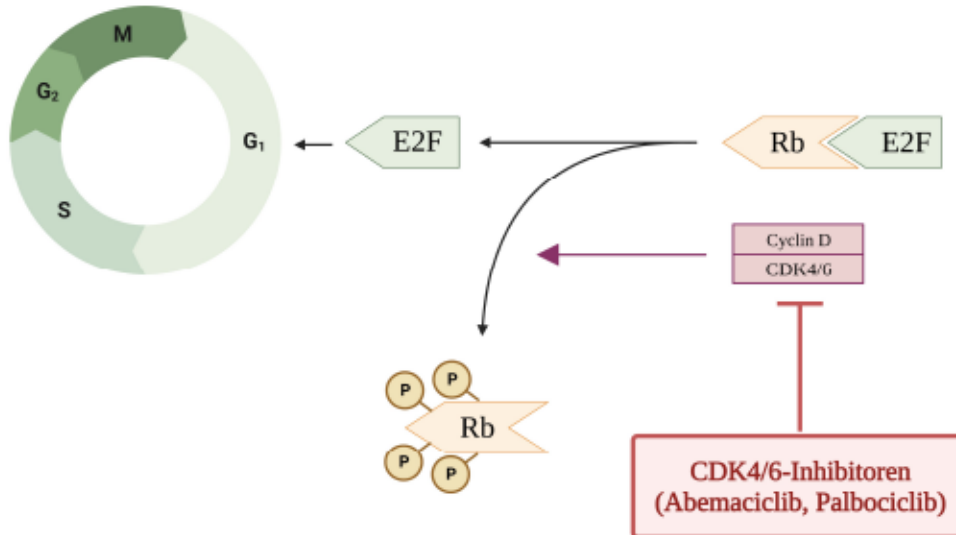


Abbildung 5 | Funktion und Blockade zellzyklusregulierender CDKs.

CDKs regulieren den Übergang einer Zellzyklusphase in die nächste. CDK4/6 regulieren den Übergang von der G<sub>1</sub>- in die S-Phase, indem sie das Retinoblastom (RB)-Protein phosphorylieren, welches nun vom Transkriptionsfaktor E2F dissoziieren kann. Durch E2F kommt es zur Transkription von Genen, welche essentiell für den Phasenübergang sind. Durch eine Inhibition von CDK4/6 durch Abemaciclib oder Palbociclib wird ein Zellzyklusarrest in der G<sub>1</sub>-Phase initiiert.

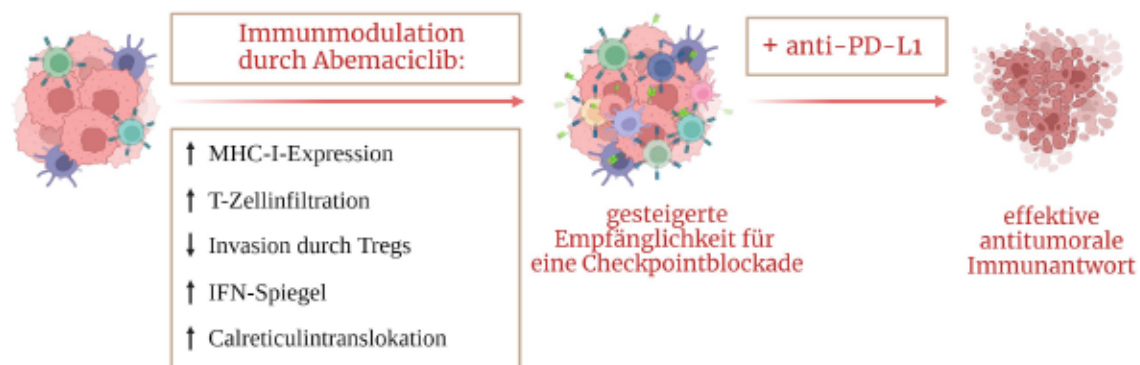
Quelle: erstellt mit *Biorender.com*, modifiziert nach [83]

CDK: cyclin dependent kinase

Die erste Zulassung für einen CDKI seitens der FDA erfolgte 2015 für den CDK4/6-Inhibitor Palbociclib. Darauf folgten Zulassungen für Ribociclib und Abemaciclib, die ebenfalls zur Gruppe der CDK4/6-Inhibitoren zählen. Alle drei Medikamente sind bisher ausschließlich zur Behandlung des Hormonrezeptor-positiven/HER2-negativen Mammakarzinoms indiziert. Eine große Vielzahl weiterer CDKIs befindet sich in klinischen und präklinischen Studien, dazu gehören beispielsweise der CDK 12/1/2/5/9-Inhibitor Dinaciclib und der kovalente CDK 7/12/13-Inhibitor THZ1 [83–86].

### 1.2.3.1. Immunstimulation durch Zellzyklusinhibition

Der Wirkmechanismus der CDKIs geht über den Zellzyklusarrest hinaus und umfasst verschiedene immunstimulatorische Eigenschaften. So konnte gezeigt werden, dass CDKIs *in vivo* zu erhöhten Typ-III-IFN-Spiegeln, zur erhöhten MHC-I-Expression sowie gleichzeitig zu einer verringerten Infiltration durch Tregs führen. CDKIs sind somit in der Lage, ein proinflammatorisches TME zu fördern und damit die Immunogenität von Tumoren sowie die T-Zellinvasion zu steigern. Des Weiteren bewirken sie eine Translokation von Calreticulin (CalR) an die Zelloberfläche und induzieren einen immunogenen Zelltod (immunogenic cell death, ICD) [87–91].



**Abbildung 6 | Immunmodulatorische Eigenschaften von Abemaciclib.**

Durch eine Abemaciclib-vermittelte Modulation des Immunsystems wird das TME verändert und die Empfindlichkeit des Tumors für eine ICI-basierte Therapie gesteigert.

Quelle: erstellt mit *Biorender.com*

*Tregs: regulatorische T-Zellen; IFN: Interferon; CalR: Calreticulin; TME: tumor microenvironment; ICI: Immuncheckpoint-Inhibitor*

Unter Zusammenschau dieser Aspekte ergibt sich die Rationale einer Kombination von CDKI und ICI (s. Abbildung 6). Eine Kombination beider Substanzklassen wurde bereits *in vitro* und *in vivo* mit vielversprechenden Ergebnisse untersucht [90]. Es konnte gezeigt werden, dass CDKs auf molekularer Ebene in die Expression von Checkpointmolekülen involviert sind. Folglich kann die Expression durch eine Inhibition der CDKs gesteigert werden. Dadurch werden Tumore zugänglicher für eine Immuntherapie und es kann eventuellen Resistenzmechanismen einer ICI-Therapie entgegengewirkt werden. Es konnte gezeigt werden, dass CDKIs die allgemeine T-Zellfunktion über eine Modulation des TME steigern, sowie ein immunologisches Gedächtnis über die Induktion von T-Gedächtniszellen generieren, welches möglicherweise vor einem Tumorrezidiv schützt [88, 91–93].

Studien untersuchten bereits Kombinationstherapien mit Abemaciclib und einem PD-L1-Inhibitor an Mausmodellen und konnten sowohl einen Tumorregress als auch ein deutlich verlängertes Überleben nachweisen [92]. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Dissertation das Potential einer CDKI-basierten Kombinationstherapie eruiert.

---

## 2. ZIELSTELLUNGEN

In der vorliegenden Arbeit sollte die Effektivität einer alleinigen Zellzyklusblockade sowie einer Kombination aus Zellzyklus- und Immuncheckpoint-Inhibition bei dMMR/MSI-assoziierten Tumoren untersucht werden.

Grundlage hierfür waren vorangegangene Studien, in denen die Wirksamkeit einer Immuncheckpoint-Inhibition im präklinischen murinen *Mlh1*-knockout-Modell nachgewiesen werden konnte. Das Modell basiert auf einer Keimbahnmutation der MMR-Proteine und repräsentiert somit diverse Tumorentitäten, die mit einer MSI vergesellschaftet sind - insbesondere das CRC.

Zur Eruiierung der gewählten immunologischen Therapieansätze sollten zunächst unterschiedliche Zellzyklusinhibitoren *in vitro* getestet werden. Ziel war es, neben der Untersuchung der Zytotoxizität, erstmalig auch die Induktion immunmodulatorischer Effekte bei MSI-Tumorzellen nachzuweisen.

Nach Auswahl eines adäquaten Inhibitors erfolgte die *in vivo* Testung im Mausmodell. Vordergründig sollten die Auswirkungen der Mono- und Kombinationstherapie auf das Gesamtüberleben sowie das Tumorwachstum ermittelt werden. Darüber hinaus wurde geprüft, inwiefern die applizierten Substanzen Einfluss auf das Immunsystem nehmen.

Schlussendlich wurde nach Zusammenschau aller Ergebnisse geprüft, inwiefern Zellzyklusinhibitoren – ob als Kombinationspartner oder als Monotherapie – eine Relevanz für die Behandlung von MSI-Tumorentitäten haben und welche klinische Rolle sie in Zukunft spielen könnten.

---

### 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1. Material

---

##### 3.1.1. Laborgeräte

| <b>Laborgeräte</b>                                  | <b>Hersteller</b>  | <b>Hauptsitz</b>                       |
|---|--|--|
| ABI Prism 7500 Gene Analyzer                        | Thermo Fisher Scientific GmbH                                    | Waltham, USA                           |
| BD FACSVerser <sup>TM</sup>                         | BD Biosciences <sup>TM</sup>                                     | Heidelberg, Deutschland                |
| Brutschrank   | Heraeus instruments  | Hanau, Deutschland                     |
| Brutschrank   | Binder   | Tuttlingen, Deutschland                |
| Captair <sup>TM</sup> chem (Abzug)                  | Erlab simpler safer  | Val de Reuil Cedex, Frankreich         |
| Cytek <sup>®</sup> Aurora                           | Cytek Biosciences  | Fremont, USA                           |
| Digital Dry Bath                                    | Bio-Rad  | Hercules, USA                          |
| Eismaschine AF 80                                   | Scotsman   | Mailand, Italien                       |
| Feuchte Kammer                                      | UMR Eigenbau   | Rostock, Deutschland                   |
| Freezing Container, Nalgene <sup>®</sup> Mr. Frosty | Thermo Fisher Scientific   | Waltham, USA                           |
| Gamma-Bestrahlungsanlage                            | Gammabestrahlungsanlage IBL 673                                  | Hamburg, Deutschland                   |
| Gefrierschrank -80 °C                               | Liebherr Deutschland GmbH<br>Bieberach;<br>Kryotec-Kryosafe GmbH | Bulle, Schweiz<br>Hamburg, Deutschland |
| Isoflurananlage (PET/CT)                            | Groppler   | Deggendorf, Deutschland                |
| Kühlschrank 4 °C / Gefrierschrank - 20 °C           | Elektrolux   | Stockholm, Schweden                    |
| mini-Wippschüttler WT 16                            | Biometra GmbH  | Göttingen, Deutschland                 |
| Kryostat CM1850 S                                   | Leica  | Wetzlar, Deutschland                   |
| Laser-Scanning Mikroskop LSM 780                    | Carl Zeiss Microscopy GmbH                                       | Jena, Deutschland                      |
| Lichtmikroskop Nikon Eclipse TE200                  | Nikon  | Tokio, Japan                           |
| Mikroskop Evos XL Core                              | Thermo Fisher Scientific GmbH                                    | Waltham, USA                           |
| Multipette TM M4                                    | Eppendorf  | Hamburg, Deutschland                   |
| NanoDrop <sup>TM</sup> 1000 Spektrophotometer       | Thermo Fisher Scientific GmbH                                    | Waltham, USA                           |

|   |                          |                                |
|---|--------------------------|--------------------------------|
| Narkoseinduktionskammer                           | Patterson Scientific     | Waukesha, USA                  |
| Neubauer Zählkammer                               | Marienfeld               | Lauda Königshofen, Deutschland |
| PET/CT  | Siemens                  | München, Deutschland           |
| Pannoramic Desk II DW Slide Scanner               | 3D Histech               | Budapest, Ungarn               |
| Pipetboy (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   | Vernon Hills, USA              |
| Sterile Werkbank Herasafe™                        | Thermo Fisher Scientific | Waltham, USA                   |
| Stickstofftank Apollo™                            | KGW Isotherm             | Karlsruhe Deutschland          |
| Dewar-Transportgefäß                              | KGW Isotherm             | Karlsruhe Deutschland          |
| GloMax®- Multi Detection System                   | Promega                  | Madison, USA                   |
| Thermal Cycler C1000™                             | Bio-Rad                  | Hercules, USA                  |
| Thermomixer comfort™                              | Eppendorf                | Hamburg, Deutschland           |
| REAX top™ Vortexgerät                             | Heidolph                 | Schwabach, Deutschland         |
| Waage MP-300                                      | Kern                     | Reinach, Schweiz               |
| Wasserbad   | GFL                      | Lauda-Königshofen, Deutschland |
| Zentrifuge 5418                                   | Eppendorf                | Hamburg, Deutschland           |
| Zentrifuge Rotina 35R                             | Hettich                  | Tuttlingen, Deutschland        |
| Zentrifuge Rotina 38R                             | Hettich                  | Tuttlingen, Deutschland        |
| Zentrifuge Rotina 420                             | Hettich                  | Tuttlingen, Deutschland        |

#### 3.1.2. Verbrauchsmaterialien

| Verbrauchsmaterialien                     | Hersteller       | Hauptsitz                |
|---|------------------|--------------------------|
| 6 well Zellkulturplatte Cellstar™         | Greiner bio-One  | Kremsmünster, Österreich |
| 24 well Zellkulturplatte Cellstar™        | Greiner bio-One  | Kremsmünster, Österreich |
| 96-Well 340µl Storage Platte mit V-bottom | Corning          | New York, USA            |
| 96-Well PCR-Platte (Halbrand)             | Sarstedt Ag & Co | Nümbrecht, Deutschland   |
| 96-Well Platte Cellstar™ mit F-           | Greiner bio-One  | Kremsmünster, Österreich |

### 3. MATERIAL UND METHODEN | Material

|  |   |                           |
|--|---|---------------------------|
| bottom, steril   |   |                           |
| 96-Well Platte Cellstar™ mit U-bottom, steril  | Greiner bio-One                                   | Kremsmünster, Österreich  |
| Alu-Folie 20 µm Stärke   | Roth  | Karlsruhe, Deutschland    |
| Cell Strainer EASY strainer TM 100 µm Poren-größe (steril)                             | Greiner bio-One                                   | Kremsmünster, Österreich  |
| Cell Strainer 40 µm Poren-größe Nylon (steril)   | Corning   | New York, USA             |
| Chirurgisches Besteck-Set (chirurgische Schere, chirurgische und anatomische Pinzette) | Aesculap AG                                       | Tuttlingen<br>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)  | Thermo Fisher Scientific                          | Waltham, USA              |
| End-to-End Kapillare 20 µl   | Sarstedt AG & Co                                  | Nümbrecht, Deutschland    |
| Falcon™ Tube (15 ml, 50 ml)  | Thermo Fisher Scientific GmbH                     | Waltham, USA              |
| MicroAMPTM Optical Adhesive Film   | Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific GmbH | Waltham, USA              |
| Nunc™ KryoTube™ Vials  | Thermo Fisher Scientific                          | Waltham, USA              |
| Objektträger   | Engelbrecht                                       | Edermünde, Deutschland    |
| Objektträger   | Tharmac   | Wiesbaden, Deutschland    |
| Parafilm   | Bemis   | Neenah, USA               |
| Pasteur Pipetten (150 mm)  | Thermo Fisher Scientific GmbH                     | Waltham, USA              |
| Pasteur Pipetten (250 mm)  | Thermo Fisher Scientific GmbH                     | Waltham, USA              |
| PCR-Reaktionsgefäß (low Tube)  | Bio-Rad Laboratories GmbH                         | Hercules, USA             |
| PCR-Reaktionsgefäß-Deckel (flat cap)   | Bio-Rad Laboratories GmbH                         | Hercules, USA             |
| Peha-soft nitrile fino puderfrei Einmal-Handschuh, unsteril                            | Paul Hartmann AG                                  | Heidenheim, Deutschland   |
| Pipetten   | Eppendorf   | Hamburg, Deutschland      |
| Pipettenspitzen  | Eppendorf   | Hamburg, Deutschland      |
| Pipettenspitzen mit Filter   | Biozym Scientific GmbH                            | Vernon Hills, USA         |
| Probengefäß 1,3 ml K3E   | Sarstedt AG & Co                                  | Nümbrecht, Deutschland    |

### 3. MATERIAL UND METHODEN | Material

|  |                            |                                  |
|--|----------------------------|----------------------------------|
| Reaktionsgefäß, braun (1,5 ml)                           | Sarstedt Ag & Co           | Nümbrecht, Deutschland           |
| Reaktionsgefäße, safe-lock tubes (1,5 ml)                | Eppendorf                  | Hamburg, Deutschland             |
| Röhrchen 5 ml (FACS tubes)                               | Sarstedt Ag & Co           | Nümbrecht, Deutschland           |
| Serologische Pipette, steril (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml) | Greiner bio-One            | Kremsmünster, Österreich         |
| Skalpell präzisa plus, steril                            | Dahlhausen                 | Köln, Deutschland                |
| Skalpellklingen, steril                                  | Braun                      | Tuttlingen, Deutschland          |
| Spritzen, steril   | Braun                      | Melsungen, Deutschland           |
| Tissue-Tek Cryomold™                                     | Sakura Finetek Europe B.V. | Alphen aan den Rijn, Niederlande |
| U-100 Insulin-Spritzen                                   | Becton Dickinson GmbH      | Heidelberg, Deutschland          |
| Zellkulturflaschen Cellstar™ 250 ml, 75 cm <sup>2</sup>  | Greiner bio-One            | Kremsmünster, Österreich         |
| Zellkulturflaschen Cellstar™ 550 ml, 175 cm <sup>2</sup> | Greiner bio-One            | Kremsmünster, Österreich         |

#### 3.1.3. Chemikalien

| Chemikalien   | Hersteller     | Hauptsitz                             |
|---|----------------|---------------------------------------|
| 96 % Ethanol  | Walter CMP     | Kiel, Deutschland                     |
| Aceton  | JTBaker        | Waltham, USA                          |
| Ammoniumchlorid   | Merck KGA      | Darmstadt, Deutschland                |
| <i>Aqua dest.</i>   | SGWater-Anlage | Barsbüttel, Deutschland               |
| Bacillol AF   | Hartmann       | Heidenheim, Deutschland               |
| Beads (fluorescent microsphere beads (1,4 x 10 <sup>5</sup> beads/ml, Größe: 10 µm) | Polysciences   | Warrington, USA                       |
| CDKIs (Zellzyklusinhibitoren: Abemaciclib, Palbociclib, Dinaciclib, THZ1)           | Selleckchem    | Houston, USA                          |
| CMFDA (5(6)-CFDA, SE (5-(and-6)-Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester)   | Biotium        | Fremont, USA                          |
| DFS-Taq DNA Polymerase  | Bioron         | Römerberg, Deutschland<br>Deutschland |
| DMEM/Ham's F12 (1:1)  | PAA            | Pasching, Österreich                  |
| DMSO (dimethyl sulfoxide)   | AppliChem      | Darmstadt, Deutschland                |

### 3. MATERIAL UND METHODEN | Material

|  |  |                                    |
|--|--|------------------------------------|
| dNTP 10 mM                                 | Bioron                                       | Römerberg, Deutschland             |
| FACSClean Solution (Reinigungsflüssigkeit) | BD Biosciences™                              | Heidelberg, Deutschland            |
| FACSFlow™ (Trägerflüssigkeit)              | BD Biosciences™                              | Heidelberg, Deutschland            |
| FACSuite™ CS&T Research Beads              | BD Biosciences™                              | Heidelberg, Deutschland            |
| Fetales Kälberserum (FKS)                  | Pan-Biotech                                  | Aidenbach, Deutschland             |
| GeneScan™ 500 LIZ™                         | Appliedbiosystems byThermo Fisher Scientific | Wartham, USA                       |
| HiDi™ Formamide                            | ThermoFisher Scientific GmbH                 | Waltham, USA                       |
| Intracellular StrainingPerm WashBuffer     | Biolegend                                    | SanDiego, USA                      |
| Isofluran Forene®                          | AbbVie GmbH & Co. KG                         | Wiesbaden, Deutschland             |
| Isopropanol                                | Walter CMP                                   | Kiel, Deutschland                  |
| Ketamin 10 %                               | Bela-pharm GmbH & Co.KG                      | Vechta, Deutschland                |
| L-Glutamin                                 | Pan-Biotech                                  | Aidenbach, Deutschland             |
| Methanol                                   | JT Baker                                     | Deventer, Niederlande              |
| Natriumhydroxid (NaOH)                     | Roth GmbH                                    | Karlsruhe, Deutschland             |
| PFA (Paraformaldehyd)                      | Sigma-Aldrich Chemie GmbH                    | Taufkirchen, Deutschland           |
| Phosphat buffered saline (pH 7,4)          | Sigma-Aldrich Chemie GmbH                    | Taufkirchen, Deutschland           |
| Propidiumiodid (1 mg/ml in Wasser)         | Sigma-Aldrich Chemie GmbH                    | Taufkirchen, Deutschland           |
| Reaction Buffer for DFS-Taq, High Taq      | Bioron                                       | Römerberg, Deutschland             |
| RNAse A                                    | Sigma-Aldrich Chemie GmbH                    | Taufkirchen, Deutschland           |
| Roti-Mount FluorCareDAPI 15 ml             | Carl Roth GmbH                               | Karlsruhe, Deutschland             |
| Tissue Tek O.C.T. Compound Containing      | Sakura Finetek Europe                        | AJ Alphen aanden Rijn, Niederlande |
| TritonX-100                                | Sigma-Aldrich Chemie GmbH                    | Taufkirchen, Deutschland           |
| Trypan blau (0.02 %)                       | Sigma-Aldrich Chemie GmbH                    | Taufkirchen, Deutschland           |
| Trypsin/EDTA (0.25 %/0.02 %)               | Biochrom GmbH                                | Berlin, Deutschland                |

#### 3.1.4. Medien, Puffer, Lösungen

| Produkt  | Zusammensetzung   |
|--|---|
| 0,2 % Kristallviolettlösung                          | 200 mg Kristallviolett<br>2 ml absoluter Ethanol<br>100 ml <i>Aqua dest.</i>  |
| 1 % SDS  | 1g SDS (Sodiumdodecylsulfat)<br>100 ml <i>Aqua dest.</i>  |
| 2 % BSA in 1x PBS                                    | 2 g BSA<br>100 ml 1x PBS  |
| 4 mM Calcein AM                                      | 1 mg Calcein<br>250 µl DMSO   |
| 0,5 mM EDTA-Lösung (pH 8)                            | 186,1 g EDTA<br>800 ml A. dest<br>NaOH zur pH-Einstellung   |
| 70 % Ethanol   | 36 ml 96 % Ethanol<br>15 ml <i>Aqua dest.</i>   |
| BD Horizon™ Brilliant Stain Buffer (BD Biosciences™) | ready-to-use  |
| Erythrozyten-Lyse-Puffer                             | 0,16 M Ammoniumchlorid + 0,17 M TRIS<br>Verhältnis 1:10   |
| FluoroFix™ Buffer (BioLegend)                        | ready-to-use  |
| 10x Intracellular Staining Perm Wash Buffer          | 5 ml Buffer<br>45 ml A. dest  |
| Freezing Medium                                      | 45 ml FKS (90 % final)<br>5 ml DMSO (10 % final)  |
| 1x PBS   | 80,00 g Natriumchlorid<br>2,00 g Kaliumchlorid<br>18,05 g Dinatriumhydrogenphosphat<br>2 x H <sub>2</sub> O<br>2,00 g Kaliumhydrogenphosphat ad 1000 ml <i>Aqua dest.</i> |
| True Nuclear™ Fix Concentrate                        | 6 ml True Nuclear™ Fix Diluent (BioLegend)<br>2 ml 4X True Nuclear™ Fix Concentrate (BioLegend)   |
| True Nuclear™ Perm Buffer                            | 1 ml 10x True Nuclear™ Perm Buffer (BioLegend)<br>9 ml A. dest.   |
| Trypanblau-Lösung (pH 7,4)                           | 0,16 % (W/V) Trypan-Blau<br>150 mM NaCl   |
| Vollmedium   | 500 ml DMEM/Ham's F12 (1:1)<br>50 ml FKS (final: 10 %)<br>6-8 ml L-Glutamin (final: 20 mM)<br>Penicillin/Streptomycin (final: 1 %)  |

#### 3.1.5. Antikörper

Eine Übersicht aller verwendeten Antikörper findet sich im Anhang (s. 8.3.).

#### 3.1.6. Kits

| Kit                                 | Bestandteile  | Hersteller | Hauptsitz  |
|-------------------------------------|---|------------|------------|
| Wizard®Genomic DNA Purification Kit | Nuclei Lysis Solution<br>RNase Solution<br>Precipitation Solution<br>DNA Rehydration Solution | Promega    | Woods, USA |

#### 3.1.7. Primer

Eine Übersicht aller verwendeten Primer findet sich im Anhang (s. 8.4.).

#### 3.1.8. Software

| Programm  | Verwendung  |
|---|---|
| BD FACSuite™                                    | Analyse der BD FACSVere-Daten                     |
| FlowJo  | Analyse der Cytex Aurora-Daten, Zellzyklusanalyse |
| GeneMapper v4.1                                 | Fragmentanalyse                                   |
| GraphPad Prism8                                 | Grafiken, Statistik                               |
| BioRender                                       | Illustrationen                                    |
| Zotero  | Literaturverzeichnis                              |
| NanoDrop 1000 Thermo Fisher Scientific          | Messung von gDNA                                  |
| Inveon Research Workplace 4.2 Software          | PET/CT-Auswertung                                 |
| Microsoft Office 2007 (Word, Excel, PowerPoint) | EDV-Programme                                     |
| Case Viewer                                     | Digitalisierung der Leberpräparate                |

#### 3.1.9. Statistik

Die statistischen Analysen der Datensätze erfolgten mittels GraphPad Prism8. Zunächst wurde ein Shapiro-Wilk-Test durchgeführt, um zu testen, ob eine Normalverteilung vorlag. War eine Stichprobe normalverteilt, wurde entweder ein One- oder ein Two-way-ANOVA (Tukey) durchgeführt. Für nicht-normalverteilte Daten wurde ein Kruskal-Wallis-Test

angewandt. Es wurde ein Signifikanzniveau  $p < 0,05$  als statistisch signifikant festgelegt. Kaplan-Meier-Überlebenskurven wurden mittels des log rank (Mantel Cox)-Tests analysiert. In den angefertigten Diagrammen sind jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen dargestellt.

#### 3.2. Methoden – *in vivo*

---

##### 3.2.1. Tierzucht und -haltung

Für alle Tierversuche wurden homozygote *Mlh1*<sup>-/-</sup> Mäuse verwendet, welche aus der Paarung heterozygoter *Mlh1*<sup>+/-</sup> Mäuse stammen. Die Embryonen, aus denen die Zucht am Standort Rostock aufgebaut wurde, stammen aus dem NCI Mouse Repository in Frederick, USA (genetischer Hintergrundstamm: B6.129-*Mlh1*<sup>tm1Rak</sup>/NCI; Stammnr.: 01XA2). Die Zucht und Kreuzung aller *Mlh1*<sup>-/-</sup> Mäuse erfolgte in der Zentralen Versuchstierhaltung des Instituts für Experimentelle Chirurgie (Direktorin: Univ.-Prof. B. Vollmar) in Rostock unter pathogenfreien Bedingungen. Alle tierexperimentellen Versuche wurden vorab durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (AZ: 7221.3-2-3-053/12 und -026/17) genehmigt.

3-4 Wochen alte Nachkommen wurden mittels einer Schwanzbiopsie bzw. Ohrlochstanze genotypisiert [94]. 25 % der Nachkommen waren heterozygot (*Mlh1*<sup>+/-</sup>) und wurden für die weitere Züchtung benötigt, während 50 % einen Wildtyp aufwiesen (*Mlh1*<sup>+/+</sup>). Die restlichen 25 % der Nachkommen waren homozygote, infertile *Mlh1*<sup>-/-</sup> Mäuse und wurden in den Versuch eingeschlossen. Zur Entgegenwirkung eines genetischen Drifts erfolgte ab Generation F10 eine Rückkreuzung mit dem C57BL-Wildtyp.

Die Haltung der Tiere erfolgte in der SPF-nahen Haltung in speziellen Filterkäfigen; in den Räumen der zentralen Versuchstierhaltung in IVC-Käfigen. Beide Räumlichkeiten unterlagen einem 12-stündigen Tag-/Nacht rhythmus. Die Tiere hatten jederzeit freien Zugang zu Wasser und Standardfutter, welches täglich eingeweicht wurde. Außerdem waren die Käfige ausgestattet mit Mausiglus, Papierrollen sowie Nestbaumaterialien. Die Anzahl war auf maximal vier Mäuse pro Käfig beschränkt.

Zucht und Haltung der Tiere erfolgte gemäß des deutschen Tierschutzgesetzes sowie der EU Richtlinien 2010/63/EU.

##### 3.2.2. Behandlungsprotokoll

Die Jungtiere wurden engmaschig visitiert, um eine Tumorgenese rechtzeitig zu erkennen und diagnostische Schritte einzuleiten. Hierzu wurde vor allem auf den allgemeinen Habitus sowie den Gewichtsverlauf geachtet, wobei ein Gewichtsverlust von 15 % des Ausgangsgewichtes als kritisch eingestuft wurde. Gleichzeitig wurde das Alter und das Geschlecht berücksichtigt. Beobachtungen aus vorherigen Arbeiten zeigten, dass Weibchen eher zur Entwicklung von Lymphomen, Männchen eher zur Entwicklung von gastrointestinalen Tumoren neigten [50].

Die Lymphomagenese begann durchschnittlich im Alter von vier Monaten, die Tumorgenese im Darm mit acht Monaten [95]. Unter Berücksichtigung des Allgemeinzustandes, des Alters und des Geschlechtes wurden die Versuchstiere der Tumordiagnostik unterzogen. Diese umfasste die im Folgenden beschriebenen Verfahren der Bildgebung sowie der Untersuchung peripherer Blutproben (s. 3.2.3.). Nach Bestätigung der Verdachtsdiagnose wurden die Tiere den in Tabelle 2 dargestellten Versuchsgruppen zugeordnet. Eine schematische Darstellung des Behandlungsprotokolls zeigt Abbildung 7.

**Tabelle 2 | Versuchsgruppen**

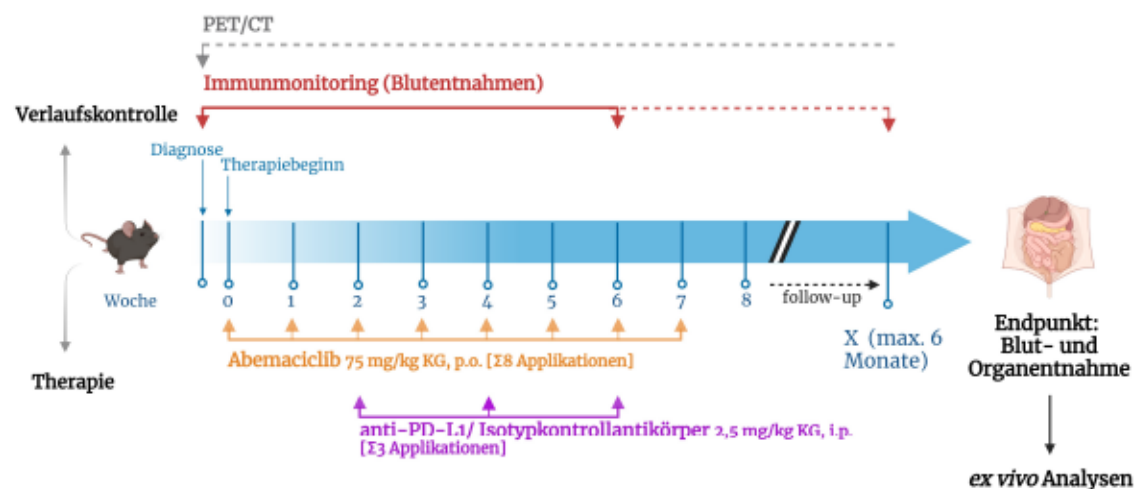
| <b>Tiere mit gastrointestinalem Tumor (n = 6-7 Mäuse/Gruppe)</b> |   |
|--|---|
| Gruppe 1   | Kontrolle, keine Intervention   |
| Gruppe 2   | Isotypkontrollantikörper (anti-IgG1 bzw. anti-IgG2b 2,5 mg/kg KG, i.p.) + Adjuvanz      |
| Gruppe 3   | anti-PD-L1 (2,5 mg/kg KG, i.p.) + Adjuvanz  |
| Gruppe 4   | Abemaciclib (75 mg/kg KG, p.o.)   |
| Gruppe 5   | Kombinationstherapie: anti-PD-L1 (2,5 mg/kg KG, i.p.) + Abemaciclib (75 mg/kg KG, p.o.) |
| <b>Tiere mit Lymphomen (n = 2-6 Mäuse/Gruppe)</b>                |   |
| Gruppe 6   | Kontrolle, keine Intervention   |
| Gruppe 7   | Isotypkontrollantikörper (anti-IgG1 bzw. anti-IgG2b 2,5 mg/kg KG, i.p.) + Adjuvanz      |
| Gruppe 8   | anti-PD-L1 (2,5 mg/kg KG, i.p.) + Adjuvanz  |
| Gruppe 9   | Abemaciclib (75 mg/kg KG, p.o.)   |
| Gruppe 10  | Kombinationstherapie: anti-PD-L1 (2,5 mg/kg KG, i.p.) + Abemaciclib (75 mg/kg KG, p.o.) |

*Adjuvanz: Imiquimod (1 mg/kg KG); i.p.: intraperitoneal; p.o.: peroral*

Im Falle einer Monotherapie mit dem ICI anti-PD-L1 (muriner Klon: E611 [96]) sowie dem Isotypkontrollantikörper erfolgte die Applikation sequentiell insgesamt dreimal im Abstand von 14 Tagen (q2Wx3). Die Therapeutika wurden, in einer Dosierung von 2,5 mg/kg KG, in 100 µl 1x Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline, PBS) gelöst und intraperitoneal injiziert. Dies erfolgte im Nackengriff ohne Narkose. Als Adjuvanz wurde Imiquimod (1 mg/kg KG) verwendet. Abemaciclib wurde einmal wöchentlich peroral appliziert. Insgesamt erhielten die Tiere acht Applikationen in einer Dosis von 75 mg/kg KG (q1Wx8, gelöst in 100 µl 1x PBS). Die perorale Darreichung erfolgte mittels Schlundsonde, welche in den Magen vorgeschoben wurde (im Nackengriff, ohne Narkose). Bei der

Kombinationstherapie wurden die jeweiligen Medikamente in der oben dargestellten Form appliziert, wodurch es teilweise zu einer simultanen Gabe kam (s. Abbildung 7).

Nach Abschluss der Therapie folgte ein Nachbeobachtungszeitraum von maximal sechs Monaten.



**Abbildung 7 | Behandlungsprotokoll und Verlaufskontrollen.**

Nach der Diagnose eines Tumors mittels PET/CT und Immunphänotypisierung peripherer Blutentnahmen wurden die Tiere in Versuchsgruppen eingeschlossen. Abemaciclib wurde dabei in einer Dosierung von 75 mg/kg KG peroral verabreicht (q1Wx8). Anti-PD-L1- sowie Isotypkontrollantikörper wurden in einer Dosierung von 2,5 mg/kg KG verabreicht (q2Wx3). Im Rahmen der Verlaufskontrolle wurde den Mäusen alle sechs Wochen Blut für eine Immunphänotypisierung abgenommen. Ca. 30 Tage nach Einschluss in die Therapie wurde ein erneutes PET/CT durchgeführt. Die Behandlungsdauer betrug somit maximal acht Wochen, woran sich ein Beobachtungszeitraum von maximal sechs Monaten anschloss, in dem ggf. weitere PET/CTs sowie Blutentnahmen erfolgten. Bei Erreichen der humanen Endpunkte wurden eine finale Blutentnahme und eine Organentnahme vorgenommen.

### 3.2.3. Monitoring

#### 3.2.3.1. Bildgebung mittels PET/CT

Die Diagnostik sowie die Verlaufskontrolle der Tumorentwicklung erfolgten unter anderem mittels  $^{18}\text{F}$ -Fluordesoxyglukose (FDG)-Positronenemissionstomografie/Computertomografie (PET/CT). Bei diesem Untersuchungsverfahren wird der erhöhte Glukosestoffwechsel maligner Zellen genutzt, indem Glukose als metabolisch aktive Substanz an ein radioaktives Isotop ( $^{18}\text{F}$ -Fluor) gekoppelt und die Anreicherung dieses Tracers dargestellt wird. Bei dieser multimodalen Bildgebung wird das nuklearmedizinische Verfahren der PET mit dem röntgenologischen Schnittbildverfahren der CT kombiniert. Durch diese Integration wird die topografische Auflösung erhöht und Ungenauigkeiten bei der Lokalisation von Tumoren werden verringert.

Im Vorfeld wurden die Tiere mittels Isofluran (1,5 - 2,5 %ig) inhalativ narkotisiert und erhielten über einen Mikrokatheter in der Schwanzvene eine Applikation von ca. 16 MBq des Radiopharmakons. Die Untersuchung selbst dauerte ungefähr 15 min. Die Durchführung des beschriebenen Untersuchungsablaufes erfolgte durch die Mitarbeiter der Core Facility „Multimodale Kleintierbildung“ des Rudolf-Zenker-Instituts für Experimentelle Chirurgie. Die Auswertung der angefertigten Aufnahmen erfolgte mittels der Inveon™ Research Workplace™ Software. Hierbei wurde der Tumor graphisch markiert, was eine Berechnung des Volumens in mm<sup>3</sup> sowie der standardized uptake value (SUV) ermöglichte. Der SUV ist ein radiologischer Vergleichsparameter und beschreibt das Verhältnis zwischen der Radionuklidaktivität in der untersuchten Region „region of interest“ (ROI) und der Radionuklidaktivität im gesamten Körper. Bei einer homogenen Verteilung ist der SUV gleich 1. Ein humaner SUV von 2,5 und größer wird im Allgemeinen als malignitätsverdächtig eingestuft [97].

Im Rahmen dieses Projektes wurde die Diagnose gestellt, sobald die Versuchstiere, zusätzlich zu allgemeinen Parametern wie Habitus und Gewichtsverlust (s. 3.2.2.), im PET/CT mindestens einen Tumor  $\geq 30 \text{ mm}^3$  aufwiesen. Nach Diagnosestellung erfolgte der Einschluss in die Versuchsgruppen.

Im Laufe der Therapie wurde ca. vier Wochen nach Therapiebeginn ein weiteres PET/CT zur Beurteilung der Tumorentwicklung durchgeführt.

#### 3.2.3.2. Immunphänotypisierung des peripheren Blutes

Den Tieren wurde regelmäßig Blut zur Phänotypisierung abgenommen. Dies geschah alle sechs Wochen, sobald eine Diagnose gestellt wurde bzw. nach Einschluss in eine der Therapiegruppen. Das Blut wurde unter Inhalationsnarkose mit Isofluran (1,5 - 2,5%ig) mit Hilfe einer Glaskapillare aus dem retrobulbären Venenplexus gewonnen. Zu Beginn des Projektes erfolgten die durchflusszytometrischen Analysen am BD FACSuite™. Im späteren Verlauf wurden die Proben am Cytex® Aurora gemessen. Die jeweiligen Färbeprotokolle werden in Abschnitt 3.2.5. dargestellt.

#### 3.2.4. Organaufbereitung

Nach Erreichen der humanen Endpunkte erfolgte die Organentnahme in Allgemeinanästhesie (Ketamin/Xylazin, 90/6 mg/kg KG, i.p.). Die humanen Endpunkte sind als konkrete Abbruchkriterien unter Anwendung eines Score Sheets definiert (s. 8.2.; Abbildung 31). Die

relevantesten Parameter umfassen: Anzeichen für Schmerz (gekrümmte Haltung, verändertes Sozialverhalten, Apathie), Gewichtsreduktion  $\geq 15\%$ , Tumorgroße  $\geq 400\text{ mm}^3$  (im Vergleich zum vorherigen PET/CT) sowie weitere klinische Auffälligkeiten wie rektale Blutungen, progredienter Analprolaps oder pathologische Atemmuster (bei Thymomen). Nach Erreichen einer ausreichend tiefen Narkose wurde das Tier durch Entbluten getötet. Der retrobulbäre Venenplexus wurde mit einer Kapillare angestochen, so dass gleichzeitig eine finale Blutprobe gewonnen wurde. Anschließend wurde eine Laparotomie vorgenommen. Nach Eröffnung des Situs wurde eine Inspektion des gesamten Gastrointestinaltraktes vorgenommen und die Tumore, wenn vorhanden, reseziert. Darüber hinaus erfolgte die Entnahme der Milz, Leber sowie suspekter mesenterialer oder paraaortaler Lymphknoten. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurde das Gewebe in 1x PBS auf Eis gelagert. Ziel der Aufarbeitung war es, Zellsuspensionen von Tumor, Milz und Blutbestandteilen anzufertigen, welche durchflusszytometrisch analysiert wurden. Darüber hinaus wurde das Gewebe für weitere Untersuchungen entsprechend asserviert.

**Darmtumore** wurden mit Hilfe eines Skalpells in zwei Teile geschnitten. Eine Hälfte wurde für die Anfertigung von Kryostatschnitten in Tissue Tek kryokonserviert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die weitere Lagerung erfolgte bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ . Von der anderen Hälfte wurde unter Verwendung eines Zellsiebes ( $100\text{ }\mu\text{m}$ ) eine Einzelzellsuspension hergestellt. Diese wurde bei  $300\text{ g}$  für  $8\text{ min}$  pelletiert, in  $2\text{ ml}$  1x PBS resuspendiert und auf zwei Eppendorf-Gefäße aufgeteilt für: (I) Durchflusszytometrie und (II) gDNA-Isolation. Bei letztgenanntem wurde die Zellsuspension pelletiert, der Überstand abgenommen und das trockene Zellpellet bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  asserviert.

Die Leber wurde, auf gleiche Weise wie der Tumor, kryokonserviert.

Die Milz wurde analog zum Tumor durch ein Zellsieb ( $100\text{ }\mu\text{m}$ ) gesiebt.  $1\text{ ml}$  der Suspension wurde für die durchflusszytometrische Messung abgenommen, der Rest wurde bei  $300\text{ g}$  für  $8\text{ min}$  pelletiert und anschließend in  $4\text{-}6\text{ ml}$  Erylyse für  $5\text{ min}$  inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die Zellen in  $20\text{ ml}$  resuspendiert und die Gesamtzellzahl bestimmt. Die Milzzellen wurden in einem Gefrierbehälter (Nalgene™ Mr. Frosty™) bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  vital in Freezing Medium (fetales Kälberserum (FKS) mit  $10\%$  Dimethylsulfoxid (DMSO)) asserviert. Die dauerhafte Aufbewahrung der Zellen erfolgte in der Gasphase in flüssigem Stickstoff bei  $-190\text{ }^\circ\text{C}$ .

**Lymphknoten** wurden ebenfalls mittels Zellsieb homogenisiert, ausgezählt und in Freezing Medium asserviert.

Das Blut wurde analog zum in Punkt 3.2.5.2. beschriebenen Verfahren aufbereitet.

Nach Herstellung einer Einzelzellsuspension wurde aus Tumor, Milz und Blutproben die Färbung für die durchflusszytometrische Phänotypisierung durchgeführt, welche im Folgenden beschrieben wird.

