

Aus der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Identifikation und Charakterisierung immunologisch reaktiver Zellpopulationen
bei Patienten mit kolorektalem Karzinom während der Immunisierung mit L-
BLP25 (LICC-Studie)**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Lisa Keiber
aus Landau in der Pfalz

Trier, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. U. Förstermann

1. Gutachter: Prof. Dr. med. M. Munder

2. Gutachter: Prof. Dr. M. Möhler

Tag der Promotion: 04. Mai 2023

Für meine Eltern und meine Schwester

Inhalt

Tabellenverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1 Einleitung	1
2 Literaturdiskussion	5
2.1 Epidemiologie des KRK.....	5
2.2 Pathogenese des KRK.....	6
2.3 Hereditäre Formen des KRK	10
2.4 Risikofaktoren des KRK	10
2.5 Makroskopie.....	11
2.6 Histologie	12
2.7 Stadieneinteilung des KRK.....	13
2.8 Klinik des KRK	14
2.9 Diagnostik und Screening	15
2.10 Therapie des KRK.....	16
2.11 Immunsystem.....	18
2.11.1 Immunsystem allgemein.....	18
2.11.2 Immunsystem und Tumorerkrankungen	20
2.11.3 Myeloische Suppressorzellen.....	24
2.11.4 T _{regs}	31
2.11.5 Strategien für immunologische Tumorthherapie	33
2.12 LICC (engl.: <i>L-BLP25 in colorectal cancer</i>)-Studie	35
2.12.1 L-BLP25.....	36
2.13 Immunmonitoring	39
2.14 Zielsetzung und Fragestellungen.....	40
3 Materialien und Methoden	41
3.1 Studiendesign und Ablauf.....	41
3.1.1 Studiendesign	41
3.1.2 Ethikkommission, Fallzahlplanung und Aufklärung.....	41
3.1.3 Ein- und Ausschlusskriterien	41
3.1.4 Studienablauf und Zielgrößen	44
3.2 Materialien	45
3.2.1 Antikörper für die Durchflusszytometrie	45
3.2.2 Geräte.....	46
3.2.3 Software.....	46

3.3	Methoden	46
3.3.1	Blutentnahme und Transport	46
3.3.2	Ficoll-Separation	46
3.3.3	Durchflusszytometrie (<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> , FACS)	47
3.3.4	Statistik	47
4	Ergebnisse	49
4.1	Patientenkollektiv	49
4.2	FACS-Analysen.....	56
4.2.1	CD15 ⁺ <i>low density</i> PMN und CD10 ⁺ CD15 ⁺ <i>low density</i> PMN	57
4.2.2	CD10 ⁺ CD15 ⁺ PMN-MDSCs	59
4.2.3	HLA-DR ⁺ CD14 ⁺ Monozyten und HLA-DR ⁻ CD14 ⁺ M-MDSCs.....	61
4.2.4	CD3 ⁺ T-Lymphozyten	64
4.2.5	CD28 ⁺ CD4 ⁺ und CD28 ⁻ CD8 ⁺ T-Zellen.....	65
4.2.6	CD45RA ⁺ und CD45RO ⁺ T-Zellen	67
4.2.7	CD4 ⁺ CD25 ⁺⁺ CD127 ^{+/-} T _{regs}	72
4.3	Korrelationen.....	75
4.3.1	CD10 ⁺ CD15 ⁺ <i>low density</i> PMN und CD3 ⁺ T-Lymphozyten	75
4.3.2	CD10 ⁺ CD15 ⁺ <i>low density</i> PMN und CD45RO ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen	76
4.3.3	PMN-MDSCs und T _{regs}	76
4.3.4	CD28 ⁻ , CD45RO ⁺ und CD45RA ⁺ T-Zellen.....	77
4.3.5	CD4 ⁺ CD25 ⁺⁺ CD127 ^{+/-} T _{regs} und HLA-DR ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen	78
4.4	Gesamtüberleben.....	79
4.4.1	CD28 ⁺ HLA-DR ⁺ CD4 ⁺ , CD28 ⁻ CD8 ⁺ und CD28 ⁻ HLA-DR ⁻ CD8 ⁺ T-Zellen.....	79
4.4.2	HLA-DR ⁻ CD14 ⁺ M-MDSCs	80
4.4.3	CD3 ⁺ T-Lymphozyten	80
4.4.4	CD45RA ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen und CD45RO ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen	80
4.5	Rezidivfreies Überleben	81
4.5.1	CD45RO ⁻ CD4 ⁺ , CD45RO ⁻ CD45RA ⁺ CD8 ⁺ und CD45RO ⁻ CD8 ⁺ T-Zellen	81
5	Diskussion.....	82
5.1	Patientenkollektiv	82
5.2	Verhalten ausgewählter immunologisch relevanter Zelltypen	83
5.2.1	Vakzinierung und Effektorzellen	86
5.2.2	Verhalten der immunologisch relevanten Zellen untereinander	88
5.3	Gesamtüberleben.....	88
5.4	Rezidivfreies Überleben	89
5.4.1	CD45RO ⁻ CD4 ⁺ , CD45RO ⁻ CD45RA ⁺ CD8 ⁺ und CD45RO ⁻ CD8 ⁺ T-Zellen	89

