

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

DIREKTOR: PROF. DR. MED. C. JUNGHANß

IMMUNCHECKPOINT INHIBITION IM
MURINEN $Msh2^{LoxP/LoxP}$ TUMORMODELL
– EINFLUSS AUF ÜBERLEBEN, IMMUNANTWORT & HÄMATOPOESE

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

VORGELEGT VON

PAULA JOHANNA KRONE | GEB. AM 01.03.2001 IN GERMERSHEIM

AUS ROSTOCK

ROSTOCK | 06.11.2024

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00005677

Gutachter:

PD Dr. rer. nat. Claudia Maletzki, Universitätsmedizin Rostock, Institut für Hämatologie, Onkologie und Palliativmedizin

apl. Prof. Dr. rer. nat. Dietmar Zechner, Universitätsmedizin Rostock, Institut für Experimentelle Chirurgie

Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Sandrine Sander, Greifswald, Institut für Translationale und experimentelle Onkologie

Jahr der Einreichung: 2024

Jahr der Verteidigung: 2025

PUBLIKATIONEN

Originalarbeiten

1. Salewski I, Henne J, Engster L, Krone P, Schneider B, Redwanz C, et al. CDK4/6 blockade provides an alternative approach for treatment of mismatch-repair deficient tumors. Oncoimmunology. 2022;11:2094583. doi: 10.1080/2162402X.2022.2094583. (Impact Factor 2022: 7,7)
2. Krone P, Wolff A, Teichmann J, Maennicke J, Henne J, Engster L, et al. Short-term immune-checkpoint inhibition partially rescues perturbed bone marrow hematopoiesis in mismatch-repair deficient tumors. Oncoimmunology. 2023;12:2230669. doi: 10.1080/2162402X.2023.2230669. (Impact Factor 2023: 6,5)
3. Wolff A, Krone P, Maennicke J, Henne J, Oehmcke-Hecht S, Redwanz C, et al. Prophylaxis with abemaciclib delays tumorigenesis in dMMR mice by altering immune responses and reducing immunosuppressive extracellular vesicle secretion. Transl Oncol. 2024;47:102053. doi: 10.1016/j.tranon.2024.102053. (Impact Factor 2024: 4,5)

Kongressbeiträge

1. Krone P, Salewski I, Henne J, Engster L, Schneider B, Redwanz C, Junghanss C, Maletzki C. CDK4/6 blockade provides an alternative approach for treatment of mismatch-repair deficient tumors. Oncol Res Treat 2022, Vol. 45, Suppl. 2

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
1.1	GENETISCHER DARMKREBS	1
1.2	MISMATCH – REPARATUR – DEFIZIENZ (DMMR).....	1
1.3	MIKROSATELLITENINSTABILITÄT (MSI)	3
1.3.1	LYNCH SYNDROM	5
1.3.2	SPORADISCHE MIKROSATELLITENINSTABILITÄT.....	6
1.4	TUMORIMMUNOLOGIE	6
1.4.1	IMMUN – ESCAPE MECHANISMEN.....	7
1.4.2	IMMUNCHECKPOINTS UND DEREN INHIBITION	7
1.4.2.1	IMMUNCHECKPOINT-INHIBITOREN & THERAPIE VON MSI TUMOREN.....	10
1.4.3	CHARAKTERISIERUNG DES TUMORMIKROMILIEUS	11
1.4.3.1	VERÄNDERUNGEN DER HÄMATOPOESE BEI SOLIDEN TUMOREN	12
II.	ZIELSETZUNG	14
III.	MATERIAL	14
3.1	LABORGERÄTE	14
3.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN	16
3.3	CHEMIKALIEN	18
3.4	MEDIEN, PUFFER, LÖSUNGEN	20
3.4.1	KITS	21
3.5	ANTIKÖRPER	21
3.6	TAQMAN™ ASSAYS UND PRIMER	21
3.7	SOFTWARE	21
3.8	STATISTIK	22
IV.	METHODEN	23
4.1	MSH2 ^{LOXPLOXP-VILLIN^{CRE}} KNOCKOUT MAUSMODELL	23
4.2	TIERZUCHT UND -HALTUNG.....	24
4.3	VERSUCHSAUFBAU UND MONITORING	25

4.4	BILDGEBUNG MITTELS PET/CT-MESSUNGEN	26
4.5	AUFARBEITUNG VON ORGANEN	27
4.5.1	AUFARBEITUNG VON BLUT	28
4.5.2	AUFARBEITUNG VON DARMTUMOREN.....	28
4.5.3	AUFARBEITUNG VON MILZGEWEBE.....	29
4.5.4	AUFARBEITUNG VON KNOCHENMARK	29
4.6	MORPHOLOGISCHE DIFFERENZIERUNG DER KNOCHENMARKZELLEN	30
4.7	IMMUNPHÄNOTYPISIERUNG MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE.....	31
4.7.1	FUNKTIONSWEISE	32
4.7.2	DURCHFLUSSZYTOMETRIE DES PERIPHEREN BLUTES, DER TUMOREN UND DER MILZ ...	33
4.7.3	DURCHFLUSSZYTOMETRIE DES KNOCHENMARKS.....	35
4.8	GENEXPRESSIONSANALYSE	37
4.8.1	RNA - ISOLATION VON TUMOR, MILZ UND KNOCHENMARK.....	38
4.8.2	cDNA-SYNTHESE	38
4.8.3	QUANTITATIVE REAL-TIME PCR (qPCR)	39
4.9	CHARAKTERISIERUNG DER TUMORMIKROUMGEBUNG MITTELS IMMUNFLUORESCENZ	39
4.9.1	HERSTELLUNG UND FIXIERUNG VON GEFRIERSCHNITTEN AUS TUMORGEWEBE.....	40
4.9.2	IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG DER TUMORSCHNITTE	40
4.9.3	KONFOKALE LASER – SCANNING - MIKROSKOPIE UND QUANTIFIZIERUNG	41
V.	ERGEBNISSE	42
5.1	ÜBERLEBENSWAHRSCHEINLICHKEITEN VON MSH2 ^{LoxP/LoxP;TgTg(VIL1-CRE)} MÄUSEN	42
5.2	EINFLUSS AUF DAS TUMORWACHSTUM.....	43
5.3	IMMUNPHÄNOTYPISIERUNG DES PERIPHEREN BLUTES.....	44
5.4	IMMUNPHÄNOTYPISIERUNG DER MILZZELLEN.....	46
5.5	VERÄNDERUNGEN DER GENEXPRESSION IN DER MILZ.....	48
5.6	IMMUNPHÄNOTYPISIERUNG DER TUMOREN.....	49
5.7	CHARAKTERISIERUNG DES TUMORMIKROMILIEUS MITTELS IMMUNFLUORESCENZ.....	51
5.8	GENEXPRESSIONSANALYSE DER TUMOREN.....	54
5.9	EINFLUSS DMMR-ASSOZIIERTER TUMOREN AUF DIE HÄMATOPOESE.....	55

5.10	VERÄNDERUNGEN DER HÄMATOPOESE DURCH IMMUNCHECKPOINT-INHIBITION	61
VI.	DISKUSSION	65
6.1	IMMUNCHECKPOINT-INHIBITION BEI DMMR-ASSOZIIERTEN TUMOREN	66
6.2	THERAPIEEINFLUSS AUF GESAMTÜBERLEBEN UND TUMORWACHSTUM	67
6.3	THERAPIEEINFLUSS AUF IMMUNOLOGISCHE UND MOLEKULARE CHARAKTERISTIKA	69
6.4	ALLGEMEINE VERÄNDERUNGEN DER HÄMATOPOESE IN SOLIDEN TUMOREN	73
6.5	EINFLUSS DER IMMUNCHECKPOINT-INHIBITION AUF DIE GESTÖRTE HÄMATOPOESE	76
6.6	ANGRIFFSPUNKTE IN DER HÄMATOPOESE ALS THERAPIEANSÄTZE	77
6.7	TOXIZITÄT UND NEBENWIRKUNGEN VON IMMUNCHECKPOINT INHIBITOREN.....	79
6.8	BIOMARKER ZUR IMMUNCHECKPOINT INHIBITOR BEHANDLUNG BEI DMMR/MSI-CRC ..	80
6.9	GRUNDSÄTZLICHE LIMITATIONEN DES MAUSMODELLS.....	82
VII.	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	85
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	86
IX.	ANHANG	I
9.1	ABKÜRZUNGEN	I
9.2	ANTIKÖRPER	III
9.3	TAQMAN™ ASSAYS UND PRIMER	VI
9.4	THESEN	VII
9.5	DANKSAGUNG	VIII
9.6	ANMERKUNGEN	X

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: GENESE DES KOLOREKTALEN KARZINOMS.....	1
ABBILDUNG 2: MISMATCH-REPARATUR-SYSTEM	3
ABBILDUNG 3: MSI-ENTSTEHUNGSWEG VON CRCs	4
ABBILDUNG 4: TUMORRISIKO BEI LYNCH-SYNDROM - PATIENTEN	5
ABBILDUNG 5: WIRKUNGSWEISE DER ICI α -PD1/ α -PD-L1 UND α -LAG-3.....	8
ABBILDUNG 6: TUMORASSOZIIERTE MYELOPOESE IN KNOCHENMARK UND MILZ	13
ABBILDUNG 7: SCHEMA ZUM <i>CRE-LoxP</i> -SYSTEM	24
ABBILDUNG 8: VERSUCHSAUFBAU	26
ABBILDUNG 9: ÜBERSICHT ZUM VORGANG DER MORPHOLOGISCHEN DIFFERENZIERUNG.....	30
ABBILDUNG 10: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES DURCHFLUSSZYTOMETERS	33
ABBILDUNG 11: SCHEMATISCHER AUFBAU DES KONFOKALEN LASER-SCANNING-MIKROSKOPS ..	41
ABBILDUNG 12: KAPLAN–MEIER ÜBERLEBENSKURVE	42
ABBILDUNG 13: ^{18}F -FDG-PET/CT-BILDGEBUNG ZUR LONGITUDINALEN VERLAUFS-DARSTELLUNG DER TUMORENTWICKLUNG.....	43
ABBILDUNG 14: PET/CT ANALYSE DER TUMORENTWICKLUNG IM VERLAUF.....	43
ABBILDUNG 15: GATING-STRATEGIE ZUR IDENTIFIZIERUNG VON IMMUNZELL-SUBTYPEN	44
ABBILDUNG 16: DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE PHÄNOTYPISIERUNG VON CD4^+ UND CD8^+ T- ZELLEN IM PERIPHEREN BLUT	45
ABBILDUNG 17: DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE PHÄNOTYPISIERUNG VON T- ZELLSUBPOPULATIONEN IM PERIPHEREN BLUT.....	46
ABBILDUNG 18: DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE PHÄNOTYPISIERUNG DER MDSCs UND NK-ZELLEN IM PERIPHEREN BLUT	46
ABBILDUNG 19: DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE PHÄNOTYPISIERUNG DER MILZZELLEN.....	47
ABBILDUNG 20: ANALYSE DER GENEXPRESSION IN DER MILZ.....	49
ABBILDUNG 21: DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE PHÄNOTYPISIERUNG DES TUMORS	50
ABBILDUNG 22: DIFFERENZIERUNG VERSCHIEDENER CD4^+ - UND CD8^+ T-ZELLEN IM TUMOR.....	51
ABBILDUNG 23: NACHWEIS TUMORINFILTRIERENDER IMMUNZELLEN	53
ABBILDUNG 24: NACHWEIS TUMORINFILTRIERENDER IRF5^+ / PD1^+ -ZELLEN.....	53
ABBILDUNG 25: ANALYSE DER GENEXPRESSION IM TUMOR.....	54
ABBILDUNG 26: MORPHOLOGIE HÄMATOPOETISCHER ZELLEN IM KNOCHENMARK.....	55
ABBILDUNG 27: MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN HÄMATOPOETISCHER ZELLEN	56
ABBILDUNG 28: ÜBERSICHTSGRAPHIK ZUR HÄMATOPOESE	57
ABBILDUNG 29: PHÄNOTYPISIERUNG DER HÄMATOPOETISCHEN STAMMZELLPOPULATIONEN	58

ABBILDUNG 30: DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE PHÄNOTYPISIERUNG DER HÄMATOPOETISCHEN VORLÄUFERZELLEN	59
ABBILDUNG 31: PHÄNOTYPISIERUNG DER MONOZYTÄREN VORLÄUFERZELLEN	60
ABBILDUNG 32: DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE PHÄNOTYPISIERUNG DER EOSINOPHILEN UND PD1 ⁺ VORLÄUFERZELLEN	60
ABBILDUNG 33: MORPHOLOGIE VON HÄMATOPOETISCHEN ZELLEN DES KNOCHENMARKS	61
ABBILDUNG 34: MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN HÄMATOPOETISCHER ZELLEN IM THERAPIEVERGLEICH	62
ABBILDUNG 35: PHÄNOTYPISIERUNG DER HÄMATOPOETISCHEN STAMMZELLPOPULATIONEN IM THERAPIEVERGLEICH	63
ABBILDUNG 36: DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE PHÄNOTYPISIERUNG DER HÄMATOPOETISCHEN VORLÄUFERZELLEN IM THERAPIEVERGLEICH.....	64
ABBILDUNG 37: DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE PHÄNOTYPISIERUNG DER MONOZYTÄREN VORLÄUFERZELLEN IM THERAPIEVERGLEICH.....	64
ABBILDUNG 38: DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE PHÄNOTYPISIERUNG DER EOSINOPHILEN UND PD1 ⁺ VORLÄUFERZELLEN IM THERAPIEVERGLEICH.....	65

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN LABORGERÄTE	14
TABELLE 2: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN VERBRAUCHSMATERIALIEN	16
TABELLE 3: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN CHEMIKALIEN	18
TABELLE 4: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN MEDIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN	20
TABELLE 5: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN KITS	21
TABELLE 6: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN SOFTWARE-PROGRAMME.....	21
TABELLE 7: EXTRAZELLULÄRE ANTIKÖRPER - PHÄNOTYPISIERUNG VON BLUT, TUMOR UND MILZ	34
TABELLE 8: INTRAZELLULÄRE ANTIKÖRPER - PHÄNOTYPISIERUNG VON BLUT, TUMOR UND MILZ	35
TABELLE 9: EXTRAZELLULÄRE ANTIKÖRPER - PHÄNOTYPISIERUNG DER STAMMZELLEN	36
TABELLE 10: INTRAZELLULÄRE ANTIKÖRPER - PHÄNOTYPISIERUNG DER STAMMZELLEN	37
TABELLE 11: ÜBERSICHT DER PRIMÄREN ANTIKÖRPER FÜR DIE IMMUNFLUORESCENZ-FÄRBUNG	40
TABELLE 12: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN ANTIKÖRPER	III
TABELLE 13: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN TAQMAN™-ASSAYS	VI
TABELLE 14: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN PRIMER.....	VI

I. EINLEITUNG

1.1 GENETISCHER DARMKREBS

Das durchschnittliche Lebenszeitrisko an einem kolorektalen Karzinom (*engl. colorectal cancer*, CRC) zu erkranken, liegt weltweit bei 4 – 5 % [1]. Hauptrisikofaktor ist das zunehmende Lebensalter [1]. Aber auch bei Vorliegen genetischer Risikofaktoren besteht eine deutlich erhöhte Gefahr. So haben ca. 20 % aller Patienten eine positive Familienanamnese [2,3]. In etwa 5 % aller Fälle liegt eine pathogene Keimbahnmutation vor (Abb. 1) [1]. Das häufigste genetisch bedingte Tumorprädispositionssyndrom ist das Lynch Syndrom, welches 3 - 4 % aller CRCs betrifft. Lynch-assoziierte Tumoren entstehen aufgrund einer Keimbahnmutation in einem der DNA Mismatch – Reparatur (MMR) Gene. Auf diese wird im folgenden Kapitel näher eingegangen. Ein weiteres Tumorsyndrom mit obligater Kanzerose ist die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), die in ca. 1 % aller CRCs auftritt und auf einer Keimbahnmutation des APC-Gens beruht [4,5]. Andere und deutlich seltenere erbliche Syndrome sind das Peutz–Jeghers–Syndrom und das Cowden–Syndrom [1,3]. Gemeinsames Charakteristikum aller erblich bedingten Tumoren ist deren, im Vergleich zum sporadischen Pendant, frühzeitige Entwicklung. So erkranken die betroffenen Patienten in der Regel vor dem 50. Lebensjahr [6,7].

Häufigkeitsverteilung von kolorektalen Karzinomen

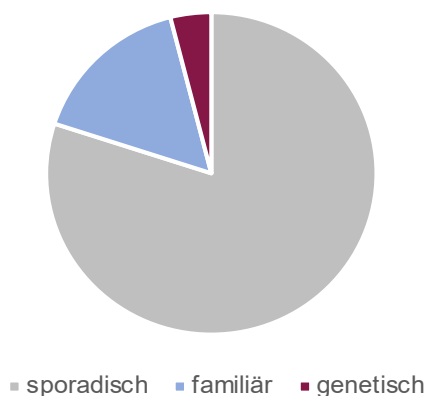


ABBILDUNG 1: GENESE DES KOLOREKTALEN KARZINOMS

WÄHREND 80 % SPORADISCH AUFTRETEN, LIEGEN BEI 20 % FAMILIÄRE HÄUFUNGEN VOR. DAVON ENTSTEHEN CA. 16 % OHNE NACHWEISBARE GENVERÄNDERUNGEN. BEI DEN VERBLEIBENDEN 4 % LIEGT EINE MONO-GENETISCHE KEIMBAHN-MUTATION VOR. (ADAPTIERT NACH [8].)

1.2 MISMATCH – REPARATUR – DEFIZIENZ (DMMR)

In einer einzelnen Zelle treten täglich etwa 10.000 Basenfehlpaarungen auf [9,10]. DNA-Polymerasen bauen falsche Nukleotide ein oder verrutschen am DNA–Strang, wodurch Insertions–Deletions–Schleifen (*engl. insertion-deletion-loops*, IDL) entste-

hen können. Bleibt der Reparaturvorgang aus, trägt der Tochterstrang eine Punktmutation oder eine Leserasterverschiebung (*Frameshift-Mutation*), die zu einem vorzeitigen STOP-Codon und zur Synthese eines verkürzten Proteins führen [11]. Um sicherzustellen, dass diese die Zellteilung und -funktion nicht beeinträchtigen, gibt es integrierte Reparaturmechanismen. Während der Replikation korrigiert die DNA-Polymerase durch ihre Korrekturleseaktivität eine Vielzahl von Fehlpaarungen. Bleiben dennoch welche bestehen [12,13], so können diese durch das MMR-System entfernt werden [14,15].

Das MMR-System wurde zuerst in Bakterien entdeckt, bei denen eine erhöhte Mutationsrate auftrat, wenn das Reparatursystem defekt war [16–18]. In Prokaryoten besteht der Komplex aus drei spezifischen Proteinen: *MutS*, *MutL* und *MutH* [19,20]. Säuger besitzen fünf Homologe von *MutS* (*MSH2* - *MSH6*) und vier Homologe von *MutL* (*MLH1*, *MLH2*, *PMS1*, *PMS2*) [21]. Mit Ausnahme von *MSH4* und *MSH5* sind alle anderen Proteine an der DNA-Reparatur beteiligt [22–24]. Die Zusammensetzung der Proteinkomplexe unterscheidet sich je nach Mutationstyp [25–27]: Nukleotid-Fehlpaarungen und kleine IDLs werden vom *hMutS α* -Heterodimer erkannt, welcher aus *hMSH2* und *hMSH6* besteht [28,29]. Dieser bindet an die DNA, nachdem *hMSH2* ein Molekül ADP gegen ATP ausgetauscht hat [27]. Nachfolgend bindet *hMutL α* , bestehend aus *hMLH1* und *hPMS2*, an den *hMutS α* -Komplex und bildet einen tetrameren Komplex [13,30]. *hMutL α* erkennt den neusynthetisierten, fehlerhaften Strang. Die Endonuklease-Aktivität schneidet den Strang entlang der Bindungsstelle mithilfe der Aktivierung des *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA). Durch den Replikationsfaktor C wird dieses an die DNA gebunden [31]. Die rekrutierte Exonuklease *Exo1* entfernt mehrere hundert Basen des fehlerhaften Segments und die *Polymerase δ* repliziert dieses Stück, welches anschließend von der *DNA-Ligase I* verschlossen wird (Abb. 2) [13,32,33]. Größere IDLs werden vom *hMutS β* -Heterodimer, bestehend aus *hMSH2* und *hMSH3*, korrigiert [28,29,33,34]. Auch dieses bindet an die DNA und rekrutiert den *hMutL α* -Komplex [30,35]. Anschließend folgt das Prozedere entsprechend der Reparatur einzelner Basenfehlpaarungen [36–38].

MMR-Proteine sind auch an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen und der Rekombination beteiligt [39]. Zusätzlich haben sie Funktionen bei der Regulation des Zellzyklus und der p53-abhängigen Apoptose bei Reaktionen auf starke Schädigungen der DNA [14,40]. Der Verlust des MMR-Systems, die sogenannte MMR-Defizienz (*engl. deficient MMR*, dMMR), führt zur Akkumulation von Mutationen und Entwicklung von

Tumoren. Typisch für diese Tumoren ist eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI). Sie tritt sowohl in hereditären als auch in sporadischen Tumoren auf [17,41,42].

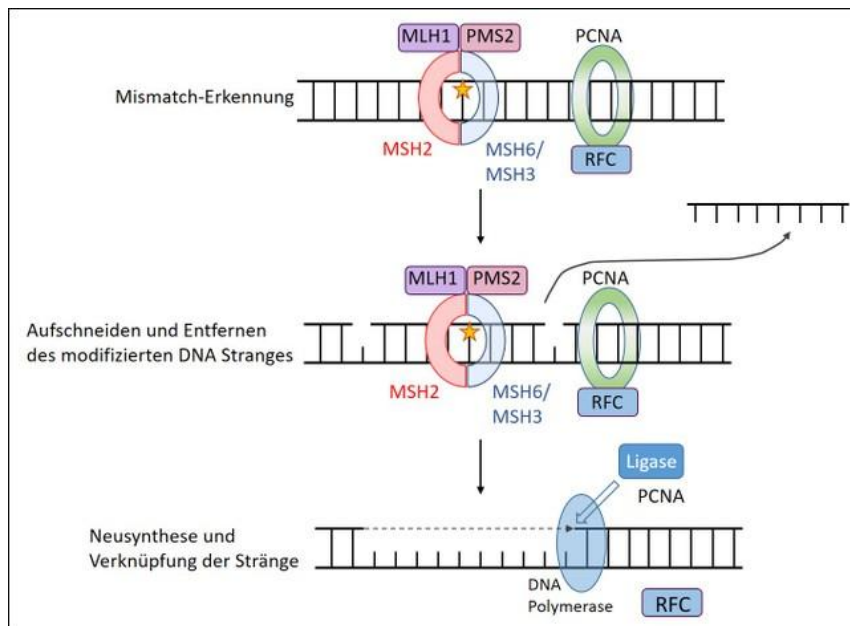


ABBILDUNG 2: MISMATCH-REPARATUR-SYSTEM

DURCH *hMutS*-KOMPLEXE (*hMSH2/hMSH6* ODER *hMSH2/hMSH3*) WERDEN FEHLERHAFTE BASENPAARUNGEN IN DER DNA ERKANNT. *hMutL*- (*hMLH1/hPMS2*) WIRD REKRUTIERT, DAS PCNA BINDET MITTELS REPLIKATIONSFAKTOR C AN DEN DNA-STRANG, DIE FEHLERHAFTE STELLE WIRD AUSGESCHNITTEN UND MITTELS DNA-POLYMERASE DIE RICHTIGEN NUKLEOTIDE EINGEFÜGT. ZULETZT VERBINDET DIE LIGASE DIE STRÄNGE WIEDER MITEINANDER [43].

1.3 MIKROSATELLITENINSTABILITÄT (MSI)

Mikrosatelliten (*engl. short tandem repeats, STR*) sind kurze, sich wiederholende Basenpaarsequenzen, die aus 2 bis 6 Basenpaaren bestehen. Sie sind vorwiegend in nicht-kodierenden Bereichen lokalisiert, kommen aber im gesamten Genom vor [44,45]. Aufgrund ihrer repetitiven Struktur (z.B. AAAA, TTTT, TATATATA) sind STRs besonders anfällig für Mutationen und für Längenänderungen der Mikrosatelliten-DNA. Liegt eine dMMR vor, so können diese Basenfehlpaarungen und Insertionen/Deletionen nicht korrigiert werden. Dies führt zu einer Akkumulation von Mutationen, insbesondere in den STRs. Man spricht in diesem Fall von einer MSI. Die Anhäufung solcher Mutationen in kodierenden Genen wird als wichtigster molekularer Mechanismus beschrieben, der die onkogene Transformation in den betroffenen Zellen bewirkt [46–48]. Tritt die MSI in kodierenden Bereichen auf, führt dies oft zu *Frameshift*-Mutationen. Besonders häufig betroffene Zielgene umfassen u.a. Gene der Apoptoseregulation (*BAX*), Inflammation (*Caspase-5*), Signaltransduktion (*TGF β -RII*, *ACVR2*) sowie der Transkriptionsregulation (*TAF1B*). Die Mutationen führen zur Synthese trunkierter und

damit funktionsloser Proteine, die ihre tumorsuppressiven Eigenschaften verlieren [49].

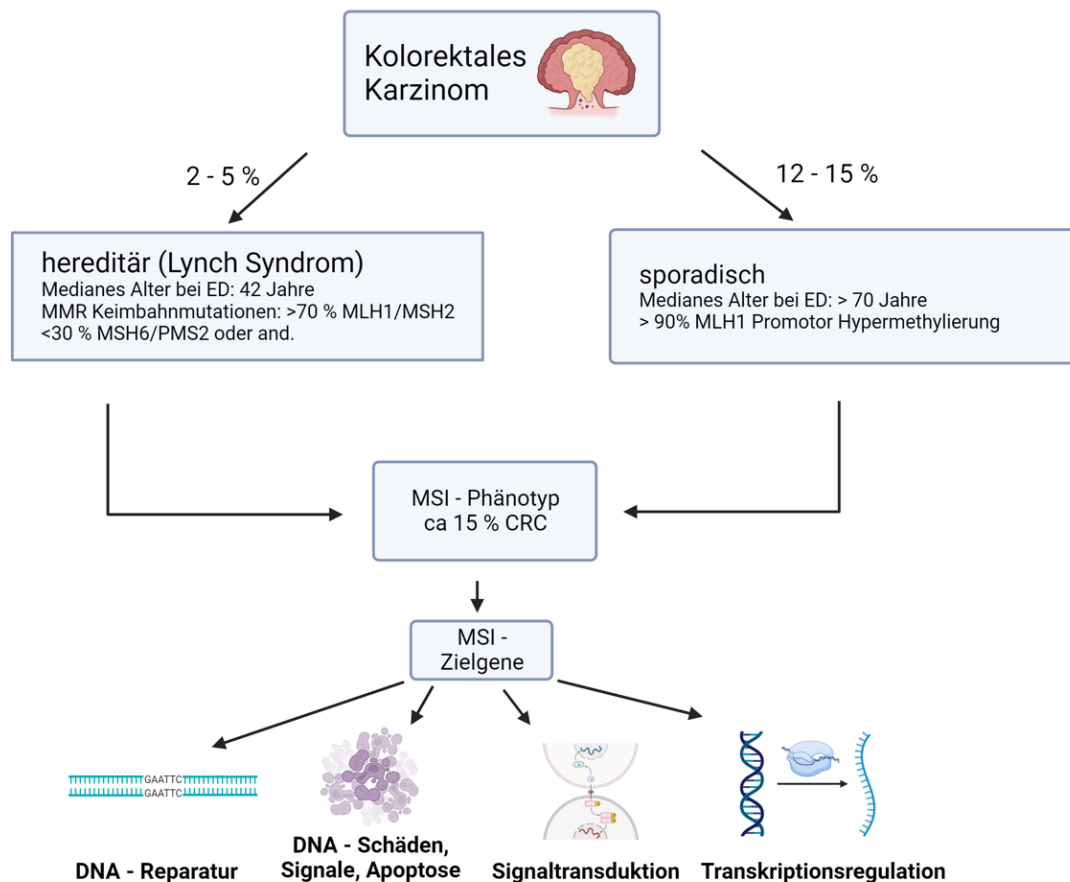


ABBILDUNG 3: MSI-ENTSTEHUNGSWEG VON CRCs

ERSTELLT MIT BIOENDER.COM UND ADAPTIERT NACH [44].

Um diesen Entstehungsweg der Tumorgenese nachzuweisen, wird der MSI-Phänotyp als diagnostischer Marker für eine dMMR in Tumorzellen genutzt und weist so auf einen Defekt des *hMutS*- oder *hMutL*-Komplexes hin [50]. Dadurch kann eine hochfrequente MSI (*MSI-high*, MSI-H) von einer niedrig-frequenten MSI (*MSI-low*, MSI-L)/MSS (*engl. microsatellite stable*) unterschieden werden. Zum Nachweis können folgende Methoden eingesetzt werden:

- Nachweis von Größenunterschieden spezifischer Mikrosatelliten mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)
- Nachweis eines Ausfalls der MMR-Proteine *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6* und *hPMS2* über spezifische Antikörper (AK) mittels Immunhistochemie
- Nachweis von DNA-Veränderungen mittels Next-Generation-Sequenzierung (NGS) [51–53].

Goldstandard ist die Immunhistochemie bei der Testung von MSI-H-CRCs. Um MSI-H, MSI-L und MSS voneinander abzugrenzen, werden MSI-Marker genutzt (sog. *Bethesda Panel*) und je nach Anzahl der vorhandenen Mutationen entsprechend in die Kategorien eingeteilt. MSI-L-Tumoren weisen die gleichen klinischen Merkmale wie MSS-Tumoren auf, bei denen keine MSI im Tumor nachweisbar ist [37,41,54,55]. MSI-H wurde in mehreren Studien als prognostisch günstiger Faktor nachgewiesen [38,41,54,56].

1.3.1 LYNCH SYNDROM

Das Lynch Syndrom (LS) ist eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung, die mit einem erhöhten Risiko für kolonische und extrakolonische Tumoren assoziiert ist. Bösartige Tumoren außerhalb des Kolorektums treten u.a. im Endometrium, Ovar, Magen, Dünndarm, Urothel, Gehirn, Pankreas und Prostata auf (Abb. 4) [4,57]. Da das LS nicht zu einer vermehrten Polypenbildung im Darm führt, wurde es früher als hereditäres nicht-polypöses kolorektales Karzinom (HNPCC) bezeichnet. Aufgrund des komplexen Tumorspektrums ist der Begriff mittlerweile obsolet [43].

Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 44 Jahren [51]. In Abhängigkeit der zugrundeliegenden Keimbahnmutation besteht ein Lebenszeitrisiko von 70 %, an einem CRC zu erkranken. In 40 % der Fälle tritt dies vor dem 40. Lebensjahr auf [58,59].

Die charakteristischen Merkmale von Lynch-assoziierten Tumoren auf molekularbiologischer Ebene sind dMMR und MSI [57]. Lynch Anlageträger tragen eine monoallelische Keimbahnmutation. Mutationen im zweiten Allel führen zum kompletten Funktionsverlust des MMR-Systems und zur Tumorgenese [4,60]. Die am häufigsten betroffene Gene sind *hMLH1* und *hMSH2* (jeweils 40 – 45 %). Darüber hinaus sind Keimbahnmutationen in *hMSH6*- und *hPMS2* pathogenetisch relevant (jeweils 5 – 10 %) [4,61].

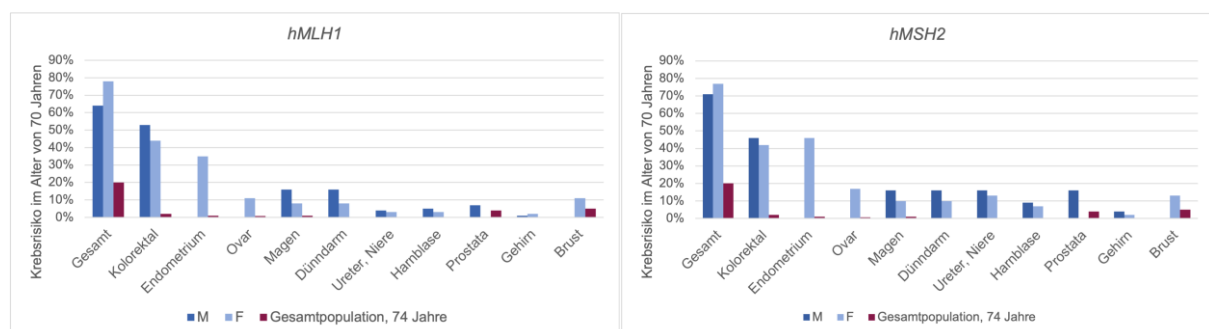


ABBILDUNG 4: TUMORRISIKO BEI LYNCH-SYNDROM - PATIENTEN

Risiko im Alter von 70 Jahren im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung. Adaptiert nach [57,62].

Weiterhin kennzeichnend ist die häufige Lokalisation im rechten Hemikolon und die hohe Rate syn- und metachroner Tumoren [51,63].

Um die Diagnose LS zu stellen, bedarf es vorwiegend klinischer Befunde. Sie verläuft in mehreren Stufen [57]:

Die Amsterdam-II-Kriterien liefern dabei einen anamnestischen Leitfaden, um familienanamnestische Hinweise auf das Vorliegen eines LS zu erhalten [64,65].

Die revidierten Bethesda-Kriterien werden eingesetzt, wenn nicht alle Amsterdam-II-Kriterien erfüllt sind [66]. Hierbei werden vor allem die Charakteristika des bestehenden Tumors untersucht. Trifft mindestens eines dieser Kriterien zu, sollten anschließende molekularpathologische/-genetische Untersuchungen erfolgen, um eine dMMR bzw. MSI zu analysieren [51,67].

1.3.2 SPORADISCHE MIKROSATELLITENINSTABILITÄT

MSI ist in ca. 12 – 15 % aller sporadischen CRCs nachweisbar [68]. Im Gegensatz zum LS sind sporadische MSI-Tumoren mit CpG-Hypermethylierungen im MLH1-Promotor assoziiert [65,69]. Die Promotorhypermethylierung führt zur Inaktivierung des Gens [70]. Charakteristisch für diese Tumoren sind das Fehlen signifikanter familiärer Häufungen, ein höheres Manifestationsalter, eine biallelische Methylierung des MLH1-Promotors, der Verlust des MLH1- und PMS2-Proteins und häufige Mutationen im *BRAF*-Gen [71–73]. Damit sind sporadische MSI-assoziierte Tumoren sowohl molekularpathologisch als auch klinisch deutlich vom hereditären Pendant abzugrenzen. Ein gemeinsames Merkmal aller MSI-Tumoren ist jedoch ihre hohe Tumorimmunogenität, die nicht nur prognostisch, sondern auch klinisch relevant ist, u.a. für Therapieentscheidungen.

1.4 TUMORIMMUNOLOGIE

Die Tumorimmunologie befasst sich mit den Wechselwirkungen zwischen Tumor und Immunsystem. Dabei handelt es sich um einen sehr dynamischen Prozess. Das Immunsystem ist sowohl an der Entstehung, als auch an der Bekämpfung von Tumoren beteiligt und hat in fortgeschrittenen Stadien zusätzlich Einfluss auf die Immunogenität der Tumoren [74]. Die Tumorgenese umfasst drei Phasen der Immunedition: (I) der Eliminierung (*engl. elimination*), (II) dem Gleichgewicht (*engl. equilibrium*) und (III) dem Entkommen (*engl. escape*). In der ersten Phase können transformierte Zellen, z.B. über Fremdantigene, vom Immunsystem erkannt und eliminiert werden. Dies erfolgt in

der Regel noch lange bevor der Tumor klinisch manifest wird [75–77]. Jedoch werden dabei nicht immer alle Tumorzellvarianten vollständig eliminiert und treten in eine zweite Phase des Gleichgewichts ein: Das Immunsystem kontrolliert das Wachstum der Tumorzellen, verhindert es aber nicht vollständig. Es kommt zu einer Veränderung der Tumorimmunogenität. Dies führt in der dritten Phase, der sogenannten Escape-Phase, zur Tumorprogression, in der sich der Tumor unkontrolliert ausbreitet. Es entsteht ein immunsuppressives Tumormikromilieu (*engl. Tumor Microenvironment, TME*) und der Tumor wird klinisch sichtbar [78–80].

Die Fähigkeit von Tumoren, sich gezielt der Kontrolle durch das Immunsystem zu entziehen, wurde von Hanahan und Weinberg als eines der „*Hallmarks of Cancer*“ beschrieben [81].

1.4.1 IMMUN – ESCAPE MECHANISMEN

Tumoren nutzen Immun-Escape-Mechanismen, um sich der Kontrolle durch das Immunsystem zu entziehen. Die fehlende bzw. verminderte Abundanz von Haupthistokompatibilitätskomplex-I-Molekülen (MHC-I) auf Tumorzellen führt zu einer verringerten Antigenpräsentation und -erkennung durch zytotoxische T-Zellen [74,82]. Außerdem sezernieren Tumorzellen immunsuppressive Zytokine (z.B. Prostaglandin E, Tumor Growth Factor- β (TGF- β), Interleukin-10), welche das Tumorwachstum entscheidend beeinflussen [74,83]. Zwei besonders wichtige Escape-Mechanismen werden unter dem Punkt 1.4.2 und 1.4.3 erläutert.

1.4.2 IMMUNCHECKPOINTS UND DEREN INHIBITION

Immuncheckpoints gehören zum Kontrollsystem des Immunsystems, um Immunantworten zu steuern und überschießende Reaktionen zu vermeiden [84]. Sie fungieren als physiologischer Schutz vor Autoimmunerkrankungen. Im Jahr 2018 erhielten die Wissenschaftler James Allison und Tasuku Honjo den Nobelpreis für Medizin und Physiologie mit der Entdeckung der ersten zwei Immuncheckpoints, CTLA-4 (*engl. Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Protein-4*) und PD1 (*engl. Programmed Death Protein-1*) [85,86]. Dadurch wurden wichtige Zielmoleküle für die Immuntherapie entdeckt [76,87]. Heute ist bekannt, dass Tumoren diese Immuncheckpoints bzw. deren Liganden nutzen, um sich vor dem Immunsystem zu schützen und die Aktivität zytotoxischer

T-Lymphozyten und T-Helferzellen zu regulieren. Damit ist die Beeinflussung der spezifischen T-Zell-Aktivität ein weiterer wichtiger Mechanismus, den sich Tumoren zunutze machen. Die Hochregulation bestimmter Immuncheckpoint-Liganden auf den Tumorzellen (z.B. PD-L1) hat zur Folge, dass T-Zellen diese nicht angreifen. Zusätzlich führt das immunsuppressive TME zu einer Erschöpfung der T-Zellen. Diese exprimieren dann ebenfalls vermehrt Immuncheckpointmoleküle und produzieren weniger Effektorzytokine [88,89]. In der Konsequenz werden Tumorzellen nicht zerstört.

Zur Wiederherstellung der Aktivität erschöpfter T-Zellen ist die Auslösung einer Abwehrreaktion durch Blockade hemmender Immuncheckpoints (Immuncheckpoint-Inhibitoren, ICI) erforderlich (= *releasing the brake*) [90]. Hierfür werden zumeist monoklonale AK eingesetzt, die gegen spezifische Immuncheckpoints (u.a. CTLA-4, PD1) gerichtet sind [91,92]. Der Wirkmechanismus der ICI ist in Abbildung 5 veranschaulicht.

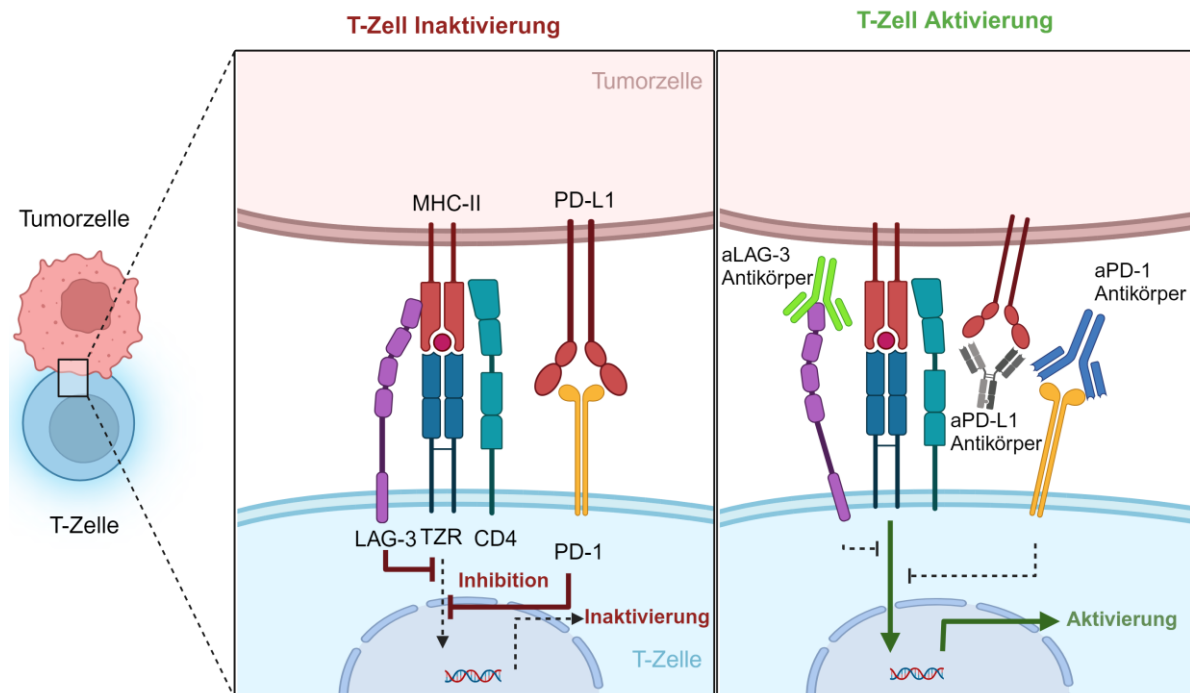


ABBILDUNG 5: WIRKUNGSWEISE DER ICI α -PD1/ α -PD-L1 UND α -LAG-3

(ENGL. ANTI-LYMPHOCYTE-ACTIVATION-GENE-3) ADAPTIERT NACH [93] UND ERSTELLT MIT BIORENDER.COM.

Der Durchbruch der immunvermittelten Tumorthherapie gelang 2011 mit der Zulassung des monoklonalen AKs gegen CTLA-4, Ipilimumab, beim fortgeschrittenen (metastasierten) malignen Melanom [94,95]. Es folgten weitere Zulassungen für PD1 und PD-L1-Inhibitoren [96–99].

PD1 ist, genau wie CTLA-4, ein Zellmembranprotein der CD28-Familie [100] und vorrangig auf der Oberfläche aktivierter T-Zellen exprimiert [101,102]. Sein Ligand PD-L1

befindet sich auf Antigen-präsentierenden Zellen und Tumorzellen. PD-L1 kann als Reaktion auf entzündliche Zytokine (z.B. TNF- α , IFN- γ , IL-1 β) auf verschiedenen nicht-lymphoiden Gewebezellen induziert werden [103–105]. Bindet PD1 an seinen Liganden, wird die antitumorale Aktivität von T-Zellen herunterreguliert [106,107]. Diese Interaktion kann mithilfe spezifischer α -PD1- oder α -PD-L1-AK blockiert werden, um die zytotoxische T-Zellantwort wieder herzustellen [87,108]. Verschiedene PD1-AK (u.a. Pembrolizumab und Nivolumab) sind mittlerweile zur Behandlung unterschiedlicher Tumorerkrankungen zugelassen, u.a. des malignen Melanoms, des Nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms (*engl. non small cell lung cancer*, NSCLC) und des Hodgkin-Lymphoms [87,96,109]. Revolutionär in diesem Zusammenhang war die erste tumoragnostische Zulassung von der FDA im Jahr 2017 für dMMR bzw. MSI Tumoren [110]. Die Zulassung basiert auf den Erkenntnissen mehrerer klinischer Studien, die unterschiedliche Tumorentitäten mit dMMR-/MSI-H-Status umfassten. Diese Studien bestätigten mehrheitlich, dass dieser Subtyp besonders gut auf eine Immuncheckpoint-Blockade anspricht. Das gute Ansprechen ist auf die hohe Tumorummunogenität und die damit einhergehende hohe T-Zellinfiltration zurückzuführen [110–112].

Neben CTLA-4 und PD1 werden zunehmend weitere Immuncheckpoints hinsichtlich ihrer Eignung als therapeutische Zielstruktur untersucht. Zu diesen zählt u.a. auch LAG-3 [99,113,114]. LAG-3 ist ein Transmembranprotein, das strukturelle Ähnlichkeit mit CD4 aufweist. Es wird durch Antigenstimulation auf aktivierten und erschöpften CD4⁺ und CD8⁺ T- Zellen induziert [115,116] und spielt eine wichtige Rolle bei der Funktion regulatorischer T-Zellen (Tregs) [102,117]. Auf tumor-infiltrierenden T-Zellen wird LAG-3 nach Antigenkontakt und in Anwesenheit von IL-2, IL-7 und IL-12 induziert [118,119]. Die inhibitorische Funktion korreliert stark mit dem Expressionslevel auf der Zelloberfläche [120]. Die Signalübertragung zwischen LAG-3 und seinen Liganden ist komplex und Gegenstand aktueller Forschung. Es zeigte sich jedoch, dass LAG-3 wichtig bei der Informationsvermittlung zwischen CD4 und MHC-II ist und diese entscheidend beeinflussen kann [115,121,122]: Zytokinproduktion, zytolytische Funktion und Proliferation von T-Zellen werden beeinträchtigt, die Immunsuppression hingegen wird gefördert [123–126].

Um in diese Signalübertragung einzugreifen, werden derzeit mehrere klinische Studien bei soliden Tumoren und hämatologischen Neoplasien durchgeführt, die auf LAG-3 abzielen. Der erste blockierende monoklonale AK, welcher in der Klinik angewendet

wurde, war Relatlimab. Dieser humane IgG4- α -LAG-3-AK wird allein oder in Kombination mit PD1/PD-L1 Inhibitoren eingesetzt und hat bereits vielversprechende Ergebnisse gezeigt [127,128]. Trotz dessen ist derzeit noch wenig über die Wirkmechanismen von LAG-3 bekannt [126].

Relatlimab ist bislang in Kombination mit dem PD1-Inhibitor Nivolumab zur Behandlung des metastasierten oder inoperablen Melanoms zugelassen. Die Zulassung basiert auf den Ergebnissen der RELATIVITY-074-Studie [113,129], in der die Fixkombination Opdualag® im Gegensatz zur Nivolumab Monotherapie zu einer statistisch signifikanten Verlängerung des progressionsfreien Überlebens führte [129–131].