#### 3.2.5. Analysen mittels Durchflusszytometrie

##### 3.2.5.1. Allgemeines Funktionsprinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Analyse unterschiedlichster Zelleigenschaften. Durch den Einsatz von Fluorophor-gekoppelten Antikörpern ist es möglich, sowohl Oberflächenantigene als auch intrazelluläre Moleküle darzustellen und hinsichtlich ihrer Quantität und Qualität auszuwerten. Ein Durchflusszytometer bildet eine Einheit aus unterschiedlichen Systemen, welche Hand in Hand arbeiten. Zu diesen gehören die Messzelle, ein optisches Lasersystem sowie die Elektronik. Durch die Messzelle fließt die zu untersuchende Zellsuspension und wird hier in einen dünnen Strahl geleitet, so dass die Zellen einzeln den Laser des optischen Systems passieren und somit jede Zelle einzeln detektiert werden kann. Die Zellen erzeugen dabei Streulicht, welches von Detektoren registriert wird und mittels der Elektronik in ein digitales Signal umgewandelt werden kann. Je nach Ausrichtung der Laserstrahlen unterscheidet man zwischen dem Forward Angle Scatter, der die Zellgröße abbildet, und dem Side Angle Scatter, welcher die Granularität einer Zelle repräsentiert, was eine Unterscheidung der Subtypen zulässt [98]. Zeitgleich werden durch den Laser Fluorophore angeregt. Diese sind gekoppelt an Antikörper, welche wiederum an Oberflächen- oder intrazelluläre Antigene der Zellen binden. Die Menge des emittierten Lichtes ist dabei proportional zur Antigenmenge der Zelle [99].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die *in vitro* Analysen am BD FACSVerser™ und die Auswertung mit der BD FACSuite™ durchgeführt. Im Live Gate wurden hierzu jeweils 10.000 Events gemessen.

Für die Analysen der *in vivo* Versuche wurde zusätzlich auch das Cytex® Aurora eingesetzt, die Auswertung erfolgte mit der SpectroFlo® Software und FlowJo.

##### 3.2.5.2. Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie

###### BD FACSuite™

Das Vollblut wurde bei 8.000 g für 8 min zentrifugiert, so dass sich deutlich zwei Phasen aus Blutplasma sowie den korpuskulären Blutbestandteilen bildeten. Der Plasmaüberstand wurde vorsichtig abgenommen und auf zwei Eppendorfgefäße aufgeteilt, welche bei -80 °C gelagert

wurden. Die festen Blutbestandteile wurden in 650 µl 1x PBS gelöst und in Kavitäten einer 96-Wellplatte, in die Antikörpermischungen vorgelegt waren, überführt (s. Tabelle 3). Ebenso wurden ungefärbte Kontrollen mitgeführt.

**Tabelle 3** | Verwendete Antikörper für die *in vivo* Phänotypisierung (BD FACSuite™)

| Extrazelluläre Färbensätze (Labeling) |  |
|---------------------------------------|--|
| Probe 1                               | Ungefärbte Kontrolle   |
| Probe 2                               | Mix 4: g/d TCR (FITC), NK1.1 (PE)                                |
| Probe 3                               | Mix 5: CD11b (FITC), Gr.1 (PE)                                   |
| Probe 4                               | Mix 6: CD69 (FITC), CD266 (PE), CD19 (APC), CD83 (PE-Cy7)        |
| Intrazelluläre Färbensätze (Labeling) |  |
| Probe 5                               | Mix 7: CD3 (FITC), PD-L1/CD274 (PE), PD-1 (APC), CTLA-4 (PE-Cy7) |
| Probe 6                               | Mix 9: CD25 (FITC), CD4 (PE), Foxp3 (APC)                        |

Die Platte inkubierte für 30 min bei 4 °C im Dunkeln. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde den Wells der Proben 1-4 je 200 µl Erylyse hinzugefügt und für 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nachdem die Platte zentrifugiert (500 g, 5 min) und der Überstand dekantiert wurde, wurden die Zellpellets der Tumor- und Milzproben final in 150 µl 1x PBS resuspendiert. Die Blutproben wurden für 10 min einer erneuten Erylyse unterzogen, bevor sie nochmals zentrifugiert und ebenfalls in 1x PBS resuspendiert wurden. Bei den Proben 5 und 6 wurde nach einem anderen Protokoll vorgegangen, entsprechend wurden die Proben zunächst in FACS-Röhrchen gefärbt. Hierbei wurde den Röhrchen 200 µl FluoroFix™ Buffer hinzugefügt und die Proben für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (500 g, 5 min), in 200 µl/Probe Intracellular Staining Perm Wash Buffer resuspendiert, gefolgt von einem weiteren Zentrifugationsschritt. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Nun wurden zum Pellet jeweils 100 µl Intracellular Staining Perm Wash mit weiteren Antikörpern gegeben (Probe 5: CTLA-4; Probe 6: Foxp3), und die Proben für 20 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Es folgte ein erneuter Waschschritt mit Intracellular Staining Perm Wash sowie Zentrifugation. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt, bevor die Proben final in 150 µl 1x PBS resuspendiert und in die 96-Well-Platte überführt wurden.

**Cytek® Aurora**

Auch nach diesem Protokoll wurde das Blut, wie zuvor, zentrifugiert und das Plasma weggefroren. Nach Resuspension in 650 µl 1x PBS und Überführung in FACS-Röhrchen, wurden die Proben zusammen mit anderen Proben (ggf. Tumor- und Milzzellsuspensionen) bei 500 g für 5 min zentrifugiert und anschließend mit 100 µl Zombie NIR 1:5000 in 1x PBS für 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen zentrifugiert, mit je 200 µl 2 % bovinem Serumalbumin (BSA) gewaschen und mit 100 µl FC-Blocker-Gemisch (90 µl 1x PBS, 10 µl FKS, 2 µl FC-Blocker) für 10 min inkubiert. Nun folgte die Zugabe von BD Horizon Brilliant Stain Buffer (50 µl/Röhrchen) sowie der Antikörper der extrazellulären Färbung, welche in Tabelle 4 aufgelistet sind. Nach der 30-minütigen Inkubation (bei RT im Dunkeln) folgte eine 15-minütige Erylyse (1 ml/Röhrchen). Anschließend wurden die Zellen pelletiert, mit je 200 µl Waschpuffer (40 % BSA 5 %, 40 % 5 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 20 % 1x PBS) gewaschen und erneut zentrifugiert. An dieser Stelle folgte der Fixierschritt. Hierzu wurden zum Zellpellet jeweils 200 µl True-Nuclear™ Fix Concentrate (75 % Fix Diluent, 25 % Fix Concentrate) hinzugegeben und für 45 min inkubiert.

**Tabelle 4 |** Verwendete Antikörper für die *in vivo* Phänotypisierung (Cytek® Aurora)

| Extrazellulärer Färbeansatz |                | Intrazellulärer Färbeansatz |                |
|-----------------------------|----------------|-----------------------------|----------------|
| Antikörper (Labeling)       | Volumen/ Probe | Antikörper (Labeling)       | Volumen/ Probe |
| Gr.1 (AF700)                | 0,25 µl        | CTLA-4 (PE/Cy7)             | 2 µl           |
| CD4 (APC Fire)              | 0,5 µl         | CD3 (PerCP)                 | 2 µl           |
| CD11b (BV570)               | 0,5 µl         | Foxp3 (AF 647)              | 0,5 µl         |
| NK1.1 (BV605)               | 1,5 µl         |                             |                |
| CD25 (PerCP-eFluor710)      | 1,5 µl         |                             |                |
| PD-1 (BV650)                | 2 µl           |                             |                |
| CD19 (Spark Blue)           | 3 µl           |                             |                |

Je 200 µl True-Nuclear™ Perm Buffer (90 % Wasser, 10 % Perm Buffer) wurde zu den Pellets hinzugegeben, bevor die Proben zentrifugiert wurden. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt, so dass die Proben insgesamt dreimal mit dem True-Nuclear™ Perm Buffer gewaschen wurden. Es folgte erneut eine 10-minütige Inkubation mit dem FC-Blocker-Gemisch (s. oben), bevor die Antikörper der intrazellulären Färbung in die

Zellsuspensionen pipettiert wurden. Nach Ablauf einer 30-minütigen Inkubationszeit wurden die Proben wieder dreimal mit dem True-Nuclear™ Perm Buffer gewaschen und final in 200 µl 1x PBS resuspendiert.

### 3.2.6. Herstellung von Gefrierschnitten

Gefrierschnitte wurden sowohl von Tumoren als auch von Lebern angefertigt. Das Gewebe wurde direkt nach der Entnahme in Tissue Tek eingebettet und bei -80 °C gelagert (s. 3.2.4.). Die jeweilige Probe wurde nun aufgeblickt, so dass mit Hilfe des Kryostaten (Leica™ CM1850S) 5 µm dicke Schnitte hergestellt werden konnten. Die Kryostatschnitte wurden auf einen Objektträger überführt, für ca. 30 min an der Luft getrocknet und in Methanol für 8 min fixiert. Nach einer kurzen Lufttrocknung konnten die Objektträger bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert werden. Die Leberschnitte wurden im Institut für Pathologie der Universität Rostock einer Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung unterzogen und lichtmikroskopisch untersucht. Die Tumorschnitte wurden für eine Immunfluoreszenzfärbung genutzt, welche im nächsten Abschnitt beschrieben wird.

### 3.2.7. Immunfluoreszenzfärbung der Tumorschnitte

Zusätzlich zur Phänotypisierung wurden die Tumore auch hinsichtlich ihres Mikromilieus mikroskopisch untersucht. Hierzu wurde das Tumorgewebe mit Antikörpern gefärbt und das Fluoreszenzsignal, nach Bindung an die Antigene, mittels eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops detektiert. Zunächst wurden die Objektträger gewaschen und mit dem Dakopen ein Fettrand um das Gewebe gezogen. Darauf folgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 2 % BSA für eine Stunde in einer dunklen Feuchtkammer. Anschließend wurden die primären Antikörper hinzugegeben (s. Tabelle 5) und für vier Stunden bzw. über Nacht in der dunklen Feuchtkammer bei RT inkubiert.

**Tabelle 5** | Verwendete primäre Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung

| Antikörpermix | Primäre Antikörper (Labeling)            | Verdünnung |
|---------------|--|------------|
| Mix 1         | CD3 (AF488), CD4 (AF 594), CD8 (AF 647)  | 1:20       |
| Mix 2         | CD206 (AF488), F4/80 (AF594)             | 1:50       |
| Mix 3         | CD11b (AF488), Gr.1 (AF594), PD-L1 (APC) | 1:20       |
| Mix 4         | PD1 (FITC)                               | 1:20       |

Anschließend wurden die Objektträger mit den Mixen 1-3 dreimal in 0,2 % 1x PBS gewaschen. Diese Schnitte wurden dann direkt eingedeckt. Als Eindeckmedium wurde Roti™-Mount FluorCare™ DAPI verwendet, womit auch zeitgleich eine Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte. Auf das Medium wurde ein Deckgläschen gegeben und die Schnitte bei 4 °C bis zur Mikroskopie gelagert.

Proben, die mit Mix 4 gefärbt wurden, wurden nach der Inkubation der primären Antikörper über Nacht und den darauffolgenden Waschschritten einer intrazellulären Färbung unterzogen. Dafür wurden die Objektträger für 30 min mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) bei RT in der dunklen Feuchtkammer fixiert. Die Schnitte wurden erneut zweimal gewaschen, bevor sie mit 0,5 % Triton X-100 permeabilisiert wurden (Inkubationszeit: 15 min). Es folgten erneut zwei Waschschriffe. Als nächstes wurde der primäre Antikörper anti-IRF5 (5 µg/ml) auf das Gewebe gegeben. Anschließend wurden die Objektträger gewaschen und der sekundäre Antikörper (Donkey anti-Rabbit IgG AF647) für eine Stunde im Dunkeln bei RT hinzugegeben. Nach einer letzten dreimaligen Waschung mit 0,2 % BSA in 1x PBS, wurden die Schnitte ebenfalls wie oben beschrieben mit Roti™-Mount FluorCare™ DAPI-Medium eingedeckt. Die mikroskopische Begutachtung der gefärbten Tumorschnitte erfolgte am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss LSM 780).

#### 3.2.8. Fragmentlängenanalyse

##### 3.2.8.1. *gDNA-Isolation aus Tumorzellproben*

Von jedem Tumor wurde nach der Entnahme ein trockenes Zellpellet bei -20 °C weggefroren (s. 3.2.4.). Die Zellen sowie deren Kernmembranen wurden im ersten Schritt, durch Zugabe von 600 µl Nuclei Lysis Solution unter gutem Mischen, lysiert. Zu den lysierten Zellen wurden 3 µl RNase Solution hinzugefügt und einige Male geschwenkt, um eventuell enthaltene RNA zu entfernen. Die Proben wurden für 30 min im Heizblock (37 °C, 300 rpm) inkubiert und anschließend für 5 min auf RT runtergekühlt. Die Proben wurden mit jeweils 200 µl Precipitation Solution versetzt, um etwaige Proteinkomponenten zu entfernen, und für 20 sek auf hoher Stufe gevortext. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 5 min und eine Zentrifugation für 4 min bei 10.000 g. Der DNA-enhaltene Überstand wurde abgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt, in dem bereits 600 µl Isopropanol vorgelegt waren. Das Gemisch wurde vorsichtig geschwenkt und somit eine Fällung der DNA durch Isopropanol induziert, wodurch die DNA als weißer Strang sichtbar wurde. Diese wurden bei 10.000 g für 1 min pelletiert und der Überstand dekantiert. Die DNA wurde durch Zugabe von je 600 µl

70 % Ethanol unter vorsichtigem Schwenken gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Ethanol abgenommen und das Pellet für 15 min an der Luft getrocknet. Zur DNA wurden 30 µl DNA Rehydration Solution gegeben und diese anschließend bei 65 °C im Heizblock (300 rpm) für eine Stunde rehydriert. Final erfolgte die photometrische Messung der gDNA-Konzentration am NanoDrop™ bei einem Absorptionsmaximum von 260 nm. Die Proben wurden einheitlich auf eine Konzentration von 25 ng/µl verdünnt, wofür gereinigtes, nukleasefreies Aqua dest. genutzt wurde.

### 3.2.8.2. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ermöglicht die Vervielfältigung kleinster DNA-Mengen. Ein PCR-Zyklus besteht aus einer initialen Denaturierung (= Einzelstränge), einer Primeranlagerung, sowie der Strangsynthese. Mit Hilfe der ausgewählten, farbmarkierten Primer (s. 8.4.) können die zu untersuchenden, spezifischen Sequenzen amplifiziert werden, wobei das Zielfragment jeweils durch einen forward und einen reverse Primer eingegrenzt wird. Auf die Primeranlagerung folgte die Strangsynthese der gewählten Zielfragmente mittels der taq-Polymerase. Als Bausteine der neuen Stränge nutzt die taq-Polymerase Nukleotide (desoxyNukleotidtriphosphate (dNTPs)). Zur Amplifikation der zuvor isolierten Tumorzell-DNA wurden die Ansätze, deren Komponenten in Tabelle 6 aufgelistet sind, in die PCR-Reaktionsgefäße der PCR-Streifen pipettiert. Als Kontrolle wurde die DNA einer Wildtyp-*Mhl1*-Maus verwendet. Die Proben wurden anschließend im Thermocycler positioniert und durchliefen dort die in Tabelle 7 dargestellten 35 Zyklen.

Tabelle 6 | PCR-Ansatz

| Reagenz  | Volumen |
|--|---------|
| DNA (25 ng/µl)   | 1 µl    |
| 10x PCR-Puffer inkl. MgCl <sub>2</sub> (final: 2,5 nM) | 1,25 µl |
| Forward Primer   | 0,25 µl |
| Reverse Primer   | 0,25 µl |
| Taq-Polymerase   | 0,1 µl  |
| dNTPs  | 0,25 µl |
| Ad Aqua dest.  | 12,5 µl |

dNTP: desoxyNukleotidtriphosphat

Tabelle 7 | Zeitlicher Ablauf der PCR

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

### 3.2.8.3. Aufarbeitung der PCR-Produkte für Fragmentlängenanalysen

Nach der oben dargestellten Gewinnung der PCR-Produkte folgte die Aufarbeitung für die Fragmentlängenanalyse. Hierzu wurden je 1 µl der PCR-Produkte, nach einer 1:10 Verdünnung, in eine 96-Well-PCR-Platte gegeben, in der je 24,3 µl HiDi-LIZ-Mix (24 µl HiDi® + 0,3 µl GeneScan™ 500 LIZ™) vorgelegt waren. Das GeneScan™ 500 LIZ™ dient hierbei als farbmarkierter Größenstandard, durch den die Längenbestimmung der amplifizierten DNA-Fragmente ermöglicht wird. Der HiDi-LIZ-Mix wurde nun mit je 1,3 µl PCR-Produkt versetzt. Die PCR-Platte wurde mit Optical-Clear Klebefolie verschlossen und kurz an zentrifugiert. Bis zur Messung wurde die Platte bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Die Fragmentlängenanalyse erfolgte am ABI Prism 7500 Gene Analyzer durch das molekularpathologische Labor des Institutes für Pathologie der Universität Rostock. Nach der Analyse wurden die Daten mittels der GeneMapper v4.1 Software ausgewertet.

#### 3.3. Methoden – *in vitro*

---

##### 3.3.1. Zellbiologische Methoden

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien erfolgte im Brutschrank in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37 °C sowie 5 % CO<sub>2</sub>. Als Zellkultur (ZK)-Medium wurde DMEM/Ham's F12 unter Zusatz von 10 % FKS (hitzeinaktiviert), 1 % Penicillin/Streptomycin und 6 mM Glutamin verwendet. Adhärente Zellen wurden in ZK-Flaschen mit 175 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche kultiviert, Suspensionszellen in Flaschen mit 75 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche. In Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen, welche lichtmikroskopisch beurteilt wurde, wurden die Zellen ein- bis dreimal wöchentlich gesplittet oder einem ZK-Mediumwechsel unterzogen. Die Arbeit mit den Zellkulturen erfolgte unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank mit laminarem Luftstrom.

##### 3.3.1.1. Verwendete Zelllinien

Für die *in vitro* Analysen wurden drei Zelllinien verwendet, darunter zwei Tumorzelllinien epithelialen Ursprunges (*Mlh1*<sup>-/-</sup> A7450 T1 M1 und *Mlh1*<sup>-/-</sup> 328) und eine Lymphomzelllinie (*Mlh1*<sup>-/-</sup> 1351), welche in Suspension kultiviert wurde. Zur Etablierung der epithelialen Zelllinien wurden Zellen aus gastrointestinalen Tumoren von *Mlh1*<sup>-/-</sup> Mäusen verwendet, wobei der Tumor der Linie *Mlh1*<sup>-/-</sup> A7450 T1 M1 einem Allograft entstammt (Nomenklatur T1 M1 = Transfer 1, Maus 1). Bei den Zellen der Linie *Mlh1*<sup>-/-</sup> 1351 handelt es sich um T-Zell-NHL-Zellen aus der Milz einer *Mlh1*<sup>-/-</sup> Maus [95].

##### 3.3.1.2. Auftauen und Kryokonservierung von Zellen

Für die Kryokonservierung wurde das ZK-Medium abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen, trypsiniert, in 10 ml ZK-Medium überführt und für 8 min bei 200 g sedimentiert. Das Zellpellet wurde in Freezing Medium resuspendiert (ca. 4-5 Mio Zellen/ml), in Kryogefäße überführt und zunächst bei -80 °C gelagert. Die endgültige Lagerung erfolgte in der Gasphase in flüssigem Stickstoff.

Das Auftauen der kryokonservierten Zellen erfolgte möglichst schnell. Die Zelllösung wurde in 10 ml warmes ZK-Medium überführt, zentrifugiert, das Pellet in 20 ml ZK-Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche gegeben.

#### 3.3.1.3. ZK-Mediumwechsel, Zellzahlbestimmung und Aussäen von Zellen

Ein ZK-Mediumwechsel erfolgte in Abhängigkeit von der Wachstumsgeschwindigkeit und dem Anfall saurer Stoffwechselprodukte. Dieser zeigte sich durch einen Farbumschlag des ZK-Mediums von rot nach gelb, ausgelöst durch das dem ZK-Medium beigegefügte Phenolrot. Das ZK-Medium wurde abgesaugt, die Zellkulturflasche mit 1x PBS gespült, um tote Zellen sowie Zelldetritus zu entfernen. Anschließend wurden den Flaschen 20 ml frisches ZK-Medium zugesetzt. Sobald die Zellen lichtmikroskopisch eine Konfluenz von ca. 80-95 % aufwiesen, wurden diese unter Zugabe von 2-3 ml Trypsin/EDTA zu den adhären Zellen gesplittet. Ein Teil der abgelösten Zellen wurde zur weiteren Kultivierung zurück in die ZK-Flaschen überführt, die restlichen Zellen wurden ausgezählt und für die geplanten Experimente verwendet. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen 1:1 mit Trypanblau versetzt, wodurch eine Unterscheidung zwischen toten Zellen, die sich aufgrund ihrer Permeabilität blau färbten, und vitalen, hell erscheinenden Zellen, möglich war. Anschließend wurde die Neubauer Zählkammer mit 10 µl der Lösung befüllt, wo die lebenden Zellen aus vier Großquadranten ausgezählt und die Zellzahl/ml ermittelt wurde. Je nach durchzuführendem Versuchsansatz wurde die gewünschte Menge an Zellen in die benötigten Well-Platten pipettiert und für 24 h zum Adhären im Brutschrank inkubiert, bevor weitere Schritte erfolgten.

#### 3.3.2. Kristallviolett- und Calcein-AM-Färbung zur IC<sub>50</sub>-Bestimmung

Die Zellen wurden mit den CDKIs Abemaciclib, Palbociclib und Dinaciclib (Dosis: IC<sub>30</sub>, in Voruntersuchungen bestimmt) behandelt. Als weiterer CDKI wurde THZ1 eingesetzt. Hierbei erfolgte zunächst eine Dosisbestimmung (IC<sub>50</sub>) anhand von Verdünnungsreihen (1 nM bis 1 µM). 10.000 Zellen/Well wurden in 96-Well-Platten ausgesät und für 24 h inkubiert. Anschließend wurde THZ1 in aufsteigender Konzentration hinzugegeben und für 72 h im Brutschrank inkubiert. Es folgte ein zweiter Behandlungszyklus für weitere 72 h. Die Quantifizierung der Viabilität der adhären Zellen *Mlh1*<sup>-/-</sup> A7450 T1 M1 und *Mlh1*<sup>-/-</sup> 328 erfolgte mittels einer Kristallviolett (KV)-Färbung. Hierzu wurde das ZK-Medium verworfen, die Platte mit 1x PBS gespült, 50 µl/Well einer 0,2 % KV-Lösung hinzugegeben und die Platte auf dem Schüttler für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das KV verworfen, die Platte zweimal mit 1x PBS gewaschen und über Nacht getrocknet. Die Quantifizierung erfolgte, nach Zugabe von 100 µl 1% Natriumdodecylphosphat (sodium dodecyl phosphate,

SDS)/Well und 10 min Inkubation bei RT, am Glomax bei einer Absorption von 570 nm (Referenz 620 nm).

Bei der Suspensionszelllinie *Mhl1<sup>-/-</sup>* 1351 wurde die Viabilität mit Hilfe eines Calcein-AM-Assays bestimmt. Hierzu wurde das Calcein-AM (Stock: 4 mM) 1:1000 mit 1x PBS verdünnt und je 50 µl/Well pipettiert. Die Platte wurde für 20 min im Dunkeln im Brutschrank inkubiert und anschließend am Glomax gemessen (Anregung: 485nm; Emission: 535 nm).

Anhand der gewonnenen Daten konnte für jede Zelllinie die IC<sub>50</sub> für das Medikament THZ1 berechnet werden, welche dann als Konzentration für die darauffolgenden Versuche verwendet wurde (s. Tabelle 8). Für die Zelllinie *Mhl1<sup>-/-</sup>* 328 gelang keine adäquate Titrierung einer Dosis.

#### 3.3.3. Behandlung mit Zellzyklusinhibitoren

Zunächst wurden die Zellen in 24-Well-Platten ausgesät (100.000 Zellen/Well). Als Kontrolle wurde ZK-Medium sowohl ohne als auch mit DMSO verwendet. Bei letztgenanntem entsprach die Dosis der höchsten CDKI-Konzentration, um potentielle Artefakte durch das DMSO auszuschließen. Je nach Versuch erfolgte die Behandlung für 48 h, 72 h oder 2x72 h. Eine Übersicht der verwendeten Konzentration liefert Tabelle 8. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen für weitere Analysen geerntet. Hierzu wurde der Überstand überführt, die Wells mit 200 µl 1x PBS gespült und die residuellen Zellen nach Trypsinierung geerntet. Die Zellen wurden für 8 min bei 300 g pelletiert und der Überstand dekantiert.

#### 3.3.2. Analysen mittels Durchflusszytometrie

##### 3.3.2.1. Immunogener Zelltod

Die Induzierbarkeit von immunogenem Zelltod wurde anhand der CalR-Translokation nach 48-stündiger Behandlung erfasst. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet und die Tumorzellsuspensionen jeweils auf zwei Röhrchen aufgeteilt. In die Röhrchen der zweiten Probe wurden zuvor 2 µl anti-CalR-Antikörper vorgelegt. Die Proben wurden für 30 min bei 4 °C inkubiert, zentrifugiert (300 g, 8 min) und der Überstand dekantiert. Zu beiden Proben wurde der sekundäre Antikörper (Donkey anti rabbit FITC, final 1:50, Stock: 0,5 mg/ml) gegeben und erneut für 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 200 µl 1x PBS abgestoppt und die Proben zentrifugiert. Für die durchflusszytometrische Messung wurde das Zellpellet in 200 µl 1x PBS resuspendiert.

Tabelle 8 | Verwendete CDKIs mit Konzentrationsangaben

| Zelllinie                             | Behandlung  | Konzentration |
|---------------------------------------|-------------|---------------|
| <i>Mhl1<sup>-/-</sup></i> A7450 T1 M1 | Palbociclib | 5 $\mu$ M     |
|                                       | Abemaciclib | 5 $\mu$ M     |
|                                       | Dinaciclib  | 0,1 $\mu$ M   |
|                                       | THZ1        | 0,83 $\mu$ M  |
| <i>Mhl1<sup>-/-</sup></i> 328         | Palbociclib | 5 $\mu$ M     |
|                                       | Abemaciclib | 5 $\mu$ M     |
|                                       | Dinaciclib  | 0,1 $\mu$ M   |
| <i>Mhl1<sup>-/-</sup></i> 1351        | Palbociclib | 5 $\mu$ M     |
|                                       | Abemaciclib | 5 $\mu$ M     |
|                                       | Dinaciclib  | 0,1 $\mu$ M   |
|                                       | THZ1        | 0,25 $\mu$ M  |

#### 3.3.4.2. Immunphäotypisierung

Zelloberflächenmarker wurden nach der Zellernte und Färbung mit jeweils 2  $\mu$ l Antikörper (30 min, 4 °C) durchflusszytometrisch bestimmt. Die verwendeten Antikörper umfassen: anti-MHC-I (PE), anti-PD-1 (APC), anti-PD-L1 (PE), anti-CTLA-4 (PE-Cy7). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben zentrifugiert und in 150  $\mu$ l 1x PBS resuspendiert.

#### 3.3.4.3. Zellzyklusanalyse

Bei der DNA-Färbung nach Nicoletti werden Zellen samt Zellkerne durch eine hypotone Lösung lysiert und die DNA durch Propidiumiodid (PI) angefärbt. Der Gehalt an angefärbter Zellkern-DNA kann daraufhin am Durchflusszytometer gemessen werden. Die für 48 h behandelten Zellen wurden in FACS-Röhrchen überführt, pelletiert und in 1 ml eiskaltem 70 % Ethanol resuspendiert. Die Proben wurden bei -20 °C für 1-7 Tage inkubiert und anschließend für 5 min bei 1000 g zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 0,5 ml 1x PBS mit 0,25 % TritonX-100 resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 0,5 ml 1x PBS mit 10  $\mu$ g/ml RNase A und 20  $\mu$ g/ml PI resuspendiert und dann 30 min im Dunkeln inkubiert, bevor die Analyse am Durchflusszytometer erfolgte.

#### 3.3.4.4. Nachweis apoptotischer und nekrotischer Zellen

Die Zellen wurden geerntet, in FACS-Röhrchen überführt und pelletiert (300 g, 8 min). Es wurde eine Färbelösung (Yo-Pro1-Stammlösung 1:5000 in 1x PBS) angesetzt, je 200 µl zum Pellet gegeben und für 20 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden mit 1x PBS gewaschen, zentrifugiert und final in 200 µl 1x PBS resuspendiert. Vor der durchflusszytometrischen Messung wurde jedem Ansatz 5 µl 7-Aminoactinomycin D beigegeben.

#### 3.3.4.5. Ko-Kulturversuch

In diesem Versuchskonzept wurde durch Zugabe von pan-Leukozyten aus murinen Blutproben zu den Tumorzellkulturen ein Ko-Kulturansatz durchgeführt. Das Behandlungsschema der Zellen wurde in Anlehnung an den *in vivo* Versuch (s. 3.2.) gewählt. Die Zellen wurden mit einer Abemaciclibmonotherapie (5 µM), mit einer anti-PD-L1 (murin: Klon: 6E11 [96])-Monotherapie (10 µg/ml) sowie mit einer Kombinationstherapie behandelt. Die Zelllinien *Mlh1*<sup>-/-</sup> A7450 T1 M1 und *Mlh1*<sup>-/-</sup> 328 wurden unter Zugabe von Trypsin/EDTA geerntet, gesiebt, zentrifugiert und mit 1x PBS gewaschen. Die Zellsuspension wurde gezählt, so dass 5 Mio. Zellen pelletiert werden konnten. Diese wurden in 1 ml Chloromethylfluorescein-diacetate-Farbstofflösung (final 1:2000 in 1x PBS, Stock: 10 mM), aufgenommen und für 15 min im Brutschrank inkubiert. Hiernach wurden die Zellen erneut mit 1x PBS gewaschen, pelletiert und in ZK-Medium aufgenommen. Das Volumen wurde so gewählt, dass 20.000 Zellen/Well in eine 24 Well-Platte ausgesät werden konnten. Nach 24 h Stunden wurde das ZK-Medium abgesaugt und Abemaciclib zu den jeweiligen Wells hinzugegeben. Außerdem erfolgte am ersten Behandlungstag die Zugabe der pan-Leukozyten. Hierzu wurde peripheres Blut mittels retrobulbärer Blutentnahme unter Isoflurannarkose entnommen und mit 15 ml Erylysepuffer für 15 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit 15 ml 1x PBS abgestoppt, die Zellen pelletiert und in ZK-Medium aufgenommen. Anschließend wurden die Leukozyten in einem Verhältnis von 10:1 zu den Tumorzellen gegeben. Als Kontrolle dienten Tumorzellen ohne Leukozyten, sowie ein Ko-Kulturansatz ohne Therapeutika. Die Platte wurde für 24 h im Brutschrank inkubiert. Am zweiten Behandlungstag wurde der anti-PD-L1-Antikörper hinzugegeben und der Ansatz für weitere 48 h im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit, also am fünften Behandlungstag, erfolgten die Zellernte sowie die Quantifizierung residualer Tumorzellen. Der Leukozyten-enthaltene Überstand wurde vorsichtig aus den Wells abgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Diese wurden bei 500 g für 10 min zentrifugiert, in 1x PBS

resuspendiert und die Leukozytensuspension auf drei Röhrchen à 200 µl aufgeteilt. Eines dieser Röhrchen diente als Kontrolle, zu den anderen beiden Röhrchen wurden entweder ein LAG-3- oder ein CTLA-4-Antikörper (PE), je 2 µl, hinzugegeben (Inkubation: 30 min bei 4 °C). Die Messung erfolgte schließlich am Durchflusszytometer. Zeitgleich wurden die verbliebenen adhärennten Tumorzellen durch Zugabe von Trypsin/EDTA geerntet, mit 1x PBS gewaschen und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde, nachdem es in 1x PBS aufgenommen wurde, mit je 50 µl Beads (fluorescent microsphere beads (( $1,4 \times 10^5$  beads/ml, Größe: 10 µm), 1:35 in 1x PBS verdünnt) versetzt. Direkt vor der durchflusszytometrischen Analyse wurden jeder Probe 50 µl PI (0,01 mg/ml) beigefügt.

---

## 4. ERGEBNISSE

Im Rahmen dieser Dissertation wurde zunächst das therapeutische Potential verschiedener selektiver und globaler CDKIs *in vitro* eruiert. Ergänzend dazu erfolgten *in vitro* und *in vivo* Analysen zur Wirksamkeit einer Abemaciclibmono- sowie Kombinationstherapie mit einem anti-PD-L1-Antikörper. Die *in vivo* Analysen wurden im präklinischen *Mhl1*<sup>-/-</sup> Modell durchgeführt.

### 4.1. *In vitro* Analysen

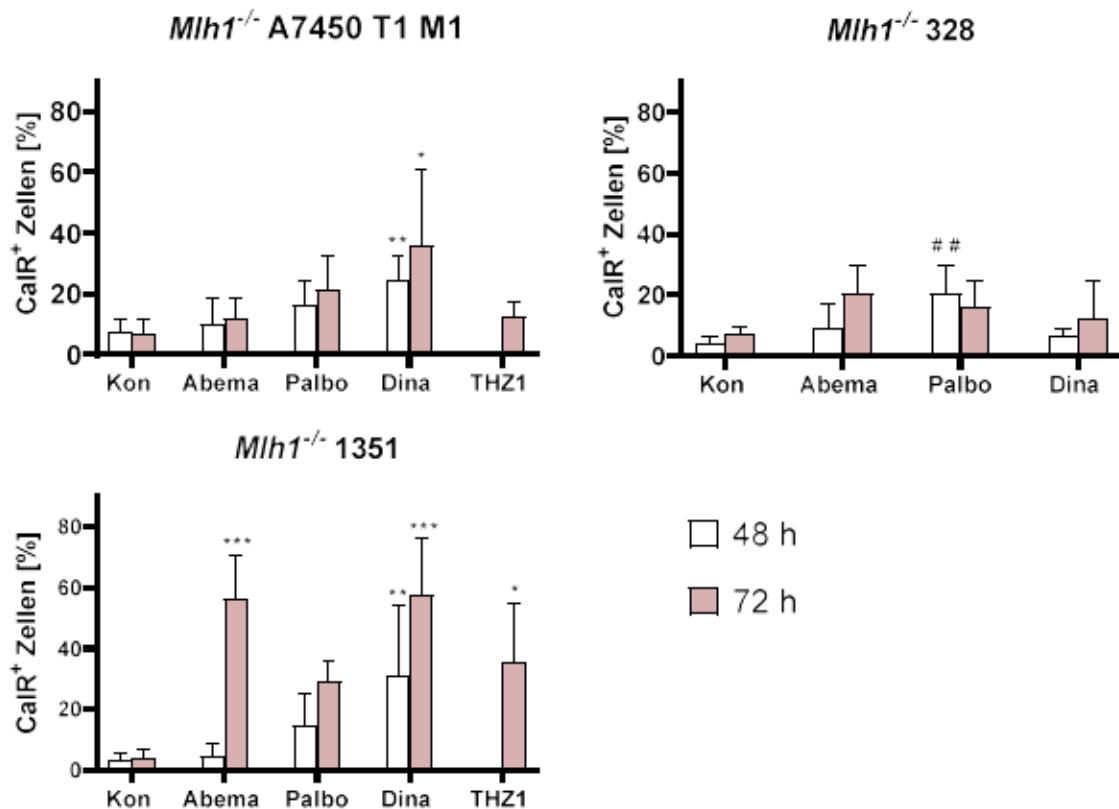
---

#### 4.1.1. Immunogener Zelltod

Der Anteil an transloziertem CalR wurde nach 48 und nach 72 Stunden erfasst, wobei die THZ1-Behandlung nur für 72 Stunden durchgeführt wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt.

Die beiden selektiven CDK4/6-Inhibitoren, Abemaciclib und Palbociclib, führten zu einer leichten Erhöhung des Anteils CalR<sup>+</sup> Zellen bei den epithelialen Zelllinien *Mhl1*<sup>-/-</sup> A7450 T1 M1 und *Mhl1*<sup>-/-</sup> 328. Die global wirkenden CDKIs THZ1 und Dinaciclib hatten unterschiedliche Effekte auf die Induzierbarkeit eines ICDs. Während THZ1 bei der Zelllinie *Mhl1*<sup>-/-</sup> A7450 T1 M1 nicht zur erhöhten CalR-Translokation führte, induzierte Dinaciclib eine signifikante Zunahme CalR<sup>+</sup> Zellen. Bei der Zelllinie *Mhl1*<sup>-/-</sup> 328 wurde dieser Effekt nicht beobachtet. Die Lymphomzelllinie *Mhl1*<sup>-/-</sup> 1351 reagierte insgesamt deutlich stärker auf die CDKI-Behandlungen. Mit Ausnahme der 48-stündigen Inkubation mit Abemaciclib führten alle CDKIs zu allen gemessenen Zeitpunkten zu einem deutlichen und teilweise signifikanten Anstieg an transloziertem CalR. Insbesondere für Dinaciclib und für die 72-stündigen Abemaciclib- und THZ1-Behandlungen war dieser Effekt signifikant.

Damit konnte die grundsätzliche Induzierbarkeit eines immunogenen Zelltodes durch CDKIs bestätigt werden. Je nach verwendetem CDKI konnten individuelle und zelllinienspezifische Effekte nachgewiesen werden.



**Abbildung 8 | Anteil CalR<sup>+</sup> Zellen nach CDKI-Behandlung.**

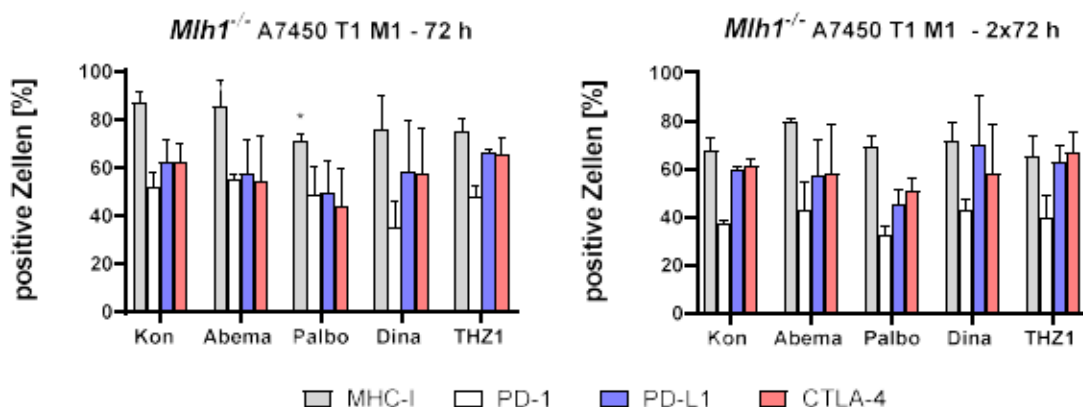
Die Zelllinien *Mlh1*<sup>-/-</sup> A7450 T1 M1, *Mlh1*<sup>-/-</sup> 328 und *Mlh1*<sup>-/-</sup> 1351 wurden mit Abemaciclib (5 µM), Palbociclib (5 µM) und Dinaciclib (0,1 µM) für 48 h und für 72 h behandelt. Für die Linien *Mlh1*<sup>-/-</sup> A7450 T1 M1 und *Mlh1*<sup>-/-</sup> 1351 wurde zusätzlich eine 72-stündige THZ1-Behandlung durchgeführt (0,83 µM [*Mlh1*<sup>-/-</sup> A7450 T1 M1] bzw. 0,25 µM [*Mlh1*<sup>-/-</sup> 1351]). Als Kontrolle für Palbociclib dienten Zellen, die ausschließlich im Vollmedium kultiviert wurden. Für Abemaciclib, Dinaciclib und THZ1 wurde dem Vollmedium DMSO äquivalenter Dosis zugesetzt (zusammengefasst unter Kontrolle). Dargestellt ist der prozentuelle Anteil an CalR<sup>+</sup> Zellen. MW + Stabw; n = 3-7 unabhängige Versuche; \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,005 (vs. DMSO-Kontrolle), ##p<0,01 (vs. Kontrolle); One-way ANOVA (Tukey post-hoc).

*CalR*: Calreticulin

#### 4.1.2. Immunphänotypisierung

In weiteren Analysen wurde der Einfluss der CDKIs auf den Phänotyp nach 72 h sowie nach 2x72 h erfasst. Anschließend wurde die Abundanz der Oberflächenmoleküle MHC-I, PD-1, PD-L1 und CTLA-4 durchflusszytometrisch quantifiziert. Bei den epithelialen Zelllinien *Mlh1*<sup>-/-</sup> A7450 T1 M1 und *Mlh1*<sup>-/-</sup> 328, welche in Abbildung 9 und 10 dargestellt sind, zeigten sich nur geringe Veränderungen im Expressionsmuster durch die unterschiedlichen Behandlungen. Bei der *Mlh1*<sup>-/-</sup> A7450 T1 M1 führte die Behandlung mit Palbociclib zu einer transienten Herunterregulation von MHC-I. Nach 2x72 h blieb die MHC-I-Expression unter den CDKIs im Vergleich zur Kontrolle konstant, nur unter Abemaciclib konnte ein Anstieg

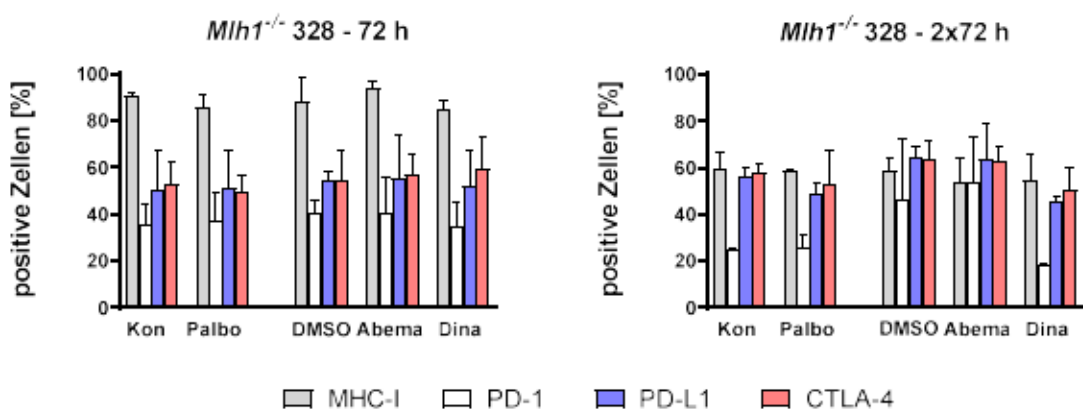
nachgewiesen werden. Dinaciclib induzierte eine transiente PD-1-Herunterregulation, die nach 2x72 h wieder anstieg. Gleichzeitig stieg der Anteil der PD-L1<sup>+</sup> Zellen.



**Abbildung 9 | Phänotypisierung der Zelllinie *Mlh1*<sup>-/-</sup> A7450 T1 M1 nach CDKI-Behandlung.**

Die Zelllinie *Mlh1*<sup>-/-</sup> A7450 T1 M1 wurde mit Abemaciclib (5  $\mu$ M), Palbociclib (5  $\mu$ M), Dinaciclib (0,1  $\mu$ M) und THZ1 (0,83  $\mu$ M) für 72 h und für 2x72 h behandelt. Als Kontrolle für Palbociclib dienten Zellen, die ausschließlich im Vollmedium kultiviert wurden. Für Abemaciclib, Dinaciclib und THZ1 wurde dem Vollmedium DMSO äquivalenter Dosis zugesetzt (zusammengefasst unter Kontrolle). Quantitative Darstellung der Abundanz von MHC-I, PD-1, PD-L1 und CTLA-4. MW + Stabw; n = 3-6 unabhängige Versuche; \*p<0,05 (vs. Kontrolle); One-way ANOVA (Tukey post-hoc).