5.5	Schlussfolgerung und Ausblick.....	90
6	Zusammenfassung.....	92
7	Literaturverzeichnis	94
8	Anhang.....	109
9	Danksagung.....	115
10	Lebenslauf	116

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Epidemiologische Kennzahlen des KRK für Deutschland (31).	6
Tabelle 2: Die verschiedenen Karzinogenesewege des (sporadischen) KRK (modifiziert nach (43, 45)).	9
Tabelle 3: TNM-Klassifikation (66).	13
Tabelle 4: Stadieneinteilung des KRK nach TNM 2016 (66).	14
Tabelle 5: Zusammenfassung der Phänotypen von MDSCs (110, 115, 117).	26
Tabelle 6: Einschlusskriterien (die jeweils zu erfüllen sind).	41
Tabelle 7: Ausschlusskriterien.	42
Tabelle 8: ECOG Performance Status (217).	43
Tabelle 9: Kriterien des Fong-Scores (218).	44
Tabelle 10: Übersicht über die Altersverteilung des Studienkollektivs.	49
Tabelle 11: Übersicht über die Graduierung der KRK im Studienkollektiv.	53
Tabelle 12: Übersicht über die Anzahl der resezierten Lebermetastasen im Studienkollektiv.	55
Tabelle 13: Übersicht über die immunhistochemische MUC1-Expression im Studienkollektiv.	56
Tabelle 14: Korrelation zwischen CD10 ⁺ CD15 ⁺ low density PMN und CD3 ⁺ T-Lymphozyten.	76
Tabelle 15: Korrelation zwischen CD10 ⁺ CD15 ⁺ low density PMN und CD45RO ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen.	76
Tabelle 16: Korrelation zwischen CD10 ⁻ CD15 ⁺ PMN-MDSCs und CD4 ⁺ CD25 ⁺⁺ CD127 ^{-/+} T _{regs}	76
Tabelle 17: Korrelation zwischen CD28 ⁻ CD8 ⁺ T-Zellen und CD45RA ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen.	77
Tabelle 18: Korrelation zwischen CD28 ⁻ CD8 ⁺ T-Zellen und CD45RO ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen.	78
Tabelle 19: Korrelation zwischen CD28 ⁻ CD4 ⁺ T-Zellen und CD45RO ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen.	78
Tabelle 20: Korrelation zwischen CD4 ⁺ CD25 ⁺⁺ CD127 ^{-/+} T _{regs} und HLA-DR ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen. ..	78