Wichtige Entscheidungskriterien bei der Therapieauswahl sind neben der Wirksamkeit auch das Nebenwirkungsprofil und die Nebenwirkungsrate. Das Nebenwirkungsprofil der ICI-Therapie ist hauptsächlich auf Autoimmunphänomene zurückzuführen. Diese manifestieren sich vorrangig in Form von Hautläsionen (46-62%), Kolitiden (22-48%), Hepatitiden (7-33%) und Endokrinopathien (12-34%). Seltener sind Pneumonitiden, Nephritiden, Kardiomyositiden und neurologische Nebenwirkungen. Die Kombinationstherapie von CTLA-4 und PD1-Inhibitoren weist eine höhere Rate an Nebenwirkungen auf, als die jeweilige Monotherapie [132]. Eine entsprechende Überwachung und frühzeitige Erkennung schwerwiegender Therapienebenwirkungen ist daher unerlässlich, um diese erfolgreich behandeln zu können [133,134].

Trotz der bahnbrechenden Erfolge, die seit der Einführung der ICIs erzielt wurden, sprechen nicht alle Patienten auf die Therapie an oder es kommt zu Rückfällen durch Resistenzmechanismen [135,136]. Daher ist es Gegenstand derzeitiger Forschung, diese Mechanismen besser zu verstehen und neben der PD-L1-Expression oder Tumormutationslast (*engl. tumor mutational burden*; TMB), weitere prädiktive Biomarker zur Vorhersage des Ansprechens zu identifizieren [137]. Außerdem ist es eminent wichtig, geeignete Kombinationspartner für eine ICI-Therapie zu finden, die z.B. immunsuppressive Zellen und weitere Komponenten im TME adressieren [138].

1.4.2.1 IMMUNCHECKPOINT-INHIBITOREN & THERAPIE VON MSI TUMOREN

Wie zuvor beschrieben, sprechen dMMR/MSI Tumoren häufig gut auf eine ICI an [139]. Dies lässt sich wie folgt erklären: dMMR/MSI Tumoren haben aufgrund der fehlenden Reparaturmechanismen eine besonders hohe TMB. Dieser hypermutierte Phänotyp

korreliert direkt mit dem Grad der Tumorummunogenität und der Anzahl tumorinfiltrierender zytotoxischer T-Zellen [140–142].

Im Jahr 2021 wurde mit der KEYNOTE-177-Studie der PD1-Inhibitor Pembrolizumab als Erstlinientherapie beim metastasierten dMMR/MSI-CRC mit primär nicht resektablen Metastasen zugelassen. Es zeigte sich im Vergleich zu der Chemo-basierten Standardtherapie eine signifikante Verlängerung des progressionsfreien Überlebens (*hazard ratio* 0.6 (95 % Konfidenzintervall: 0,45 – 0,80)) und ein Gesamtansprechen von knapp 44 % im Vergleich zu 33 % in der Chemotherapie Gruppe, bei geringerer Toxizität (22 % vs. 66 % der Grad 3-4 Nebenwirkungen). Eine signifikante Verlängerung des Gesamtüberlebens konnte nicht gezeigt werden, dennoch sind die bereits genannten Ergebnisse dieser Therapie klinisch relevant [96,143,144].

Auf Grundlage der CheckMate-142-Studie kann die Kombination aus Nivolumab (α -PD1) und Ipilimumab (α -CTLA-4) nach einer Chemotherapie-basierten Erstlinientherapie eingesetzt werden, wenn keine vorausgehende Immuntherapie durchgeführt wurde und es zum Fortschreiten der Erkrankung kommt [110–112].

1.4.3 CHARAKTERISIERUNG DES TUMORMIKROMILIEUS

Das TME besteht aus malignen und nicht-malignen Zellen, welche entweder „pro“- oder antitumoral sind [137,145]. Bei soliden Tumoren besteht das TME aus zwei Hauptkomponenten: Der zelluläre Anteil enthält Fibroblasten, mesenchymale Stammzellen, Adipozyten, Perizyten, Endothelzellen, sowie Immunzellen, darunter myeloide Suppressorzellen (*engl. Myeloid derived Suppressor cells*, MDSCs), Tumorassoziierte Makrophagen (*engl. Tumor-associated macrophages*, TAMs), Tumor-infiltrierende Lymphozyten (*engl. Tumor-infiltrating lymphocytes*, TILs) v.a. Tregs und Tumorassoziierte Neutrophile (*engl. Tumor-associated neutrophils*, TANs) [146,147]. Zu den nicht-zellulären Bestandteilen gehört primär die Extrazelluläre Matrix, die ein Gerüst bildet und die Gewebestruktur aufrechterhält [148]. Gleichzeitig stellt die Extrazelluläre Matrix auch eine mechanische Barriere für infiltrierende Immunzellen dar und verhindert u.a. die Interaktion mit den Tumorzellen [146,149,150]. Über ein Netzwerk von Chemokinen, Zytokinen und anderen Stoffwechselprodukten kommunizieren der Tumor und das TME [137].

Der Aufbau eines tumorfördernden TMEs lässt sich in drei Kategorien einteilen: Regulation von Immunzellen, metabolische Umprogrammierung und hypoxische Einflussnahme [83]. Während der Tumorgenese kommt es zu einem erhöhten Nährstoff- und Sauerstoffbedarf und damit zu einer Vasodilatation. Daraus resultiert ein abnormes Gefäßwachstum, das zu einer Kompression des Stromas führt. Es kommt initial zu einer Verringerung des Blutflusses und zu einer Hypoperfusion. Die Hypoxie reduziert die Immunzellaktivität und fördert ein immunsuppressives TME [137]. Dies stellt eine große Herausforderung im Hinblick auf die Wirksamkeit von Immuntherapien dar [151]. Einige Tumorthérapien richten sich bereits gegen Komponenten des TMEs, beispielsweise der neutralisierende AK Bevacizumab. Bevacizumab bindet an den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor A und hemmt die Angiogenese [152–154].

1.4.3.1 VERÄNDERUNGEN DER HÄMATOPOESE BEI SOLIDEN TUMOREN

Trotz der Erfolge der Immuntherapie zeigt nur ein Teil der Patienten ein dauerhaftes klinisches Ansprechen [155]. Daher ist die Identifizierung von validen prädiktiven Biomarkern und ein noch besseres Verständnis bezüglich der Tumorgenese essentiell, um weitere Ursachen für die ICI-Resistenz aufzeigen zu können [156].

Der Einfluss von soliden Tumoren auf die Hämatopoese ist bislang wenig erforscht [147], einige Studien zeigen jedoch die erhebliche Relevanz bei der Tumorgenese [138,157]. Die Hämatopoese bei Tumorkranken ist durch eine unausgewogene und mangelhafte Produktion von Erythrozyten gegenüber einer verstärkten Myelopoese gekennzeichnet [138]. Tumorzellen sind in der Lage, myeloische Zellen wie MDSCs, Neutrophile und Makrophagen zu rekrutieren und die Myelopoese umzuprogrammieren [158,159]. Sie interagieren über myeloische Stammzellfaktoren mit den Vorläuferzellen [138,147]. Infolgedessen werden die hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen aus dem Knochenmark mobilisiert und in das TME rekrutiert. Die MDSCs sind hauptverantwortlich für das immunsuppressive TME und beeinflussen die unreifen Myeloblasten, welche in den Blutkreislauf gelangen und außerhalb des Knochenmarks in „protumorale“ Immunzellen differenziert werden [157,160]. Proinflammatorische und antitumorale M1-Makrophagen und N1-Neutrophile entwickeln sich zu einem anti-inflammatorischen und „protumoralen“ Phänotyp (M2-Makrophagen/N2-Neutrophile Granulozyten) [161–164]. Außerdem beschreiben einige Studien die Bedeutung der extramedullären Hämatopoese (EMH) bei der Entstehung solider Tumoren [165–167]. Die Hämatopoese außerhalb des Knochenmarks, z.B. in Milz und Leber, unterscheidet

sich funktionell und morphologisch [160,168]. Sie wird durch den Tumor initiiert und beinhaltet eine Akkumulation seltener hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen, insbesondere der Granulozyten und Makrophagen, um das Wachstum und die Versorgung mit myeloischen Zellen zu gewährleisten. Eine große Anzahl von TAMs und TAN-Vorläufern infiltrieren das Tumorstroma. Durch einen Feedbackmechanismus werden immunsuppressive Faktoren freigesetzt und an Knochenmark und Milz abgegeben, um die Tumorprogression zu fördern (Abb. 6) [165,169]. Bisher ist jedoch nur wenig über die EMH bekannt und sie wird häufig als Metastasierung fehldiagnostiziert [160,166,167]. Das Phänomen ist aber ein wichtiger Bestandteil des Tumorwachstums. Daher haben wir begonnen, uns intensiver mit der Hämatopoese im Knochenmark zu beschäftigen. Die Charakterisierung der Mechanismen, die der Rekrutierung von tumor-assoziierten myeloischen Zellen zugrunde liegen, könnten Ziele für neue Krebstherapien aufzeigen [138,159].

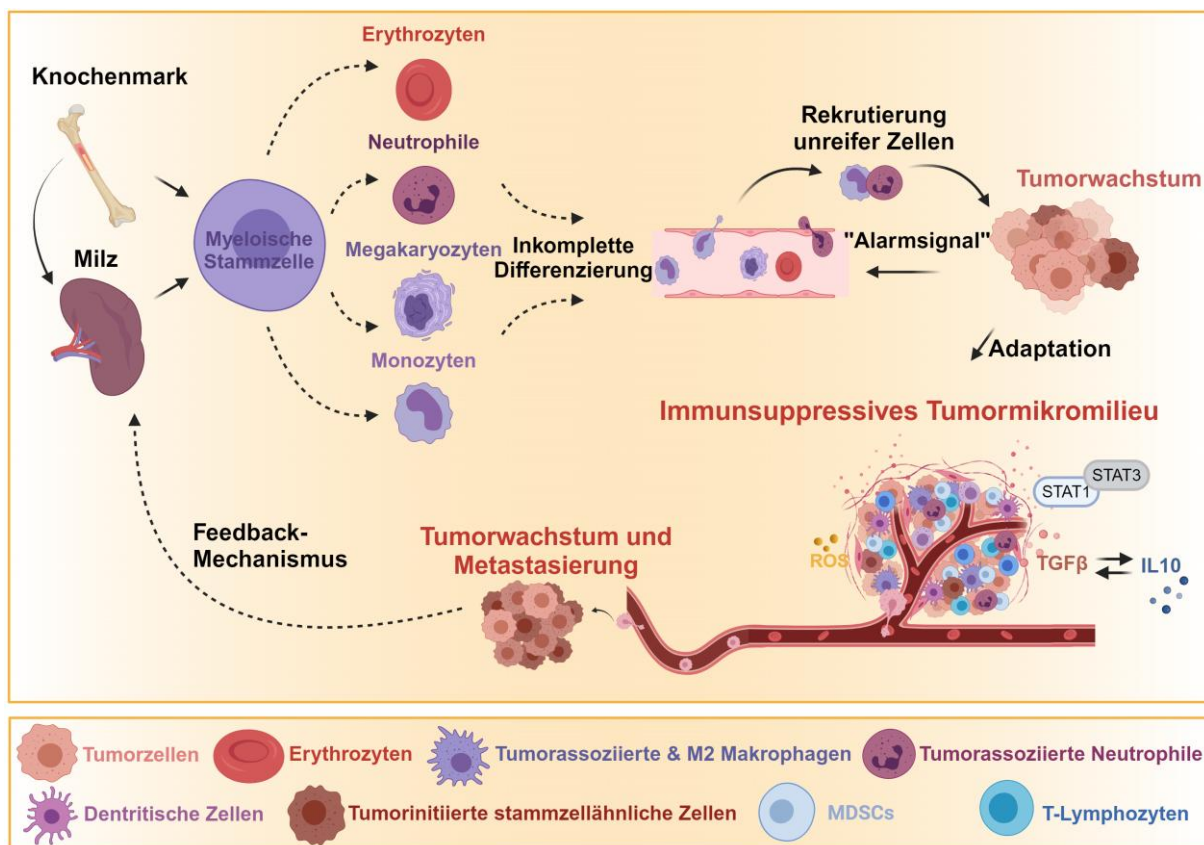


ABBILDUNG 6: TUMORASSOZIIERTE MYELOPOESE IN KNOCHENMARK UND MILZ

ZIEL DES TUMORS IST DIE REKRUTIERUNG MYELOISCHER ZELLEN IN DAS TME. DAFÜR INITIIERT DER TUMOR DIE EMH IN DER MILZ, UM DIE VERSORGUNG MIT MYELOISCHEN ZELLEN SICHERZUSTELLEN. DIESE UNREIFEN ZELLEN INFILTRIEREN DEN TUMOR UND WERDEN IM TME SO VERÄNDERT, DASS SIE EINEN IMMUNSUPPRESSIVEN PHÄNOTYP ANNEHMEN. GLEICHZEITIG WERDEN IMMUNSUPPRESSIVE FAKTOREN AUSGESCHÜTTET (TGF-BETA, IL-10) UND SIGNALE AN DAS KNOCHENMARK UND DIE MILZ ZURÜCKGESENDET. DIESER FEEDBACK-MECHANISMUS VERSCHAFFT DEN TUMOREN EINEN WACHSTUMSVORTEIL UND TRÄGT ZU EINEM SCHLECHTEN ÜBERLEBEN BEI. ERSTELLT MIT BIORENDER.COM.

II. ZIELSETZUNG

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war es, die Wirksamkeit der PD1-Blockade zu bestätigen und die Effektivität des neueren α -LAG-3-AKs bei dMMR/MSI-H-assoziierten Tumoren am präklinischen $Msh2^{loxP/loxP;TgTg(Vil1-cre)}$ Tumorgenese-Modell zu untersuchen. Bereits in Vorarbeiten konnte die Wirksamkeit des α -PD-L1-AKs an diesem Modell aufgezeigt werden. Der Fokus lag dabei auf der gezielten Untersuchung von ICIs, um deren Potential und die zugrundeliegenden Wirkmechanismen besser zu verstehen.

Zur Beurteilung der effizienten Behandlung wurde das Allgemeinbefinden unter der Therapie sowie das Gesamtüberleben und das Tumorstadium longitudinal erfasst. Für die Erhebung der immunologischen Charakteristika wurden durchflusszytometrische Analysen von peripherem Blut, Gastrointestinalen Tumoren und der Milz durchgeführt, die Genexpression verschiedener Gene in Tumoren und Milz analysiert und das TME anhand von immunhistochemischen Verfahren quantifiziert.

Außerdem wurde erstmalig der Einfluss der beiden ICIs auf die Hämatopoese untersucht und dies mit der Hämatopoese bei tumorfreen und bei tumortragenden Kontrollmäusen verglichen. Hierzu wurden Knochenmarkszellen morphologisch differenziert und durchflusszytometrische Analysen durchgeführt.

Durch diesen Ansatz erhoffen wir uns, zur Entwicklung neuer therapeutischer Konzepte für Patienten mit LS beizutragen und die Möglichkeiten der Immuntherapien zu optimieren. Im Detail liegt der Fokus vor allem auf einem besseren Verständnis zu den häufig auftretenden Resistenzmechanismen und Non-Respondern, um in Folgeansätzen dies mit gezielten Kombinationspartnern zu vermeiden.

III. MATERIAL

3.1 LABORGERÄTE

TABELLE 1: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN LABORGERÄTE

LABORGERÄTE	HERSTELLER	HAUPTSITZ
ABI Prism 7500 Gene Analyzer	Thermo Fisher Scientific GmbH	Waltham, USA
Abzug Captair™	Erlab simpler safer	Val de Reuil Cedex, Frankreich

MATERIAL

Biologische Sicherheits- werkbank Herasafe™	Thermo Fisher Scientific GmbH	Waltham, USA
Dewar-Transportgefäß	KGW Isotherm	Karlsruhe Deutschland
Eismaschine AF 80	Scotsman	Mailand, Italien
FACS Cytex™ Aurora	Cytex Biosciences B.V.	Fremont, USA
Feuchte Kammer	UMR-Eigenbau	Rostock, Deutschland
Freezing Container, Nalgene™ Mr. Frosty	Thermo Fisher Scientific GmbH	Waltham, USA
Gamma-Bestrahlungsan- lage	Gammabestrahlungsanlage IBL 673	Hamburg, Deutschland
Gefrierschrank -80 °C	Liebherr Deutschland GmbH	Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -20°C	Bosch	Gerlingen, Deutschland
Isoflurananlage (PET/CT)	Groppler	Deggendorf, Deutschland
Kryostat CM1850 S	Leica	Wetzlar, Deutschland
Kühl- / Gefrierschrank (4° / -20 °C)	Elektrolux	Stockholm, Schweden
Kühl- / Gefrierschrank (4° / -20 °C)	Liebherr	Bulle, Schweiz
Glasküvetten	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Light cycler Vii7	Applied Biosystems	Foster City, USA
Lichtmikroskop Nikon E- clipse TE200	Nikon	Tokio, Japan
Mikroskop Evos XL Core	Thermo Fisher Scientific GmbH	Waltham, USA
Mikroskop Primovert	Zeiss	Jena, Deutschland
Multipette™ M4	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
NanoDrop™ ND 1000	Thermo Fisher Scientific GmbH	Waltham, USA
Narkoseinduktionskammer	Patterson Scientific	Waukesha, USA

MATERIAL

Neubauer Zählkammer	Marienfeld	Lauda-Königshofen, Deutschland
PET/CT	Siemens	München, Deutschland
Pipetboy (Accu-Jet™ pro)	Brand	Wertheim, Deutschland
Pipetten research (2,5 µl – 1000 µl)	Eppendorf SE	Hamburg, Deutschland
Präzisionswaage 572 MP-300	KERN & SOHN GmbH	Balingen, Deutschland
REAX top™ Vortexgerät	Heidolph	Schwabach, Deutschland
Sprout™mini-Zentrifuge	Biozym Scientific GmbH	Vernon Hills, USA
Stickstofftank Apollo™	KGW Isotherm	Karlsruhe Deutschland
Thermal Cycler C1000™	Bio-Rad Laboratories GmbH	Hercules, USA
Vortex Mixer	Uniequip Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH	Planegg, Deutschland
Werkbank Herasafe™ (steril)	Thermo Fisher Scientific GmbH	Waltham, USA
ZEISS Elyra 7 Confocal Laser Mikroskop	Zeiss	Jena, Deutschland
Zentrifuge 5418	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Rotina 35R	Hettich	Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Rotina 38R	Hettich	Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Rotina 420	Hettich	Tuttlingen, Deutschland
Zytozentrifuge Thermo Shandon Cytospin 3	Hyland Scientific	Stanwood, USA

3.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN

TABELLE 2: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN VERBRAUCHSMATERIALIEN

VERBRAUCHSMATERIALIEN	HERSTELLER	HAUPTSITZ
96-Well PCR-Platte	Sarstedt AG & Co	Nümbrecht, Deutschland
96-Well V-bottom Platte	Corning	New York, USA

MATERIAL

96-Well F-bottom Platte Cell-star™	Greiner bio-One GmbH	Kremsmünster, Österreich
AESCULAP Skalpellklinge	B. Braun SE	Melsungen, Deutschland
Aluminiumfolie 20 µm Stärke	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Cellspin Cytoträger 311-100	Tharmac GmbH	Wiesbaden, Deutschland
Cell Strainer EASY strainer™ 100 µm	Greiner Bio-One GmbH	Kremsmünster, Österreich
CELLSTAR Serologische Pipette 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One GmbH	Kremsmünster, Österreich
Chirurgische und anatomische Pinzette	Aesculap AG	Tuttlingen, Deutschland
Combitips advanced, steril, 5 ml, 10 ml	Eppendorf SE	Hamburg, Deutschland
Curwood Parafilm™	Bemis	Neenah, USA
Dako Pen	Dako	Glostrup, Dänemark
Deckgläser (18x18mm)	Gerhard Menzel GmbH	Braunschweig, Deutschland
Einmalhandschuhe Peha-Soft nitrile, unsteril	Paul Hartmann AG	Heidenheim an der Brenz, Deutschland
End-to-End Kapillare 20 µl	Sarstedt AG & Co	Nümbrecht, Deutschland
FACS Tubes 5ml	Sarstedt AG & Co.KG	Nümbrecht, Deutschland
Falcon™ 15ml, 50ml	Greiner Bio-One GmbH	Kremsmünster, Österreich
Holzstäbchen (40x16x10mm)	Abedd	Wien, Österreich
Maus-Iglus	ANT-Tierhaltungsbedarf	Buxtehude, Deutschland
Mauskäfige Typ III	Zoonlab GmbH	Castrop-Rauxel, Deutschland
MicroAMP™ Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific GmbH	Waltham, USA
Geschreddertes Seidenpapier	Verbandsmittel GmbH	Frankenberg, Deutschland

MATERIAL

Nunc™ KryoTube™ Vials	Thermo Fisher Scientific GmbH	Waltham, USA
Objektträger (76 x 26mm)	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH	Edermünde, Deutschland
Omnifix Luer Lok Solo 5 ml	B. Braun SE	Melsungen, Deutschland
Omnifix-F Luer Solo 1 ml	B. Braun SE	Melsungen, Deutschland
Papierrollen (75 x 38 mm)	Ssniff–Spezialdiäten GmbH	Soest, Deutschland
Pasteur Pipetten (150 mm)	Thermo Fisher Scientific GmbH	Waltham, USA
PCR-Reaktionsgefäß 0,2 ml	Bio-Rad Laboratories GmbH	Hercules, USA
PCR-Reaktionsgefäß-Deckel	Bio-Rad Laboratories GmbH	Hercules, USA
Pellets (10mm)	Ssniff-Spezialdiäten GmbH	Soest, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf SE	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen mit Filter	Biozym Scientific GmbH	Vernon Hills, USA
Reaktionsgefäß 0,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß, braun 1,5 ml; 2ml	Sarstedt Ag & Co	Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße, safe-lock tubes 1,5 ml; 2ml	Eppendorf SE	Hamburg, Deutschland
Skalpellschlingen, steril	B. Braun SE	Tuttlingen, Deutschland
Spritzen, steril	B. Braun SE	Melsungen, Deutschland
Tissue-Tek Cryomold™	Sakura Finetek Europe B.V.	Alphen aan den Rijn, Niederlande
U-100 Insulin-Spritzen	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg, Deutschland

3.3 CHEMIKALIEN

TABELLE 3: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN CHEMIKALIEN

CHEMIKALIEN	HERSTELLER	HAUPTSITZ
96 % Ethanol	Walter CMP	Kiel, Deutschland

MATERIAL

β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Deutschland
Aqua dest.	SGWater-Anlage	Barsbüttel, Deutschland
BacilloI AF	Hartmann	Heidenheim, Deutschland
BD Horizon Brilliant Stain Buffer	BD Bioscience	Heidelberg, Deutschland
Beads (fluorescent micro-sphere beads (1,4 x 10⁵ beads/ml, Größe 10 µm))	Polysciences	Warrington, USA
BSA (bovines Serumalbumin)	Serva	Heidelberg, Deutschland
Dako Fluorescent Mounting Medium	Dako	Glostrup, Dänemark
DFS-Taq DNA Polymerase	Bioron	Römerberg, Deutschland
DMSO (dimethylsulfoxide)	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
dNTP 10 mM	Bioron	Römerberg, Deutschland
FACSClean Solution	BD Biosciences™	Heidelberg, Deutschland
FACSFlow™	BD Biosciences™	Heidelberg, Deutschland
FACSSuite™ CS&T Research Beads	BD Biosciences™	Heidelberg, Deutschland
FKS (Fetales Kälberserum)	Pan-Biotech	Aidenbach, Deutschland
Isofluran Forane™	AbbVie GmbH & Co. KG	Wiesbaden, Deutschland
Isopropanol	Walter CMP	Kiel, Deutschland
Ketamin 10 %	Bela-pharm GmbH & Co.KG	Vechta, Deutschland
Methanol	JT Baker	Deventer, Niederlande
PFA (Paraformaldehyd)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Deutschland
Phosphat buffered saline (pH 7,4)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Deutschland
Reaction Buffer for DFS-taq, High Taq	Bioron	Römerberg, Deutschland

Reverase™ Reverse Transkriptase	Bioron	Römerberg, Deutschland
RNAse A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Deutschland
Roti-Mount FluorCareDAPI	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Tissue Tek O.C.T. Compound Containing	Sakura Finetek Europe	Alphen aan den Rijn, Niederlande
TritonX-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Deutschland
True Nuclear Transcription Buffer Set	BioLegend	San Diego, USA
Trypanblau (0,02 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen, Deutschland

3.4 MEDIEN, PUFFER, LÖSUNGEN

TABELLE 4: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN MEDIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN

MEDIUM, PUFFER, LÖSUNG	BESTANDTEILE
2 % BSA in 1x PBS	1 g BSA in 50 ml 1x PBS
5 % BSA in 1x PBS	2,5 g BSA in 50 ml 1x PBS
70 % Ethanol	36 ml 96 % Ethanol, 15 ml Aqua dest.
0,5 mM EDTA-Lösung (pH 8)	186,1 g EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure); 800 ml A. dest; NaOH zur pH-Einstellung
BD Horizon™ Brilliant Stain Buffer	<i>ready-to-use</i>
Erythrozyten-Lyse-Puffer	0,16 M Ammoniumchlorid; 0,17 M TRIS (Verhältnis 1:10)
FACS-staining Buffer	2 % BSA, 2 mM EDTA in 1x PBS
FluoroFix™ Buffer (BioLegend)	<i>ready-to-use</i>
Freezing Medium	45 ml FKS (90 % final); 5 ml DMSO (10 % final)
Giemsa	<i>ready-to-use</i>
10x Intracellular Staining Perm Wash Buffer	5 ml Buffer; 45 ml A.dest
May-Grünwald Lösung	<i>ready-to-use</i>

MATERIAL

Mikroskopie Immersionsöl	<i>ready-to-use</i>
1x PBS (<i>phosphate buffered saline</i>)	80,00 g Natriumchlorid; 2,00 g Kaliumchlorid; 18,00 g Dinatriumhydrogenphosphat; 2x H ₂ O
Puffer pH 7,2	1 Puffertablette in 1 L Wasser
True-Nuclear™ 1x Fix Concentrate	10 ml 4x Fix Concentrate ; 30 ml Fix Diluent
True-Nuclear™ 1x Perm Buffer	5 ml 10x Perm Buffer ; 45 ml Aqua dest.
Trypanblau-Lösung	0,16 % (W/V) Trypan-Blau; 150 mM NaCl
TrueStain Monocyte Blocker™	<i>ready-to-use</i>

3.4.1 KITS

TABELLE 5: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN KITS

KITS	HERSTELLER	HAUPTSITZ
RNeasy Mini Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland
SensiFAST Probe Lo-ROX Kit	Bioline	Memphis, Tennessee, USA
Wizard™ Genomic DNA Purification Kit	Promega	Woods, USA

3.5 ANTIKÖRPER

Eine Übersicht der verwendeten Antikörper findet sich im Anhang unter Punkt 9.2.

3.6 TAQMAN™ ASSAYS UND PRIMER

Eine Übersicht der verwendeten Taqman™ Assays und Primer findet sich im Anhang unter Punkt 9.3.

3.7 SOFTWARE

TABELLE 6: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN SOFTWARE-PROGRAMME

SOFTWARE-PROGRAMM	VERWENDUNG
BioRender	Illustrationen
GraphPad PRISM Software, Version 8.0.2	Statistiken, Grafiken
SpectroFlow™ Version 2.2.0.3	Analyse und Darstellung der FACS Cytex Aurora™-Daten

FlowJo™ Version 10.6.1	Analyse und Darstellung der FACS Cytex Aurora™-Daten
NanoDrop 1000 Thermo Fisher Scientific	Messung von RNA
Inveon Research Workplace 4.2 Software	PET/CT-Auswertung
Microsoft Office 2021 (Word, Excel, PowerPoint)	EDV-Programme
Pubmed	Literaturrecherche
Zotero	Literaturverzeichnis

3.8 STATISTIK

Für die statistischen Analysen und die graphische Darstellung der Datensätze wurde *GraphPad PRISM 8.0.2* genutzt. Metrische, normalverteilte Ergebnisse wurden durch Angabe von Mittelwert und Standardabweichung (*engl. standard deviation*, SD) charakterisiert. Die Signifikanz wurde auf Werte unter $p < 0,05$ festgelegt. Zuerst wurde die Normalverteilung mittels *Shapiro-Wilk*-Test getestet. Im Fall der Normalverteilung wurde ein *one-way ANOVA (Tukey's or Sidak's multiple comparison)* durchgeführt. Wenn keine Normalverteilung vorlag, wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet.

Kaplan-Meier-Überlebenskurven wurden mittels *Log-rank*-Tests (Mantel-Cox-Test) zur Analyse von Überlebenszeiten genutzt.

Bei der Phänotypisierung mittels Durchflusszytometrie wurden Ausreißer entfernt, wenn die Daten nicht im Bereich des Durchschnitts plus/minus zweimal die Standardabweichung lagen. Zur Quantifizierung durchflusszytometrischer Daten wurden nur lebende Zellen analysiert und tote Zellen mittels Gates aussortiert. Es wurden 100.000 Zellen pro Probe erfasst.

Folgende Symbole wurden verwendet, um statistisch signifikante Unterschiede darzustellen: * Tag 0 vs. Endpunkt; # - ICI vs. Isotyp; \$ - α -PD1 vs. α -LAG-3; § - Tumorfrei vs. frühes vs. spätes Tumorstadium (nur bei Analysen des Knochenmarks).

IV. METHODEN

4.1 MSH2^{LOXP/LOXP-VILLINCRE} KNOCKOUT MAUSMODELL

Bei dem *Msh2*^{loxP/loxP-VillinCre} knockout Mausmodell wird das MMR-System durch einen gewebsspezifischen Gendefekt im Exon 12 des *Msh2*-Gens inaktiviert. Dafür werden *Msh2*^{LoxP}-Mäuse mit *Ella-Cre*-Rekombinase-transgenen Mäusen gepaart (Abb. 7). Das *loxP* markiert dabei den Zielbereich auf dem Gen, welcher entfernt werden soll. Die Rekombinase *Cre* ist ein Enzym, welches die DNA gezielt spalten und wieder zusammensetzen kann [170,171]. Durch die Paarung der beiden Mäuse wurden diese beiden Eigenschaften zusammengeführt. Das *Cre* nutzt das *loxP* als spezifischen Marker, um das ausgewählte Zielgen zu eliminieren. Bei dem *Msh2*^{loxP/loxP;TgTg(Vil1-cre)} Modell wird somit das *Msh2*-Protein entfernt. Damit der Defekt nur spezifisch in der Darmschleimhaut auftritt, ist ein Promotor notwendig, welcher vor dem *Cre* sitzt, sodass die Rekombinase ausschließlich gewebsspezifisch arbeitet [172]. Daher wird das *Msh2*^{LoxP}-Allel mit dem *Villin-Cre*-Transgen kombiniert. *Villin* ist ein Aktin-bindendes Protein, welches in Epithelzellen vorkommt, die einen Bürstensaum bilden und für die Nährstoffaufnahme verantwortlich sind [173]. Die dMMR ist somit auf das Darmepithel beschränkt und die Mäuse entwickeln ausschließlich intestinale Neoplasien. Dadurch wird das klinische Pendant des LS im präklinischen Modell repräsentiert. Die Mäuse zeigen zunächst ein normales Wachstum und entwickeln im Alter von neun Monaten (+/- 1,1 Monate) gastrointestinale Tumoren [170].

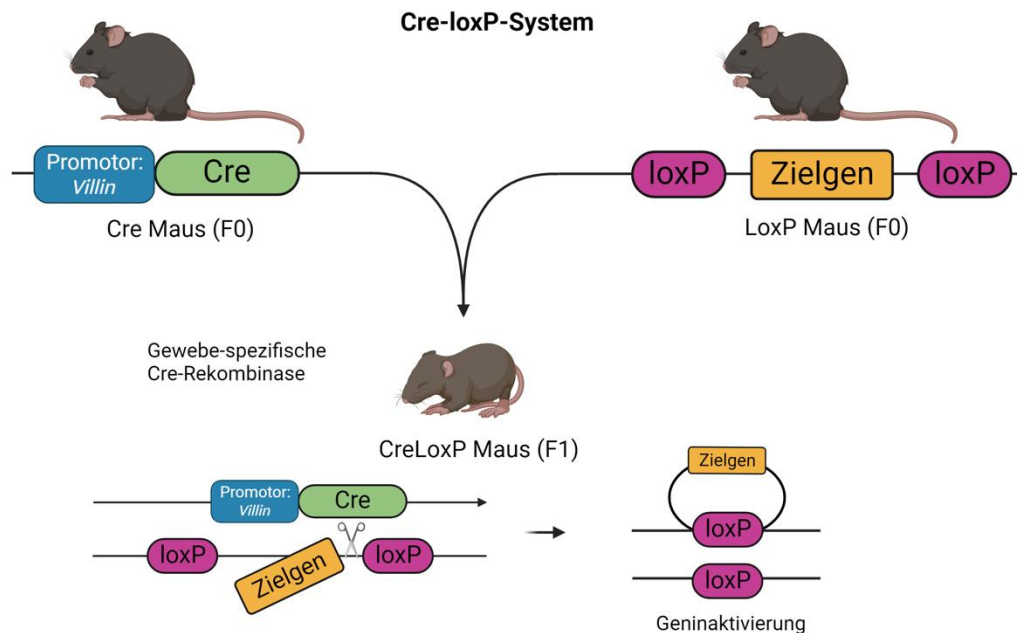


ABBILDUNG 7: SCHEMA ZUM CRE-LOXP-SYSTEM

DIE CRE-REKOMBINASE ERKENNT DIE LOXP-STELLEN VON SPEZIFISCHEN DNA-SEQUENZEN UND KANN SO DAS MARKIERTE ZIELGEN HERAUSCHNEIDEN. DADURCH WIRD DAS GEN INAKTIVIERT [180]. DURCH DEN PROMOTOR VILLIN ARBEITET DIE REKOMBINASE NUR IN EPITHELZELLEN, DIE EINEN BÜRSTENSAUM EXPRIEREN. ERSTELLT MIT BIORENDER.COM.

4.2 TIERZUCHT UND -HALTUNG

Die deutsche Behörde Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (7221.3-1-062/19) hat gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz und der EU-Richtlinie 2010/63/EU alle Tierversuche genehmigt.

Die Zuchtpaare stammten aus der spezifisch pathogenfreien Haltung des Labors für Molekulare Karzinom Chemo-Prävention der Medizinischen Universität Wien. Die weitere Verpaarung erfolgte in der *Core Facility* Zentrale Versuchstierhaltung des Rudolph-Zenker-Instituts für experimentelle Chirurgie (Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. B. Vollmar) unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen. Die Versuche erfolgten an homozygoten $Msh2^{loxP/loxP;TgTg(Vil1-cre)}$ Mäusen. 100 % der Nachkommen sind homozygot, sodass nahezu alle gezüchteten Tiere in die Versuchsdurchführung eingeschlossen werden konnten. Es wurden gleichermaßen männliche und weibliche Tiere in den Versuch eingeschlossen.

Die lebenden $Msh2^{loxP/loxP;TgTg(Vil1-cre)}$ Nachkommen wurden mittels Ohrlochbiopsie im Alter von 3-4 Wochen genotypisiert, um zu bestätigen, dass die Nachkommen eine

Exon 12 Mutation tragen, da das Risiko besteht, dass Mutationen verloren gehen. Anschließend folgte die weitere Zucht bis zu einem Alter von 5-6 Monaten. Nach Überschreiten dieses Alters, wurden die Tiere aus der Zucht genommen und für die geplanten Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

Während ihrer gesamten Lebenszeit erhielten alle Tiere Maus-Iglus, Nistmaterial, Papierrollen und Holzstäbchen. Die Mäuse wurden in Typ-III-Käfigen bei einem Dunkel-Licht-Zyklus von 12 Stunden, einer Temperatur von 21 +/- 2 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 +/- 20 % und mit Futterpellets und autoklaviertem Leitungswasser *ad libitum* gehalten. Sobald die Mäuse in eine Versuchsgruppe überführt wurden, erhielten sie eingeweichte Pellets, um die Nahrungsaufnahme zu erleichtern.

4.3 VERSUCHSAUFBAU UND MONITORING

Mit einem medianen Alter von neun Monaten entwickeln $Msh2^{loxP/loxP;TgTg(Vil1-cre)}$ -Mäuse mit einer Inzidenz von über 90 % einen gastrointestinalen Tumor. Das mediane Gesamtüberleben beträgt 12 Monate, daher wurden die Tiere über einen Zeitraum von maximal 14 Monaten kontinuierlich überwacht. Tiere mit Verdacht auf eine gastrointestinale Tumorgenese wurden mittels Positronen-Emissions-Tomographie/Computertomographie (PET/CT) gescreent, um das Tumorwachstum darzustellen. Bei dem Nachweis eines Tumors wurden sie randomisiert in folgende Kontroll- und Therapiegruppen überführt:

- Keine Intervention (Kontrollgruppe, n = 10)
- Isotyp-AK (Kontrollgruppe, intraperitoneale Applikation (i.p.) 2,5 mg/kg Körpergewicht, alle zwei Wochen, insgesamt dreimal (q2Wx3), n = 9)
- α -PD1-AK (i.p., 2,5 mg/kg Körpergewicht, q2Wx3, n = 9)
- α -LAG-3-AK (i.p., 2,5 mg/kg Körpergewicht, q2Wx3, n = 8)

Die Mäuse wurden täglich visitiert und der Gesundheitszustand nach einem standardisierten *Scoring*-System beobachtet. Einmal wöchentlich erfolgte die dokumentierte Gewichtskontrolle. Alle sechs Wochen wurde eine Blutentnahme mit der Entnahme von maximal 100 μ l Vollblut durch Punktion des retrobulbären Venenplexus durchgeführt. Im Verlauf folgten erneute PET/CT-Messungen, um den Verlauf der Tumorprogression zu bestimmen. Je nach Tumorentwicklung und Allgemeinzustand wurden die

Mäuse nach vordefinierten Kriterien durch humane Endpunkte euthanasiert. Dazu gehörten ein Gewichtsverlust von > 15 % innerhalb von vier Wochen, ein Analprolaps, eine gekrümmte Haltung, verminderte Fellpflege oder ein verändertes Sozialverhalten wie Isolation oder aggressives Benehmen. Zum Versuchsende wurden erneut Blutproben sowie die Tumoren, die Milz und das Knochenmark entnommen und die Gewebe für weitere Untersuchungen asserviert. Abbildung 8 veranschaulicht den durchgeführten Versuchsablauf.

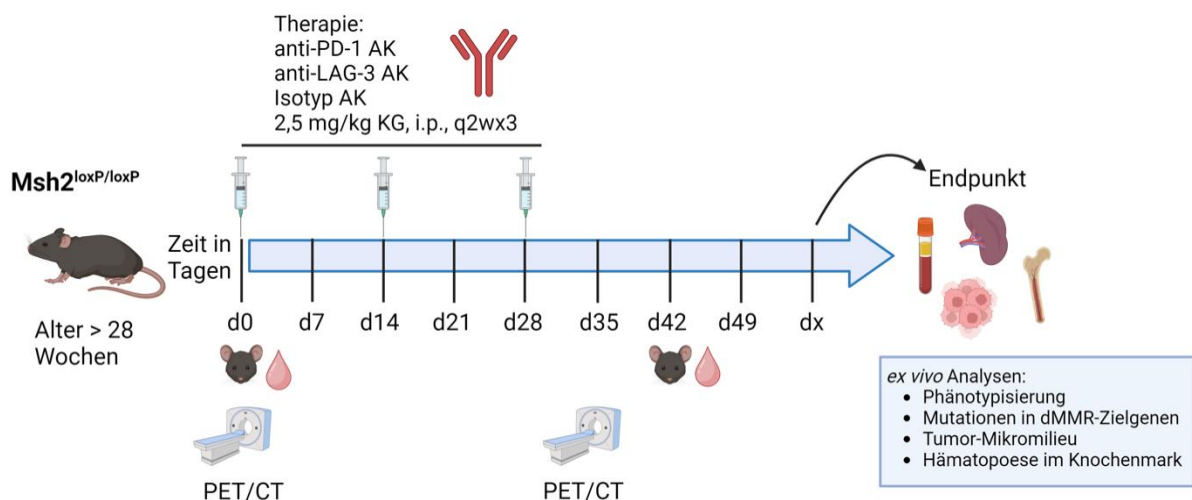


ABBILDUNG 8: VERSUCHSAUFBAU

DARGESTELLT IST DER BEHANDLUNGSABLAUF UND DIE THERAPEUTISCHE DURCHFÜHRUNG. ERSTELLT MIT BIORENDER.COM.

Des Weiteren wurden bei den Untersuchungen zur Veränderung der Hämatopoese heterozygote *Mlh1*-Mäuse als Kontrollmäuse genutzt. Sie entwickeln in dem gegebenen Zeitrahmen keine Tumoren und spiegeln somit die menschliche Situation eines gesunden dMMR-Keimbahnträgers wider.

4.4 BILDGEBUNG MITTELS PET/CT-MESSUNGEN

Wie unter Punkt 4.3 erwähnt, wurde die Tumorgenese und -progression mittels ¹⁸F-Fluoresoxyglucose (FDG)-PET/CT überwacht und so an definierten Zeitpunkten die Anzahl- und Stoffwechselaktivität der Tumoren bestimmt, um indirekt auf die Tumormasse zu schließen. Die Kombination von der PET und der CT führt metabolische (FDG-PET) und morphologische (CT) Informationen in einem Untersuchungsengang zusammen. Das Prinzip der PET ist die Koinzidenzmessung von Vernichtungsstrahlen aus dem Zerfall von radioaktiven Isotopen in Verbindung mit einem Molekül als Tracer. Damit können Radioaktivitätsverteilungen in bestimmten Geweben dargestellt und

quantifiziert werden. Bei der FDG-PET wird ein metabolisch aktives Glukosemolekül durch Kopplung an das radioaktive Isotop ^{18}F -Fluor radioaktiv markiert. Gewebe mit einer erhöhten Aktivität des Glukosetransporters (Glut I) und der Hexokinase nehmen deutlich mehr Fluordesoxyglucose auf. Dazu gehören unter anderem Herz und Gehirn, aber auch maligne Zellen. Die FDG-PET ist daher eine sehr sensitive Methode zur Diagnostik, zum Staging und zur Überprüfung des Therapieansprechens.

Die CT nutzt eine Röntgenröhre als externe Transmissionsquelle als Strahlungsquelle und ist mit einem Detektorfeld kombiniert. Dadurch kann die Abschwächung der Strahlung durch den Körper gemessen und morphologische/anatomische Vorgänge dargestellt werden. Die CT dient somit der räumlichen Charakterisierung, der Lokalisation und der Ausdehnung von Tumoren [174–177].

Vor der Durchführung dieser Bildgebung wurden die Mäuse mittels Isofluran inhalativ in Narkose versetzt und über einen Mikrokatheter in die Schwanzvene ^{18}F -FDG gewichtsabhängig appliziert. Durchgeführt wurde diese Methode von den Mitarbeitern der *Core Facility* „Multimodale Kleintierbildgebung“ des Rudolf-Zenker-Instituts für Experimentelle Chirurgie.

Die Software Inveon™ Research Workplace™ wurde für die Auswertung der Aufnahmen genutzt und der Tumor in verschiedenen Schnittbildebene markiert. Dadurch konnte das Volumen in mm^3 der *standardized uptake value* (SUV) berechnet werden. Hatte eine Raumforderung ein Volumen von $\geq 30 \text{ mm}^3$, wurde die Verdachtsdiagnose Tumor bestätigt und die Tiere in die jeweiligen Therapiegruppen eingeschlossen. Nach fünf Wochen erfolgte ein neuer Scan mittels PET/CT, um den Verlauf des Tumorstwachstums zu beurteilen.

4.5 AUFARBEITUNG VON ORGANEN

Die Mäuse wurden nach bestimmten Kriterien (siehe Punkt 4.3) durch Ketamin/Xylaxin (90/6 mg/kg Körpergewicht, i.p.) und Entbluten getötet. Nach medianer Laparotomie wurden Tumoren, Milz, Blut und Knochenmark entnommen und in sterilem 1x PBS in Falcons auf Eis transportiert. Im Folgenden wurden die Gewebe unter der sterilen Werkbank aufgearbeitet und als Einzelzellsuspension asserviert. Jede Aufarbeitung wurde genauestens protokolliert, dokumentiert und die Gewebeproben exakt beschriftet.

4.5.1 AUFARBEITUNG VON BLUT

Blutentnahmen erfolgten während des Versuchs am lebenden Tier, sowie bei Versuchsabschluss. Das Blut wurde bei 8000 x g für 8 min zentrifugiert und das Plasma vorsichtig abgenommen und in zwei separate 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Das Plasmavolumen wurde dokumentiert und das Plasma bei -80°C gelagert.

Auf das Vollblut wurden entweder 1 ml PBS oder 1 ml Freezingmedium gegeben, je nachdem, ob die durchflusszytometrische Phänotypisierung direkt im Anschluss oder zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt wurde. Erfolgte die Phänotypisierung direkt im Anschluss, so wurde auf das Vollblut 1 ml PBS gegeben und auf Eis gestellt. War dies nicht der Fall, wurde das Vollblut mit 1 ml Freezingmedium (FKS + 10 % DMSO) versetzt und im Mr. Frosty bei -80° C gelagert. Am darauffolgenden Tag wurden die Proben aus dem Mr. Frosty in einen Stickstofftank überführt und dort in der Gasphase asserviert.

4.5.2 AUFARBEITUNG VON DARMTUMOREN

Unter der Sterilbank wurde der Tumor in einer Petrischale mithilfe einer chirurgischen Pinzette und einem Skalpell in zwei identisch große Teile geschnitten. Die eine Hälfte wurde zum späteren Anfertigen von Gefrierschnitten mit Cryomatrix eingebettet, in ein Cryomold gegeben und in Flüssigstickstoff schockgefroren. Anschließend wurde das Cryomold in Alufolie gewickelt und im Gefrierschrank bei -80°C aufbewahrt.

Die andere Hälfte des Tumors wurde zur Gewinnung von Einzelzellsuspensionen homogenisiert. Dazu wurde das Gewebestück durch ein 100 µm *Cell Strainer* Sieb gegeben, welches auf einem 50 ml Falcon aufgesetzt wurde. Mit dem Stempel einer 5 ml Spritze wurde das Gewebe durch das Sieb gedrückt und dies mit sterilem PBS gewaschen. Diese Schritte wurden vier- bis fünfmal wiederholt. Die gesiebte Zellsuspension wurde anschließend bei 200 x g für 8 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 2 ml PBS gelöst und auf zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt. Dabei wurde ein Reaktionsgefäß für die anschließende durchflusszytometrische Phänotypisierung auf Eis gestellt und das andere Reaktionsgefäß mit der Zellsuspension bei 8000 x g für 8 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und bei -80°C für die nachfolgende RNA-Isolation aufbewahrt.