Bei der Zelllinie *Mlh1*<sup>-/-</sup> 328 konnten keine signifikanten Unterschiede im Oberflächenprofil der untersuchten Marker detektiert werden (s. Abbildung 10). Auffällig war jedoch die, im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, stark reduzierte Expression von PD-1 unter der Dinaciclib-Behandlung nach 2x72 h, ähnlich wie bei der Zelllinie *Mlh1*<sup>-/-</sup> A7450 T1 M1 nach 72 h.

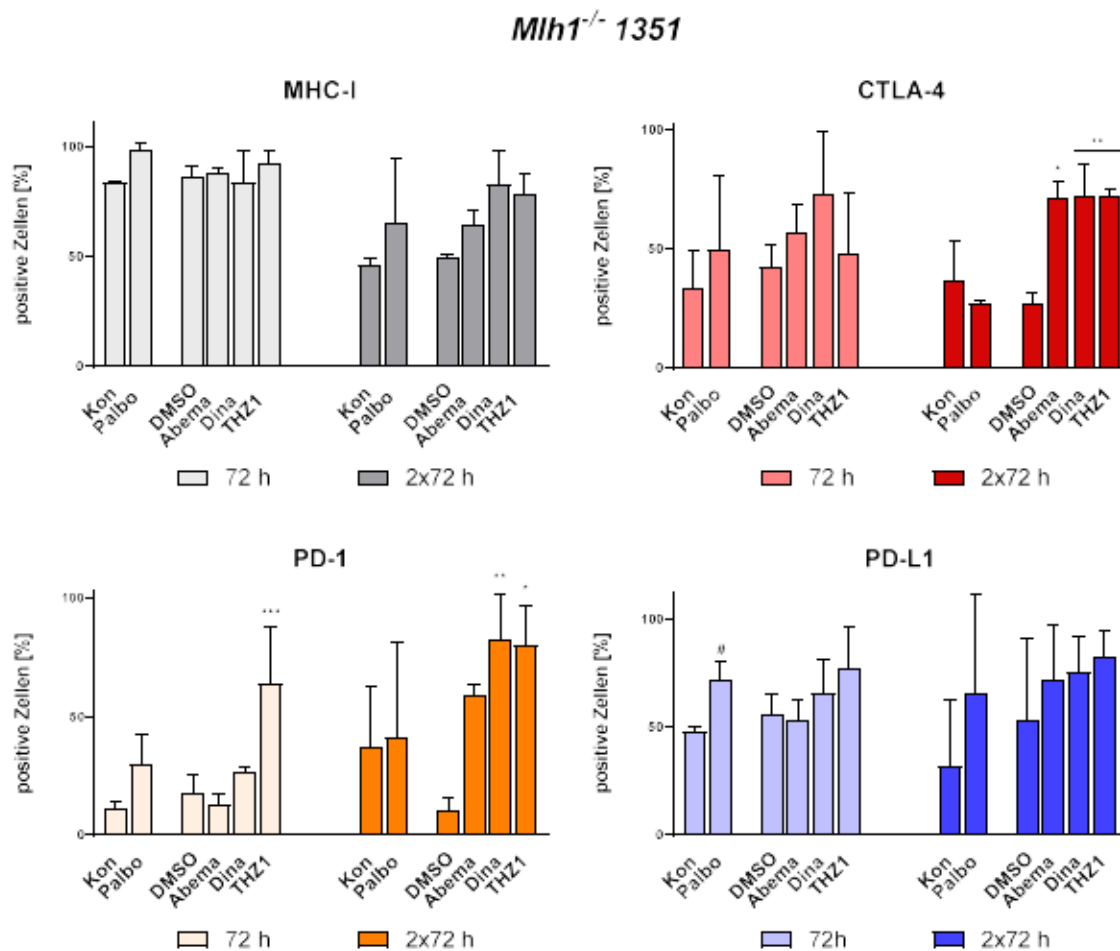


**Abbildung 10 | Phänotypisierung der Zelllinie *Mlh1*<sup>-/-</sup> 328 nach CDKI-Behandlung.**

Die Zelllinie *Mlh1*<sup>-/-</sup> 328 wurde mit Abemaciclib (5  $\mu$ M), Palbociclib (5  $\mu$ M) und Dinaciclib (0,1  $\mu$ M) für 72 h und für 2x72 h behandelt. Als Kontrolle für Palbociclib dienten Zellen, die ausschließlich im Vollmedium kultiviert wurden. Für Abemaciclib und Dinaciclib wurde dem Vollmedium DMSO äquivalenter Dosis zugesetzt. Quantitative Darstellung der Abundanz von MHC-I, PD-1, PD-L1 und CTLA-4. MW + Stabw; n = 3-5 unabhängige Versuche.

In Abbildung 11 sind die Ergebnisse der Phänotypisierung der lymphoiden Linie *Mhl1*<sup>-/-</sup> 1351 dargestellt. Hier ließen sich, im Gegensatz zu den anderen Zelllinien, teils erhebliche Unterschiede in der Expression nachweisen. Aufgrund der hohen basalen MHC-I-Expression veränderte sich das Profil durch die Behandlung nur marginal. Nach 2x72 h verringert sich die basale Expression, gleichzeitig wurde MHC-I durch alle CDKIs vermehrt nachgewiesen. Eine Hochregulation von CTLA-4 ließ sich sowohl nach 72 h, als auch nach 2x72 h feststellen. Diese wurde durch Abemaciclib, Dinaciclib und THZ1, jedoch nicht durch Palbociclib, vermittelt. THZ1, Abemaciclib und Dinaciclib induzieren in unterschiedlicher Frequenz und zeitlicher Dynamik PD-1. Beim Vergleich der PD-L1-Expressionen zeigen sich weniger starke Unterschiede. Palbociclib regulierte transient PD-L1 hoch, Tendenzen wurden auch unter Dinaciclib und THZ1 beobachtet. Nach 2x72 h waren, unabhängig von der Behandlung, mehr PD-L1<sup>+</sup> Zellen nachweisbar als in der Kontrolle.

Zusammenfassend belegen die Daten den immunmodulatorischen Einfluss von CDKIs auf Tumorzellen, insbesondere bei Zellen lymphoiden Ursprungs. Dieser Effekt war nach längerer Beobachtungszeit stärker ausgeprägt. Insbesondere die Immuncheckpoint-Moleküle CTLA-4, PD-1 und PD-L1 wurden zum Teil stark induziert, vor allem unter dem Einfluss von Abemaciclib, Dinaciclib und THZ1.



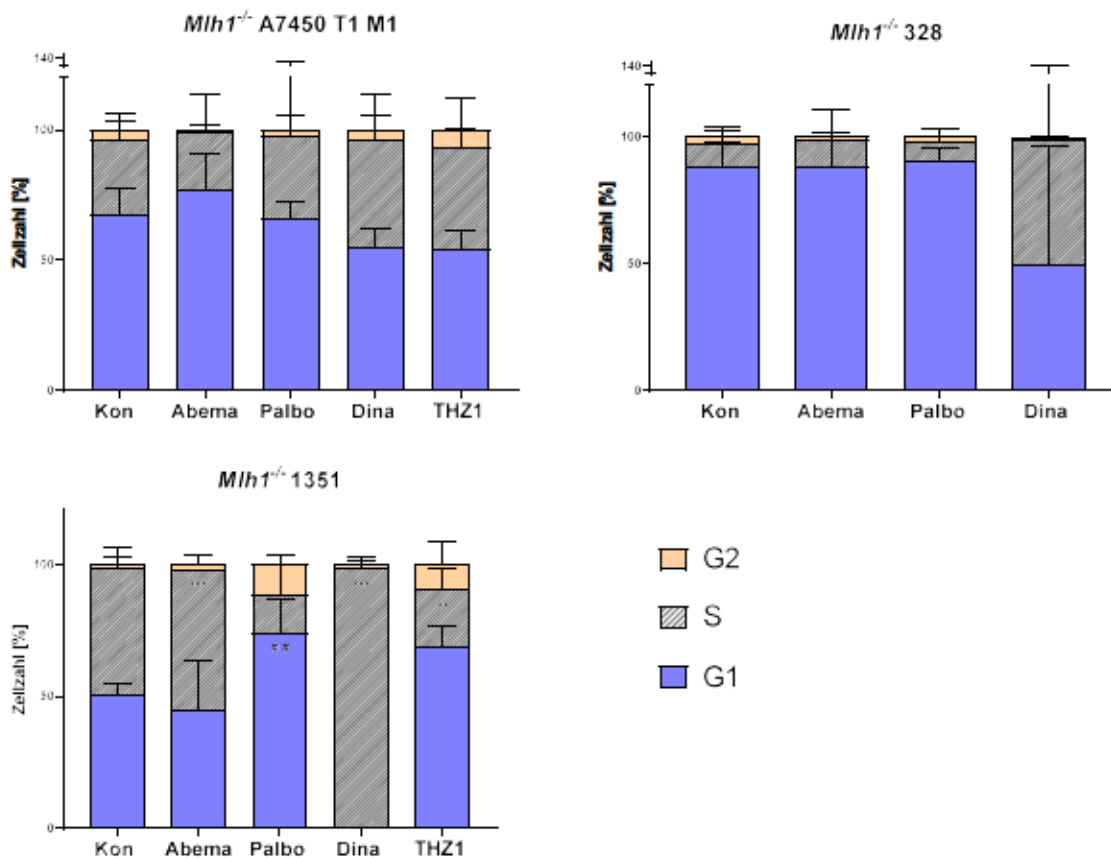
**Abbildung 11 | Phänotypisierung der Zelllinie *Mlh1*<sup>-/-</sup> 1351 nach CDKI-Behandlung.**

Die Zelllinie *Mlh1*<sup>-/-</sup> 1351 wurde mit Abemaciclib (5  $\mu$ M), Palbociclib (5  $\mu$ M), Dinaciclib (0,1  $\mu$ M) und THZ1 (0,25  $\mu$ M) für 72 h und für 2x72 h behandelt. Als Kontrolle für Palbociclib dienten Zellen, die ausschließlich im Vollmedium kultiviert wurden. Für Abemaciclib, Dinaciclib und THZ1 wurde dem Vollmedium DMSO äquivalenter Dosis zugesetzt. Quantitative Darstellung der Abundanz von MHC-I, PD-1, PD-L1 und CTLA-4. MW + Stabw; n = 3-6 unabhängige Versuche. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,005$  (vs. DMSO-Kontrolle), # $p < 0,05$  (vs. Kontrolle); One-way ANOVA (Tukey post-hoc).

#### 4.1.3. Zellzyklusanalyse

Anschließend wurde der Einfluss der CDKIs auf den Zellzyklus untersucht (s. Abbildung 12). In Analogie zu den Vorbefunden zeigten sich auch in dieser Analyse zelllinienspezifische und teilweise sehr heterogene Effekte. Abemaciclib induzierte einen G1-Phasenarrest in der Zelllinie *Mlh1*<sup>-/-</sup> A7450 T1 M1. Bei der Zelllinie *Mlh1*<sup>-/-</sup> 328 wurden keine Unterschiede detektiert. Dinaciclib als global wirkender CDKI führte bei allen Linien zu einem S-Phasenarrest. Vergleichbare Befunde wurden bei der Zelllinie *Mlh1*<sup>-/-</sup> A7450 T1 M1 unter THZ1-Behandlung nachgewiesen. Insgesamt reagierte die Linie *Mlh1*<sup>-/-</sup> 1351 im Vergleich zu

den epithelialen Linien sensitiver auf die CDKI-Behandlung. Palbociclib und THZ1 induzierten hier einen G1-Arrest.



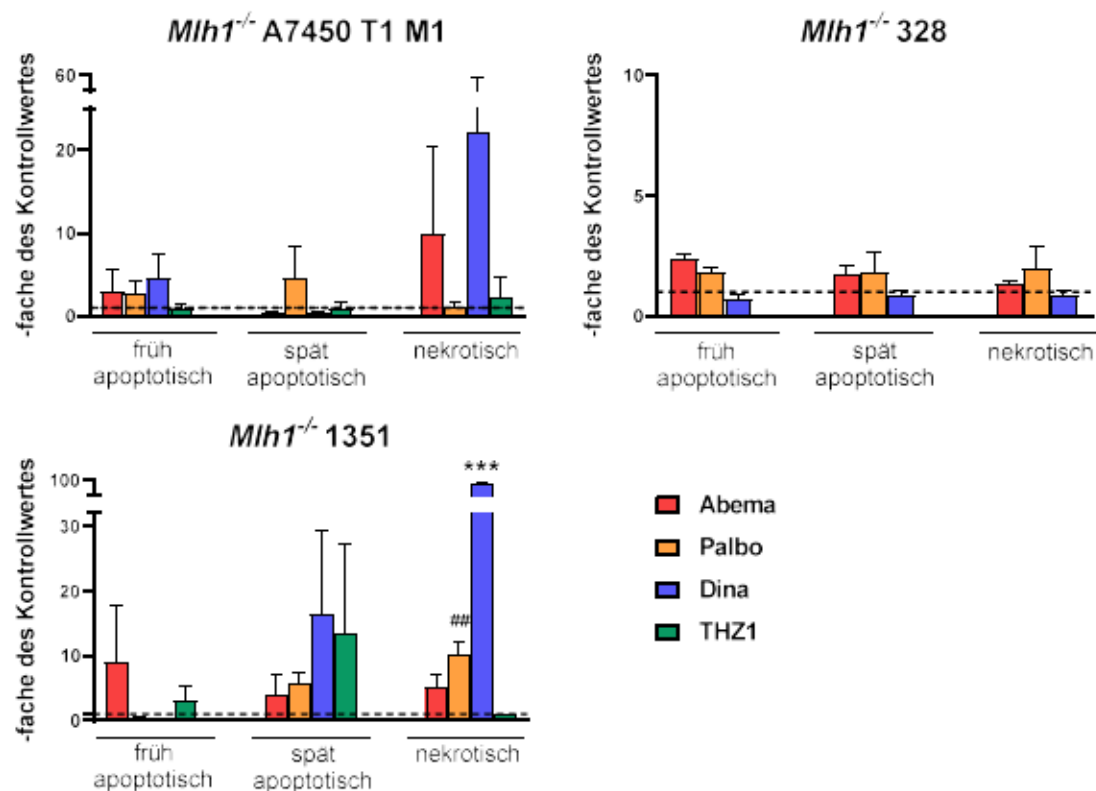
**Abbildung 12 | Zellzyklusanalyse der Zelllinien *Mlh1*<sup>-/-</sup> A7450 T1 M1, *Mlh1*<sup>-/-</sup> 328 und *Mlh1*<sup>-/-</sup> 1351 nach CDKI-Behandlung.**

Die Zelllinien *Mlh1*<sup>-/-</sup> A7450 T1 M1, *Mlh1*<sup>-/-</sup> 328 und *Mlh1*<sup>-/-</sup> 1351 wurden mit Abemaciclib (5 µM), Palbociclib (5 µM) und Dinaciclib (0,1 µM) für 48 h behandelt. Für die Linien *Mlh1*<sup>-/-</sup> A7450 T1 M1 und *Mlh1*<sup>-/-</sup> 1351 wurde außerdem eine THZ1-Behandlung (0,83 µM [*Mlh1*<sup>-/-</sup> A7450 T1 M1] bzw. 0,25 µM [*Mlh1*<sup>-/-</sup> 1351]) durchgeführt. Als Kontrolle für Palbociclib dienten Zellen, die ausschließlich im Vollmedium kultiviert wurden. Für Abemaciclib, Dinaciclib und THZ1 wurde dem Vollmedium DMSO äquivalenter Dosis zugesetzt (zusammengefasst unter Kontrolle). Dargestellt ist der prozentuelle Anteil an Zellen in der G2-, S- und G1-Phase. MW + Stabw; n = 2-5 unabhängige Versuche; \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,005 (vs. DMSO-Kontrolle), ##p<0,01 (vs. Kontrolle); One-way ANOVA (Tukey post-hoc).

Somit konnten in Abhängigkeit der verwendeten CDKIs Zellzyklusveränderungen nachgewiesen werden.

## 4.1.4. Nachweis apoptotischer und nekrotischer Zellen

Die folgenden Daten (s. Abbildung 13) wurden in Zusammenarbeit mit Inken Salewski erhoben [100]. Bei der epithelialen Zelllinie *Mlh1*<sup>-/-</sup> A7450 T1 M1 führten die CDKI-Behandlungen insbesondere unter Abemaciclib und Dinaciclib zu einem erhöhten Anteil früh apoptotischer und vor allem nekrotischer Zellen. Für THZ1 und Palbociclib waren diese Effekte schwächer ausgeprägt, dafür konnten unter letztgenanntem vermehrt spät apoptotische Zellen nachgewiesen werden. Diese Auswirkungen waren bei der Zelllinie *Mlh1*<sup>-/-</sup> 328 deutlich geringer bis gar nicht ausgeprägt. Lediglich durch Abemaciclib kam es zu einer leichten Erhöhung früh apoptotischer, durch Palbociclib zu einer leichten Erhöhung nekrotischer Zellen. Auch bei der lymphoiden Zelllinie *Mlh1*<sup>-/-</sup> 1351 wurden durch die CDKI-Behandlungen vermehrt nekrotische Zellen detektiert, insbesondere durch Abemaciclib sowie signifikant durch Palbo- und Dinaciclib. Hier erhöhten alle CDKIs den Anteil spät apoptotischer Zellen.



**Abbildung 13 | Nachweis apoptotischer und nekrotischer Zellen der Zelllinien *Mlh1*<sup>-/-</sup> A7450 T1 M1, *Mlh1*<sup>-/-</sup> 328 und *Mlh1*<sup>-/-</sup> 1351 nach CDKI-Behandlung.**

Die Zelllinien *Mlh1*<sup>-/-</sup> A7450 T1 M1, *Mlh1*<sup>-/-</sup> 328 und *Mlh1*<sup>-/-</sup> 1351 wurden mit Abemaciclib (5  $\mu$ M), Palbociclib (5  $\mu$ M) und Dinaciclib (0,1  $\mu$ M) für 72 h behandelt. Für die Linien *Mlh1*<sup>-/-</sup> A7450 T1 M1 und *Mlh1*<sup>-/-</sup> 1351 wurde außerdem eine THZ1-Behandlung (0,83  $\mu$ M [*Mlh1*<sup>-/-</sup> A7450 T1 M1] bzw. 0,25  $\mu$ M [*Mlh1*<sup>-/-</sup> 1351]) durchgeführt. Als Kontrolle für Palbociclib dienten Zellen, die ausschließlich im Vollmedium kultiviert wurden.

Für Abemaciclib, Dinaciclib und THZ1 wurde dem Vollmedium DMSO äquivalenter Dosis zugesetzt. Dargestellt sind Relativwerte als Vielfaches der jeweiligen Kontrolle (Kontrolle entspricht dem Wert 1,0). MW ± Stabw; n = 3 unabhängige Versuche; \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,005$  (vs. DMSO-Kontrolle), ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,005$  (vs. Kontrolle); One-way ANOVA (Tukey post-hoc).

#### 4.1.5. Ko-Kulturversuch

Das Modell der Zellkultur und die darauf basierenden Versuche können die Komplexität eines Organismus und seiner Pathologien nur teilweise abbilden. Eine Annäherung des Kultursystems an organische Verhältnisse kann durch eine Ko-Kultur realisiert werden, indem diese eine Schnittstelle zwischen *in vitro* und *in vivo* schafft.

Dazu wurden die zwei Tumorzelllinien *Mlh1*<sup>-/-</sup> A7450 T1 M1 und *Mlh1*<sup>-/-</sup> 328 mit Leukozyten von *Mlh1*<sup>-/-</sup> Mäusen in Anwesenheit folgender Testsubstanzen für 72 h ko-kultiviert: (I) Abemaciclib, (II) anti-PD-L1-Antikörper, (III) Kombination. Anschließend wurde der Anteil residueller Zellen durchflusszytometrisch ermittelt, wie in Abbildung 14 dargestellt. Mit diesem Versuch wurden die zytoreduktiven Eigenschaften der CDKIs sowie der Kombinationstherapie ersichtlich. Infolge der Abemaciclibmonotherapie reduzierte sich die Zellzahl der *Mlh1*<sup>-/-</sup> A7450 T1 M1 auf 22 %, die der *Mlh1*<sup>-/-</sup> 328 auf 10 %. Ein ähnlicher Effekt konnte bei beiden Zelllinien durch die Kombinationstherapie erzielt werden. Eine alleinige Behandlung mit dem anti-PD-L1-Antikörper hatte keinen Einfluss auf die Zellzahl. Während bei der *Mlh1*<sup>-/-</sup> A7450 T1 M1 noch über 90 % der Zellen vital waren, stieg die Zellzahl der *Mlh1*<sup>-/-</sup> 328 sogar auf das 1,4-fache.

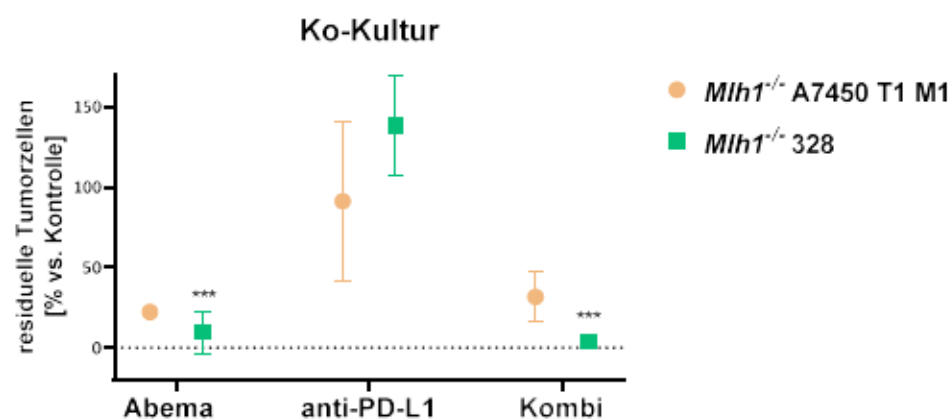


Abbildung 14 | Ko-Kultur: Anteil residueller Zellen der Linien *Mlh1*<sup>-/-</sup> A7450 T1 M1 und *Mlh1*<sup>-/-</sup> 328.

Die Zelllinien *Mlh1*<sup>-/-</sup> A7450 T1 M1 und *Mlh1*<sup>-/-</sup> 328 wurden mit Leukozyten aus *Mlh1*<sup>-/-</sup> Mäusen für 72 h ko-kultiviert und mit Abemaciclib (5 µM), anti-PD-L1 (10 µg/ml) sowie einer Kombination behandelt. Dargestellt ist die prozentuale Zellzahl nach Behandlung in Relation zu den unbehandelten Kontrollzellen. MW ± Stabw; n = 3 unabhängige Versuche; \*\*\* $p < 0,005$  (vs. anti-PD-L1); One-way ANOVA (Tukey post-hoc).

Neben der Tumorzellzahl wurde auch der Phänotyp erfasst. Hierbei wurde die Abundanz der Oberflächenmarker LAG-3 sowie CTLA-4 gemessen (s. Abbildung 15).

Insgesamt reagierten die Leukozyten sehr ähnlich, unabhängig davon, welcher Tumorzelllinie sie exponiert waren. Die LAG-3-Expression konnte durch jeden Behandlungsansatz hochreguliert werden, besonders durch den Einsatz von Abemaciclib. Bei der *Mlh1*<sup>-/-</sup> 328 konnte dieser Effekt nur durch die Kombinationstherapie übertroffen werden. Alle Leukozyten reagierten sowohl auf Abemaciclib als auch die Kombinationstherapie mit einer verstärkten Präsentation von CTLA-4, bei *Mlh1*<sup>-/-</sup> 328 war dies unter Abemaciclib signifikant. Die Behandlung mit anti-PD-L1 schien dagegen keinen Effekt auf CTLA-4 zu haben.

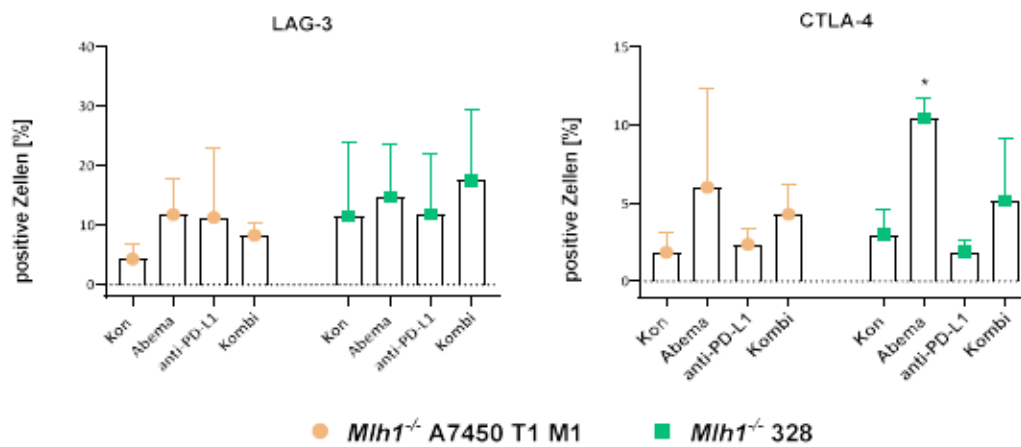


Abbildung 15 | Ko-Kultur: Phänotypisierung der murinen Leukozyten.

Die Zelllinien *Mlh1*<sup>-/-</sup> A7450 T1 M1 und *Mlh1*<sup>-/-</sup> 328 wurden mit Leukozyten aus *Mlh1*<sup>-/-</sup> Mäusen ko-kultiviert und mit Abemaciclib (5  $\mu$ M), anti-PD-L1 (10  $\mu$ g/ml), sowie einer Kombination aus Abemaciclib und anti-PD-L1 behandelt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil positiver Zellen. MW  $\pm$  Stabw; n = 3-4 unabhängige Versuche; \*p<0,05 (vs. Kontrolle); One-way ANOVA (Tukey post-hoc).

### 4.2. *In vivo* Analysen

---

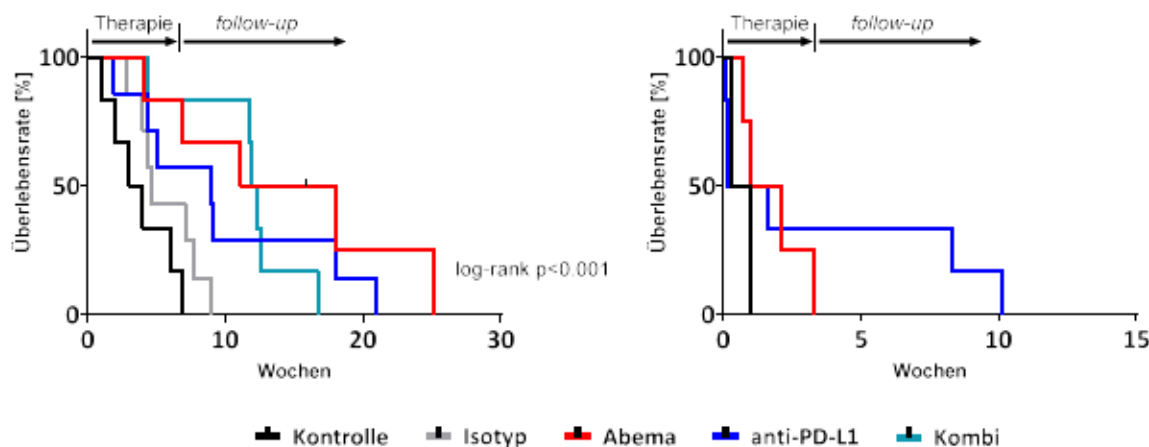
*Mlh1*<sup>-/-</sup> Mäuse, die entweder gastrointestinale Tumore oder Lymphome entwickelten, wurden nach Diagnosestellung randomisiert und den jeweiligen Versuchsgruppen zugeordnet. Diese umfassen: (I) unbehandelte Kontrollgruppe, (II) Isotypkontrollantikörper, (III) Monotherapie mit Abemaciclib, (IV) Monotherapie mit anti-PD-L1, sowie (V) die Kombination.

#### 4.2.1. Gesamtüberleben

Die Gesamtüberlebenszeit der Tiere mit gastrointestinalen Tumoren ist in Abbildung 16 (links) als Kaplan-Meier-Kurve in der *log-rank* Analyse dargestellt.

Alle drei Therapieansätze verlängerten das Gesamtüberleben im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren signifikant. Interessanterweise war Abemaciclib am wirksamsten. Während die Kontrollmäuse nach Diagnosestellung im Schnitt nur 3,5 Wochen lebten, hatten mit Abemaciclib behandelte Tiere eine mittlere Gesamtüberlebenszeit von 11,97 Wochen (Median 11,1 Wochen), mit anti-PD-L1 behandelte Tiere 9,76 Wochen (Median 9,0 Wochen). Das mittlere Gesamtüberleben von Tieren, die die Kombinationstherapie erhielten, lag bei 11,58 Wochen (Median 12,08 Wochen) und zeigte somit eine Überlegenheit gegenüber der anti-PD-L1-, nicht aber gegenüber der Abemaciclibtherapie.

Die Aussagekraft des Therapieerfolgs bei den Lymphomtieren (s. Abbildung 16, rechts) ist durch die geringere Tierzahl pro Gruppe eingeschränkt. Aufgrund der sehr raschen Progression und des aggressiven Wachstums der Lymphome, konnten viele Tiere nicht rechtzeitig diagnostiziert und somit entweder gar nicht oder zu spät in die jeweiligen Therapiegruppen aufgenommen werden. Bei den Tieren, die eine Therapie erhielten, zeigte sich eine Überlegenheit der anti-PD-L1-Monotherapie. Während Kontrolltiere durchschnittlich 0,65 Wochen (Median 0,65 Wochen) und mit Abemaciclib behandelte Tiere 1,78 Wochen (Median 1,55 Wochen) nach Diagnosestellung bzw. Therapiebeginn verstarben, lebten mit anti-PD-L1 behandelte Tiere im Schnitt noch 3,4 Wochen (Median 0,87 Wochen) nach Therapiebeginn. Die Daten sind in Tabelle 9 zusammengefasst.



**Abbildung 16 | Kaplan-Meier-Kurve. Gesamtüberleben der Tiere mit gastrointestinalen Tumoren (links) und mit Lymphomen (rechts).**

Gastrointestinale Tumore (links): Kontrolle: n = 6; Isotyp: n = 7; Abema: n = 6; anti-PD-L1: n = 7; Kombi: n = 6. Isotyp vs. anti-PD-L1: p < 0,05; Kontrolle vs. Abema: p < 0,01; Kontrolle vs. Kombi: p < 0,01. Lymphome (rechts): Kontrolle: n = 2; Abema: n = 4; anti-PD-L1: n = 6. Log-rank Analyse (Mantel Cox).

**Tabelle 9 | Statistische Daten des Gesamtüberlebens**

**Gastrointestinale Tumore**

| Gruppen    | Durchschnittliches Überleben (Wochen) | Medianes Überleben (Wochen) | SD   | 95 % - KI für Median |
|------------|---------------------------------------|-----------------------------|------|----------------------|
| Kontrolle  | 3,54                                  | 3,00                        | 2,21 | 98,44 %              |
| Isotyp     | 5,66                                  | 4,70                        | 2,26 | 98,44 %              |
| Abema      | 11,97                                 | 11,10                       | 8,15 | 98,44 %              |
| anti-PD-L1 | 9,75                                  | 9,00                        | 7,18 | 98,44 %              |
| Kombi      | 11,58                                 | 12,08                       | 4,02 | 96,88 %              |

**Lymphome**

| Gruppe     | Durchschnittliches Überleben (Wochen) | Medianes Überleben (Wochen) | SD   | 95 % - KI für Median |
|------------|---------------------------------------|-----------------------------|------|----------------------|
| Kontrolle  | 0,64                                  | 0,64                        | 0,50 | 50,00 %              |
| anti-PD-L1 | 3,40                                  | 0,87                        | 4,57 | 96,88 %              |
| Abema      | 1,77                                  | 1,55                        | 1,17 | 87,50 %              |

SD: standard deviation (Standardabweichung); KI: Konfidenzintervall; Abema: Abemaciclib; Kombi: Abemaciclib + anti-PD-L1

## 4.2.2. Einfluss auf das Tumorwachstum

Zur longitudinalen Verlaufskontrolle des Tumorwachstums wurde nach einer initialen Bildgebung im Verlauf (ca. 30 Tage später) eine zweite Bildgebung mittels PET/CT durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt.

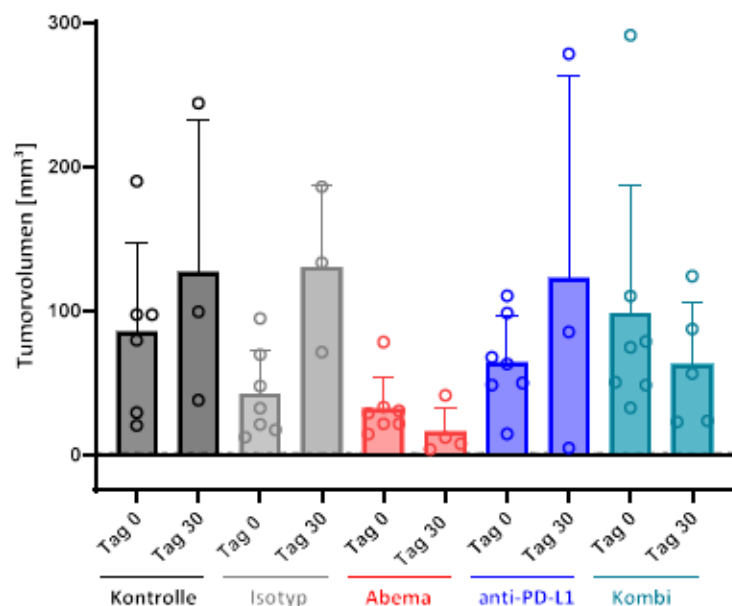


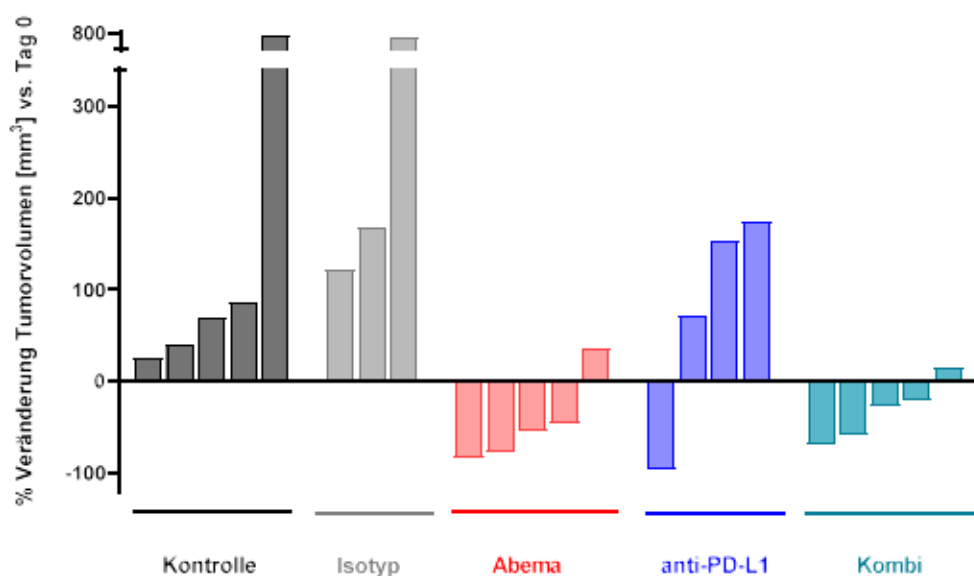
Abbildung 17 | Quantitative PET/CT-Auswertung.

Bei Verdacht auf einen Tumor wurde eine Bildgebung mittels PET/CT durchgeführt (= Tag 0). Daraufhin erfolgte ca. 30 Tage nach Therapiebeginn eine erneute Aufnahme. Dargestellt ist das mittlere Tumolvolumen in  $\text{mm}^3$ . MW + Stabw; Kontrolle:  $n = 6$ , Isotyp:  $n = 7$ , Abemaciclib:  $n = 7$ , anti-PD-L1:  $n = 7$ , Kombinationstherapie:  $n = 7$ .

Die Monotherapie mit Abemaciclib und die Kombinationstherapie zeigten das größte Therapieansprechen in Bezug auf die Reduktion des Tumolvolumens. Zu Therapiebeginn betrug die durchschnittliche Tumorgöße der Tiere aller Versuchsgruppen  $64,14 \pm 33,43 \text{ mm}^3$ , wobei die Unterschiede der Tumorgößen zwischen den verschiedenen Gruppen nicht signifikant waren. Die Kontrollgruppen (unbehandelt und Isotypkontrollantikörper) zeigten ein progredientes Tumorwachstum. Sowohl Abemaciclib- als auch die Kombinationstherapie zeigten untereinander vergleichbare Ergebnisse und induzierten eine Teilremission. Durch Abemaciclib konnte ein durchschnittlicher Tumorregress um 51 % erreicht werden, mit der Kombinationstherapie ein Regress um 36 %. Unter der anti-PD-L1-Therapie wiesen die Versuchstiere ein sehr individuelles Ansprechen auf. Betrachtet man die mittlere Tumorgöße, so zeigte sich durch die anti-PD-L1-Therapie insgesamt ein Progress. Bei Betrachtung der

individuellen Verläufe (s. Abbildung 18) wird jedoch deutlich, dass innerhalb der Versuchsgruppe starke Schwankungen auftraten. Während zwei Tiere ein progredientes Wachstum um 72 % und 153 % zeigten, reduzierte sich die Tumorgöße bei einer weiteren Maus auf unter 5 % der Ausgangsgröße, womit nahezu eine Vollremission erreicht wurde.

Innerhalb der beiden Kontrollgruppen zeigten jeweils alle Tiere ein starkes Tumorwachstum. Unter der Abemaciclibmono- und Kombinationstherapie wiesen jeweils 4 von 5 Tieren einen Regress auf. Eines der mit Abemaciclib behandelten Tiere zeigte einen Tumorprogress um 36 %, eines der Tiere der Kombinationsgruppe einen leichten Progress um 16 %.



**Abbildung 18 | Quantitative PET/CT-Auswertung einzelner Versuchstiere.**

Dargestellt ist die prozentuale Veränderung des Tumorvolumens jedes individuellen Tieres an Tag 30 im Vergleich zu Tag 0.

#### 4.2.3. Phänotypisierung

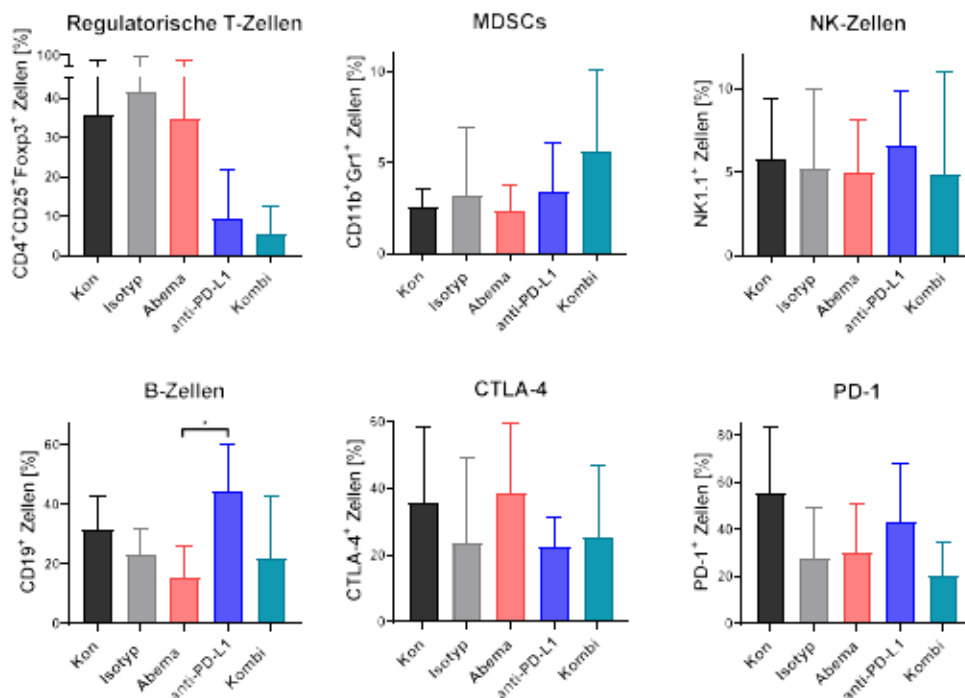
Routinemäßige Blutentnahmen (alle 6-7 Wochen) sowie abschließende Blutproben am Endpunkt dienten dem Nachweis von therapieassoziierten Veränderungen. Der Fokus lag hierbei auf der Untersuchung von Markern für Tregs, MDSCs, NK-Zellen, B-Zellen sowie auf dem Expressionsprofil der Immuncheckpoint-Moleküle CTLA-4 und PD-1 als Indikatoren für erschöpfte T-Zellen. Ergänzend wurden durchflusszytometrische Phänotypisierungen von Milz und Tumor durchgeführt.

Die Ergebnisse der Phänotypisierung der Blutentnahmen sind der Abbildung 28 im Anhang zu entnehmen. Zur Übersichtlichkeit sind ausschließlich Daten dargestellt, die zu

Therapiebeginn, an Tag 42 und zum Endpunkt erhoben wurden. Unbehandelte Kontrolltiere überlebten nach Einschluss in den Versuch in der Regel nicht bis Tag 42, so dass hier keine Daten vorhanden sind. Die Daten der Blutentnahmen der Kontrollgruppe an Tag 0 wurden durch historische Daten ebenfalls unbehandelter *Mh1<sup>-/-</sup>* Mäuse aus früheren Studien derselben Arbeitsgruppe ergänzt.

Während bei Kontrolltieren die Anzahl an Tregs im Blut zunahm, konnte bei allen Therapien eine Reduktion eine Abnahme beobachtet werden. Die Anzahl der MDSCs sowie der NK-Zellen nahm im Verlauf in allen Therapiegruppen zu. Sowohl die anti-PD-L1-Monotherapie als auch die Kombinationstherapie führten zu einer Reduktion der B-Zellen. Unter Abemaciclib zeigte sich final ein vergleichbarer Effekt. Die Anzahl an CTLA-4<sup>+</sup> Zellen sank zunächst unter der Abemaciclibmonotherapie, nahm dann aber wieder zu. Durch die anti-PD-L1-Monotherapie ließ sich der umgekehrte Fall beobachten: Nach einem vorübergehenden Anstieg kam es zu einer Abnahme der CTLA-4<sup>+</sup> Zellen. Unter der Kombinationstherapie nahm die Anzahl kontinuierlich ab. Betrachtet man jedoch die Anzahl der PD-1<sup>+</sup> Zellen im Blut, so sieht man einen Anstieg dieser durch die Kombinationstherapie. Auch bei den Monotherapien war im Vergleich zum Therapiebeginn ein leichter Anstieg zu verzeichnen, der jedoch geringer ausfällt, als bei der Kontrollgruppe.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass alle Therapieansätze zu einer Reduktion der immunsuppressiven Tregs sowie erschöpften T-Zellen führen. Ähnliche Befunde zeigten sich auch bei der Untersuchung der Milzen (s. Abbildung 19). Die anti-PD-L1-Mono- und Kombinationstherapie führten in gleicher Weise zu einer deutlichen Reduktion der Tregs. Abemaciclib hingegen hatten keinen Einfluss auf die Anzahl an Tregs. Die MDSCs wurden ausschließlich nach Kombinationsbehandlung vermehrt detektiert. Ebenso hatte keines der Behandlungsschemata einen Einfluss auf die NK-Zellen. Die Anzahl der B-Zellen in der Milz nahm unter Abemaciclibmono- und Kombinationstherapie ab, während sie unter anti-PD-L1-Behandlung zunahm. Die Expression der Immuncheckpoint-Moleküle variierte auch in der Milz. Betrachtet man die Anzahl PD-1<sup>+</sup> Zellen, so zeigt sich eine Reduktion durch alle Therapieansätze, insbesondere durch die Kombinationstherapie.