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Altersstandardisierte Neuerkrankungsraten bösartiger, kolorektaler Neubildungen nach Lokalisation und Geschlecht, 1999-2018.....	5
Abbildung 2: Adenom-Karzinom-Sequenz (modifiziert nach dem Modell von Fearon und Vogelstein (37)).....	8
Abbildung 3: Häufigkeitsverteilung KRK im Kolorektum (modifiziert nach (56, 58)).....	11
Abbildung 4: Krebs- <i>Immunoediting</i> (modifiziert nach (105))	23
Abbildung 5: Kommunikation zwischen MDSCs und der Tumormikroumgebung.....	30
Abbildung 6: Funktionsmechanismen von T _{regs} (modifiziert nach (179)).....	33
Abbildung 7: L-BLP25 (190)	38
Abbildung 8: Graphische Darstellung der Fong-Score-Verteilung im Studienkollektiv (absolute Zahlen für das Gesamtkollektiv).....	50
Abbildung 9: Graphische Darstellung der Fong-Score-Verteilung im Studienkollektiv (prozentuale Verteilung für das Gesamtkollektiv).....	51
Abbildung 10: Lokalisationsverteilung der KRK im Vergleich beider Gruppen (modifiziert nach (58)).....	52
Abbildung 11: Graphische Darstellung der UICC-Stadien im Studienkollektiv (absolute Zahlen für das Gesamtkollektiv).....	54
Abbildung 12: Graphische Darstellung der UICC-Stadien im Studienkollektiv (prozentuale Verteilung für das Gesamtkollektiv).....	54
Abbildung 13: CD15 ⁺ <i>low density</i> PMN im zeitlichen Verlauf.....	57
Abbildung 14: CD15 ⁺ <i>low density</i> PMN im Mittel und im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe.....	57
Abbildung 15: CD10 ⁺ CD15 ⁺ <i>low density</i> PMN im zeitlichen Verlauf.....	58
Abbildung 16: CD10 ⁺ CD15 ⁺ <i>low density</i> PMN im Mittel und im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe.....	58
Abbildung 17: CD10 ⁺ CD15 ⁺ PMN-MDSCs im zeitlichen Verlauf.....	60
Abbildung 18: CD10 ⁺ CD15 ⁺ PMN-MDSCs im Mittel und im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe.....	61
Abbildung 19: HLA-DR ⁺ CD14 ⁺ Monozyten im zeitlichen Verlauf.....	62
Abbildung 20: HLA-DR ⁺ CD14 ⁺ Monozyten im Mittel und im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe.....	62
Abbildung 21: HLA-DR ⁺ CD14 ⁺ M-MDSCs im zeitlichen Verlauf.....	63
Abbildung 22: HLA-DR ⁺ CD14 ⁺ M-MDSCs im Mittel und im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe.....	63
Abbildung 23: CD3 ⁺ T-Lymphozyten im zeitlichen Verlauf.....	64
Abbildung 24: CD3 ⁺ T-Lymphozyten im Mittel und im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe.....	64
Abbildung 25: CD28 ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen im zeitlichen Verlauf.....	65
Abbildung 26: CD28 ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen im Mittel und im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe.....	65
Abbildung 27: CD28 ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen im zeitlichen Verlauf.....	66
Abbildung 28: CD28 ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen im Mittel und im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe.....	67
Abbildung 29: CD45RA ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen im zeitlichen Verlauf.....	68
Abbildung 30: CD45RA ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen im Mittel und im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe.....	68
Abbildung 31: CD45RA ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen im zeitlichen Verlauf.....	69
Abbildung 32: CD45RA ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen im Mittel und im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe.....	69

Abbildung 33: CD45RO ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen im zeitlichen Verlauf.....	70
Abbildung 34: CD45RO ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen im Mittel und im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L- BLP25- und Placebo-Gruppe.....	70
Abbildung 35: CD45RO ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen im zeitlichen Verlauf.....	71
Abbildung 36: CD45RO ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen im Mittel und im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L- BLP25- und Placebo-Gruppe.....	71
Abbildung 37: CD4 ⁺ CD25 ⁺⁺ CD127 ^{-/+} T _{regs} im zeitlichen Verlauf.....	73
Abbildung 38: CD4 ⁺ CD25 ⁺⁺ CD127 ^{-/+} T _{regs} im Mittel und im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe.	73
Abbildung 39: NLR im Mittel und im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo- Gruppe.....	74
Abbildung 40: Lymphozyten/Monozyten-Ratio im Mittel und im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe.....	75
Abbildung 41: Korrelation zwischen CD10 ⁻ CD15 ⁺ PMN-MDSCs und CD4 ⁺ CD25 ⁺⁺ CD127 ^{-/+} T _{regs} im zeitlichen Verlauf.	77
Abbildung 42: Korrelation zwischen CD28 ⁻ CD8 ⁺ T-Zellen und CD45RA ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen im zeitlichen Verlauf.....	77
Abbildung 43: Korrelation zwischen CD4 ⁺ CD25 ⁺⁺ CD127 ^{+/-} T _{regs} und HLA-DR ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen im zeitlichen Verlauf.....	79