4.5.3 AUFARBEITUNG VON MILZGEWEBE

Das Milzgewebe wurde analog zum Tumorgewebe durch ein 100 µm *Cell Strainer* Sieb gegeben, durch den Stempel einer 5 ml Spritze in ein 50 ml Falcon gesiebt und mittels sterilem PBS durch das Sieb gespült. Dieser Schritt wurde vier- bis fünfmal wiederholt und anschließend bei 200 x *g* für 8 min zentrifugiert sowie der Überstand dekantiert. Anschließend wurde das Pellet in 5 ml sterilem Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 ml sterilem PBS abgestoppt und die Suspension bei 200 x *g* für 8 min zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet in 20 ml sterilem PBS resuspendiert, die Zellen gezählt und die Anzahl notiert. 1 ml der Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für die anschließende durchflusszytometrische Phänotypisierung auf Eis gestellt. Von der verbleibenden Zellsuspension wurden 60 x 10⁶ Zellen entnommen. Diese wurden bei 200 x *g* für 8 min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Im Folgenden wurde das Pellet in 3 ml Freezingmedium (FKS + 10% DMSO) gelöst und auf drei Kryoröhrchen gleichmäßig verteilt. Diese Kryoröhrchen wurden in einen Mr. Frosty überführt und wie unter 4.5.1. weiter prozessiert.

Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer

Um die Zellzahl zu ermitteln, wurden 50 µl der Zellsuspension in eine unsterile 96-well Platte überführt und mit 50 µl Trypanblau versetzt. Nachfolgend wurde die Zählkammer mit 10 µl der Suspension befüllt und unter dem Lichtmikroskop angeschaut. Dabei wurden zwei große Quadrate mit jeweils 16 kleinen Quadraten ausgezählt und anschließend die Gesamtzellzahl mit der folgenden Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{\text{Anzahl der gezählten lebenden Zellen}}{\text{Anzahl der ausgezählten Großquadrate}} * \text{Verdünnung (2)} * \text{Kammerfaktor (10}^4\text{)}$$

Anschließend wurde die ermittelte Zellzahl/ml mit dem Gesamtvolumen multipliziert, um die finale Gesamtzellzahl zu bestimmen.

4.5.4 AUFARBEITUNG VON KNOCHENMARK

Zur Gewinnung von Knochenmarkzellen wurden Femur- und Tibiaknochen entnommen. Die langen Röhrenknochen wurden mithilfe einer anatomischen Pinzette und einer Spritze von je beiden Seiten dreimal durchgespült und die Suspension in einem 15

ml Falcon aufgefangen. Die Anzahl der in der Suspension enthaltenen Zellen wurden, wie unter Punkt 4.5.3 beschrieben, gezählt. 1×10^5 Zellen wurden in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis gestellt, um Cytospins anzufertigen. 1×10^6 Zellen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, bei $8000 \times g$ für 8 min zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das Zellpellet wurde bei -80°C weggefroren, um dies für die RNA-Isolation zu nutzen. Die restliche Zellsuspension wurde bei $200 \times g$ für 8 min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Zellpellet wurde mit 1 ml Freezingmedium vermischt und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Anzahl der darin enthaltenen Zellen wurde notiert. Dies wurde auch in einem Mr. Frosty in den -80°C – Gefrierschrank gestellt und später in den Stickstofftank überführt.

4.6 MORPHOLOGISCHE DIFFERENZIERUNG DER KNOCHENMARKZELLEN

Um einen ersten Überblick über die Verteilung der hämatopoetischen Zellen im Knochenmark zu bekommen, wurden die Zellen zunächst nach Pappenheim gefärbt und lichtmikroskopisch differenziert.

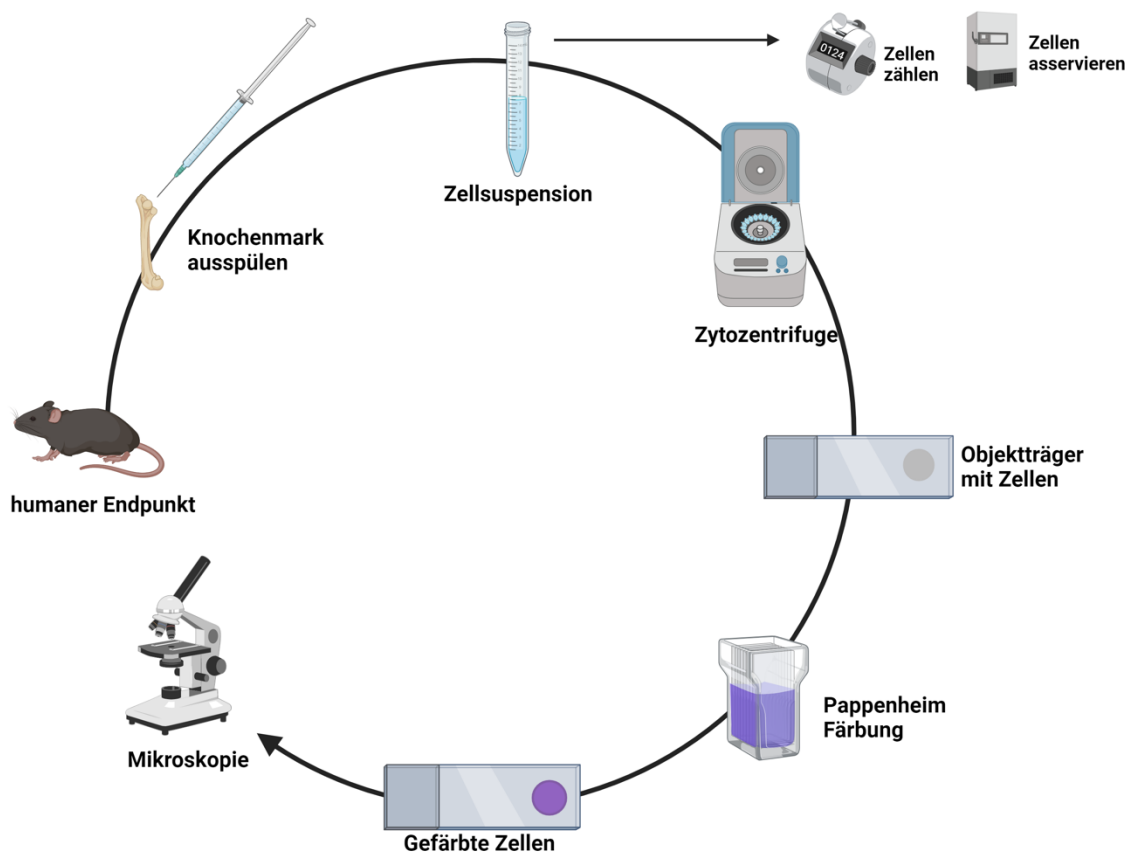


ABBILDUNG 9: ÜBERSICHT ZUM VORGANG DER MORPHOLOGISCHEN DIFFERENZIERUNG
ERSTELLT MIT BIOENDER.COM.

Für das Anfertigen der Cytospins wurden 1×10^5 Knochenmarkzellen in 200 μ l PBS gelöst. Zunächst wurde das Cytospinzubehör, bestehend aus Halterung, beschriftetem Objektträger, Einfülltasche und Filterpapier zu einer Apparatur zusammengebaut und in die Zytozentrifuge gesetzt. In die Einfülltasche wurde die Zellsuspension, bestehend aus 200 μ l, pipettiert und nachfolgend bei 700 rpm für 10 min zentrifugiert. Anschließend trockneten die Cytospins für 24 Stunden an der Luft. Danach erfolgte die Färbung nach Pappenheim. Hierzu wurden die Objektträger für 6 min in eine Küvette mit 60 ml May-Grünwald-Lösung gestellt. Anschließend erfolgte dreimal ein Waschschrift in einem Puffer mit einem pH von 7,2 für jeweils eine Minute. Die Objektträger wurden für 20 min in Giemsa-Lösung 1:10 (54 ml Puffer pH 7,2 und 6 ml Giemsa) gestellt und danach erneut in dem Puffer mit einem pH von 7,2 für dreimal jeweils eine Minute gewaschen. Zuletzt wurden die Objektträger einmalig mit destilliertem Wasser abgespült und luftgetrocknet (Abb. 9).

Die morphologische Differenzierung erfolgte bei 1000-facher Vergrößerung und mit Zugabe von Immersionsöl unter dem Lichtmikroskop Evos XL Core. Dabei wurden 200 Zellen ausgezählt und nach einem selbst erstellten Differenzierungsschema in folgende Zelltypen unterteilt: Myeloblasten; Neutrophile Pro-/ Myelozyten; Neutrophile Metamyelozyten/Neutrophile; Eosinophile Pro-/ Myelozyten; Eosinophile Metamyelozyten/Eosinophile; Lymphozyten; Plasmazellen; Monoblasten und Monozyten. Zusätzlich wurde bei einigen Mäusen die Erythropoese in Erythroblasten, Retikulozyten und Erythrozyten differenziert. Die Auswertung erfolgte verblindet.

4.7 IMMUNPHÄNOTYPISIERUNG MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Das Prinzip der Durchflussszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) ermöglicht es, mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten monoklonalen AK, bestimmte immunologische Eigenschaften von Zellen und Zellpopulationen auf Ebene einzelner Zellen zu charakterisieren. So ist eine detaillierte Analyse von Geweben und Proteinmustern, aber auch eine Abbildung dynamischer Prozesse in lebenden Zellen möglich [178]. Die Immunphänotypisierung von Blut, Tumor, Milz und Knochenmark konnte so auf gezielte Fragestellungen untersucht werden.

4.7.1 FUNKTIONSWEISE

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, welches eine schnelle multiparametrische Analyse einzelner Zellen in einem Flüssigkeitsstrom ermöglicht. Bei der Analyse werden einzelne Zellen durch hydrodynamische Fokussierung hintereinander an einem gebündelten Laserstrahl vorbeigeleitet. Die Laser werden als Lichtquellen genutzt, um sowohl Fluoreszenz-, als auch Streulichtsignale zu erzeugen, welche wiederum von Photodioden detektiert werden. Diese sind abhängig von den Lichtstreuungsmerkmalen der Zellen, die von Farbstoffen oder fluoreszenzmarkierten AK stammen, die auf Moleküle der Zellen abzielen. Sie können sowohl intra- als auch extrazellulär lokalisiert sein. Zellpopulationen können so auf Grundlage ihrer Fluoreszenz- und Lichtstreuungseigenschaften analysiert werden [179,180]. Dabei besteht eine Korrelation zwischen Volumen (Vorwärtsstreulicht) und Struktur sowie Granularität (Seitwärtsstreulicht) der Zelle mit der Menge des gestreuten Lichts. Zur Auswertung werden die Signale in elektronische Signale umgewandelt, welche dann von der Software eines Computers analysiert und in ein Standardformat zur Darstellung umgeschrieben wurden [181].

In dieser Arbeit wurde das spektrale Durchflusszytometer Cytex™ Aurora für die Analysen genutzt. Das Gerät nutzt drei unterschiedliche Wellenlängen mit einem Spektrum von 405 nm, 488 nm und 640 nm. Es ermöglicht eine schnelle Messung von 35.000 Ereignissen pro Sekunde und einer parallelen Wahrnehmung von 24 Farben. Dadurch ist es möglich, die Proben mit einer Vielzahl von AK gleichzeitig zu markieren. Zur Datenerhebung wurde die Software SpecroFlow™ Version 2.2.0.3 genutzt und die Statistik mithilfe von FlowJo™ Version 10.6.1 analysiert. In Abbildung 10 ist der grundsätzliche Aufbau eines Durchflusszytometers dargestellt.

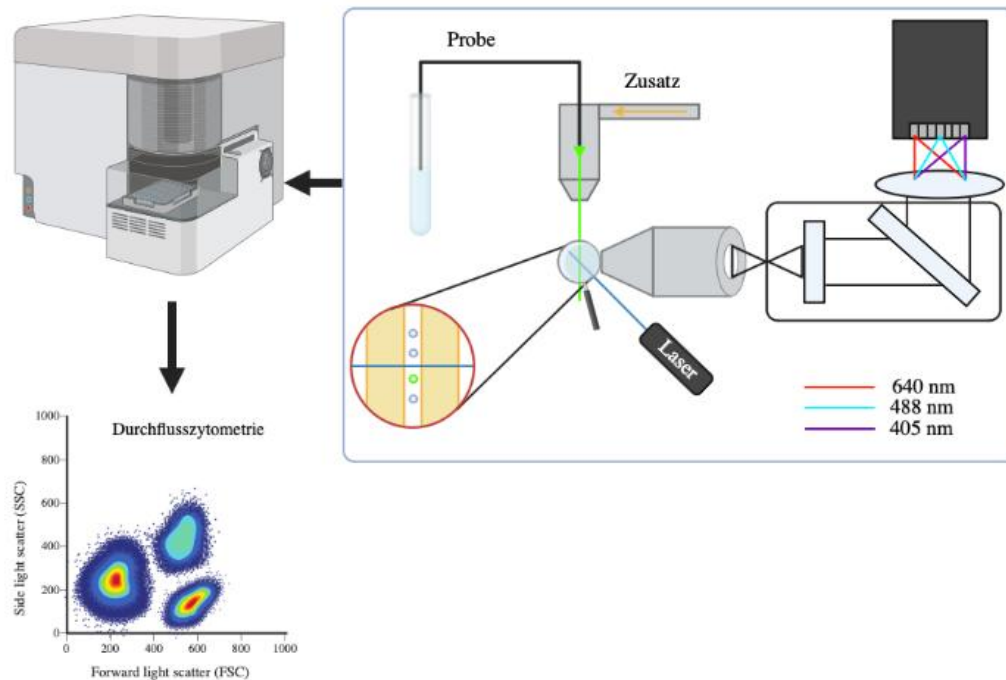


ABBILDUNG 10: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES DURCHFLUSSZYTOMETERS

ABGEBILDET IST DER GRUNDSÄTZLICHE AUFBAU UND DIE FUNKTIONSWEISE EINES KLASSISCHEN DURCHFLUSSZYTOMETERS. ERSTELLT MIT BIOENDER.COM UND ADAPTIERT NACH [186].

4.7.2 DURCHFLUSSZYTOMETRIE DES PERIPHEREN BLUTES, DER TUMOREN UND DER MILZ

Wie unter Punkt 4.5 beschrieben, wurden die Gewebe entweder direkt in 1x PBS aufgenommen und in ein beschriftetes FACS-Röhrchen überführt oder zunächst kryo-asserviert. In diesem Fall wurden die Proben zügig aufgetaut und schnellstmöglich in ein beschriftetes FACS-Röhrchen überführt, in welches bereits 1 ml 1x PBS vorgelegt wurde.

Anschließend wurden die Proben bei 500 x g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten unter Lichtausschluss. Zunächst wurde der Avitalfarbstoff Zombie NIR™ angesetzt (1:5000), 100 µl der Färbelösung zu den Proben gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 500 x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Proben mit 200 µl 2%igem BSA gewaschen, der Überstand dekantiert und nach Zugabe von 90 µl PBS, 10 µl FKS und 2 µl FC-Blocker die Proben für 10 min bei RT inkubiert. 50 µl *BD Horizont Brilliant Stain Buffer* wurden jeweils in die Röhrchen gegeben, gefolgt von 20,25 µl aus einem Mix aller extrazellulären AK. Nachdem die Röhrchen vorsichtig gevortext wurden, folgten 30 min Inkubationszeit bei RT gefolgt von der Zugabe von 1 ml Erylysepuffer pro Röhrchen und weiteren 15 min Inkubation. Nach

wiederholter Zentrifugation bei 500 x *g* für 5 min und Dekantieren des Überstandes wurden auf die Pellets 200 µl Waschpuffer (zusammengesetzt aus 2 %igem BSA und 2 mM EDTA in PBS) pipettiert und erneut bei gleicher Einstellung zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Nach Zugabe von 200 µl *True-Nuclear*TM 1X Fix Konzentrat wurden die Probenröhrchen gevortext. Für 45 – 60 min folgte eine Inkubation bei RT. Anschließend wurde erneut bei 500 x *g* für 5 min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und 200 µl Waschpuffer in die Röhrchen pipettiert. An dieser Stelle wurde das Protokoll unterbrochen und die Proben im Kühlschrank bei 4 °C bis zum nächsten Tag gelagert, wo das Protokoll fortgesetzt wurde. Mit der Zugabe von 200 µl *True-Nuclear*TM 1X *Perm Buffer* wurde die Färbung fortgeführt, worauf sich das Zentrifugieren bei 500 x *g* für 5 min mit Überstand verwerfen, anschloss. Diese drei Schritte wurden insgesamt dreimal durchgeführt. 10 min Inkubation bei RT folgten, nachdem jeweils 90 µl PBS, 10 µl FKS und 2 µl Fc-Blocker auf die Pellets pipettiert wurden. Dann wurden 4,5 µl eines Mixansatzes aus allen intrazellulären AK hinzugefügt, vorsichtig gevortext und bei RT für 30 min inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde erneut 200 µl *True-Nuclear*TM 1X *Perm Buffer* dazugegeben, bei 500 x *g* für 5 min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Auch an dieser Stelle wurde die Abfolge der drei zuletzt genannten Schritte insgesamt dreimal durchgeführt. Im letzten Schritt wurden die Zellen in 200 µl PBS aufgenommen und abgedunkelt bis zur Messung im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Folgende T-Zell-Subpopulationen wurden charakterisiert: Naive T-Zellen (CD3⁺CD4⁺CD8⁻ CCR7⁺CD62L⁺CD44⁻), Effektor-Gedächtnis- CD3⁺CD4⁺ oder CD3⁺CD8⁺ T-Zellen (T_{EM}, CCR7^{low}CD62L^{low}CD44⁺), und zentrale Gedächtnis CD3⁺CD4⁺ oder CD3⁺CD8⁺ T Zellen (T_{CM}, CCR7⁺CD62L⁺CD44⁻).

TABELLE 7: EXTRAZELLULÄRE ANTIKÖRPER - PHÄNOTYPISIERUNG VON BLUT, TUMOR UND MILZ

ANTIKÖRPER (KONJUGAT)	VOLUMEN/ PROBE	ZELLTYP/FUNKTION
Gr.1 (AF700)	0,25 µl	Myeloide Suppressorzellen (Granulozyten, Makrophagen)
CD8 (FITC)	0,5 µl	Zytotoxische T-Zellen
CD4 (APC Fire)	0,5 µl	T-Helferzellen
CD11b (BV570)	0,5 µl	Myeloide Suppressorzellen

CD274/PD-L1 (BV421)	0,5 µl	Immun-Checkpoint, Th1-Lymphozyten
NK1.1 (BV605)	1,5 µl	NK-Zellen
CD25 (PerCP-eFluor710)	1,5 µl	Tregs
CD62L (BV785)	2 µl	Gedächtnis-Effektor-Zellen
CD83 (BV750)	2 µl	B-Zellen/dendritische Zellen
CD366/TIM-3 (PE/Dazzle 594)	2 µl	Immun-Checkpoint, Th1-Lymphozyten, Makrophagen
CD279/PD1 (BV650)	2 µl	Immun-Checkpoint, Th1-Lymphozyten
CCR7 (PE)	2 µl	Gedächtnis-Effektor-Zellen
CD44 (BV711)	2 µl	Gedächtnis-Effektor-Zellen
CD19 (Spark Blue)	3 µl	B-Zellen/dendritische Zellen
LAG-3/CD223 (BV480)	3 µl	Immun-Checkpoint, Th1-Lymphozyten

TABELLE 8: INTRAZELLULÄRE ANTIKÖRPER - PHÄNOTYPISIERUNG VON BLUT, TUMOR UND MILZ

ANTI-KÖRPER (LABEL)	VOLUMEN / PROBE	ZELLTYP/FUNKTION BEI DER TUMORENTSTEHUNG
CD152/CTLA-4 (PE/Cy7)	2 µl	Immun-Checkpoint
CD3 (PerCP)	2 µl	T-Zellen
Foxp3 (AF 647)	0,5 µl	Tregs

4.7.3 DURCHFLUSSZYTOMETRIE DES KNOCHENMARKS

Die Hämatopoese spielt auch bei der Tumorgenese von soliden Tumoren eine wichtige Rolle. Um die Veränderungen der Myelopoese infolge des Tumorwachstums zu charakterisieren, wurde ein von uns etabliertes Panel mit Stammzellmarkern angewendet und Stammzellen, die in frühen und späten Krebsstadien relevant sind, mittels Durchflussszytometrie erfasst.

Die Auswertungen wurden mittels SpectroFlow™ Version 2.2.0.3 und Flow Jo™ Version 10.6.1 durchgeführt.

Zur durchflussszytometrischen Messung wurden kryoasservierte Knochenmarkzellen eingesetzt. Die Proben wurden aufgetaut, in 5 ml PBS gegeben und bei 200 x g für 8 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand dekantiert und das Pellet mit 10 ml

PBS verdünnt. Mittels der Neubauer Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt und 5×10^5 Zellen für die Färbung in FACS-Röhrchen überführt. Diese wurden bei $350 \times g$ für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nachfolgend wurden 100 µl Zombie NIR™ in PBS (1:5000) auf das Zellpellet pipettiert, gevortext und für 30 min bei Dunkelheit und RT inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 250 µl 1x PBS pro Röhrchen hinzugegeben, zentrifugiert bei $350 \times g$ für 5 min und der Überstand verworfen. Diese drei Waschschriffe wurden zweimal hintereinander ausgeführt. Danach wurde der *TrueStain FcX™* Plus (*anti-mouse* CD16/32) AK hinzugefügt. Dieser wurde mit 1:200 in *FACS Staining Buffer* verdünnt (0,5 µl/100 µl). Es folgten 10 min Inkubation auf Eis im Dunkeln. Nun wurde zu jedem Ansatz 2,5 µl *True-Stain Monocyte Blocker™* hinzugefügt. Um die extrazellulären AK hinzuzufügen, wurde ein Mix erstellt, der insgesamt 33,3 µl AK enthielt und 66,6 µl *FACS Staining Buffer*, sodass pro Röhrchen etwa 100 µl AK-Mix hinzugegeben wurden. Dies wurde gevortext und für 20 min bei RT und Dunkelheit inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde zweimal mit 250 µl PBS gewaschen und jeweils anschließend bei $350 \times g$ für 5 min zentrifugiert sowie der Überstand dekantiert. Nachdem 250 µl *True-Nuclear™* 1x Fix Konzentrat zu den Zellpellets gegeben wurde, folgte eine 45-minütige Inkubation bei RT im Dunkeln. 400 µl *True-Nuclear™* 1X Perm Buffer wurde hinzugegeben, bei $350 \times g$ für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann wurde der Mix aus intrazellulären AK hinzugegeben. Hierzu wurden insgesamt 6 µl AK in 94 µl *True-Nuclear™* 1X Perm Buffer gemischt und 100 µl dieser Lösung auf die Proben gegeben. Anschließend wurde gevortext und für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Erneut wurden 400 µl *True-Nuclear™* 1X Perm Buffer pipettiert; gevortext; bei $350 \times g$ für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dies wurde zweimal durchgeführt. Final wurde das Pellet in 350 µl *FACS Staining Buffer* aufgenommen und bis zur Messung abgedunkelt bei 4° C gelagert.

TABELLE 9: EXTRAZELLULÄRE ANTIKÖRPER - PHÄNOTYPISIERUNG DER STAMMZELLEN

ANTIKÖRPER (LABEL)	VOLUMEN / PROBE	ZELLTYP
CD117/c-Kit (BV785)	1 µl	Granulozyten-/Monozyten-Vorläuferzellen
Ly-6A/Sca-1 (BV711)	2,5 µl	Normale Stammzellen, Vorläuferzellen, tumorauslösende Zellen
CD41 (PE/Cy7)	2,5 µl	Hämatopoetische Vorläuferzellen/pluripotente Zellen

CD71 (PE/Dazzle 594)	0,5 µl	Proliferierende Zellen
CD34 (BV421)	2,5 µl	Normale Stammzellen, Vorläuferzellen, tumorauslösende Zellen
CXCR1 (APC/Fire810)	0,33 µl	Monozyten
CD90.2/Thy-1.2 (BV605)	2,5 µl	Blutbildende Zellen, Krebsstammzellen
CD38 (PE/Fire 640)	1 µl	Hämatopoetische Zellen
CD127/IL-7Rα (BV510))	2 µl	Stroma-Zellen, unreife B-Zellen
CD123 (PE)	2,5 µl	Hämatopoetische Vorläuferzellen
CD150 (SLAM) (PE/Cyanine5)	1 µl	T-Zell-Subgruppen, B-Zellen, dendritische Zellen
CD279/PD1 (PE/Fire 810)	1 µl	Aktivierte T- und B-Zellen
CD115/CSF-1R (AF 647)	0,5 µl	Monozyten/Makrophagen
CD63 (APC/Cy7)	2,5 µl	Monozyten/Makrophagen
CD48 (Vio® Bright B515)	2,5 µl	Monozyten/Makrophagen, T- und B-Zellen
CD170 (AF700)	3,5 µl	Makrophagen

TABELLE 10: INTRAZELLULÄRE ANTIKÖRPER - PHÄNOTYPISIERUNG DER STAMMZELLEN

ANTI-KÖRPER (LABEL)	VOLUMEN / PROBE	ZELLTYP
IRF-8 (PerCP-eFluor 710)	2,5 µl	Myeloische Zellen
MCP-1 (APC)	1,5 µl	Monozyten
CXCL12 (FITC)	2 µl	Stromazellen

4.8 GENEXPRESSIONSANALYSE

Die Genexpressionsanalyse ist ein molekularbiologisches Verfahren, um die Umsetzung von genetischen Informationen zu analysieren. Mit diesem Verfahren kann die Expression von vielen Genen bzw. Genabschnitten gleichzeitig gemessen werden [182]. Bei der hier angewendeten quantitativen Analyse kann der Expressionsunterschied, also die Stärke der Expression, gegenüber einer Referenz untersucht werden.

Dadurch kann auf die Funktion der Zellen der Gewebetypen und deren Veränderungen bei einer Tumorgenese bzw. bei den unterschiedlichen Therapiegruppen rückgeschlossen werden [183,184].

4.8.1 RNA - ISOLATION VON TUMOR, MILZ UND KNOCHENMARK

Die RNA-Isolation ermöglicht es, spezifisch die RNA zu extrahieren, wobei die Integrität und die Expressionsprofile der RNA erhalten werden. Zur Isolation von RNA wurde das RNeasy Mini Kit von Qiagen und die, wie unter den Punkten 4.5.3 und 4.5.4 beschrieben, vorbereiteten Zellpellets von der Milz und dem Knochenmark verwendet. Alle Arbeiten erfolgten unter dem Abzug. Zunächst wurde 1 ml RLT-Puffer mit 10 µl β-Mercaptoethanol versetzt. Pro Probe wurden 350 µl dieses Puffers auf das Zellpellet gegeben und gevortext. 70 %iges Ethanol wurde zum Lysat hinzugefügt, mehrfach auf- und abpipettiert und dies dann (700 µl Probe) auf die Säule gegeben. Nach 30 s Zentrifugation bei 8000 x g wurde der Durchfluss verworfen und auf einem Tuch trocken geklopft. 350 µl RW1-Puffer wurden auf die Säule pipettiert und erneut 30 s bei 8000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Anschließend wurden 10 µl DNase mit 70 µl RDD-Puffer vorsichtig gemischt, auf die Säule gegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden erneut 350 µl RW1-Puffer auf die Säule pipettiert, 30 s bei 8000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nach Zugabe von 500 µl RPE-Puffer, Zentrifugation für 30 s bei 8000 x g und Verwerfen des Durchflusses, wurden nochmals 500 µl RPE-Puffer hinzugefügt. Darauf folgten 2 min Zentrifugation bei 8000 x g, Verwerfen des Durchflusses und Trockenzentrifugieren für eine Minute bei 8000 x g. Die Säule wurde in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, 30 µl RNase freies Wasser auf die Säule pipettiert und 5 min gewartet. Zuletzt wurde für eine Minute bei 8000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss enthielt dann die RNA und wurde direkt auf Eis gestellt. Final wurde die Konzentration am NanoDrop gemessen.

4.8.2 cDNA-SYNTHESE

Im nächsten Schritt wurde die isolierte RNA aus Tumor, Milz und Knochenmark für die nachfolgende PCR in cDNA umgeschrieben. Dafür wurden 500 ng der extrahierten mRNA mit 1 µl des Random Hexamer Primers versetzt. Als nächstes wurden die Proben bei 70° C für 10 min inkubiert und anschließend direkt auf Eis gekühlt. Zwischen-

zeitlich wurde der Master-Mix angesetzt, bestehend aus 4 µl des *5x RT buffer complete*, 1 µl der dNTP-Mischung und 1 µl der *ReveraseTM–200 units*. Danach folgte die Durchführung der Reaktion am PCR Thermocycler bei 45° C für 120 min und bei 70° C für 10 min. Nach Ablauf der Zeit wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und mit 30 µl RNase-freiem Wasser gekühlt. Die finale cDNA-Konzentration von 12,5 ng/µl wurde bis zur Durchführung der qPCR bei -20° C gelagert.

4.8.3 QUANTITATIVE REAL-TIME PCR (qPCR)

Die qPCR ist eine Nukleinsäure-Amplifikationstechnik, die es erlaubt, die Vervielfältigung der DNA-Sequenzen in Echtzeit zu überwachen. Daher werden die Daten während des gesamten Prozesses erfasst und nach jedem Amplifikationszyklus die Menge der entstandenen DNA analysiert. Die Reaktion wird also durch den Zeitpunkt während des Zyklus charakterisiert, an dem die Vervielfältigung eines Zielgens zum ersten Mal nachgewiesen wird und nicht die Menge des Zielgens nach einer festen Anzahl von Zyklen. Ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz wird somit dann beobachtet, wenn die Anfangskopienzahl des Nukleinsäure-Zielgens hoch ist [182,185].

Für die qPCR wurden die 12,5 ng cDNA mit dem SensiFAST Probe Lo-Rox Kit verwendet. Es wurden kommerzielle TaqMan Genexpressionstests genutzt. Durchgeführt wurde die Reaktion im Light cycler Viia7 unter den folgenden Konditionen: 95 °C für 10 min, 40 Zyklen für 15 s bei 95 °C und 1 Minute bei 60 °C. Alle Reaktionen wurden dreimal ausgeführt. Für jede Probe wurde das Expressionsniveau durch die Berechnung von $2^{-\Delta Ct}$ ($\Delta Ct = Ct_{target} - Ct_{Housekeeping-Gen}$) und anschließende $2^{-\Delta\Delta Ct}$ – Quantifizierung ermittelt. Dabei dienten die Werte der Kontrollen als Kalibrator.

4.9 CHARAKTERISIERUNG DER TUMORMIKROUMGEBUNG MITTELS IMMUNFLUORESCENZ

Die Immunfluoreszenz ermöglicht mittels fluoreszenzmarkierter AK den Nachweis und die Lokalisation spezifischer Zielantigene in verschiedenen Gewebetypen und Zellpräparaten [186,187]. In dieser Arbeit wurde dieses Prinzip genutzt, um das TME der Tumoren in verschiedenen Stadien darzustellen. Dabei haben wir uns auf die infiltrierenden MDSCs, TAMs und TANs konzentriert, aber auch die Infiltration von dendritischen Zellen, T- und B- Zellen untersucht, um die wichtigsten Zellen abzudecken, die an der „pro“- und antitumoralen Immunantwort beteiligt sind.

4.9.1 HERSTELLUNG UND FIXIERUNG VON GEFRIERSCHNITTEN AUS TUMORGEWEBE

Wie unter Punkt 4.5.2 erwähnt, wurde Tumorgewebe in Tissue Tek eingebettet und bei -80° C gelagert. Um Kryostatschnitte herzustellen, wurde das eingebettete Gewebe aufgeblickt und daraus 4 µm dicke Schnitte hergestellt. Dafür wurde der Kryostat Leica™ CM1850S genutzt. Die Schnitte wurden auf einem beschrifteten Objektträger für 30 min luftgetrocknet. Danach folgte die Fixierung mit Methanol für 8-10 min und 2 min Trocknen. Die Schnitte wurden in Aluminiumfolie eingepackt und bei -20 °C gelagert.

4.9.2 IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG DER TUMORSCHNITTE

Die Objektträger mit den fixierten Tumorschnitten wurden zuerst mit 1x PBS gewaschen und ein Fettrand um die Zellen mit dem Dakopen gezogen. Für 60 min wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit 2 %igem BSA bei RT in der feuchten Kammer blockiert. Nachfolgend wurden die primären AK mit 2 %igem BSA in PBS verdünnt, auf die Objektträger pipettiert und bei RT für 4 h oder bei 4 °C über Nacht in der Feuchtkammer inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Gewebeschnitte mit den Mixen 1-3 (Tabelle 11) dreimal in 0,2 %igem BSA gewaschen. Bei diesen direkt gelabelten primären AK erfolgte direkt die Einbettung in Dako Mounting Medium. Auf diese Schnitte wurde ein Deckgläschen gegeben und bei 4 °C bis zur Mikroskopie gelagert.

Bei mit Mix 4 gefärbten Proben erfolgte nach der Inkubation zunächst eine intrazelluläre Färbung. Die Objektträger wurden für 30 min mit 4 %igem Paraformaldehyd bei RT in der Feuchtkammer fixiert, zweimal gewaschen, mit 0,5 %igem Triton X-100 für 15 min permeabilisiert und erneut zweimal gewaschen. Als nächstes wurde der primäre AK anti-IRF5 (5 µg/ml) auf das Tumorgewebe gegeben und nach wiederholtem Waschen der sekundäre AK (Donkey anti-Rabbit IgG AF647) 1:1000 verdünnt, auf das Gewebe pipettiert und bei RT für 60 min in der feuchten Kammer inkubiert. Nach finalem dreimaligem Waschen erfolgte die Eindeckung in Dako Mounting Medium. Auch diese Schnitte wurden mit einem Deckgläschen versehen und bei 4 °C gelagert.

TABELLE 11: ÜBERSICHT DER PRIMÄREN ANTIKÖRPER FÜR DIE IMMUNFLUORESCENZ-FÄRBUNG

ANTIKÖRPERMIX	PRIMÄRE ANTIKÖRPER (LABELING)	VERDÜNNUNG
Mix 1	CD3 (AF488), CD4 (AF594), CD8 (AF647)	1:20
Mix 2	CD206 (AF 488), F4/80 (AF594)	1:50
Mix 3	CD11b (AF 488), Gr.1 (AF 594), PD-L1 (APC)	1:20
Mix 4	PD1 (FITC)	1:20

4.9.3 KONFOKALE LASER – SCANNING - MIKROSKOPIE UND QUANTIFIZIERUNG

Ein konfokales Mikroskop ermöglicht es, tiefe Gewebe mit hoher Auflösung abzubilden. Dazu wird ein Laser verwendet, der eine punktförmige Lichtquelle erzeugt und unscharfes Licht dabei unterdrückt. Der monochromatische Lichtstrahl mit definierter Wellenlänge und einstellbarer Intensität wird durch das Mikroskopobjektiv auf einem kleinen Fleck im Gewebe fokussiert. Das Objektiv sammelt das fluoreszierende Licht, das von den Fluorophoren der markierten AK im Präparat emittiert wird und projiziert dieses Licht (Abb. 11 [197]). Es wird also nicht direkt betrachtet. Eine Lochblende stellt dabei sicher, dass nur das vom gewünschten Brennpunkt ausgehende Licht einfällt und das Streulicht blockiert wird [188,189].

In dieser Arbeit wurde das ZEISS Elyra 7 Confocal Laser Mikroskop verwendet. Anhand eines validierten Bewertungssystems wurden regulatorische Granulozyten und TAMs semiquantitativ in 2-3 Hauptgesichtsfeldern (HPF) pro Schnitt erfasst: 0 = keine; 1 = leicht (1–20 Zellen/HPF); 2 = mittel (21–40 Zellen/HPF); 3 = stark (>40 Zellen/HPF).

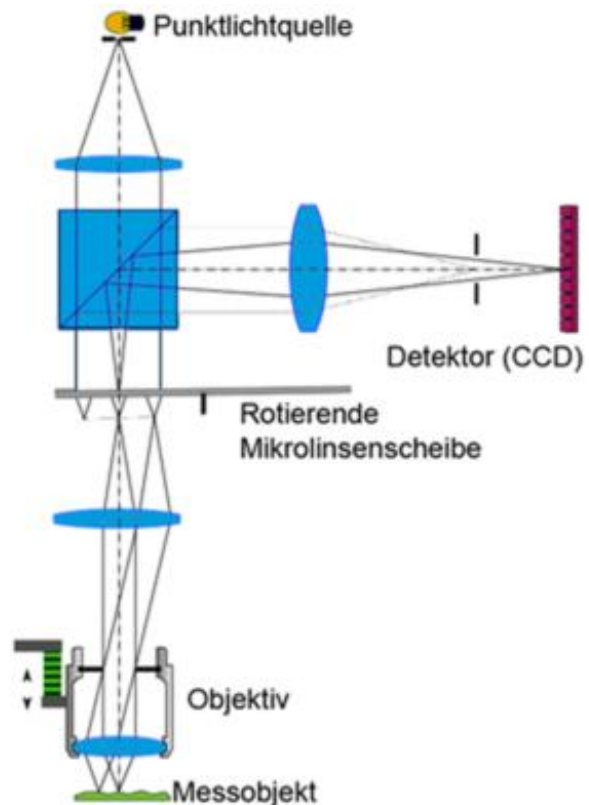


ABBILDUNG 11: SCHEMATISCHER AUFBAU DES KONFOKALEN LASER-SCANNING-MIKROSKOPS

V. ERGEBNISSE

In dieser Arbeit wurde die Wirksamkeit der ICIs α -PD1-AK und α -LAG3-AK im $Msh2^{loxP/loxP;TgTg(Vil1-cre)}$ Mausmodell erfasst. Dabei wurden neben dem Gesamtüberleben und der Tumorgroße auch systemische, sowie lokale immunologische und hämatologische Phänomene betrachtet.

Zusätzlich lag ein Fokus auf dem Nachweis von Veränderungen in der Hämatopoese bei dMMR-assoziierten Tumoren. Die Ergebnisse sind nachfolgend dargestellt.

5.1 ÜBERLEBENSWAHRSCHEINLICHKEITEN VON $Msh2^{loxP/loxP;TgTg(Vil1-cre)}$ MÄUSEN

Beide ICIs verlängerten das Gesamtüberleben von tumortragenden $Msh2^{loxP/loxP;TgTg(Vil1-cre)}$ Mäusen signifikant ($p < 0,001$, Abb. 12). Die Behandlung mit dem α -PD1-AK verlängerte das mediane Gesamtüberleben um 4,0 Wochen. Bei dem α -LAG-3-AK betrug das Gesamtüberleben 13,3 Wochen und war damit 8,3 Wochen länger als in der Isotyp-behandelten Kontrollgruppe. Das mediane Überleben der unbehandelten Kontrolltiere war mit 3,3 Wochen am kürzesten. Im direkten Vergleich der ICIs zeigte sich ein Vorteil der α -LAG-3 Therapie gegenüber der α -PD1 Gabe, dieser war jedoch nicht statistisch signifikant ($p = 0,13$).

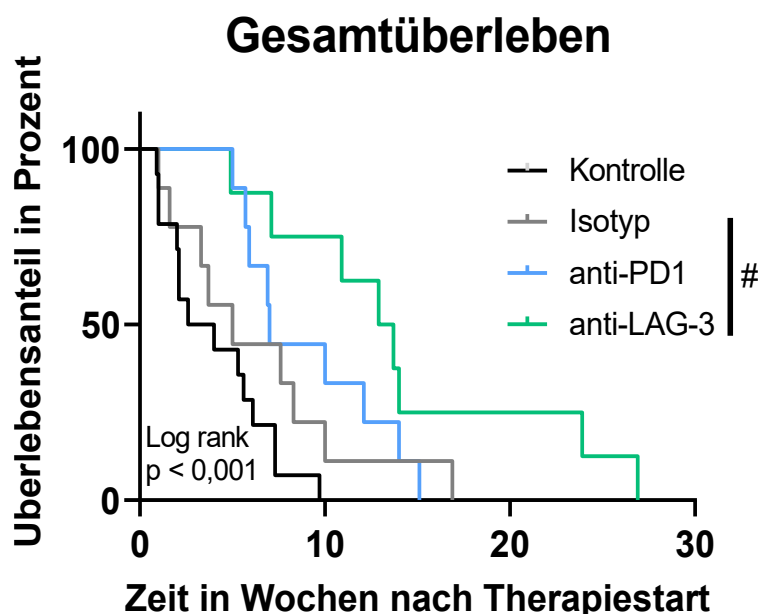


ABBILDUNG 12: KAPLAN-MEIER ÜBERLEBENSKURVE

DARSTELLUNG DES GESAMTÜBERLEBENS VON TUMORTRAGENDEN $Msh2^{loxP/loxP;TgTg(Vil1-cre)}$ MÄUSEN. KONTROLLE N = 10; ISOTYP N = 9; α -PD1 N = 9; α -LAG-3 N = 8; # $p < 0,05$ vs. ISOTYP; LOG-RANK ANALYSE (MANTEL-COX TEST).

5.2 EINFLUSS AUF DAS TUMORWACHSTUM

Die Tumorgröße wurde mittels ^{18}F -FDG-PET/CT ermittelt und an Tag 0 sowie im Therapieverlauf an Tag 35 quantifiziert. Repräsentative Bilder sind in Abbildung 13 dargestellt.

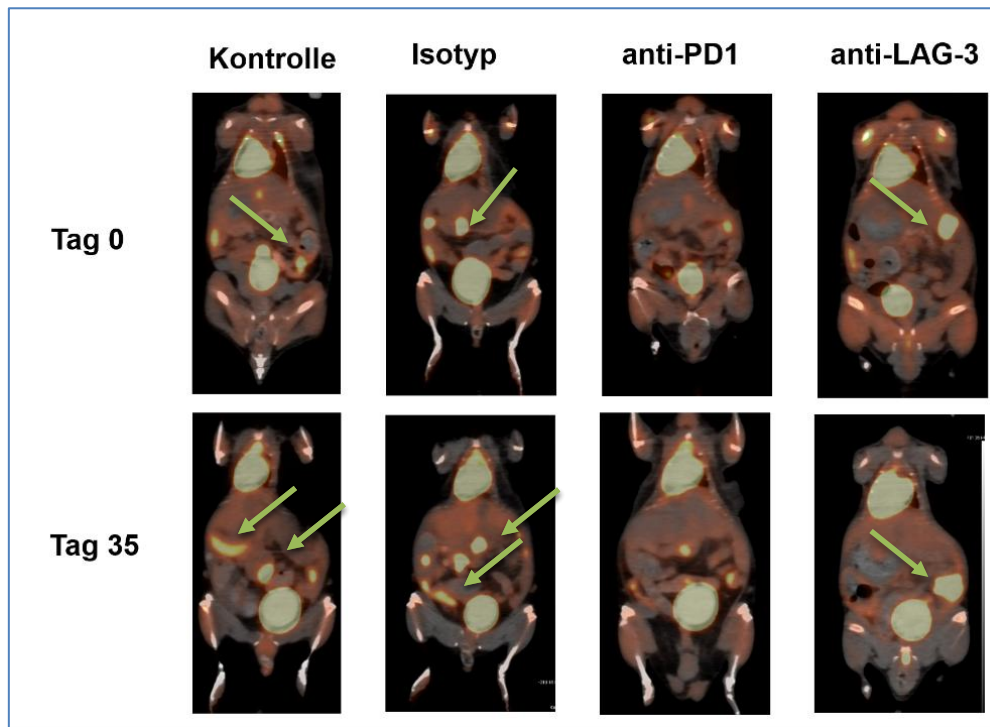


ABBILDUNG 13: ^{18}F -FDG-PET/CT-BILDGEBUNG ZUR LONGITUDINALEN VERLAUFS-DARSTELLUNG DER TUMORENTWICKLUNG

REPRÄSENTATIVE PET/CT AUFNAHMEN ZU BEGINN (= TAG 0) UND AN TAG 35 DER THERAPIE. DIE PFEILE MARKIEREN DIE GRÖßENPROGREDIENZ SOWIE MULTIPLE NEUBILDUNGEN IN DER KONTROLL- UND ISOTYP-GRUPPE.

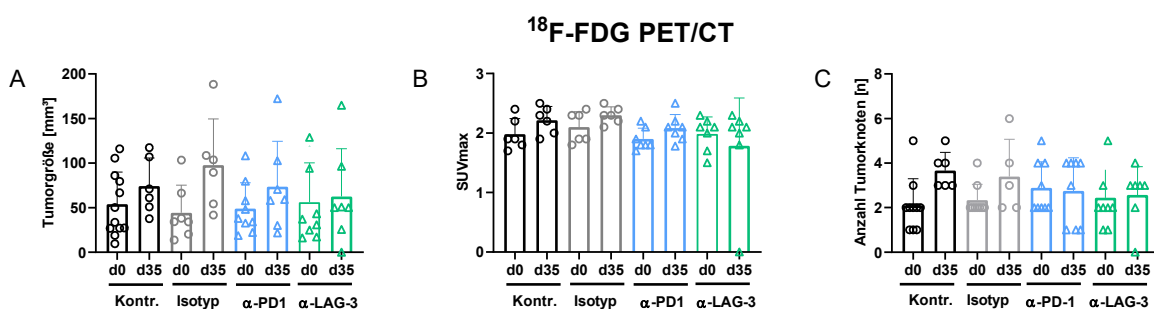


ABBILDUNG 14: PET/CT ANALYSE DER TUMORENTWICKLUNG IM VERLAUF

DARGESTELLT SIND DIE TUMORGRÖßE IN mm^3 (A), SUV_{MAX} (B) ANZAHL DER TUMORKNOTEN (C). MITTELWERT + SD. JEDES SYMBOL REPRÄSENTIERT EINE MAUS. KONTROLLE $n = 6-10/\text{ZEITPUNKT}$; ISOTYP $n = 5-7$; α -PD1 $n = 7-9$; α -LAG-3 $n = 7-8$. WÄHREND IN DER KONTROLL- UND ISOTYPGRUPPE EINE DEUTLICHE PROGREDIENZ DES TUMORWACHSTUMS NACHGEWIESEN WURDE, FÜHRTE DIE α -PD1- UND α -LAG-3 – THERAPIE ZU EINER KRANKHEITSSTABILISIERUNG MIT PARTIELLER REMISSION.