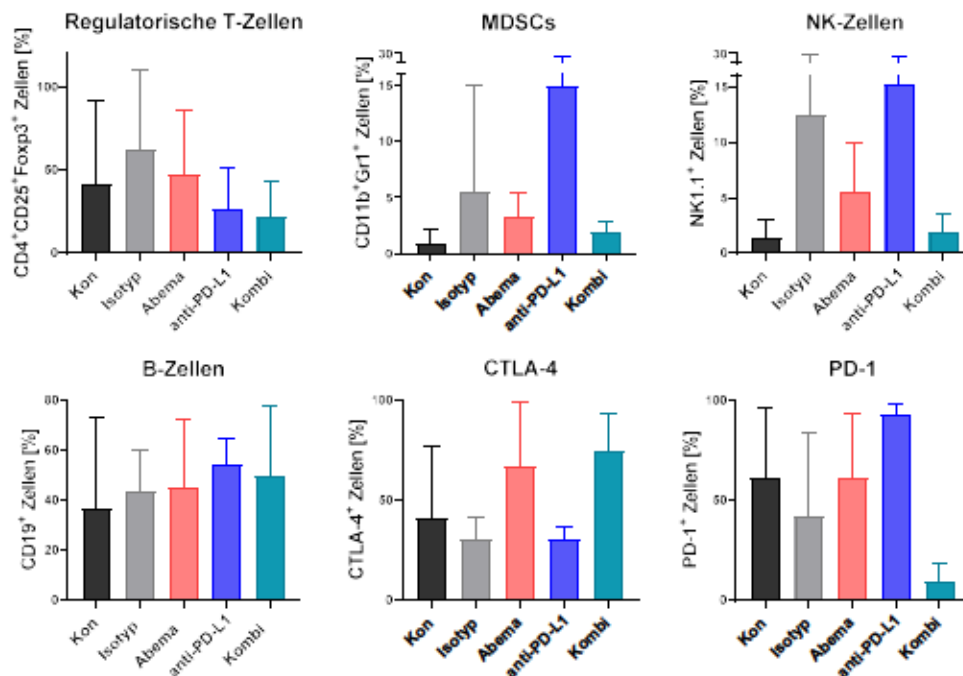


**Abbildung 19 | Immunphänotypisierung der Milzen.**

Final entnommene Milzen wurden phänotypisiert und durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt ist der prozentuale Anteil positiver Zellen. MW + Stabw; Kontrolle: n = 3; Isotyp: n = 5; Abema: n = 7-8; anti-PD-L1: n = 5-7; Kombi: n = 6; \*p<0,05 (Abema vs. anti-PD-L1); Kruskal-Wallis (Dunn).

*MDSCs: myeloide Suppressorzellen; NK: natürliche Killer*

Diese Ergebnisse spiegeln sich größtenteils auch in der Untersuchung der Tumore wider (s. Abbildung 20). Mit Ausnahme der Behandlung mit Abemaciclib führten beide Therapien zu einer Abnahme der Infiltration von Tregs in den Tumor. Dagegen stieg die Anzahl an MDSCs vor allem durch die anti-PD-L1-Therapie im Tumor an. Alle Behandlungen führten zu einem Anstieg an B-Zellen und NK-Zellen, insbesondere durch die Monotherapien. Die Untersuchung der Expression beider Immuncheckpoint-Moleküle variierte je nach Behandlung und je nach Molekül. Während die Anzahl an CTLA-4<sup>+</sup> Zellen im Tumor nur durch die anti-PD-L1-Therapie reduziert wurden, hatte ausschließlich die Kombinationstherapie einen Einfluss auf PD-1<sup>+</sup> Zellen.



**Abbildung 20 | Immunphänotypisierung der Tumore.**

Final entnommene Tumore wurden phänotypisiert und durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt ist der prozentuale Anteil positiver Zellen. MW + Stabw; Kontrolle: n = 3; Isotyp: n = 4; Abema: n = 3-4; anti-PD-L1: n = 2-3; Kombi: n = 4.

*MDSCs: myeloide Suppressorzellen; NK: natürliche Killer*

Anhand der Phänotypisierung zeigt sich der immunstimulatorische Einfluss der Therapieansätze. Immunsupprimierende Immunzellen wie Tregs konnten reduziert, antitumorale Immunzellen wie NK-Zellen und B-Zellen, je nach Behandlung, induziert werden. Es ließ sich ebenfalls eine Veränderung des Expressionsmusters der Immuncheckpoint-Moleküle nachweisen.

#### 4.2.4. Immunfluoreszenz

Um den Einfluss der unterschiedlichen Behandlungen auf das TME zu erfassen, wurden Gefrierschnitte der gastrointestinalen Tumore mittels Immunfluoreszenzfärbung an einem Laser-Scanning-Mikroskop untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt. Dabei fällt eine vermehrte T-Zell-Infiltration unter allen Therapieansätzen auf. Außerdem wurde eine Re-Expression von Interferon Regulatory Factor 5 (IRF5) beobachtet, die sowohl durch die Abemaciclibmono- als auch durch die Kombinationstherapie induziert wurde. Eine hohe IRF5-Expression wird als Charakteristikum für die Polarisierung proinflammatorischer

M1-Makrophagen angesehen. Eine zusätzliche Quantifizierung der weiteren Parameter ist den Abbildungen 22 und 23 zu entnehmen.

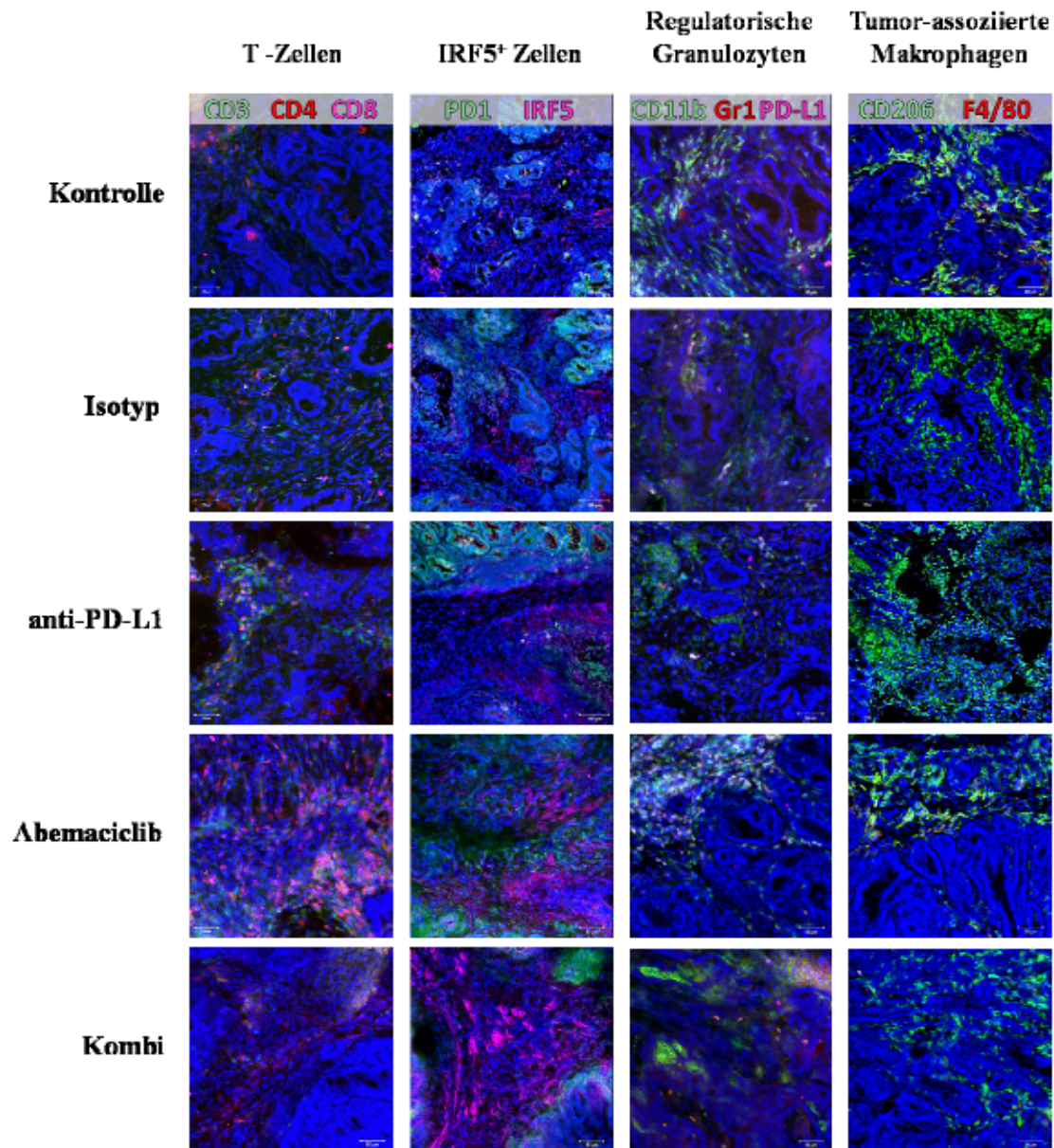


Abbildung 21 | Immunfluoreszenzmikroskopie gastrointestinaler Tumorpräparate von *Mlh1*<sup>+</sup> Mäusen.

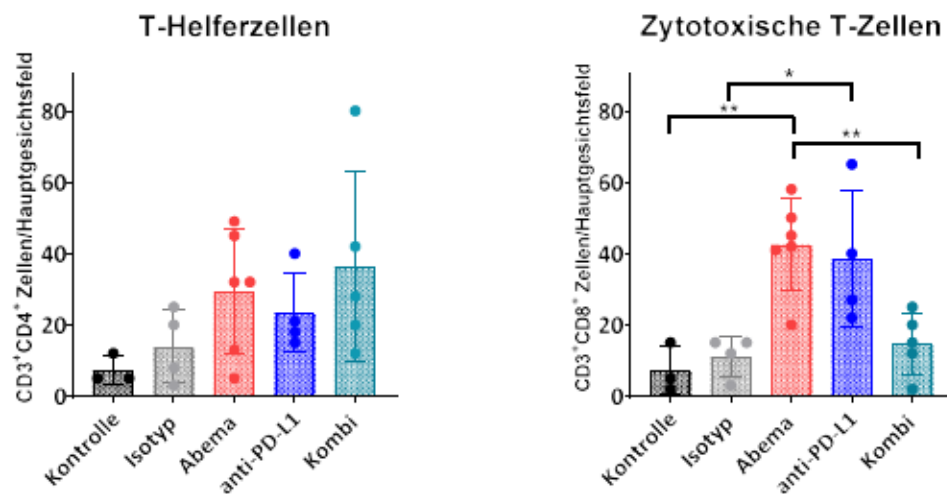
Gastrointestinale Tumore wurden nach Therapie (Abemaciclib, anti-PD-L1, Kombinationstherapie) bzw. Kontrolle (keine Intervention bzw. Isotypkontrollantikörper) mikroskopisch untersucht. Dargestellt sind repräsentative immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen in Originalvergrößerung 20x.

*IRF5*: interferon regulatory factor-5

Um die Infiltration durch die beiden T-Zell-Subtypen zu quantifizieren, wurden pro gefärbten Tumor 2-3 Hauptgesichtsfelder ausgezählt (s. Abbildung 22). Die Auswertung der Infiltration

durch Tumor-assoziierte Makrophagen sowie durch regulatorische Granulozyten erfolgte semiquantitativ mittels eines Scoring-Systems (s. Abbildung 23).

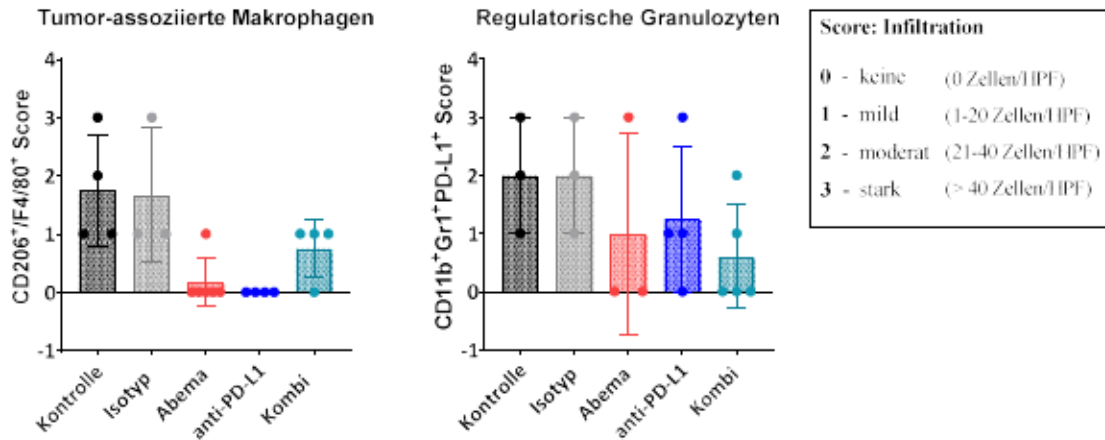
Hinsichtlich der T-Helferzellen konnte durch alle drei Behandlungen eine verstärkte Infiltration beobachtet werden, insbesondere unter der Kombinationstherapie. Dies war beim Infiltrationsmuster der CTLs nicht der Fall. Im Gegensatz dazu führten sowohl die Abemaciclib- als auch die anti-PD-L1-Monotherapie zu einer gesteigerten CTL-Infiltration.



**Abbildung 22 | Quantitative Auswertung der Infiltration durch T-Zellen.**

Gastrointestinale Tumorpräparate wurden mittels Immunfluoreszenz angefärbt. Residuelle Tumore wurden nach Therapie (Abemaciclib, anti-PD-L1, Kombinationstherapie) bzw. Kontrolle (keine Intervention bzw. Isotypkontrollantikörper) mikroskopisch untersucht. Dargestellt ist die Anzahl positiver Zellen/Hauptgesichtsfeld. MW ± Stabw; Kontrolle: n = 3; Isotyp: n = 4; Abema: n = 6; anti-PD-L1: n = 4; Kombi: n = 5; \*p<0,05, \*\*p<0,01; One-way ANOVA (Tukey post-hoc).

Betrachtet man das Infiltrationsmuster der Tumor-assoziierten Makrophagen und der regulatorischen Granulozyten, so zeigt sich eine verringerte Infiltration unter allen drei Behandlungen. Die Infiltration Tumor-assoziiierter Makrophagen (TAM) nahm insbesondere unter Monotherapie, die regulatorischer Granulozyten insbesondere unter Kombinationstherapie ab.

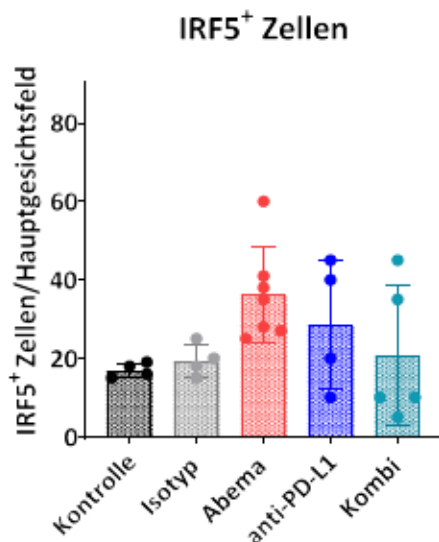


**Abbildung 23 |** Semiquantitative Auswertung der Infiltration durch Tumor-assoziierte Makrophagen und durch regulatorische Granulozyten.

Gastrointestinale Tumorpräparate wurden mittels Immunfluoreszenz angefärbt. Residuelle Tumore wurden nach Therapie (Abemaciclib, anti-PD-L1, Kombinationstherapie) bzw. Kontrolle (keine Intervention bzw. Isotypkontrollantikörper) mikroskopisch untersucht. Dargestellt ist die erreichte Punktzahl im Scoring (s. Legende oben rechts). MW ± Stabw; Kontrolle: n = 3-4; Isotyp: n = 3; Abema: n = 3-6; anti-PD-L1: n = 4; Kombi: n = 4-5; \*p<0,05, \*\*p<0,01; One-way ANOVA (Tukey post-hoc).

HPF: Hauptgesichtsfeld

Durch die beiden Monotherapien, insbesondere durch Abemaciclib, konnte die Anzahl an IRF5<sup>+</sup> infiltrierenden Zellen gesteigert werden, auch wenn dies nicht signifikant war. Im kombinationstherapeutischen Ansatz war dieser Effekt geringer ausgeprägt (s. Abbildung 24).

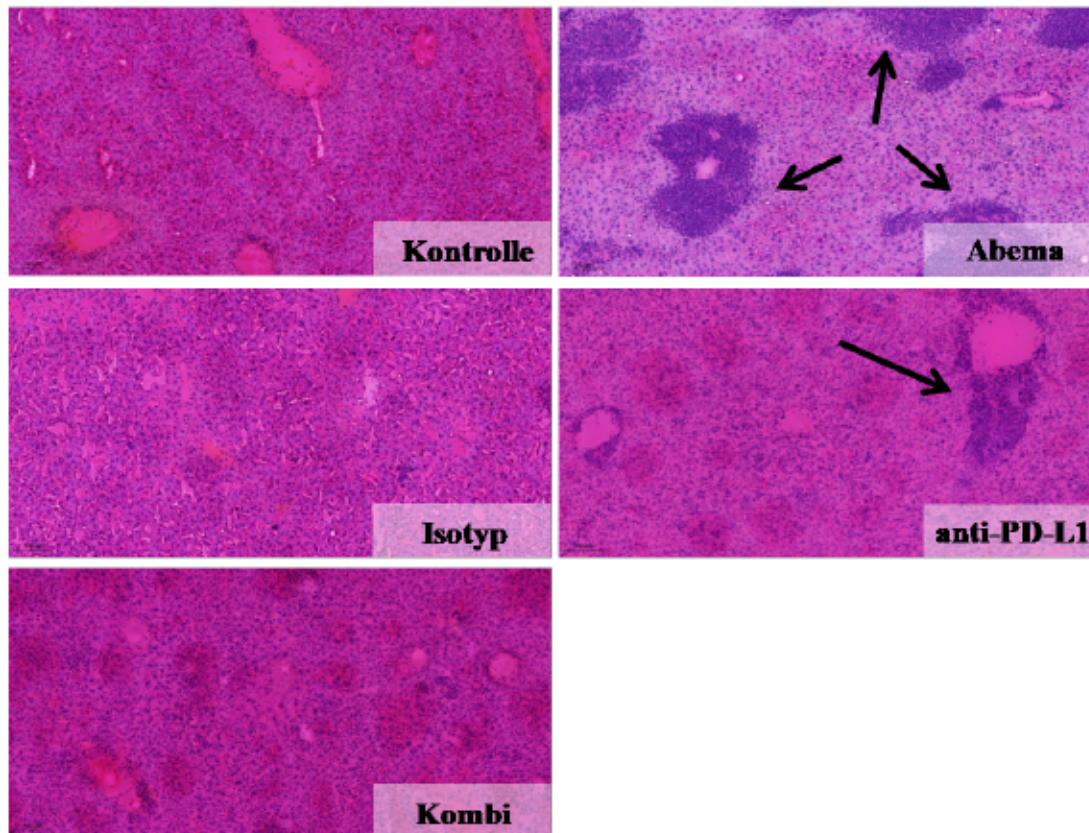


**Abbildung 24 |** Quantitative Auswertung der Infiltration durch IRF5<sup>+</sup> Zellen.

Gastrointestinale Tumorpräparate wurden mittels Immunfluoreszenz angefärbt. Residuelle Tumore wurden nach Therapie (Abemaciclib, anti-PD-L1, Kombinationstherapie) bzw. Kontrolle (keine Intervention bzw. Isotypkontrollantikörper) mikroskopisch untersucht. Dargestellt ist die Anzahl positiver Zellen/Hauptgesichtsfeld. MW ± Stabw; Kontrolle: n = 4; Isotyp: n = 4; Abema: n = 6; anti-PD-L1: n = 4; Kombi: n = 5.

#### 4.2.5. Histologische Untersuchung der Lebern

Um den Einfluss der Therapien auf die Leber sowie eine eventuelle Hepatotoxizität feststellen zu können, wurden histologische Leberpräparate (HE-gefärbt) mikroskopisch untersucht.



**Abbildung 25 | HE-gefärbte Leberpräparate.**

Lebergewebe wurde nach Entnahme kryokonserviert. Von diesem wurden Gefrierschnitte angefertigt, mit Methanol fixiert und einer HE-Färbung unterzogen. Anschließend erfolgte die Digitalisierung am Slide Scanner. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen in Originalvergrößerung 20x.

*HE: Hämatoxylin-Eosin*

Wie in Abbildung 25 zu sehen ist, zeigten sich in den Lebern sowohl der Abemaciclib- als auch der anti-PD-L1-Gruppen massive fokale lymphozytäre Infiltrate (mit Pfeilen markiert). Dies konnte bei den Lebern der Kombinationstherapie nicht beobachtet werden. Demgegenüber wurden hier fokale Nekrosen detektiert.

## 4.2.6. Fragmentlängenanalyse

Mit dem gewonnenen Tumorgewebe wurden Fragmentlängenanalysen durchgeführt, um zum einen eine MSI der Tumore, vor allem in nicht-kodierenden MS (ncMS)-Markern, nachzuweisen und zum anderen, um potentielle diagnostische murine kodierende MS (cMS)-Marker identifizieren zu können. Hierzu wurde aus dem Tumorgewebe gDNA isoliert und eine PCR durchgeführt. Da in Vorstudien der Einfluss einer anti-PD-L1-Therapie auf die Mutationsfrequenzen der MS-Marker bereits ausführlich untersucht wurde [101–103], erfolgte hier eine nähere Betrachtung der Abemaciclib- und Kombinationsgruppe.

## 4.2.6.1. Untersuchung nicht-kodierender Mikrosateliten

Die Bestimmung der Mutationsfrequenzen der ncMS-Marker bestätigte, dass *Mlh1*<sup>-/-</sup> Tumore unabhängig von der Versuchsgruppe eine hochgradige MSI aufweisen (s. 8.2.; Abbildung 29). Die durchschnittliche Mutationsfrequenz aller nicht-kodierenden Marker lag bei 90,2 % und erfüllt somit eindeutig die Kriterien einer MSI-H. Zu den Markern mit der höchsten Mutationshäufigkeit von 100 % zählen *Bat30*, *Bat26*, *D1Mit79*, *L24372* sowie *AC096777*. Die niedrigste Mutationsfrequenz von 60 % wurde bei dem Dinukleotidmarker *D15Mit93* festgestellt. Bei den Mutationen handelte es sich in der Regel um Deletionen. In Abbildung 26 sind repräsentative Elektropherogramme ausgewählter Marker dargestellt.

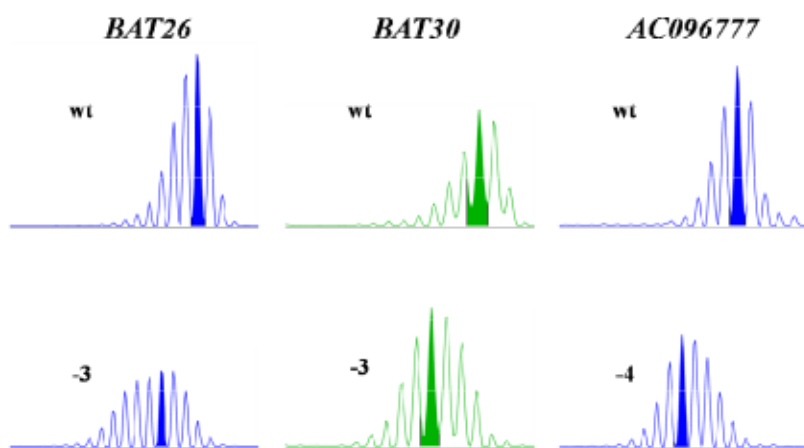


Abbildung 26 | Elektropherogramm der Fragmentlängenanalyse der *Mlh1*<sup>-/-</sup> Tumore.

Repräsentative Darstellung der ncMS-Marker *Bat26*, *Bat30* sowie *AC096777*. Der entsprechende Wildtyp der Genabschnitte (oben) ist den mutierten Genabschnitten des *Mlh1*<sup>-/-</sup> Gewebes (unten) gegenübergestellt.

wt: Wildtyp; -: Deletion; ncMS: nicht-kodierende Mikrosateliten

4.2.6.2. Untersuchung kodierender Mikrosateliten

Um potentielle diagnostische MS-Marker zu identifizieren und den Einfluss der unterschiedlichen Therapien auf die Mutationsfrequenzen zu untersuchen, wurden zusätzlich cMS-Marker untersucht (s. 8.2; Abbildung 30). In den Tumoren der Kontrolliere zeigte sich für den Marker *Lig4* eine erhöhte Mutationshäufigkeit, die unter beiden Therapien nicht mehr nachweisbar war. Die Marker *Mdm2*, *Ncapd2* und *Tmem60* zeigten ausschließlich bei den mit Abemaciclib behandelten Tumoren vermehrte Mutationen. Eine Reihe weiterer Gene erwarben im Verlauf der Therapie Mutationen (*Spen*, *SDCCAG1*, *Rasal2* und *DNAJC2*). Die Marker *ERCC5* sowie *Kcnmal* wiesen je nach Versuchsgruppe unterschiedliche Mutationsfrequenzen auf.

4.2.7. Expressionslevel der Gene *Myc* und *Mxd4*

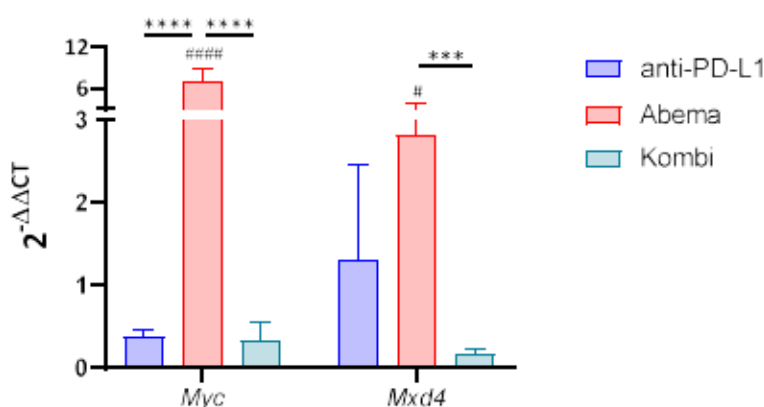


Abbildung 27 | Expressionslevel der Gene *Myc* und *Mxd4* im Tumorgewebe.

Tumor-RNA wurde aus Kryostatanschnitten isoliert und es wurde eine qPCR durchgeführt. Die relative Quantifizierung erfolgte nach der  $\Delta\Delta CT$ -Methode. Die Werte sind als  $2^{-\Delta\Delta CT}$  + Stabw angegeben. n = 3 Mäuse/Gruppe; \*\*\*\*p<0.0001; \*\*\*p<0.001; \*p<0.05; # p < 0.05 vs. Kontrolle; #####p<0.0001 vs. Kontrolle. Two-way ANOVA (Tukey post-hoc).

Zur Untersuchung der Expressionslevel ausgewählter Gene wurde Tumor-RNA isoliert, amplifiziert und quantifiziert. Abbildung 27 zeigt die Ergebnisse für die Gene *Myc* sowie *Mxd4*. In beiden Fällen zeigte sich in der Abemaciclibgruppe ein signifikant erhöhtes Expressionslevel. Unter der Kombinationstherapie war dieser Effekt nicht zu beobachten. Die anti-PD-L1-Therapie konnte nur für *Mxd4* einen leichten Expressionsanstieg induzieren.

---

## 5. DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, immunmodulatorische Eigenschaften unterschiedlicher CDKIs zunächst *in vitro* zu untersuchen, um nachfolgend eine präklinische Kombinationstherapie mit Immuncheckpoint-Inhibition *in vivo* durchzuführen. Hierfür wurden *Mlh1*<sup>-/-</sup> Zelllinien den unterschiedlichen CDKIs exponiert und deren Einfluss näher charakterisiert.

### 5.1. CDKI-Einfluss auf murine dMMR-Tumorzellen

---

Aufgrund der hohen Immunogenität von dMMR-assoziierten Tumoren zeigen ICIs bei diesem Patientenkollektiv eine deutlich höhere Wirksamkeit als bei MSS-Tumoren [77]. So zeigten *Le et al.*, dass Patienten mit einem dMMR/MSI-H-CRC eine Ansprechrate von 40 % auf den anti-PD-1-Inhibitor Pembrolizumab haben, während Patienten ohne dMMR gar nicht ansprechen. Dies konnte durch weitere Studien bestätigt werden, wobei die ICI-Therapie teilweise sogar einer Standard-Chemotherapie überlegen war [104–107]. Weitere ICIs, darunter auch der anti-PD-L1-Antikörper Atezolizumab, befinden sich in klinischen Studien, deren Ergebnisse noch ausstehend sind [108–110]. Dennoch besteht ein dringender Bedarf, die Effektivität einer ICI-basierten Therapie zu erhöhen, da das therapeutische Ansprechen aufgrund von intrinsischen und extrinsischen Resistenzmechanismen limitiert ist. In dem hier gewählten experimentellen Ansatz wurde versucht, dies durch eine Kombination mit den ebenfalls immunmodulatorisch wirkenden CDKIs zu erreichen. Die bisherige Zulassung von CDKIs ist auf spezifische Subtypen des Mammakarzinoms beschränkt. Auch zur Wirksamkeit von CDKIs an dMMR/MSI-Tumorzellen liefert die aktuelle Studienlage kaum Daten. Im Jahr 2021 wurde gezeigt, dass MSI-H-Zellen eines Magenkarzinom sensitiv gegenüber Abemaciclib sind [111]. Studien, in denen explizit verschiedene CDKIs untersucht wurden, konnten nach umfassender Recherche nicht gefunden werden. Daraus ergab sich die Notwendigkeit, vor Beginn der *in vivo* Applikation, *in vitro* Testungen an Tumorzelllinien vorzunehmen, die aus *Mlh1*<sup>-/-</sup> Gewebe etabliert wurden [50]. Anhand der Ergebnisse ließ sich eine Immunmodulation durch CDKIs, welche für diverse andere Entitäten bereits beschrieben wurde, auch für die hier untersuchten dMMR-assoziierten Tumore bestätigen [87, 112, 113].

### 5.1.1. Induzierbarkeit eines Zellzyklusarrest

In einem ersten Ansatz wurden Zellzyklusanalysen nach 48-stündiger Behandlung mit CDKIs durchgeführt. Diese bestätigten die effektive CDK-Blockade und den damit verbundenen Zellzyklusarrest, wenn auch in unterschiedlichen Zellzyklusphasen und in unterschiedlichem Ausmaß.

Die Ergebnisse der Behandlung mit den Multi- und Pan-Inhibitoren Dinaciclib und THZ1 spiegeln die nicht-selektive Inhibition durch diese Substanzen wider. Bei der Zelllinie *Mlh1*<sup>-/-</sup> A7450 T1 M1 wurde durch beide CDKIs ein S-Phasenarrest induziert. Ähnliches zeigte sich unter Dinaciclib auch für die Linie *Mlh1*<sup>-/-</sup> 328 und insbesondere für die *Mlh1*<sup>-/-</sup> 1351. Bei letzterer führte THZ1 hingegen zu einem Arrest in der G1-Phase. Das heterogene Ansprechen wird ebenfalls in der Literatur beschrieben [114]. Obwohl THZ1 zunächst als selektiver CDK7-Inhibitor beschrieben wurde, konnte festgestellt werden, dass es auch äquipotent CDK12/13 hemmt. Dies ist auf die strukturelle Ähnlichkeit der CDKs12/13 zu CDK7 zurückzuführen, welche analog positionierte Cysteinreste am C-Terminus und somit Bindungsstellen besitzen [115–117]. Die durch Dinaciclib induzierten unterschiedlich ausgeprägten Phasenarreste sind ebenfalls in dem nicht-selektiven Wirkmechanismus der Substanz begründet. Parry *et al.* konnten zeigen, dass Dinaciclib CDK2 am wirksamsten inhibiert, zusätzlich aber auch weitere CDKs hemmt [118]. Dies erklärt den in unserer Studie beobachteten S-Phasenarrest: CDK2/Cyclin A hat gemeinsam mit CDK1/Cyclin B eine essentielle Bedeutung sowohl für den Eintritt als auch für das Fortschreiten der S-Phase [119]. Auch wenn die von Parry *et al.* verwendete Dinaciclib-Konzentration zum Erreichen des S-Phasenarrests (0,125 µmol/l) mit der hier verwendeten Konzentration (0,1 µmol/l) vergleichbar ist, muss dennoch darauf hingewiesen werden, dass in der beschriebenen Studie Ovarialkarzinomzellen verwendet wurden. Mit steigender Konzentration wurde zunehmend ein G1- oder G2-Arrest als Hinweis auf eine effektivere CDK1/9-Inhibition beobachtet. Auch wenn sich damit der durch Dinaciclib induzierte Zellzyklusarrest erklären lässt, so sollte dieser dennoch, insbesondere in der überproportionalen Ausprägung bei der Linie *Mlh1*<sup>-/-</sup> 1351, kritisch betrachtet werden. So kann die durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse nicht exakt zwischen der späten G1- und der frühen S-Phase unterscheiden [120]. Diese Problematik könnte durch Zugabe des Nukleosidanalogons Bromodesoxyuridin, welches in die DNA einbaut wird, umgangen werden und somit eine präzisere Aussage zur S-Phase getroffen werden.

Bei der Zelllinie *Mlh1*<sup>-/-</sup> 1351 induzierte Palbociclib einen G1-Arrest, während Abemaciclib zu einem S-Phasenarrest führte. Dieser Sachverhalt lässt sich möglicherweise ebenfalls durch

die oben beschriebene Problematik der Differenzierung zwischen später G1- und früher S-Phase erklären. Bei der Zelllinie *Mlh1*<sup>-/-</sup> A7450 T1 M1 kam es zum charakteristischen G1-Arrest unter Abemaciclib, wohingegen Palbociclib kaum einen Effekt hatte. Dies ist auf die geringere Wirksamkeit von Palbociclib hinsichtlich der Hemmung von CDK4 zurückzuführen. Auch in der Literatur sind keine oder nur minimale G1-Arreste durch Palbociclib beschrieben [121–125]. Die Linie *Mlh1*<sup>-/-</sup> 328 zeigte ein deutlich geringeres Ansprechen auf die CDKI-Behandlungen. Nur Dinaciclib konnte einen Phasenarrest induzieren.

Neben der Interpretation der Ergebnisse auf zellulärer Ebene, sind auch technische und methodische Limitationen der Zellzyklusanalyse zu berücksichtigen. So wurde in der durchgeführten Analyse nur ein einziger Zeitpunkt betrachtet. Dies erlaubt keine Aussagen über die Kinetik, wie z.B. die Dauer der einzelnen Zyklen. Darüber hinaus kann durch die Durchflusszytometrie nicht immer zwischen der G2- und der M-Phase unterschieden werden, da Zellkerne beider Phasen über dieselbe DNA-Menge verfügen. Zur Abgrenzung von Zellen in der M-Phase könnte ein Antikörper gegen Phospho-Histon-H3 eingesetzt werden, da dieses ausschließlich während der Mitose phosphoryliert wird [126, 127]. Dies würde eine genauere Unterscheidung zwischen G2- und M-Phase ermöglichen.

### 5.1.2. Einfluss auf die Abundanz der Immuncheckpoint-Moleküle

Immuncheckpoint-Moleküle wirken immunsuppressiv und verhindern somit eine zielgerichtete Immunantwort gegen Tumorzellen. Ein alternativer Weg ist die pharmakologische Steigerung der Immuncheckpoint-Expression, um die Effektivität einer nachfolgenden oder simultanen Blockade zu erhöhen. Dies wurde in verschiedenen Arbeiten für einige der hier verwendeten CDKIs gezeigt [128]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Induktion von Immuncheckpoint-Molekülen durch CDKIs auch *in vitro* bestätigt werden. Während bei den epithelialen Linien nur marginale Unterschiede detektiert wurden, zeigte sich bei der Lymphomzelllinie eine deutliche Expressionssteigerung. Es ist noch nicht abschließend geklärt, ob die Hochregulation von Immuncheckpoint-Molekülen über direkte Mechanismen induziert wird, oder als Reaktion auf die Erzeugung eines proinflammatorischen TMEs auftritt. Im letzteren Fall bedarf es der Interaktion von Tumor- und Immunzellen. Das könnte erklären, warum die epithelialen Zellen in der Monokultur keine veränderten Expressionsprofile zeigten, sondern ausschließlich im Ko-Kulturansatz nach Zugabe von pan-Leukozyten. Lediglich für PD-L1 postulieren Zhang *et al.* einen direkten Zusammenhang zwischen der PD-L1-Expression und einer CDK4/6-Inhibition, der

durch einen CULLIN3/SPOP-Ubiquitin-E3-Ligase-abhängigen, proteasomal-vermittelten Abbau erklärt wird [92]. Zhang *et al.* konnten diesen Zusammenhang *in vivo* nachweisen, dieser Effekt konnte in der vorliegenden Arbeit durch eine CDK4/6-Inhibition nicht bestätigt werden. Bei der Linie *Mhl1*<sup>-/-</sup> 1351 hatten die CDKIs den stärksten Einfluss auf die Expression von CTLA-4- und PD-1. Es ist schon seit längerem bekannt, dass CTLA-4 auch von einigen Tumoren, darunter dem CRC, exprimiert wird. CTLA-4 liegt intrazellulär in Lysosomen vor und wird, nach erfolgter T-Zellaktivierung, an die Zelloberfläche transloziert [129–132]. Aktivierte T-Zellen induzieren CTLA-4 auf Tumorzellen. Dies erklärt die vermehrte Abundanz von CTLA-4 in der Ko-Kultur. Im Gegensatz dazu wurde PD-L1 weniger stark induziert. Dies ist vermutlich auf die hohe basale Expression zurückzuführen. Entsprechendes gilt für MHC-I. Für die CDK4/6-Inhibitoren sind übereinstimmende Befunde in der Literatur beschrieben [88, 89, 133]. Allerdings ist noch nicht bekannt, ob MHC-I direkt durch die CDK-Inhibition oder IFN-vermittelt induziert wird. Sowohl für Dinaciclib als auch für THZ1 liegen weniger Daten zur MHC-I-Induktion vor. Schönwälder *et al.* untersuchten den Einfluss von Dinaciclib an Kopf-Hals-Tumorzellen und konnten ebenfalls eine Hochregulation feststellen [114]. Gleiches konnte auch durch Zhang *et al.* gezeigt werden [134].

Insgesamt implizieren die Ergebnisse einen immunmodulatorischen Effekt der CDK-Inhibition, welche insbesondere in Anwesenheit von Immunzellen deutlich ausgeprägt ist. Auch andere Arbeiten bestätigen die Induktion von Immuncheckpoint-Molekülen entweder durch eine vermehrte Immunantwort oder durch intrinsische, (epi-) genetische Veränderungen der Tumorzellen. Eine Differenzierung der PD-L1-Positivität ist insofern essentiell, als dass die immunologisch bedingte Hochregulation die beste Voraussetzung für eine erfolgreiche Immuntherapie darstellt. Dies spiegelt sich auch in der immunologischen Klassifizierung von Tumoren wider. Um Patienten hinsichtlich ihrer Ansprechrate perspektivisch zu beurteilen, können ihre Tumore den Typen I-IV zugeordnet werden [135–137]. Während Typ I-Tumore (PD-L1<sup>+</sup> TIL<sup>+</sup>) in der Regel ein gutes Ansprechen zeigen, sind Typ III-Tumore (PD-L1<sup>+</sup> TIL<sup>-</sup>) trotz hoher PD-L1-Expression oftmals resistent gegenüber ICI-Therapien. Dies zeigt, dass eine immunologische Induktion der Immuncheckpoint-Expression zwingend erforderlich ist.

### 5.1.3. Induzierbarkeit von apoptotischem und nekrotischem Zelltod

Werden Zellen zytotoxischen Substanzen ausgesetzt und es kommt zum Zelltod, ist häufig Nekrose oder Apoptose die Folge. In dieser Arbeit konnten beide Formen als Folge der CDKI-Behandlung nachgewiesen werden. Dies ist insofern von Relevanz, als dass viele

dMMR-assoziierte Tumore intrinsisch resistent gegenüber 5-FU sind. Komponenten eines funktionierenden MMR-Systems binden an 5-FU und bauen es in die DNA ein, wodurch normalerweise der Zelltod, häufig in Form der Apoptose, induziert wird [138–140]. Liegt eine dMMR vor, so ist dies nicht mehr möglich. In der Konsequenz führen die Standardtherapeutika nicht zum apoptotischen Zelltod. In der vorliegenden Studie wurde, neben der Apoptose, auch Nekrose durch CDKIs induziert. Nekrose ist charakterisiert durch den Verlust der Integrität der Plasmamembran, wodurch intrazelluläre Bestandteile wie Proteine und Nukleinsäuren frei werden und eine Entzündungsreaktion auslösen. In den hier verwendeten Zelllinien wurde eine Nekrose primär durch Abemaciclib und Dinaciclib induziert. Dies bestätigt die im Vergleich zu THZ-1 höhere Zytotoxizität. Bei der Apoptose kommt es zur Reduktion des Zellvolumens, zur Fragmentierung des Zellkerns und zur Bildung von membranumhüllten Apoptosekörpern, wobei die Integrität der Plasmamembran erhalten bleibt und immunologische Reaktionen schwächer ausfallen [141, 142]. Die Apoptose verläuft multifaktoriell. Für Dinaciclib und THZ1 konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Apoptoseinduktion und der Hemmung der Phosphorylierung der RNA Polymerase II festgestellt werden. Dies hat wiederum zur Folge, dass die Expression antiapoptotischer Transkriptionsfaktoren und Proteine wie MYC und MCL-1 verringert wird [143–148]. Dieser apoptotische Effekt beschränkt sich allerdings nicht nur auf maligne Zellen und erklärt insbesondere für Dinaciclib einen Teil des Nebenwirkungsprofils, zu welchem primär die Neutropenie gehört. Neutrophile Granulozyten exprimieren ausschließlich die CDKs 5, 7 und 9 und sind damit direkte Zielstrukturen von Dinaciclib. Dies erhöht das Risiko einer febrilen Neutropenie [149–151].

Die Apoptoseinduktion durch Abemaciclib umfasst u.a. die Unterdrückung des mTOR-Signalweges, die Aktivierung des Hippo-Signalweges, sowie die Induktion des Tumorsuppressorproteins p53. P53 aktiviert Gene, welche für pro-apoptotische Proteine wie Bax, Fas oder IGF-BP3 kodieren. Neben der Apoptose sind für Abemaciclib weitere Arten des Zelltodes beschrieben. Diese umfassen die Seneszenz, die prä-apoptotische Bildung von Autophagosomen und die Methuosis [152, 154–160].

Im Gegensatz zur Apoptose, wird die Nekrose häufig im Zusammenhang mit der Induktion antitumoraler Immunantworten beschrieben, u.a. über die Sekretion von HMGB1. Dies führt zur Reifung von DCs und deren Migration in das TME sowie zur Aktivierung naiver T-Zellen [161].