Abkürzungsverzeichnis

APC	Adenomatous Polyposis coli
ARG I	Arginase I
BCG	<i>Bacille Calmette-Guérin</i>
BRAF	engl.: <i>rat fibrosarcoma Isoform B</i>
CAR	engl.: <i>chimeric antigen receptor</i>
CCL	CC-Chemokin-Ligand
CD	engl.: <i>cluster of differentiation</i>
CEA	carcino-embryonales Antigen
CIMP	CpG-Insel-Methylierungsphänotyp
COX2	Cyclooxygenase 2
CpG	5'-C-Phosphat-G-3'
c-Src	engl.: <i>cellular and sarcoma</i>
CT	Computertomographie
CTL	engl.: <i>cytotoxic T lymphocyte</i>
CTLA-4	engl.: <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4</i>
DAMP	engl.: <i>danger-associated molecular pattern</i>
DC	engl.: <i>dendritic cell</i>
DCC	engl.: <i>deleted in colorectal carcinoma</i>
DNA	engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i>
DNMT	DNA-Methyltransferase
DSMB	engl.: <i>Data Safety Monitoring Board</i>
ECOG	engl.: <i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EGFR	engl.: <i>epidermal growth factor receptor</i>
EPCs	engl.: <i>endothelial progenitor cells</i>
ERK	engl.: <i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis coli
FOBT	fäkaler okkultter Bluttest
FOXP3	engl.: <i>forkhead box protein 3</i>
G	Grading
G-CSF	engl.: <i>granulocyte-colony stimulating factor</i>

GM-CSF	engl.: <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
HBV	Hepatitis-B-Virus
HER2/neu	engl.: <i>human epidermal growth factor receptor 2/neuproteoncogene</i>
HIF1 α	engl.: <i>hypoxia-inducible factor-1α</i>
HIV	engl.: <i>human immunodeficiency virus</i>
HLA	humanes Leukozytenantigen
HMGB1	engl.: <i>high mobility group box 1</i>
hMLH1	engl.: <i>human mutL homolog 1</i>
HPV	humane Papillomaviren
HRAS	engl.: <i>Harvey rat sarcoma</i>
iDCs	engl.: <i>immature dendritic cells</i>
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IEN	intraepitheliale Neoplasie
IFN	Interferon
iFOBT	immunologischer fäkaler okkultter Bluttest
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iMC	engl.: <i>immature myeloid cells</i>
iNOS	induzierbare Nitritoxid-Synthetase
INR	engl.: <i>International Normalized Ratio</i>
IRF-8	engl.: <i>Interferon regulatory factor 8</i>
ITAM	engl.: <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
iT _{regs}	induzierte regulatorische T-Zellen
JAK	Janus-Kinase
KI	Konfidenzintervall
KRAS	engl.: <i>Kirsten rat sarcoma oncogene homolog (Vi-Ki-ras 2)</i>
KRK	kolorektales Karzinom
LAK	engl.: <i>lymphokine-activated killer</i>
M	monozytär
M2-PK	M2-Pyruvatkinase

MAC	engl.: <i>membrane attac complex</i>
mAK	monoklonaler Antikörper
MAP	MUTYH-assoziierte Polyposis
MAPK	engl.: <i>mitogen-activated protein kinase</i>
M-CSF	engl.: <i>macrophage-colony stimulating factor</i>
MDSC	engl.: <i>myeloid-derived suppressor cell</i>
MGMT	O-6-Methylguanin-DNS-Methyltransferase
MHC	engl.: <i>major histocompatibility complex</i>
MMP	Matrix-Metalloprotease
MPL	Monophosphoryl-Lipid A
MRP1	engl.: <i>multidrug-resistance-protein 1</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MSI-H	Mikrosatelliteninstabilität high
MSI-L	Mikrosatelliteninstabilität low
MSS	mikrosatellitenstabil
mTOR	engl.: <i>mechanistic target of Rapamycin</i>
MUC1	engl.: <i>Mucin-1</i>
N	engl.: <i>nodes</i>
NETs	engl.: <i>neutrophil extracellular traps</i>
NF-kB	engl.: <i>nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NKT-Zellen	natürliche Killer-T-Zellen
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
NLR	Neutrophilen/Lymphozyten-Ratio
NOX	NADPH-Oxidase
NRAS	engl.: <i>Neuroblastoma rat sarcoma</i>
NSCLC	engl.: <i>non small cell lung cancer</i>
nT _{regs}	natürliche regulatorische T-Zellen
PAMP	engl.: <i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMC	engl.: <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PD1	engl.: <i>programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	engl.: <i>programmed death-ligand 1</i>