Unter der α -PD1-AK-Therapie war im Beobachtungszeitraum von 35 Tagen eine leichte Größenzunahme der Tumoren zu verzeichnen. Die Behandlung mit dem α -

LAG-3-AK erzielte eine Krankheitsstabilisierung oder eine partielle Tumorremission. Eine deutliche Größenzunahme wurde in der unbehandelten Kontroll- und in der Isotypgruppe beobachtet (Abb.14, A).

Ein Blick auf die Aktivitätsverteilung mittels $(SUV)_{max}$ verdeutlichte nur bei α -LAG-3-therapierten Mäusen eine Abnahme der Aktivität. Sowohl in der Kontroll- und Isotypgruppe als auch unter α -PD1-Therapie ließ sich ein Anstieg dieses Parameters nachweisen (Abb.14, B).

In Bezug auf die Anzahl der Tumoren konnte in beiden ICI-Therapiegruppen ein konstanter Wert ermittelt werden, während bei beiden Vergleichsgruppen vermehrte Neoplasien detektiert wurden (Abb. 14, C).

5.3 IMMUNPHÄNOTYPISIERUNG DES PERIPHEREN BLUTES

Begleitend zu den bildgebenden Verfahren wurde der Immunphänotyp zu Beginn und am Versuchsende mittels Durchflusszytometrie erfasst. Die Gating-Strategie ist in Abb. 15 dargestellt.

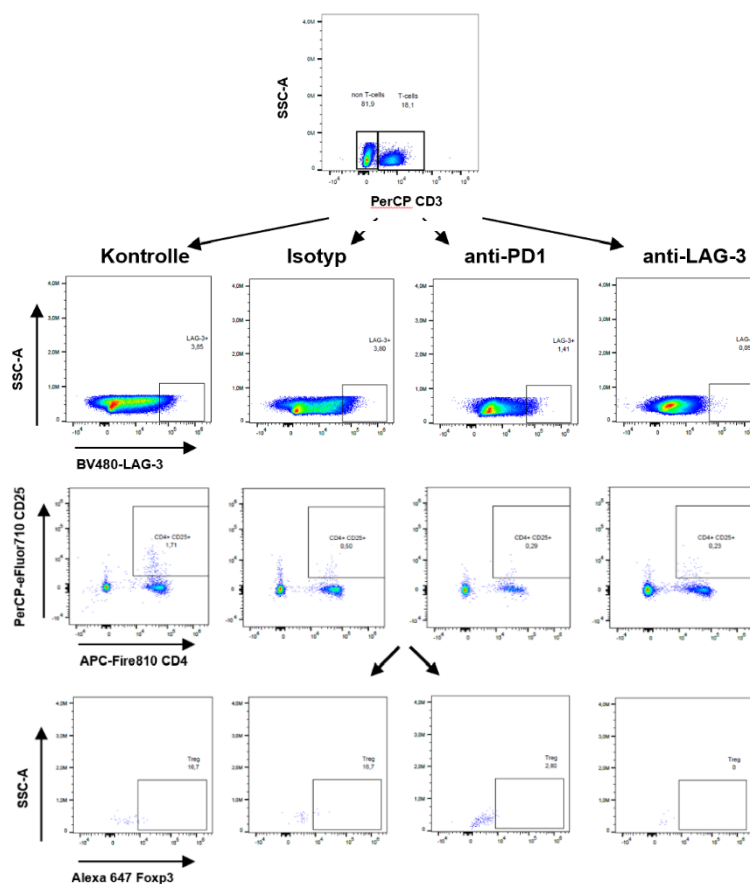


ABBILDUNG 15: GATING-STRATEGIE ZUR IDENTIFIZIERUNG VON IMMUNZELL-SUBTYPEN

REPRÄSENTATIVE DOTPLOTS SIND DARGESTELLT. DIE QUANTIFIZIERUNG ERFOLGTE MITTELS FLOWJO.

Zunächst wurde der Anteil an zirkulierenden T-Zellen ermittelt. Hierbei wurden leichte Unterschiede zwischen den beiden AK-Therapien nachgewiesen (Abb. 16). Die α -

PD1-Behandlung führte zu einem Anstieg an T-Helferzellen (CD4⁺) und zytotoxischen T-Zellen (CD8⁺) im Vergleich zum Behandlungsstart. Im Gegensatz dazu wurde unter der α -LAG-3-AK Therapie eine verringerte Anzahl beider T-Zellsubpopulationen im Vergleich zu den Kontrollen detektiert.

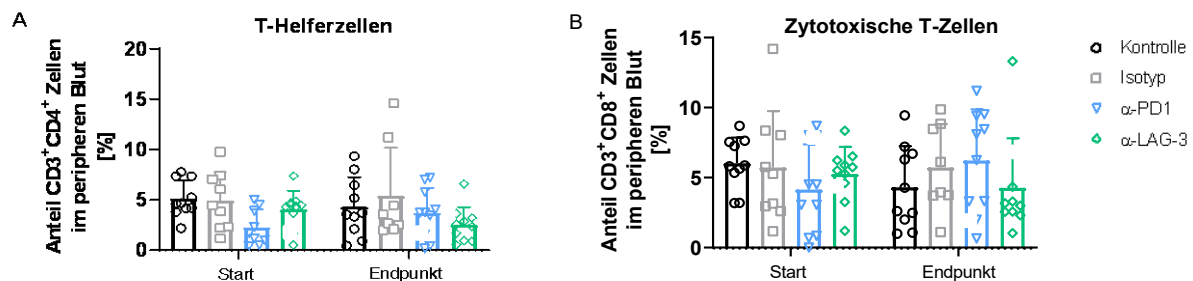
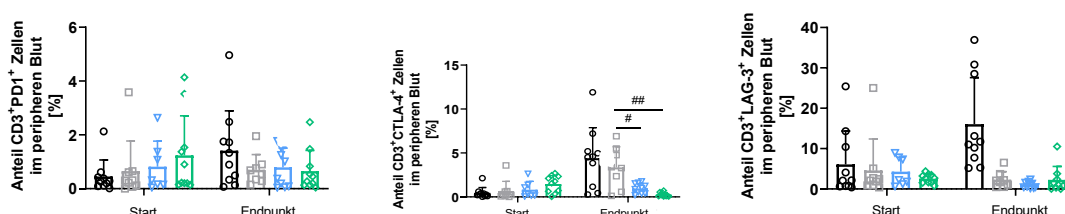


ABBILDUNG 16: DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE PHÄNOTYPISIERUNG VON CD4⁺ UND CD8⁺ T-ZELLEN IM PERIPHEREN BLUT
QUANTITATIVE ANALYSE DES PROZENTUALEN ANTEILS DER CD4⁺ T-ZELLEN (A) UND DER CD8⁺ T-ZELLEN (B) AN TAG 0 (VOR BEHANDLUNG) UND AM ENDPUNKT. ES WURDEN 100.000 ZELLEN/PROBE GEMESSEN. JEDES SYMBOL REPRÄSENTIERT EINE MAUS. KONTROLLE N = 10; ISOTYP N = 8-9; α -PD1 N = 9; α -LAG-3 N = 8.

Eine nähere Betrachtung der T-Zellsubpopulationen bestätigte die unterschiedlichen Befunde. Während die Behandlung mit dem α -PD1-AK nur einen geringen Einfluss auf die T-Zell „*exhaustion*“ oder „Erschöpfungs“marker hatte, führte die α -LAG-3-AK-Therapie zu einer Abnahme dieser Marker im Verlauf (Abb. 17). Dies war charakterisiert durch eine verringerte Anzahl der Tregs (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, $p < 0,01$ vs. Isotyp) und durch Reduktion der T-Zell „*exhaustion*“-assoziierten Oberflächenmarker (PD1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3). In der Kontroll- und Isotypgruppe kam es im Verlauf zu einer deutlichen Zunahme der Tregs sowie der erschöpften T-Zellen. Der direkte Vergleich zwischen den Kontroll- und Therapiegruppen am Versuchsende bestätigte eine signifikante Reduktion dieser Populationen durch die jeweilige Therapie. Dabei waren die Effekte nach α -LAG-3 Behandlung jeweils stärker ausgeprägt als unter α -PD1 Gabe.

Erschöpfte T-Zellen



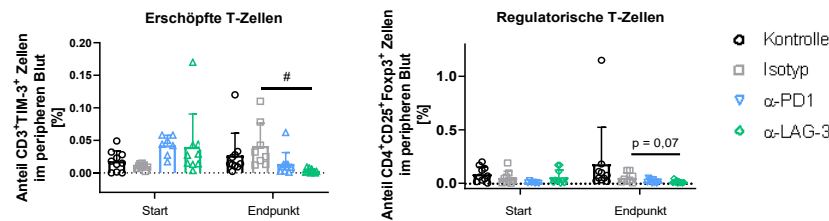


ABBILDUNG 17: DURCHFLUSSZYOMETRISCHE PHÄNOTYPISIERUNG VON T-ZELLSUBPOPULATIONEN IM PERIPHEREN BLUT

QUANTITATIVE ANALYSE DES PROZENTUALEN ANTEILS VERSCHIEDENER T-ZELLSUBPOPULATIONEN AN TAG 0 (VOR BEHANDLUNG) UND AM ENDPUNKT. ES WURDEN 100.000 ZELLEN/PROBE GEMESSEN. JEDES SYMBOL REPRÄSENTIERT EINE MAUS. KONTROLLE N = 10; ISOTYP N = 8; α-PD1 N = 7-9; α-LAG-3 N = 8; # P < 0,05 UND ## P < 0,01 VS. ISOTYP. TWO-WAY ANOVA (TUKEY'S MULTIPLE COMPARISONS TEST). INSBESONDERE DIE α-LAG-3-THERAPIE FÜHRTE ZU EINER ABNAHME DER „ERSCHÖPFUNGS“MARKER AUF DEN UNTERSUCHTEN T-ZELLSUBPOPULATIONEN.

Die Untersuchung weiterer Immunpopulationen im peripheren Blut zeigte einen signifikanten Anstieg der CD11b⁺Gr.1⁺ Zellen (MDSCs) in allen Versuchsgruppen im Verlauf. Am deutlichsten war diese Entwicklung unter dem α-LAG-3-AK (p < 0,001 vs. Start). Der Anteil an NK1.1⁺ Zellen (NK-Zellen) stieg im Verlauf leicht an. Dies war jedoch unabhängig von der ICI-Gabe (Abb. 18).

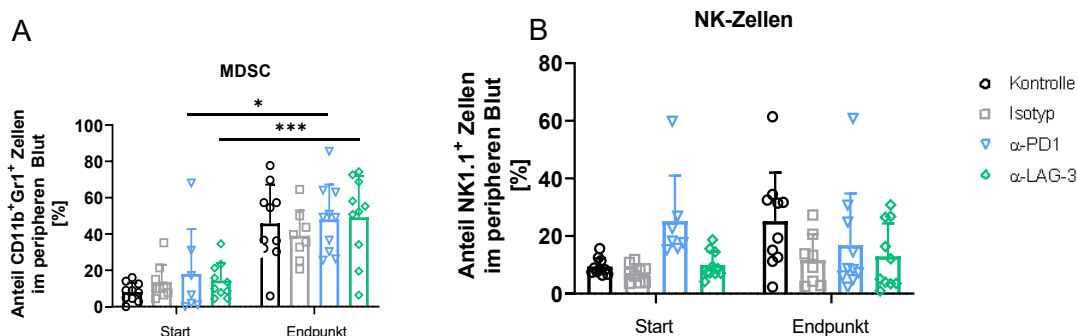


ABBILDUNG 18: DURCHFLUSSZYOMETRISCHE PHÄNOTYPISIERUNG DER MDSCs UND NK-ZELLEN IM PERIPHEREN BLUT

QUANTITATIVE ANALYSE DES PROZENTUALEN ANTEILS AN MDSCs (A) SOWIE NK-ZELLEN (B) AN TAG 0 (VOR BEHANDLUNG) UND AM ENDPUNKT. ES WURDEN 100.000 ZELLEN/PROBE GEMESSEN. JEDES SYMBOL REPRÄSENTIERT EINE MAUS. KONTROLLE N = 10; ISOTYP N = 8; α-PD1 N = 7-9; α-LAG-3 N = 8; * P < 0,05 UND *** P < 0,001 VS. START (= TAG 0); TWO-WAY ANOVA (TUKEY'S MULTIPLE COMPARISONS TEST). IN ALLEN VERSUCHSGRUPPEN KAM ES ZU EINEM SIGNIFIKANTEN ANSTIEG DER MDSCs.

5.4 IMMUNPHÄNOTYPISIERUNG DER MILZZELLEN

Unter Punkt 1.4.3.1 wurde bereits die Relevanz der EMH erwähnt, welche sich zu einem bedeutenden Anteil in der Milz manifestiert. Daher kommt es durch die fehlregulierte Hämatopoese bei der Tumorentwicklung zu einem veränderten immunologischen Phänotyp. Bei der Organentnahme wurde makroskopisch eine massive Splenomegalie festgestellt. Diese bestätigte sich bei der Gewebeaufarbeitung mit einer ausgeprägten Hyperplasie.

Im Anschluss wurde untersucht, wie sich die Verteilung der einzelnen Zellpopulationen durch die Tumorgenese veränderte und welchen Einfluss die ICI-Therapie auf immunologisch relevante Zellpopulationen hat (Abb. 19).

Der Anteil an T-Helfer- und zytotoxischen T-Zellen, sowie CD83⁺CD19⁺ B-Zellen war vergleichbar zwischen den experimentellen Gruppen (Abb. 19). In Analogie zu den Ergebnissen im peripheren Blut konnte auch hier eine verringerte Anzahl an Tregs sowie an erschöpften T-Zellen unter ICI-Therapie nachgewiesen werden (Abb. 19). Innerhalb der beiden ICIs zeigten sich nur marginale Unterschiede in der Verteilung der einzelnen Subpopulationen.

Hinsichtlich des Anteils an MDSCs sowie NK-Zellen kam es zu einem leichten, jedoch nicht signifikanten Anstieg unter den ICI-Therapien im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen (Abb. 19).

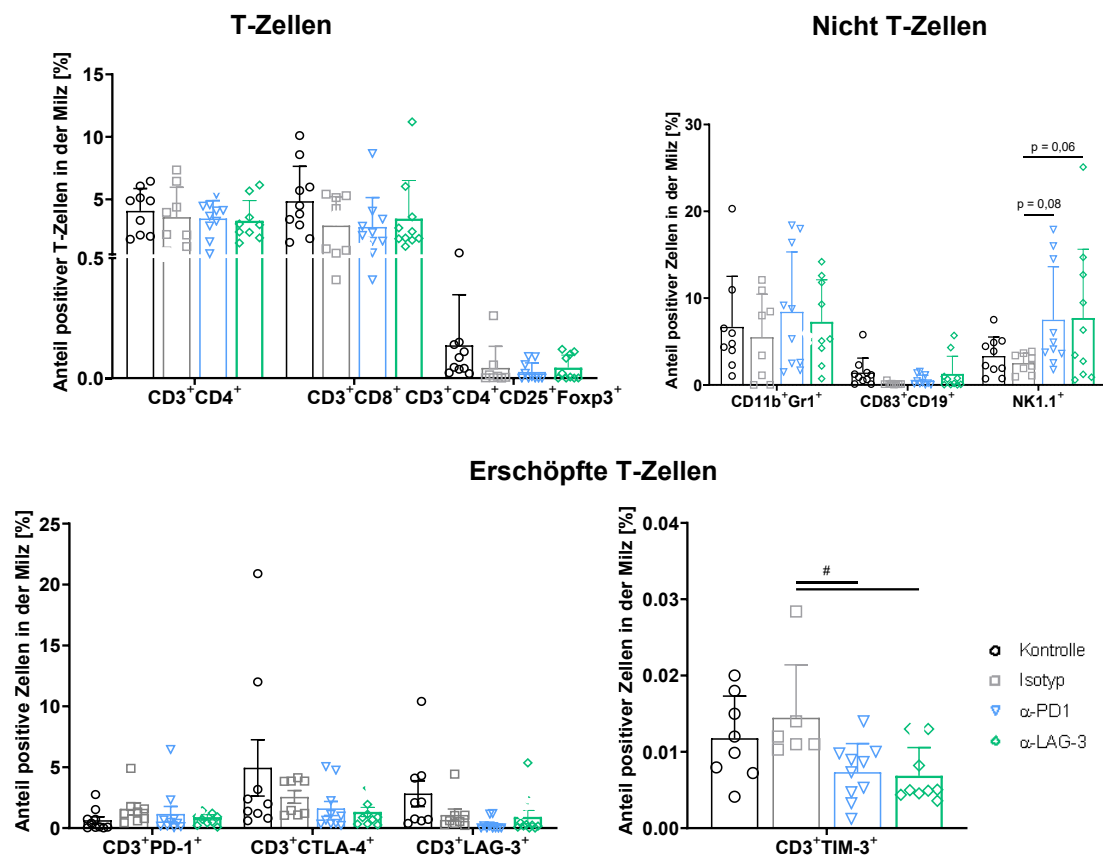


ABBILDUNG 19: DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE PHÄNOTYPISIERUNG DER MILZZELLEN

QUANTITATIVE ANALYSE DES PROZENTUALEN ANTEILS VERSCHIEDENER T-ZELLPOPULATIONEN ZUM ENDPUNKT. ES WURDEN 100.000 ZELLEN/PROBE GEMESSEN. JEDES SYMBOL REPRÄSENTIERT EINE MAUS. KONTROLLE N = 8-9; ISOTYP N = 6-8; α-PD1 N = 9; α-LAG-3 N = 8; # P < 0,05 vs. ISOTYP. TWO-WAY ANOVA (TUKEY'S MULTIPLE COMPARISONS TEST). INSBESONDERE DIE α-LAG-3-THERAPIE FÜHRTE ZU EINER ABNAHME DER „ERSCHÖPFUNGS“MARKERS TIM-3 AUF DEN UNTERSUCHTEN T-ZELLPOPULATIONEN.

5.5 VERÄNDERUNGEN DER GENEXPRESSION IN DER MILZ

Die Myelopoese wird im Rahmen der Tumorgenese beeinflusst, wodurch es zur Polarisierung von Neutrophilen und Makrophagen kommt. Um diesen Vorgang im experimentellen Modell zu untersuchen, wurden entsprechende Veränderungen auf transkriptioneller Ebene genauer untersucht. In diesem Zusammenhang sind *Colony stimulating factor 1 und 2* (*Csf1*, *Csf2*) für M1- und M2-Makrophagen [190,191], sowie *Early growth response protein 2* (*Egr2*) und *Arachidonate 5-lipoxygenase* (*Alox5*) für die Neutrophilenpolarisierung von Bedeutung [192–194]. Zusätzlich wurde der T-Zell-spezifische Transkriptionsfaktor (*T cell factor 1*; *Tcf1*) und der transformierende Wachstumsfaktor (*Transforming growth factor β* ; *Tgf- β*) analysiert. *Tcf1* ist an der T-Zell-Differenzierung beteiligt [195] und *Tgf- β* trägt maßgeblich zur lokalen Immunsuppression bei [196].

In Abbildung 20 ist das Expressionsniveau dieser Marker für die beiden Therapiegruppen in Referenz zur Kontrolle (Isotyp) dargestellt.

Die Expression von *Csf1* war nach ICI-Therapie signifikant herunterreguliert ($p < 0,0001$ vs. Isotyp), *Csf2* war in den Milzen der α -LAG-3-therapierten Mäusen leicht hochreguliert. Bedeutende Unterschiede zwischen den ICI-Therapien und der Isotyp-Kontrolle wurden bei *Egr2* und *Alox5* erkennbar: Beide Transkriptionsfaktoren waren signifikant herunterreguliert ($p < 0,0001$ vs. Isotyp). Ähnlich verhielt es sich bei der Expression von *Tgf- β* , dessen Expression in beiden Therapiegruppen unterhalb der Isotyp-Kontrolle lag.

Demgegenüber wurden Unterschiede zwischen den beiden ICIs für *Tcf1* erhoben. Die PD1-Blockade führte zu einer Herunterregulation von *Tcf1*, α -LAG-3 hingegen induzierte die Expression dieses T-Zell-stimulierenden Faktors. Aufgrund der hohen individuellen Schwankung wurde jedoch keine Signifikanz erreicht.

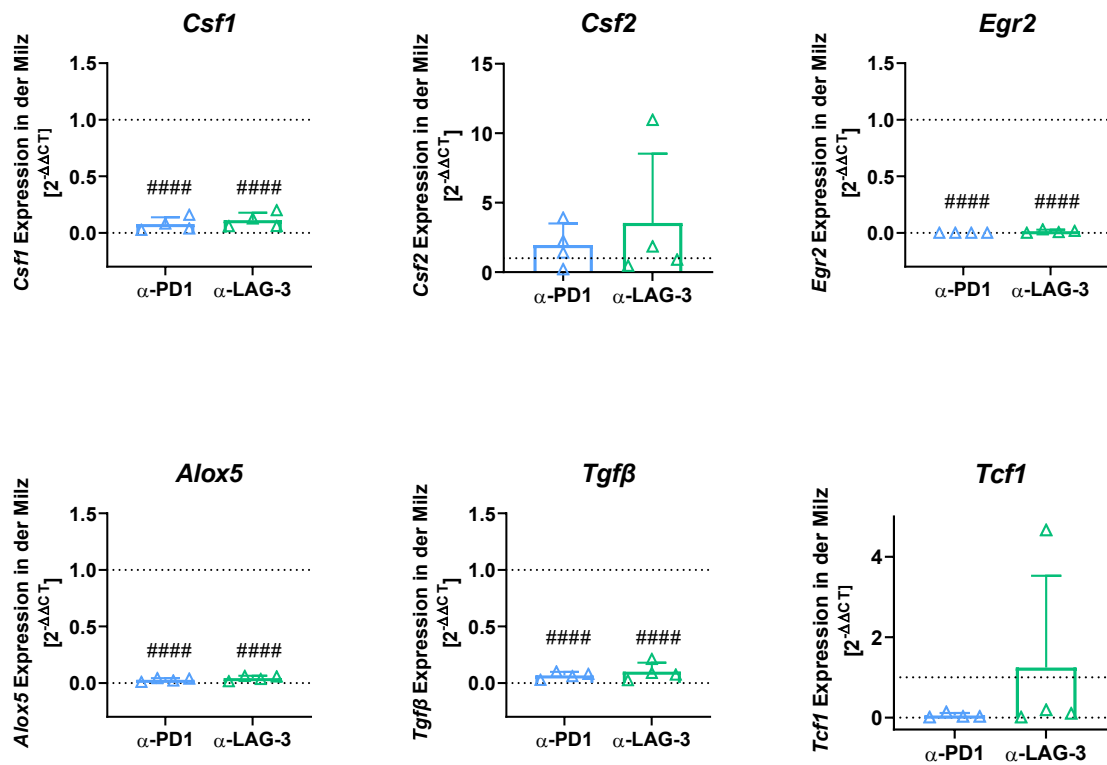


ABBILDUNG 20: ANALYSE DER GENEXPRESSION IN DER MILZ

DURCHFÜHRT WURDE EINE QUANTITATIVE REAL-TIME PCR. ES WURDEN MYELOISCHE UND IMMUNREGULATORISCHE MARKER NACHGEWIESEN. DIE GESAMT-RNA WURDE IN cDNA TRANSKRIBIERT UND ANSCHLIEßEND DIE QUANTITATIVE *REAL-TIME* PCR UNTER VERWENDUNG SPEZIFISCHER PRIMER UND SONDEN DURCHFÜHRT. JEDES SYMBOL REPRÄSENTIERT EINE MAUS. $n = 4$ MÄUSE/GRUPPE. DIE DATEN SIND ALS $2^{-\Delta\Delta CT}$ -WERTE + SD ANGEZEIGT. #### $p < 0,0001$ vs. ISOTYP. TWO-WAY ANOVA (TUKEY'S MULTIPLE COMPARISONS TEST). BEIDE ICI-THERAPIEN FÜHRTE ZU EINER SIGNIFIKANTEN HERUNTERREGULATION DER MARKER *Csf1*, *Egr2*, *ALOX5* UND *TGF-β*.

5.6 IMMUNPHÄNOTYPISIERUNG DER TUMOREN

In den weiterführenden Analysen wurde der Einfluss der jeweiligen Therapien auf das lokale Tumormikromilieu erfasst. In den Abbildungen 21 und 22 sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Phänotypisierung der Tumoren dargestellt.

Der Anteil an T-Helfer- und zytotoxischen T-Zellen wurde durch die jeweiligen Behandlungen geringfügig beeinflusst (Abb. 21). Signifikante Unterschiede wurden nicht detektiert. Ähnliche Befunde wurden auch für die B- und NK-Zellen erhoben. Dennoch führten beide ICIs zu einer Abnahme der Tregs und MDSCs. Letztere waren nach α-LAG-3-Therapie signifikant verringert ($p < 0,01$ vs. Isotyp; $p < 0,05$ vs. α-PD1, Abb. 21). Des Weiteren konnte auch hier die Tendenz zur Therapie-assoziierten Reduktion erschöpfter T-Zellen nachgewiesen werden. Dabei war eine signifikante Reduktion der CTLA4⁺ T-Zellen unter α-PD1-Therapie, eine Abnahme von PD1⁺ T-Zellen unter α-

LAG-3-Therapie, sowie eine Verringerung der LAG3⁺ T-Zellen in beiden Behandlungsgruppen nachweisbar (Abb. 21).

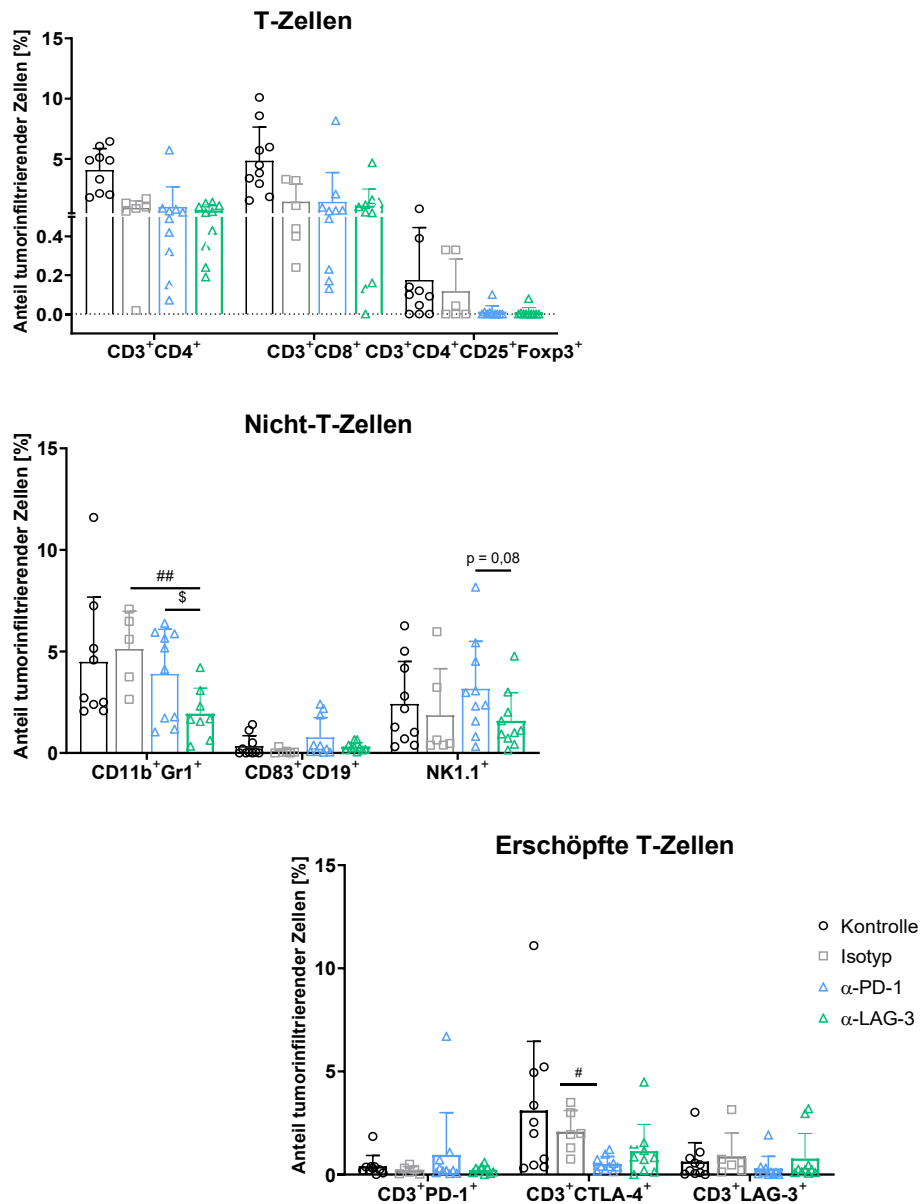


ABBILDUNG 21: DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE PHÄNOTYPISIERUNG DES TUMORS

QUANTITATIVE ANALYSE DES PROZENTUALEN ANTEILS VERSCHIEDENER T-ZELLPOPULATIONEN ZUM ENDPUNKT. ES WURDEN 100.000 ZELLEN/PROBE GEMESSEN. JEDES SYMBOL REPRÄSENTIERT EINE MAUS. KONTROLLE N = 9-10; ISOTYP N = 5-6; α-PD1 N = 9; α-LAG-3 N = 8; # P < 0,05, ## P < 0,01 UND ### P < 0,001 VS. ISOTYP; \$ P < 0,05 VS. ICI; TWO-WAY ANOVA (TUKEY'S MULTIPLE COMPARISONS TEST). DIE BLOCKADE DER IMMUNCHECKPOINTS FÜHRTE VORRANGIG ZU EINER REDUKTION DER TREGS, DER MDSCs UND DER CTLA-4⁺ T-ZELLEN.

Darüber hinaus wurden die T-Zellen in den Tumoren weiter charakterisiert und der Anteil naiver, Effektor- (*effector memory*; T_{EM}) und zentraler Gedächtnis-T-Zellen (*central memory*; T_{CM}) jeweils für die CD4⁺ und für die CD8⁺ T-Zellen erfasst (Abb. 22). Hierbei zeigte sich ein signifikanter Anstieg der CD4⁺ T_{EM} unter α-LAG-3-, nicht aber

unter α -PD1 Therapie ($p < 0,001$ vs. Isotyp und α -PD1). Im Gegensatz dazu hatten die Behandlungen keinen Einfluss auf die CD4⁺ naiven und T_{CM}.

Die nähere Betrachtung der CD8⁺ T-Zellsubpopulationen zeigte, dass insbesondere der Anteil an naiven T-Zellen nach ICI verringert war. Interessanterweise war dies unabhängig von der Art der Checkpoint-Blockade. Der Anteil an CD8⁺ T_{EM} und T_{CM} blieb nahezu unverändert. Lediglich nach α -LAG-3 Therapie waren marginal mehr Zellen in den residualen Tumoren nachweisbar.

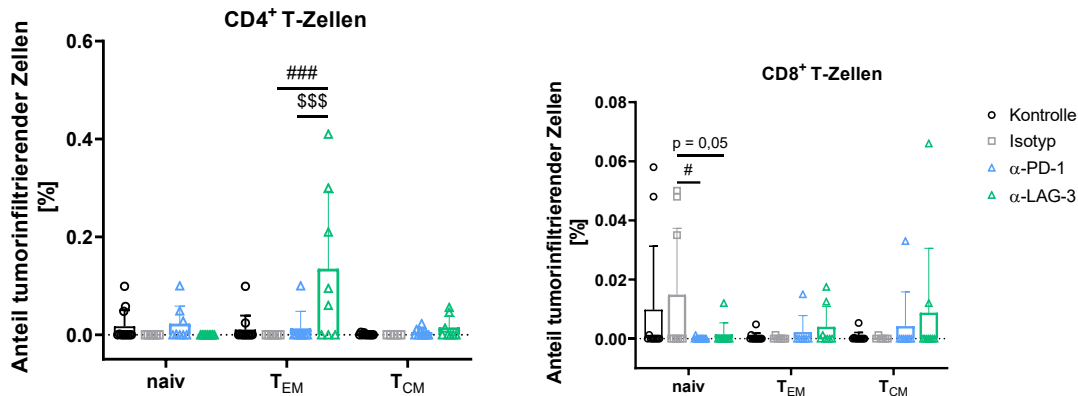


ABBILDUNG 22: DIFFERENZIERUNG VERSCHIEDENER CD4⁺- UND CD8⁺ T-ZELLEN IM TUMOR

MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRISCHER PHÄNOTYPIERUNG WURDE EINE QUANTITATIVE ANALYSE DES PROZENTUALEN ANTEILS VERSCHIEDENER T-ZELLPOPULATIONEN ZUM ENDPUNKT DURCHFÜHRT. ES WURDEN 100.000 ZELLEN/PROBE GEMESSEN. JEDES SYMBOL REPRÄSENTIERT EINE MAUS. KONTROLLE N = 10; ISOTYP N = 6-9; α -PD1 N = 6; α -LAG-3 N = 6; # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ vs. ISOTYP; \$\$\$ $p < 0,001$ vs. ICI; TWO-WAY ANOVA (TUKEY'S MULTIPLE COMPARISONS TEST). HERAUSRAGEND IST HIER DER SIGNIFIKANTE ANSTIEG AN CD4⁺ T_{EM} UNTER α -LAG-3-BLOCKADE.

5.7 CHARAKTERISIERUNG DES TUMORMIKROMILIEUS MITTELS IMMUNFLUORESCENZ

Zur räumlichen Lokalisation der Immunzellsubpopulationen im TME wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Der Fokus wurde auf die vorherrschenden immunsuppressiven Zelltypen gesetzt: CD206⁺F4/80⁺ TAM, CD163⁺ M2-Makrophagen, CD11b⁺Gr1⁺ MDSC und CD11b⁺Gr1⁺PD-L1⁺ regulatorische Granulozyten. Zusätzlich wurde der Ki-67-Proliferationsindex und CD3 als T-Zell-Marker sowie Gr1 als Granulozytenmarker bestimmt, um die Auswirkung der Behandlung auf die Proliferation von Tumor- und Immunzellen festzustellen. Abbildung 23, A zeigt repräsentative Aufnahmen der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie des TMEs, sowie die quantitative Auswertung der untersuchten Marker.

Durch die ICI-Therapien konnten signifikante Effekte auf die immunsuppressiven Zelltypen nachgewiesen werden (Abb. 23, B). Der Anteil CD206⁺F4/80⁺ TAMs, sowie äquivalent dazu CD163⁺ M2-Makrophagen war sowohl nach PD1 als auch LAG-3 Blockade im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle signifikant reduziert. Vergleichbare Befunde wurden

auch für die tumor-infiltrierenden MDSCs und Tregs erhoben. Die α -LAG-3-, jedoch nicht die α -PD1 Therapie reduzierte die Anzahl an MDSCs und regulatorischer Granulozyten im Tumor signifikant gegenüber der Isotypkontrolle ($p < 0,01$ und $p < 0,05$ vs. Isotyp).

Damit einhergehend wurde auch die Tumorzellproliferation durch die beiden Therapien beeinflusst. Nach den Behandlungen wurden bei der Ki-67-Färbung weniger proliferierende Tumorzellen festgestellt, dafür jedoch einige infiltrierende T-Zellen, welche positiv für Ki-67 waren.

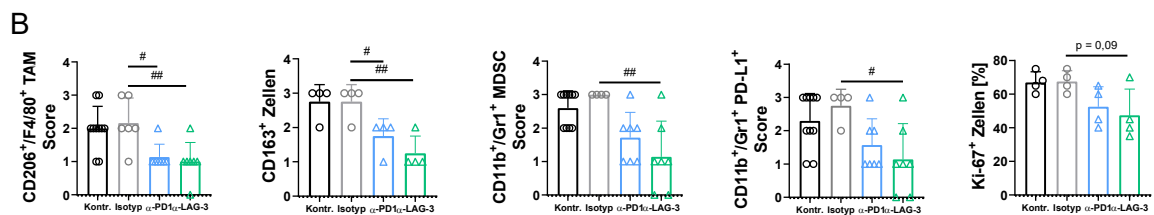
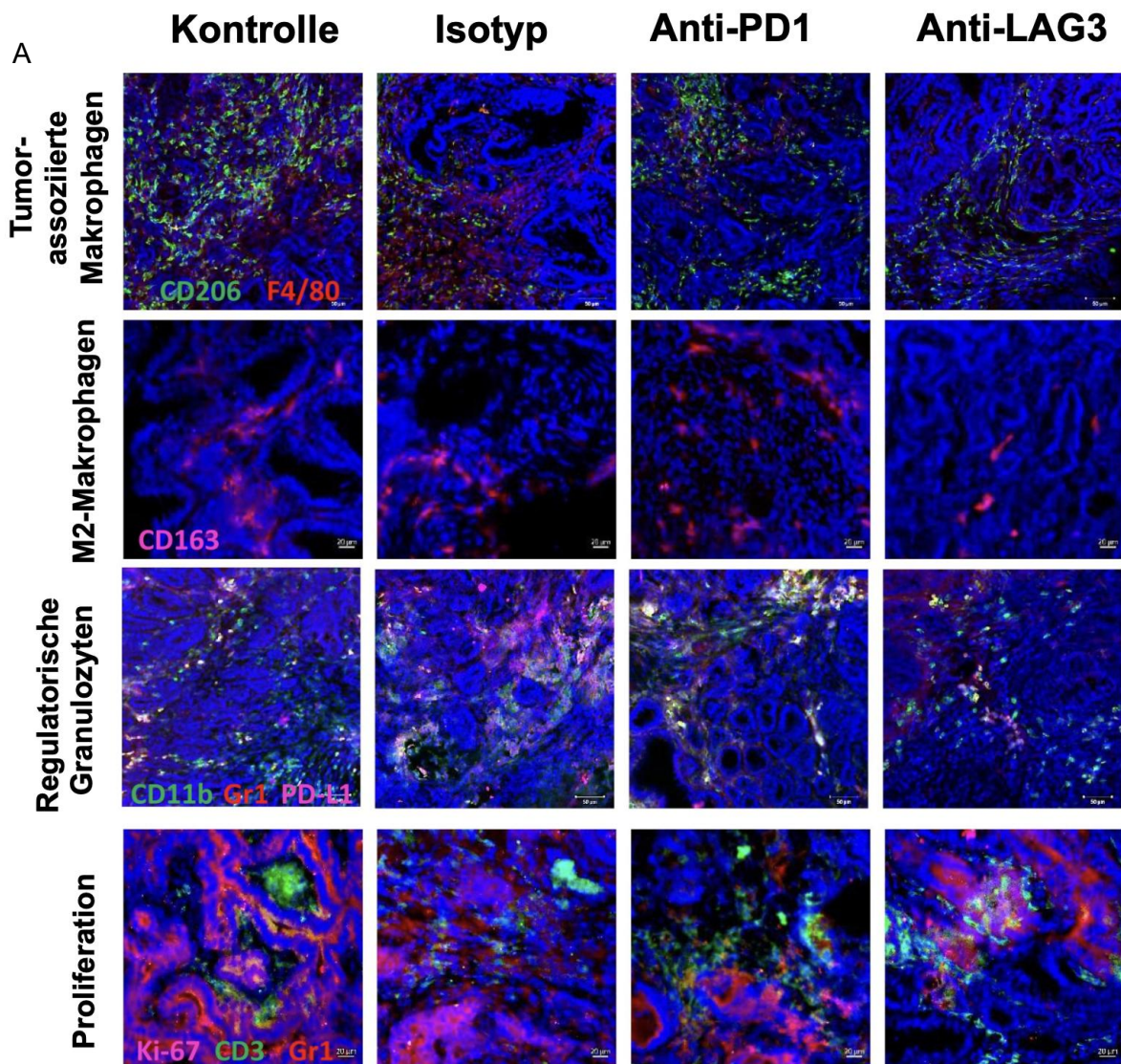


ABBILDUNG 23: NACHWEIS TUMORINFILTRIERENDER IMMUNZELLEN

KONFOKALE LASER-SCANNING-MIKROSKOPIE: (A) REPRÄSENTATIVE BILDER DER IMMUNFLUORESCENZ; (B) QUANTITATIVE ANALYSE DER TUMORINFILTRIERENDEN IMMUNZELLEN. GEZÄHLT IN 2-3 HPF/FALL. JEDES SYMBOL REPRÄSENTIERT EINE MAUS. KONTROLLE N = 4-10; ISOTYP N = 4-6; α -PD1 N = 4-7; α -LAG-3 N = 4-7; # P < 0,05 UND ## P < 0,01 VS. ISOTYP. DAS INFILTRATIONSMUSTER WURDE MIT HILFE EINES PUNKTESYSTEMS SEMIQUANTITATIV ANALYSIERT. 0 = NICHT; 1 = LEICHT; 2 = MÄßIG; 3 = STARK ONE-WAY ANOVA (TUKEY'S MULTIPLE COMPARISONS TEST). BEIDE ICIs FÜHRTE ZU EINER REDUKTION DER INFILTRIERENDEN MYELOIDEN ZELLEN UND VERMITTELTE EINE REDUKTION DER TUMORZELLPROLIFERATION.

Ergänzend wurde das Vorkommen von *interferon regulatory factor 5* (IRF5) untersucht, sowie eine Ko-Färbung für PD1 durchgeführt, um den funktionellen Status dieser Zellen zu ermitteln. IRF5 ist ein Regulator der Autoimmunität und bei der B-Zell-Aktivierung beteiligt [197].

Beide Therapien führten zu einem leichten, aber nicht signifikanten Anstieg der IRF5⁺ Zellen im Tumor (Abb. 24). Der Anteil an PD1/IRF5 doppelt positiver Zellen war zwischen den beiden Therapien unterschiedlich. Nach α -PD1-Behandlung wurden einige IRF5⁺/PD1⁺ Zellen nachweisbar. Deren Anzahl entsprach dem der Kontrolltumoren. Hingegen konnten infolge der α -LAG-3 Behandlung nahezu keine IRF5⁺/PD1⁺ Zellen nachgewiesen werden, sodass diese vermutlich eher funktionell waren (Abb. 24).

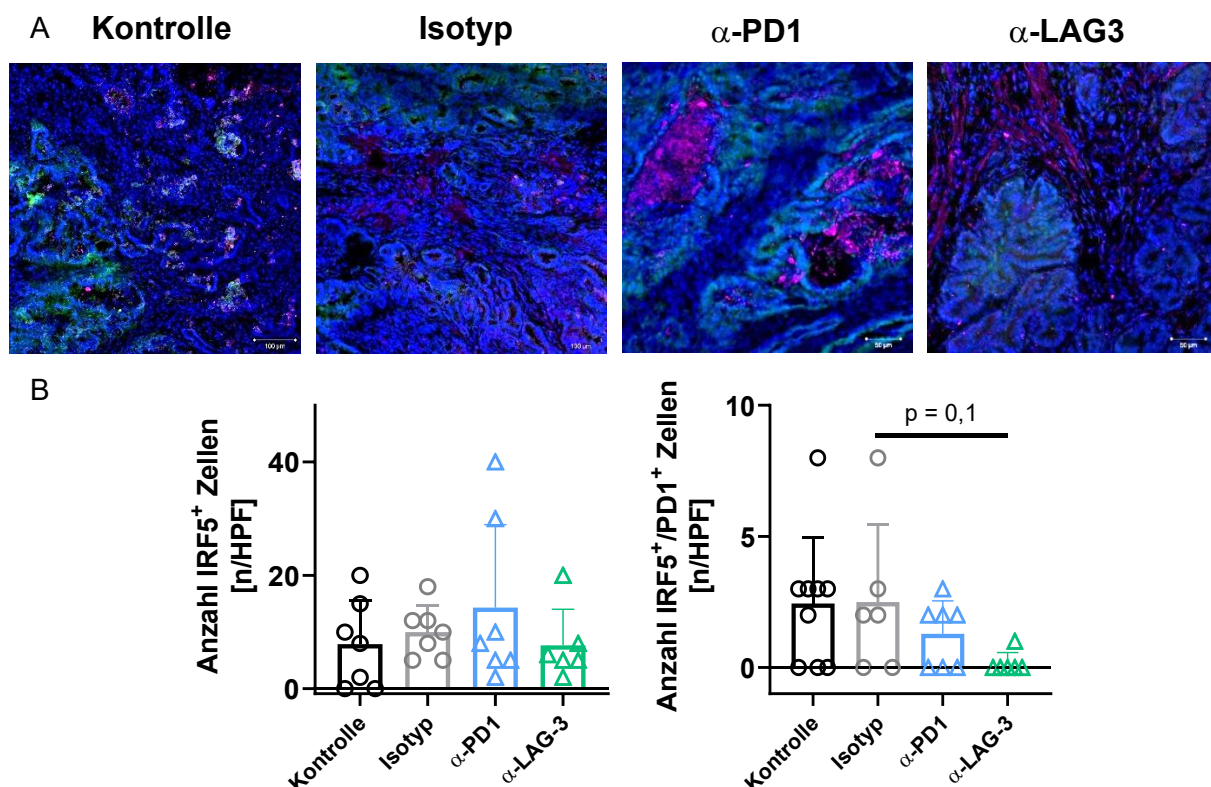


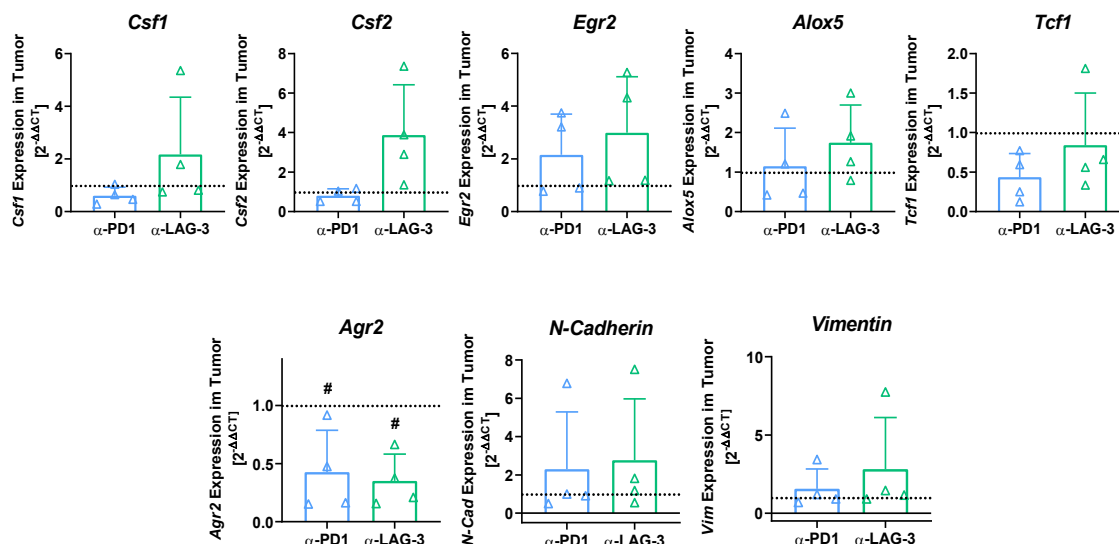
ABBILDUNG 24: NACHWEIS TUMORINFILTRIERENDER IRF5⁺/PD1⁺-ZELLEN

KONFOKALE LASER-SCANNING-MIKROSKOPIE: (A) REPRÄSENTATIVE BILDER DER IMMUNFLUORESCENZ; (B) QUANTITATIVE ANALYSE DER TUMORINFILTRIERENDEN IMMUNZELLEN. GEZÄHLT IN 2-3 HPFs/FALL. JEDES SYMBOL REPRÄSENTIERT EINE MAUS. KONTROLLE N = 7-9; ISOTYP N = 6-7; α -PD1 N = 7; α -LAG-3 N = 6. DAS INFILTRATIONSMUSTER WURDE MIT HILFE EINES

SCORINGSYSTEMS SEMIQUANTITATIV ANALYSIERT. 0 = NICHT; 1 = LEICHT; 2 = MÄßIG; 3 = STARK. ONE-WAY ANOVA (TUKEY'S MULTIPLE COMPARISONS TEST).