### 5.1.4. Induzierbarkeit von immunogenem Zelltod

Eine weitere Form des Zelltodes, welche eine Immunreaktion auslöst, ist der immunogene Zelltod (ICD). Dieser konnte für alle Substanzen nachgewiesen werden. Der ICD stellt eine weitere Form der Apoptose dar, wobei CalR einer der wichtigsten Induktoren ist. CalR ist ein im Lumen des Endo- und Sarkoplasmatischen Retikulums (ER/SR) lokalisiertes Protein, das maßgeblich an der Elimination apoptotischer Zellen durch ICD beteiligt ist [162, 163]. Durch ICD kann eine effektive antitumorale Immunogenität initiiert werden, die schließlich zur Entwicklung einer protektiven Immunität beiträgt. Anthrazykline, Oxaliplatin, Cyclophosphamid und Bleomycin, aber auch die Strahlentherapie, sind in der Lage, durch Induktion von ER-Stress sowie durch Überproduktion von reaktiven Sauerstoffspezies, eine CalR-Translokation zu induzieren. Transloziertes CalR kann an den CD91-Rezeptor von DCs binden und deren Reifung initiieren [7–10]. Klinisch ist eine erhöhte CalR-Translokation beim CRC (Stadium IIIB) mit einer erhöhten T-Zell-Infiltration assoziiert [164–166]. Die Fähigkeit von CDKIs, ein proinflammatorisches TME zu fördern, wird auch durch CalR unterstützt. In den verwendeten dMMR-Zelllinien konnte durch alle CDKIs eine vermehrte CalR-Translokation induziert werden. Dabei war Dinaciclib in Übereinstimmung mit der Literatur der potenteste CalR-Induktor [91, 114]. Auch Abemaciclib induzierte ICD, im Gegensatz zu Palbociclib und THZ1, die den CalR-Anteil vergleichsweise nur geringfügig erhöhten.

Ferner wurde kürzlich auch die Funktion von sezerniertem CalR beschrieben, welche interessanterweise einen gegenteiligen Effekt hat und durch Suppression der Phagozytose sterbender Tumorzellen immunsuppressiv wirkt. Eine simultane Messung beider CalR-Formen könnte zukünftig eine erkenntnisreiche Erweiterung der Methoden darstellen.

Als weiterer Schlüsselmechanismus des ICDs wurde auch die Inhibition der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors p73 durch CDKIs identifiziert [167, 168]. Dieser Funktionsmechanismus könnte auch hier zur dazu beitragen, dass die Lymphomzelllinie eine ausgeprägtere CalR-Translokation aufwies.

### 5.1.5. Interpretation der zelllinienspezifischen Ergebnisse

Das zelllinienspezifische Ansprechen beruht zum einen darauf, dass zwei epitheliale und eine hämatologische Zelllinie in die Untersuchungen eingeschlossen wurden, zum anderen auf der vermutlich besseren Wirksamkeit von CDKIs gegenüber hämatologischen Neoplasien [153, 169]. Dies ist bedingt durch die hohe Expression von CDK6 bei hämatologischen Neoplasien,

darunter auch T-Zell-Lymphome. Zusätzlich zeigen die *Mlh1*<sup>-/-</sup> Tumore einen äußerst heterogenen Phänotyp sowie stark voneinander abweichende Mutationsprofile. Dies reflektiert die molekulare Heterogenität dMMR-assoziiierter Tumore. Binder *et al.* haben dMMR-assoziierte CRC-Proben in zwei Subtypen eingeteilt: G1 (= hohe Mutationslast sowie eine starke Immunreaktion) und G2 (= weniger immunogenes TME). Auch für die verwendeten epithelialen Zelllinien konnte in Vorstudien nachgewiesen werden, dass es sich bei *Mlh1*<sup>-/-</sup> A7450 T1 M1 um einen immunogenen Typ handelt, während *Mlh1*<sup>-/-</sup> 328 den wenig-immunogenen Subtyp darstellt [170–175].

Bereits der Ursprungstumor der Linie *Mlh1*<sup>-/-</sup> A7450 T1 M1 zeigte nach Entnahme 4-mal so viele TILs wie der 328 Tumor. Aus den etablierten Zelllinien wurden Lysate hergestellt und *in vivo* an *Mlh1*<sup>-/-</sup> Mäusen als Vakzine appliziert. In beiden Studien konnte die *Mlh1*<sup>-/-</sup> A7450-basierte Vakzine eine antitumorale Immunantwort induzieren und führte somit zu einem verlängerten Überleben, während die *Mlh1*<sup>-/-</sup> 328-basierte Vakzine keinen oder nur einen minimalen Einfluss auf Immunaktivierung und Überleben hatte. Dies erscheint zunächst kontraintuitiv wenn man bedenkt, dass die Linie *Mlh1*<sup>-/-</sup> 328 als ultrahypermutiert (167 Mutationen/Mb) und die Linie *Mlh1*<sup>-/-</sup> A7450 T1 M1 als hypermutiert (27 Mutationen/Mb) charakterisiert wurde [50]. Obwohl grundsätzlich angenommen wird, dass mit steigender Mutationslast auch die Menge an Neoantigenen und somit die Immunogenität von Tumoren zunimmt, so konnte eine Vorstudie unserer Arbeitsgruppe aufzeigen, dass die Neoantigenqualität, nicht die –quantität, prädiktiv für den Therapieerfolg ist [175]. Dieses Phänomen lässt sich auch in der Klinik beobachten [176]: In einem Fallbericht einer 19-jährigen CMMR-D-Patientin wurde eine adjuvante duale ICI-Therapie aufgrund eines anaplastischen Astrozytoms angewandt. Diese führte zu einem progressionsfreien Intervall von 20 Monaten, obwohl der Tumor der Patientin eine geringe Mutationslast aufwies (8 Mutationen/Mb).

Betrachtet man die durch Gladbach *et al.* dargelegten Mutationsprofile der drei Zelllinien, so lassen sich drei Mutationen ausmachen, die spezifisch für die Linie *Mlh1*<sup>-/-</sup> 328 sind und nur bei dieser festgestellt werden konnten [50]: *IDH1*, *MIER3*, sowie *KRAS*. Diese Mutationen erklären das aggressive Wachstumsmuster der Zelllinie und eventuell sogar eine Resistenz gegenüber CDKIs.

*IDH1*-Mutationen kommen häufig vor, sind jedoch primär mit niedrig-gradigen Gliomen assoziiert. Obwohl IDH-mutierte Gliome allgemein eine bessere Prognose haben, ist für IDH-mutierte Gliome, denen eine dMMR zugrunde liegt, das Gegenteil der Fall. Diese Patienten zeigen einen besonders aggressiven und ungünstigen Krankheitsverlauf. Auch wenn es sich

hierbei um Gliome und nicht um gastrointestinale Tumore handelt, ist diese Eigenschaft womöglich auf die Zelllinie *Mth1<sup>-/-</sup>* 328 übertragbar.

Die genaue Funktion von *MIER3* ist noch nicht vollständig erforscht. Es wird aber vermutet, dass es insbesondere beim CRC als Tumorsuppressor wirkt und Zellproliferation, -migration und -invasion inhibiert. Vice versa tragen Mutationen zur CRC-Entwicklung sowie zu einem Progress bei [177–179].

Ungefähr 20 % aller Malignome tragen eine *KRAS*-Mutation. Diese ist sowohl mit einer schlechteren Prognose als auch mit erworbener Therapieresistenz assoziiert. Vermutet wird auch, dass *KRAS*-Mutationen an der Entstehung von CDKI-Resistenzen beteiligt sind [180–183]. *KRAS*-mutierte Zellen zeigten eine erhöhte Expression von CDK6, Cyclin D1/CCND1 und D3 und Cyclin E, wodurch das RB-Protein phosphoryliert werden kann und kein G1-Arrest initiiert wird [183–185]. Haines *et al.* vermuten darüber hinaus, dass die *KRAS*-Mutations-assoziierte CDK6-Expression die Transkription des FGFR-Liganden bFGF induziert. Durch die Sekretion des Liganden kommt es zur autokrinen Aktivierung des Rezeptors, mit der eine weitere Aktivierung des MEK-ERK1/2-Signalweges einhergeht und es somit zu einer sich selbst verstärkenden Resistenz kommt [186].

Das heterogene Ansprechen der Zelllinien veranschaulicht die Notwendigkeit von personalisierter Medizin in der modernen Onkologie; nicht nur für Patienten mit dMMR-Tumoren, sondern allgemein bei der Anwendung zielgerichteter (Immun-) Therapien.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der *in vitro* Analysen das Potential der CDKIs, das Immunsystem zu stimulieren und damit eine antitumorale Antwort zu initiieren. Um diese Befunde zu verifizieren und das Anwendungsgebiet der CDKIs möglicherweise auf immunogene Tumore auszuweiten, wurde Abemaciclib auch *in vivo* eingesetzt. Dabei besitzt insbesondere Abemaciclib ein hohes translationales Potential. Voruntersuchungen haben überdies gezeigt, Abemaciclib neben CDK4/6 auch CDK9 inhibieren kann und eine CDK9-Inhibition *in vivo* für eine ICI-Therapie sensitiviert [134, 187]. Die darüber hinaus nachgewiesene Hochregulation von PD-L1 (s. 1.2.3.1.) macht Abemaciclib zu einem vielversprechenden Kombinationspartner für die anti-PD-L1-Therapie *in vivo*.

### 5.2. CDK4/6-Blockade als Alternative zur Immuncheckpoint-Inhibition

---

Im Rahmen der *in vivo* Therapieversuche sollte untersucht werden, ob eine Kombinationstherapie mit Abemaciclib und anti-PD-L1 einen Überlebensvorteil gegenüber der jeweiligen Monotherapie erzielt. Überraschenderweise zeigte sich eine Überlegenheit der Monotherapie mit Abemaciclib im Vergleich zu einer Immuncheckpoint-Inhibition, sowie eine Gleichwertigkeit im Vergleich zur Kombinationstherapie. Dies war vor allem auf eine Stimulation des Immunsystems durch die CDKI-Behandlung zurückzuführen.

#### 5.2.1. Reduziertes Tumorwachstum und verlängertes Gesamtüberleben

In einer vorangegangenen Studie der eigenen Arbeitsgruppe wurde der hier gewählte anti-PD-L1-Therapieansatz (insgesamt drei Applikationen à 2,5 mg/kg KG alle zwei Wochen) etabliert [101]. Das dadurch erreichte mediane Gesamtüberleben betrug 9,2 Wochen, welches sich hier mit einem medianen Überleben von 9,0 Wochen reproduzieren ließ und somit die Reliabilität der Ergebnisse bestätigt. In den PET/CT-Ergebnissen der Vorstudie zeigte sich innerhalb der anti-PD-L1-Gruppe keine signifikante Tumorreduktion im Vergleich zum Therapiebeginn, was hier ebenfalls der Fall war. Dies ist auf ein individuelles Therapieansprechen zurückzuführen, charakterisiert durch Krankheitsstabilisierung bzw. partielle Remission in einigen Fällen, sowie Progredienz in anderen Fällen (s. Abbildung 18). Dieses Phänomen wird häufig auch im klinischen Alltag in der initialen Phase einer ICI-Therapie beobachtet und als Pseudoprogress bezeichnet [188]. Dementsprechend lassen sich die hier generierten heterogenen PET/CT-Ergebnisse dieser Versuchsgruppe erklären. Im Gegensatz zur konventionellen Strahlen- oder Chemotherapie dient bei der ICI-Therapie nicht die Tumormasse selbst als primäres Therapieziel, sondern das Immunsystem, um antitumorale Immunantworten zu reaktivieren. Folglich resultieren oftmals atypische Ansprechmuster. Für bisherige Zytostatika wird das Therapieansprechen solider Raumforderungen auf bildmorphologischer Ebene anhand der response evaluation criteria in solid tumors (RECIST)-Kriterien der WHO evaluiert. Diese definieren das Therapieansprechen, im Sinne einer Voll- oder Partialremission, als Tumorreduktion innerhalb von vier Wochen nach Therapiebeginn, wobei eine frühe Zunahme des Tumolvolumens um 20 % als Progress klassifiziert wird. Im Gegensatz dazu wurde unter Immuntherapie vermehrt eine stagnierende Tumorgroße, wenn nicht sogar ein initialer Progress, beobachtet, bevor laut der RECIST-Kriterien ein Therapieansprechen vorlag [189–191]. Es wird angenommen, dass die konventionellen Kriterien aus diesen Gründen nicht auf die ICI-Therapie übertragbar sind. Im Rahmen einer

Immuncheckpoint-Inhibition entspricht ein Progress zu Beginn der Behandlung, anders als unter Chemotherapie, nicht immer einem Therapieversagen, weshalb modifizierte immunabhängige Kriterien (immune-related response criteria) etabliert wurden. Im Wesentlichen werden zwei Hypothesen für den initialen Pseudoprogress diskutiert. Man nimmt an, dass es sich entweder um ein tatsächliches Wachstum des Tumors handelt, bis eine adäquate Immunantwort erreicht wird, oder aber es handelt sich um eine transiente Immuzellinfiltration mit oder ohne Ödem, was zu einer radiologischen Vergrößerung der Läsion führt. Studien vermuten sogar eine positive Korrelation zwischen Pseudoprogress unter ICI-Gabe und einem verbesserten Gesamtüberleben [192–196].

Der Überlebensvorteil durch die Abemaciclibtherapie spiegelt sich auch in der bildmorphologischen Tumorreduktion wider. Dies wurde bereits in klinischen Studien an Mammakarzinompatienten beobachtet. In der MONARCH 3-Phase III Studie wurden Mammakarzinompatienten in zwei Armen therapiert [197]: eine Gruppe erhielt Tamoxifen in Kombination mit Abemaciclib, die zweite erhielt Tamoxifen mit einem Placebo. Hierbei zeigte die Abemaciclibgruppe ein signifikant verlängertes progressionsfreies Überleben. Das Therapieansprechen, gemessen an der Tumorreduktion, betrug bei der Abemaciclibgruppe 61 % vs. 45,5 % bei der Placebogruppe, wobei Abemaciclib nach 24 Zyklen eine Tumorreduktion um 75 % induzierte. Auch in Kombination mit Fulvestrant zeigt sich unter Abemaciclibtherapie in der Bildgebung sowohl eine Tumor- als auch Lymphknotenreduktion [198]. Diese Resultate klinischer Studien sind vereinbar mit unseren PET/CT-Ergebnissen, die eine Tumorreduktion um 51 % durch Abemaciclib zeigten, allerdings nur im monotherapeutischen Ansatz. In einer weiteren Phase-II-Studie, MONARCH 1, wurde Abemaciclib als Monotherapeutikum beim metastasierten Mammakarzinom eingesetzt. Das Therapieansprechen lag bei 20 %, was dem Therapieansprechen der Standardchemotherapie dieser Patientenkohorte entspricht. Dies führte zur Zulassung von Abemaciclib als Monotherapeutikum beim Mammakarzinom durch die FDA [199–201].

In einer interessanten Studie aus 2018 haben Schaefer *et al.* ebenfalls Abemaciclibmono- und Kombinationstherapien mit anti-PD-L1-Antikörpern *in vivo* untersucht [88]. Hierbei wurden MMR-profiziente CT26-CRC-Zellen in Mäuse implantiert. Fünf Tage nach Transplantation wurden die Therapeutika in unterschiedlichen Applikationsschemata verabreicht. Auch wenn ein anderes Mausmodell verwendet wurde, ist zumindest ein eingeschränkter Vergleich zu unseren Ergebnissen möglich. Erwähnenswert ist hier vor allem die Tatsache, dass die

Kombinationstherapie auch bei Schaer *et al.* eine Lebensverlängerung um das 3,5-fache im Vergleich zu unbehandelten Kontrollmäusen erzielt hat. Große Unterschiede zeigen sich allerdings bei Betrachtung der Monotherapien. Während die anti-PD-L1-Therapie bei Schaer *et al.* keine signifikante Verlängerung und die Abemaciclibtherapie nur eine 1,8-fache Verlängerung des Gesamtüberlebens induzierte, erzielte die jeweilige Monotherapie in unserer Studie einen deutlichen Überlebensvorteil. Die anti-PD-L1-Therapie erbrachte eine 2,3-fache, die überlegene Abemaciclibtherapie eine 3-fache Verlängerung des Gesamtüberlebens. Diese Diskrepanz lässt sich am ehesten durch grundlegende Unterschiede beider Studien erklären. So haben Schaer *et al.* zwar ebenfalls insgesamt drei Dosen des anti-PD-L1-Antikörpers verabreicht, diese allerdings in kürzeren Abständen (eine vs. zwei Wochen bei uns). Außerdem erfolgte die Applikation nicht gewichtsadaptiert, es wurde also immer eine Standarddosis von 500 µg/Maus verabreicht. Tatsächlich wird die Gabe des anti-PD-L1-Antikörpers Atezolizumab in der Klinik ähnlich gehandhabt. Hier werden regulär zwei Dosen (1200 µg) im Abstand von 22 Tagen infundiert. Andere ICIs, wie Pembrolizumab, Nivolumab oder Ipilimumab hingegen werden ebenfalls gewichtsadaptiert appliziert [202]. Bei der Behandlung mit Abemaciclib wählten Schaer *et al.* ebenfalls eine feste Dosierung von 75 mg/Maus. Diese wurde allerdings, wie auch im klinischen Alltag, täglich verabreicht, nicht wöchentlich wie in unserem Ansatz.

Diese Unterschiede in der Dosierung und Applikation liefern eine mögliche Erklärung, warum die beiden Monotherapien bei uns erfolgreicher waren. Ebenso ist die Tumorummunogenität der CT26-Zellen vermutlich geringer [203–205]. Dies unterstreicht die Notwendigkeit „immunologisch heißer“ Tumore im Vorfeld einer ICI-Therapie. Die Daten unserer Studie implizieren, dass selbiges auch für CDKI-Behandlungen gilt und unterstreichen somit das immunstimulatorische Potenzial einer CDK-Blockade. Um diesen Sachverhalt genauer zu beleuchten, folgt die Betrachtung der Ergebnisse immunologischer Veränderungen während der jeweiligen Behandlungen (s. 5.2.2.).

### 5.2.1.1. Limitierte Wirksamkeit bei der Lymphombehandlung

Im Gegensatz zur Immuntherapie der gastrointestinalen Tumore, konnte bei der Behandlung der Lymphome kein eindeutiger Therapieerfolg erzielt werden. Das mediane Gesamtüberleben der Abemaciclibgruppe betrug 1,55 Wochen, das der anti-PD-L1-Gruppe 0,87 Wochen (vs. 0,64 Wochen der Kontrollgruppe).

Ein grundlegendes Fehlen der Wirksamkeit einer CDK4/6- bzw. einer anti-PD-L1-Blockade ist als Ursache unwahrscheinlich. Die starke Diskrepanz zwischen *in vitro* und *in vivo* ist eher

in der äußerst raschen Lymphomagenese begründet. Lymphome der *Mhl1<sup>-/-</sup>* Tiere, welche sich meist als Thymome oder generalisierte Lymphome in der Milz und Leber manifestieren, entstehen in einem besonders jungen Alter, weswegen sie auch als Korrelat des kindlichen early-onset T-Zelllymphoms gelten. Im Kontext dieser präklinischen Studie zeigten die Lymphome neben ihrer frühen Entstehung auch ein besonders aggressives Wachstum [95, 206–209]. Dieser Umstand erschwerte eine frühe Diagnosestellung sowie einen rechtzeitigen Einschluss in die Versuchsgruppen. Dieser erfolgte somit, trotz engmaschiger Beobachtung der Tiere, teils zu spät, so dass das Krankheitsstadium zu weit fortgeschritten war, als dass die Behandlungen noch eine ausreichende therapeutische Wirksamkeit hätten erzielen können.

### 5.2.2. Verstärkte Immunmodulation durch die Kombinationsbehandlung

Wesentlicher Bestandteil der immunologischen Untersuchungen war die durchflusszytometrische Analyse von Blut-, Tumor- sowie Milzproben. Insgesamt hatten alle Therapieansätze einen Einfluss auf das Immunsystem. In einigen Fällen konnte die eingangs postulierte Hypothese einer gesteigerten Immunantwort durch die Kombinationstherapie bestätigt werden. Andere Analysen wiederum liefern mögliche Begründungen für die Überlegenheit der alleinigen CDK4/6-Blockade.

Die Immunphänotypisierung der Tumore zeigte eine auffallend hohe Anzahl an infiltrierenden MDSCs infolge der anti-PD-L1-Behandlung. MDSCs wirken global immunsuppressiv und hemmen die T-Zell-Antwort. Die suppressive Wirkung wird über die Sekretion von Molekülen wie Arginase ARG1, TGF $\beta$ , IL 10 oder auch Indolamin-2,3-Dioxygenase vermittelt. Eine vermehrte Infiltration durch MDSCs unter ICI-Behandlung wird als kausale Erklärung für eine sekundäre Therapieresistenz angesehen [210, 211]. Die hier generierten Ergebnisse lassen eine beginnende Resistenz vermuten, welcher durch die Kombination mit Abemaciclib entgegengewirkt werden konnte. Für CDKIs, vor allem für CDK4/6-Inhibitoren, wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Reduktion von MDSCs im TME nachgewiesen. Die Rekrutierung immunsuppressiver Tregs wird als weitere Hauptursache für erworbenes ICI-Therapieversagen diskutiert. Unter ICI-Therapie verschiebt sich das Verhältnis zwischen CTLs und Tregs zugunsten der CTLs, einerseits durch Reaktivierung erschöpfter T-Zellen, andererseits durch eine Herunterregulation des Transkriptionsfaktors FOXP3 in den Tregs selbst [149, 212–214]. Im Verlauf kann sich dieses Verhältnis jedoch erneut Richtung Tregs verschieben und es kommt zu einer Therapieresistenz. Dies kann durch einen Kombinationspartner, der ebenfalls Tregs hemmt,

umgangen oder zumindest zeitlich verzögert werden. Diese Eigenschaft wird den CDKIs zugeschrieben, da Tregs im Vergleich zu anderen T-Zell-Subpopulationen eine besonders hohe CDK6-Expression aufweisen und damit empfindlicher auf eine Zellzyklusblockade reagieren. Darüber hinaus wird CDK4/6-Inhibitoren eine Hemmung der DNA-Methyltransferase 1 zugeschrieben, was ebenfalls zu einer verminderten Proliferation von Tregs führt. Unsere Ergebnisse konnten zeigen, dass die Anzahl der Tregs im peripheren Blut, in der Milz und im Tumor am stärksten durch die Kombinationstherapie reduziert wurde [87, 215, 216].

Die Anzahl der PD1<sup>+</sup> T-Zellen als Marker für erschöpfte T-Zellen blieb unter beiden Monotherapien gleich bzw. stieg unter ICI leicht an. Dies erscheint kontraintuitiv da erschöpfte T-Zellen reaktiviert werden sollen. Eine mögliche Ursache ist eine beginnende Resistenzentwicklung. Unter der Kombinationstherapie nahm die Anzahl der erschöpften T-Zellen deutlich ab – ein weiteres Indiz der synergistischen Immunmodulation. Außerdem zeigten Tumore der Kombinationsgruppe eine erhöhte Anzahl an T-Helferzellen. Ergänzend hierzu wurden in parallelen Analysen Zytokinlevel im Blutplasma der jeweiligen Behandlungsgruppen bestimmt. Bei Tieren der Kombinationsgruppe zeigte sich eine erhöhte IL-4-Sekretion als Indiz für die Differenzierung naiver T-Helferzellen [100, 217, 218].

### 5.2.3. Überlegenheit der Abemaciclibbehandlung

Trotz der beschriebenen immunmodulatorischen Effekte konnte in der Kombinationsbehandlung kein Überlebensvorteil gegenüber der alleinigen Abemaciclibbehandlung nachgewiesen werden. Im Folgenden sollen mögliche Erklärungsansätze diskutiert werden.

#### 5.2.3.1. Abemaciclib-induzierte Veränderung des Tumormikromilieus

Die Abemaciclibmonotherapie führte, im Gegensatz zur Kombinationsbehandlung, zu einer Infiltration durch CTLs. Eine mögliche Ursache hierfür findet sich bei Betrachtung der Tumordinfiltration durch Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs):

Makrophagen besitzen die Fähigkeit, sich in zwei unterschiedliche Subpopulationen zu differenzieren: die klassisch aktivierten M1-Makrophagen und die alternativ aktivierten M2-Makrophagen. M1-polarisierte Makrophagen stellen den proinflammatorischen, M2-polarisierte eher den antiinflammatorischen Phänotyp dar [219]. Entsprechendes gilt für TAMs. M1-polarisierte TAMs besitzen immunstimulierende Eigenschaften, so dass sie über

eine Aktivierung von CTLs einen supprimierenden Effekt auf das Tumorwachstum haben. M2-TAMs stellen den Gegenspieler dar. Sie inhibieren die Funktion der M1-Makrophagen, fördern die Gewebsheilung und Angiogenese und unterstützen somit das Tumorwachstum. Untersucht wurde die Infiltration durch TAMs, welche CD206, einen Marker für M2-polarisierte Makrophagen, exprimieren [220–222]. Es zeigte sich, dass die Monotherapien jeweils zur Reduktion CD206-exprimierender TAMs beitragen. Dieser Effekt war in der Kombinationstherapie weniger stark ausgeprägt. Damit einhergehend wurden weniger CTLs detektiert. Zusätzlich wurden ausschließlich nach Abemaciclibbehandlung verstärkt IRF5<sup>+</sup> Zellen nachgewiesen (s. Abbildung 24). IRF5 ist ein Transkriptionsfaktor, dessen Expression durch IFN-I-Signale sowie durch DNA-Schäden hochreguliert wird. Seine primäre Funktion besteht in der Regulierung von Zellwachstum und Immunantworten auf virale Infektionen, indem es über die Induktion von Zyto- und Chemokinen T-Lymphozyten rekrutiert. Darüber hinaus wurden für IRF5 antiproliferative Eigenschaften beschrieben. Eine verringerte IRF5-Expression ist beispielsweise assoziiert mit Leukämien oder dem Mammakarzinom [223–228]. Vice versa ist eine erhöhte IRF5-Expression mit Autoimmunerkrankungen wie Systemischer Lupus erythematodes oder Rheumatoider Arthritis vergesellschaftet. Der beschriebene Zusammenhang wird durch die Induktion eines proinflammatorischen Milieus durch IRF5 erklärt. Hierzu zählt unter anderem die vermehrte IRF5-assoziierte M1-Polarisation [229–231]. In parallelen Analysen der Arbeitsgruppe wurde eine erhöhte Expression des *Csf2*-Gens als Ursache der Abemaciclib-induzierten M1-Polarisation nachgewiesen [100]. Warum genau sich dies in der Kombinationstherapie nicht reproduzieren ließ, bleibt allerdings noch abzuklären.

### 5.2.3.2. Abemaciclib-induzierte Aktivierung des Wnt- $\beta$ -Signalweges

In weiterführenden Expressionsanalysen [100] wurde eine durch Abemaciclib induzierte Aktivierung des Wnt- $\beta$ -Signaltransduktionsweges in residuellen Tumoren und damit einhergehend eine erhöhte Genexpression des Protoonkogens *Myc* festgestellt (s. Abbildung 27). Dies resultiert aus der Hemmung der Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK-3) [121, 232]. Die GSK-3 bildet zusammen mit Axin und APC einen Komplex, welcher den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg kontrolliert und so eine Zellproliferation unterbindet. Der GSK-3/APC-Komplex bewirkt eine negative Regulation von  $\beta$ -Catenin, indem es dieses phosphoryliert und ubiquitiniert, wodurch es letztendlich proteasomal abgebaut wird [233]. Geschieht dies aufgrund einer GSK-3-Inhibition nicht, so kommt es zu einer Akkumulation von  $\beta$ -Catenin. Freies  $\beta$ -Catenin induziert schließlich den Transkriptionsfaktor MYC.

Die heterogene Wirkweise des Wnt- $\beta$ -Signalweges sowie die vielfältigen Funktionen von MYC erschweren die Interpretierbarkeit dieser Ergebnisse. Mutationen im Wnt- $\beta$ -Signalweg sind direkt mit der CRC-Karzinogenese assoziiert und treten in > 90 % aller Fälle auf. Dies gilt auch für den molekularen Subtyp MSI [234–237]. Allerdings impliziert die derzeitige Studienlage auch eine gewisse Dichotomie von MYC in Bezug auf maligne Entartungen. Dies erscheint durchaus nachvollziehbar wenn man bedenkt, dass MYC in der Regulation von rund 15 % aller humanen Gene beteiligt ist [238]. Es gibt einige Hinweise darauf, dass MYC in Abhängigkeit des zellulären Kontextes sowohl pro- als auch antitumorale Auswirkungen haben kann.

Die proliferative Wirkung des Wnt- $\beta$ -Signalwegs wird beispielsweise über freies  $\beta$ -Catenin realisiert, das an den Transkriptionsfaktor Tcf-1 bindet und eine Zellzyklusprogression initiiert. Darüber hinaus führt die Aktivierung des Signalweges zu einer MYC-vermittelten Induktion von Cyclin D1 und/oder D2 und damit zum Übertritt der G1- in die S-Phase. Ferner inhibiert MYC die Expression des Proteins GADD45, welches unter anderem zur DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle und Seneszenz beiträgt. Wird diese Funktion durch MYC beeinträchtigt, so verlassen Zellen die G0/G1-Phase und es kommt zu einem Eintritt in den Zellzyklus. Des Weiteren vermittelt der Wnt- $\beta$ -Signalweg eine Akkumulation von phosphoryliertem Snail, einem Transkriptionsfaktor, welcher wiederum die Transition von epithelialen zu mesenchymalen Zellen fördert und die Tumorinvasivität augmentiert [239–243].

Neben proliferativen Effekten wurde auch eine MYC-abhängige, immunstimulatorische Wirkung nachgewiesen. Es lässt sich spekulieren, dass dies im Kontext immunogener Tumore durchaus antitumorale Auswirkungen haben kann. In der Literatur finden sich Hinweise dafür, dass eine GSK-3-Inhibition *in vitro* zu einer verstärkten T-Zell-Proliferation sowie einer vermehrten IL-2-Produktion führt [244]. Letztere wurde in parallelen Untersuchungen *in vivo* ebenfalls unter Abemaciclibtherapie nachgewiesen [100]. Erklärt wird dieser Effekt der GSK-3-Inhibition durch eine gesteigerte Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors NF-AT, wodurch wiederum die Signaltransduktion des T-Zell-Rezeptors gesteigert wird [245]. Warum dieser Effekt in der Kombinationstherapie nicht erhalten blieb, bleibt unklar.

Auch eine MYC-vermittelte Apoptoseinduktion wird in der Literatur beschrieben. Diese wird über eine gesteigerte *ARF*-Genexpression vermittelt, was eine Inaktivierung von *mouse double minute 2 homolog (Mdm2)* zufolge hat. Dies wiederum stabilisiert und aktiviert p53 [246–249]. Als Voraussetzung einer solchen MYC-vermittelten Apoptoseinduktion wird das Vorhandensein eines p53-Wildtyps beschrieben, welcher in den hier untersuchten *Mlh1*<sup>-/-</sup>

Proben vorlag [174, 250–254]. Dies erklärt warum die Abemaciclib-induzierte Überexpression bei den *Mhl1*<sup>-/-</sup> Mäusen nicht zu einem Tumorprogress führte. Ergänzend zur vermuteten Apoptoseinduktion durch MYC postulieren Murphy *et al.* eine Konzentrationsabhängigkeit. Demnach wirkt eine Überexpression von MYC proapoptotisch [255].

Eine GSK-3-Inhibition ist spezifisch für Abemaciclib und wird bei den anderen CDK4/6-Inhibitoren Palbo- und Ribociclib nicht beobachtet [232]. Aus diesem Grund wird vermutet, dass es sich um eine CDK9-vermittelte Inhibition handelt, da Abemaciclib, im Gegensatz zu den anderen CDK4/6-Inhibitoren, ebenfalls die CDK9 hemmt.

Ähnlich wie bei Heckler *et al.*, konnten wir im Tumorgewebe nach Abemaciclibbehandlung ein erhöhtes Expressionslevel von *Mxd4* nachweisen. *MAX Dimerization Protein 4 (MXD4)* kodiert für das gleichnamige Protein, welches ebenso wie MYC als Transkriptionsfaktor fungiert. MXD4 ist ein MYC-Antagonist. Somit erscheint es kontraintuitiv, dass mit Abemaciclib behandelte Tumore eine simultane Hochregulation von sowohl *Myc* als auch *Mxd4* aufweisen. Für gewöhnlich stehen die beiden Transkriptionsfaktoren im Gleichgewicht und zeigen ein gegenläufiges Expressionsmuster. Der zugrunde liegende Mechanismus bleibt vorerst unklar. Unabhängig davon könnte eine erhöhte *Mxd4*-Expression allerdings zum Therapieerfolg der Abemaciclibtherapie beigetragen haben. So wurde für *MXD4* nachgewiesen, dass es bspw. die Leukämogenese unterdrückt und damit antitumoral wirkt, indem es dem proliferativen Effekt von MYC entgegenwirkt [256–258].

### 5.2.3.3. Potenzielle Toxizität der Kombinationstherapie

Ein weiterer Erklärungsansatz für die fehlende Überlegenheit der Kombinationstherapie gegenüber der Monotherapie liegt in der möglichen Toxizität.

2021 veröffentlichten Patnaik *et al.* Ergebnisse einer Phase Ia/Ib-PACT-Studie, in der ein neuer PD-L1-Inhibitor (LY3321367) sowohl als Monotherapeutikum, als auch in Kombination mit Abemaciclib an Patienten mit soliden Tumoren eingesetzt wurde [259]. Ihre Untersuchungen zeigten eine starke Ähnlichkeit hinsichtlich der Clearance und des Distributionsvolumens zwischen LY3321367 und Atezolizumab, was einen Vergleich der Studie zu unserer zulässt.

Die Kombinationstherapie beinhaltete sowohl eine simultane Applikation, als auch eine vorangegangene Abemaciclibgabe. Bei einer initialen Abemaciclibgabe folgte die Gabe des ICIs, wie auch in unserer Studie, zwei Wochen später und auch im Verlauf alle zwei Wochen. Anders als bei uns erfolgte die Abemaciclibgabe, wie auch in der Klinik, alle 12 Stunden.

Interessanterweise musste dieser sequentielle Ansatz aufgrund einer ausgeprägten Hepatotoxizität, welche bei der simultanen Applikation nicht beobachtet wurde, abgebrochen werden. Von den vier Patienten entwickelten drei eine Autoimmunhepatitis. Das hepatotoxische Potenzial von Abemaciclib wurde bereits in den klinischen Studien monarchE, MONARCH 2 sowie MONARCH 3 nachgewiesen [199, 260, 261]: Hier kam es bei 2-6 % der Patienten zu einem klinisch relevanten Transaminasenanstieg, welcher sich in der Regel durch eine Dosisreduktion als regredient erwies. Bei diesen induzierten Leberzellschäden handelte es sich jedoch nicht um Autoimmunhepatitiden. Unter den CDK4/6-Inhibitoren wurden durch die FDA bisher keine Fälle einer Autoimmunhepatitis durch Abemaciclib gemeldet. Für Palbociclib ist bisher ein Fall, für Ribociclib sind lediglich vier Fälle beschrieben [262]. Die im Rahmen unserer Studie gewonnenen Gewebeproben zeigten in den Lebern der monotherapeutisch behandelten Tiere eine Infiltration durch granulozytäre Immunzellen (s. Abbildung 25). In den Lebern der Kombinationstherapie hingegen zeigten sich Nekrosen als Hinweis eines ausgeprägten Leberzellschadens. Da sowohl für Abemaciclib als auch für ICIs Transaminasenanstiege als häufige Nebenwirkungen beschrieben werden, ist von einer kumulativen Hepatotoxizität infolge der Kombination auszugehen. Unter Zusammenschau unserer histopathologischen Untersuchung sowie der Ergebnisse der klinischen Studie von Patnaik *et al.* kann vermutet werden, dass eine sequentielle Applikation mit Abemaciclib als Initialtherapeutikum zu einer starken Immunzellaktivierung sowie T-Zell-Infiltration (auch ins Lebergewebe) führt. Eine konsekutive ICI-Gabe könnte diesen Effekt noch potenziert haben und so zum beschriebenen Leberzellschaden geführt haben. Bei Patnaik *et al.* beschränkten sich die Nebenwirkungen im simultanen Studienarm auf tolerable, klinisch weniger relevante Nebenwirkungen, wie Diarrhoe und Übelkeit, welche im Rahmen einer Immuntherapie zu erwarten sind. Des Weiteren konnte interessanterweise gezeigt werden, dass die effektivste Tumorreduktion durch eher niedrigere ICI-Konzentrationen erreicht werden konnte. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass eine zu stark ausgeprägte Immunantwort den Erfolg einer Kombinationstherapie deutlich mindern kann. Dies könnte in unserem Studienansatz durchaus ebenfalls aufgetreten sein, insbesondere wenn man die a priori vorhandene Immunogenität der MSI-Tumore bedenkt. In der Studie von Patnaik *et al.* hingegen war das Patientenkollektiv nicht auf eine Tumorentität beschränkt. Es wurden Patienten mit unterschiedlichen soliden MSS-Tumoren eingeschlossen, was beim hier gezogenen Vergleich berücksichtigt werden muss.

Die Rationale hinter einer sequentiellen Applikation mit einer initialen Abemaciclibgabe besteht in der Voraktivierung des Immunsystems. Aufgrund der ausgeprägten Immunreaktion

lässt sich nun spekulieren, dass immunogene MSI-Tumore aufgrund der hohen Abundanz an Neoantigenen bereits präformierte Immunantworten auslösen, weshalb eine Stimulation nicht notwendig ist. Folglich sollte man eher auf andere Applikationsschemata bzw. -reihenfolgen setzen.

Abgesehen von den immunabhängigen Nebenwirkungen zeigen Patnaik *et al.* vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich des Krankheitsverlaufs: Patienten, die aufgrund fehlender Nebenwirkungen die Therapie fortsetzen konnten, profitierten immens und es konnte eine 12-monatige Progressionsfreiheit erreicht werden. Auch im anderen Studienarm, der die simultane Applikation verfolgte, konnte bei 55 % der Patienten ein progressionsfreies Intervall erzielt werden.

Weitere klinische Studien zur CDKI-/ICI-Kombinationstherapie bestätigen die Ergebnisse unserer präklinischen Studie. Im Rahmen klinischer Studien zum Mammakarzinom als auch zum NSCLC wurde eine Kombination aus Abemaciclib sowie Pembrolizumab getestet [263, 264]: Wenngleich antitumorale Aktivität nachgewiesen werden konnte, so war der hepatotoxische Einfluss (in Form von Transaminasenanstiegen) enorm und einer der Hauptgründe für Diskontinuität. Weitere veröffentlichte und auch noch laufende Studien untersuchen Kombinationen wie Palbociclib/Pembrolizumab oder Palbociclib/Nivolumab. Auch hier wurde von Transaminasenanstiegen als einer der führenden Nebenwirkungen berichtet [265, 266].

Diese, sowie unsere Ergebnisse, zeigen, dass die grundlegende Idee hinter einer Kombination aus Zellzyklus- und Checkpointinhibition wirkungsvoll sein kann, aber weiterer, genauerer Anpassungen, insbesondere hinsichtlich Applikationsschemata sowie Dosierungen bedarf. Unsere Ergebnisse sowie bisher veröffentlichte Daten klinischer Studien lassen vermuten, dass der Grad zwischen einem Benefit für Patienten und immunvermittelter Nebenwirkung sehr schmal ist.

### 5.2.4. Potenzielle Resistenzentwicklung gegenüber CDKIs

Trotz vielversprechender Therapieerfolge durch eine CDK4/6-Blockade müssen potenzielle Resistenzentwicklungen berücksichtigt werden. Bei 20 % aller Mammakarzinompatienten liegt eine primäre Therapieresistenz vor. Weitere 30 % entwickeln im Verlauf Resistenzen. Ein wesentlicher Resistenzmechanismus basiert auf einer vermehrten *MYC*-Expression. Weitere Mechanismen der CDKI-induzierten Resistenzentwicklung wurden bereits identifiziert. Hierzu zählen unter anderem der Verlust des Rb-Proteins sowie loss of function-Mutationen im *FAT1*-Gen. FAT1 fungiert durch Beeinflussung des Hippo-Signalweges unter

anderem als Regulator der CDK6-Expression. Bei reduzierten FAT1-Konzentrationen kommt es zur Unterdrückung des Hippo-Signalweges, wodurch wiederum die Transkriptionsfaktoren YAP und TAZ rekrutiert werden. Diese binden an die CDK6-Promotorregion und induzieren eine Hochregulation von CDK6, dies führt zur Therapieresistenz [267–269]. Weitere Resistenzmechanismen, die bisher identifiziert wurden, beinhalten die Amplifikation von *CCNE1*, welches für Cyclin E1 codiert; eine Aktivierung des PI3K-PDK1-Signalweges oder beispielsweise auch eine Aktivierung von CDK2, gefolgt von einer erhöhten Cyclin D1-Expression. Nicht nur CDK2, sondern auch alle anderen CDKs können kompensatorisch als Antwort auf eine CDK4/6-Blockade hochreguliert werden, um einen Zellzyklusprogress zu gewährleisten [270, 271].

Zur Überwindung entstehender sekundärer Resistenzen gilt die weitere Identifizierung geeigneter Kombinationspartner. Pandey *et al.* konnten so beispielsweise durch eine zusätzliche CDK2-Inhibition *in vivo* eine Palbociclib-induzierte Resistenz umgehen [272]. Auch Riess *et al.* konnten *in vitro* zeigen, dass durch eine simultane Applikation von Abema- und Dinaciclib einer Resistenzentwicklung vorgebeugt werden konnte [152]. Neben einer Kombination aus verschiedenen CDKIs werden BET-, PI3K/mTOR-, MET- oder auch TRK-Inhibitoren als potenzielle Kombinationspartner diskutiert [273–276]. Perspektivisch interessant wäre auch eine Kombination mit dem in unserer Studie ebenfalls untersuchten CDKI Dinaciclib, der sich *in vitro* bezüglich seiner zytotoxischen sowie immunvermittelten Wirkung als gleichwertig zu Abemaciclib erwies. Studien an HNSCC-Zelllinien haben gezeigt, dass die PD-L1-Expression unter anderem auch von der Zellzyklusphase abhängig ist und während der S-Phase signifikant höher ist als in der G1-Phase. Folglich wäre es denkbar, dass die Kombination eines anti-PD-L1-Antikörpers mit einem CDKI, welche anteilig auch einen S-Phasen-Arrest induziert, die Effektivität einer Immuntherapie steigern könnte. Hierfür ist Dinaciclib ein denkbarer Partner [277–279].

### 5.2.5. Stellenwert der personalisierten Medizin

Neben der sekundären Resistenzentwicklung spielt auch die primäre Therapieresistenz eine wichtige Rolle. Zur Identifikation des Patientenkollektivs, welches bestmöglich von einer CDK4/6-Blockade profitieren wird, müssen im Sinne der personalisierten Medizin geeignete prädiktive Biomarker identifiziert werden.

Insgesamt unterstreichen unsere Ergebnisse den Stellenwert einer individuellen, Patientenspezifischen Therapie, insbesondere in der Immuntherapie. Dies gilt nicht nur hinsichtlich der auszuwählenden Substanzen, sondern auch bezüglich Kombinationspartner,

Applikationsschemata sowie Dosierungen. Hierfür braucht es eine prätherapeutische, immunhistochemische Analyse des Tumors, welche zurzeit nicht standardmäßig durchgeführt führt. Daraus ableitbar wären spezifische, an die jeweiligen Patienten angepasste Therapieoptionen. Je nach Immuncheckpoint-Expressionsmuster könnte dies die Wahl des ICIs beeinflussen. Auch eine Analyse der CDK-Expression könnte die Wahl des CDKIs beeinflussen. Patienten mit einer geringen Immunzellinfiltration, also mit „immunologisch kalten“ Tumoren könnten von einem anderen Applikationsschema profitieren, als Patienten mit „immunologisch heißen“ Tumoren. Diese bedürfen wiederum eines angepassten Schemas, um immunvermittelte Nebenwirkungen möglichst gering zu halten oder gar zu vermeiden.