PD-L2	engl.: <i>programmed death-ligand 2</i>
PGE2	Prostaglandin E2
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PMN	polymorphnukleär
PROK2	Prokineticin 2
PTEN	engl.: <i>phosphatase and tensin homolog</i>
pT _{regs}	periphere regulatorische T-Zellen
PTT	partielle Thromboplastinzeit
RAGE	engl.: <i>receptor for advanced glycation end products</i>
RAS	engl.: <i>rat sarcoma</i>
rIL-2	rekombinantes Interleukin 2
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SCF	engl.: <i>stem cell factor</i>
STAT	engl.: <i>signal transducer and activator of transcription</i>
T	Tumor
TAM	tumorassoziierte Makrophagen
TGF- β	engl.: <i>transforming growth factor β</i>
TIM-3	engl.: <i>T cell immunoglobulin and mucin-domain containing protein-3</i>
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TP53	Tumor Protein 53
T _{regs}	regulatorische T-Zellen
tT _{regs}	thymische regulatorische T-Zellen
TZR	T-Zell-Rezeptor
UICC	franz.: <i>Union Internationale Contre le Cancer</i>
ULN	engl.: <i>upper limit of normal</i>
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
v. Chr.	vor Christus
VEGF	engl.: <i>vascular endothelial growth factor</i>

1 Einleitung

Im Jahr 2019 starben in Deutschland 231.000 Menschen an den Folgen einer Krebserkrankung, dabei befanden sich bösartige Neubildungen des Kolons mit 15.830 an 13. Stelle der Todesursachen insgesamt und an vierter Stelle unter den bösartigen Neubildungen (Anzahl der Verstorbenen nach den Kapiteln des ICD codiert) (Statistisches Bundesamt Deutschland, Pressemitteilung Nr. N 010 vom 3. Februar 2021). Indes treten tödlich verlaufende Krebserkrankungen in allen Altersgruppen auf und in der Altersgruppe der 45- bis 65-Jährigen ist eine Krebserkrankung sogar die häufigste Todesursache mit mehr als einem Drittel (39 %) aller Todesfälle (1).

Der Kampf der Menschheit gegen den Krebs wurde bereits in einer Aufzeichnung aus der Antike beschrieben, in welcher der griechische Arzt Hippokrates (ca. 460 v. Chr. – 370 v. Chr.) der Krankheit ihren Namen gab – *Karkinos* (griechisch für Krebs) (2). Es war ebenfalls Hippokrates, der die erkrankte Person mit dem folgenden Therapieansatz ins Zentrum des Interesses rückte: „Es ist wichtiger zu wissen, welche Person eine Krankheit hat, als zu wissen, welche Krankheit eine Person hat.“ (3) So gewinnt in den letzten Jahren neben den anerkannten Säulen der Therapie – Chirurgie, Chemotherapie und Strahlentherapie – die Immuntherapie in Zusammenspiel mit molekularpathologischen Analysen (und bei alledem auch die personalisierte Medizin) immer mehr an Bedeutung. Die Chirurgie, die sich Ende des 19. Jahrhunderts als eine Säule der Therapie etablierte (2), verfolgt das Ziel einen Tumor vollständig aus dem Organismus zu entfernen. Dies ist vor allem in Frühstadien erfolgsversprechend. Die Chemo- und die Strahlentherapie streben an, die Zellteilung der Tumorzellen zu hemmen beziehungsweise die Tumorzellen zu zerstören, um so bei einer neoadjuvanten Therapie den Tumor zu verkleinern – sogenanntes „*Downstaging*“ – oder bei einer adjuvanten Therapie, die im Körper verbliebenen, makroskopisch nicht sichtbaren Tumorzellen zu eliminieren. Unterdessen kann bei einer Radiochemotherapie – die Kombinationstherapie aus Chemo- und Strahlentherapie – die Strahlensensibilität des Tumors durch die begleitende Chemotherapie erhöht werden. Die Chemotherapie ist eine medikamentöse Therapie mittels Zytostatika, die vor allem gut auf proliferierende Zellen wirkt, indem sie in den Zellzyklus eingreift und somit die Vermehrung inhibiert und durch Apoptose zu einer Reduktion der Zellen führt. Allerdings wirken Zytostatika sowohl auf Tumorzellen als auch auf gesunde proliferierende Zellen und sind besonders effektiv, wenn die Tumore eine große Wachstumsfraktion und eine niedrige Populationsverdopplungszeit haben. Gegenüber Tumorzellen, die sich in der G₀-Phase befinden z.B. die Tumor-Stammzellen, sind Zytostatika im Wesentlichen unwirksam. Da Zytostatika auch auf gesunde proliferierende Zellen wirken, wie z.B. die Mukosa- und Haarfollikelzellen, die Hämatopoese sowie auf die Oogenese und Spermatogenese, werden sie meist mitgeschädigt, welches sich zum Teil durch erhebliche Nebenwirkungen bei den Patienten äußert. Diese treten in Form von Mukositiden mit Stomatitiden und Enteropathien, welche zu Diarrhö führen, in Form von Haarausfall, in Form von Panzytopenie mit Infekt- und Blutungsneigungen sowie Anämie, und in Form von Amenorrhö und Azoospermie auf.