5.8 GENEXPRESSIONSANALYSE DER TUMOREN

Analog zu den Analysen der Milzen wurde ebenfalls eine begleitende Genexpressionsanalyse für die Gene *Csf1*, *Csf2*, *Egr2*, *Alox5* und *Tcf1* durchgeführt. Zusätzlich wurde das Protoonkogen Anterior gradient-2 (*Agr2*) und die Marker der Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) *N-Cadherin* und *Vimentin* untersucht (Abb. 25). Dabei wurden Unterschiede zwischen beiden ICIs nachgewiesen. Während die PD1-Blockade zu einer leichten Abnahme führte bzw. keinen Einfluss auf die *Csf1* und *Csf2* hatte, wurden beide Gene vermehrt nach LAG-3-Blockade detektiert. Darüber hinaus waren *Egr2* und *Alox5* unter beiden Therapien im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Im Unterschied dazu war *Tcf1* primär unter α -PD1 Behandlung verringert und *Agr2* infolge beider Therapien signifikant reduziert ($p < 0,05$ vs. Isotyp). Eine geringe AGR2-Expression wird mit einem immunologisch "heißen" und immunsuppressiven Phänotyp in Verbindung gebracht, der durch eine starke Immunzellinfiltration, eine erhöhte Konzentration von Tgf- β und durch die EMT-Aktivierung gekennzeichnet ist [198]. Vor diesem Hintergrund wurden die Transkripte der EMT-Marker *N-Cadherin* und *Vimentin* analysiert. Eine Überexpression der EMT-Marker war weder unter α -PD1 noch unter α -LAG-3-Therapie nachweisbar, jedoch zeigte sich ein Trend: Beide Marker waren nach ICI leicht erhöht (α -LAG-3 > α -PD1), analog zur Herunterregulation von AGR2.



ABILDUNG 25: ANALYSE DER GENEXPRESSION IM TUMOR

DURCHFÜHRT WURDE EINE QUANTITATIVE REAL-TIME PCR. ES WURDEN MYELOISCHE UND EPITHELIAL-MESENCHYMAL ÜBERGANGSMARKER IM TUMOR NACHGEWIESEN. DIE GESAMT-RNA WURDE IN cDNA TRANSKRIBIERT UND ANSCHLIEßEND DIE QUANTITATIVE PCR UNTER VERWENDUNG SPEZIFISCHER PRIMER UND SONDEN DURCHFÜHRT JEDES SYMBOL REPÄSENTIERT EINE MAUS; N = 4 MÄUSE/GRUPPE. ALLE DATEN SIND ALS 2^{-ΔΔCT}-WERTE + SD ANGEZEIGT. # P < 0,05 VS. ISOTYP; ONE-WAY-ANOVA (TUKEY'S MULTIPLE COMPARISONS TEST). IM HINBLICK AUF DIE UNTERSUCHTEN MARKER KONNTEN NUR MARGINALE UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DEN BEIDEN ICI DETEKTIERT WERDEN.

5.9 EINFLUSS DMMR-ASSOZIIERTER TUMOREN AUF DIE HÄMATOPOESE

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Untersuchung der Hämatopoese bei dMMR-assozierten Tumoren, worauf im Folgenden näher eingegangen wird.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Entwicklung von $Msh2^{loxP/loxP;TgTg(Vil1-cre)}$ -assozierten Tumoren zu umfassenden Veränderungen der Hämatopoese führt. Eine verstärkte Myelopoese ging mit einer verminderten Lymphopoese und Erythropoese einher, wobei die verminderte Erythrozytenproduktion auch klinische Zeichen einer Anämie zur Folge hat [199]. Insgesamt waren vielfältige Veränderungen der verschiedenen Progenitorzellen nachweisbar. Diese wurden durch die ICI-Therapie partiell beeinflusst.

Bereits morphologisch wurden im blutbildenden Knochenmark deutliche Unterschiede in den hämatopoetischen Zellreihen durch den Tumorbefall detektiert. Abbildung 26 stellt repräsentative mikroskopische Bilder der hämatopoetischen Zellen von tumorfreien, sowie tumortragenden $Msh2^{loxP/loxP;TgTg(Vil1-cre)}$ Mäusen dar, welche sich im Früh- bzw. im Spätstadium der Tumorgenese befanden. Hier ist bereits die deutliche Zunahme der neutrophilen Granulozyten und die verringerte Anzahl erythropoetischer Zellen unter der Tumorgenese auffällig.

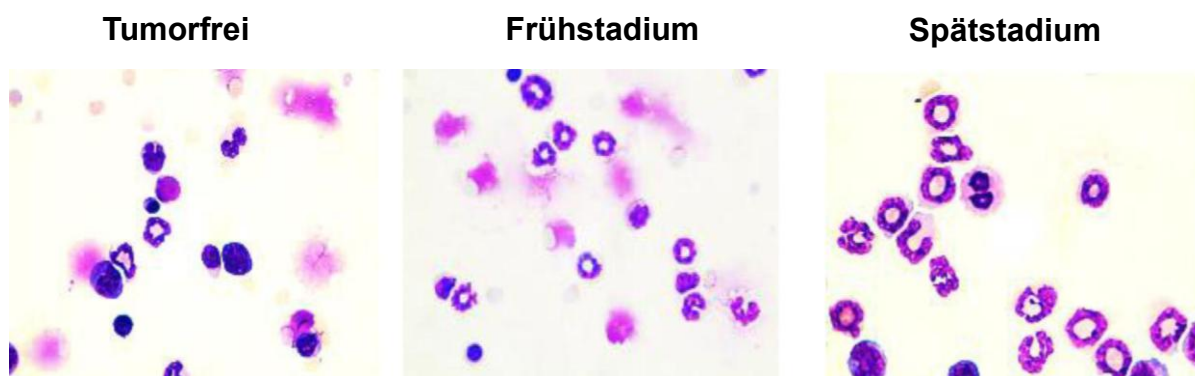


ABBILDUNG 26: MORPHOLOGIE HÄMATOPOETISCHER ZELLEN IM KNOCHENMARK

REPRÄSENTATIVE MIKROSKOPISCHE BILDER VON HÄMATOPOETISCHEN ZELLEN DES KNOCHENMARKS VON TUMORFREIEN, SO WIE TUMORTRAGENDEN $Msh2^{loxP/loxP;TgTg(Vil1-cre)}$ MÄUSEN IM FRÜH- UND SPÄTSTADIUM. FÄRBUNG DER ZELLEN NACH PAP-PENHEIM. VERGRÖßERUNG: x1000. DAS SPÄTSTADIUM IST GEKENNZEICHNET DURCH EINE DEUTLICHE REDUKTION ERYTHRO-POETISCHER ZELLEN, ZUGUNSTEN DER MYELOPOESE MIT EINER DEUTLICHEN ZUNAHME DER NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN.

Neben den deutlich verringerten erythropoetischen Zellen waren auch Lymphozyten und Plasmazellen sowie Myelozyten bei tumortragenden Mäusen stark vermindert. Im Gegensatz dazu kam es zu einem signifikanten Anstieg der Metamyelozyten und neutrophilen Granulozyten (Abb. 27).

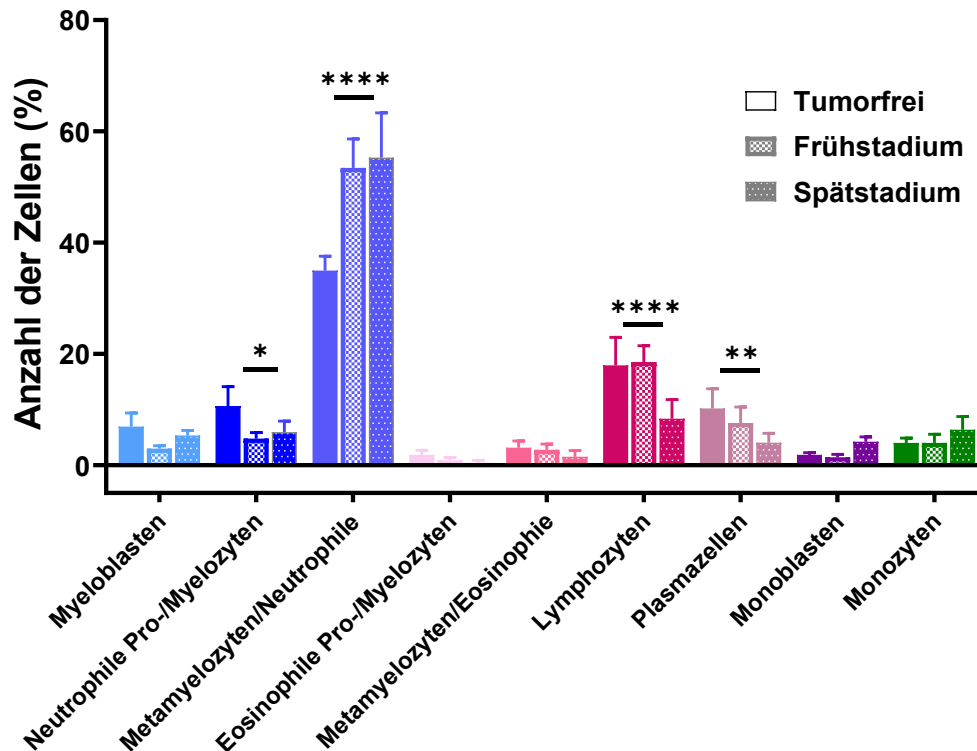


ABBILDUNG 27: MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN HÄMATOPOETISCHER ZELLEN

NACH PAPPENHEIM GEFÄRBT UND IN FOLGENDE ZELLTYPEN DIFFERENZIIERT: MYELOBLASTEN, NEUTROPHILE PRO-/MYELOZYTEN, METAMYELOZYTEN/NEUTROPHILE GRANULOZYTEN, EOSINOPHILE PRO-/MYELOZYTEN, METAMYELOZYTEN/EOSINOPHILE, LYMPHOZYTEN, PLASMАЗELLEN, MONOBLASTEN, MONOZYTEN. DIE QUANTIFIZIERUNG ERFOLGTE VERBLINDET. MITTELWERT + SD, N = 7 MÄUSE/GRUPPE; * P < 0,05; ** P < 0,01; **** P < 0,0001; ONE-WAY ANOVA (SIDAK'S MULTIPLE COMPARISONS TEST).

Um diese Veränderungen genauer zu untersuchen, wurden spezifische Subpopulationen durchflusszytometrisch charakterisiert. Einen Überblick dieser Zellpopulationen sowie deren Charakteristika und Reifungsstadien ist in Abbildung 28 dargestellt.

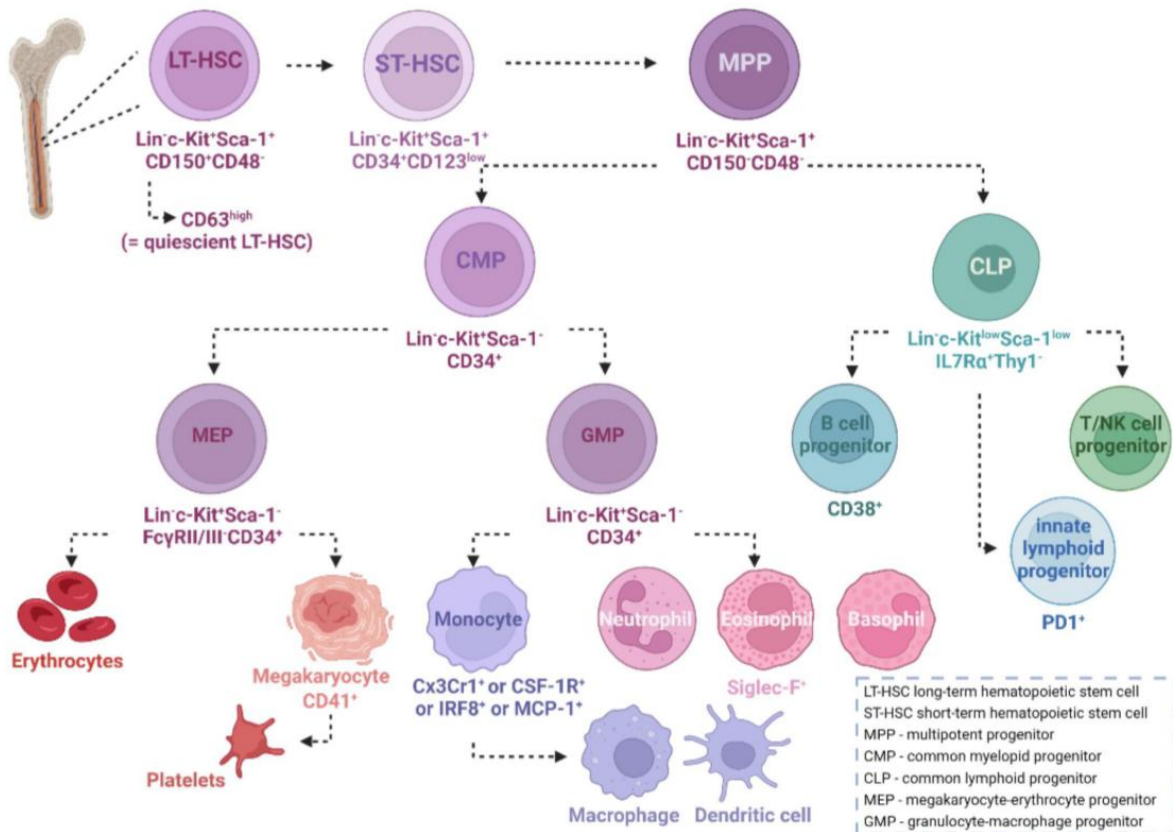


ABBILDUNG 28: ÜBERSICHTSGRAPHIK ZUR HÄMATOPOESE

DARSTELLUNG DER VERSCHIEDENEN ZELLTYPEN UND DEN CHARAKTERISIERENDEN IMMUNPHÄNOTYPISCHEN OBERFLÄCHENMARKERN, DIE FÜR DIE DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE PHÄNOTYPISIERUNG VERWENDET WURDEN. ERSTELLT MIT BIOENDER.COM.

In der Durchflusszytometrie konnten die Veränderungen in der Hämatopoese bestätigt werden. Die Abbildungen 29 - 32 repräsentieren die Ergebnisse der verschiedenen Zelltypen bei tumorfreien und tumortragenden Mäusen jeweils im Früh- und im Spätstadium. Der Anteil an langfristigen, ruhenden-langfristigen und kurzzeitigen hämatopoetischen Stammzellpopulationen, *Long-term hematopoietic stem cell* (LT-HSC; Lin⁻c-Kit⁺Sca-1⁺CD150⁺CD48⁻), *Quiescent* LT-HSC (Lin⁻c-Kit⁺Sca-1⁺CD150⁺CD48⁻CD63^{high}) und *Short-term hematopoietic stem cell* (ST-HSC; Lin⁻c-Kit⁺Sca-1⁺CD34⁺CD123^{low}) war vergleichbar zwischen tumorfreien und tumortragenden Mäusen (Abb. 29).

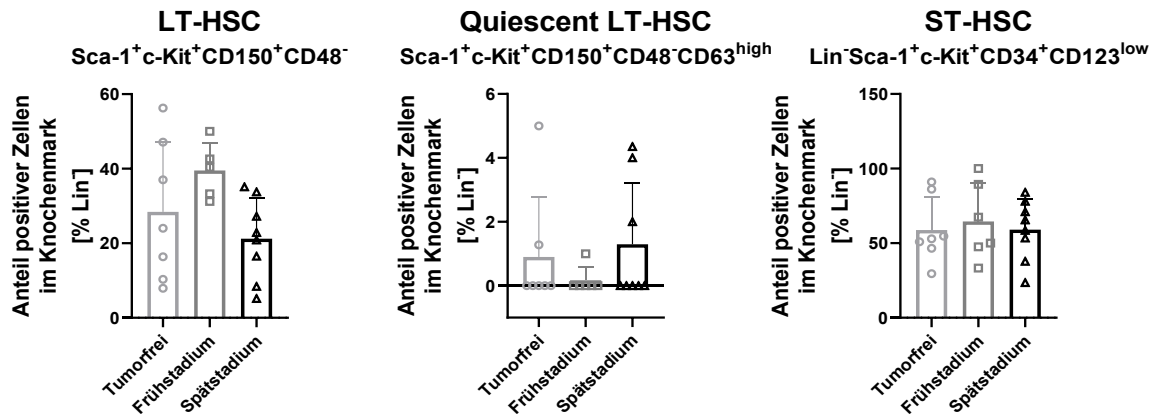


ABBILDUNG 29: PHÄNOTYPISIERUNG DER HÄMATOPOETISCHEN STAMMZELLPOPULATIONEN

DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE, QUANTITATIVE ANALYSE DES PROZENTUALEN ANTEILS DER $LIN^- c-Kit^+$ -VORLÄUFERZELLEN IM KNOCHENMARK. ES WURDEN 100.000 ZELLEN/PROBE GEMESSEN. MITTELWERT + SD, JEDES SYMBOL REPRÄSENTIERT EINE MAUS; N = 5-8 MÄUSE/GRUPPE. ONE-WAY ANOVA (SIDAK'S MULTIPLE COMPARISONS TEST).

Bei den hämatopoetischen Vorläuferzellen hingegen waren deutliche Unterschiede zu verzeichnen (Abb. 30). Der Anteil multipotenter Progenitorzellen (*multipotent progenitor*; *MPP*; $Lin^- c-Kit^+ Sca-1^+ CD150^- CD48^-$) korrelierte positiv mit dem Tumorwachstum und war im Spätstadium signifikant erhöht ($p < 0,05$ vs. tumorfrei). Die sich daraus differenzierenden gemeinsamen myeloiden Vorläufer (*common myeloid progenitor*; *CMP*; $Lin^- c-Kit^+ Sca-1^- CD34^+$) sind bereits im Frühstadium signifikant angestiegen ($p < 0,0001$ vs. tumorfrei) und auch im Spätstadium erhöht gewesen ($p < 0,05$ vs. Frühstadium). Dies ging mit einem Ungleichgewicht der gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzellen (*common lymphoid progenitor*; *CLP*; $Lin^- c-kit^{low} Sca-1^{low} IL7R\alpha^+ Thy1^-$) einher (Abb. 30). Hier zeigte sich eine signifikante Reduktion dieser Zellen, welche mit der Tumorgenese korrelierte ($p < 0,01$ vs. tumorfrei). Auch in den folgenden Differenzierungsstufen der *CLPs* konnte eine deutliche Verringerung von B-Zell-Vorläufern (*B cell progenitor*; $IL-7R\alpha^+ Sca-1^{low} c-Kit^{low} Thy1^- CD38^+$) ($p < 0,01$ vs. tumorfrei) sowie der angeborenen lymphoiden Vorläuferzellen (*innate lymphoid progenitor*; *ILP*; $Lin^- IL-7R\alpha^+ Sca-1^{low} c-Kit^{low} Thy1^- PD1^+$) ($p < 0,05$ vs. tumorfrei) in den Spätstadien nachgewiesen werden (Abb. 30). Zusätzlich kam es zu einer Abnahme der Megakaryozyten ($Lin^- c-Kit^+ Sca-1^- CD34^+ CD41^+$).

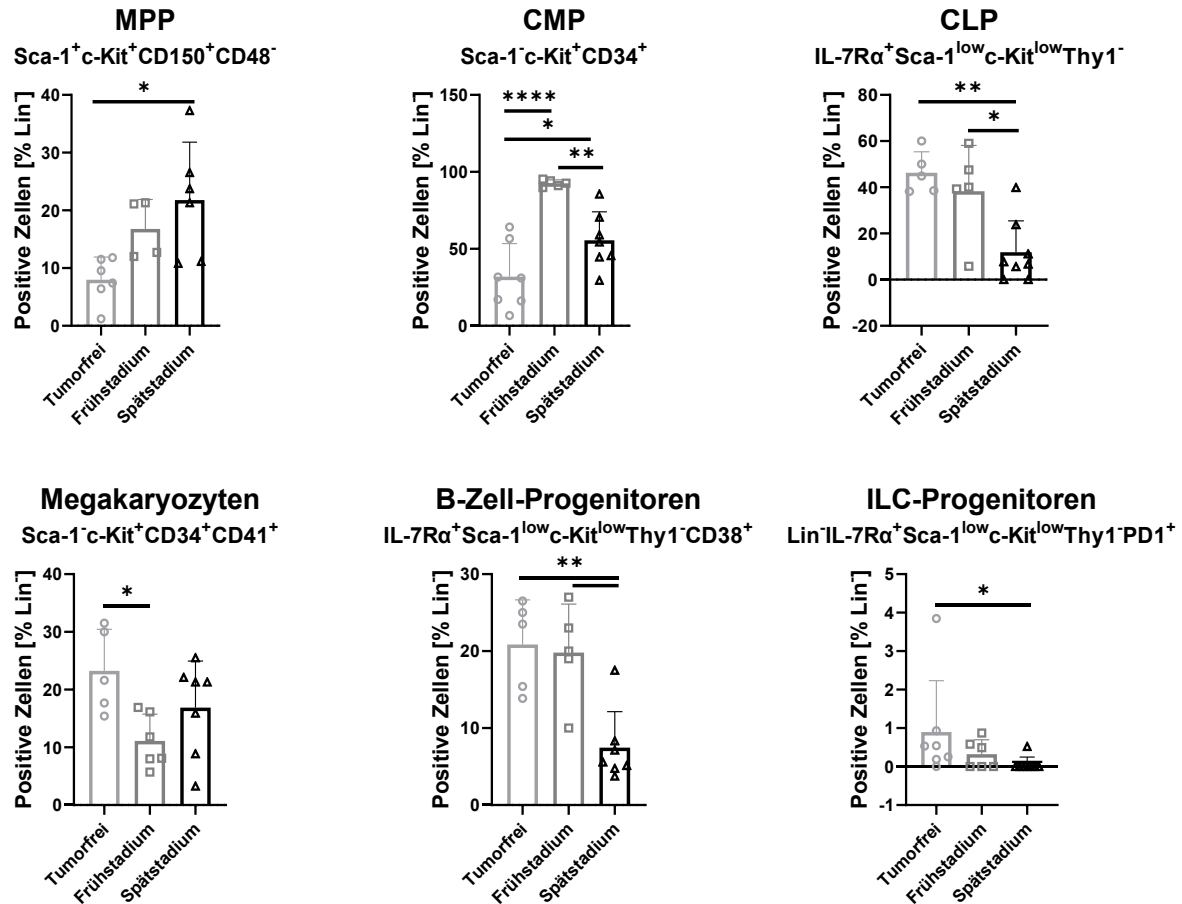


ABBILDUNG 30: DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE PHÄNOTYPISIERUNG DER HÄMATOPOETISCHEN VORLÄUFERZELLEN

QUANTITATIVE ANALYSE DES PROZENTUALEN ANTEILS DER LIN⁻C-KIT⁺-VORLÄUFERZELLEN IM KNOCHENMARK. ES WURDEN 100.000 ZELLEN/PROBE GEMESSEN. MITTELWERT + SD, JEDES SYMBOL REPRÄSENTIERT EINE MAUS; N = 5-7 MÄUSE/GRUPPE. * P < 0,05; ** P < 0,01; **** P < 0,0001; ONE-WAY ANOVA (SIDAK'S MULTIPLE COMPARISONS TEST). DAS TUMORWACHSTUM GEHT MIT TIEFGREIFENDEN VERÄNDERUNGEN IN DER HÄMATOPOESE EINHER, DIE DURCH REDUKTION BZW. ZUNAHME VON PROGENITORZELLEN GEKENNZEICHNET IST.

Bei Betrachtung der Sca-1⁺c-Kit⁺CD34⁺CMPs (Monozyten) manifestierten sich ebenfalls wesentliche Unterschiede zwischen tumorfremen und tumortragenden Mäusen. Je nach Vorhandensein der verschiedenen Marker wurden drei Populationen unterschieden: Lin⁻c-Kit⁺Sca-1⁺CD34⁺CSF-1R⁺ Zellen waren signifikant vermehrt in tumortragenden Mäusen. Demgegenüber nahm der Anteil Lin⁻c-Kit⁺Sca-1⁺CD34⁺Cxcr3⁺ und Lin⁻c-Kit⁺Sca-1⁺CD34⁺IRF8⁺ Monozyten deutlich ab (Abb. 31). IRF8 fördert die Produktion von Monozyten und kontrolliert somit indirekt die Expansion der Neutrophilen [200].

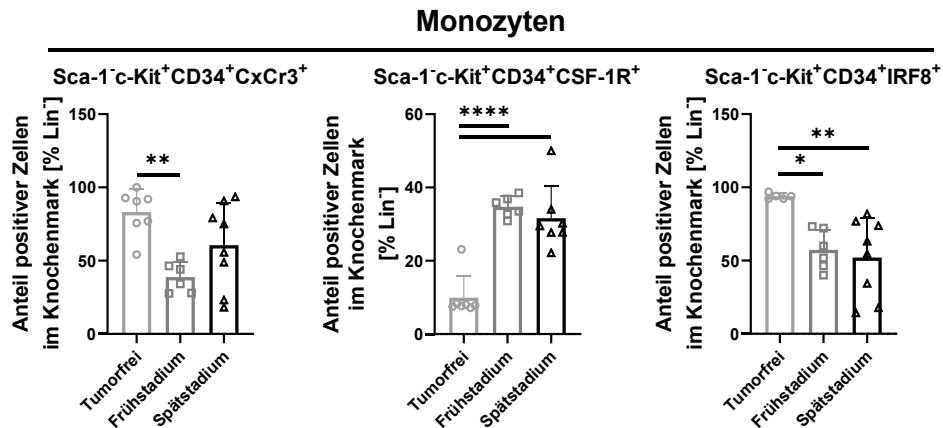
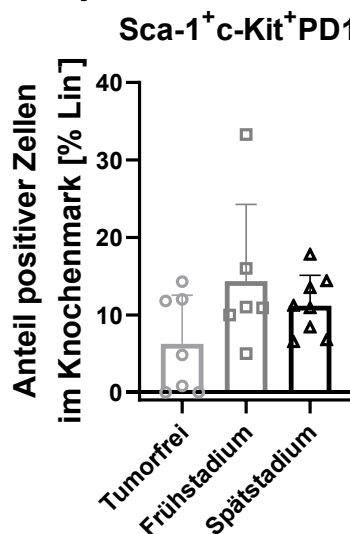


ABBILDUNG 31: PHÄNOTYPISIERUNG DER MONOZYTÄREN VORLÄUFERZELLEN

DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE, QUANTITATIVE ANALYSE DES PROZENTUALEN ANTEILS DER LIN⁻c-KIT⁺-VORLÄUFERZELLEN IM KNOCHENMARK. ES WURDEN 100.000 ZELLEN/PROBE GEMESSEN. MITTELWERT + SD, JEDES SYMBOL REPRÄSENTIERT EINE MAUS; N = 5-8 MÄUSE/GRUPPE. * P < 0,05; ** P < 0,01; **** P < 0,0001; ONE-WAY ANOVA (SIDAK'S MULTIPLE COMPARISONS TEST). BESONDERS AUFFÄLLIG IST DER SIGNIFIKANTE ANSTIEG CSF-1R⁺ ZELLEN BEREITS IM FRÜHEN STADIUM DER TUMOR-GENESE.

Ergänzend kam es unter der Tumorgenese zu einem Anstieg hämatopoetischer Vorläuferzellen, welche positiv für PD1 (definiert als Lin⁻c-Kit⁺Sca-1⁺PD1⁺) waren (Abb. 32). PD1 ist ein Marker für die Erschöpfung von T-Zellen, wird aber auch transient während der normalen Hämatopoese auf Vorläuferzellen induziert. Der Anteil eosinophiler Vorläuferzellen (Lin⁻c-Kit⁺Sca-1⁺CD34⁺Siglec-F⁺) änderte sich nur marginal, jedoch kam es mit zunehmender Tumorprogression zu einer Abnahme, was auf eine zunehmende Knochenmarkinsuffizienz hindeutet.

Hämatopoetische Vorläuferzellen



Eosinophile

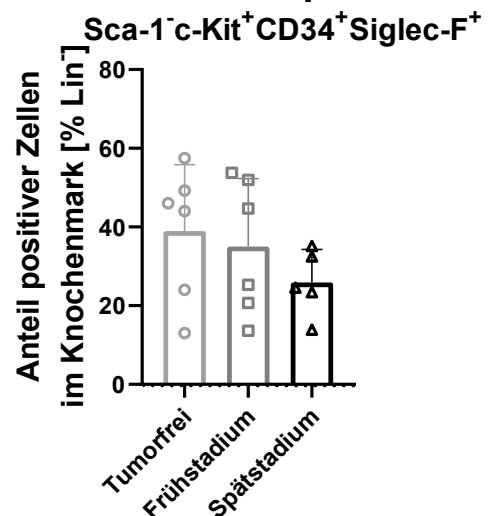


ABBILDUNG 32: DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE PHÄNOTYPISIERUNG DER EOSINOPHILEN UND PD1⁺ VORLÄUFERZELLEN

QUANTITATIVE ANALYSE DES PROZENTUALEN ANTEILS DER LIN⁻C-KIT⁺-VORLÄUFERZELLEN IM KNOCHENMARK. ES WURDEN 100.000 ZELLEN/PROBE GEMESSEN. MITTELWERT + SD, JEDES SYMBOL REPRÄSENTIERT EINE MAUS; N = 5-8 MÄUSE/GRUPPE; * P < 0,05; ** P < 0,01; **** P < 0,0001; ONE-WAY ANOVA (SIDAK'S MULTIPLE COMPARISONS TEST).

5.10 VERÄNDERUNGEN DER HÄMATOPOESE DURCH IMMUNCHECKPOINT-INHIBITION

Nachdem die grundlegenden Veränderungen der Hämatopoese durch die Tumorprogression im Vergleich zu tumorfreien Mäusen analysiert wurden, lag der Fokus auf den Effekten der ICI-Therapie in tumortragenden Mäusen. Dafür wurde das Knochenmark von Mäusen genutzt, welche den α -PD1-AK oder den α -LAG-3-AK erhielten, sowie von denjenigen, die den Isotyp-AK als Kontrolle bekamen.

In Zusammenschau der Ergebnisse lässt sich vorab bereits erwähnen, dass sich ein signifikanter Einfluss auf die Hämatopoese, insbesondere unter α -LAG-3-Therapie, zeigte und zu einem partiellen Ausgleich der gestörten Hämatopoese führte. Dies wird im Folgenden näher spezifiziert.

Morphologisch zeigten sich bei den Pappenheim-gefärbten hämatopoetischen Knochenmarkszellen eine Reduktion der Metamyelozyten und der neutrophilen Granulozyten, welche unter α -LAG-3-Therapie signifikant war ($p < 0,001$ vs. Isotyp). Zusätzlich kam es, unabhängig von der Checkpoint-Blockade, zu einem signifikanten Anstieg der Lymphozyten und einem leichten Anstieg der Plasmazellen (Abb. 34). Die Werte näherten sich denen der tumorfreien Mäuse an und lassen den Schluss zu, dass die therapeutische Blockade von PD1 oder LAG-3 zur partiellen Normalisierung der Hämatopoese beiträgt.

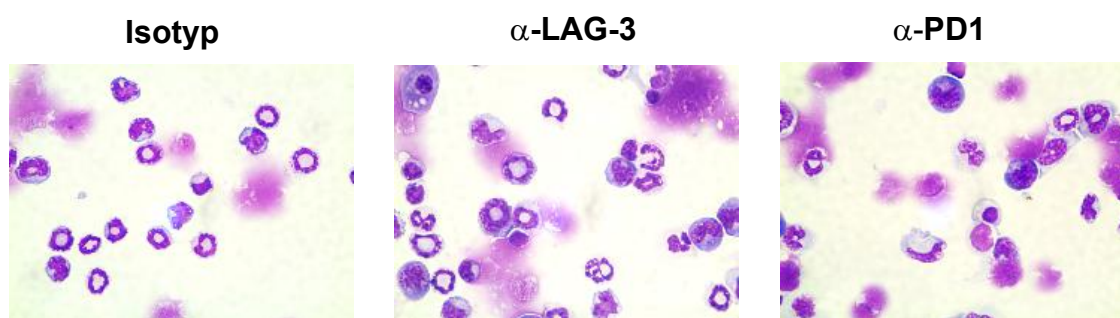


ABBILDUNG 33: MORPHOLOGIE VON HÄMATOPOETISCHEN ZELLEN DES KNOCHENMARKS

REPRÄSENTATIVE MIKROSKOPISCHE BILDER VON HÄMATOPOETISCHEN ZELLEN DES KNOCHENMARKS VON MSH2^{LoxP/LoxP;TgTg(VIL1-CRE)} MÄUSEN, WELCHE EINEN TUMOR TRAGEN UND MIT VERSCHIEDENEN AK (ISOTYP-AK, α -LAG-3-AK, α -PD1-AK) BEHANDELT WURDEN. FÄRBUNG DER ZELLEN NACH PAPPENHEIM. VERGRÖßERUNG: X1000. EINE ZUNAHME DER LYMPHOZYTEN, DIE MIT EINER ABNAHME NEUTROPHILER GRANULOZYTEN EINHERGEHT, IST UNTER ICI ZU VERZEICHNEN.

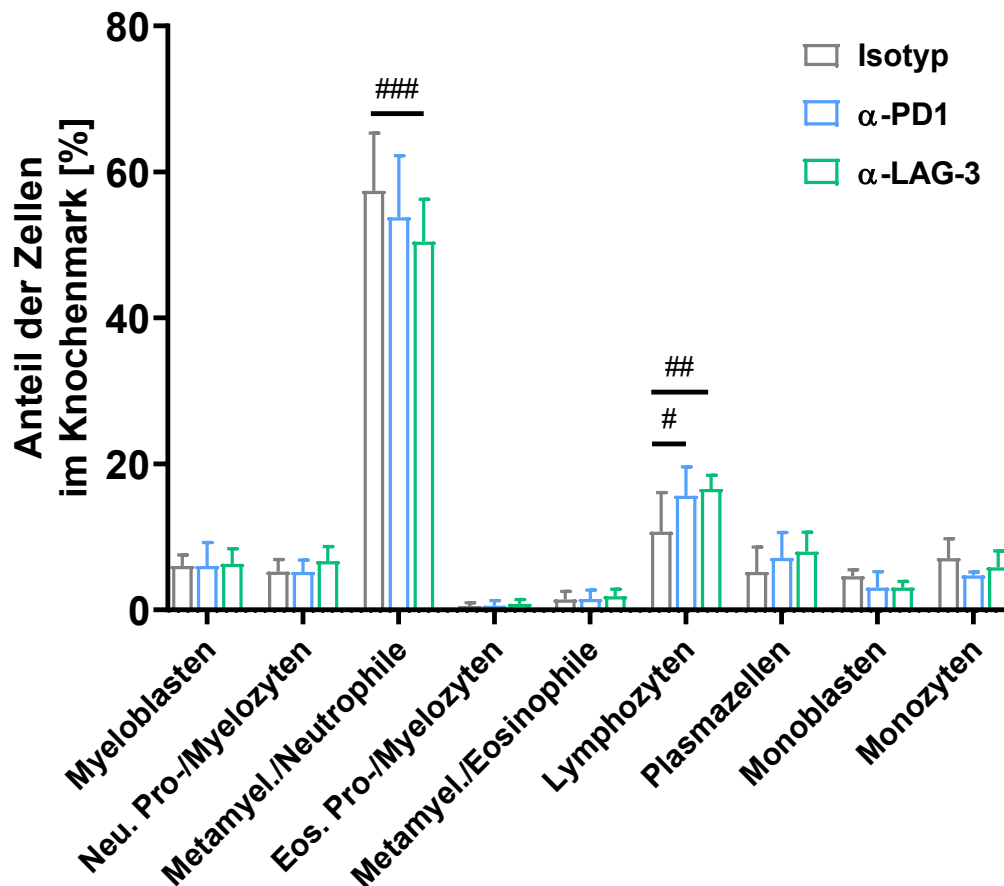


ABBILDUNG 34: MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN HÄMATOPOETISCHER ZELLEN IM THERAPIEVERGLEICH

NACH PAPPENHEIM GEFÄRBT UND IN FOLGENDE ZELLTYPEN DIFFERENZIIERT: MYELOBLASTEN, NEUTROPHILE PRO-/MYELOZYTEN, METAMYELOZYTEN/NEUTROPHILE GRANULOZYTEN, EOSINOPHILE PRO-/MYELOZYTEN, METAMYELOZYTEN/EOSINOPHILE, LYMPHOZYTEN, PLASMAZELLEN, MONOBLASTEN, MONOZYTEN. DIE QUANTIFIZIERUNG ERFOLGTE VERBLINDET. MITTELWERT + SD; ISOTYP: N = 7; α-PD1 UND α-LAG-3: N = 6 TIERE/GRUPPE; # P < 0,05; ## P < 0,01; ### P < 0,001; ONE-WAY ANOVA (SIDAK'S MULTIPLE COMPARISONS TEST). BEIDE ICIs FÜHRTE ZUR REBALANCIERUNG ZWISCHEN NEUTROPHILEN UND LYMPHOZYTEN.

Zur genaueren Analyse der verschiedenen Subpopulationen im Knochenmark folgte die durchflusszytometrische Messung unter Anwendung desselben Panels, wie unter Punkt 5.9. Bei den hämatopoetischen Stammzellen zeigten sich leichte Unterschiede bei den *Quiescent* LT-HSCs und bei den ST-HSCs, während die LT-HSCs unter ICI-Therapie nicht verändert waren. Bei beiden Populationen kam es zu einem Anstieg im Vergleich zur Isotypkontrolle (Abb. 35).

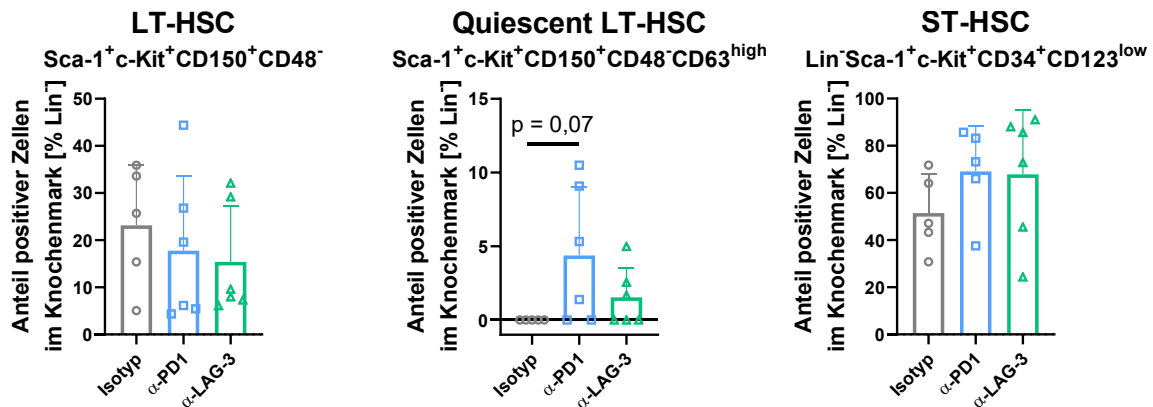
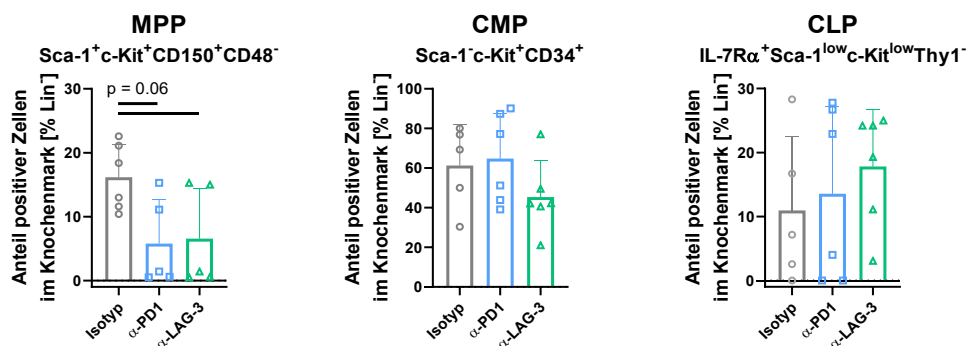


ABBILDUNG 35: PHÄNOTYPISIERUNG DER HÄMATOPOETISCHEN STAMMZELLPOPULATIONEN IM THERAPIEVERGLEICH

DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE, QUANTITATIVE ANALYSE DES PROZENTUALEN ANTEILS DER LIN⁻C-KIT⁺-VORLÄUFERZELLEN IM KNOCHENMARK. ES WURDEN 100.000 ZELLEN/PROBE GEMESSEN. MITTELWERT + SD, JEDES SYMBOL REPRÄSENTIERT EINE MAUS; ISOTYP N = 5; α-PD1 N = 5-6; α-LAG-3 N = 6; TWO-WAY ANOVA (TUKEY'S MULTIPLE COMPARISONS TEST).

Interessanterweise zeigten sich individuelle Unterschiede zwischen den beiden ICIs und der Isotyp-Kontrolle hinsichtlich der Verteilung von MPPs, CMPs und CLPs. Die Hemmung von PD1 oder LAG-3 führte zu einer Quasi-Normalisierung dieser Zelltypen im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle (Abb. 36). Dies war charakterisiert durch eine Reduktion der MPPs unter ICI-Therapie ($p = 0,06$ vs. Isotyp). Unter α-LAG-3-Therapie zeigte sich dies auch bei den CMPs, während der Anteil an CLPs leicht anstieg. Die α-LAG-3-Therapie trägt somit zu einer Re-Balancierung der Hämatopoese bei.

Ferner wurde ein Anstieg der Megakaryozyten unter beiden ICI-Therapien detektiert (Abb. 36). Ein weiterer Unterschied zwischen beiden ICIs zeigte sich im Anteil der B-Zell-Vorläufer und ILPs. Beide Zellpopulationen waren nach LAG-3-Blockade im Vergleich zur Isotypkontrolle signifikant erhöht ($p < 0,05$ vs. Isotyp, Abb. 36).



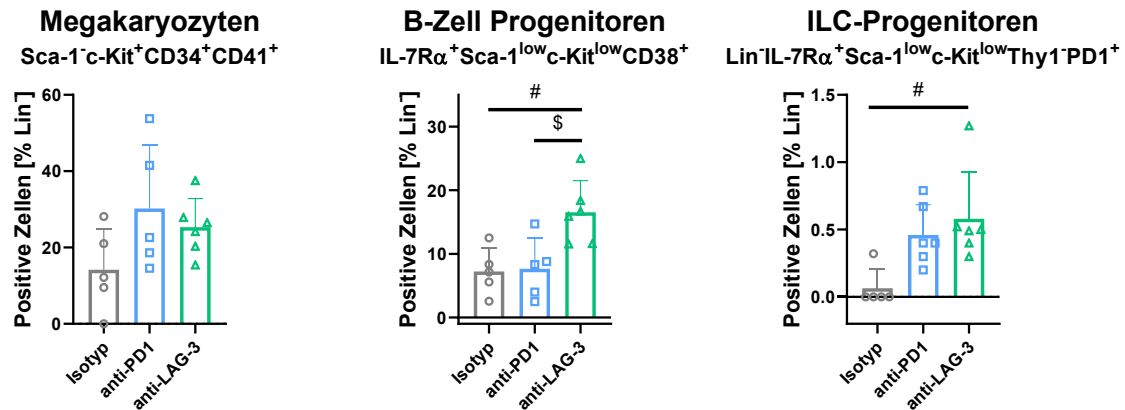


ABBILDUNG 36: DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE PHÄNOTYPISIERUNG DER HÄMATOPOETISCHEN VORLÄUFERZELLEN IM THERAPIEVERGLEICH

QUANTITATIVE ANALYSE DES PROZENTUALEN ANTEILS DER LIN⁻C-KIT⁺-VORLÄUFERZELLEN IM KNOCHENMARK. ES WURDEN 100.000 ZELLEN/PROBE GEMESSEN. MITTELWERT + SD, JEDES SYMBOL REPRÄSENTIERT EINE MAUS; ISOTYP N = 5; α-PD1 N = 5-6; α-LAG-3 N = 6; TWO-WAY ANOVA (TUKEY'S MULTIPLE COMPARISONS TEST). BEMERKENSWERT IST DER SIGNIFIKANTE ANSTIEG VON B-ZELL-VORLÄUFERN UND ILC-VORLÄUFERN UNTER α-LAG-3-THERAPIE.

Die weiterführenden Analysen fokussierten sich auf monozytäre Vorläuferzellen. Hauptziel der ICI-Behandlung waren dabei die *lin⁻c-Kit⁺Sca-1⁻CD34⁺CSF-1R⁺*-Vorläuferzellen. Beide ICIs führten zu einer signifikanten Abnahme der CD34⁺ Monozyten, die zusätzlich CSF-1R⁺ waren. Dies korrelierte invers mit dem Anteil IRF8⁺ Zellen, welche insbesondere nach α-LAG-3 Gabe erhöht waren (Abb. 37). Dabei zeigte sich bei der letztgenannten Population eine fast vergleichbare Anzahl wie bei den tumorfreien Mäusen. IRF8⁺ Zellen limitieren die Produktion der Neutrophilen und fördern indirekt die Bildung inflammatorischer Monozyten.