In Anbetracht der Resistenzentwicklung sowie der Rate an initialen Non-Respondern bedarf es allerdings über die Immuncheckpoint-/CDK-Expression hinaus aussagekräftigerer Biomarker. Zu potenziellen Biomarkern, die mit einem Therapieansprechen nach CDK4/6-Blockade assoziiert sind, gehören beispielsweise *FRS2*, *MDM2*, *PRKCA* oder *ERBB2* [280, 281]. Gleichmaßen wurde auch in dieser Studie eine vermehrte Frequenz an *Mdm2*-Mutationen in der Abemaciclibgruppe detektiert (s. Abbildung 30). Erhöhte Mutationsfrequenzen in den Therapiegruppen fanden sich darüber hinaus für *Rasal2* sowie *Ncapd2*. Bereits 2020 postulierten Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe einen immunogenen Einfluss der aus *Rasal2*-Mutationen resultierenden Neoantigene [175]. Das RASAL2-Protein ist Bestandteil der RAS GTPase-aktivierenden Proteine und wirkt sowohl pro- als auch antionkogen, je nach Zelltyp bzw. Tumorentität. Die funktionelle Rolle von RASAL2 beim CRC ist noch weitestgehend unklar [282, 283].

Auch für *Ncapd2* zeigten sich in den Therapiegruppen erhöhte Mutationsfrequenzen. Beim Menschen ist NCAPD2 ein wichtiges Protein der Chromosomenkondensation. Seine Rolle in der Kanzerogenese jedoch ist noch kaum erforscht. Neuste Studien lassen einen Zusammenhang zwischen NCAPD2 sowie Mutationslast bei Lungentumoren und deren Immunzellinfiltration vermuten. Außerdem wird ein Einfluss auf die Zellzyklusregulation diskutiert [284–286].

### 5.2.6. Übertragbarkeit präklinischer Studien auf die klinische Anwendung

#### 5.2.6.1. Generelle Limitationen von Mausmodellen

Bei der Interpretation der Ergebnisse sind potenzielle Limitationen der Übertragbarkeit auf den Menschen zu berücksichtigen. Trotz offensichtlicher Unterschiede zwischen Mensch und Tier konnten in den vergangenen Jahrzehnten wegweisende Therapien etabliert, sowie neue

Erkenntnisse grundlegender Pathomechanismen in Tierversuchen aufgeklärt werden. Allerdings müssen, je zielgerichteter die Funktionsweisen moderner Therapien sind, auch immer feinere Unterschiede mitberücksichtigt werden.

Unterschiede zwischen Maus und Mensch bestehen in der Größe und Lebenserwartung. Darüber hinaus bestehen metabolische Unterschiede [287]: Die basale Stoffwechselrate der Maus ist rund sieben mal schneller als die eines durchschnittlich großen Menschen. Dies hat Einfluss auf Stoffwechselfvorgänge (vor allem der Leber und der Nieren), Thermoregulation sowie den Anteil an braunem Fettgewebe. Durch den höheren basalen Stoffwechsel tendieren Mäuse eher zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, was wiederum sämtliche Entzündungs- und damit auch Immunprozesse beeinflusst. Aufgrund der einfachen Haltung stellt die Maus dennoch das meistverwendete Versuchstier dar.

In der Erforschung von Immuntherapien gilt es nicht nur, die Krebserkrankung selbst, sondern insbesondere das Immunsystem der Patienten als Variable zu betrachten. Die allgemeine Struktur und Organisation des Immunsystems der Maus ähnelt der des Menschen. Dennoch bestehen einige Unterschiede. So umfassen murine Lymphozyten rund 75-90 % der Leukozyten, wohingegen dieser Anteil beim Menschen nur bei 30-50 % liegt. Dementsprechend ist der Anteil an Neutrophilen bei Mäusen deutlich geringer. Murine Endothelzellen und T-Lymphozyten exprimieren, im Gegensatz zu humanen, kein MHC-II. Über MHC-II-Moleküle erfolgt die Aktivierung  $CD4^+$  T-Helferzellen, welche die Differenzierung der B-Zelle zur Plasmazelle vermitteln. Es wird vermutet, dass das murine Immunsystem, in Anbetracht der kurzen Lebensdauer, weniger immunologische Gedächtniszellen benötigt. Im murinen Organismus findet bis ins Erwachsenenalter die Hämatopoese zusätzlich in der Milz statt. Beim Menschen sistiert dieser Vorgang bereits pränatal [287, 288].

Eine weitere Variable ist die SPF-nahe, sprich pathogenarme Haltung, welche den menschlichen Alltag nicht adäquat reflektiert. Das menschliche Immunsystem unterläuft einer lebenslangen Prägung durch kontinuierliche Exposition gegenüber unterschiedlichen Keimen und somit einer Vielfalt an Antigenen. Diesen Umstand gilt es vor allem in der präklinischen Forschung an Immuntherapien zu beachten, in der Versuchstiere unter pathogenfreien oder -armen Bedingungen gehalten werden. Hierdurch ergeben sich Unterschiede zwischen menschlichem und murinen Immunphänotyp. Eine SPF-nahe Haltung hat darüber hinaus massiven Einfluss auf das (Darm-) Mikrobiom der Mäuse, wodurch sowohl Tumorwachstum als auch Immunantwort beeinflusst werden. Neben dem Einfluss des Mikrobioms auf das

Immunsystem sollte ebenfalls der Einfluss auf die Metabolisierung von Medikamenten berücksichtigt werden [289–292].

Andererseits können durch eine pathogenfreie/-arme Haltung Infektionskrankheiten und nicht-Malignom-assoziierte Todesfälle reduziert werden, welche letztendlich nicht nur die Interpretation der Daten erschweren würden, sondern ferner einen finanziellen Mehraufwand bedeuten [290]. Dies macht eine natürliche Haltung ungeeignet und nur schwer realisierbar für Forschungszwecke. Dennoch wäre zukünftig ein realitätsnäheres Umfeld wünschenswert. Gerade in Hinblick auf die zunehmende Relevanz der Immuntherapie wären Rahmenbedingungen, die die Heterogenität des Immunsystems besser reflektieren, wünschenswert. Studien konnten zeigen, dass die Haltung mehrerer Mäuse in einem Käfig sich nicht nur positiv auf das Sozialverhalten auswirkt, sondern auch eine Veränderung des Immunsystems bewirkt, welche eher dem humanen entspricht [292]. Dies konnte in diesem Studiendesign umgesetzt werden, wodurch die Übertragbarkeit der Ergebnisse gesteigert wird.

### 5.2.6.2. Übertragbarkeit des gewählten *Mlh1*<sup>-/-</sup> Modells auf das Lynch-Syndrom

Das hier gewählte *Mlh1*-knockout-Modell schafft es, molekulare Grundlagen dMMR-assoziiierter Tumore widerzuspiegeln und stellt ein adäquates präklinisches Modell dar. Nichtsdestotrotz gilt es zu berücksichtigen, dass das LS bzw. sporadisch auftretende Mutationen in MMR-Genen, die zur MSI-Karzinogenese beitragen, sich in der klinischen Praxis deutlich komplexer und heterogener darstellen.

So wird im Mausmodell mittels Inzucht ein homozygoter Gen-knockout generiert, womit das *Mlh1*<sup>-/-</sup> Modell auch über viele Parallelen zur CMMR-D verfügt (s. 1.1.2.2). LS-Patienten hingegen tragen heterozygote MMR-Keimbahnmutationen, welche nicht ausschließlich *MLH1* betreffen [95, 293].

Ein weiterer wichtiger molekularer Unterschied zwischen Mensch und *Mlh1*<sup>-/-</sup> Maus besteht in der MHC-I-Expression. Während diese bei den knockout-Mäusen bei 100 % liegt, zeigen 30–40 % aller LS-Patienten einen Verlust des MHC-I-Moleküls. Vermutet wird eine dem zugrunde liegende Mutation im  $\beta$ 2-Microglobulin [207, 294, 295].

Weiterhin gilt es beim Vergleich zwischen Mausmodell und LS etwaige Vortherapien zu bedenken. *Mlh1*<sup>-/-</sup> Mäuse verfügen über keine Vorerkrankungen und sind, im Gegensatz zum Großteil der onkologischen Patienten, Medikamenten-naiv. Nach Diagnosestellung erhielten die Mäuse direkt das entsprechende Immuntherapieregime, wohingegen LS-Patienten als Erstlinientherapie in der Regel multiple Chemotherapiezyklen adjuvant oder auch

neoadjuvant durchlaufen, bevor sie aufgrund eines Krankheitsprogresses bzw. einer Metastasierung eine Immuntherapie erhalten.

Neben molekularen, bereits im Vorfeld bestehenden Unterschieden, zeigen sich auch erhebliche Unterschiede im Umgang mit dem Erkennen und der Behandlung von Nebenwirkungen. In der klinischen Praxis werden Komplikationen durch simple medikamentöse Maßnahmen oder gegebenenfalls auch einer temporären Dosisreduktion schnell reguliert. Hier besteht zudem eine engmaschige laborchemische Kontrolle der Patienten, was in diesem Versuchsmodell nicht möglich war. Dadurch können organotoxische, immunvermittelte Nebenwirkungen wie eine Hepatitis bzw. ein Leberzellschaden nicht nur frühzeitig anhand eines Transaminasenanstieges erkannt werden, sondern auch durch Steroide oder ggf. einer Dosisreduktion behandelt werden. Dies gilt sowohl im Rahmen einer ICI-Therapie als auch einer CDK4/6-Blockade [262, 296]. Durch solche Maßnahmen kann oftmals eine Fortführung der Therapie erzielt werden, wohingegen solche Interventionen im Tierversuch nicht möglich sind und dadurch Endpunkte früher erreicht wurden.

---

## 6. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob eine Kombinationstherapie (bestehend aus Immuncheckpoint- und CDK4/6-Inhibitor) die Effekte der jeweiligen Monotherapie steigert und potentielle Resistenzmechanismen überwunden werden können. Hierzu wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Analysen im *Mlh1*<sup>-/-</sup> Tumorgenesemodell durchgeführt.

Im Rahmen der *in vitro* Vorarbeiten wurde zunächst das therapeutische Potential des CDK4/6-Inhibitors Abemaciclib gegenüber *Mlh1*<sup>-/-</sup> Zellen aufgezeigt. Es wurde ein Zellzyklusarrest, sowie immunogener, apoptotischer und nekrotischer Zelltod nachgewiesen. In Ko-Kulturversuchen mit autologen murinen Immunzellen wurden anti-tumorale Effekte verstärkt. Interessanterweise vermittelte die Kombinationsbehandlung bestehend aus Abemaciclib und einem anti-PD-L1-Antikörper vergleichbar starke zytotoxische Effekte.

Basierend auf den erhobenen Daten wurde ein *in vivo* Therapieversuch durchgeführt. Tumortragende *Mlh1*<sup>-/-</sup> Mäuse erhielten Abemaciclib bzw. einen anti-PD-L1-Antikörper in Mono- oder Kombinationstherapie. Im Falle der Kombinationsgabe erfolgte eine metronomische Applikation mit initialer CDK-Blockade. Mit diesem Applikationsschema zeigte die Kombinationstherapie zwar eine Überlegenheit gegenüber der ICI-, jedoch nicht gegenüber der CDKI-Monotherapie. Abemaciclib verlängerte das Gesamtüberleben signifikant, einhergehend mit einer bildmorphologisch nachweisbaren Reduktion der Tumormasse. Damit konnte erstmals im experimentellen Modell eine sichere Anwendung von Abemaciclib bei MSI-Tumoren demonstriert werden. Wir postulieren eine Äquivalenz der Zellzyklushemmung durch Abemaciclib und damit eine innovative Therapieoption bei soliden MSI-Tumoren.

Weiterführende *ex vivo* Analysen bestätigten zudem das immunstimulierende Potenzial von Abemaciclib, welches durch eine deutlich Abnahme regulatorischer T-Zellen im Blut, in der Milz und dem residuellen Tumorgewebe charakterisiert ist. Gleichzeitig wurden vermehrt CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen im Tumorgewebe detektiert. Vergleichbare Effekte zeigten sich auch nach Kombinationsbehandlung. Die alleinige ICI hatte nur einen geringen Einfluss auf das Tumormikromilieu. Als potentieller Resistenzmechanismus nach Abemaciclibgabe konnte eine erhöhte *Myc*-Expression im Tumorgewebe identifiziert werden, die interessanterweise in der Kombinationsbehandlung nicht nachweisbar war. Zusammenfassend konnte somit der therapeutische Wert beider Monotherapien im präklinischen Modell

bestätigt werden. In weiterführenden Studien sollten Dosierung sowie Applikationsintervalle optimiert werden.

Prospektiv sind die gewonnenen Daten für Patienten mit primärem oder sekundärem Therapieversagen bei ICI-Behandlung von Interesse. Darüber hinaus bedarf es für das Patientenkollektiv, bei dem eine ICI-basierte Therapie kontraindiziert ist, einer gleichwertigen Alternative. Eine solche Alternative sehen wir in der Zellzyklusinhibition.

In welcher Form eine Abemaciclibmonotherapie bei MSI-Tumoren eingesetzt werden kann, muss noch genauer untersucht werden. In unserer Studie erfolgte eine wöchentliche Applikation, basierend auf der hohen Immunogenität von MSI-Tumoren und der Fähigkeit von Abemaciclib, antitumorale Immunantworten zu verstärken.

Ein „one-size-fits-all“ Therapieschema kann jedoch nur selten einen definitiven Erfolg garantieren, vielmehr bedarf es individualisierter Therapieansätze. Hierzu müssen immunologische und genetische Biomarker identifiziert werden, um darauf abgestimmte Substanzen, Kombinationen sowie Applikationsschemata zu wählen. Trotz der Fortschritte in der Immuntherapie gibt es immer wieder neue und auch unerwartete Erkenntnisse. Dies stellt die medizinische Forschung vor die Herausforderung, eben solche Erkenntnisse weitergehend zu hinterfragen und zugrunde liegende Pathomechanismen aufzudecken. Andererseits ergeben sich dadurch immer mehr Therapieoptionen, die den Weg zu einer personalisierten Medizin ebnen.

Basierend auf den hier generierten Daten konnten wegweisende Erkenntnisse zur CDK-Inhibition gewonnen werden. Diese tragen zu einem besseren Verständnis der bisherigen und vor allem der zukünftigen Rolle der CDK-Inhibition in der zielgerichteten Immuntherapie von MSI-Tumoren bei.

---

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Lorenzi M, Amonkar M, Zhang J, Mehta S, Liaw KL. Epidemiology of Microsatellite Instability High (MSI-H) and Deficient Mismatch Repair (dMMR) in Solid Tumors: A Structured Literature Review. *J Oncol*. 2020 Mar 9;2020:1–17.
2. Helbock HJ, Beckman KB, Shigenaga MK, Walter PB, Woodall AA, Yeo HC, Ames BN. DNA oxidation matters: The HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc Natl Acad Sci*. 1998 Jan 6;95(1):288–93.
3. Yang W. Structure and function of mismatch repair proteins. *Mutat Res Repair*. 2000 Aug 30;460(3):245–56.
4. Wen J, Wang Y, Yuan M, Huang Z, Zou Q, Pu Y, Zhao B, Cai Z. Role of mismatch repair in aging. *Int J Biol Sci*. 2021 Sep 21;17(14):3923–35.
5. Bellacosa A. Functional interactions and signaling properties of mammalian DNA mismatch repair proteins. *Cell Death Differ*. 2001 Nov;8(11):1076–92.
6. Kunkel TA, Erie DA. Eukaryotic Mismatch Repair in Relation to DNA Replication. *Annu Rev Genet*. 2015;49:291–313.
7. Rahimian E, Amini A, Alikarami F, Pezeshki SMS, Saki N, Safa M. DNA repair pathways as guardians of the genome: Therapeutic potential and possible prognostic role in hematologic neoplasms. *DNA Repair*. 2020 Dec;96:102951.
8. Liu D, Keijzers G, Rasmussen LJ. DNA mismatch repair and its many roles in eukaryotic cells. *Mutat Res Mutat Res*. 2017 Jul 1;773:174–87.
9. Li K, Luo H, Huang L, Luo H, Zhu X. Microsatellite instability: a review of what the oncologist should know. *Cancer Cell Int*. 2020 Jan 13;20(1):16.
10. Lee V, Murphy A, Le DT, Diaz LA. Mismatch Repair Deficiency and Response to Immune Checkpoint Blockade. *The Oncologist*. 2016 Oct;21(10):1200–11.
11. Jascur T, Boland CR. Structure and function of the components of the human DNA mismatch repair system. *Int J Cancer*. 2006;119(9):2030–5.
12. Rasuck CG, Leite SMO, Komatsuzaki F, Ferreira ACS, Oliveira VC, Gomes KB. Association between methylation in mismatch repair genes, V600E BRAF mutation and microsatellite instability in colorectal cancer patients. *Mol Biol Rep*. 2012 Mar;39(3):2553–60.
13. Wimmer K, Hulla W, Zschocke J, Lax SF, Webersinke G, Zelger B, Uyanik G, Kain R, Speicher M, Hoefler G. Erfassung von erblichem Dickdarm- und Gebärmutterkrebs: Konsensus der Österreichischen Arbeitsgemeinschaft Pathologie-Humangenetik zur verbesserten Betreuung von Lynch-Syndrom-Erkrankten und betroffenen Verwandten. *Onkol*. 2020 Sep;26(9):846–55.
14. Rädle J. Hereditäre Tumorerkrankungen – Diagnostik und Überwachungsstrategien. In: Schilling D, F. Riemann J, editors. *Prävention gastroenterologischer Tumorerkrankungen: Primär-, Sekundär- und Tertiärprävention* [Internet]. Berlin,

- Heidelberg: Springer; 2020 [cited 2022 Feb 1]. p. 149–71. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-3-662-58879-6\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-662-58879-6_9)
15. Giardiello FM, Allen JI, Axilbund JE, Boland CR, Burke CA, Burt RW, Church JM, Dornitz JA, Johnson DA, Kaltenbach T, Levin TR, Lieberman DA, Robertson DJ, Syngal S, Rex DK. Guidelines on Genetic Evaluation and Management of Lynch Syndrome: A Consensus Statement by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Am J Gastroenterol.* 2014;109:21.
  16. Haraldsdottir S, Hampel H, Tomsic J, Frankel WL, Pearlman R, de la Chapelle A, Pritchard CC. Colon and Endometrial Cancers with Mismatch Repair Deficiency can Arise from Somatic, Rather Than Germline, Mutations. *Gastroenterology.* 2014 Dec;147(6):1308-1316.e1.
  17. Zagraban B, Offner FA. Spontane, hereditäre und CED-assoziierte Pathogenese des kolorektalen Karzinoms. *J Für Gastroenterol Hepatol Erkrank.* 2020 Jun 1;18(2):39–48.
  18. Elze L, Mensenkamp AR, Nagtegaal ID, Zelst-Stams WAG van, Dommering CJ, Hoogerbrugge N, Jong MM de, Bleeker FE, Leter EM, Letteboer TGW, Nielsen M, Post RS van der, Wapstra B, Voer RM de, Ligtenberg MJL. Somatic Nonepigenetic Mismatch Repair Gene Aberrations Underly Most Mismatch Repair–Deficient Lynch-Like Tumors. *Gastroenterology.* 2021 Mar 1;160(4):1414-1416.e3.
  19. Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet.* 2004 Jun;5(6):435–45.
  20. Kelkar YD, Tyekucheva S, Chiaromonte F, Makova KD. The genome-wide determinants of human and chimpanzee microsatellite evolution. *Genome Res.* 2008 Jan;18(1):30–8.
  21. Pearson CE, Edamura KN, Cleary JD. Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nat Rev Genet.* 2005 Oct;6(10):729–42.
  22. Wu Y, Berends MJW, Mensink RGJ, Kempinga C, Sijmons RH, van der Zee AGJ, Hollema H, Kleibeuker JH, Buys CHCM, Hofstra RMW. Association of Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer–Related Tumors Displaying Low Microsatellite Instability with MSH6 Germline Mutations. *Am J Hum Genet.* 1999 Nov;65(5):1291–8.
  23. Woerner SM, Benner A, Sutter C, Schiller M, Yuan YP, Keller G, Bork P, Doeberitz M von K, Gebert JF. Pathogenesis of DNA repair-deficient cancers: a statistical meta-analysis of putative Real Common Target genes. *Oncogene.* 2003 Apr;22(15):2226–35.
  24. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2003 Mar 6;348(10):919–32.
  25. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B, Brattain M, Willson JKV. Inactivation of the Type II TGF- $\beta$  Receptor in Colon Cancer Cells with Microsatellite Instability. *Science [Internet].* 1995 Jun 2 [cited 2022 Feb 3]; Available from: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.7761852>

26. Roudko V, Bozkus CC, Orfanelli T, McClain CB, Carr C, O'Donnell T, Chakraborty L, Samstein R, Huang K lin, Blank SV, Greenbaum B, Bhardwaj N. Shared Immunogenic Poly-Epitope Frameshift Mutations in Microsatellite Unstable Tumors. *Cell*. 2020 Dec 10;183(6):1634-1649.e17.
27. Lynch HT, Snyder CL, Shaw TG, Heinen CD, Hitchins MP. Milestones of Lynch syndrome: 1895–2015. *Nat Rev Cancer*. 2015 Mar;15(3):181–94.
28. Choucair K, Radford M, Bansal A, Park R, Saeed A. Advances in immune therapies for the treatment of microsatellite instability-high/deficient mismatch repair metastatic colorectal cancer (Review). *Int J Oncol*. 2021 Aug 11;59(3):74.
29. Kohring C, Holstiege J, Akmatov MK, Dammertz L, Heuer J, Bätzing J. Vertragsärztliche und -psychotherapeutische onkologische Versorgung in Deutschland – Trends im Zeitverlauf 2010 bis 2019. 2021 [cited 2022 Feb 3]; Available from: <https://www.versorgungsatlas.de/themen/alle-analysen-nach-datum-sortiert?tab=6&uid=114>
30. Zhang X, Li J. Era of universal testing of microsatellite instability in colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol*. 2013 Feb 15;5(2):12–9.
31. Espenschied CR, LaDuca H, Li S, McFarland R, Gau CL, Hampel H. Multigene Panel Testing Provides a New Perspective on Lynch Syndrome. *J Clin Oncol*. 2017 Aug 1;35(22):2568–75.
32. Møller P, Seppälä T, Bernstein I, Holinski-Feder E, Sala P, Evans DG, Lindblom A, Macrae F, Blanco I, Sijmons R, Jeffries J, Vasen H, Burn J, Nakken S, Hovig E, Rødland EA, Tharmaratnam K, Cappel WH de V tot N, Hill J, Wijnen J, Green K, Lalloo F, Sunde L, Mints M, Bertario L, Pineda M, Navarro M, Morak M, Renkonen-Sinisalo L, Frayling IM, Plazzer JP, Pylvanainen K, Sampson JR, Capella G, Mecklin JP, Möslein G, Group (<http://mallorca-group.eu>) in collaboration with TM. Cancer incidence and survival in Lynch syndrome patients receiving colonoscopic and gynaecological surveillance: first report from the prospective Lynch syndrome database. *Gut*. 2017 Mar 1;66(3):464–72.
33. Alemayehu A, Sebova K, Fridrichova I. Redundant DNA methylation in colorectal cancers of Lynch-syndrome patients. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008 Oct;47(10):906–14.
34. Idos G, Valle L. Lynch Syndrome. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Gripp KW, Amemiya A, editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cited 2023 Mar 12]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1211/>
35. Nguyen A, Bougeard G, Koob M, Chenard MP, Schneider A, Maugard C, Entz-Werle N. MSI detection and its pitfalls in CMMRD syndrome in a family with a bi-allelic MLH1 mutation. *Fam Cancer*. 2016 Oct;15(4):571–7.
36. Poley JW, Wagner A, Hoogmans MMCP, Menko FH, Tops C, Kros JM, Reddingius RE, Meijers-Heijboer H, Kuipers EJ, Dinjens WNM, on behalf of the Rotterdam Initiative on Gastrointestinal Hereditary Tumors. Biallelic germline mutations of

- mismatch-repair genes: A possible cause for multiple pediatric malignancies. *Cancer*. 2007 Jun 1;109(11):2349–56.
37. Tabori U, Hansford JR, Achatz MI, Kratz CP, Plon SE, Frebourg T, Brugières L. Clinical Management and Tumor Surveillance Recommendations of Inherited Mismatch Repair Deficiency in Childhood. *Clin Cancer Res*. 2017 Jun 1;23(11):e32–7.
  38. Amayiri N, Tabori U, Campbell B, Bakry D, Aronson M, Dumo C, Rakopoulos P, Malkin D, Qaddoumi I, Musharbash A, Swaidan M, Bouffet E, Hawkins C, Al-Hussaini M, On behalf of BMMRD consortium. High frequency of mismatch repair deficiency among pediatric high grade gliomas in Jordan: High frequency of bMMRD in pediatric HGG. *Int J Cancer*. 2016 Jan 15;138(2):380–5.
  39. Ärzteblatt DÄG Redaktion Deutsches. Erblicher Darmkrebs ohne Polyposis [Internet]. *Deutsches Ärzteblatt*. 2013 [cited 2022 Feb 11]. Available from: <https://www.aerzteblatt.de/archiv/134013/Erblicher-Darmkrebs-ohne-Polyposis>
  40. Wimmer K, Kratz CP. Constitutional mismatch repair-deficiency syndrome. *Haematologica*. 2010 May 1;95(5):699–701.
  41. Zippl M, Jochum W. Mikrosatelliten-Instabilität Grundlagen und neue klinische Anwendungen eines etablierten Biomarkers. :5.
  42. S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom. 2019.
  43. Hewish M, Lord CJ, Martin SA, Cunningham D, Ashworth A. Mismatch repair deficient colorectal cancer in the era of personalized treatment. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010 Apr;7(4):197–208.
  44. Kang BW, Baek DW, Chang E, Kim HJ, Park SY, Park JS, Choi GS, Baek JH, Kim JG. Clinical implication of adjuvant chemotherapy according to mismatch repair status in patients with intermediate-risk stage II colon cancer. *Yeungnam Univ J Med* [Internet]. 2021 Dec 22 [cited 2022 Feb 15]; Available from: <http://www.e-jyms.org/journal/view.php?doi=10.12701/yujm.2021.01571>
  45. Ni K, Zhan Y, Liu Z, Zhao X zhu, Wang W, Wang G, Zhang Z, Li G, Zhang X, Zhang C. Mismatch repair system deficiency is associated with chemoradiotherapy resistance in locally advanced rectal adenocarcinoma patients. *J Surg Oncol*. 2022;125(4):692–702.
  46. Roset M, Amonkar M, Patel R, Lara N, Kothari S. Real-World Treatment Patterns and Clinical Outcomes for Standard of Care Regimens in Patients with Deficient MMR or MSI-High Metastatic Colorectal and Non-Colorectal Cancer: A Retrospective Chart Review Study in France. *Adv Ther* [Internet]. 2022 Jan 13 [cited 2022 Feb 15]; Available from: <https://doi.org/10.1007/s12325-021-01956-8>
  47. Sahin IH, Akce M, Alese O, Shaib W, Lesinski GB, El-Rayes B, Wu C. Immune checkpoint inhibitors for the treatment of MSI-H/MMR-D colorectal cancer and a perspective on resistance mechanisms. *Br J Cancer*. 2019 Nov 12;121(10):809–18.
  48. Tong Y, Yang W, Koeffler HP. Mouse models of colorectal cancer. *Chin J Cancer*. 2011 Jul 5;450–62.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

---

49. Shrestha KS, Aska EM, Tuominen MM, Kauppi L. Tissue-specific reduction in MLH1 expression induces microsatellite instability in intestine of Mlh1+/- mice. *DNA Repair*. 2021 Oct 1;106:103178.
50. Gladbach YS, Wiegele L, Hamed M, Merckenschläger AM, Fuellen G, Junghanss C, Maletzki C. Unraveling the Heterogeneous Mutational Signature of Spontaneously Developing Tumors in MLH1-/- Mice. *Cancers*. 2019 Oct 2;11(10):1485.
51. Decker WK, da Silva RF, Sanabria MH, Angelo LS, Guimarães F, Burt BM, Kheradmand F, Paust S. Cancer Immunotherapy: Historical Perspective of a Clinical Revolution and Emerging Preclinical Animal Models. *Front Immunol*. 2017;8:829.
52. McCarthy EF. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop J*. 2006;26:154-8.
53. Coley WB. II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Ann Surg*. 1891 Sep;14(3):199-220.
54. Dobosz P, Dzieciatkowski T. The Intriguing History of Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 2019 Dec 17;10:2965.
55. Soysal SD, Tzankov A, Muenst SE. Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. *Pathobiology*. 2015;82(3-4):142-52.
56. Jarosz-Biej M, Smolarczyk R, Cichoń T, Kułach N. Tumor Microenvironment as A "Game Changer" in Cancer Radiotherapy. *Int J Mol Sci*. 2019 Jun 29;20(13):3212.
57. Valkenburg KC, de Groot AE, Pienta KC. Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018 Jun;15(6):366-81.
58. Lewis CE, Pollard JW. Distinct Role of Macrophages in Different Tumor Microenvironments. *Cancer Res*. 2006 Jan 15;66(2):605-12.
59. Ijsselstein ME, Petitprez F, Lacroix L, Ruano D, van der Breggen R, Julie C, Morreau H, Sautès-Fridman C, Fridman WH, de Miranda NF da CC. Revisiting immune escape in colorectal cancer in the era of immunotherapy. *Br J Cancer*. 2019 Apr 16;120(8):815-8.
60. Jiang Y, Li Y, Zhu B. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Death Dis*. 2015 Jun;6(6):e1792-e1792.
61. Yao H, Wang H, Li C, Fang JY, Xu J. Cancer Cell-Intrinsic PD-1 and Implications in Combinatorial Immunotherapy. *Front Immunol*. 2018 Jul 30;9:1774.
62. Wang X, Yang X, Zhang C, Wang Y, Cheng T, Duan L, Tong Z, Tan S, Zhang H, Saw PE, Gu Y, Wang J, Zhang Y, Shang L, Liu Y, Jiang S, Yan B, Li R, Yang Y, Yu J, Chen Y, Gao GF, Ye Q, Gao S. Tumor cell-intrinsic PD-1 receptor is a tumor suppressor and mediates resistance to PD-1 blockade therapy. *Proc Natl Acad Sci*. 2020 Mar 24;117(12):6640-50.
63. Brown JA, Dorfman DM, Ma FR, Sullivan EL, Munoz O, Wood CR, Greenfield EA, Freeman GJ. Blockade of Programmed Death-1 Ligands on Dendritic Cells Enhances T Cell Activation and Cytokine Production. *J Immunol*. 2003 Feb 1;170(3):1257-66.

64. Alsaab HO, Sau S, Alzhrani R, Tatiparti K, Bhise K, Kashaw SK, Iyer AK. PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. *Front Pharmacol.* 2017 Aug 23;8:561.
65. Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol.* 2008 Jun;8(6):467–77.
66. Freeman GJ, Lombard DB, Gimmi CD, Brod SA, Lee K, Laning JC, Hafler DA, Dorf ME, Gray GS, Reiser H. CTLA-4 and CD28 mRNA are coexpressed in most T cells after activation. Expression of CTLA-4 and CD28 mRNA does not correlate with the pattern of lymphokine production. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1992 Dec 15;149(12):3795–801.
67. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak TW, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med.* 2000 Jul 17;192(2):303–10.
68. Sharma MD, Baban B, Chandler P, Hou DY, Singh N, Yagita H, Azuma M, Blazar BR, Mellor AL, Munn DH. Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest.* 2007 Sep 4;117(9):2570–82.
69. Lau J, Cheung J, Navarro A, Lianoglou S, Haley B, Totpal K, Sanders L, Koeppen H, Caplazi P, McBride J, Chiu H, Hong R, Grogan J, Javinal V, Yauch R, Irving B, Belvin M, Mellman I, Kim JM, Schmidt M. Tumour and host cell PD-L1 is required to mediate suppression of anti-tumour immunity in mice. *Nat Commun.* 2017 Apr;8(1):14572.
70. Bronte V. Myeloid-derived suppressor cells in inflammation: Uncovering cell subsets with enhanced immunosuppressive functions. *Eur J Immunol.* 2009;39(10):2670–2.
71. Liu Y, Zeng B, Zhang Z, Zhang Y, Yang R. B7-H1 on myeloid-derived suppressor cells in immune suppression by a mouse model of ovarian cancer. *Clin Immunol.* 2008 Dec 1;129(3):471–81.
72. Chen SMY, Krinsky AL, Woolaver RA, Wang X, Chen Z, Wang JH. Tumor Immune Microenvironment in Head and Neck Cancers. *Mol Carcinog.* 2020 Jul;59(7):766–74.
73. Kim YJ, Park SJ, Broxmeyer HE. Phagocytosis, a potential mechanism for myeloid derived suppressor cell regulation of CD8+ T cell function mediated through PD-1 and PD-L1 interaction. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2011 Sep 1;187(5):2291–301.
74. Online GL. Atezolizumab - Anwendung, Wirkung, Nebenwirkungen | Gelbe Liste [Internet]. Gelbe Liste Online. [cited 2022 Feb 24]. Available from: [https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Atezolizumab\\_55040](https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Atezolizumab_55040)
75. Mandal R, Samstein RM, Lee KW, Havel JJ, Wang H, Krishna C, Sabio EY, Makarov V, Kuo F, Blechua P, Ramaswamy AT, Durham JN, Bartlett B, Ma X, Srivastava R, Middha S, Zehir A, Hechtman JF, Morris LG, Weinhold N, Riaz N, Le DT, Diaz LA, Chan TA. Genetic diversity of tumors with mismatch repair deficiency influences anti-PD-1 immunotherapy response. *Science.* 2019 May 3;364(6439):485–91.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

---

76. Sahin IH, Goyal S, Pumpalova Y, Sonbol MB, Das S, Haraldsdottir S, Ahn D, Ciombor KK, Chen Z, Draper A, Berlin J, Bekaii-Saab T, Lesinski GB, El-Rayes BF, Wu C. Mismatch Repair (MMR) Gene Alteration and BRAF V600E Mutation Are Potential Predictive Biomarkers of Immune Checkpoint Inhibitors in MMR-Deficient Colorectal Cancer. *The Oncologist*. 2021 Aug;26(8):668–75.
77. Oliveira AF, Bretes L, Furtado I. Review of PD-1/PD-L1 Inhibitors in Metastatic dMMR/MSI-H Colorectal Cancer. *Front Oncol*. 2019;9:396.
78. Tan E, Sahin IH. Defining the current role of immune checkpoint inhibitors in the treatment of mismatch repair-deficient/microsatellite stability-high colorectal cancer and shedding light on future approaches. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021 Jul;15(7):735–42.
79. Guidoboni M, Gafà R, Viel A, Doglioni C, Russo A, Santini A, Del Tin L, Macri E, Lanza G, Boiocchi M, Dolcetti R. Microsatellite Instability and High Content of Activated Cytotoxic Lymphocytes Identify Colon Cancer Patients with a Favorable Prognosis. *Am J Pathol*. 2001 Jul;159(1):297–304.
80. Llosa NJ, Cruise M, Tam A, Wick EC, Hechenbleikner EM, Taube JM, Blosser L, Fan H, Wang H, Lubber B, Zhang M, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, Sears CL, Anders RA, Pardoll DM, Housseau F. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov*. 2015 Jan;5(1):43–51.
81. Borelli B, Antoniotti C, Carullo M, Germani MM, Conca V, Masi G. Immune-Checkpoint Inhibitors (ICIs) in Metastatic Colorectal Cancer (mCRC) Patients beyond Microsatellite Instability. *Cancers*. 2022 Oct 11;14(20):4974.
82. Sánchez-Martínez C, Lallena MJ, Sanfeliciano SG, de Dios A. Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs: Recent advances (2015–2019). *Bioorg Med Chem Lett*. 2019 Oct;29(20):126637.
83. Tripathy D, Bardia A, Sellers WR. Ribociclib (LEE011): Mechanism of Action and Clinical Impact of This Selective Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitor in Various Solid Tumors. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2017 Jul 1;23(13):3251–62.
84. Lu J. Palbociclib: a first-in-class CDK4/CDK6 inhibitor for the treatment of hormone-receptor positive advanced breast cancer. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol*. 2015 Aug 13;8:98.
85. Palumbo A, Lau G, Saraceni M. Abemaciclib: The Newest CDK4/6 Inhibitor for the Treatment of Breast Cancer. *Ann Pharmacother*. 2019 Feb 1;53(2):178–85.
86. Kwiatkowski N, Zhang T, Rahl PB, Abraham BJ, Reddy J, Ficarro SB, Dastur A, Amzallag A, Ramaswamy S, Tesar B, Jenkins CR, Hannett NM, McMillin D, Sanda T, Sim T, Kim ND, Look T, Mitsiades C, Weng AP, Brown JR, Benes CH, Marto JA, Young RA, Gray NS. Targeting transcription regulation in cancer with a covalent CDK7 inhibitor. *Nature*. 2014 Jul 31;511(7511):616–20.

87. Petroni G, Formenti SC, Chen-Kiang S, Galluzzi L. Immunomodulation by anticancer cell cycle inhibitors. *Nat Rev Immunol.* 2020 Nov;20(11):669–79.
88. Schaer DA, Beckmann RP, Dempsey JA, Huber L, Forest A, Amaladas N, Li Y, Wang YC, Rasmussen ER, Chin D, Capen A, Carpenito C, Staschke KA, Chung LA, Litchfield LM, Merzoug FF, Gong X, Iversen PW, Buchanan S, de Dios A, Novosiadly RD, Kalos M. The CDK4/6 Inhibitor Abemaciclib Induces a T Cell Inflamed Tumor Microenvironment and Enhances the Efficacy of PD-L1 Checkpoint Blockade. *Cell Rep.* 2018 Mar;22(11):2978–94.
89. Charles A, Bourne CM, Korontsvit T, Aretz ZEH, Mun SS, Dao T, Klatt MG, Scheinberg DA. Low-dose CDK4/6 inhibitors induce presentation of pathway specific MHC ligands as potential targets for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology.* 10(1):1916243.
90. Goel S, DeCristo MJ, Watt AC, BrinJones H, Sceneay J, Li BB, Khan N, Ubellacker JM, Xie S, Metzger-Filho O, Hoog J, Ellis MJ, Ma CX, Ramm S, Krop IE, Winer EP, Roberts TM, Kim HJ, McAllister SS, Zhao JJ. CDK4/6 inhibition triggers anti-tumour immunity. *Nature.* 2017 Aug;548(7668):471–5.
91. Hossain DMS, Javaid S, Cai M, Zhang C, Sawant A, Hinton M, Sathe M, Grein J, Blumenschein W, Pinheiro EM, Chackerian A. Dinaciclib induces immunogenic cell death and enhances anti-PD1-mediated tumor suppression. *J Clin Invest.* 2018 Jan 16;128(2):644–54.
92. Zhang J, Bu X, Wang H, Zhu Y, Geng Y, Nihira NT, Tan Y, Ci Y, Wu F, Dai X, Guo J, Huang YH, Fan C, Ren S, Sun Y, Freeman GJ, Sicinski P, Wei W. Cyclin D-CDK4 kinase destabilizes PD-L1 via cullin 3-SPOP to control cancer immune surveillance. *Nature.* 2018 Jan 4;553(7686):91–5.
93. Heckler M, Ali LR, Clancy-Thompson E, Qiang L, Ventre KS, Lenehan P, Roehle K, Luoma A, Boelaars K, Peters V, McCreary J, Boschert T, Wang ES, Suo S, Marangoni F, Mempel TR, Long HW, Wucherpfennig KW, Dougan M, Gray NS, Yuan GC, Goel S, Tolaney SM, Dougan SK. Inhibition of CDK4/6 Promotes CD8 T-cell Memory Formation. *Cancer Discov.* 2021 Oct 1;11(10):2564–81.
94. Edelmann W, Yang K, Kuraguchi M, Heyer J, Lia M, Kneitz B, Fan K, Brown AMC, Lipkin M, Kucherlapati R. Tumorigenesis in *Mlh1* and *Mlh1/Apc1638N* Mutant Mice. *Cancer Res.* 1999 Mar 15;59(6):1301–7.
95. Maletzki C, Beyrich F, Hühns M, Klar E, Linnebacher M. The mutational profile and infiltration pattern of murine *MLH1*<sup>-/-</sup> tumors: concurrences, disparities and cell line establishment for functional analysis. *Oncotarget.* 2016 Jul 18;7(33):53583–98.
96. Christensen C, Kristensen LK, Alfsen MZ, Nielsen CH, Kjaer A. Quantitative PET imaging of PD-L1 expression in xenograft and syngeneic tumour models using a site-specifically labelled PD-L1 antibody. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2020;47(5):1302–13.
97. Mah K, Caldwell CB. Biological Target Volume. In: *PET-CT in Radiotherapy Treatment Planning* [Internet]. Elsevier; 2008 [cited 2021 Nov 27]. p. 52–89. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781416032243500074>

98. How a Flow Cytometer Works - DE [Internet]. [cited 2021 Nov 25]. Available from: [//www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/flow-cytometry-basics/flow-cytometry-fundamentals/how-flow-cytometer-works.html](http://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/flow-cytometry-basics/flow-cytometry-fundamentals/how-flow-cytometer-works.html)
99. BD FACSVerser System User's Guide. :184.
100. Salewski I, Henne J, Engster L, Krone P, Schneider B, Redwanz C, Lemcke H, Henze L, Junghanss C, Maletzki C. CDK4/6 blockade provides an alternative approach for treatment of mismatch-repair deficient tumors. *Oncoimmunology*. 11(1):2094583.
101. 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*. 2021;70(12):3405–19.
102. Salewski I, Henne J, Engster L, Schneider B, Lemcke H, Skorska A, Berlin P, Henze L, Junghanss C, Maletzki C. Combined Gemcitabine and Immune-Checkpoint Inhibition Conquers Anti-PD-L1 Resistance in Low-Immunogenic Mismatch Repair-Deficient Tumors. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 1;22(11):5990.
103. Maletzki C, Gladbach YS, Hamed M, Fuellen G, Semmler ML, Stenzel J, Linnebacher M. Cellular vaccination of MLH1<sup>-/-</sup> mice - an immunotherapeutic proof of concept study. *Oncoimmunology*. 2018;7(3):e1408748.
104. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, Skora AD, Luber BS, Azad NS, Laheru D, Biedrzycki B, Donehower RC, Zaheer A, Fisher GA, Crocenzi TS, Lee JJ, Duffy SM, Goldberg RM, de la Chapelle A, Koshiji M, Bhaijee F, Hruban RH, Wood LD, Cuka N, Pardoll DM, Papadopoulos N, Kinzler KW, Zhou S, Cornish TC, Taube JM, Anders RA, Eshleman JR, Vogelstein B, Diaz LA. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med*. 2015 Jun 25;372(26):2509–20.
105. O'Neil BH, Wallmark JM, Lorente D, Elez E, Raimbourg J, Gomez-Roca C, Ejadi S, Piha-Paul SA, Stein MN, Razak ARA, Dotti K, Santoro A, Cohen RB, Gould M, Saraf S, Stein K, Han SW. Safety and antitumor activity of the anti-PD-1 antibody pembrolizumab in patients with advanced colorectal carcinoma. *PLOS ONE*. 2017 Dec 28;12(12):e0189848.
106. Le DT, Kavan P, Kim TW, Burge ME, Van Cutsem E, Hara H, Boland PM, Van Laethem JL, Geva R, Taniguchi H, Crocenzi TS, Sharma M, Atreya CE, Diaz LA, Liang LW, Marinello P, Dai T, O'Neil BH. KEYNOTE-164: Pembrolizumab for patients with advanced microsatellite instability high (MSI-H) colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2018 May 20;36(15\_suppl):3514–3514.
107. André T, Shiu KK, Kim TW, Jensen BV, Jensen LH, Punt C, Smith D, Garcia-Carbonero R, Benavides M, Gibbs P, de la Fouchardiere C, Rivera F, Elez E, Bendell J, Le DT, Yoshino T, Van Cutsem E, Yang P, Farooqui MZH, Marinello P, Diaz LA. Pembrolizumab in Microsatellite-Instability-High Advanced Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2020 Dec 3;383(23):2207–18.