Paul Ehrlich beschrieb bereits 1908 die Idee, dass das Immunsystem in der Lage ist, körpereigene Tumore zu erkennen und zu bekämpfen (4). Im menschlichen Organismus entstehen täglich Tumorzellen, die von Immunzellen, insbesondere von den T-Zellen, über sogenannte tumorassoziierte Antigene (Peptide) in Zusammenspiel mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC, engl.: *major histocompatibility complex*) als solche erkannt und eliminiert werden. Dies beschreibt das Konzept der „*immune surveillance*“, das von Sir Macfarlane Burnet (1957) und Lewis Thomas (1959) entwickelt wurde (5-8). Durch genetische Prädispositionen, dem Einwirken von physikalischen (z.B. Strahlung) und chemischen Noxen (z.B. Zigarettenrauch) können vermehrt Tumorzellen entstehen. In bestimmten Fällen entgeht eine Tumorzelle dem Immunsystem, es kommt zu deren unkontrolliertem Wachstum und dadurch zur Entstehung einer bösartigen Neubildung. Bei der Entwicklung dieser Neoplasie unterscheidet man drei Phasen: Die Elimination – der Tumor beginnt invasiv zu wachsen und löst hierbei eine Reaktion des umgebenden Gewebes aus, in deren Folge die Tumorzellen in Kontakt mit Immunzellen gelangen und letztlich getötet werden –, das Gleichgewicht – das Immunsystem und einige überlebende Tumorzellen gehen in ein dynamisches Gleichgewicht über – und das Entkommen – es kommt zum Überleben von Tumorzellen, gleichwohl überleben solche, die nicht mehr vom Immunsystem als Tumorzellen detektiert werden können oder solche, die sich zu schnell und unkontrolliert genetisch und epigenetisch verändern. Diese Tumore treten klinisch in Erscheinung. Dieser Vorgang aus Elimination (*elimination*), Gleichgewicht (*equilibrium*) und Entkommen (*escape*) wird in der Literatur als „*cancer immunoediting*“ beschrieben (9).

Bereits 1867 versuchte der Bonner Chirurg Wilhelm Busch das körpereigene Immunsystem zu nutzen, um eine Patientin von ihrem Krebsleiden zu heilen, indem er zur Aktivierung des Immunsystems eine bakterielle Infektion herbeiführte. Zunächst erschien die Behandlungsmethode vielversprechend, da der Tumor schrumpfte. Letztendlich aber verstarb die Frau (10). Mutmaßlich davon inspiriert, behandelte auch ein Chirurg aus New York, William Coley (1891), während seines Berufslebens über 1000 Patienten mit inoperablen Tumoren, dabei handelte es sich vor allem um Knochen- und Weichgewebssarkome, durch die Injektion von Bakterien oder bakteriellen Produkten (11), später als Coley-Toxine bekannt (12). Einen neuerlichen Aufschwung erlebte die Immun- und Krebsforschung erst wieder nach 1945 und es setzte ein kontinuierlicher Erkenntnisgewinn in Bezug auf das Immunsystem und dessen Zusammenspiel mit neoplastischen und infektiösen Erkrankungen ein. Wie z.B. 1957 die Entdeckung von Interferon (13) oder 1959 die Entwicklung der ersten Krebsimpfung, die aus dem individuellen Tumor der Patientin hergestellt und mit dem Freund'schen Adjuvanz versetzt wurde, durch Ruth und John Graham. Der Ansatz basierte auf der Hypothese, dass ein Teil des Tumors andere Antigene besitzt als das physiologische Gewebe, und dass das Immunsystem des Patienten auf diese Antigene mit einer Immunantwort reagieren wird (14). Darüber hinaus gelang 1967 die Entdeckung und Charakterisierung von T-Zellen – und deren entscheidender Rolle innerhalb des Immunsystems (15) – sowie 1973 von dendritischen Zellen (DCs) (16). Ein weiterer Meilenstein war 1974 die Entdeckung und das Verständnis der MHC Klasse I-Moleküle sowie die Erkenntnis der MHC-Restriktion (17). Im Jahr 1975 wurde zum ersten Mal die Aktivität von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen, engl.: *natural killer cells*)