Monozyten

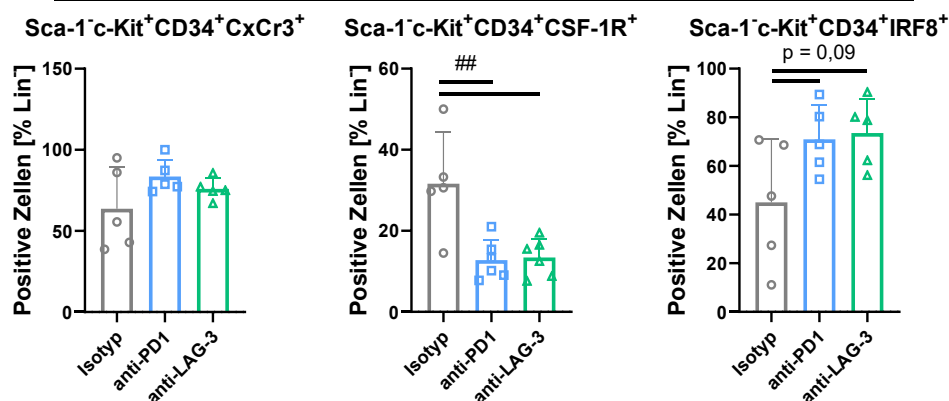


ABBILDUNG 37: DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE PHÄNOTYPISIERUNG DER MONOZYTÄREN VORLÄUFERZELLEN IM THERAPIEVERGLEICH

QUANTITATIVE ANALYSE DES PROZENTUALEN ANTEILS DER LIN⁻C-KIT⁺-VORLÄUFERZELLEN IM KNOCHENMARK. ES WURDEN 100.000 ZELLEN/PROBE GEMESSEN. MITTELWERT + SD, JEDES SYMBOL REPRÄSENTIERT EINE MAUS; ISOTYP N = 7; α-PD1 N = 5; α-LAG-3 N = 5; # P < 0,05; ## P < 0,01; \$ P < 0,05; TWO-WAY ANOVA (TUKEY'S MULTIPLE COMPARISONS TEST).

Demgegenüber wurden keine Veränderungen in der Anzahl PD1⁺ hämatopoetischer Vorläuferzellen sowie eosinophiler Granulozyten nachgewiesen. Weder die Blockade von PD1 noch LAG-3 beeinflusste die Anzahl dieser beiden Subpopulationen (Abb. 38).

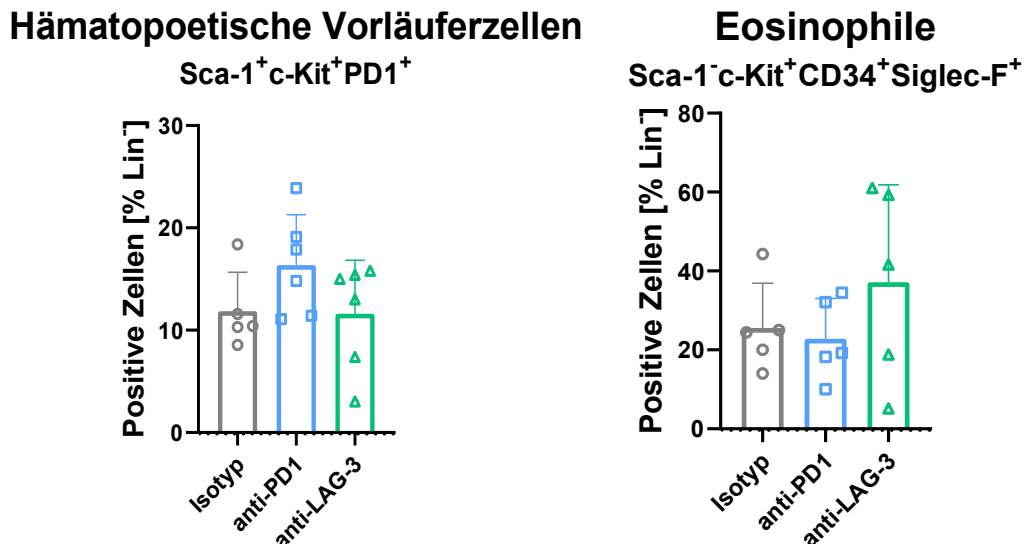


ABBILDUNG 38: DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE PHÄNOTYPISIERUNG DER EOSINOPHILEN UND PD1⁺ VORLÄUFERZELLEN IM THERAPIEVERGLEICH

QUANTITATIVE ANALYSE DES PROZENTUALEN ANTEILS DER LIN⁻c-Kit⁺-VORLÄUFERZELLEN IM KNOCHENMARK. ES WURDEN 100.000 ZELLEN/PROBE GEMESSEN. MITTELWERT + SD, JEDES SYMBOL REPRÄSENTIERT EINE MAUS; ISOTYP N = 5; α -PD1 N = 5-6; α -LAG-3 N = 5-6; TWO-WAY ANOVA (TUKEY'S MULTIPLE COMPARISONS TEST).

VI. DISKUSSION

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde das therapeutische Potenzial von zwei Immuncheckpoint-Inhibitoren (ICI) bei dMMR-assoziierten Tumoren vergleichend analysiert. Hierzu erfolgte die therapeutische Applikation des α -PD1- sowie α -LAG-3-AKs im präklinischen Msh2^{loxP/loxP};TgTg(Vil1-cre) Modell [96]. Neben den beiden Hauptzielgrößen Gesamtüberleben und Tumorwachstum wurden auch immunologische und molekulare Veränderungen betrachtet, um die Pathomechanismen der Tumorgenese darzulegen, sowie gezielt die Einflüsse der jeweiligen Therapie zu charakterisieren und neue Erkenntnisse zum Wirkverhalten der ICI zu erfahren.

Neben den lokalen Effekten auf das Tumormikromilieu (TME) ist in diesem Zusammenhang auch der systemische Einfluss von ICIs auf zirkulierende und hämatopoetische Vorläuferzellen von besonderer Bedeutung. Eine Dysbalance zwischen lymphoiden und myeloiden Zellen ist charakteristisch für fortgeschrittene solide Tumoren und trägt kausal zur tumorinduzierten Immunsuppression bei. Durch Immuntherapien wird

versucht, diese Dysbalance auszugleichen und eine normale Hämatopoese wieder herzustellen. Dies wurde in dieser Arbeit teilweise bestätigt. Die Befunde werden nachfolgend diskutiert.

6.1 IMMUNCHECKPOINT-INHIBITION BEI DMMR-ASSOZIIERTEN TUMOREN

MSI-H/dMMR-assoziierte Tumoren tragen eine Vielzahl von Neoantigenen, die ideale Zielstrukturen für das Immunsystem darstellen. Folglich ist dieser molekulare Subtyp prädestiniert für die Therapie mit ICIs [201,202].

ICIs, die gegen PD1 gerichtet sind, wurden in einer Vielzahl von klinischen Studien eingesetzt und deren Wirksamkeit konnte mehrheitlich bestätigt werden. Konsequenterweise ist der α -PD1-AK ein fester Bestandteil in der Erstlinientherapie des MSI-H/dMMR-assoziierten CRCs im Stadium IV bei nicht resektablen Metastasen [96,144]. Außerdem kann im Stadium IV bei Patienten, welche bereits mit einer Chemotherapie vorbehandelt wurden, in der Zweit-, Dritt- und Viertlinientherapie bei MSI-H-Tumoren Pembrolizumab oder die Kombination aus Nivolumab und Ipilimumab zulassungskonform eingesetzt werden [112]. Auf Grundlage der Phase-II-Studien KEYNOTE-158 und KEYNOTE-164 folgte eine Indikationserweiterung für Pembrolizumab bei nicht resektablen oder metastasierten Endometrium-, Magen-, Dünndarm-, und biliären Karzinomen mit MSI-H oder dMMR-Status [203–205]. Des Weiteren wurde 2021 von der Europäischen Arzneimittel-Agentur der α -PD1-AK Dostarlimab in der Zweitlinie bei rezidiertem oder therapierefraktärem Endometriumkarzinom zugelassen [206]. Aktuell laufen zahlreiche klinische Studien, die das Potenzial von α -PD1-AK weiter erforschen und die Effektivität bei verschiedenen Tumorentitäten mit und ohne MSI-H/dMMR testen. Dabei spielt vor allem die Suche nach möglichen Kombinationspartnern eine wichtige Rolle, um das Anwendungsspektrum der ICIs zu erweitern. Zu diesen zählen neben klassischen Zytostatika u.a. auch IL-2, Heparanase-Inhibitoren oder T-Zell-stimulierende Vakzine (*clinicaltrials.gov identifier*: NCT05104567, NCT03228667, NCT03836352) [207]. Eigene Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die Kombination von ICI und cyclinabhängiger Kinase 4/6 Blockade mit Abemaciclib keinen Überlebensvorteil erzielt, jedoch toxische Nebenwirkungen hervorruft, so dass immer zwischen klinischem Nutzen und Nebenwirkungsrate abgewogen werden muss [208].

Im Gegensatz zu PD1-ICIs gehören α -LAG-3-AK bislang noch nicht zur Standard-Immuntherapie. LAG-3 ist als Immuncheckpointmolekül weniger gut erforscht und viele Funktionsmechanismen bleiben bislang ungeklärt [115]. Es ist ein Transmembranprotein, das strukturelle Ähnlichkeit zu CD4 aufweist und eine wichtige Rolle bei der Funktion von Tregs und bei der Förderung der Immunsuppression hat [117,126]. Besonders bei dMMR-assoziierten Tumoren sind LAG-3⁺ T-Zellen bereits in frühen Erkrankungsstadien nachweisbar und mit einer schlechten Prognose verbunden, was dieses Molekül zu einem attraktiven Angriffspunkt macht [209].

Die im Jahr 2022 zugelassene Kombination aus Relatlimab und Nivolumab als Erstlinientherapie beim metastasierten/nicht operablen Melanom ist die bislang einzige Zulassung eines α -LAG-3-AK im klinischen Kontext [130]. Nachbeobachtungen zeigen einen deutlichen klinischen Vorteil bei Patienten, die diese Therapie erhielten [210]. Daher werden weitere klinische Studien mit dem α -LAG-3-AK durchgeführt. Eine aktuell laufende Phase-III-Studie (RELATIVITY-123) untersucht die Wirksamkeit von Relatlimab in Kombination mit Nivolumab bei Patienten mit MSI-H/dMMR-assoziierten metastasierendem CRC bei denen vorangegangene Therapien zur Behandlung fehlgeschlagen sind (*clinicaltrials.gov identifier*: NCT05328908). Weitere laufende klinische Studien an unterschiedlichen Tumorentitäten untersuchen die Wirksamkeit, sowie die Sicherheit und Verträglichkeit unter α -LAG-3 Mono- oder Kombinationstherapie (*clinicaltrials.gov identifier*: NCT01968109, NCT03610711, NCT04150965, NCT03743766, NCT05134948, NCT04623775). Erste Studienergebnisse werden erwartet und zeigen, ob die Blockade von LAG-3 bei bestimmten Patientengruppen einen Vorteil gegenüber den bislang etablierten ICIs erzielt.

6.2 THERAPIEEINFLUSS AUF GESAMTÜBERLEBEN UND TUMORWACHSTUM

Die Therapieversuche wurden so geplant, dass Tiere mit bildmorphologisch-gesicherten Tumoren in die jeweiligen Versuchsgruppen überführt wurden. Die Versuchstiere erhielten daraufhin alle 2 Wochen den α -PD1 oder α -LAG-3 AK in einer Dosis von 2,5 mg/kg Körpergewicht. Das Behandlungsintervall orientierte sich an Vorarbeiten, in denen nachgewiesen wurde, dass die Tumoren grundsätzlich sensitiv gegenüber einer Immuncheckpoint Blockade sind.

In dieser Arbeit wurden die Ergebnisse der vorherigen Studie grundsätzlich bestätigt. In Analogie zu den Vorarbeiten wurde gezeigt, dass die niedrig dosierte Behandlung

zu einer signifikanten Verlängerung des Gesamtüberlebens in beiden Therapiegruppen gegenüber der Kontrolle führt. Interessanterweise zeigte sich im direkten Vergleich der beiden ICIs ein Überlebensvorteil der α -LAG-3-therapierten Tiere gegenüber der α -PD1-Gruppe. Dieses Ergebnis ist bereits ein erster Hinweis auf die vielversprechenden Möglichkeiten der LAG-3-Blockade in der Tumorthherapie.

Die zum Therapiemonitoring und zur Nachbeobachtung begleitenden PET/CT-Aufnahmen erbrachten bezüglich des Tumorwachstums keine signifikanten Unterschiede zwischen den Therapiegruppen, führten jedoch zur Stabilisierung der Erkrankung. Das progressionsfreie Überleben spiegelte sich in dem deutlichen Gesamtüberlebensvorteil gegenüber den Kontrollmäusen wider.

Der $(SUV)_{max}$ ist ein Wert für die Aktivitätsverteilung in der PET/CT-Bildgebung und ist ein wertvoller Biomarker für das Therapieansprechen und der damit verbundenen prognostischen Bedeutung [211–214]. Ein niedriger $(SUV)_{max}$ -Wert geht mit einem geringeren Glukosestoffwechsel und folglich mit einer herabgesetzten metabolischen Aktivität im Tumor einher und ist assoziiert mit einer besseren Prognose. Durch die α -LAG-3-Behandlung nahm dieser Wert im Verlauf ab, während er in den anderen Versuchsgruppen anstieg. Dies steht im Einklang mit dem verlängerten Gesamtüberleben der Tiere.

Die Interpretation der PET/CT-Daten muss jedoch eingeschränkt erfolgen, da die Therapie mit ICIs häufig eine Pseudoprogression verursacht. Dafür gibt es zwei biologische Erklärungsmodelle: Zum einen ist es möglich, dass es zu einem vorübergehenden Progress kommt, da entsprechend des Wirkmechanismus der Immuntherapie nicht direkt der Tumor bekämpft wird. Der zweite Mechanismus ist durch die Aktivierung des Immunsystems zu erklären: Die Inflammation mit Einwanderung von zellulären und humoralen Abwehrstoffen bedingt eine vorübergehende Zunahme der Tumormasse. Die Exsudation von entzündlichen Flüssigkeiten verursacht eine ausgeprägte Ödembildung mit Annahme der Größenprogression des Tumorumfanges in der Bildgebung. Dies erschwert die exakte Auswertung der Veränderungen von Tumorgöße und Aktivitätsverteilung [215–217]. Daher wurden die zur Quantifizierung des Therapieansprechens etablierten *response evaluation criteria in solid tumors* der *World Health Organization* für die Immuntherapien modifiziert (*immune-related response criteria*). Die Messung der Tumorlast, sowie die Bewertung der Immunreaktion wurde

angepasst [218–220]. Es gibt sogar Hinweise auf einen möglichen Überlebensvorteil bei Patienten mit aufgetretener Pseudoprogression [220].

Eine weitere Einschränkung stellt die Auswertung des Tumolvolumens dar, denn mit der ^{18}F -FDG-PET/CT-basierten Bildgebung wird die Stoffwechselaktivität von stark glukoseverbrauchenden Gewebeverbänden dargestellt. Es kann nur indirekt auf die tatsächliche Masse des Tumors rückgeschlossen werden.

In der Zusammenschau der hier erhobenen Daten lässt sich dennoch schlussfolgern, dass die Blockade von LAG-3 der PD-1 Hemmung im Hinblick auf Kontrolle des Tumorstwachstums und Gesamtüberleben überlegen ist.

6.3 THERAPIEEINFLUSS AUF IMMUNOLOGISCHE UND MOLEKULARE CHARAKTERISTIKA

Der Wirkmechanismus von ICIs beruht auf der Re-Stimulation antitumoraler Immunantworten und damit auf der Bekämpfung von Tumoren durch das körpereigene Immunsystem. Um potenzielle Therapie-assoziierte Veränderungen nachzuweisen, erfolgten immunologische und molekulare Untersuchungen. Hierzu wurde neben dem peripheren Blut, auch die Milz als sekundäres immunologisches Organ, sowie das TME im Hinblick auf Immunzellinfiltration und -modulation untersucht.

Die Anzahl der T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen im peripheren Blut wurden durch die ICI-Therapien nicht signifikant beeinflusst. Gleiches gilt für diese Zellpopulationen in der Milz und im Tumor. Dies bestätigen Daten in von uns durchgeführten Studien zur Therapie mit einem α -PD-L1-Antikörper [208,221]. Da die T-Zellen mit ihren Immuncheckpoint-Rezeptoren jedoch primäre Ziele der ICIs sind, liegt der Verdacht nahe, dass sie funktionellen Einfluss auf die T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen haben. Hinweisend dafür ist der im Tumor nachgewiesene Anstieg der CD4^+ T_{EM} -Zellen unter α -LAG-3-Therapie und der verringerte Anteil naiver T-Zellen in der CD8^+ T-Zellsubpopulation nach beiden Immuncheckpoint-Blockaden.

Hinsichtlich der Tregs und der „erschöpften/exhausted“ T-Zellen kam es im Vergleich zur Kontrolle zu einer Abnahme der Zellen im peripheren Blut, was auf eine Immunmodulation durch die Therapie hindeutet. Dies war nach der Behandlung mit α -LAG-3 am stärksten ausgeprägt und korrelierte mit dem Gesamtüberleben. Garcia-Marquez *et al.* beschrieb dieses Phänomen in einer Studie, bei der klinische Proben von α -PD1-AK-therapierten Hodgkin-Lymphom-Patienten untersucht wurden und therapieassoziiert eine anhaltende Abnahme des erschöpften T-Zell-Phänotyps nachgewiesen

wurde. Diese Reaktionen wurden häufiger in Proben von Patienten beobachtet, welche früh und gut auf die α -PD1-Therapie ansprachen [222]. Sie zeigen auch, dass weniger die T-Zellquantität, sondern vielmehr dessen Funktionalität relevant für das Therapieansprechen ist.

Tregs stellen einen Hauptmediator in der Immunregulation dar und tragen zahlreiche Immuncheckpoint-Moleküle auf ihrer Oberfläche. Entsprechend korreliert deren Anwesenheit Entitäten-unabhängig häufig mit einer schlechteren Prognose [223–226].

Während die verschiedenen T-Zellpopulationen und ihre Funktionen mittlerweile sehr gut charakterisiert wurden, ist jedoch die Datenlage bezüglich der Auswirkungen der ICIs auf Tregs sehr heterogen. In der Literatur werden viele unterschiedliche Beobachtungen beschrieben [227,228]. Unsere Ergebnisse zeigen unter der ICI-Therapie eine Reduktion der Tregs sowohl im peripheren Blut als auch in der Milz, was mit der Aktivierung des Immunsystems im Einklang steht.

Eine weitere Zellpopulation, die als prognostisch relevant beschrieben wurde, sind myeloide Suppressorzellen, kurz MDSCs [138,229,230]. Im Rahmen unserer Studie kam es im Verlauf zu einem signifikanten Anstieg der zirkulierenden MDSCs unter Therapie. Dies war in beiden Therapiegruppen vergleichbar und deutet auf einen kompensatorischen Mechanismus, entgegen der immunbasierten Tumorbekämpfung, hin: Myeloide Suppressorzellen werden selektiv von Tumoren rekrutiert und tragen wesentlich zur Aufrechterhaltung des immunsuppressiven Milieus bei. Infolge der ICI-vermittelten Immunaktivierung wird Zellstress induziert, sodass die Tumorzellen vermehrt Signale ausschütten, um die Immunsuppression aufrechtzuerhalten [228]. Die erhöhte Anzahl an MDSCs bei ICI-behandelten Mäusen in der Milz bestätigen diese Annahme. Die Milz ist im Sinne der EMH ein wichtiger „Reserveort“ für den Tumor, suppressive Zellen zu bilden [231,232]. Die signifikante Reduktion der MDSCs im Tumor, verglichen zur Kontrolle, könnte für eine initiale Bekämpfung durch die Therapie sprechen und nachfolgend zu einem kompensatorischen Anstieg in Blut und Milz führen.

Aktuelle Studien wiesen die „protumorale“ und immunsuppressive Funktion von MDSCs nach und ihre Akkumulation wird mit einer schlechten Prognose und einem schlechteren Ansprechen auf Immuntherapien in Verbindung gebracht [233–235]. Daher ist es von entscheidender Bedeutung diese Population gezielter zu untersuchen und mögliche therapeutische Angriffspunkte zu identifizieren. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass Interleukin-6 (IL-6) die MDSCs aktiviert und die Immunsuppres-

sion fördert [236]. Ein negativer Zusammenhang zwischen hohen IL-6-Konzentrationen und vermindertem Ansprechen auf ICIs wurde nachgewiesen [237,238]. Li *et al.* bestätigte in CRC-Mausmodellen, dass IL-6 eine starke Immunsuppression im TME auslöst, indem es MDSCs rekrutiert und die Infiltration von T-Zellen beeinträchtigt. Die Hemmung von IL-6 verbesserte die Wirksamkeit von α -PD-L1 bei CRCs und könnte eine neue Strategie zur Überwindung der α -PD-L1-Resistenz bei CRCs darstellen [239]. Derzeit laufen viele weitere präklinische Studien zur Kombinationstherapie mit ICIs und einer zielgerichteten Therapie gegen MDSCs unter anderem mit anti-CSF-1R Antikörpern, all-trans-Retinsäure, Axitinib, Gemcitabin und Entinostat [229,240,241]. Einige dieser Strategien werden bereits in klinischen Studien mit verschiedenen ICIs getestet (*clinicaltrials.gov identifier*: NCT03024437, NCT03302247, NCT03161431) [242]. Unsere Daten bestätigen die Relevanz der zielgerichteten Therapie, da der Anstieg der MDSCs eine mögliche Ursache für das Therapieversagen darstellt.

Die ergänzende Genexpressionsanalyse zum Nachweis spezifischer Populationen bzw. dessen Funktion in der Milz zeigte, dass die M2-Makrophagen- und Neutrophilenmarker (*Csf1* bzw. *Egr2*, *Alox5*) unter beiden ICI-Behandlungen signifikant herunterreguliert waren, während der Marker für die proinflammatorischen M1-Makrophagen (*Csf2*) verstärkt gegenüber den Kontrollgruppen exprimiert wurde. Dies war bei den α -LAG-3-therapierten Mäusen am stärksten ausgeprägt und erklärt zusätzlich die gute Wirksamkeit einer LAG-3 Blockade infolge der erfolgreichen Immunmodulation. [243]. In präklinischen *in vivo* Modellen wurde verdeutlicht, dass die ICI in Kombination mit einem CSF1/CSF1R-Inhibitor die Resistenzentwicklungen unter den ICI-Monotherapien aufheben können [244,245]. Außerdem bietet die duale Hemmung der Tgf- β -Signalübertragung und des CSF1/CSF1R-Signalweges einen neuartigen Ansatz zur Umprogrammierung von tumorinfiltrierenden Makrophagen und zur Verbesserung des Ansprechens auf Chemotherapien [246]. Kamga *et al.* wies in einer Studie mit Gewebeproben von NSCLC-Patienten nach, dass einerseits hohe *Csf1*-Spiegel vor Beginn der Therapie mit einem schlechteren Ansprechen auf die ICIs verbunden sind und andererseits auch hohe Werte während der ICI-Therapie mit einem kürzeren progressionsfreien Überleben und einer schlechteren Gesamtansprechrate assoziiert sind [247].

Interessante Ergebnisse sind bei der *Tcf1*-Expression zu erkennen: *TCF1* als zentraler Regulator der T-Zell-Entwicklung und -Funktion ist von entscheidender Bedeutung in der Beeinflussung von Immunreaktionen bei Infektionen, Autoimmunität und Tumoren

[195,248]. Eine Interaktion mit dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg ist gesichert, es gibt jedoch auch Hinweise auf eine unabhängige Aktivitätsfunktion [195]. Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg reguliert wichtige zelluläre Funktionen wie Proliferation, Differenzierung, genetische Stabilität, Apoptose und Stammzellerneuerung und ist bei der Regulation der Infiltration von Immunzellen in das TME beteiligt [249]. Bei Tumorpatienten wird durch eine unkontrollierte pathologische Aktivierung der Wnt/ β -Catenin-Signalübertragung *TCF1* in T-Zellen und/oder Tregs aktiviert, um eine abweichende Entwicklungsprogression und Transformation von Thymozyten sowie ein Ungleichgewicht des Immunsystems zu fördern. Diese ist u.a. ursächlich für die CRC-Progression [195,250,251]. Die Wnt-gerichtete Therapie stellt einen möglichen Behandlungsansatz dar [249]. Bei unserer Arbeit ist unter PD1-Inhibition die *Tcf1*-Expression bereits signifikant herunterreguliert, was für eine Immunstimulation sprechen könnte. In dieser Arbeit wurde eine vermehrte *Tcf1*-Expression in Splenozyten von α -LAG-3 behandelte Tiere detektiert. Die biologische Wertigkeit kann aufgrund hoher Schwankungen jedoch nicht beurteilt werden, weshalb eine Wiederholung dieses Versuches sinnvoll wäre.

Darüber hinaus spielt Tgf- β eine wichtige Rolle in der Tumorgenese: Zunächst wirkt es als Tumorsuppressor und hat antiproliferative und proapoptotische Effekte. Im Verlauf der Tumorprogression verändert sich die Funktion von Tgf- β hin zu immunsuppressiven Eigenschaften und entsprechend tumorfördernden Effekten [252]. In dieser Arbeit nahm die Tgf- β -Expression in der Milz nach der ICI-Behandlung ab, was ein weiteres Indiz für das Therapieansprechen darstellt.

Die Genexpressionsanalyse des Tumorgewebes erzielte abweichende Ergebnisse: Die erhöhte Expression von *Csf1* und *Csf2* unter α -LAG-3, sowie von *Egr2* und *Alox5* unter beiden ICIs deutet auf eine verstärkte Rekrutierung hämatopoetischer Zellen zur Differenzierung von Makrophagen und Neutrophilen im TME hin. Die verringerte *Agr2*-Expression unter beiden Therapien weist auf einen immunsuppressiven Phänotyp hin. Ferner zeigte sich eine tendenzielle Zunahme der EMT-Marker *N-Cadherin* und *Vimentin*, analog zur Herunterregulation von *AGR2* unter beiden Therapien. Dies ist vermutlich eine Folge der andauernden Immunstimulation.

Die Daten bestätigen damit, dass ICIs deutliche immunologische Veränderungen im TME hervorrufen und zu einer günstigen Immunmodulation im Sinne einer antitumoralen Aktivität führen: Die Anzahl der TAMs, inklusive der „protumoralen“ M2-Makrophagen, sowie die MDSCs und regulatorischen Granulozyten wurden sowohl durch

PD1- als auch durch LAG-3-Blockade reduziert. Bei allen vier Zellpopulationen war dies unter der LAG-3-Blockade signifikant und untermauert das therapeutische Potential dieses ICIs. Weiterführende Untersuchungen des TMEs konzentrierten sich auf den Nachweis des Transkriptionsfaktors IRF5, basierend auf Vorarbeiten, in denen eine Re-Induktion von IRF5 mit einem guten Ansprechen auf Immuntherapie korrelierte [208,221]. IRF5 ist an der Regulation von Immunreaktionen beteiligt und wichtig bei der Pathogenese von Entzündungen, Autoimmunkrankheiten und Tumoren. Der ansteigende Trend unter der ICI-Behandlung weist hier auf eine Reaktivierung der angeborenen Immunantwort hin [253]. In anderen Arbeiten wurde ebenfalls nachgewiesen, dass IRF5 an der Kontrolle eines apoptotischen Signalwegs beteiligt ist und eine erhöhte Expression mit einem verstärkten Zelltod verbunden ist [254,255].

Letztlich bestätigte sich das gute klinische Ansprechen auch durch den Nachweis der verminderten Tumorzellproliferation. In allen Tumoren wurden nach ICI niedrigere Ki-67-Proliferationsindizes nachgewiesen. Folglich wurde die Tumorzellproliferation effektiv gehemmt, aber die T-Zellproliferation gefördert.

Die immunologischen Veränderungen zeigen die komplexen Auswirkungen der Tumorgenese. Die ICI-Behandlung konnte diesen teilweise entgegenwirken und zur Homöostase beitragen. Es wurden allerdings auch Gegenregulationsmechanismen detektiert, die zu Resistenzentwicklungen führen und das Ansprechen reduzieren bzw. zu Rezidiven beitragen. Die Suche nach geeigneten Kombinationspartnern ist daher von eminenter Bedeutung.

6.4 ALLGEMEINE VERÄNDERUNGEN DER HÄMATOPOESE IN SOLIDEN TUMOREN

Eine dysregulierte Hämatopoese wird in der Literatur zunehmend im Kontext solider Tumoren beschrieben [232,256]. Die tumorassoziierte Anämie begünstigt die Progression von Karzinomen und kann das Therapieansprechen sowie die Prognose negativ beeinflussen [257–259]. In einer aktuellen Studie von Long *et al.* wurde nachgewiesen, dass erythroide Vorläuferzellen umprogrammiert werden, sodass sie ihr ursprüngliches Entwicklungspotenzial verlieren und in die myeloide Zellreihe wechseln (*erythroid derived myeloid cells*, EDMCs). Die EDMC-Anreicherung ist gemeinsam mit der Anämie ein negativer prognostischer Faktor in ICI-therapierten Patientenkohorten, da sie die T-Zell-vermittelten Antitumor-Reaktionen hemmen [138].

In dieser Arbeit wurden die komplexen hämatopoetischen Veränderungen zunächst an tumortragenden $\text{Msh2}^{\text{loxP/loxP};\text{TgTg(Vil1-cre)}}$ -Kontrolltieren erfasst. Es zeigte sich, dass

in Analogie zu Befunden in der Literatur, die Tumorgenese im murinen Modell ebenfalls mit grundlegenden Veränderungen der Hämatopoese im Sinne einer gesteigerten Myelopoese einhergeht. Neben der Anämie nahm die Zahl der Metamyelozyten und Neutrophilen unter Tumorentwicklung zu, was mit einer Reduktion der Lymphozyten und Plasmazellen korrelierte. Es wurde eine positive Korrelation zwischen Tumprogression und dem Grad der Zellveränderungen festgestellt, was die weitreichenden Auswirkungen auf die Hämatopoese widerspiegelt. Aus den bereits früh nachweisbaren Veränderungen ergibt sich die Notwendigkeit, zu einem frühen Zeitpunkt zu intervenieren, um das Gleichgewicht der Hämatopoese wieder herzustellen.

Auch in einem Mammakarzinom-Mausmodell wurde bereits über eine defekte Hämatopoese einhergehend mit Fortschreiten des Tumorwachstums berichtet: Die erhöhte tumorassoziierte G-CSF-Produktion trug entscheidend dazu bei, dass vermehrt myeloide Vorläuferzellen generiert wurden. Folglich kam es zu Leukozytose, Anämie und Knochenmarkdefekten mit verstärkter EMH in der Milz [256]. Vergleichbare Ergebnisse mit Hochregulation von GM-CSF und vermehrter Rekrutierung von MDSCs konnte bei Mäusen mit Pankreaskarzinomen festgestellt werden [260].

Die detaillierte Analyse der verschiedenen Vorläuferzellen, die mittels Durchflusszytometrie aus dem Knochenmark typisiert wurden, bestätigte die tiefgreifenden Defekte und Veränderungen im Knochenmark durch die Tumorgenese: Die Hämatopoese ist erheblich beeinträchtigt. Ein signifikanter Anstieg der multipotenten Progenitorzellen (MPPs) in Korrelation mit dem Tumorstadium weist bereits auf eine vermehrte Produktion von hämatopoetischen Vorläuferzellen hin. Diese tragen zur Aufrechterhaltung des immunsuppressiven TMEs bei. Daraus lässt sich schließen, dass die veränderte Hämatopoese tumorassoziiert ist. Von besonderer Bedeutung erscheinen auch die weiteren Differenzierungswege in den tumortragenden Tieren. Die aus den MPPs hervorgehenden CMPs sind bereits zu Beginn der Erkrankung stark erhöht und untermauern die Hypothese, dass myeloide Vorläuferzellen vermehrt durch den Tumor rekrutiert werden. Dabei infiltrieren myeloide Zellen als unreife Vorläuferzellen den Tumor und differenzieren sich dann im TME zu MDSCs. Da myeloide Zellen jedoch sehr kurzlebig sind, müssen ständig Zellen nachrekrutiert werden, um die lokale Immunsuppression aufrechtzuerhalten. So kommt es tumorbedingt sukzessiv zu einer Verschiebung der Hämatopoese in Richtung myeloischer Zellen. Kompensatorisch und diese These unterstützend, wurde im Rahmen dieser Arbeit auch eine Reduktion der gemeinsamen

lymphoiden Vorläufer (CLPs) und nachfolgend auch der B-Zell- und angeborenen lymphoiden Vorläufer (ILPs) detektiert. Dies stimmt mit den morphologischen Befunden überein, in denen eine Reduktion der lymphatischen Zellen nachweisbar waren. Die begleitende Abnahme der Megakaryozyten könnte durch die gesteigerte Myelopoese und der damit verbundenen Verdrängungsproblematik bedingt sein.

Die Populationen der zur Granulozyten-Makrophagen-Linie (GMP) gehörenden CD34⁺ CMPs (Monozyten) wurden in unserem Experiment durch die Tumorgenese auch wesentlich beeinträchtigt. So wurde u.a. eine erhöhte Anzahl an CSF-1R⁺ monozytären Vorläufern detektiert, die vermutlich für die vermehrte Produktion, Differenzierung und Aktivierung von TAMs verantwortlich ist und zusätzlich die Immunsuppression fördert. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit der erhöhten Expression von *CSF1* in tumortragenden Mäusen. Erhöhte Mengen an tumorinfiltrierenden myeloiden CSF-1R⁺-Zellen korrelieren mit einem schlechteren Überleben bei Tumorpatienten [261–263].

Ein weiteres Resultat der hier durchgeführten Untersuchungen ist die Reduktion von IRF8⁺ Monozyten. IRF8 unterstützt die Differenzierung von CMPs und fördert die Produktion von Monozyten. Eine Abnahme dieser Zellen deutet auf eine Differenzierung der CMPs in andere myeloide Zellen hin. In einem Mammakarzinom-Mausmodell zeigten sowohl die Milz- als auch die Knochenmarkszellen der tumortragenden Mäuse eine deutlich reduzierte IRF8 Expression im Vergleich zu den Kontrollpopulationen. Die IRF8-defizienten Mäuse wiesen vermehrt myeloproliferative Störungen und erhöhte Mengen an MDSCs auf [264,265].

Chemokinrezeptoren wie CXCR3 spielen ebenfalls eine Rolle bei der Steuerung der Immunantwort und ihre Expression sollte nicht aus dem Gleichgewicht geraten [266]. In tumortragenden Mäusen konnte jedoch eine Abnahme CXCR3⁺ Zellen nachgewiesen werden. CXCR3 wird in hohem Maße auf Effektor-T-Zellen exprimiert und ist bedeutsam für das T-Zell-Trafficking und deren Funktion. Neuere Studien weisen auf die Relevanz von CXCR3 für die Migration von T-Zellen in das periphere Gewebe und in das lymphoide Kompartiment hin. Die Interaktion von T-Zellen mit antigenpräsentierenden Zellen wird erleichtert und führt zur Bildung von Effektor- und Gedächtniszellen [267].

Aufgrund der hohen Relevanz von PD1 im Kontext von Tumoren wurde auch dieser Marker erfasst. Es zeigte sich, dass PD1 während der Tumorgenese vermehrt auf hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert wird. Dies deutet auf eine zunehmende Insuffizienz des Knochenmarks aufgrund der gestörten Hämatopoese hin.

In der Zusammenschau dieser Ergebnisse ist eine vom Tumor gesteuerte Rekrutierung unreifer neutrophiler Zellen mit persistierender hämatopoetischer Dysbalance denkbar. In der Folge kommt es zu einer tumorbedingten „Knochenmarkerschöpfung“, verbunden mit einer Insuffizienz der rebalancierten Hämatopoese.

6.5 EINFLUSS DER IMMUNCHECKPOINT-INHIBITION AUF DIE GESTÖRTE HÄMATOPOESE

Die Immuntherapie mit ICIs stellt einen Ansatz dar, der hämatopoetischen Dysbalance entgegenzuwirken. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl der α -PD1, als auch der α -LAG3 AK zu einer partiellen Re-Balancierung der gestörten Hämatopoese führt. Dies zeigte sich zunächst an morphologisch erkennbaren Veränderungen, die durch eine verminderte Anzahl von Neutrophilen und eine erhöhte Anzahl von Lymphozyten gekennzeichnet waren. Interessanterweise war dies vor allem unter der α -LAG-3-Therapie nachweisbar und korrelierte mit dem guten Therapieansprechen. Eine differenziertere Betrachtung bestätigte die morphologischen Befunde: Die MPPs waren in beiden Behandlungsgruppen drastisch reduziert und fast vergleichbar mit denen der tumorfreien Tiere. Ferner wurde ein ausgewogeneres CMP:CLP-Verhältnis beobachtet, wobei die CMPs abnahmen und die CLPs zunahmen, insbesondere nach LAG-3-Blockade. Daraus ergibt sich für die nächsten Entwicklungsschritte eine Zunahme von B-Zell- und ILP-Vorläufern. Lymphozyten bilden die Grundlage des erworbenen Immunsystems und des immunologischen Gedächtnisses und sind an der Abwehr verschiedener Krankheitserreger beteiligt [268]. Außerdem sind sie wesentlich an der gezielten antitumoralen Immunabwehr involviert, weshalb eine Modulation der Hämatopoese in Richtung Lymphopoese wünschenswert ist. Im Einklang mit diesen Befunden kam es zur Zunahme der Megakaryozyten nach Therapie und damit zur Re-Balancierung der Hämatopoese im Knochenmark. Einer Verdrängung der physiologischen blutbildenden Zellen wird entgegengewirkt und Spätkomplikationen wie Thrombopenie und Anämie können verringert werden.

Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt erwähnt, sind die monozytären Vorläufer wichtig für die Balance in der Hämatopoese, welche durch die Tumorgenese jedoch stark durcheinandergebracht ist. Interessanterweise konnte auch hier ein Trend zur Normalisierung festgestellt werden. Die Verringerung der CSF-1R⁺-Zellen ging mit ei-

ner Zunahme von CXCR3⁺- und IRF8⁺-Zellen einher. IRF8 begrenzt die Granulozytenentwicklung und fungiert somit als negativer Regulator bei der Bildung von polymorphkernigen MDSCs *in vivo* [269,270].

Insgesamt führte die α -LAG-3-Therapie gegenüber der PD1-Blockade zu stärkeren Veränderungen der Hämatopoese in Richtung Normalisierung hämatopoetischer Prozesse. Dies spiegelt erneut das große Potenzial dieser Immuntherapie wider und zeigt, welche vielversprechenden Ergebnisse möglich sind. Über den Einfluss von ICIs auf die Hämatopoese bei soliden Tumoren ist derzeit wenig bekannt und Bestandteil aktueller Forschung. In dieser Arbeit wurde eine allgemein positive Auswirkung auf die Hämatopoese deutlich. Es gibt jedoch Hinweise die zeigen, dass die gestörte Blutbildung auch Ursache für ein vermindertes Ansprechen der ICIs sein kann und damit die potenzielle Wirksamkeit einschränkt [138]. Dies sollte in Folgestudien näher untersucht werden.

6.6 ANGRIFFSPUNKTE IN DER HÄMATOPOESE ALS THERAPIEANSÄTZE

Die aktuellen Erkenntnisse zur Hämatopoese bei soliden Tumoren verdeutlichen, dass ganzheitliche und umfassende Therapieansätze bei diesem Krankheitsbild von großer Bedeutung sind. Das Blutsystem stellt dabei einen besonders wichtigen Angriffspunkt dar, da es für die allgemeine Versorgung des gesamten Organismus zuständig und somit zentraler Bestandteil zur Aufrechterhaltung der physiologischen Homöostase ist. Derzeit ist das TME in der Forschung sehr in den Fokus gerückt und viele vielversprechenden Therapieoptionen, die auf Modulation immunsuppressiver Zellen abzielen, werden untersucht. Dabei sollte möglichst frühzeitig in den gestörten Mechanismus eingegriffen werden, denn die Vielfalt an „protumoralen“ myeloischen Zellen ist groß und während der Tumorprogression werden permanent neue suppressive Zellen nachgebildet. Die Entwicklung dieser Populationen kann somit effektiver verhindert werden. Entscheidende Regulatoren bei der Blutbildung sind G-CSF und GM-CSF. Sie fördern die Myelopoese und mobilisieren die HSCs. Tumoren können in der Lage sein, zusätzlich G-CSF zu produzieren und somit vermehrt hämatopoetische Vorläuferzellen für sich zu rekrutieren. Ferner korreliert das G-CSF-Expressionsniveau deutlich mit dem Stadium der Tumorerkrankung und der Prognose. Ein entscheidender Ansatzpunkt ist daher die Unterbindung diesen Faktors, um nachhaltig die Rekrutierung und Differenzierung von Monozyten zu MDSCs zu unterbinden [256,271–273]. Bislang ist jedoch

wenig verstanden, wie diese heterogene Population sich bildet. Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Expression von G-CSF/GM-CSF und der verstärkten MDSC-Produktion [271,272]. In einer Studie mit verschiedenen murinen Tumormodellen wies Waight *et al.* nach, dass eine verringerte G-CSF-Produktion die MDSC-Akkumulation und das Tumorwachstum signifikant verringern konnte [271]. Erwähnenswert ist an dieser Stelle auch nochmal die Therapiestrategie mit einem CSF-1-/CSF-1R-Inhibitor. Dessen umfangreiches Potenzial wurde mehrfach erwähnt. Da bereits in monozytären Vorläuferzellen im Knochenmark pathologisch hohe Werte des CSF-1Rs nachgewiesen wurden, wird eventuell schon ein früher Eingriff in die pathologische Blutbildung möglich und diese somit nachhaltig beeinflusst [262,263]. Ein möglicher Erklärungsansatz könnte folgender sein: Die Reifung und Rekrutierung der MDSCs ist abhängig von der Signalübertragung durch die Rezeptortyrosinkinase CSF-1R auf myeloischen Zellen. Wird die CSF-1R-Signalübertragung gehemmt, werden die myeloischen Vorläuferzellen nicht in MDSCs umgewandelt, die tumorinfiltrierenden MDSCs funktionell blockiert und die T-Zell-Antwort gegen den Tumor verstärkt [241]. Darüber hinaus wird ein deutlich verbessertes Ansprechen auf die ICI-Therapie erreicht. Somit stellt der CSF-1R ein weiteres vielversprechendes Target für die Immuntherapie dar. Erste klinische Studien bestätigen die Wirksamkeit der Kombination von anti-CSF-1R-Antikörpern und ICIs, die das Ansprechen und die Prognose der betroffenen Patienten verbessern [244,245,274].

Klinisch relevant ist in diesem Zusammenhang auch die tumorinduzierte Anämie, der bisher kaum langfristig entgegengewirkt werden kann. Pharmakologische Therapie u.a. basierend auf Erythropoetin oder Erythropoese-stimulierenden Medikamenten führen bei dieser Form der Anämie zu keinem Überlebensvorteil [275,276]. Die schlechte Wirksamkeit könnte auf die Erythropoetin-induzierte Bildung von EPCs zurückgeführt werden, die für die Bildung von EDMCs benötigt werden. In diesem Fall wäre es dringend erforderlich, diesen Mechanismus genauer zu analysieren und gegebenenfalls medikamentös zu unterbrechen. So könnte die Anämie überwunden und gleichzeitig der Bildung von EDMCs entgegengewirkt werden [138,199,276]. Somit wird zunehmend deutlich, dass eine ganzheitliche Betrachtung notwendig ist, bei der neben dem TME, auch periphere hämatopoetische Veränderungen analysiert werden müssen, um Tumoren langfristig effektiv zu behandeln.

6.7 TOXIZITÄT UND NEBENWIRKUNGEN VON IMMUNCHECKPOINT INHIBITOREN

Bei der Durchführung pharmakologischer Studien ist neben der Effektivität auch die Nebenwirkungsrate ein wesentlicher Parameter. Dies ist insbesondere vor dem zunehmenden Einsatz von unterschiedlichen Kombinationstherapien relevant. Für ICIs ist insgesamt und studienübergreifend eine gute Verträglichkeit beschrieben. Durch den immunaktivierenden Wirkmechanismus sind jedoch, wie bereits in der Einleitung beschrieben, insbesondere Autoimmunreaktionen wie Hautläsionen, Kolitiden, Hepatitiden, Endokrinopathien und Pneumonitiden mit der Behandlung vergesellschaftet. Sie können schwerwiegende Reaktionen hervorrufen und bei unzureichender Kontrolle lebensbedrohlich werden. In der klinischen Anwendung ist daher eine engmaschige Therapieüberwachung mit Laborkontrollen und klinischen Untersuchungen unerlässlich. Auch nach Abschluss der Behandlung sind Nachkontrollen wichtig, da Spätreaktionen auftreten können [133,277]. Sowohl die Patienten und Angehörigen als auch das behandelnde Personal müssen umfassend geschult sein, um Risikofaktoren zu identifizieren und frühzeitige Begleiterscheinungen zu erkennen. Die Bandbreite an potenziellen Nebenwirkungen ist groß und häufig durch unspezifische Symptomatik schwierig vom Grundleiden abzugrenzen. Sie treten bei über 80 % der ICI-behandelten Patienten auf. Die α -CTLA-4-AK haben eine höhere Rate zu verzeichnen als die α -PD1-AK. Am meisten ausgeprägt ist die Nebenwirkungsrate bei der Kombinationstherapie dieser beiden Inhibitoren. Werden diese frühzeitig erkannt, können sie jedoch regelhaft mit Glukokortikoiden erfolgreich behandelt werden und Komplikationen vermieden werden. Ein Therapieabbruch durch unerwünschte Nebenwirkungen ist daher selten. Interessanterweise führt dieser dann auch nicht zu einem schlechteren Outcome [132,133].

In unserer Studie haben die Mäuse die niedrig dosierte ICI-Therapie gut vertragen und eine mögliche Dosissteigerung für ein verbessertes Therapieansprechen ist prinzipiell denkbar. Auch ein Kombinationsansatz von α -PD1 und α -LAG-3 sollte zukünftig angedacht werden, wobei dort besonders auf das Toxizitäts- und Nebenwirkungsprofil geachtet werden muss, da diese in bereits zugelassenen Kombinationspräparaten verstärkt auftreten [132,133]. Die Fixkombination Nivolumab/Relatlimab (α -PD1/ α -LAG-3-Kombination) bei nicht resektablem oder metastasiertem Melanom führte bei ca. 80 % der Fälle zu therapiebedingten Nebenwirkungen. Die häufigsten immunvermit-

telten unerwünschten Ereignisse waren Hypothyreose oder Thyreoiditis, Hautausschlag, sowie Durchfall oder Kolitis. Häufige Grad 3/4 Nebenwirkungen waren erhöhte Lipase- und Transaminasen-Werte, diese wurde bei knapp 20 % aller Fälle nachgewiesen. Die synergistischen Effekte könnten ursächlich für die Potenzierung der Nebenwirkungen sein [278].