108. Diaz LA, Le DT, Yoshino T, André T, Bendell JC, Rosales M, Kang SP, Lam B, Jäger D. KEYNOTE-177: Phase 3, open-label, randomized study of first-line pembrolizumab (Pembro) versus investigator-choice chemotherapy for mismatch repair-deficient (dMMR) or microsatellite instability-high (MSI-H) metastatic colorectal carcinoma (mCRC). *J Clin Oncol.* 2018 Feb;36(4\_suppl):TPS877–TPS877.
109. Bendell JC, Powderly JD, Lieu CH, Eckhardt SG, Hurwitz H, Hochster HS, Murphy JE, Funke RP, Rossi C, Wallin J, Waterkamp D, Pishvaian MJ. Safety and efficacy of MPDL3280A (anti-PDL1) in combination with bevacizumab (bev) and/or FOLFOX in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC). *J Clin Oncol.* 2015 Jan 20;33(3\_suppl):704–704.
110. Rocha Lima CMSP, Yothers G, Jacobs SA, Sanoff HK, Cohen DJ, Guthrie KA, Henry NL, Ganz PA, Kopetz S, Lucas PC, Blanke CD, Wolmark N, Hochster HS, George TJ, Overman MJ. A randomized phase III study of mFOLFOX6/bevacizumab combination chemotherapy with or without atezolizumab or atezolizumab monotherapy in the first-line treatment of patients (pts) with deficient DNA mismatch repair (dMMR) metastatic colorectal cancer (mCRC): Colorectal Cancer Metastatic dMMR Immuno-Therapy (COMMIT) study (NRG-GI004/SWOG-S1610). *J Clin Oncol.* 2020 Feb;38(4\_suppl):TPS260–TPS260.
111. Bae HJ, Kang SK, Kwon WS, Jeong I, Park S, Kim TS, Kim KH, Kim H, Jeong HC, Chung HC, Rha SY. p16 methylation is a potential predictive marker for abemaciclib sensitivity in gastric cancer. *Biochem Pharmacol.* 2021 Jan 1;183:114320.
112. Deng J, Lv C, Qin D, Wang X, An Z. The Role of CDKs Inhibitors in Cancer Immunotherapy. *Am J Biomed Sci Res.* 2020 Feb 18;7(3):257.
113. Laphanuwat P, Jirawatnotai S. Immunomodulatory Roles of Cell Cycle Regulators. *Front Cell Dev Biol.* 2019 Feb 26;7:23.
114. Schoenwaelder N, Salewski I, Engel N, Krause M, Schneider B, Müller M, Riess C, Lemcke H, Skorska A, Grosse-Thie C, Junghanss C, Maletzki C. The Individual Effects of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors on Head and Neck Cancer Cells-A Systematic Analysis. *Cancers.* 2021 May 15;13(10):2396.
115. Kwiatkowski N, Zhang T, Rahl PB, Abraham BJ, Reddy J, Ficarro SB, Dastur A, Amzallag A, Ramaswamy S, Tesar B, Jenkins CE, Hannett NM, McMillin D, Sanda T, Sim T, Kim ND, Look T, Mitsiades CS, Weng AP, Brown JR, Benes CH, Marto JA, Young RA, Gray NS. Targeting transcription regulation in cancer with a covalent CDK7 inhibitor. *Nature.* 2014 Jul;511(7511):616–20.
116. Zhang T, Kwiatkowski N, Olson CM, Dixon-Clarke SE, Abraham BJ, Greifenberg AK, Ficarro SB, Elkins JM, Liang Y, Hannett NM, Manz T, Hao M, Bartkowiak B, Greenleaf AL, Marto JA, Geyer M, Bullock AN, Young RA, Gray NS. Covalent targeting of remote cysteine residues to develop CDK12 and CDK13 inhibitors. *Nat Chem Biol.* 2016 Oct;12(10):876–84.
117. Li BB, Wang B, Zhu CM, Tang D, Pang J, Zhao J, Sun CH, Qiu MJ, Qian ZR. Cyclin-dependent kinase 7 inhibitor THZ1 in cancer therapy. *Chronic Dis Transl Med.* 2019 Oct 18;5(3):155–69.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

---

118. Parry D, Guzi T, Shanahan F, Davis N, Prabhavalkar D, Wiswell D, Seghezzi W, Paruch K, Dwyer MP, Doll R, Nomeir A, Windsor W, Fischmann T, Wang Y, Oft M, Chen T, Kirschmeier P, Lees EM. Dinaciclib (SCH 727965), a Novel and Potent Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor. *Mol Cancer Ther.* 2010 Aug 9;9(8):2344–53.
119. Satyanarayana A, Kaldis P. A dual role of Cdk2 in DNA damage response. *Cell Div.* 2009 May 18;4(1):9.
120. Schorl C, Sedivy JM. Analysis of Cell Cycle Phases and Progression in Cultured Mammalian Cells. *Methods San Diego Calif.* 2007 Feb;41(2):143–50.
121. George MA, Qureshi S, Omene C, Toppmeyer DL, Ganesan S. Clinical and Pharmacologic Differences of CDK4/6 Inhibitors in Breast Cancer. *Front Oncol* [Internet]. 2021 [cited 2022 May 2];11. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2021.693104>
122. Chen P, Lee NV, Hu W, Xu M, Ferre RA, Lam H, Bergqvist S, Solowiej J, Diehl W, He YA, Yu X, Nagata A, VanArsdale T, Murray BW. Spectrum and Degree of CDK Drug Interactions Predicts Clinical Performance. *Mol Cancer Ther.* 2016 Oct;15(10):2273–81.
123. Saqub H, Proetsch-Gugerbauer H, Bezrookove V, Nosrati M, Vaquero EM, de Semir D, Ice RJ, McAllister S, Soroceanu L, Kashani-Sabet M, Osorio R, Dar AA. Dinaciclib, a cyclin-dependent kinase inhibitor, suppresses cholangiocarcinoma growth by targeting CDK2/5/9. *Sci Rep.* 2020 Oct 28;10(1):18489.
124. Tien AH, Sadar MD. Cyclin-dependent Kinase 4/6 Inhibitor Palbociclib in Combination with Ralaniten Analogs for the Treatment of Androgen Receptor-positive Prostate and Breast Cancers. *Mol Cancer Ther.* 2022 Feb;21(2):294–309.
125. Wang TH, Chen CC, Leu YL, Lee YS, Lian JH, Hsieh HL, Chen CY. Palbociclib induces DNA damage and inhibits DNA repair to induce cellular senescence and apoptosis in oral squamous cell carcinoma. *J Formos Med Assoc.* 2021 Sep 1;120(9):1695–705.
126. Hahn AT, Jones JT, Meyer T. Quantitative analysis of cell cycle phase durations and PC12 differentiation using fluorescent biosensors. *Cell Cycle Georget Tex.* 2009 Apr 1;8(7):1044–52.
127. Apraiz A, Mitxelena J, Zubiaga A. Studying Cell Cycle-regulated Gene Expression by Two Complementary Cell Synchronization Protocols. *J Vis Exp JoVE.* 2017 Jun 6;(124):55745.
128. Teh JLF, Aplin AE. Arrested developments: CDK4/6 inhibitor resistance and alterations in the tumor immune microenvironment. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2019 Feb 1;25(3):921–7.
129. Contardi E, Palmisano GL, Tazzari PL, Martelli AM, Falà F, Fabbi M, Kato T, Lucarelli E, Donati D, Polito L, Bolognesi A, Ricci F, Salvi S, Gargaglione V, Mantero S, Alberghini M, Ferrara GB, Pistillo MP. CTLA-4 is constitutively expressed on tumor cells and can trigger apoptosis upon ligand interaction. *Int J Cancer.* 2005 Nov 20;117(4):538–50.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

---

130. Fecteau S, Basadonna GP, Freitas A, Ariyan C, Sayegh MH, Rothstein DM. CTLA-4 up-regulation plays a role in tolerance mediated by CD45. *Nat Immunol.* 2001 Jan;2(1):58–63.
131. Iida T, Ohno H, Nakaseko C, Sakuma M, Takeda-Ezaki M, Arase H, Kominami E, Fujisawa T, Saito T. Regulation of cell surface expression of CTLA-4 by secretion of CTLA-4-containing lysosomes upon activation of CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2000 Nov 1;165(9):5062–8.
132. Do P, Beckwith KA, Cheney C, Tran M, Beaver L, Griffin BG, Mo X, Liu Y, Lapalombella R, Hertlein E, Muthusamy N, Byrd JC. Leukemic B Cell CTLA-4 Suppresses Costimulation of T Cells. *J Immunol.* 2019 May 1;202(9):2806–16.
133. Minton K. Cell cycle inhibitors boost tumour immunogenicity. *Nat Rev Immunol.* 2017 Sep;17(9):529–529.
134. Zhang H, Pandey S, Travers M, Sun H, Morton G, Madzo J, Chung W, Khowsathit J, Perez-Leal O, Barrero CA, Merali C, Okamoto Y, Sato T, Pan J, Garriga J, Bhanu NV, Simithy J, Patel B, Huang J, Raynal NJM, Garcia BA, Jacobson MA, Kadoch C, Merali S, Zhang Y, Childers W, Abou-Gharbia M, Karanicolos J, Baylin SB, Zahnow CA, Jelinek J, Graña X, Issa JPI. Targeting CDK9 Reactivates Epigenetically Silenced Genes in Cancer. *Cell.* 2018 Nov 15;175(5):1244–1258.e26.
135. Ribas A, Hu-Lieskovan S. What does PD-L1 positive or negative mean? *J Exp Med.* 2016 Dec 12;213(13):2835–40.
136. Yi M, Niu M, Xu L, Luo S, Wu K. Regulation of PD-L1 expression in the tumor microenvironment. *J Hematol Oncol/J Hematol Oncol.* 2021 Jan 7;14(1):10.
137. Teng MWL, Ngiow SF, Ribas A, Smyth MJ. Classifying cancers based on T cell infiltration and PD-L1. *Cancer Res.* 2015 Jun 1;75(11):2139–45.
138. Bezabeh T, Mowat MRA, Jarolim L, Greenberg AH, Smith ICP. Detection of drug-induced apoptosis and necrosis in human cervical carcinoma cells using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Cell Death Differ.* 2001 Mar;8(3):219–24.
139. Chung C. Predictive and prognostic biomarkers with therapeutic targets in colorectal cancer: A 2021 update on current development, evidence, and recommendation. *J Oncol Pharm Pract Off Publ Int Soc Oncol Pharm Pract.* 2022 Jun;28(4):850–69.
140. Jo WS, Carethers JM. Chemotherapeutic implications in microsatellite unstable colorectal cancer. *Cancer Biomark Sect Dis Markers.* 2006;2(1–2):51–60.
141. Liu Z gang, Jiao D. Necroptosis, tumor necrosis and tumorigenesis. *Cell Stress.* 4(1):1–8.
142. Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, Piacentini M, Nagata S, Melino G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.* 2005 Nov 1;12(2):1463–7.

143. Ghia P, Scarfò L, Perez S, Pathiraja K, Derosier M, Small K, McCrary Sisk C, Patton N. Efficacy and safety of dinaciclib vs ofatumumab in patients with relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2017 Mar 30;129(13):1876–8.
144. Buzzetti M, Morlando S, Solomos D, Mehmood A, Cox AWI, Chiesa M, D'Alessandra Y, Garofalo M, Topham CH, Di Leva G. Pre-therapeutic efficacy of the CDK inhibitor dinaciclib in medulloblastoma cells. *Sci Rep*. 2021 Mar 8;11:5374.
145. Tee AE, Ciampa OC, Wong M, Fletcher JI, Kamili A, Chen J, Ho N, Sun Y, Carter DR, Cheung BB, Marshall GM, Liu PY, Liu T. Combination therapy with the CDK7 inhibitor and the tyrosine kinase inhibitor exerts synergistic anticancer effects against MYCN-amplified neuroblastoma. *Int J Cancer*. 2020;147(7):1928–38.
146. Xie G, Zhu A, Gu X. Converged DNA Damage Response Renders Human Hepatocellular Carcinoma Sensitive to CDK7 Inhibition. *Cancers*. 2022 Mar 28;14(7):1714.
147. Abudurehman T, Xia J, Li MH, Zhou H, Zheng WW, Zhou N, Shi RY, Zhu JM, Yang LT, Chen L, Zheng L, Xue K, Qing K, Duan CW. CDK7 Inhibitor THZ1 Induces the Cell Apoptosis of B-Cell Acute Lymphocytic Leukemia by Perturbing Cellular Metabolism. *Front Oncol*. 2021;11:663360.
148. Juric V, Hudson L, Fay J, Richards CE, Jahns H, Verreault M, Bielle F, Idbaih A, Lamfers MLM, Hopkins AM, Rehm M, Murphy BM. Transcriptional CDK inhibitors, CYC065 and THZ1 promote Bim-dependent apoptosis in primary and recurrent GBM through cell cycle arrest and Mcl-1 downregulation. *Cell Death Dis*. 2021 Aug 3;12(8):763.
149. Riess C, Schoenwaelder N, Salewski I, Strüder D, Classen CF, Große-Thie C, Junghanss C, Maletzki C. Cyclin-dependent kinase inhibitors in head and neck cancer and glioblastoma—backbone or add-on in immune-oncology? *Cancer Metastasis Rev*. 2021 Mar 1;40:1–19.
150. Hoodless LJ, Lucas CD, Duffin R, Denvir MA, Haslett C, Tucker CS, Rossi AG. Genetic and pharmacological inhibition of CDK9 drives neutrophil apoptosis to resolve inflammation in zebrafish in vivo. *Sci Rep*. 2016 Nov 11;5:36980.
151. Wang K, Hampson P, Hazeldine J, Krystof V, Strnad M, Pechan P, M J. Cyclin-Dependent Kinase 9 Activity Regulates Neutrophil Spontaneous Apoptosis. *PLOS ONE*. 2012 Jan 19;7(1):e30128.
152. Riess C, Koczan D, Schneider B, Linke C, Del Moral K, Classen CF, Maletzki C. Cyclin-dependent kinase inhibitors exert distinct effects on patient-derived 2D and 3D glioblastoma cell culture models. *Cell Death Discov*. 2021 Mar 15;7(1):54.
153. Richter A, Schoenwaelder N, Sender S, Junghanss C, Maletzki C. Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors in Hematological Malignancies—Current Understanding, (Pre-)Clinical Application and Promising Approaches. *Cancers*. 2021 May 20;13(10):2497.
154. Liu Y, Zhao R, Fang S, Li Q, Jin Y, Liu B. Abemaciclib sensitizes HPV-negative cervical cancer to chemotherapy via specifically suppressing CDK4/6-Rb-E2F and mTOR pathways. *Fundam Clin Pharmacol*. 2021 Feb;35(1):156–64.

155. Zhou Y, Li Y, Shen J, Li J, Li X. Abemaciclib induces apoptosis in cardiomyocytes by activating the Hippo signaling pathway. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2020 Aug 5;52(8):875–82.
156. Abuhammad S, Cullinane C, Martin C, Bacolas Z, Ward T, Chen H, Slater A, Ardley K, Kirby L, Chan K, Brajanovski N, Smith L, Rao A, Lelliott E, Kleinschmidt M, Vergara I, Papenfuss A, Lau P, Gosh P, Sheppard K. Regulation of PRMT5–MDM4 axis is critical in the response to CDK4/6 inhibitors in melanoma. *Proc Natl Acad Sci.* 2019 Aug 22;116.
157. Wang B, Brandenburg S, Hernandez-Segura A, Vliet T van, Jongbloed EM, Wilting SM, Ohtani N, Jager A, Demaria M. Pharmacological CDK4/6 inhibition unravels a p53-induced secretory phenotype in senescent cells [Internet]. *bioRxiv*; 2020 [cited 2022 May 10]. p. 2020.06.05.135715. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.06.05.135715v2>
158. Wang B, Varela-Eirin M, Brandenburg SM, Hernandez-Segura A, van Vliet T, Jongbloed EM, Wilting SM, Ohtani N, Jager A, Demaria M. Pharmacological CDK4/6 inhibition reveals a p53-dependent senescent state with restricted toxicity. *EMBO J.* 2022 Mar 15;41(6):e108946.
159. Pucci B, Kasten M, Giordano A. Cell Cycle and Apoptosis. *Neoplasia N Y N.* 2000 Jul;2(4):291–9.
160. Torres-Guzmán R, Calsina B, Hermoso A, Baquero C, Alvarez B, Amat Rodrigo J, McNulty A, Gong X, Boehnke K, Du J, Dios A, Beckmann R, Buchanan S, Lallena M. Preclinical characterization of abemaciclib in hormone receptor positive breast cancer. *Oncotarget.* 2017 May 10;8.
161. Amaravadi RK, Thompson CB. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2007 Dec 15;13(24):7271–9.
162. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, Castedo M, Mignot G, Panaretakis T, Casares N, Métivier D, Larochette N, van Endert P, Ciccocanti F, Piacentini M, Zitvogel L, Kroemer G. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med.* 2007 Jan;13(1):54–61.
163. Zamanian M, Veerakumarasivam A, Abdullah S, Rosli R. Calreticulin and Cancer. *Pathol Oncol Res.* 2013 Apr;19(2):149–54.
164. Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2012 Dec;12(12):860–75.
165. Pitt JM, Kroemer G, Zitvogel L. Immunogenic and Non-immunogenic Cell Death in the Tumor Microenvironment. In: Kalinski P, editor. *Tumor Immune Microenvironment in Cancer Progression and Cancer Therapy* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017 [cited 2021 Dec 14]. p. 65–79. (Advances in Experimental Medicine and Biology). Available from: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-67577-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-67577-0_5)

166. Peng RQ, Chen YB, Ding Y, Zhang R, Zhang X, Yu XJ, Zhou ZW, Zeng YX, Zhang XS. Expression of calreticulin is associated with infiltration of T-cells in stage IIIB colon cancer. *World J Gastroenterol WJG*. 2010 May 21;16(19):2428–34.
167. Liu P, Zhao L, Loos F, Marty C, Xie W, Martins I, Lachkar S, Qu B, Waeckel-Énée E, Plo I, Vainchenker W, Perez F, Rodriguez D, López-Otin C, Endert P van, Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. Immunosuppression by Mutated Calreticulin Released from Malignant Cells. *Mol Cell*. 2020 Feb 20;77(4):748-760.e9.
168. Frank DA. Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitors: Is a Noncanonical Substrate the Key Target? *Cancer Res*. 2022 Apr 1;82(7):1170–1.
169. Phillips DC, Jin S, Gregory GP, Zhang Q, Xue J, Zhao X, Chen J, Tong Y, Zhang H, Smith M, Tahir SK, Clark RF, Penning TD, Devlin JR, Shortt J, Hsi ED, Albert DH, Konopleva M, Johnstone RW, Levenson JD, Souers AJ. A novel CDK9 inhibitor increases the efficacy of venetoclax (ABT-199) in multiple models of hematologic malignancies. *Leukemia*. 2020 Jun;34(6):1646–57.
170. Su H, Chang J, Xu M, Sun R, Wang J. CDK6 overexpression resulted from microRNA-320d downregulation promotes cell proliferation in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncol Rep*. 2019 Jul 1;42(1):321–7.
171. Chilosi M, Doglioni C, Yan Z, Lestani M, Menestrina F, Sorio C, Benedetti A, Vinante F, Pizzolo G, Inghirami G. Differential expression of cyclin-dependent kinase 6 in cortical thymocytes and T-cell lymphoblastic lymphoma/leukemia. *Am J Pathol*. 1998 Jan;152(1):209–17.
172. Nagel S, Leich E, Quentmeier H, Meyer C, Kaufmann M, Drexler HG, Zettl A, Rosenwald A, MacLeod R a. F. Amplification at 7q22 targets cyclin-dependent kinase 6 in T-cell lymphoma. *Leukemia*. 2008 Feb;22(2):387–92.
173. Binder H, Hopp L, Schweiger MR, Hoffmann S, Jühling F, Kerick M, Timmermann B, Siebert S, Grimm C, Nersisyan L, Arakelyan A, Herberg M, Buske P, Loeffler-Wirth H, Rosolowski M, Engel C, Przybilla J, Peifer M, Friedrichs N, Moeslein G, Odenthal M, Hussong M, Peters S, Holzapfel S, Nattermann J, Hueneburg R, Schmiegel W, Royer-Pokora B, Aretz S, Kloth M, Kloor M, Buettner R, Galle J, Loeffler M. Genomic and transcriptomic heterogeneity of colorectal tumours arising in Lynch syndrome. *J Pathol*. 2017;243(2):242–54.
174. Gladbach YS, Wiegele L, Hamed M, Merckenschlager AM, Fuellen G, Junghanss C, Maletzki C. Unraveling the heterogeneous mutational signature of spontaneously developing tumors in MLH1<sup>-/-</sup> mice [Internet]. *bioRxiv*; 2019 [cited 2022 Feb 20]. p. 725929. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/725929v1>
175. 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.
176. Rittberg R, Harlos C, Rothenmund H, Das A, Tabori U, Sinha N, Singh H, Chodirker B, Kim CA. Immune Checkpoint Inhibition as Primary Adjuvant Therapy for an IDH1-Mutant Anaplastic Astrocytoma in a Patient with CMMRD: A Case Report—Usage of Immune Checkpoint Inhibition in CMMRD. *Curr Oncol*. 2021 Feb 1;28(1):757–66.

177. Han S, Liu Y, Cai SJ, Qian M, Ding J, Larion M, Gilbert MR, Yang C. IDH mutation in glioma: molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *Br J Cancer*. 2020 May;122(11):1580–9.
178. Suwala AK, Stichel D, Schrimpf D, Kloor M, Wefers AK, Reinhardt A, Maas SLN, Kratz CP, Schweizer L, Hasselblatt M, Snuderl M, Abedalthagafi MSJ, Abdullaev Z, Monoranu CM, Bergmann M, Pekrun A, Freyschlag C, Aronica E, Kramm CM, Hinz F, Sievers P, Korshunov A, Kool M, Pfister SM, Sturm D, Jones DTW, Wick W, Unterberg A, Hartmann C, Dodgshun A, Tabori U, Wesseling P, Sahm F, von Deimling A, Reuss DE. Primary mismatch repair deficient IDH-mutant astrocytoma (PMMRDIA) is a distinct type with a poor prognosis. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2021 Jan 1;141(1):85–100.
179. Peng M, Hu Y, Song W, Duan S, Xu Q, Ding Y, Geng J, Zhou J. MIER3 suppresses colorectal cancer progression by down-regulating Sp1, inhibiting epithelial-mesenchymal transition. *Sci Rep*. 2017 Sep 8;7(1):11000.
180. Raimondi L, Di Benedetto L, Naso G, Raimondi FM, Di Rocco A, Giacconi L, Lazzeroni R, Spinelli GP. Resistance to CDK4/6 inhibitors (CDK4/6i): The clinical usefulness of liquid biopsy in metastatic breast cancer (mBC). *J Clin Oncol*. 2021 May 20;39(15\_suppl):1053–1053.
181. Raimondi L, Pietranera M, Spinelli GP. 335P Resistance to CDK4/6 inhibitors: Clinical practice use of liquid biopsy to identify KRAS-mutations in ctDNA and overexpression of CDK9 in plasma derived exosomes. *Ann Oncol*. 2020 Sep 1;31:S380.
182. Wander SA, Cohen O, Gong X, Johnson GN, Buendia-Buendia JE, Lloyd MR, Kim D, Luo F, Mao P, Helvie K, Kowalski KJ, Nayar U, Waks AG, Parsons SH, Martinez R, Litchfield LM, Ye XS, Yu C, Jansen VM, Stille JR, Smith PS, Oakley GJ, Chu QS, Batist G, Hughes ME, Kremer JD, Garraway LA, Winer EP, Tolaney SM, Lin NU, Buchanan SG, Wagle N. The genomic landscape of intrinsic and acquired resistance to cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors in patients with hormone receptor positive metastatic breast cancer. *Cancer Discov*. 2020 Aug;10(8):1174–93.
183. Raimondi L, Raimondi FM, Pietranera M, Di Rocco A, Di Benedetto L, Miele E, Lazzeroni R, Cimino G, Spinelli GP. Assessment of Resistance Mechanisms and Clinical Implications in Patients with KRAS Mutated-Metastatic Breast Cancer and Resistance to CDK4/6 Inhibitors. *Cancers*. 2021 Apr 16;13(8):1928.
184. Álvarez-Fernández M, Malumbres M. Mechanisms of Sensitivity and Resistance to CDK4/6 Inhibition. *Cancer Cell*. 2020 Apr;37(4):514–29.
185. Sherr CJ. Acquired palbociclib resistance in KRAS-mutant lung cancer. *Oncotarget*. 2018 Aug 28;9(67):32734–5.
186. Haines E, Chen T, Kommajosyula N, Chen Z, Herter-Sprue GS, Cornell L, Wong KK, Shapiro GI. Palbociclib resistance confers dependence on an FGFR-MAP kinase-mTOR-driven pathway in KRAS-mutant non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2018 Aug 3;9(60):31572–89.
187. Gelbert LM, Cai S, Lin X, Sanchez-Martinez C, del Prado M, Lallena MJ, Torres R, Ajamie RT, Wishart GN, Flack RS, Neubauer BL, Young J, Chan EM, Iversen P,

- Cronier D, Kreklau E, de Dios A. Preclinical characterization of the CDK4/6 inhibitor LY2835219: in-vivo cell cycle-dependent/independent anti-tumor activities alone/in combination with gemcitabine. *Invest New Drugs*. 2014;32(5):825–37.
188. Liang H, Xu Y, Chen M, Zhong W, Wang M, Zhao J. Patterns of response in metastatic NSCLC during PD-1 or PD-L1 inhibitor therapy: Comparison of the RECIST 1.1 and iRECIST criteria. *Thorac Cancer*. 2020 Apr;11(4):1068–75.
189. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, Verweij J, Van Glabbeke M, van Oosterom AT, Christian MC, Gwyther SG. New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2000 Feb 2;92(3):205–16.
190. Di Giacomo AM, Danielli R, Guidoboni M, Calabrò L, Carlucci D, Miracco C, Volterrani L, Mazzei MA, Biagioli M, Altomonte M, Maio M. Therapeutic efficacy of ipilimumab, an anti-CTLA-4 monoclonal antibody, in patients with metastatic melanoma unresponsive to prior systemic treatments: clinical and immunological evidence from three patient cases. *Cancer Immunol Immunother*. 2009 Aug 1;58(8):1297–306.
191. Champiat S, Dercle L, Ammari S, Massard C, Hollebecque A, Postel-Vinay S, Chaput N, Eggermont A, Marabelle A, Soria JC, Féré C. Hyperprogressive Disease Is a New Pattern of Progression in Cancer Patients Treated by Anti-PD-1/PD-L1. *Clin Cancer Res*. 2017 Apr 13;23(8):1920–8.
192. Wolchok JD, Hoos A, O'Day S, Weber JS, Hamid O, Lebbé C, Maio M, Binder M, Bohnsack O, Nichol G, Humphrey R, Hodi FS. Guidelines for the Evaluation of Immune Therapy Activity in Solid Tumors: Immune-Related Response Criteria. *Clin Cancer Res*. 2009 Nov 30;15(23):7412–20.
193. Hoos A, Parmiani G, Hege K, Sznol M, Loibner H, Eggermont A, Urba W, Blumenstein B, Sacks N, Keilholz U, Nichol G, Group (CVCTWG) for the CVCTW. A Clinical Development Paradigm for Cancer Vaccines and Related Biologics. *J Immunother*. 2007 Jan;30(1):1–15.
194. Perlstein D, Shlagman O, Kogan Y, Halevi-Tobias K, Yakobson A, Lazarev I, Agur Z. Personal response to immune checkpoint inhibitors of patients with advanced melanoma explained by a computational model of cellular immunity, tumor growth, and drug. *PLoS ONE*. 2019 Dec 26;14(12):e0226869.
195. Rocha P, Hardy-Werbin M, Naranjo D, Taus Á, Rodrigo M, Zuccarino F, Roth R, Wood O, Ottensmeier CH, Arriola E. CD103+CD8+ Lymphocytes Characterize the Immune Infiltration in a Case With Pseudoprogression in Squamous NSCLC. *J Thorac Oncol*. 2018 Oct 1;13(10):e193–6.
196. Won SE, Park HJ, Byun S, Pyo J, Kim JH, Choi CM, Lee JC, Lee DH, Kim SW, Yoon S, Kim KW. Impact of pseudoprogression and treatment beyond progression on outcome in patients with non-small cell lung cancer treated with immune checkpoint inhibitors. *Oncoimmunology*. 2020 Jun 19;9(1):1776058.
197. Johnston S, Martin M, Di Leo A, Im SA, Awada A, Forrester T, Frenzel M, Hardebeck MC, Cox J, Barriga S, Toi M, Iwata H, Goetz MP. MONARCH 3 final PFS: a

- randomized study of abemaciclib as initial therapy for advanced breast cancer. *Npj Breast Cancer*. 2019 Jan 17;5(1):1–8.
198. Matsushita K, Hagihara K, Motoki Y, Sakisaka H, Akiyama Y, Nakaguchi K, Doi S. [Locally Advanced Breast Cancer Successfully Treated with Abemaciclib and Fulvestrant-A Case Report]. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2020 Dec;47(13):2165–7.
199. Dickler MN, Tolaney SM, Rugo HS, Cortés J, Diéras V, Patt D, Wildiers H, Hudis CA, O’Shaughnessy J, Zamora E, Yardley DA, Frenzel M, Koustenis A, Baselga J. MONARCH 1, A Phase II Study of Abemaciclib, a CDK4 and CDK6 Inhibitor, as a Single Agent, in Patients with Refractory HR+/HER2– Metastatic Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. 2017 Aug 31;23(17):5218–24.
200. Zhang J, Yang N, Ji D, Shen W, Li W, Han R, Wang N, Tao H, Chapman SC, Sykes AK, Zhang W, Hu X. A Randomized Phase I Study of Abemaciclib in Chinese Patients with Advanced and/or Metastatic Cancers. *Target Oncol*. 2021 Mar;16(2):177–87.
201. Tolaney SM, Beeram M, Beck JT, Conlin A, Dees EC, Puhalla SL, Rexer BN, Burris HA, Jhaveri K, Helsten T, Becerra C, Kalinsky K, Moore KN, Manuel AM, Lithio A, Price GL, Chapman SC, Litchfield LM, Goetz MP. Abemaciclib in Combination With Endocrine Therapy for Patients With Hormone Receptor-Positive, HER2-Negative Metastatic Breast Cancer: A Phase 1b Study. *Front Oncol*. 2021;11:810023.
202. Ahmed M, von Itzstein MS, Sheffield T, Khan S, Fattah F, Park JY, Popat V, Saltarski JM, Gloria-McCutchen Y, Hsiehchen D, Ostmeier J, Khan SA, Sultana N, Xie Y, Li QZ, Wakeland EK, Gerber DE. Association between body mass index, dosing strategy, and efficacy of immune checkpoint inhibitors. *J Immunother Cancer*. 2021 Jun 14;9(6):e002349.
203. Wang H, Zhou Y, Zhang Y, Fang S, Zhang M, Li H, Xu F, Liu L, Liu J, Zhao Q, Wang F. Subtyping of microsatellite stability colorectal cancer reveals guanylate binding protein 2 (GBP2) as a potential immunotherapeutic target. *J Immunother Cancer*. 2022 Apr;10(4):e004302.
204. Lechner MG, Karimi SS, Barry-Holson K, Angell TE, Murphy KA, Church CH, Ohlfest JR, Hu P, Epstein AL. Immunogenicity of murine solid tumor models as a defining feature of in vivo behavior and response to immunotherapy. *J Immunother Hagerstown Md 1997*. 2013;36(9):477–89.
205. Castle JC, Loewer M, Boegel S, de Graaf J, Bender C, Tadmor AD, Boisguerin V, Bukur T, Sorn P, Paret C, Diken M, Kreiter S, Türeci Ö, Sahin U. Immunomic, genomic and transcriptomic characterization of CT26 colorectal carcinoma. *BMC Genomics*. 2014 Mar 13;15(1):190.
206. Daino K, Ishikawa A, Suga T, Amasaki Y, Kodama Y, Shang Y, Hirano-Sakairi S, Nishimura M, Nakata A, Yoshida M, Imai T, Shimada Y, Kakinuma S. Mutational landscape of T-cell lymphoma in mice lacking the DNA mismatch repair gene *Mlh1*: no synergism with ionizing radiation. *Carcinogenesis*. 2019 Apr 29;40(2):216–24.
207. Gladbach YS, Wiegele L, Hamed M, Merckenschläger AM, Fuellen G, Junghanss C, Maletzki C. Unraveling the Heterogeneous Mutational Signature of Spontaneously Developing Tumors in *MLH1*–/– Mice. *Cancers*. 2019 Oct 2;11(10):1485.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

---

208. Maletzki C, Wiegele L, Nassar I, Stenzel J, Junghanss C. Chemo-immunotherapy improves long-term survival in a preclinical model of MMR-D-related cancer. *J Immunother Cancer*. 2019 Jan 10;7:8.
209. Maletzki C, Gladbach YS, Hamed M, Fuellen G, Semmler ML, Stenzel J, Linnebacher M. Cellular vaccination of MLH1<sup>-/-</sup> mice – an immunotherapeutic proof of concept study. *Oncoimmunology*. 2017 Dec 14;7(3):e1408748.
210. Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Immunol Res*. 2017 Jan;5(1):3–8.
211. Li T, Liu T, Zhu W, Xie S, Zhao Z, Feng B, Guo H, Yang R. Targeting MDSC for Immune-Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy: Current Progress and New Prospects. *Clin Med Insights Oncol*. 2021 Aug 5;15:11795549211035540.
212. Zhang T, Zhang C, Fu Z, Gao Q. Immune Modulatory Effects of Molecularly Targeted Therapy and Its Repurposed Usage in Cancer Immunotherapy. *Pharmaceutics*. 2022 Aug 24;14(9):1768.
213. Saleh R, Elkord E. Treg-mediated acquired resistance to immune checkpoint inhibitors. *Cancer Lett*. 2019 Aug 10;457:168–79.
214. Sasidharan Nair V, Elkord E. Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy: a focus on T-regulatory cells. *Immunol Cell Biol*. 2018;96(1):21–33.
215. Deng J, Wang ES, Jenkins RW, Li S, Dries R, Yates K, Chhabra S, Huang W, Liu H, Aref AR, Ivanova E, Paweletz CP, Bowden M, Zhou CW, Herter-Sprie GS, Sorrentino JA, Bisi JE, Lizotte PH, Merlino AA, Quinn MM, Bufe LE, Yang A, Zhang Y, Zhang H, Gao P, Chen T, Cavanaugh ME, Rode AJ, Haines E, Roberts PJ, Strum JC, Richards WG, Lorch JH, Parangi S, Gunda V, Boland GM, Bueno R, Palakurthi S, Freeman GJ, Ritz J, Haining WN, Sharpless NE, Arthanari H, Shapiro GI, Barbie DA, Gray NS, Wong KK. CDK4/6 Inhibition Augments Anti-Tumor Immunity by Enhancing T Cell Activation. *Cancer Discov*. 2018 Feb;8(2):216–33.
216. Dowless M, Lowery CD, Shackelford T, Renschler M, Stephens J, Flack R, Blosser W, Gupta S, Stewart J, Webster Y, Dempsey J, VanWye AB, Ebert P, Iversen P, Olsen JB, Gong X, Buchanan S, Houghton P, Stancato L. Abemaciclib Is Active in Preclinical Models of Ewing Sarcoma via Multipronged Regulation of Cell Cycle, DNA Methylation, and Interferon Pathway Signaling. *Clin Cancer Res*. 2018 Dec 3;24(23):6028–39.
217. Yoshimoto T. The Hunt for the Source of Primary Interleukin-4: How We Discovered That Natural Killer T Cells and Basophils Determine T Helper Type 2 Cell Differentiation In Vivo. *Front Immunol*. 2018 Apr 23;9:716.
218. Gilmour J, Lavender P. Control of IL-4 expression in T helper 1 and 2 cells. *Immunology*. 2008 Aug;124(4):437–44.
219. Zhu Y, Zhang L, Lu Q, Gao Y, Cai Y, Sui A, Su T, Shen X, Xie B. Identification of different macrophage subpopulations with distinct activities in a mouse model of oxygen-induced retinopathy. *Int J Mol Med*. 2017 Aug;40(2):281–92.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

---

220. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 2002 Nov 1;23(11):549–55.
221. Yang Y, Liu F, Tang M, Yuan M, Hu A, Zhan Z, Li Z, Li J, Ding X, Lu L. Macrophage polarization in experimental and clinical choroidal neovascularization. *Sci Rep.* 2016 Aug 4;6:30933.
222. Camell C, Smith C. Dietary Oleic Acid Increases M2 Macrophages in the Mesenteric Adipose Tissue. *PLoS One.* 2013 Sep 30;8:e75147.
223. Takaoka A, Tamura T, Taniguchi T. Interferon regulatory factor family of transcription factors and regulation of oncogenesis. *Cancer Sci.* 2008;99(3):467–78.
224. Barnes BJ, Kellum MJ, Pinder KE, Frisancho JA, Pitha PM. Interferon Regulatory Factor 5, a Novel Mediator of Cell Cycle Arrest and Cell Death1. *Cancer Res.* 2003 Oct 14;63(19):6424–31.
225. Yanai H, Negishi H, Taniguchi T. The IRF family of transcription factors. *Oncoimmunology.* 2012 Nov 1;1(8):1376–86.
226. Yanai H, Chen H min, Inuzuka T, Kondo S, Mak TW, Takaoka A, Honda K, Taniguchi T. Role of IFN regulatory factor 5 transcription factor in antiviral immunity and tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci.* 2007 Feb 27;104(9):3402–7.
227. Garaud S, Willard-Gallo K. IRF5: a rheostat for tumor-infiltrating lymphocyte trafficking in breast cancer? *Immunol Cell Biol.* 2015;93(5):425–6.
228. Bi X, Hameed M, Mirani N, Pimenta EM, Anari J, Barnes BJ. Loss of interferon regulatory factor 5 (IRF5) expression in human ductal carcinoma correlates with disease stage and contributes to metastasis. *Breast Cancer Res.* 2011 Nov 4;13(6):R111.
229. Yan J, Pandey SP, Barnes BJ, Turner JR, Abraham C. T Cell-Intrinsic IRF5 Regulates T Cell Signaling, Migration, and Differentiation and Promotes Intestinal Inflammation. *Cell Rep.* 2020 Jun 30;31(13):107820.
230. Krausgruber T, Blazek K, Smallie T, Alzabin S, Lockstone H, Sahgal N, Hussell T, Feldmann M, Udalova IA. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat Immunol.* 2011 Mar;12(3):231–8.
231. Schneider A, Weier M, Herderschee J, Perreau M, Calandra T, Roger T, Giannoni E. IRF5 Is a Key Regulator of Macrophage Response to Lipopolysaccharide in Newborns. *Front Immunol.* 2018;9:1597.
232. Cousins EM, Goldfarb D, Yan F, Roques J, Darr D, Johnson GL, Major MB. Competitive Kinase Enrichment Proteomics Reveals that Abemaciclib Inhibits GSK3 $\beta$  and Activates WNT Signaling. *Mol Cancer Res MCR.* 2018 Feb;16(2):333–44.
233. Stamos JL, Weis WI. The  $\beta$ -catenin destruction complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013 Jan 1;5(1):a007898.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

---

234. Jeong WJ, Ro EJ, Choi KY. Interaction between Wnt/ $\beta$ -catenin and RAS-ERK pathways and an anti-cancer strategy via degradations of  $\beta$ -catenin and RAS by targeting the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Npj Precis Oncol.* 2018 Feb 20;2(1):1–10.
235. Schatoff EM, Leach BI, Dow LE. Wnt Signaling and Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep.* 2017 Apr;13(2):101–10.
236. Shimizu Y, Ikeda S, Fujimori M, Kodama S, Nakahara M, Okajima M, Asahara T. Frequent alterations in the Wnt signaling pathway in colorectal cancer with microsatellite instability. *Genes Chromosomes Cancer.* 2002;33(1):73–81.
237. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 2012;487(7407):330–7.
238. Madden SK, de Araujo AD, Gerhardt M, Fairlie DP, Mason JM. Taking the Myc out of cancer: toward therapeutic strategies to directly inhibit c-Myc. *Mol Cancer.* 2021 Jan 4;20(1):3.
239. Yang VW. APC as a Checkpoint Gene: The Beginning or the End? *Gastroenterology.* 2002 Sep;123(3):935–9.
240. Perez-Roger I, Kim SH, Griffiths B, Sewing A, Land H. Cyclins D1 and D2 mediate Myc-induced proliferation via sequestration of p27Kip1 and p21Cip1. *EMBO J.* 1999 Oct;18(19):5310–20.
241. Tamura RE, de Vasconcellos JF, Sarkar D, Libermann TA, Fisher PB, Zerbini LF. GADD45 proteins: central players in tumorigenesis. *Curr Mol Med.* 2012 Jun;12(5):634–51.
242. Marhin WW, Chen S, Facchini LM, Jr AJF, Penn LZ. Myc represses the growth arrest gene gadd45. *Oncogene.* 1997 Jun;14(23):2825–34.
243. McCubrey JA, Fitzgerald TL, Yang LV, Lertpiriyapong K, Steelman LS, Abrams SL, Montalto G, Cervello M, Neri LM, Cocco L, Martelli AM, Laidler P, Dulińska-Litewka J, Rakus D, Gizak A, Nicoletti F, Falzone L, Candido S, Libra M. Roles of GSK-3 and microRNAs on epithelial mesenchymal transition and cancer stem cells. *Oncotarget.* 2017 Feb 21;8(8):14221–50.
244. Ohteki T, Parsons M, Zakarian A, Jones RG, Nguyen LT, Woodgett JR, Ohashi PS. Negative Regulation of T Cell Proliferation and Interleukin 2 Production by the Serine Threonine Kinase Gsk-3. *J Exp Med.* 2000 Jul 3;192(1):99–104.
245. Huang GN, Huso DL, Bouyain S, Tu J, McCorkell KA, May MJ, Zhu Y, Lutz M, Collins S, Dehoff M, Kang S, Whartenby K, Powell J, Leahy D, Worley PF. NFAT Binding and Regulation of T Cell Activation by the Cytoplasmic Scaffolding Homer Proteins. *Science.* 2008 Jan 25;319(5862):476–81.
246. McMahon SB. MYC and the Control of Apoptosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014 Jul;4(7):a014407.
247. Hoffman B, Libermann DA. Apoptotic signaling by c-MYC. *Oncogene.* 2008 Oct;27(50):6462–72.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

---

248. García-Gutiérrez L, Delgado MD, León J. MYC Oncogene Contributions to Release of Cell Cycle Brakes. *Genes*. 2019 Mar 22;10(3):244.
249. Zindy F, Eischen CM, Randle DH, Kamijo T, Cleveland JL, Sherr CJ, Roussel MF. Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev*. 1998 Aug 1;12(15):2424–33.
250. Wagner AJ, Kokontis JM, Hay N. Myc-mediated apoptosis requires wild-type p53 in a manner independent of cell cycle arrest and the ability of p53 to induce p21waf1/cip1. *Genes Dev*. 1994 Jan 12;8(23):2817–30.
251. Hermeking H, Eick D. Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. *Science*. 1994 Sep 30;265(5181):2091–3.
252. Phesse TJ, Myant KB, Cole AM, Ridgway RA, Pearson H, Muncan V, van den Brink GR, Vousden KH, Sears R, Vassilev LT, Clarke AR, Sansom OJ. Endogenous c-Myc is essential for p53-induced apoptosis in response to DNA damage in vivo. *Cell Death Differ*. 2014 Jun;21(6):956–66.
253. Othman NS, Mohd Azman DK. Andrographolide Induces G2/M Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Glioblastoma DBTRG-05MG Cell Line via ERK1/2 /c-Myc/p53 Signaling Pathway. *Mol Basel Switz*. 2022 Oct 8;27(19):6686.
254. Crosstalk of the Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway in the Induction of Apoptosis on Cancer Cells. 2021. p. 871.
255. Murphy DJ, Junttila MR, Pouyet L, Kamezis A, Shchors K, Bui DA, Brown-Swigart L, Johnson L, Evan GI. Distinct thresholds govern Myc's biological output in vivo. *Cancer Cell*. 2008 Dec 9;14(6):447–57.
256. Boros K, Lacaud G, Kouskoff V. The transcription factor Mxd4 controls the proliferation of the first blood precursors at the onset of hematopoietic development in vitro. *Exp Hematol*. 2011 Nov 1;39(11):1090–100.
257. Coutier J, Auvré F, Lemaître G, Lataillade JJ, Deleuze JF, Roméo PH, Martin MT, Fortunel NO. MXD4/MAD4 Regulates Human Keratinocyte. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2022 Aug 22 [cited 2022 Dec 3];0(0). Available from: [https://www.jidonline.org/article/S0022-202X\(22\)01778-X/fulltext](https://www.jidonline.org/article/S0022-202X(22)01778-X/fulltext)
258. Hu CL, Chen BY, Li Z, Yang T, Xu CH, Yang R, Yu PC, Zhao J, Liu T, Liu N, Shan B, Zhang Q, Song J, Fei MY, Zong LJ, Zhang JY, Wu JC, Chen SB, Wang Y, Chang B, Hou D, Liu P, Jiang Y, Li X, Chen X, Deng CH, Ren YY, Wang R, Jin J, Xue K, Zhang Y, Du M, Shi J, Wu LY, Chang CK, Shen S, Chen Z, Chen SJ, Liu X, Sun XJ, Zheng M, Wang L. Targeting UHRF1-SAP30-MXD4 axis for leukemia initiating cell eradication in myeloid leukemia. *Cell Res*. 2022 Dec;32(12):1105–23.
259. Patnaik A, Yap TA, Chung HC, de Miguel MJ, Bang YJ, Lin CC, Su WC, Italiano A, Chow KH, Szpurka AM, Yu D, Zhao Y, Carlsen M, Schmidt S, Vangerow B, Gandhi L, Xu X, Bendell J. Safety and Clinical Activity of a New Anti-PD-L1 Antibody as Monotherapy or Combined with Targeted Therapy in Advanced Solid Tumors: The PACT Phase Ia/Ib Trial. *Clin Cancer Res*. 2021 Mar 1;27(5):1267–77.