durch Kiessling und Klein beschrieben (18, 19). 1984 behandelte Steven A. Rosenberg eine Patientin mit metastasiertem malignem Melanom durch die systemische Applikation von rekombinantem Interleukin 2 (rIL-2) (20). Darauffolgend führten Rosenberg und sein Team verschiedene klinische Studien wie z.B. die systemische Applikation von autologen Lymphokin-aktivierten Killerzellen (engl.: *lymphokine-activated killer cell*, LAK cell) und rIL-2 durch (21). Durch die Entdeckung von Interferon- γ (IFN- γ) als möglichem Element der Immunantwort bei der in vivo Tumor-Rejektion (22) und dem Verständnis der T-Zell-vermittelten, tumorspezifischen Immunüberwachung, bei der Lymphozyten und IFN- γ -vermittelte Effektorfunktionen kollaborieren, um den Organismus vor der Entstehung von karzinogen-induziertem Krebs zu schützen (23), wurde das Basiskonzept der Immuntherapie weiter entwickelt. Ein entscheidender Durchbruch in der Tumorthherapie war 2011 die Entwicklung und Zulassung des ersten Checkpoint-Inhibitors Ipilimumab, der durch das Eingreifen in das immunologische Kontrollsystem charakterisiert ist. Ipilimumab ist ein monoklonaler Antikörper (mAK), der an das zytotoxische T-Lymphozyten-assoziierte Antigen 4 (CTLA-4, engl.: *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*) auf der T-Zelle bindet. Dadurch wird die Bindung von CTLA-4 an CD80 oder CD86 auf der antigenpräsentierenden Zelle verhindert und somit die hemmende Wirkung dieser Interaktion aufgehoben. T-Zellen können dadurch wieder vermehrt durch antigenpräsentierende Zellen stimuliert und gegen den Tumor wirksam werden. Ein weiterer Ansatzpunkt ist die zelluläre Immuntherapie durch gentechnisch veränderte T-Zellen mit spezifischem chimärem Antigenrezeptor (CAR), mit dem die T-Zellen Krebszellen erkennen und zerstören, die zuvor für das Immunsystem unsichtbar waren (24).

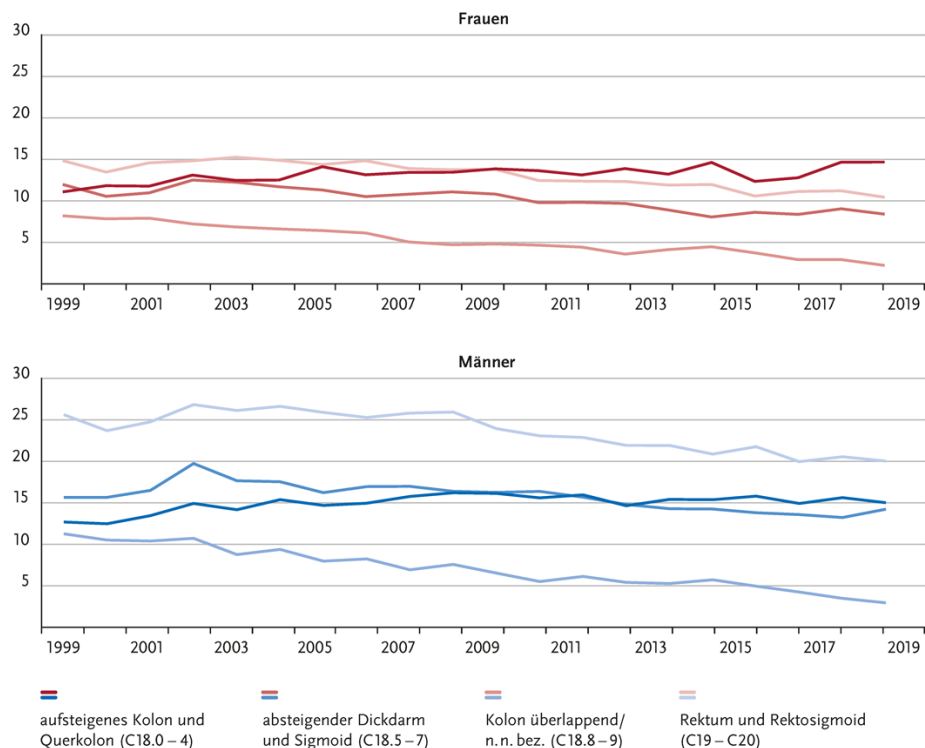
In den letzten Jahren gelang es neben diesen antitumoralen Effekten auch tumorinduzierte immunsupprimierende zelluläre Komponenten der endogenen Immunantwort zu charakterisieren. Dadurch sind Tumore in der Lage, der gegen sie gerichteten Immunantwort zu entgehen, das sogenannte Prinzip des „*tumor immune escape*“ (9). Bereits in den 1980ern wurden myeloische Zellen in Krebspatienten beschrieben, die eine immunsuppressive Funktion aufwiesen (25-27). Heutzutage sind sie als möglicher Angriffspunkt für neue Krebstherapien sehr stark in den Fokus der Forschung gerückt. Myeloische Suppressorzellen (MDSCs, engl.: *myeloid-derived suppressor cells*) sind eine heterogene Population von Zellen, die während verschiedener pathologischer Konditionen im menschlichen Organismus in unterschiedlichem Ausmaß vorkommen. Einheitliche Charakteristika dieser heterogenen Zellpopulation sind ihr myeloischer Ursprung, ihr Status der Unreife und ihre Fähigkeit, die T-Zell-Antwort des Immunsystems zu unterdrücken. Ein vermehrtes Vorkommen von MDSCs im peripheren Blut ist mit einer schlechteren Prognose bei Krebspatienten vergesellschaftet. Eine weitere Zellpopulation, die Anteil am *tumor immune escape* hat und im Kontext der verschiedenen Karzinome einschließlich des kolorektalen Karzinoms (KRK) (28) die Fähigkeit besitzt die T-Zell-vermittelte Immunantwort gegen maligne Tumore zu supprimieren, stellen die regulatorischen T-Zellen (T_{regs}) dar. Auch ihre Akkumulation im Rahmen von verschiedenen Karzinomen ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Das Ziel dieser Promotionsarbeit war es myeloische und lymphatische reaktive Zellpopulationen, darunter die MDSCs, T_{regs} und Effektorzellen, im Rahmen der LICC-Studie zu identifizieren und zu charakterisieren und einen möglichen Einfluss durch die Vakzine – L-BLP25 (Tecemotide) –