Dass ICIs insgesamt ein positives Nebenwirkungsprofil haben, bestätigt auch eine aktuelle Studie, in der Pembrolizumab als Erstlinientherapie bei fortgeschrittenen Adenokarzinomen des Magens oder des gastroösophagealen Übergangs als Mono- oder Kombinationstherapie mit einer Chemotherapie verabreicht wurde [279,280]. Die Ergebnisse zeigten, dass Pembrolizumab sowie der Kombinationsansatz der Chemotherapie in Bezug auf das Gesamt- und progressionsfreie Überleben keinesfalls unterlegen waren, aber unerwünschte Wirkungen seltener auftraten [279]. Pembrolizumab in der Monotherapie stellte eine nebenwirkungsarme und zuverlässige Alternative bei dieser Erkrankung dar. Eine weitere vielversprechende Möglichkeit zur Optimierung des Therapieansprechens mit wenigen Nebenwirkungen ist die Kombination aus zwei Medikamenten, welche unterschiedliche Wirkmechanismen haben und an verschiedenen Punkten ansetzen. Ein ICI und ein MDSC-Inhibitor könnten aussichtsreiche Ergebnisse erzielen, da auf unterschiedliche Zellen abgezielt wird und die unphysiologische tumor-induzierte Produktion der MDSCs reduziert wird. Eine Dosisüberschreitung kann so vermieden werden.

6.8 BIOMARKER ZUR IMMUNCHECKPOINT INHIBITOR BEHANDLUNG BEI dMMR/MSI-CRC

Obwohl die globale Inzidenz von CRCs seit den letzten Jahren rückläufig ist, wurde eine Zunahme der Neuerkrankungen in der Gruppe von unter 50-jährigen Patienten, gehäuft im proximalen Kolon, dokumentiert [7,58]. Etwa 30 % leiden an genetisch bedingten Tumorprädispositionssyndromen und circa 20 % haben ein familiäres CRC. Die Lokalisation im proximalen Kolon ist typisch für MSI-assoziierte Tumoren [65]. MSI-CRCs zeigen ein deutlich schlechteres Ansprechen auf die konventionellen Chemotherapien mit erhöhter Resistenzneigung und Therapieversagen, was die zunehmende Relevanz zur Testung auf Vorliegen einer dMMR/MSI unterstreicht [281,282]. Die frühzeitige Erkennung von LS-Patienten spielt somit eine erste wichtige Rolle, um eine effiziente Behandlung zu gewährleisten.

Aufgrund der hohen TMB und Expression von Neoantigenen sind dMMR/MSI-assoziierte Tumoren für eine Immuntherapie prädestiniert [77]. Die starke Tumorerheterogenität und die individuellen Wechselwirkungen zeigen jedoch zunehmend, dass die TMB keinen universellen Biomarker für die Immuntherapie darstellt [283]. Die Identifikation von noch gezielteren und angepassten Biomarkern sowie ein synergistischer Einsatz ist nötig, um Resistenzmechanismen vorzubeugen und Respondern von Non-Respondern abzugrenzen.

Da das Hauptziel der ICIs die immunologische Tumorbekämpfung durch das Immunsystem ist, gewinnt die Identifizierung von immunbezogenen Biomarkern immer mehr an Bedeutung. In einer Übersichtsarbeit von Manson *et al.* werden Biomarker, die mit der Wirksamkeit und der Toxizität von α -CTLA-4-AKs und α -PD1/ α -PD-L1-AKs bei Patienten in Verbindung gebracht werden, zusammengefasst und erläutert [284].

In mehreren Studien, u.a. bei Melanom- und NSCLC-Patienten, war eine erhöhte CD8⁺ T-Zell-Infiltration mit einem verbesserten Ansprechen auf Pembrolizumab assoziiert [283,285,286]. Bortolomeazzi *et al.* bestätigten eine stärkere Korrelation zwischen immunogenen Mechanismen und der Ansprechrate auf α -PD1-AK bei hypermutierten CRCs als mit der TMB [287]. Interessanterweise zeigte sich in einer kürzlich veröffentlichten Studie ein Zusammenhang zwischen der initialen *Csf1*-Expression und dem Therapieansprechen und Gesamtüberleben bei ICI-behandelten NSCLC-Patienten auf. Hohe *Csf1*-Werte gingen mit einer schlechteren Prognose einher [247].

Des Weiteren werden Strategien für ein Immunmonitoring untersucht, um anhand dynamischer zirkulierender Biomarker das Therapieansprechen zu eruieren. Dazu gehören insbesondere Entzündungsmediatoren wie Zytokine und Interleukine, die an der Immunantwort beteiligt sind. Bisher erwiesen sich diese zirkulierenden Biomarker nicht als „robust genug“, stellen jedoch ein zukunftsorientiertes, leistungsfähiges und klinisch praktikables Instrument für die Therapieüberwachung dar [77,288].

Im Rahmen von gastrointestinalen Tumoren ist außerdem die zunehmende Erkenntnisgewinnung zum kommensalen Mikrobiom erwähnenswert. Neue Ergebnisse bestätigen, dass die kommensale Mikroflora im Darm die Wirksamkeit von α -PD1/ α -PD-L1-Therapien entscheidend beeinflussen kann, sodass auch dies genutzt werden kann, um Biomarker zu identifizieren und therapeutische Ziele zu definieren [289–292].

Der kürzlich in den Fokus gerückte LAG-3-Checkpoint überzeugt ebenfalls in einigen Studien als potenzieller Biomarker. Shen *et al.* berichten über eine signifikante Korrelation zwischen zirkulierenden LAG-3⁺ Zellpopulationen und dem Therapieansprechen bzw. Gesamtüberleben bei Melanompatienten. Eine hohe LAG-3 Expression war mit einer schlechteren Prognose assoziiert, was die Relevanz der Inhibition zirkulierender LAG-3⁺ Zellpopulationen unterstreicht [293]. Gleichzeitig bestätigen unsere Ergebnisse, dass die Kontrollgruppe, die die schlechteste Prognose hatte, auch die meisten LAG3⁺ Zellen im Verlauf hatte. Damit wird LAG-3 als Biomarker zunehmend relevant.

6.9 GRUNDSÄTZLICHE LIMITATIONEN DES MAUSMODELLS

Die Tatsache, dass Mäuse nicht uneingeschränkt mit dem Menschen verglichen werden können, ist unbestritten und erfordert eine differenzierte Interpretation der Ergebnisse, die im Rahmen von Tierversuchen erzielt werden. Trotzdem liefern die Ergebnisse sehr wertvolle Erkenntnisse und wegweisende Informationen.

Grundsätzlich bildet das *Msh2^{loxP/loxP};TgTg(Vil1-cre)*-Mausmodell das LS sehr gut ab. Durch den isolierten gewebsspezifischen Defekt ist die Tumorgenese auf den Darm beschränkt und deutlich besser für die LS-Darstellung geeignet, als andere Modelle, die auf einem konstitutionellem MMR-Defekt beruhen [294]. Außerdem sind bei der menschlichen Tumorgenese unterschiedliche Keimbahnmutationen vorzufinden. Neben dem Defekt im *hMSH2*- bzw. *hMLH1*-Gen können u.a. auch *hPMS2* und *hMSH6* betroffen sein und sich klinisch sehr variabel manifestieren. Diese Heterogenität kann zusätzlich Einfluss auf die TMB nehmen und zu Unterschieden im Ansprechen auf eine ICI-Behandlung führen [295].

Da das Immunsystem in dieser Studie zentraler Bestandteil der Forschungsfrage war, ist darauf hinzuweisen, dass das gesamte System, inklusive der Hämatopoese, zwischen Menschen und Mäusen Unterschiede aufweist. Dennoch sind die Grundzüge des Immunsystems identisch aufgebaut und somit grundsätzlich vergleichbar. Da in dieser Arbeit hauptsächlich die T-Zellen charakterisiert wurden, werden an dieser Stelle nur einige Differenzen dieser Zellpopulation erörtert. Der kostimulatorische Rezeptor CD28 ist bei Mäusen nahezu ubiquitär auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen exprimiert. Konträr dazu exprimieren nur etwa 80 % der humanen CD4⁺ und 50 % der CD8⁺ T-Zellen diesen Rezeptor. Womöglich könnte dies einen Erklärungsansatz darstellen, weshalb die Wirksamkeit von CTLA-4-Inhibitoren bei Mäusen der Wirkung bei Men-

schen überlegen ist [296,297]. Weitere Unterschiede sind die eindeutigere Polarisierung von murinen T-Zellen in Th1 und Th2, sowie die fehlende Expression von murinen MHC-Klasse-II-Molekülen auf den T-Zellen. Insgesamt werden bei Menschen eine größere Vielfalt an T-Gedächtniszellen über einen längeren Zeitraum gebildet und aufrechterhalten, wodurch komplexere Zusammenhänge notwendig sind. Die Unterschiede betreffen gleichermaßen auch die wichtigen Signal- und Botenstoffe, welche die zellulären Mechanismen in den Geweben koordinieren. Grundsätzlich lässt sich zusammenfassen, dass das humane Immunsystem durch die komplexen Einflussfaktoren, die Größe des Organismus und die lange Lebenszeit ein vielfältigeres und umfassenderes System benötigt, um auf die deutlich tiefgreifenden Stressoren vorbereitet zu sein [297].

In Bezug auf die Hämatologie sind prinzipielle Unterschiede in der Verteilung der Zellen und in der Morphologie vorzufinden. Besonders relevant ist die abweichende Verteilung der Leukozyten, sowie die charakteristische ringförmige Struktur der murinen neutrophilen Granulozyten. Während beim Menschen im peripheren Blut 50-70 % Neutrophile und 30-50 % Lymphozyten vorzufinden sind, ist dies bei Mäusen weitestgehend umgekehrt (75-90 % Lymphozyten und 10-25 % Neutrophile) [297,298].

Die Haltungsbedingungen der Mäuse stellen eine weitere Einschränkung dar. Grundsätzlich verfügen die Mäuse über ein normal entwickeltes und intaktes Immunsystem. Eine möglichst standardisierte, spezifisch-pathogenfreie Haltung (SPF-nahe Haltung) ist trotzdem essenziell, um die Gefahr von Infektionsausbrüchen zu vermeiden und den Studienverlauf nicht zu gefährden. Das Immunsystem benötigt jedoch zur vollständigen Ausbildung den Kontakt zu Fremdmaterial und unbekannten Mikroorganismen. Durch die spezifizierte pathogenfreie Haltung fehlt der Einfluss der Umwelt und die Stimulationen für die Weiterentwicklung der adaptiven Immunantwort bleiben aus. Um die immunologischen Vorgänge in freilebenden Organismen, einschließlich der Menschen, abzubilden, wäre eine physiologische mikrobielle Exposition der Labormäuse relevant [299,300].

Eine pathogenarme Ernährung mit autoklavierten und speziellen Nahrungspellets sowie Trinkwasser hat zusätzlich einen großen Einfluss auf die Ausbildung des Mikrobioms. Das Mikrobiom wird zunehmend mit dem Immunsystem in Verbindung gebracht und ihm wird eine immer wichtigere Rolle in der Homöostase des Menschen zugeschrieben [301]. Veränderungen im Darmmikrobiom können grundlegende physiologi-

sche Immun- und Entzündungsfunktionen beeinflussen und die Anfälligkeit für Infektionen und Tumorentstehung modulieren. Aufgrund des direkten Zusammenhangs mit der Genese von Tumoren ist dies von besonderer Relevanz. Darüber hinaus können sie sogar den Erfolg einer Therapie beeinflussen [302].

Es gibt bereits einige Studien, die den Zusammenhang zwischen Mikrobiom und ICI-Therapien untersucht haben [290,303,304]. Unter anderem wurde nachgewiesen, dass die orale Verabreichung von Bifidobakterien dendritische Zellen aktiviert und nachfolgend zu einer erhöhten Akkumulation von CD8⁺ Zellen im TME führt, was wiederum zu einer massiven Verbesserung der Tumorkontrolle beitrug [290]. Eine andere Studie verdeutlichte die Verbindung zwischen bestimmten T-Zell-Reaktionen mit speziellen Darmbakterien, welche die Schlüsselrolle zur Wirksamkeit der CTLA-4-Blockade darstellten [304].

Durch die pathogenarme Ernährungs- und Lebensweise entwickeln die Labormäuse kein mit dem Menschen vergleichbares Mikrobiom und bilden nicht die Alltagssituation ab. Um diese in Zukunft realistischer darzustellen und trotzdem die Infektionsgefahr verschwindend gering zu halten, sollte in Erwägung gezogen werden, dass Mikrobiom anderweitig zu fördern und vielfältiger auszubilden. Eine vielschichtige Nahrung mit zusätzlicher Applikation von Prä- und Probiotika wäre ein realistischer Ansatz [299].

Bei Experimenten mit lebenden Tieren hat der Tierschutz höchste Priorität und wird jederzeit geachtet. Dies nimmt Einfluss auf die Überlebenszeiten, da der Todeszeitpunkt anhand bestimmter Kriterien ausgewählt und menschlich induziert wird. Auch diagnostische und interventionelle Maßnahmen sind nur sehr eingeschränkt möglich. Beispielsweise kann das Erleiden eines Ileus lebenslimitierend sein. Augenscheinlich ist auch die eingeschränkte Dokumentation der Lebensqualität der Mäuse. Lediglich eine objektive und äußerliche Untersuchung ist möglich, während auf das Wohlbefinden nicht näher eingegangen werden kann und die Erfassung potenzieller Nebenwirkungen limitiert. Schlussendlich ist durch die kurze Gesamtlebensdauer einer Maus auch keine Erhebung von Langzeitergebnissen möglich. Bezogen auf die Analysen der tierischen Organe ist die Anzahl der Versuchstiere sehr beschränkt. Die geringe Versuchstierzahl unterliegt teils hohen Schwankungen und schränkt die Interpretation ein, sobald einige Werte stark abweichen.

VII. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die vergleichende Analyse des PD1 und LAG-3 Inhibitors im Msh2^{loxP/loxP;TgTg(Vil1-cre)}-Modell der Mismatch-Reparatur defizienten (dMMR) Tumorgenese führte zu folgenden Ergebnissen: Die LAG-3-Inhibition verlängerte das Gesamtüberleben signifikant und war der PD-1-Blockade leicht überlegen. Dies war verbunden mit einer Krankheitsstabilisierung bzw. partiellen Tumorremission. In beiden Therapiegruppen kam es zu einer positiven Immunmodulation und Rekonstitution der T-Zellfunktion, charakterisiert durch eine signifikante Reduktion zirkulierender und splenischer CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatorischer und CTLA-4⁺ bzw. TIM-3⁺ erschöpfter T-Zellen, begleitet von einer deutlichen Abnahme tumor-infiltrierender CD163⁺ M2-Makrophagen und CD11b⁺Gr1⁺ myeloider Suppressorzellen. Gleichzeitig kam es zu einem Anstieg an zirkulierenden und splenischen Suppressorzellen, vermutlich im Sinne einer kompensatorischen Immunreaktion.

Hinsichtlich der Hämatopoese wurde zunächst an Kontrolltieren in frühen und fortgeschrittenen Tumorstadien nachgewiesen, dass die Tumorentwicklung mit einer Umprogrammierung zugunsten der Myelopoese und Abnahme von Erythrozyten und Megakaryozyten einhergeht. Dies deutet auf eine zunehmende Knochenmarkinsuffizienz hin. Die Therapie konnte dieser teilweise entgegenwirken und führte zu einer Re-Balancierung zwischen lymphoiden und myeloiden Vorläuferzellen. Dabei bestätigte sich auch die Überlegenheit des LAG-3-Inhibitors gegenüber dem PD1-Inhibitor: Die Anzahl der B-Zell-Vorläufer und der angeborenen lymphoiden Progenitorzellen entsprachen von tumorfreien Kontrolltieren. Darüber hinaus wurden auch normalisierende Effekte für IRF8⁺ monozytäre Vorläuferzellen nachgewiesen, die als negativer Regulator myeloider Suppressorzellen fungieren. Damit wurden neben dem Tumormikromilieu und dem peripheren Blut auch hämatopoetische Veränderungen analysiert, um das Therapieansprechen umfassend beurteilen zu können.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit die gute Wirksamkeit von Immuncheckpoint Inhibitoren im präklinischen Tumormodell bestätigt und LAG-3 als weitere therapeutische Zielstruktur für dMMR identifiziert werden. Zukünftig sollten Kombinationstherapien eingesetzt werden, um synergistische Effekte nach dualer Blockade zu erzielen und die T-Zellfunktionalität sowie die Antitumoraktivität weiter zu verbessern.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodríguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017;18:197.
2. Kerber RA, Neklason DW, Samowitz WS, Burt RW. Frequency of familial colon cancer and hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) in a large population database. *Fam Cancer*. 2005;4:239–44.
3. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, et al. COLORECTAL CANCER. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15065.
4. Müller MF, Ibrahim AEK, Arends MJ. Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Arch*. 2016;469:125–34.
5. Nagase H, Nakamura Y. Mutations of the APC (adenomatous polyposis coli) gene. *Hum Mutat*. 1993;2:425–34.
6. Stoffel EM, Koeppe E, Everett J, Ulintz P, Kiel M, Osborne J, et al. Germline Genetic Features of Young Individuals with Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2018;154:897-905.e1.
7. Krebs - Darmkrebs [Internet]. [cited 2023 Aug 3]. Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Darmkrebs/darmkrebs_node.html
8. Pfrötschner B. Deutsches Konsortium Familiärer Darmkrebs - Erblicher Darmkrebs [Internet]. 2006 [cited 2024 May 28]. Available from: https://www.hnpcc.de/fam_darmkrebs.html
9. Loeb LA. Human cancers express mutator phenotypes: origin, consequences and targeting. *Nat Rev Cancer*. 2011;11:450–7.
10. Friedberg EC, Walker GC, Siede W. DNA repair and mutagenesis. Washington, D.C: ASM Press; 1995.
11. Peltomäki P, Vasen HF. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: Database and results of a collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 1997;113:1146–58.
12. Yang W. Structure and function of mismatch repair proteins. *Mutation Research/DNA Repair*. 2000;460:245–56.
13. Kunkel TA, Erie DA. Eukaryotic Mismatch Repair in Relation to DNA Replication. *Annu Rev Genet*. 2015;49:291–313.
14. Bellacosa A. Functional interactions and signaling properties of mammalian DNA mismatch repair proteins. *Cell Death Differ*. 2001;8:1076–92.
15. Olave MC, Graham RP. Mismatch repair deficiency: The what, how and why it is important. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2022;61:314–21.
16. Radman M, Wagner R. Mismatch repair in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet*. 1986;20:523–38.
17. Modrich P, Lahue R. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem*. 1996;65:101–33.
18. MARINUS MG. DNA Mismatch Repair. *EcoSal Plus*. 2012;5:10.1128/ecosalplus.7.2.5.
19. Lahue RS, Au KG, Modrich P. DNA mismatch correction in a defined system. *Science*. 1989;245:160–4.
20. Grilley M, Welsh KM, Su SS, Modrich P. Isolation and characterization of the *Escherichia coli* mutL gene product. *J Biol Chem*. 1989;264:1000–4.
21. Kondo E, Horii A, Fukushige S. The interacting domains of three MutL heterodimers in man: hMLH1 interacts with 36 homologous amino acid residues within hMLH3, hPMS1 and hPMS2. *Nucleic Acids Res*. 2001;29:1695–702.
22. Ross-Macdonald P, Roeder GS. Mutation of a meiosis-specific MutS homolog decreases crossing over but not mismatch correction. *Cell*. 1994;79:1069–80.
23. Edelmann W, Cohen PE, Kneitz B, Winand N, Lia M, Heyer J, et al. Mammalian MutS homologue 5 is required for chromosome pairing in meiosis. *Nat Genet*. 1999;21:123–7.
24. Hollingsworth NM, Ponte L, Halsey C. MSH5, a novel MutS homolog, facilitates meiotic reciprocal recombination between homologs in *Saccharomyces cerevisiae* but not mismatch repair. *Genes Dev*. 1995;9:1728–39.
25. Marsischky GT, Filosi N, Kane MF, Kolodner R. Redundancy of *Saccharomyces cerevisiae* MSH3 and MSH6 in MSH2-dependent mismatch repair. *Genes Dev*. 1996;10:407–20.
26. Marsischky GT, Kolodner RD. Biochemical characterization of the interaction between the *Saccharomyces cerevisiae* MSH2-MSH6 complex and mispaired bases in DNA. *J Biol Chem*. 1999;274:26668–82.

27. Alani E. The *Saccharomyces cerevisiae* Msh2 and Msh6 proteins form a complex that specifically binds to duplex oligonucleotides containing mismatched DNA base pairs. *Mol Cell Biol.* 1996;16:5604–15.
28. Acharya S, Wilson T, Gradia S, Kane MF, Guerrette S, Marsischky GT, et al. hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:13629–34.
29. Preston BD, Albertson TM, Herr AJ. DNA Replication Fidelity and Cancer. *Semin Cancer Biol.* 2010;20:281–93.
30. Nakagawa T, Datta A, Kolodner RD. Multiple functions of MutS- and MutL-related heterocomplexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:14186–8.
31. Kadyrov FA, Dzantiev L, Constantin N, Modrich P. Endonucleolytic Function of MutL α in Human Mismatch Repair. *Cell.* 2006;126:297–308.
32. Longley MJ, Pierce AJ, Modrich P. DNA Polymerase δ Is Required for Human Mismatch Repair in Vitro *. *Journal of Biological Chemistry.* 1997;272:10917–21.
33. Edelmann W, Umar A, Yang K, Heyer J, Kucherlapati M, Lia M, et al. The DNA mismatch repair genes Msh3 and Msh6 cooperate in intestinal tumor suppression. *Cancer Res.* 2000;60:803–7.
34. Genschel J, Littman SJ, Drummond JT, Modrich P. Isolation of MutS β from Human Cells and Comparison of the Mismatch Repair Specificities of MutS β and MutS α *. *Journal of Biological Chemistry.* 1998;273:19895–901.
35. Räschle M, Marra G, Nyström-Lahti M, Schär P, Jiricny J. Identification of hMutL β , a Heterodimer of hMLH1 and hPMS1 *. *Journal of Biological Chemistry.* 1999;274:32368–75.
36. GRADY WM, CARETHERS JM. Genomic and Epigenetic Instability in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology.* 2008;135:1079–99.
37. Murphy KM, Zhang S, Geiger T, Hafez MJ, Bacher J, Berg KD, et al. Comparison of the Microsatellite Instability Analysis System and the Bethesda Panel for the Determination of Microsatellite Instability in Colorectal Cancers. *J Mol Diagn.* 2006;8:305–11.
38. Popat S, Hubner R, Houlston R s. Systematic Review of Microsatellite Instability and Colorectal Cancer Prognosis. *JCO.* 2005;23:609–18.
39. Spies M, Fishel R. Mismatch repair during homologous and homeologous recombination. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7:a022657.
40. Zhang H, Richards B, Wilson T, Lloyd M, Cranston A, Thorburn A, et al. Apoptosis induced by overexpression of hMSH2 or hMLH1. *Cancer Res.* 1999;59:3021–7.
41. Dietmaier W. Mikrosatelliteninstabilität. *Pathologe.* 2010;31:268–73.
42. Zaanen A, Meunier K, Sangar F, Fléjou J-F, Praz F. Microsatellite instability in colorectal cancer: from molecular oncogenic mechanisms to clinical implications. *Cell Oncol.* 2011;34:155–76.
43. Lynch-Syndrom (früher HNPCC) [Internet]. [cited 2023 Aug 5]. Available from: <https://www.uniklinikum-dresden.de/de/das-klinikum/kliniken-polikliniken-institute/kge/patientenambulanz/unsere-schwerpunkte/lynch-syndrom-frueher-hnpcc>
44. Schaaf CP, Zschocke J. Basiswissen Humangenetik: mit 218 Abbildungen. 3., überarbeitete und erweiterte Auflage. Berlin: Springer; 2018.
45. Arnemann J. Short Tandem Repeat (STR). In: Gressner AM, Arndt T, editors. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2019 [cited 2023 Aug 5]. p. 2158–2158. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4_3579
46. Jung B, Doctolero RT, Tajima A, Nguyen AK, Keku T, Sandler RS, et al. Loss of activin receptor type 2 protein expression in microsatellite unstable colon cancers. *Gastroenterology.* 2004;126:654–9.
47. Parsons R, Myeroff LL, Liu B, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, et al. Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1995;55:5548–50.
48. Roudko V, Cimen Bozkus C, Greenbaum B, Lucas A, Samstein R, Bhardwaj N. Lynch Syndrome and MSI-H Cancers: From Mechanisms to “Off-The-Shelf” Cancer Vaccines. *Front Immunol.* 2021;12:757804.
49. Duval. Variable mutation frequencies in coding repeats of TCF-4 and other target genes in colon, gastric and endometrial carcinoma showing microsatellite instability | *Oncogene* [Internet]. [cited 2024 May 13]. Available from: <https://www.nature.com/articles/1203287>
50. Salem ME, Bodor JN, Puccini A, Xiu J, Goldberg RM, Grothey A, et al. Relationship between MLH1, PMS2, MSH2 and MSH6 gene-specific alterations and tumor mutational burden in 1057

- microsatellite instability-high solid tumors. *Int J Cancer*. 2020;147:2948–56.
51. S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom. 2019;
52. Dedeurwaerdere F, Claes KB, Van Dorpe J, Rottiers I, Van der Meulen J, Breyne J, et al. Comparison of microsatellite instability detection by immunohistochemistry and molecular techniques in colorectal and endometrial cancer. *Sci Rep*. 2021;11:12880.
53. Innovative Krebsmedizin | Mikrosatelliteninstabilität (MSI) | BMS-Onkologie [Internet]. BMS-Onkologie. 2022 [cited 2023 Aug 7]. Available from: <https://www.bms-onkologie.de/praezisionsmedizin-mikrosatelliteninstabilitaet-msi-dmmr>
54. Pawlik TM, Raut CP, Rodriguez-Bigas MA. Colorectal Carcinogenesis: MSI-H Versus MSI-L. *Dis Markers*. 2004;20:199–206.
55. Laiho P, Launonen V, Lahermo P, Esteller M, Guo M, Herman JG, et al. Low-level microsatellite instability in most colorectal carcinomas. *Cancer Res*. 2002;62:1166–70.
56. Sinicrope FA, Rego RL, Halling KC, Foster N, Sargent DJ, La Plant B, et al. Prognostic impact of microsatellite instability and DNA ploidy in human colon carcinoma patients. *Gastroenterology*. 2006;131:729–37.
57. Idos G, Valle L. Lynch Syndrome. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Gripp KW, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cited 2023 Aug 4]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1211/>
58. Mauri G, Sartore-Bianchi A, Russo A, Marsoni S, Bardelli A, Siena S. Early-onset colorectal cancer in young individuals. *Mol Oncol*. 2019;13:109–31.
59. Lynch HT, Lynch JF, Lynch PM, Attard T. Hereditary colorectal cancer syndromes: molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management. *Familial Cancer*. 2008;7:27–39.
60. Seth S, Ager A, Arends MJ, Frayling IM. Lynch syndrome – cancer pathways, heterogeneity and immune escape. *The Journal of Pathology*. 2018;246:129–33.
61. Lynch HT, Snyder CL, Shaw TG, Heinen CD, Hitchins MP. Milestones of Lynch syndrome: 1895–2015. *Nat Rev Cancer*. 2015;15:181–94.
62. Møller P, Seppälä T, Bernstein I, Holinski-Feder E, Sala P, Evans DG, et al. Cancer incidence and survival in Lynch syndrome patients receiving colonoscopic and gynaecological surveillance: first report from the prospective Lynch syndrome database. *Gut*. 2017;66:464–72.
63. Pschyrembel Online | Hereditäres nichtpolypöses Kolonkarzinom [Internet]. [cited 2023 Oct 17]. Available from: <https://www.pschyrembel.de/Heredit%C3%A4res%20nicht-polyp%C3%B6ses%20Kolonkarzinom/K0DFX>
64. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology*. 1999;116:1453–6.
65. Boland CR, Goel A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2010;138:2073–2087.e3.
66. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndrome) and Microsatellite Instability. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96:261–8.
67. Fm G, Ji A, Je A, Cr B, Ca B, Rw B, et al. Guidelines on genetic evaluation and management of Lynch syndrome: a consensus statement by the US Multi-society Task Force on colorectal cancer. *The American journal of gastroenterology* [Internet]. 2014 [cited 2023 Aug 4];109. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25070057/>
68. Ward R, Meagher A, Tomlinson I, O'Connor T, Norrie M, Wu R, et al. Microsatellite instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer. *Gut*. 2001;48:821–9.
69. Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res*. 1997;57:808–11.
70. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa J-PJ. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:8681–6.
71. Wang L, Cunningham JM, Winters JL, Guenther JC, French AJ, Boardman LA, et al. BRAF mutations in colon cancer are not likely attributable to defective DNA mismatch repair. *Cancer Res*. 2003;63:5209–12.
72. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet*. 2006;38:787–93.

73. Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, Ma A, Lutterbaugh JD, Periyasamy S, et al. Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:8698–702.
74. Beatty GL, Gladney WL. Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2015;21:687–92.
75. Hussein MR, Hassan HI. Analysis of the mononuclear inflammatory cell infiltrate in the normal breast, benign proliferative breast disease, in situ and infiltrating ductal breast carcinomas: preliminary observations. *J Clin Pathol*. 2006;59:972–7.
76. Kallungal A, Olszewski M, Maciejewska N, Brankiewicz W, Baginski M. Cancer immune escape: the role of antigen presentation machinery. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2023;149:8131–41.
77. Chabanon RM, Pedrero M, Lefebvre C, Marabelle A, Soria J-C, Postel-Vinay S. Mutational Landscape and Sensitivity to Immune Checkpoint Blockers. *Clinical Cancer Research*. 2016;22:4309–21.
78. Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nat Immunol*. 2002;3:999–1005.
79. Vesely MD, Schreiber RD. Cancer Immunoediting: antigens, mechanisms and implications to cancer immunotherapy. *Ann N Y Acad Sci*. 2013;1284:1–5.
80. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases — elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol*. 2014;27:16–25.
81. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011;144:646–74.
82. Reeves E, James E. Antigen processing and immune regulation in the response to tumours. *Immunology*. 2017;150:16–24.
83. Menon H, Ramapriyan R, Cushman TR, Verma V, Kim HH, Schoenhals JE, et al. Role of Radiation Therapy in Modulation of the Tumor Stroma and Microenvironment. *Front Immunol*. 2019;10:193.
84. Sharpe AH. Introduction to Checkpoint Inhibitors and Cancer Immunotherapy. *Immunol Rev*. 2017;276:5–8.
85. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2018 [Internet]. DGFI. 2018 [cited 2023 Aug 9]. Available from: <https://dgfi.org/the-nobel-prize-in-physiology-or-medicine-2018-2/>
86. Smyth MJ, Teng MW. 2018 Nobel Prize in physiology or medicine. *Clin Transl Immunology*. 2018;7:e1041.
87. Zander H, Müller-Egert S, Zwiewka M, Groß S, van Zandbergen G, Engelbergs J. Checkpointinhibitoren in der Tumorthherapie. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2020;63:1322–30.
88. Demeure CE, Wolfers J, Martin-Garcia N, Gaulard P, Triebel F. T Lymphocytes infiltrating various tumour types express the MHC class II ligand lymphocyte activation gene-3 (LAG-3): role of LAG-3/MHC class II interactions in cell–cell contacts. *European Journal of Cancer*. 2001;37:1709–18.
89. Yang Z-Z, Kim HJ, Villasboas JC, Chen Y-P, Price-Troska T, Jalali S, et al. Expression of LAG-3 defines exhaustion of intratumoral PD-1+ T cells and correlates with poor outcome in follicular lymphoma. *Oncotarget*. 2017;8:61425–39.
90. Jiang Y, Li Y, Zhu B. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Death Dis*. 2015;6:e1792.
91. Zitvogel L, Kroemer G. Targeting PD-1/PD-L1 interactions for cancer immunotherapy. *Onco-Immunology*. 2012;1:1223–5.
92. Franzin R, Netti GS, Spadaccino F, Porta C, Gesualdo L, Stallone G, et al. The Use of Immune Checkpoint Inhibitors in Oncology and the Occurrence of AKI: Where Do We Stand? *Front Immunol*. 2020;11:574271.
93. Herbel, Jan Niklas. Checkpoint-Inhibitoren | Gelbe Liste [Internet]. [cited 2023 Aug 19]. Available from: <https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffgruppen/checkpoint-inhibitoren>
94. Lipson EJ, Drake CG. Ipilimumab: An Anti-CTLA-4 Antibody for Metastatic Melanoma. *Clinical Cancer Research*. 2011;17:6958–62.
95. Lamos C, Hunger RE. Checkpoint-Inhibitoren – Indikation und Verwendung bei Melanompatienten. *Z Rheumatol*. 2020;79:818–25.
96. Diaz LA, Shiu K-K, Kim TW, Jensen BV, Jensen LH, Punt C, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for microsatellite instability-high or mismatch repair-deficient metastatic colorectal

- cancer (KEYNOTE-177): final analysis of a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2022;23:659–70.
97. Mok TSK, Wu Y-L, Kudaba I, Kowalski DM, Cho BC, Turna HZ, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2019;393:1819–30.
98. Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M, Kowanetz M, Vansteenkiste J, Mazieres J, et al. Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet.* 2016;387:1837–46.
99. Hodi FS, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob J-J, Rutkowski P, Cowey CL, et al. Nivolumab plus ipilimumab or nivolumab alone versus ipilimumab alone in advanced melanoma (CheckMate 067): 4-year outcomes of a multicentre, randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology.* 2018;19:1480–92.
100. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* 1992;11:3887–95.
101. Fourcade J, Sun Z, Benallaoua M, Guillaume P, Luescher IF, Sander C, et al. Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients. *J Exp Med.* 2010;207:2175–86.
102. Ohaegbulam KC, Assal A, Lazar-Molnar E, Yao Y, Zang X. Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. *Trends in Molecular Medicine.* 2015;21:24–33.
103. Wang Y, Wang H, Yao H, Li C, Fang J-Y, Xu J. Regulation of PD-L1: Emerging Routes for Targeting Tumor Immune Evasion. *Front Pharmacol.* 2018;9:536.
104. Youngnak-Piboonratanakit P, Tsushima F, Otsuki N, Igarashi H, Machida U, Iwai H, et al. The expression of B7-H1 on keratinocytes in chronic inflammatory mucocutaneous disease and its regulatory role. *Immunology Letters.* 2004;94:215–22.
105. Ritprajak P, Azuma M. Intrinsic and extrinsic control of expression of the immunoregulatory molecule PD-L1 in epithelial cells and squamous cell carcinoma. *Oral Oncology.* 2015;51:221–8.
106. Yao H, Wang H, Li C, Fang J-Y, Xu J. Cancer Cell-Intrinsic PD-1 and Implications in Combinatorial Immunotherapy. *Front Immunol.* 2018;9:1774.
107. Page DB, Postow MA, Callahan MK, Allison JP, Wolchok JD. Immune modulation in cancer with antibodies. *Annu Rev Med.* 2014;65:185–202.
108. Wang X, Yang X, Zhang C, Wang Y, Cheng T, Duan L, et al. Tumor cell-intrinsic PD-1 receptor is a tumor suppressor and mediates resistance to PD-1 blockade therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117:6640–50.
109. Alsaab HO, Sau S, Alzhrani R, Tatiparti K, Bhise K, Kashaw SK, et al. PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. *Front Pharmacol.* 2017;8:561.
110. Overman MJ, McDermott R, Leach JL, Lonardi S, Lenz H-J, Morse MA, et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair deficient/microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): results of an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2017;18:1182–91.
111. Lenz H-J, Van Cutsem E, Luisa Limon M, Wong KYM, Hendlisz A, Aglietta M, et al. First-Line Nivolumab Plus Low-Dose Ipilimumab for Microsatellite Instability-High/Mismatch Repair-Deficient Metastatic Colorectal Cancer: The Phase II CheckMate 142 Study. *J Clin Oncol.* 2022;40:161–70.
112. Overman MJ, Lonardi S, Wong KYM, Lenz H-J, Gelsomino F, Aglietta M, et al. Durable Clinical Benefit With Nivolumab Plus Ipilimumab in DNA Mismatch Repair-Deficient/Microsatellite Instability-High Metastatic Colorectal Cancer. *JCO.* 2018;36:773–9.
113. Bristol-Myers Squibb. A Randomized, Double-Blind Phase 2/3 Study of Relatlimab Combined With Nivolumab Versus Nivolumab in Participants With Previously Untreated Metastatic or Unresectable Melanoma [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2022 Sep. Report No.: NCT03470922. Available from: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03470922>
114. Huo J-L, Wang Y-T, Fu W-J, Lu N, Liu Z-S. The promising immune checkpoint LAG-3 in cancer immunotherapy: from basic research to clinical application. *Front Immunol.* 2022;13:956090.
115. Maruhashi T, Sugiura D, Okazaki I, Okazaki T. LAG-3: from molecular functions to clinical applications. *J Immunother Cancer.* 2020;8:e001014.
116. Camisaschi C, Casati C, Rini F, Perego M, De Filippo A, Triebel F, et al. LAG-3 Expression Defines a Subset of CD4+CD25highFoxp3+ Regulatory T Cells That Are Expanded at Tumor Sites.

- The Journal of Immunology. 2010;184:6545–51.
117. Huang C-T, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, et al. Role of LAG-3 in Regulatory T Cells. *Immunity*. 2004;21:503–13.
 118. Bruniquel D, Borie N, Hannier S, Triebel F. Regulation of expression of the human lymphocyte activation gene-3 (LAG-3) molecule, a ligand for MHC class II. *Immunogenetics*. 1998;48:116–24.
 119. Sun H, Sun C, Xiao W. Expression regulation of co-inhibitory molecules on human natural killer cells in response to cytokine stimulations. *Cytokine*. 2014;65:33–41.
 120. Maeda TK, Sugiura D, Okazaki I, Maruhashi T, Okazaki T. Atypical motifs in the cytoplasmic region of the inhibitory immune co-receptor LAG-3 inhibit T cell activation. *J Biol Chem*. 2019;294:6017–26.
 121. Maruhashi T, Okazaki I-M, Sugiura D, Takahashi S, Maeda TK, Shimizu K, et al. LAG-3 inhibits the activation of CD4⁺ T cells that recognize stable pMHCII through its conformation-dependent recognition of pMHCII. *Nat Immunol*. 2018;19:1415–26.
 122. Huard B, Prigent P, Tournier M, Bruniquel D, Triebel F. CD4/major histocompatibility complex class II interaction analyzed with CD4- and lymphocyte activation gene-3 (LAG-3)-Ig fusion proteins. *Eur J Immunol*. 1995;25:2718–21.
 123. Que Y, Fang Z, Guan Y, Xiao W, Xu B, Zhao J, et al. LAG-3 expression on tumor-infiltrating T cells in soft tissue sarcoma correlates with poor survival. *Cancer Biol Med*. 2019;16:331–40.
 124. Workman CJ, Vignali DAA. Negative regulation of T cell homeostasis by lymphocyte activation gene-3 (CD223). *J Immunol*. 2005;174:688–95.
 125. Zhou G, Noordam L, Sprengers D, Doukas M, Boor PPC, van Beek AA, et al. Blockade of LAG3 enhances responses of tumor-infiltrating T cells in mismatch repair-proficient liver metastases of colorectal cancer. *Oncoimmunology*. 2018;7:e1448332.
 126. Graydon CG, Mohideen S, Fowke KR. LAG3's Enigmatic Mechanism of Action. *Front Immunol*. 2021;11:615317.
 127. Pühr HC, İlhan-Mutlu A. New emerging targets in cancer immunotherapy: the role of LAG3. *ESMO Open*. 2019;4:e000482.
 128. Sordo-Bahamonde C, Lorenzo-Herrero S, González-Rodríguez AP, Payer ÁR, González-García E, López-Soto A, et al. LAG-3 Blockade with Relatlimab (BMS-986016) Restores Anti-Leukemic Responses in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancers (Basel)*. 2021;13:2112.
 129. Study Record | ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2023 Aug 16]. Available from: <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT03470922?limit=100&id=CA224-047&rank=1>
 130. Tawbi HA, Schadendorf D, Lipson EJ, Ascierto PA, Matamala L, Castillo Gutiérrez E, et al. Relatlimab and Nivolumab versus Nivolumab in Untreated Advanced Melanoma. *N Engl J Med*. 2022;386:24–34.
 131. Opdualag Approved to Treat Advanced Melanoma - NCI [Internet]. 2022 [cited 2023 Oct 17]. Available from: <https://www.cancer.gov/news-events/cancer-currents-blog/2022/fda-opdualag-melanoma-lag-3>
 132. Friedman CF, Proverbs-Singh TA, Postow MA. Treatment of the Immune-Related Adverse Effects of Immune Checkpoint Inhibitors: A Review. *JAMA Oncol*. 2016;2:1346–53.
 133. Heinzerling L, de Toni EN, Schett G, Hundorfean G, Zimmer L. Checkpoint Inhibitors. *Dtsch Arztebl Int*. 2019;116:119–26.
 134. Fares J, Fares MY, Fares Y. Immune checkpoint inhibitors: Advances and impact in neuro-oncology. *Surg Neurol Int*. 2019;10:9.
 135. Overman MJ, McDermott R, Leach JL, Lonardi S, Lenz H-J, Morse MA, et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2017;18:1182–91.
 136. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med*. 2015;372:2509–20.
 137. Benavente S, Sánchez-García A, Naches S, LLeonart ME, Lorente J. Therapy-Induced Modulation of the Tumor Microenvironment: New Opportunities for Cancer Therapies. *Front Oncol*. 2020;10:582884.
 138. Long H, Jia Q, Wang L, Fang W, Wang Z, Jiang T, et al. Tumor-induced erythroid precursor-differentiated myeloid cells mediate immunosuppression and curtail anti-PD-1/PD-L1 treatment efficacy. *Cancer Cell*. 2022;40:674-693.e7.
 139. Shiravand Y, Khodadadi F, Kashani SMA, Hosseini-Fard SR, Hosseini S, Sadeghirad H, et

- al. Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Therapy. *Curr Oncol*. 2022;29:3044–60.
140. Dolcetti R, Viel A, Doglioni C, Russo A, Guidoboni M, Capozzi E, et al. High Prevalence of Activated Intraepithelial Cytotoxic T Lymphocytes and Increased Neoplastic Cell Apoptosis in Colorectal Carcinomas with Microsatellite Instability. *Am J Pathol*. 1999;154:1805–13.
141. Ijsselstein ME, Petitprez F, Lacroix L, Ruano D, van der Breggen R, Julie C, et al. Revisiting immune escape in colorectal cancer in the era of immunotherapy. *Br J Cancer*. 2019;120:815–8.
142. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, et al. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*. 2015;348:124–8.
143. Trullas A, Delgado J, Genazzani A, Mueller-Berghaus J, Migali C, Müller-Egert S, et al. The EMA assessment of pembrolizumab as monotherapy for the first-line treatment of adult patients with metastatic microsatellite instability-high or mismatch repair deficient colorectal cancer. *ESMO Open*. 2021;6:100145.
144. André T, Shiu K-K, Kim TW, Jensen BV, Jensen LH, Punt C, et al. Pembrolizumab in Microsatellite-Instability–High Advanced Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2020;383:2207–18.
145. Barkley D, Moncada R, Pour M, Liberman DA, Dryg I, Werba G, et al. Cancer cell states recur across tumor types and form specific interactions with the tumor microenvironment. *Nat Genet*. 2022;54:1192–201.
146. Reina-Campos M, Moscat J, Diaz-Meco M. Metabolism Shapes the Tumor Microenvironment. *Curr Opin Cell Biol*. 2017;48:47–53.
147. Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance. *Journal of Cell Science*. 2012;125:5591–6.
148. Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol*. 2012;196:395–406.
149. Valkenburg KC, de Groot AE, Pienta KC. Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15:366–81.
150. Xing F, Saidou J, Watabe K. Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Front Biosci*. 2010;15:166–79.
151. Zheng Z, Wieder T, Mauerer B, Schäfer L, Kesselring R, Braumüller H. T Cells in Colorectal Cancer: Unravelling the Function of Different T Cell Subsets in the Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci*. 2023;24:11673.
152. Crinò L, Dansin E, Garrido P, Griesinger F, Laskin J, Pavlakis N, et al. Safety and efficacy of first-line bevacizumab-based therapy in advanced non-squamous non-small-cell lung cancer (SAiL, MO19390): a phase 4 study. *The Lancet Oncology*. 2010;11:733–40.
153. Ascha MS, Wang JF, Kumthekar P, Sloan AE, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. Bevacizumab for the treatment of non-small cell lung cancer patients with synchronous brain metastases. *Sci Rep*. 2019;9:17792.
154. Matsumoto K, Ema M. Roles of VEGF-A signalling in development, regeneration, and tumours. *The Journal of Biochemistry*. 2014;156:1–10.
155. Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK, et al. Mismatch-repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science*. 2017;357:409–13.
156. Havel JJ, Chowell D, Chan TA. The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2019;19:133–50.
157. Wu W-C, Sun H-W, Chen H-T, Liang J, Yu X-J, Wu C, et al. Circulating hematopoietic stem and progenitor cells are myeloid-biased in cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111:4221–6.
158. Pathria P, Louis TL, Varner JA. Targeting Tumor-Associated Macrophages in Cancer. *Trends in Immunology*. 2019;40:310–27.
159. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*. 2012;21:309–22.
160. Wildes TJ, DiVita Dean B, Flores CT. Myelopoiesis during Solid Cancers and Strategies for Immunotherapy. *Cells*. 2021;10:968.
161. Wu K, Lin K, Li X, Yuan X, Xu P, Ni P, et al. Redefining Tumor-Associated Macrophage Subpopulations and Functions in the Tumor Microenvironment. *Front Immunol*. 2020;11:1731.
162. Lewis CE, Pollard JW. Distinct Role of Macrophages in Different Tumor Microenvironments. *Cancer Research*. 2006;66:605–12.
163. Edin S, Wikberg ML, Oldenborg P-A, Palmqvist R. Macrophages. *Oncoimmunology*.

2013;2:e23038.