260. Johnston SRD, Toi M, O'Shaughnessy J, Rastogi P, Campone M, Neven P, Huang CS, Huober J, Jaliffe GG, Cicin I, Tolaney SM, Goetz MP, Rugo HS, Senkus E, Testa L, Del Mastro L, Shimizu C, Wei R, Shahir A, Munoz M, San Antonio B, André V, Harbeck N, Martin M, monarchE Committee Members. Abemaciclib plus endocrine therapy for hormone receptor-positive, HER2-negative, node-positive, high-risk early breast cancer (monarchE): results from a preplanned interim analysis of a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2022 Dec 5;S1470-2045(22)00694-5.
261. Goetz MP, Toi M, Campone M, Sohn J, Paluch-Shimon S, Huober J, Park IH, Trédan O, Chen SC, Manso L, Freedman OC, Gamica Jaliffe G, Forrester T, Frenzel M, Barriga S, Smith IC, Bourayou N, Di Leo A. MONARCH 3: Abemaciclib As Initial Therapy for Advanced Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2017 Nov 10;35(32):3638–46.
262. Finnsdottir S, Sverrisdottir A, Björnsson ES. Hepatotoxicity associated with ribociclib among breast cancer patients. *Acta Oncol.* 2021 Feb 1;60(2):195–8.
263. Rugo HS, Kabos P, Beck JT, Jerusalem G, Wildiers H, Sevillano E, Paz-Ares L, Chisamore MJ, Chapman SC, Hossain AM, Chen Y, Tolaney SM. Abemaciclib in combination with pembrolizumab for HR+, HER2– metastatic breast cancer: Phase 1b study. *Npj Breast Cancer.* 2022 Nov 5;8(1):1–8.
264. Pujol JL, Vansteenkiste J, Paz-Ares Rodríguez L, Gregorc V, Mazieres J, Awad M, Jänne PA, Chisamore M, Hossain AM, Chen Y, Beck JT. Abemaciclib in Combination With Pembrolizumab for Stage IV KRAS-Mutant or Squamous NSCLC: A Phase 1b Study. *JTO Clin Res Rep.* 2021 Sep 25;2(11):100234.
265. Yuan Y, Lee J, Yost SE, Frankel PH, Ruel C, Egelston CA, Guo W, Padam S, Tang A, Martinez N, Schmolze D, Presant C, Ebrahimi B, Yeon C, Sedrak M, Patel N, Portnow J, Lee P, Mortimer J. Phase I/II Trial of Palbociclib, Pembrolizumab, and Letrozole in Patients with Hormone Receptor Positive Metastatic Breast Cancer. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2021 Sep;154:11–20.
266. Bristol-Myers Squibb. Randomized, Non-comparative Neoadjuvant Phase II Study in Patients With ER+/HER2- Breast Cancer  $\geq$  2 cm With Safety Run-in, Assessing Nivolumab + Palbociclib + Anastrozole [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2022 Jul [cited 2023 Feb 24]. Report No.: results/NCT04075604. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT04075604>
267. Scheidemann ER, Shajahan-Haq AN. Resistance to CDK4/6 Inhibitors in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2021 Nov 14;22(22):12292.
268. McCartney A, Migliaccio I, Bonechi M, Biagioni C, Romagnoli D, De Luca F, Galardi F, Risi E, De Santo I, Benelli M, Malorni L, Di Leo A. Mechanisms of Resistance to CDK4/6 Inhibitors: Potential Implications and Biomarkers for Clinical Practice. *Front Oncol.* 2019;9:666.
269. Li Z, Razavi P, Li Q, Toy W, Liu B, Ping C, Hsieh W, Sanchez-Vega F, Brown DN, Paula AFDC, Morris L, Selenica P, Eichenberger E, Shen R, Schultz N, Rosen N, Scaltriti M, Brogi E, Baselga J, Reis-Filho JS, Chandralapaty S. Loss of the FAT1 tumor suppressor promotes resistance to CDK4/6 inhibitors via the Hippo pathway. *Cancer Cell.* 2018 Dec 10;34(6):893-905.e8.

270. Portman N, Alexandrou S, Carson E, Wang S, Lim E, Caldon CE. Overcoming CDK4/6 inhibitor resistance in ER-positive breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2019 Jan 1;26(1):R15–30.
271. Adon T, Shanmugarajan D, Yogish Kumar H. CDK4/6 inhibitors: a brief overview and prospective research directions. *RSC Adv*. 2021;11(47):29227–46.
272. Pandey K, Park N, Park KS, Hur J, Cho YB, Kang M, An HJ, Kim S, Hwang S, Moon YW. Combined CDK2 and CDK4/6 Inhibition Overcomes Palbociclib Resistance in Breast Cancer by Enhancing Senescence. *Cancers*. 2020 Nov 29;12(12):3566.
273. Bolin S, Borgenvik A, Persson CU, Sundström A, Qi J, Bradner JE, Weiss WA, Cho YJ, Weishaupt H, Swartling FJ. Combined BET bromodomain and CDK2 inhibition in MYC-driven medulloblastoma. *Oncogene*. 2018;37(21):2850–62.
274. Wood L, Huang M, Zeki J, Gong M, Taylor J, Shimada H, Chiu B. Combining inhibitors of Brd4 and cyclin-dependent kinase can decrease tumor growth in neuroblastoma with MYCN amplification. *J Pediatr Surg*. 2021 Jul 1;56(7):1199–202.
275. Tong J, Tan X, Risnik D, Gao M, Song X, Ermine K, Shen L, Wang S, Yu J, Zhang L. BET protein degradation triggers DR5-mediated immunogenic cell death to suppress colorectal cancer and potentiate immune checkpoint blockade. *Oncogene*. 2021 Dec;40(48):6566–78.
276. Deep G, Agarwal R. New Combination Therapies with Cell Cycle Agents. *Curr Opin Investig Drugs Lond Engl* 2000. 2008 Jun;9(6):591–604.
277. Schulz D, Wetzel M, Eichberger J, Piendl G, Brockhoff G, Wege AK, Reichert TE, Ettl T, Bauer RJ. Differential Expression of PD-L1 during Cell Cycle Progression of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2021 Dec 3;22(23):13087.
278. Alagpulinsa DA, Ayyadevara S, Yaccoby S, Shmookler Reis RJ. A Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor, Dinaciclib, Impairs Homologous Recombination and Sensitizes Multiple Myeloma Cells to PARP Inhibition. *Mol Cancer Ther*. 2016 Feb 7;15(2):241–50.
279. Chen XX, Xie FF, Zhu XJ, Lin F, Pan SS, Gong LH, Qiu JG, Zhang WJ, Jiang QW, Mei XL, Xue YQ, Qin WM, Shi Z, Yan XJ. Cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib potently synergizes with cisplatin in preclinical models of ovarian cancer. *Oncotarget*. 2015 Mar 30;6(17):14926–39.
280. Lee JS, Yost SE, Li SM, Cui Y, Frankel PH, Yuan YC, Schmolze D, Egelston CA, Guo W, Murga M, Chang H, Bosserman L, Yuan Y. Genomic Markers of CDK 4/6 Inhibitor Resistance in Hormone Receptor Positive Metastatic Breast Cancer. *Cancers*. 2022 Jun 28;14(13):3159.
281. Andre F, Su F, Solovieff N, Arteaga CL, Hortobagyi GN, Chia SKL, Neven P, Bardia A, Tripathy D, Lu YS, Wang Y, Rodriguez-Lorenc K, Taran T, Babbar N, Slamon DJ. Pooled ctDNA analysis of the MONALEESA (ML) phase III advanced breast cancer (ABC) trials. *J Clin Oncol*. 2020 May 20;38(15\_suppl):1009–1009.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

---

282. Zhou B, Zhu W, Jiang X, Ren C. RASAL2 Plays Inconsistent Roles in Different Cancers. *Front Oncol*. 2019 Nov 13;9:1235.
283. Pan Y, Tong JHM, Lung RWM, Kang W, Kwan JSH, Chak WP, Tin KY, Chung LY, Wu F, Ng SSM, Mak TWC, Yu J, Lo KW, Chan AWH, To KF. RASAL2 promotes tumor progression through LATS2/YAP1 axis of hippo signaling pathway in colorectal cancer. *Mol Cancer*. 2018 Jul 23;17(1):102.
284. Zhang P, Liu L, Huang J, Shao L, Wang H, Xiong N, Wang T. Non-SMC condensin I complex, subunit D2 gene polymorphisms are associated with Parkinson's disease: a Han Chinese study. *Genome*. 2014 May;57(5):253–7.
285. Zhang Y, Liu F, Zhang C, Ren M, Kuang M, Xiao T, Di X, Feng L, Fu L, Cheng S. Non-SMC Condensin I Complex Subunit D2 Is a Prognostic Factor in Triple-Negative Breast Cancer for the Ability to Promote Cell Cycle and Enhance Invasion. *Am J Pathol*. 2020 Jan;190(1):37–47.
286. Li Z, Zheng Y, Wu Z, Zhuo T, Zhu Y, Dai L, Wang Y, Chen M. NCAPD2 is a novel marker for the poor prognosis of lung adenocarcinoma and is associated with immune infiltration and tumor mutational burden. *Medicine (Baltimore)*. 2023 Jan 20;102(3):e32686.
287. Rydell-Törmänen K, Johnson JR. The Applicability of Mouse Models to the Study of Human Disease. *Mouse Cell Cult*. 2018 Nov 9;1940:3–22.
288. Mestas J, Hughes CCW. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *J Immunol*. 2004 Mar 1;172(5):2731–8.
289. Murphy WJ. Being “penny-wise but pound foolish” in cancer immunotherapy research: the urgent need for mouse cancer models to reflect human modifying factors. *J Immunother Cancer*. 2016 Dec 20;4(1):88.
290. Dobson GP, Morris JL, Biros E, Letson HL. Specific Pathogen-Free Animals for Civilian and Military Trauma: a Cautionary Note in the Translation of New Drug Therapies. *Shock*. 2020 Aug;54(2):232.
291. Xu X, Lv J, Guo F, Li J, Jia Y, Jiang D, Wang N, Zhang C, Kong L, Liu Y, Zhang Y, Lv J, Li Z. Gut Microbiome Influences the Efficacy of PD-1 Antibody Immunotherapy on MSS-Type Colorectal Cancer via Metabolic Pathway. *Front Microbiol*. 2020;11:814.
292. Dobson GP, Letson HL, Biros E, Morris J. Specific pathogen-free (SPF) animal status as a variable in biomedical research: Have we come full circle? *EBioMedicine*. 2019 Feb 23;41:42–3.
293. Lee K, Tosti E, Edelman W. Mouse models of DNA mismatch repair in cancer research. *DNA Repair*. 2016 Feb;38:140–6.
294. Maletzki C, Beyrich F, Hühns M, Klar E, Linnebacher M. The mutational profile and infiltration pattern of murine MLH1<sup>-/-</sup> tumors: concurrences, disparities and cell line establishment for functional analysis. *Oncotarget*. 2016 Jul 18;7(33):53583–98.

295. Echterdiek F, Janikovits J, Staffa L, Müller M, Lahrmann B, Frühschütz M, Hartog B, Nelius N, Benner A, Tariverdian M, von Knebel Doeberitz M, Grabe N, Kloor M. Low density of FOXP3-positive T cells in normal colonic mucosa is related to the presence of beta2-microglobulin mutations in Lynch syndrome-associated colorectal cancer. *Oncoimmunology*. 2015 Nov 11;5(2):e1075692.
296. Lin R, Yellin MJ, Lowy I, Safferman A, Chin K, Ibrahim R. An analysis of the effectiveness of specific guidelines for the management of ipilimumab-mediated diarrhea/colitis: Prevention of gastrointestinal perforation and/or colectomy. *J Clin Oncol*. 2008 May 20;26(15\_suppl):9063–9063.

## 8. ANHANG

### 8.1. Anmerkung

In dieser Arbeit wird zur leichteren Verständlichkeit in der Regel das generische Maskulinum verwendet. Hiermit weise ich darauf hin, dass dabei auch feminine sowie non-binäre Personen gemeint sind.

### 8.2. Ergänzende Abbildungen

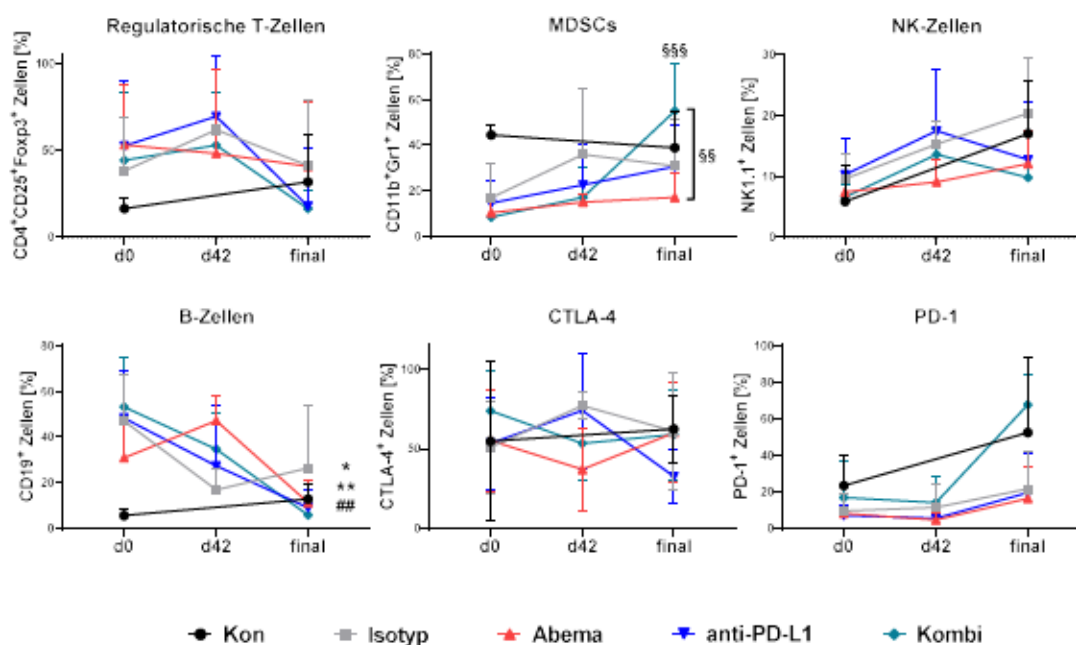


Abbildung 28 | Immunphänotypisierung des peripheren Blutes.

Routinemäßig sowie final entnommene Blutproben wurden phänotypisiert und durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt ist der prozentuale Anteil positiver Zellen. MW + Stabw; Kontrolle: n = 4 (Daten von d0 wurden durch historische Kontrolle ergänzt); Isotyp: n = 4-5; Abemaciclib: n = 7-8; anti-PD-L1: n = 7-8; Kombi: n = 6-7; \*p < 0,05 (Abemaciclib vs. d42); \*\*p < 0,01 (anti-PD-L1 vs. d0); ##p < 0,01 (Kombi vs. d0); §§p < 0,01 (Abemaciclib vs. Kombi); §§§p < 0,005 (Kombi vs. d0); One-way ANOVA (Tukeys post-hoc).

MDSCs: myeloide Suppressorzellen; d: Tag nach Therapiebeginn; NK: natürliche Killer

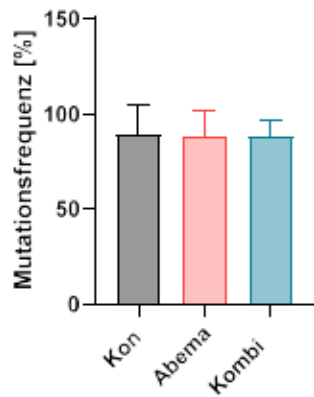


Abbildung 29 | Nicht-kodierende MS-Mutationsfrequenz von Tumoren.

Aus den Tumoren der *Mth1*<sup>-/-</sup> Mäuse wurde gDNA isoliert, das Genmaterial mittels PCR amplifiziert und einer Fragmentlängenanalyse unterzogen. Als Kontrolle diente die DNA einer Wildtyp-*Mth1*-Maus. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Mutationsfrequenzen. MW + Stabw; n = 2-4 Mäuse/Gruppe.

*ncMS*: nicht-kodierende Mikrosateliten

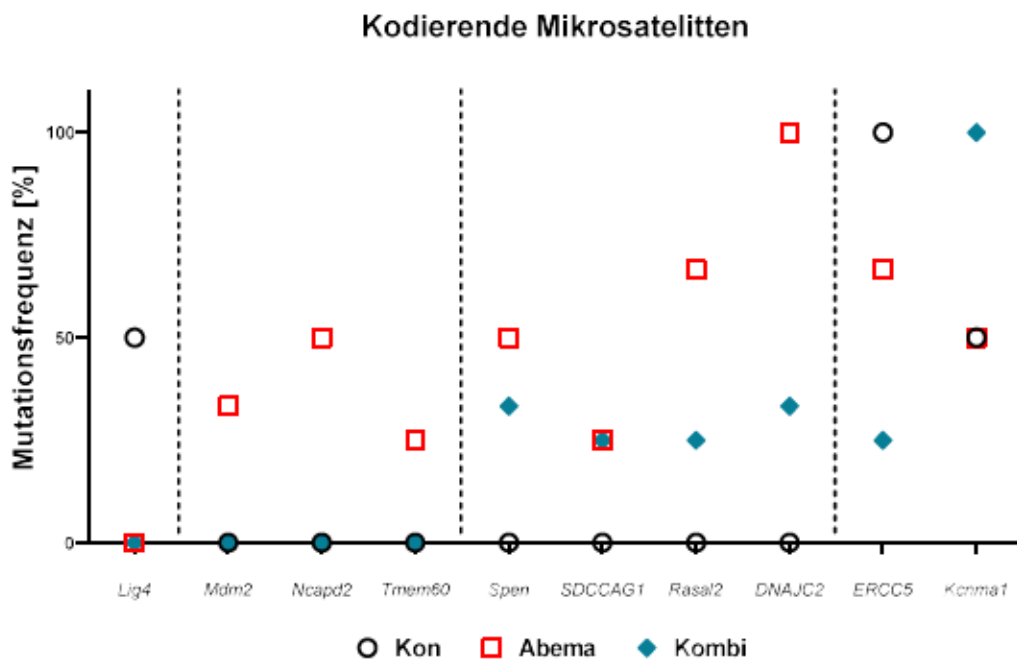


Abbildung 30 | Kodierende MS-Mutationsfrequenzen.

Aus den Tumoren der *Mth1*<sup>-/-</sup> Mäuse wurde gDNA isoliert, das Genmaterial mittels PCR amplifiziert und einer Fragmentlängenanalyse unterzogen. Als Kontrolle diente die DNA einer Wildtyp-*Mth1*-Maus. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Mutationsfrequenzen ausgewählter Marker. MW; n = 2-4 Mäuse/Gruppe.

*cMS*: kodierende Mikrosateliten

## 8. ANHANG

| Klinisches Modell   | Metrische & Parametrische Kriterien  | Score |
|---|--|-------|
| MLH1 <sup>+</sup> Modell  | Ohne klinischen Befund   | 0     |
| Definition der Tumorart: solid, autochthon, Wachstum ausschließlich lokal, keine Knochen- oder Fernmetastasierung | Verminderte Fellpflege; Fell struppig bzw. fällt aus   | 1     |
|   | verändertes (Sozial-) Verhalten (Teilnahmslosigkeit; geringe Interaktion mit Käfiggenossen)  | 1     |
|   | Gesteigerte Abwehrreaktion/Beißen/Lautäußerungen beim Ergreifen (z.B. zum Wiegen/Umsetzen)   | 1     |
|   | Gewichtsreduktion ≤10%   | 2     |
|   | Tumorgroße: ≤100 mm <sup>3</sup> (tl. PET/CT)  | 2     |
|   | Gewichtsreduktion ≥15%   | 3     |
|   | Urin u./o. Kot abweichend in Menge, Farbe und Konsistenz (starke Diarrhoe, Obstipation)/Anämie/beginnende Moribundität   | 3     |
|   | Rektale Blutung/Analprolaps/vorgewölbtes Abdomen (generalisierte Lymphome)/Beeinträchtigung der Atmung (nur bei Thymomen)  | 3     |
|   | Tumorgroße: ≥400 mm <sup>3</sup> (GIT) bzw. zunehmende Anreicherung (quantitativ und qualitativ) von 18F-FDG in Leber und Milz in Vergleich zum vorherigen Messwert (PET/CT)   | 3     |
|   | Gekrümmte Haltung, stark verändertes Sozialverhalten/Apathisches Verhalten, weiche Anzeichen für eine Schmerzsymptomatik darstellen (ggf. zunächst Analgetika, bei anhaltender Symptomatik (max. 24 h =Versuchsabbruch)) | 3     |

### Abbildung 31 | Score Sheet

Kriterien zur Einordnung des Krankheitszustandes der Mäuse. Bei einem Score von 3 erfolgte sofort der Versuchsabbruch durch Tötung. Bei 2 x Score 2 wurde engmaschiger visitiert (mindestens einmal täglich).

### 8.3. Antikörper

| Antigen     | Konjugat | Spezifität | Klon   | Hersteller  |
|-------------|----------|------------|--------|-------------|
| CD3e        | FITC     | mouse      | MEM-57 | ImmunoTools |
| CD11b       | FITC     | mouse      | M1     | ImmunoTools |
| IL17A       | FITC     | mouse      | 17F3   | BioLegend   |
| CD25        | FITC     | mouse      | PC61   | BioLegend   |
| CD69        | FITC     | mouse      | H1.2F3 | BioLegend   |
| CD200R      | FITC     | mouse      | OX-110 | BioLegend   |
| CD279 (PD1) | FITC     | mouse      | 4F12   | BioLegend   |
| g/d TCR     | FITC     | mouse      | B1     | ImmunoTools |
| CD4         | PE       | mouse      | GK1.5  | ImmunoTools |
| CD8a        | PE       | mouse      | RPA-T8 | ImmunoTools |
| CD62L       | PE       | mouse      | FMC46  | ImmunoTools |

## 8. ANHANG

|                    |                              |             |           |             |
|--------------------|------------------------------|-------------|-----------|-------------|
| CD152 (CTLA-4)     | PE                           | mouse       | UC10-4B9  | BioLegend   |
| CD266              | PE                           | mouse/human | ITEM-4    | BioLegend   |
| Gr-1               | PE                           | mouse       | RB6-8C5   | ImmunoTools |
| H-2Kb/H-2Db (MHCI) | PE                           | mouse       | 28-8-6    | BioLegend   |
| CD 274 (PD-L1)     | PE                           | mouse       | 10F.9G2   | BioLegend   |
| LAG3               | PE                           | mouse       | C9B7W     | BioLegend   |
| NK1.1              | PE                           | mouse       | PK136     | ImmunoTools |
| CD83               | PE-Cy7                       | mouse       | Michel-19 | BioLegend   |
| CD152 (CTLA-4)     | PE-Cy7                       | mouse       | UC10-4B9  | BioLegend   |
| CD366              | PE-Cy7                       | mouse       | B8.2C12   | BioLegend   |
| CD19               | APC                          | mouse       | LT19      | ImmunoTools |
| CD25               | APC                          | mouse       | MEM-181   | ImmunoTools |
| CD279 (PD1)        | APC                          | mouse       | 29F.1A12  | BioLegend   |
| Foxp3              | APC                          | mouse/rat   | FJK-16S   | eBioscience |
| CD3e               | Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 | mouse       | 500A2     | BioLegend   |
| CD206              | Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 | mouse       | C068C2    | BioLegend   |
| CD11b              | Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 | mouse/human | M1/70     | BioLegend   |
| CD4                | Alexa Fluor <sup>®</sup> 594 | mouse       | GK1.5     | BioLegend   |
| F4/80              | Alexa Fluor <sup>®</sup> 594 | mouse       | BM8       | BioLegend   |
| Gr-1               | Alexa Fluor <sup>®</sup> 594 | mouse       | RB6-8C5   | BioLegend   |
| CD8a               | Alexa Fluor <sup>®</sup> 647 | mouse       | 53-6.7    | BioLegend   |
| Gr-1               | Alexa Fluor <sup>®</sup> 700 | mouse       | RB6-8C5   | BioLegend   |
| CD8                | FITC                         | mouse       | 53-6.7    | BioLegend   |
| CD4                | APC/Fire                     | mouse       | GK1.5     | BioLegend   |
| CD11b              | BV570                        | mouse/human | M1/70     | BioLegend   |

## 8. ANHANG

|   |                  |             |           |                   |
|---|------------------|-------------|-----------|-------------------|
| CD274 (PD-L1)   | BV421            | mouse       | 10F.9G2   | BioLegend         |
| NK1.1   | BV605            | mouse       | PK136     | BioLegend         |
| CD25  | PerCP-eFluor™710 | mouse       | PC61.5    | eBioscience™      |
| CD62L   | BV785            | mouse       | MEL-14    | BioLegend         |
| CD83  | BV750            | mouse       | Michel-19 | BioLegend         |
| CD366   | PE/Dazzle™       | mouse       | B8.2C19   | BioLegend         |
| CD279 (PD1)   | BV650            | mouse       | RMP1-30   | BioLegend         |
| CD179 (CCR7)  | PE               | mouse       | 4B19      | BioLegend         |
| CD44  | BV711            | mouse/human | IM7       | BioLegend         |
| CD19  | Spark Blue™      | mouse       | 6D5       | BioLegend         |
| CD223 (LAG3)  | BV480            | mouse       | C9B7W     | BD<br>Bioscience™ |
| CD3   | PerCP            | mouse       | 145.2C11  | BioLegend         |
| Foxp3   | Alexa Fluor® 647 | mouse       | MF-14     | BioLegend         |
| Calreticulin  | unkonjugiert     |             | RB57759   | Abcepta           |
| IgG (sekundärer Antikörper: Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) H) | AF 647           | rabbit      |           | Invitrogen        |
| IgG (sekundärer Antikörper: Donkey-anti Rabbit)             | FITC             | rabbit      | Poly4064  | BioLegend         |
| PD-L1(Atezolizumab)   | unkonjugiert     |             | 6E11      |                   |
| Zombie NIR™   |                  |             |           | BioLegend         |
| CD16/32 (TrueStain FcX™ Plus                                |                  | mouse       | S17011E   | BioLegend         |
| IRF5  | unkonjugiert     |             |           | Invitrogen        |

## 8. ANHANG

### 8.4. Primer

| Gen      | Repeat          | Primer-Sequenz (5' > 3')                                  | Produktgröße [BP] |
|----------|-----------------|---|-------------------|
| Apc      | A <sub>8</sub>  | F: ATTTCTCTGGATCGCCTTT<br>R: GCGAATCTTTCCCGTAATCA         | 189               |
| Tmem60   | A <sub>9</sub>  | F: CTTTGACCCTCGACATGGAT<br>R: CAGCCAGTAAGGCCATAAA         | 164               |
| Senp6    | A <sub>11</sub> | F: GCTGTGACTGATTCGAGTGC<br>R: GCCATTCTCACTTTGGGTTTC       | 177               |
| Phactr4  | A <sub>10</sub> | F: ATCTTCAAGCCGTGGAAATG<br>R: TTTAATGCAGCAGGCTCAG         | 185               |
| Aste1    | A <sub>8</sub>  | F: GAAGCCTGGTCCACAGACTC<br>R: AGGCTGGCAACCTTTTTCTT        | 199               |
| Bat30    | A <sub>30</sub> | F: ATTTGGCTTTCAAGCATCCATA<br>R: GGAAGACTGCTTAGGGAAGA      | 82                |
| Bat59    | A <sub>59</sub> | F: GTAATCCCTTTATTCCATTAGCA<br>R: GGCTCACAACCATCCGTAACAAGA | 189               |
| Mdm2     | A <sub>8</sub>  | F: CGCAGGACAAAGACGAGAGT<br>R: TCATTTGGATTGGCTGTCTG        | 198               |
| AA003063 | A <sub>23</sub> | F: ACGTCAAAAATCAATGTTAGG<br>R: CAGCAAGGGTCCCTGTCTTA       | 87                |
| U12235   | A <sub>24</sub> | F: GCTCATCTTCGTTCCCTGTC<br>R: CATTTCGGTGAAAGCTCTGA        | 86                |
| L24372   | A <sub>27</sub> | F: GGAAGACTGCTTAGGGAAGA<br>R: ATTTGGCTTTCAAGCATCCATA      | 90                |
| AC096777 | T <sub>27</sub> | F: TACAGAGGATTGTCCTCTTGGAG<br>R: GCTGCTTCACTTGGACATTGGCT  | 138               |
| FasI     | A <sub>8</sub>  | F: TCACCAACCAAAGCCTTAAAGT<br>R: TCCCTGTAAATGGGCCACA       | 59                |
| Kit      | A <sub>8</sub>  | F: TCAGCCTGACGTGCATTGAT                                   | 108               |

## 8. ANHANG

| R: AGAACTCGTGAGGCCATTGC |                  |  |     |
|-------------------------|------------------|--|-----|
| Rasal2                  | A <sub>8</sub>   | F: CAAACTGGCGACCAGTCACAC<br>R: TAGCCTTCCACCTCTTCATAGCA   | 151 |
| Tcf712                  | T <sub>8</sub>   | F: CACCTTGTATGTAGCGAACGCA<br>R: TCAACTTGCCGTGAGCATTAGA   | 119 |
| Il18                    | A <sub>8</sub>   | F: GGACACTTTCTTGCTTGCCA<br>R: TCCCCACCTAACTTTGATGTAAG    | 124 |
| Supt16                  | A <sub>8</sub>   | F: TGAGAAAGTTCGGCATAGCA<br>R: AGAAGGATCTGCCCCAGCTA       | 85  |
| C8a                     | T <sub>8</sub>   | F: CCTGGCGGATACTTCAATCT<br>R: ACACCAGCTGAGTGGGACTT       | 100 |
| Kcnma1                  | A <sub>10</sub>  | F: TGACGTCACAGATCCCAAAA<br>R: TAACAAGGGGTCATGCCTCA       | 157 |
| Grb14                   | A <sub>10</sub>  | F: GCATTTGCAGCTTTTCAGTG<br>R: CGTCCTGCTCTGCTCTTCTT       | 147 |
| Ptpn21                  | A <sub>8</sub>   | F: TTTGAAAGGTGTCTGGGTACG<br>R: CGCTCTGGTGGACACTTCTT      | 176 |
| Rfc3                    | A <sub>10</sub>  | F: TTGGCAGTAGTGATTGGTGA<br>R: AGGAGCAGTTTACCTGGGATT      | 165 |
| BAT26                   | A <sub>26</sub>  | F: TCACCATCCATTGCACAGTT<br>R: CTGCGAGAAGGTACTIONCACCC    | 134 |
| D1Mit79                 | CA <sub>31</sub> | F: GACCTGGAAGTTGGAAACCA<br>R: TGATCCAGAACCTCTGCCTT       | 150 |
| BAT24                   | A <sub>24</sub>  | F: CATAGACCCAGTGCTCATCTTCGT<br>R: CATTCCGGTGGAAAGCTCTGA  | 98  |
| D15Mit93                | CA <sub>32</sub> | F: AAGAATTGGGGTGGGTAAGG<br>R: CATGTGCAGAATACTTACACATATGC | 144 |
| Sdccag1                 | A <sub>11</sub>  | F: GCATAGGCTGACAGGCTGAGAT<br>R: TGCCAGCATTGAGAACAGTGAT   | 132 |
| Casc3                   | C <sub>8</sub>   | F: TGTCACACTTCCATAGAAACACACC                             | 140 |

## 8. ANHANG

|        |                                |   |                |
|--------|--------------------------------|---|----------------|
|        |                                | R: GAGGACTCCCCAGCCGGT                                     |                |
| Mbd6   | G <sub>8</sub>                 | F: CCCTCTTCTTTCCAGCCAGT<br>R: TGGAGGGATCTGGAGACTCT        | 171            |
| ACVR2a | A <sub>9</sub>                 | F: GTTGCCATTTGAGGAGGAAA<br>R: CAGCATGTTTCTGCCAATAATC      | 109            |
| Lig4   | A <sub>9</sub>                 | F: TGAAGCCAAGGTGCTTACAG<br>R: TGGGTTATTAAGTGAAGAAGGCT     | 133            |
| Taf1b  | A <sub>8</sub>                 | F: CATGTGACAACCTTACGAA GAATCA<br>R: TCCTTTCTTGGATCCTGAGC' | 180            |
| Mrpl37 | A <sub>8</sub>                 | F: CGTGTCTTCCAGTTCCTGGT<br>R: GAAATCAACAGGCCCAACAG        | 171            |
| Mdc1   | C <sub>8</sub>                 | F:GAAAGGCTGGTTGCTTCTTG<br>R:ACTGATGATCTCGCCCATCT          | 188            |
| Erc5   | A <sub>9</sub>                 | F: CTCAGAGTGGTGGCACGAAG<br>R: CATCCACCACAGGCCTGAG         | 152            |
| Casc5  | A <sub>8</sub>                 | F: CAATGATGCAATGGAACTGACT<br>R: TTTCTCTCTGAGTGGGCCAG      | 124            |
| Akt3   | T <sub>8</sub>                 | F: GGGCCAGATGATGCAAAAGA<br>R: ACATCTTGCCAGTTTACTCCAG      | 65             |
| Spen   | A <sub>8</sub>                 | F: GGTGTTTTGCTGAGGGAAGG<br>R: AGGATCCTGGCAGTCTTTGG        | 129            |
| Il1f9  | A <sub>10</sub>                | F: GCACCAGAACAAGATCACGA<br>R: CCAGCTCTCTCGTGTTCAT         | 87             |
| Clock  | T <sub>8</sub>                 | F: TGTTAGAGGCTCTTGATGGTTT<br>R: ACTTCCATCTGTCATGATCGC     | 50             |
| Dnajc2 | A <sub>8</sub>                 | F: CAAGTGTTTTCTCCAGTGTGTTGA<br>R: CGAGGAGTTCATATCACCAAGC  | 84             |
| Tgfb2* | A <sub>4</sub> GA <sub>4</sub> | F: CATTACTCTGGAGACGGTTTGC<br>R: TCGTTGCACTCTTCCATGTTAC    | 153            |
| Mlh1   |                                | F: TGT CAA TAG GCT GCC CTA GG                             | 500 Knock- out |

## 8. ANHANG

---

---

|               |   |  |
|---------------|---|--|
| <b>mouse#</b> | <b>R1: TGG AAG GAT TGG AGC TAC GG R2:<br/>TTT TCA GTG CAG CCT ATG CTC</b> | <b>350 Wildtyp 350 + 500<br/>Heterozygot</b> |
|---------------|---|--|

---

### 8.5. Thesen

---

1. Das Lynch-Syndrom ist das häufigste erbliche Tumorprädispositionssyndrom und führt zur Entwicklung syn- und metachroner Tumore mit hoher Mutationslast und demzufolge mit hoher Immunogenität.
2. *Mlh1*-knockout-Mäuse stellen ein gutes präklinisches Modell für erbliche Tumorsyndrome dar.
3. Die Blockade von Immuncheckpoint-Molekülen stellt eine wirksame Therapieoption für Patienten mit dMMR-assoziierten Tumoren dar.
4. Die zielgerichtete Therapie mit Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitoren (CDKIs) ist eine innovative Therapieform für dMMR-assoziierte Tumore.
5. CDK-Inhibitoren induzieren einen Zellzyklusarrest, führen zu immunogenem Zelltod und verändern den Phänotyp von dMMR-Tumorzellen *in vitro*.
6. Der CDK-Inhibitor Abemaciclib zeigt im *Mlh1*-knockout-Modell zytostatische und immunvermittelte Effekte, insbesondere durch Modulation des Tumormikromilieus.
7. Abemaciclib verlängert signifikant das Gesamtüberleben von *Mlh1*<sup>-/-</sup> Mäusen und führt zur bildmorphologisch nachweisbaren Reduktion der Tumormasse.
8. Hinsichtlich des Gesamtüberlebens ist eine Therapie mit Abemaciclib einer Therapie mit einem anti-PD-L1-Antikörper überlegen.
9. Eine Kombination aus Zellzyklus- und Immuncheckpoint-Blockade führt potenziell zu einer kumulativen Toxizität und bedarf für eine sichere Anwendung bei dMMR-assoziierten Erkrankungen einer genaueren, individuellen Anpassung hinsichtlich Applikationsschema sowie Dosierung.
10. Perspektivisch stellt Abemaciclib eine geeignete Therapiesubstanz zur Behandlung dMMR-assoziiierter Tumore dar und womöglich auch eine überlegene Alternative zur Immuncheckpoint-Inhibition.

---

## 9. LEBENSLAUF

### PERSÖNLICHE DATEN

---

Name: Julia Henne  
Kontakt: Tel.: 0381 29415931; beruflich: 0381 494 146063  
E-Mail: julia.henne@med.uni-rostock.de  
Budapester Straße 58, 18057 Rostock  
Geburtsdatum und -ort: 09.02.1996, Reinbek

### AKADEMISCHE LAUFBAHN UND BERUFLICHER WERDEGANG

---

ab 07/2023 Assistenzärztin in der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax-, Gefäß- und Transplantationschirurgie (Universitätsmedizin Rostock)

05/2020 – 12/2022 Dissertationsschrift: „Kombinierte zielgerichtete Immuntherapie im präklinischen murinen *Mhl1*<sup>-/-</sup> Tumormodell“ bei PD Dr. rer. nat. habil. Claudia Maletzki, Universitätsmedizin Rostock

10/2016 – 06/2023 Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock, 3. Staatsexamen 06/2023, 2. Staatsexamen 10/2021, 1. Staatsexamen 09/2018

09/2015 – 10/2016 Beginn einer Ausbildung zur Operationstechnischen Assistentin am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

06/2015 Abitur (Marion-Dönhoff-Gymnasium, Mölln)

### KLINISCHE ERFAHRUNG

---

Praktisches Jahr (05/2022 – 05/2023) Innere Medizin Universitätsmedizin Rostock (Abteilung für Gastroenterologie sowie Abteilung für Infektiologie und Tropenmedizin), Allgemein-, Viszeral-, Thorax-, Gefäß- und Transplantationschirurgie Universitätsmedizin Rostock, Anästhesiologie und Intensivmedizin Universitätsmedizin Rostock

Famulaturen allgemeinmedizinische Hausarztpraxis (Schwerpunkt: Substitutionspatienten, 02/2021, Rostock); neurologischen Intensivstation (08/2020, Uniklinik Rostock); Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Transplantationschirurgie (07/2020, Uniklinik Rostock); Ambulanz für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen und Rheumatologie (08/2019, UKSH Kiel), Anästhesiologie (07/2019, Uniklinik Rostock)

## **9. LEBENSLAUF**

---

|                   |  |
|-------------------|--|
| 09/2019 – 02/2021 | Studentische Hilfskraft im Spritzendienst der Südstadtklinik Rostock |
| 08/2019 – 08/2021 | Studentische Hilfskraft im Schlaflabor der Uniklinik Rostock         |

## **FREMDSPRACHEN**

---

Englisch (fließend), Russisch (konversationssicher)

---

## 10. EIDESSTAATLICHE ERKLÄRUNG

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)

---

## 11. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. C. Junghanß, Direktor der Medizinischen Klinik III – Klinik für Hämatologie, Onkologie und Palliativmedizin, danke ich für die Aufnahme in sein Team und die Bereitstellung des Forschungsthemas.

Frau Univ.-Prof. Dr. med. B. Vollmar möchte ich für die Möglichkeit, am Rudolf- Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie arbeiten zu dürfen, danken. Für die Aufzucht der Mäuse danke ich Frau Ilona Klamfuss. Ich danke auch dem Team der Core Facility Multimodale Kleintierbildung.

Ebenfalls möchte ich Herrn Dr. phil. nat. B. Schneider vom Institut für Pathologie danken.

In besonderem Maße möchte ich mich an dieser Stelle bei PD Dr. rer. nat. Claudia Maletzki bedanken. Ich möchte ihr nicht nur für die tolle Zusammenarbeit und die einmalige Betreuung danken, sondern auch dafür, dass ich durch sie meine eigene Leidenschaft für die Forschung entdecken konnte. Es war mir eine große Ehre von ihr zu lernen und mit ihr zusammen zu arbeiten. Nicht nur aufgrund ihrer Arbeitseinstellung sondern vor allem durch ihre herzliche Art ist sie ein großes Vorbild für mich.

Ein großes Dankeschön an das gesamte Forschungsteam der Hämatologie/Onkologie für die schöne Zeit, die herzliche Aufnahme ins Team und die stetige Hilfsbereitschaft. Vor allem möchte ich Inken Salewski danken, die mich nicht nur geduldig eingearbeitet hat und mich im Arbeitsalltag unterstützt hat, sondern auch stets ein offenes Ohr für mich hatte.

Das größte Dankeschön gilt meinen Eltern, Großeltern und meinen Freunden, insbesondere Lene und Anna, für die immerwährende Unterstützung. Ohne euch hätte ich all das nicht schaffen können.