164. Masucci MT, Minopoli M, Carriero MV. Tumor Associated Neutrophils. Their Role in Tumorigenesis, Metastasis, Prognosis and Therapy. *Front Oncol.* 2019;9:1146.
165. Cortez-Retamozo V, Etzrodt M, Newton A, Rauch PJ, Chudnovskiy A, Berger C, et al. Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:2491–6.
166. Bao Y, Liu Z, Guo M, Li B, Sun X, Wang L. Extramedullary hematopoiesis secondary to malignant solid tumors: a case report and literature review. *Cancer Manag Res.* 2018;10:1461–70.
167. De Leo EK, Shah CP, Grajo JR, Liu X, Parekh H. Extramedullary Hematopoiesis in Mismatch Repair Deficient Colon Cancer Patient on Adjuvant Chemotherapy. *Cureus.* 13:e12899.
168. Yamamoto K, Miwa Y, Abe-Suzuki S, Abe S, Kirimura S, Onishi I, et al. Extramedullary hematopoiesis: Elucidating the function of the hematopoietic stem cell niche (Review). *Mol Med Rep.* 2016;13:587–91.
169. Mastio J, Condamine T, Dominguez G, Kossenkova AV, Donthireddy L, Veglia F, et al. Identification of monocyte-like precursors of granulocytes in cancer as a mechanism for accumulation of PMN-MDSCs. *J Exp Med.* 2019;216:2150–69.
170. Kucherlapati MH, Lee K, Nguyen AA, Clark AB, Hou H, Rosulek A, et al. An Msh2 conditional knockout mouse for studying intestinal cancer and testing anticancer agents. *Gastroenterology.* 2010;138:993-1002.e1.
171. Kortüm B, Campregher C, Lang M, Khare V, Pinter M, Evstatiev R, et al. Mesalazine and thymoquinone attenuate intestinal tumour development in Msh2(loxp/loxP) Villin-Cre mice. *Gut.* 2015;64:1905–12.
172. Van Duyne GD. Cre Recombinase. *Microbiology Spectrum.* 2015;3:10.1128/microbiolspec.mdna3-0014–2014.
173. Dum D, Lennartz M, Menz A, Kluth M, Hube-Magg C, Weidemann S, et al. Villin expression in human tumors: a tissue microarray study on 14,398 tumors. *Expert Review of Molecular Diagnostics.* 2022;22:665–75.
174. Rudroff T, Kindred JH, Kalliokoski KK. [18F]-FDG positron emission tomography—an established clinical tool opening a new window into exercise physiology. *Journal of Applied Physiology.* 2015;118:1181–90.
175. Herzog H. Methods and applications of positron-based medical imaging. *Radiation Physics and Chemistry.* 2007;76:337–42.
176. Deutsche Gesellschaft für Nuklearmedizin e.V. [Internet]. [cited 2023 Aug 1]. Available from: https://www.nuklearmedizin.de/leistungen/leitlinien/html/tumo_pet_ct.php?navId=53
177. Gutman F, Alberini J-L, Wartski M, Vilain D, Le Stanc E, Sarandi F, et al. Incidental colonic focal lesions detected by FDG PET/CT. *AJR Am J Roentgenol.* 2005;185:495–500.
178. facs | facs » Durchflusszytometrie » Prinzip der Durchflußzytometrie [Internet]. [cited 2023 Aug 2]. Available from: <https://www.unimedizin-mainz.de/facs/durchflusszytometrie/prinzip-der-durchflusszytometrie.html#>
179. Nolan JP, Condello D. Spectral Flow Cytometry. *Curr Protoc Cytom.* 2013;CHAPTER:Unit1.27.
180. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology.* 2017;37:163–76.
181. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol.* 2018;120:5.1.1-5.1.11.
182. essentials of real time pcr.pdf [Internet]. [cited 2023 Aug 1]. Available from: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/migration/en/filelibrary/nucleic-acid-amplification-expression-profiling/pdfs.par.65119.file.dat/essentials%20of%20real%20time%20pcr.pdf>
183. Porter JR, Telford WG, Batchelor E. Single-cell Gene Expression Profiling Using FACS and qPCR with Internal Standards. *J Vis Exp.* 2017;55219.
184. Zucha D, Kubista M, Valihrach L. Tutorial: Guidelines for Single-Cell RT-qPCR. *Cells.* 2021;10:2607.
185. eurogentec-qPCR-guide.pdf [Internet]. [cited 2023 Aug 3]. Available from: <https://www.genequantification.de/eurogentec-qPCR-guide.pdf>
186. Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH. An introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol.* 2019;1897:299–311.
187. Odell ID, Cook D. Immunofluorescence Techniques. *J Invest Dermatol.* 2013;133:1–4.
188. Nwaneshiudu A, Kuschal C, Sakamoto FH, Anderson RR, Schwarzenberger K, Young RC. Introduction to Confocal Microscopy. *J Invest Dermatol.* 2012;132:1–5.

189. Elliott AD. Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Curr Protoc Cytom.* 2020;92:e68.
190. Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW. Colony-Stimulating Factor 1 Promotes Progression of Mammary Tumors to Malignancy. *J Exp Med.* 2001;193:727–40.
191. Yadav S, Priya A, Borade DR, Agrawal-Rajput R. Macrophage subsets and their role: correlation with colony-stimulating factor-1 receptor and clinical relevance. *Immunol Res.* 2023;71:130–52.
192. Pergola C, Schaible AM, Nikels F, Dodt G, Northoff H, Werz O. Progesterone rapidly down-regulates the biosynthesis of 5-lipoxygenase products in human primary monocytes. *Pharmacological Research.* 2015;94:42–50.
193. Sun Q-Y, Zhou H-H, Mao X-Y. Emerging Roles of 5-Lipoxygenase Phosphorylation in Inflammation and Cell Death. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:2749173.
194. Laslo P, Spooner CJ, Warmflash A, Lancki DW, Lee H-J, Sciammas R, et al. Multilineage Transcriptional Priming and Determination of Alternate Hematopoietic Cell Fates. *Cell.* 2006;126:755–66.
195. Gounari F, Khazaie K. TCF-1: a maverick in T cell development and function. *Nat Immunol.* 2022;23:671–8.
196. Yoshimura A, Muto G. TGF- β Function in Immune Suppression. In: Ahmed R, Honjo T, editors. *Negative Co-Receptors and Ligands* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2011 [cited 2023 Dec 16]. p. 127–47. Available from: https://doi.org/10.1007/82_2010_87
197. De S, Zhang B, Shih T, Singh S, Winkler A, Donnelly R, et al. B Cell-Intrinsic Role for IRF5 in TLR9/BCR-Induced Human B Cell Activation, Proliferation, and Plasmablast Differentiation. *Front Immunol.* 2018;8:1938.
198. Zhang S, Liu Q, Wei Y, Xiong Y, Gu Y, Huang Y, et al. Anterior gradient-2 regulates cell communication by coordinating cytokine–chemokine signaling and immune infiltration in breast cancer. *Cancer Sci.* 2023;114:2238–53.
199. Zhao L, He R, Long H, Guo B, Jia Q, Qin D, et al. Late-stage tumors induce anemia and immunosuppressive extramedullary erythroid progenitor cells. *Nat Med.* 2018;24:1536–44.
200. Yáñez A, Ng MY, Hassanzadeh-Kiabi N, Goodridge HS. IRF8 acts in lineage-committed rather than oligopotent progenitors to control neutrophil vs monocyte production. *Blood.* 2015;125:1452–9.
201. Luchini C, Bibeau F, Ligtenberg MJL, Singh N, Nottegar A, Bosse T, et al. ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach. *Annals of Oncology.* 2019;30:1232–43.
202. Rüschoff J, Schildhaus H-U, Rüschoff JH, Jöhrens K, Bocker-Edmonston T, Dietmaier W, et al. Testung auf Mismatch-Reparatur-Defizienz und Mikrosatelliteninstabilität. *Pathologie (Heidelberg).* 2023;44:301–10.
203. Le DT, Kim TW, Van Cutsem E, Geva R, Jäger D, Hara H, et al. Phase II Open-Label Study of Pembrolizumab in Treatment-Refractory, Microsatellite Instability–High/Mismatch Repair–Deficient Metastatic Colorectal Cancer: KEYNOTE-164. *J Clin Oncol.* 2020;38:11–9.
204. Marabelle A, Le DT, Ascierto PA, Di Giacomo AM, De Jesus-Acosta A, Delord J-P, et al. Efficacy of Pembrolizumab in Patients With Noncolorectal High Microsatellite Instability/Mismatch Repair–Deficient Cancer: Results From the Phase II KEYNOTE-158 Study. *J Clin Oncol.* 2020;38:1–10.
205. Kempe S. Zulassung von Pembrolizumab bei MSI-H/dMMR-Tumoren erweitert. *Im Fokus Onkologie.* 2023;26:60–60.
206. Oaknin A, Tinker AV, Gilbert L, Samouëlian V, Mathews C, Brown J, et al. Clinical Activity and Safety of the Anti–Programmed Death 1 Monoclonal Antibody Dostarlimab for Patients With Recurrent or Advanced Mismatch Repair–Deficient Endometrial Cancer. *JAMA Oncol.* 2020;6:1–7.
207. Lemech C, Dredge K, Bampton D, Hammond E, Clouston A, Waterhouse NJ, et al. Phase Ib open-label, multicenter study of pixatimod, an activator of TLR9, in combination with nivolumab in subjects with microsatellite-stable metastatic colorectal cancer, metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma and other solid tumors. *J Immunother Cancer.* 2023;11:e006136.
208. Salewski I, Henne J, Engster L, Krone P, Schneider B, Redwanz C, et al. CDK4/6 blockade provides an alternative approach for treatment of mismatch-repair deficient tumors. *Oncoimmunology.* 2022;11:2094583.

209. Al-Mterin MA, Murshed K, Elkord E. Correlations between Circulating and Tumor-Infiltrating CD4⁺ Treg Subsets with Immune Checkpoints in Colorectal Cancer Patients with Early and Advanced Stages. *Vaccines (Basel)*. 2022;10:1471.
210. Opdivo, Opdualag Still Benefits Patients With Melanoma at 2 Years [Internet]. Curetoday. 2023 [cited 2024 Mar 13]. Available from: <https://www.curetoday.com/view/opdivo-opdualag-still-benefits-patients-with-melanoma-at-2-years>
211. Nakaigawa N, Kondo K, Tateishi U, Minamimoto R, Kaneta T, Namura K, et al. FDG PET/CT as a prognostic biomarker in the era of molecular-targeting therapies: max SUVmax predicts survival of patients with advanced renal cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2016;16:67.
212. Ke L, Wang L, Yu J, Meng X. Prognostic Significance of SUVmax Combined With Lactate Dehydrogenase in Advanced Lung Cancer Patients Treated With Immune Checkpoint Inhibitor Plus Chemotherapy: A Retrospective Study. *Front Oncol*. 2021;11:652312.
213. Thureau K, Palmes D, Hummel R, Fritz M, Schöpp M, Brüwer M, et al. PET-CT: Prognostische Bedeutung des SUV Wertes beim Ösophaguskarzinom. *Z Gastroenterol*. 2012;50:V76.
214. Cerfolio RJ, Bryant AS. Maximum standardized uptake values on positron emission tomography of esophageal cancer predicts stage, tumor biology, and survival. *Ann Thorac Surg*. 2006;82:391–4; discussion 394–395.
215. Rocha P, Hardy-Werbin M, Naranjo D, Taus Á, Rodrigo M, Zuccarino F, et al. CD103+CD8⁺ Lymphocytes Characterize the Immune Infiltration in a Case With Pseudoprogression in Squamous NSCLC. *Journal of Thoracic Oncology*. 2018;13:e193–6.
216. Derclé L, Sun S, Seban R-D, Mekki A, Sun R, Tselikas L, et al. Emerging and Evolving Concepts in Cancer Immunotherapy Imaging. *Radiology*. 2023;306:32–46.
217. Berz AM, Dromain C, Vietti-Viola N, Boughdad S, Duran R. Tumor response assessment on imaging following immunotherapy. *Front Oncol*. 2022;12:982983.
218. Somarouthu B, Lee SI, Urban T, Sadow CA, Harris GJ, Kambadakone A. Immune-related tumour response assessment criteria: a comprehensive review. *Br J Radiol*. 2018;91:20170457.
219. Wolchok JD, Hoos A, O'Day S, Weber JS, Hamid O, Lebbé C, et al. Guidelines for the Evaluation of Immune Therapy Activity in Solid Tumors: Immune-Related Response Criteria. *Clinical Cancer Research*. 2009;15:7412–20.
220. Won SE, Park HJ, Byun S, Pyo J, Kim JH, Choi C-M, et al. Impact of pseudoprogression and treatment beyond progression on outcome in patients with non-small cell lung cancer treated with immune checkpoint inhibitors. *Oncoimmunology*. 9:1776058.
221. Salewski I, Kuntz S, Kuemmel A, Feldtmann R, Felix SB, Henze L, et al. Combined vaccine-immune-checkpoint inhibition constitutes a promising strategy for treatment of dMMR tumors. *Cancer Immunol Immunother*. 2021;70:3405–19.
222. Garcia-Marquez MA, Thelen M, Reinke S, Keller D, Wennhold K, Lehmann J, et al. Reverted exhaustion phenotype of circulating lymphocytes as immune correlate of anti-PD1 first-line treatment in Hodgkin lymphoma. *Leukemia*. 2022;36:760–71.
223. Zhang C, Wang L, Xu C, Xu H, Wu Y. Resistance mechanisms of immune checkpoint inhibition in lymphoma: Focusing on the tumor microenvironment. *Front Pharmacol*. 2023;14:1079924.
224. Kumagai S, Togashi Y, Kamada T, Sugiyama E, Nishinakamura H, Takeuchi Y, et al. The PD-1 expression balance between effector and regulatory T cells predicts the clinical efficacy of PD-1 blockade therapies. *Nat Immunol*. 2020;21:1346–58.
225. deLeeuw RJ, Kost SE, Kakal JA, Nelson BH. The Prognostic Value of FoxP3⁺ Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Cancer: A Critical Review of the Literature. *Clinical Cancer Research*. 2012;18:3022–9.
226. Shang B, Liu Y, Jiang S, Liu Y. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3⁺ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2015;5:15179.
227. Ahmed H, Mahmud AR, Siddiquee MohdF-R-, Shahriar A, Biswas P, Shimul MdEK, et al. Role of T cells in cancer immunotherapy: Opportunities and challenges. *Cancer Pathog Ther*. 2022;1:116–26.
228. Ribas A, Shin DS, Zaretsky J, Frederiksen J, Cornish A, Avramis E, et al. PD-1 blockade expands intratumoral T memory cells. *Cancer Immunol Res*. 2016;4:194–203.
229. Weber R, Fleming V, Hu X, Nagibin V, Groth C, Altevogt P, et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells Hinder the Anti-Cancer Activity of Immune Checkpoint Inhibitors. *Front Immunol*. 2018;9:1310.

230. Tesi RJ. MDSC; the Most Important Cell You Have Never Heard Of. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2019;40:4–7.
231. Barisas DAG, Choi K. Extramedullary hematopoiesis in cancer. *Exp Mol Med*. 2024;1–10.
232. Wu C, Ning H, Liu M, Lin J, Luo S, Zhu W, et al. Spleen mediates a distinct hematopoietic progenitor response supporting tumor-promoting myelopoiesis. *J Clin Invest*. 128:3425–38.
233. Weide, Benjamin, Martens, Alexander, Zelba, Henning. Myeloid-Derived Suppressor Cells Predict Survival of Patients with Advanced Melanoma: Comparison with Regulatory T Cells and NY-ESO-1- or Melan-A–Specific T Cells | *Clinical Cancer Research* | American Association for Cancer Research [Internet]. [cited 2024 Mar 17]. Available from: <https://aacrjournals.org/clinccancerres/article/20/6/1601/212176/Myeloid-Derived-Suppressor-Cells-Predict-Survival>
234. Genova C, Dellepiane C, Carrega P, Sommariva S, Ferlazzo G, Pronzato P, et al. Therapeutic Implications of Tumor Microenvironment in Lung Cancer: Focus on Immune Checkpoint Blockade. *Front Immunol*. 2022;12:799455.
235. Weber R, Groth C, Lasser S, Arkhypov I, Petrova V, Altevogt P, et al. IL-6 as a major regulator of MDSC activity and possible target for cancer immunotherapy. *Cellular Immunology*. 2021;359:104254.
236. Xu M, Zhao Z, Song J, Lan X, Lu S, Chen M, et al. Interactions between interleukin-6 and myeloid-derived suppressor cells drive the chemoresistant phenotype of hepatocellular cancer. *Experimental Cell Research*. 2017;351:142–9.
237. Mace TA, Shakya R, Pitarresi JR, Swanson B, McQuinn CW, Loftus S, et al. IL-6 and PD-L1 antibody blockade combination therapy reduces tumor progression in murine models of pancreatic cancer. *Gut*. 2018;67:320–32.
238. Liu C, Yang L, Xu H, Zheng S, Wang Z, Wang S, et al. Systematic analysis of IL-6 as a predictive biomarker and desensitizer of immunotherapy responses in patients with non-small cell lung cancer. *BMC Med*. 2022;20:187.
239. Li J, Xu J, Yan X, Jin K, Li W, Zhang R. Targeting Interleukin-6 (IL-6) Sensitizes Anti-PD-L1 Treatment in a Colorectal Cancer Preclinical Model. *Med Sci Monit*. 2018;24:5501–8.
240. Du Four S, Maenhout SK, Niclou SP, Thielemans K, Neyns B, Aerts JL. Combined VEGFR and CTLA-4 blockade increases the antigen-presenting function of intratumoral DCs and reduces the suppressive capacity of intratumoral MDSCs. *Am J Cancer Res*. 2016;6:2514–31.
241. Holmgaard RB, Zamarin D, Lesokhin A, Merghoub T, Wolchok JD. Targeting myeloid-derived suppressor cells with colony stimulating factor-1 receptor blockade can reverse immune resistance to immunotherapy in indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing tumors. *EBioMedicine*. 2016;6:50–8.
242. Tobin RP, Jordan KR, Robinson WA, Davis D, Borges VF, Gonzalez R, et al. Targeting myeloid-derived suppressor cells using all-trans retinoic acid in melanoma patients treated with Ipilimumab. *Int Immunopharmacol*. 2018;63:282–91.
243. Han L, Chen Y, Huang N, Zhou X, Lv Y, Li H, et al. Cancer-educated neutrophils promote lung cancer progression via PARP-1-ALOX5-mediated MMP-9 expression. *Cancer Biol Med*. 2024;21:175–92.
244. Omstead AN, Paskewicz M, Gorbunova A, Zheng P, Salvitti MS, Mansoor R, et al. CSF-1R inhibitor, pexidartinib, sensitizes esophageal adenocarcinoma to PD-1 immune checkpoint blockade in a rat model. *Carcinogenesis*. 2022;43:842–50.
245. Zhu Y, Yang J, Xu D, Gao X-M, Zhang Z, Hsu JL, et al. Disruption of tumour-associated macrophage trafficking by the osteopontin-induced colony-stimulating factor-1 signalling sensitises hepatocellular carcinoma to anti-PD-L1 blockade. *Gut*. 2019;68:1653–66.
246. Chen T-W, Hung W-Z, Chiang S-F, Chen WT-L, Ke T-W, Liang J-A, et al. Dual inhibition of TGFβ signaling and CSF1/CSF1R reprograms tumor-infiltrating macrophages and improves response to chemotherapy via suppressing PD-L1. *Cancer Letters*. 2022;543:215795.
247. Kamga PT, Mayenga M, Sebane L, Costantini A, Julie C, Capron C, et al. Colony stimulating factor-1 (CSF-1) signalling is predictive of response to immune checkpoint inhibitors in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* [Internet]. 2024 [cited 2024 Mar 17];188. Available from: [https://www.lungcancerjournal.info/article/S0169-5002\(23\)00985-6/fulltext](https://www.lungcancerjournal.info/article/S0169-5002(23)00985-6/fulltext)
248. IJMS | Free Full-Text | The Transcription Factor TCF1 in T Cell Differentiation and Aging [Internet]. [cited 2024 Mar 18]. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/18/6497>
249. Wnt/beta-catenin pathway: modulating anticancer immune response | *Journal of Hematology*

- & Oncology | Full Text [Internet]. [cited 2024 Mar 18]. Available from: <https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-017-0471-6>
250. Quandt J, Arnovitz S, Haghi L, Woehlk J, Mohsin A, Okoreeh M, et al. Wnt- β -catenin activation epigenetically reprograms Treg cells in inflammatory bowel disease and dysplastic progression. *Nat Immunol*. 2021;22:471–84.
 251. Keerthivasan S, Aghajani K, Dose M, Molinero L, Khan MW, Venkatesvaran V, et al. Wnt/ β -catenin signaling in T-cells drives epigenetic imprinting of pro-inflammatory properties and promotes colitis and colon cancer. *Sci Transl Med*. 2014;6:225ra28.
 252. Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8:a021873.
 253. Santana-de Anda K, Gómez-Martín D, Díaz-Zamudio M, Alcocer-Varela J. Interferon regulatory factors: Beyond the antiviral response and their link to the development of autoimmune pathology. *Autoimmunity Reviews*. 2011;11:98–103.
 254. Couzinet A, Tamura K, Chen H, Nishimura K, Wang Z, Morishita Y, et al. A cell-type-specific requirement for IFN regulatory factor 5 (IRF5) in Fas-induced apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105:2556–61.
 255. Hu G, Barnes BJ. Interferon regulatory factor-5-regulated pathways as a target for colorectal cancer therapeutics. *Expert Review of Anticancer Therapy*. 2006;6:775–84.
 256. Sio A, Chehal MK, Tsai K, Fan X, Roberts ME, Nelson BH, et al. Dysregulated Hematopoiesis Caused by Mammary Cancer Is Associated with Epigenetic Changes and Hox Gene Expression in Hematopoietic Cells. *Cancer Research*. 2013;73:5892–904.
 257. Gvirtzman R, Livovsky DM, Tahover E, Goldin E, Koslowsky B. Anemia can predict the prognosis of colorectal cancer in the pre-operative stage: a retrospective analysis. *World Journal of Surgical Oncology* [Internet]. 2021 [cited 2024 Mar 29];19. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8653538/>
 258. Hurter B. Cancer-Related Anemia: Clinical Review and Management Update. Number 3 / June 2007. 2007;11:349–59.
 259. Vaupel P, Mayer A. Hypoxia and anemia: effects on tumor biology and treatment resistance. *Transfusion Clinique et Biologique*. 2005;12:5–10.
 260. Pylayeva-Gupta Y, Lee KE, Hajdu CH, Miller G, Bar-Sagi D. Oncogenic Kras-Induced GM-CSF Production Promotes the Development of Pancreatic Neoplasia. *Cancer Cell*. 2012;21:836–47.
 261. Mao Y, Eissler N, Blanc KL, Johnsen JI, Kogner P, Kiessling R. Targeting Suppressive Myeloid Cells Potentiates Checkpoint Inhibitors to Control Spontaneous Neuroblastoma. *Clinical Cancer Research*. 2016;22:3849–59.
 262. Valero JG, Matas-Céspedes A, Arenas F, Rodriguez V, Carreras J, Serrat N, et al. The receptor of the colony-stimulating factor-1 (CSF-1R) is a novel prognostic factor and therapeutic target in follicular lymphoma. *Leukemia*. 2021;35:2635–49.
 263. Riaz N, Burugu S, Cheng AS, Leung SCY, Gao D, Nielsen TO. Prognostic Significance of CSF-1R Expression in Early Invasive Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021;13:5769.
 264. IRF8 - an overview | ScienceDirect Topics [Internet]. [cited 2024 Apr 11]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/irf8>
 265. Stewart TJ, Greeneltch KM, Reid JE, Liewehr DJ, Steinberg SM, Liu K, et al. Interferon regulatory factor-8 modulates the development of tumour-induced CD11b+Gr-1+ myeloid cells. *J Cell Mol Med*. 2009;13:3939–50.
 266. Karin N. CXCR3 Ligands in Cancer and Autoimmunity, Chemoattraction of Effector T Cells, and Beyond. *Front Immunol*. 2020;11:976.
 267. Groom JR, Luster AD. CXCR3 in T cell function. *Exp Cell Res*. 2011;317:620–31.
 268. Die menschlichen Immunzellen [Internet]. Immunologie für Jedermann. 2017 [cited 2024 Apr 21]. Available from: <https://das-immunsystem.de/wissenswertes/die-menschlichen-immunzellen/>
 269. Abrams SI, Netherby CS, Twum DYF, Messmer MN. Relevance of Interferon Regulatory Factor-8 Expression in Myeloid–Tumor Interactions. *J Interferon Cytokine Res*. 2016;36:442–53.
 270. Netherby CS, Messmer MN, Burkard-Mandel L, Colligan S, Miller A, Gomez EC, et al. The Granulocyte Progenitor Stage is a Key Target of IRF8-Mediated Regulation of Myeloid-Derived Suppressor Cell Production. *J Immunol*. 2017;198:4129–39.
 271. Waight JD, Hu Q, Miller A, Liu S, Abrams SI. Tumor-Derived G-CSF Facilitates Neoplastic Growth through a Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cell-Dependent Mechanism. *PLOS*

ONE. 2011;6:e27690.

272. He K, Liu X, Hoffman RD, Shi R-Z, Lv G-Y, Gao J-L. G-CSF/GM-CSF-induced hematopoietic dysregulation in the progression of solid tumors. *FEBS Open Bio*. 2022;12:1268–85.

273. Park S, Kim E-S, Noh D-Y, Hwang K-T, Moon A. H-Ras-specific upregulation of granulocyte colony-stimulating factor promotes human breast cell invasion via matrix metalloproteinase-2. *Cytokine*. 2011;55:126–33.

274. Gomez-Roca, Carlos. Anti-CSF-1R emactuzumab in combination with anti-PD-L1 atezolizumab in advanced solid tumor patients naïve or experienced for immune checkpoint blockade | *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* [Internet]. [cited 2024 Apr 24]. Available from: <https://jitr.bmj.com/content/10/5/e004076>

275. Arcasoy MO. Erythropoiesis-Stimulating Agent Use in Cancer: Preclinical and Clinical Perspectives. *Clinical Cancer Research*. 2008;14:4685–90.

276. Hedley BD, Allan AL, Xenocostas A. The Role of Erythropoietin and Erythropoiesis-Stimulating Agents in Tumor Progression. *Clinical Cancer Research*. 2011;17:6373–80.

277. O’Kane GM, Lyons TG, Collieran GC, Ahmad MW, Alken S, Kavanagh EC, et al. Late-Onset Paraplegia after Complete Response to Two Cycles of Ipilimumab for Metastatic Melanoma. *Oncology Research and Treatment*. 2014;37:757–60.

278. Feng Y, Li C, Ji Y, Liu Y, Gan L, Yu Y, et al. Nivolumab Combined With Ipilimumab Treatment Induced Hypophysitis and Immune-Mediated Liver Injury in Advanced Esophageal Squamous Cell Carcinoma: A Case Report. *Front Oncol*. 2022;12:801924.

279. Shitara K, Van Cutsem E, Bang Y-J, Fuchs C, Wyrwicz L, Lee K-W, et al. Efficacy and Safety of Pembrolizumab or Pembrolizumab Plus Chemotherapy vs Chemotherapy Alone for Patients With First-line, Advanced Gastric Cancer. *JAMA Oncol*. 2020;6:1–10.

280. Chao J, Fuchs CS, Shitara K, Tabernero J, Muro K, Van Cutsem E, et al. Assessment of Pembrolizumab Therapy for the Treatment of Microsatellite Instability–High Gastric or Gastroesophageal Junction Cancer Among Patients in the KEYNOTE-059, KEYNOTE-061, and KEYNOTE-062 Clinical Trials. *JAMA Oncol*. 2021;7:895–902.

281. Jover R, Zapater P, Castells A, Llor X, Andreu M, Cubiella J, et al. The efficacy of adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil in colorectal cancer depends on the mismatch repair status. *Eur J Cancer*. 2009;45:365–73.

282. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, et al. Tumor Microsatellite-Instability Status as a Predictor of Benefit from Fluorouracil-Based Adjuvant Chemotherapy for Colon Cancer. *N Engl J Med*. 2003;349:247–57.

283. McGrail DJ, Pilié PG, Rashid NU, Voorwerk L, Slagter M, Kok M, et al. High tumor mutation burden fails to predict immune checkpoint blockade response across all cancer types. *Ann Oncol*. 2021;S0923-7534(21)00123-X.

284. Manson G, Norwood J, Marabelle A, Kohrt H, Houot R. Biomarkers associated with checkpoint inhibitors. *Annals of Oncology*. 2016;27:1199–206.

285. Ricciuti B, Wang X, Alessi JV, Rizvi H, Mahadevan NR, Li YY, et al. Association of High Tumor Mutation Burden in Non–Small Cell Lung Cancers With Increased Immune Infiltration and Improved Clinical Outcomes of PD-L1 Blockade Across PD-L1 Expression Levels. *JAMA Oncol*. 2022;8:1160–8.

286. Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJM, Robert L, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*. 2014;515:568–71.

287. Bortolomeazzi M, Keddar MR, Montorsi L, Acha-Sagredo A, Benedetti L, Temelkovski D, et al. Immunogenomics of Colorectal Cancer Response to Checkpoint Blockade: Analysis of the KEYNOTE 177 Trial and Validation Cohorts. *Gastroenterology*. 2021;161:1179–93.

288. Herbst RS, Soria J-C, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*. 2014;515:563–7.

289. Inamura K. Roles of microbiota in response to cancer immunotherapy. *Seminars in Cancer Biology*. 2020;65:164–75.

290. Sivan A, Corrales L, Hubert N, Williams JB, Aquino-Michaels K, Earley ZM, et al. Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science*. 2015;350:1084–9.

291. Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, Reuben A, Andrews MC, Karpinets TV, et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science*. 2018;359:97–103.

292. Matson V, Fessler J, Bao R, Chongsawat T, Zha Y, Alegre M-L, et al. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science*. 2018;359:104–8.
293. Shen R, Postow MA, Adamow M, Arora A, Hannum M, Maher C, et al. LAG-3 expression on peripheral blood cells identifies patients with poorer outcomes after immune checkpoint blockade. *Sci Transl Med*. 2021;13:eabf5107.
294. Lee K, Tosti E, Edelmann W. Mouse models of DNA mismatch repair in cancer research. *DNA Repair*. 2016;38:140–6.
295. Salem ME, Bodor JN, Puccini A, Xiu J, Goldberg RM, Grothey A, et al. Relationship between MLH1, PMS2, MSH2 and MSH6 gene-specific alterations and tumor mutational burden in 1057 microsatellite instability-high solid tumors. *Int J Cancer*. 2020;147:2948–56.
296. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 SYSTEM OF T CELL COSTIMULATION. *Annual Review of Immunology*. 1996;14:233–58.
297. Mestas J, Hughes CCW. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *The Journal of Immunology*. 2004;172:2731–8.
298. Doeing DC, Borowicz JL, Crockett ET. Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods. *BMC Clin Pathol*. 2003;3:3.
299. 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;4:88.
300. Beura LK, Hamilton SE, Bi K, Schenkel JM, Odumade OA, Casey KA, et al. Recapitulating adult human immune traits in laboratory mice by normalizing environment. *Nature*. 2016;532:512–6.
301. Shi N, Li N, Duan X, Niu H. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. *Mil Med Res*. 2017;4:14.
302. Specific Pathogen-Free Animals for Civilian and Military Tra... : Shock [Internet]. [cited 2024 Apr 28]. Available from: https://journals.lww.com/shockjournal/fulltext/2020/08000/specific_pathogen_free_animals_for_civilian_and.13.aspx
303. Xu X, Lv J, Guo F, Li J, Jia Y, Jiang D, et al. Gut Microbiome Influences the Efficacy of PD-1 Antibody Immunotherapy on MSS-Type Colorectal Cancer via Metabolic Pathway. *Front Microbiol*. 2020;11:814.
304. Vétizou M, Pitt JM, Daillère R, Lepage P, Waldschmitt N, Flament C, et al. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science*. 2015;350:1079–84.

IX. ANHANG

9.1 ABKÜRZUNGEN

¹⁸F-FDG ¹⁸F-2-Fluor-2-desoxy-D-glucose

Agr2 Anterior gradient-2

Alox5 Arachidonate 5-lipoxygenase

AK Antikörper

BSA bovines Serumalbumin

CLP *common lymphoid progenitor*

CMP *common myeloid progenitor*

CRC *colorectal cancer*

Csf colony stimulating factor

CTLA-4 *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*

dMMR DNA-Mismatch-Reparatur-Defizienz

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA *desoxyribonucleic acid*

EDMC *erythroid derived myeloid cell*

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure

Egr Early growth response protein

EMH extramedulläre Hämatopoese

EMT epithelial mesenchymale Transition

FACS™ *fluorescence activated cell sorting*

FAP familiäre adenomatöse Polyposis

FDA *Food and Drug Administration*

FKS fetales Kälberserum

GM-CSF *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

KG Körpergewicht

ICI Immuncheckpoint-Inhibition

IDL *insertion deletion loop*

IL Interleukin

ILP *innate lymphoid progenitor*

IRF Interferon Regulatory factor

i.p. intraperitoneal

LAG-3 *lymphocyte activation gene 3*

LS Lynch-Syndrom

LT-HSC *long-term hematopoietic stem cell*

MDSC *myeloid derived suppressor cell*
MHC *major histocompatibility complex*
min Minuten
MLH MutL Homolog
MMR DNA-Mismatch-Reparatur
MPP *multipotent progenitor*
MSH MutS Homolog
MSI Mikrosatelliteninstabilität
MSI-H Mikrosatelliteninstabilität *high-frequency*
MSI-L Mikrosatelliteninstabilität *low-frequency*
MSS Mikrosatellitenstabilität
NK-Zelle natürliche Killerzelle
NSCLC *non small cell lung cancer*
PBS *phosphate buffered saline*
PCNA *proliferating cell nuclear antigen*
PCR *polymerase chain reaction*
PD-1 *programmed cell death 1*
PD-L1 *programmed cell death-ligand 1*
PET / CT Positronen-Emissionen-Tomographie / Computertomographie
PFA Paraformaldehyd
RT Raumtemperatur
SD *standard deviation*
ST-HSC *short-term hematopoietic stem cell*
STR *short tandem repeats*
SUV *standardized uptake value*
TAM tumorassoziierte Makrophagen
TAN tumorassoziierte Neutrophile
Tcf *T cell factor*
 T_{CM} *central memory T cell*
 T_{EM} *effector memory T cell*
TGF- β *transforming growth factor β*
TIL tumorinfiltrierende Lymphozyten
TME *tumor microenvironment*
TMB *tumor mutational burden*
Tregs regulatorische T-Zellen

9.2 ANTIKÖRPER

TABELLE 12: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN ANTIKÖRPER

ANTIGEN	LABEL	SPEZIFITÄT	KLON	HERSTELLER
CD16/32 (TrueStain FcX™ Plus)		mouse		BioLegend
Gr.1	Alexa Fluor700	mouse	RB6-8C5	BioLegend
CD8	FITC	mouse	53-6.7	BioLegend
CD4	APC Fire	mouse	GK1.5	BioLegend
CD11b	BV570	mouse	M1/70	BioLegend
CD274	BV421	mouse	10F.9G2	BioLegend
NK1.1	BV650	mouse	PK136	BioLegend
CD25	PerCP-eFluor710	mouse	PC61.5	BioLegend
CD62L	BV785	mouse	MEL-14	BioLegend
CD152	PE	mouse	UC10-4B9	BioLegend
CD83	BV750	mouse	Michel-19	BD Bioscience
CD366	PE/Dazzle594™	mouse	B8.2C12	BioLegend
CD279	BV650	mouse	RMP1-30	BD Bioscience
CCR7	PE	mouse	4B12	BioLegend
CD44	BV711	mouse	IM7	BioLegend
CD19	Spark Blue	mouse	6D5	BioLegend
CD223	BV480	mouse	T47-530	BD Bioscience
CD3	PerCP	mouse	145-2C11	BioLegend
Foxp3	Alexa Fluor™ 647	mouse	MF-14	BioLegend
CD34	Brilliant Violet 421™	mouse	MEC14.7	BioLegend
Lineage Cocktail with Isotype Ctrl	Pacific Blue™	mouse		BioLegend
CD127	Brilliant Violet 510™	mouse	A7R34	BioLegend
CD90.2	Brilliant Violet 605™	mouse	52-2.1	BioLegend

Ly-6A	Brilliant Violet 711™	mouse	D7	BioLegend
CD117	Brilliant Violet 785™	mouse	ACK2	BioLegend
CD123	PE	mouse	5B11	BioLegend
CD71	PE/Dazzle™ 594	mouse	CY1G4	BioLegend
CD38	PE/Fire™ 640	mouse	90	BioLegend
CD150	PE/Cyanine5	mouse	TC15-12F12.2	BioLegend
CD41	PE/Cy7	mouse	MWReg30	BioLegend
CD279	PE/Fire 810	mouse	29F.1A12	BioLegend
MCP-1	APC	mouse	2H5	BioLegend
CD115	Alexa Fluor® 647	mouse	CSF-1R	BioLegend
CD63	APC/Cy7	mouse	NVG-2	BioLegend
CXCR1	APC/Fire™ 810	mouse	SA011F11	BioLegend
CD48	Vio® Bright B515, REAfinity™	mouse	REA1238	Miltenyi Biotec
CXCL12	FITC	mouse	79018	eBioscience (ThermoFisher)
IRF8	PerCP-eFluor 710	mouse	V3GYWCH	eBioscience (ThermoFisher)
CD170	Alexa Fluor™ 700	mouse	1RNM44N	eBioscience (ThermoFisher)
Gr.1	Alexa Fluor™ 594	mouse	RB6-8C5	BioLegend
CD206	Alexa Fluor™ 488	mouse	C068C2	BioLegend
F4/80	Alexa Fluor™ 594	mouse	BM8	BioLegend
CD11b	Alexa Fluor™ 488	mouse/human	M1/70	BioLegend
CD163	Alexa Fluor™ 647	mouse	S15049I	BioLegend
CD274	PE	mouse	10F.9G2	BioLegend
Zombie NIR™				BioLegend

IRF5	unkonjugiert			Invitroen
CD3	Alexa Fluor™ 488	mouse	C068C2	BioLegend
CD4	Alexa Fluor™ 594	mouse	GK1.5	BioLegend
CD8	Alexa Fluor™ 647	mouse	53-6.7	BioLegend
IgG (sekundärer AK: Donkey anti-Rabbit IgG (H+L))	Alexa Fluor™ 647	mouse		Invitrogen
IgG (sekundärer AK: Donkey anti-Rabbit)	FITC	rabbit	Poly4064	BioLegend
CD279 (PD1)	FITC	mouse	4F12	BioLegend

9.3 TAQMAN™ ASSAYS UND PRIMER

TABELLE 13: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN TAQMAN™-ASSAYS

TAQMAN™ ASSAY	GEN	
6-FAM-3'BHQ-1	<i>Mxd4</i>	(Mm00487523_m1)
6-FAM-3'BHQ-1	<i>cMyc</i>	(Mm00487804_m1)
5-VIC-3'BHQ-1	<i>Agr2</i>	(Mm01 291804_m1)
6-FAM-3'BHQ-1	<i>Tgfβ-1</i>	(Mm01178820_m1)
6-FAM-3'BHQ-1	<i>Vimentin</i>	(Mm01333430_m1)
5-VIC-3'BHQ1	<i>N-Cadherin</i>	(Mm01162497_m1)
6-FAM-3'BHQ-1	<i>Fpr2</i>	(Mm00484464_s1)
5-VIC-3'BHQ-1	<i>Csf1</i>	(Mm00432686_m1)
6-FAM-3'BHQ-1	<i>Csf2</i>	(Mm01290062_m1)
5-VIC-3'BHQ-1	<i>Tcf1/Pcbd2</i>	(Mm01342270_m1)
6-FAM-3'BHQ-1	<i>Alox5</i>	(Mm01182747_m1)

TABELLE 14: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN PRIMER

GEN		PRIMER-SEQUENZ (5'-3')
GAPDH	5' HEX - 3' BHQ-1	TGCCATCAATGACCCCTTCATTG
GAPDH	for	TCACCAGGGCTGCTTTTAAC
GAPDH	rev	GGGTGGAATCATATTGGAACA

1. Ca. 4-5 % aller kolorektalen Karzinome entstehen aufgrund einer Keimbahnmutation. Das Lynch Syndrom ist hierbei das häufigste erbliche Tumorprädispositionssyndrom. Molekular ursächlich sind Mutationen im DNA Mismatch Reparatur (MMR) System.
2. Das $Msh2^{loxP/loxP;TgTg(Vil1-cre)}$ -knockout Mausmodell stellt ein sehr gutes präklinisches Modell für das Lynch Syndrom dar.
3. Tumoren, die aufgrund von MMR-Defizienz (dMMR) entstehen, sind hochimmunogen und besonders gut für eine Immuncheckpoint-Blockade geeignet.
4. Im $Msh2^{loxP/loxP;TgTg(Vil1-cre)}$ -knockout Mausmodell verlängern Immuncheckpoint-Inhibitoren, die gegen PD1 und LAG-3 gerichtet sind, signifikant das Gesamtüberleben und induzieren eine verstärkte antitumorale Immunantwort.
5. Die LAG-3-Blockade ist der PD1-Blockade hinsichtlich des Gesamtüberlebens im $Msh2^{loxP/loxP;TgTg(Vil1-cre)}$ -knockout Mausmodell leicht überlegen.
6. Tumoren, die aufgrund von dMMR entstehen, rekrutieren unreife myeloide Vorläuferzellen, die sich zu einem immunsuppressiven Phänotyp differenzieren und das Tumorwachstum fördern.
7. Die Tumorprogression bei soliden Tumoren geht mit einer Umprogrammierung zugunsten der Myelopoese einher und führt zur Knochenmarkinsuffizienz.
8. Die Immuncheckpoint-Blockade kann der Knochenmarkinsuffizienz im $Msh2^{loxP/loxP;TgTg(Vil1-cre)}$ -knockout Mausmodell teilweise entgegenwirken und führt zu einer Re-Balancierung zwischen lymphoiden und myeloiden Vorläuferzellen, besonders nach LAG-3-Inhibition.
9. Perspektivisch stellt die LAG-3-Blockade eine geeignete Therapieoption dar, um dMMR-assoziierte Tumoren zu behandeln und ist möglicherweise der bereits etablierten PD1-Inhibition überlegen.
10. Die Kombination zweier Immuncheckpoint-Inhibitoren führt potenziell zu stärkeren immunvermittelten Nebenwirkungen, aber möglicherweise auch zu besseren Therapieergebnissen und sollte in zukünftigen Studien in Erwägung gezogen werden.

9.5 DANKSAGUNG

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

Mein größter und tiefster Dank geht an Frau PD Dr. rer. nat. C. Maletzki für die einzigartige und beste Betreuung, die ich mir je hätte vorstellen können. Von Beginn an hat sie mir stets ein Gefühl von Herzlichkeit, Wertschätzung und Sicherheit vermittelt und hat jederzeit für Fragen, Sorgen und Probleme ein offenes Ohr. Ich habe unbeschreiblich viel von ihr lernen dürfen und sehr von ihren fachlichen Kompetenzen profitiert. Ich bedanke mich sehr für die Möglichkeiten, die sie mir offenbarte, sowie für ihre Zuversicht und ihr stetiges Vertrauen in mich. Die vielen schönen Gespräche mit ihr bereicherten meine Zeit im Labor sehr. Sie war immer für mich da und hat jederzeit an mich geglaubt, selbst dann, wenn ich es nicht tat. Neben den vielen laborbezogenen Fähigkeiten konnte ich so viele weitere Kompetenzen durch die Zusammenarbeit mit ihr erwerben, die mich in meinem beruflichen sowie privaten Werdegang sehr vorangebracht haben. Dies werde ich nie vergessen.

Ich danke Frau Univ.-Prof. Dr. med. B. Vollmar für die Möglichkeit, am Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie arbeiten zu dürfen, Frau Ilona Klamfuß für die Aufzucht der Mäuse, sowie dem Team der *core facility* multimodale Kleintierbildung.

Ein besonderes Dankeschön geht an das wunderbare Laborteam, mit dem ich die zwei schönen Jahre zusammenarbeiten durfte. Frau Dr. rer. nat. I. Salewski danke ich sehr für die umfassende Einarbeitung in die Laborarbeit. Sie hat sich immer die nötige Zeit genommen, alle meine Fragen beantwortet und mir auch in meinen panischen Momenten stets Ruhe vermittelt und geholfen. Auch Leonie danke ich sehr für die herzliche Aufnahme in das Projekt. Sie war immer zur Stelle und nur einen Anruf bei Sorgen entfernt. Julia, Annika, Annabell, Thomas und Friederike machten das beste Team komplett und haben die Laborzeit mit vielen schönen Gesprächen und Momenten gesegnet, die auch weit über die Laborwände hinausgingen.

Und nun zu der größten Unterstützung meiner Laufbahn: An erster Stelle steht mein Freund Jannis, der mir jederzeit zur Seite steht und immer versucht, mir all meine Wünsche zu erfüllen. So viele meiner Krisenphasen hat er miterleben müssen und sie stets mit seiner toleranten und ausgeglichenen Art abgepuffert, mich jederzeit wieder aufgebaut und wirklich immer an mich geglaubt. Ohne ihn hätte ich das nicht geschafft. Ich kann ihm gar nicht genug dafür danken. (Ein großes Plus ist übrigens auch sein Know-how bzgl. Computer und Technik.) Ein großes Dankeschön geht auch an meine großartigen „Mensamädels“ Alina, Becci, Delia, Jojo, Marie und Toni, die mich seit dem ersten Tag an der Uni begleitet und diese Zeit zu einer ganz besonderen gemacht haben. Toni danke ich sehr für ihre empathische Art, ihr stetiges Bemü-

hen, dass sich jeder wohlfühlt und für unsere zahlreichen tiefgreifenden Gespräche. Ihre zwischenmenschlichen Fähigkeiten sind einzigartig. Ein besonderer Dank geht an Christa, die diese Arbeit sehr vorangetrieben hat. Angefangen bei dem „Doktorarbeits-Bootcamp“, bis hin zu unseren unzähligen Laufrunden, die für mich sowohl körperlich als auch emotional eine große Bereicherung darstellen. Sie weiß genau, wann ich einen kleinen Antriebs-Tritt brauche oder eine dicke „Alles-wird-gut“-Umarmung. Nicht zu vergessen: Bolli, der mir mit Abstand die meiste Gesellschaft beim Schreiben dieser Arbeit geleistet hat. Und nun, das Beste zum Schluss. Ein riesengroßes Dankeschön geht an meine Mama und meine Oma Lisa, die mich mein ganzes Leben immer unterstützt haben und dies alles erst ermöglichten. Jederzeit werde ich zu Hause mit offenen Armen empfangen und sie sind immer für mich da.

9.6 ANMERKUNGEN

In dieser Arbeit wird aus Gründen der besseren Lesbarkeit das generische Maskulinum verwendet. Weibliche und anderweitige Geschlechteridentitäten werden dabei ausdrücklich mitgemeint, soweit es für die Aussage erforderlich ist.