auf die unterschiedlichen Zellpopulationen herauszuarbeiten. Die LICC-Studie ist eine randomisierte, placebokontrollierte, multizentrische, binationale, doppelblinde Phase-II-Studie, bei der die adjuvante Therapie mit L-BLP25 – ein antigenspezifischer Krebsimpfstoff gegen Muzin 1 (MUC1, engl.: *Mucin-1*) – bei metastasiertem KRK nach erfolgter R0/R1-Resektion von Lebermetastasen bewertet wurde. Auf das Zusammenspiel mit anderen Immunzellen und auf einzelne Wirkmechanismen wird im Verlaufe dieser Promotionsarbeit noch einmal eingegangen.

2 Literaturdiskussion

2.1 Epidemiologie des KRK

Das KRK gehört mit ca. 1,9 Millionen Neuerkrankungen und etwa 0,9 Millionen Todesfällen im Jahr 2020 zu den weltweit am häufigsten auftretenden Krebsarten (29). In Deutschland verhält es sich für das KRK bei beiden Geschlechtern gleichartig und es zählt somit zu den häufigsten Tumorlokalisationen bei allen Krebsneuerkrankungen. Hierbei stellt das KRK bei den Männern die dritthäufigste und bei den Frauen sogar die zweithäufigste Krebserkrankung dar. Bei Männern treten lediglich das Prostata- und das Bronchialkarzinom und bei Frauen das Mammakarzinom häufiger auf (30). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 72 Jahren (bei den Männern) beziehungsweise 75 Jahren (bei den Frauen). Im Jahr 2018 lag die Anzahl der Neuerkrankungen in Deutschland insgesamt bei 60.630, wenngleich die Männer mit 33.920 etwas häufiger betroffen waren als die Frauen (31). Insgesamt ist die Inzidenz von KRK in den letzten Jahren rückläufig, derweil konnte vor allem für die Rektumkarzinome und für die distalen Kolonkarzinome eine deutliche Abnahme der Inzidenz verzeichnet werden. Die altersstandardisierte Inzidenz von KRK ging im Zeitraum von 2000 bis 2016 bei den Männern um 22,4 % und bei den Frauen um 25,5 % zurück. Die Mortalität im Zeitraum von 2000 bis 2018 sank bei den Männern um 35,8 % und um 40,5 % bei den Frauen (32).



© Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut

Abbildung 1: Altersstandardisierte Neuerkrankungsraten bösartiger, kolorektaler Neubildungen nach Lokalisation und Geschlecht, 1999-2018.
je 100.000 (alter Europastandard) (31)

Die relativen 5-Jahres-Überlebensraten mit Darmkrebs liegen für Frauen und Männer bei ca. 65 % beziehungsweise 63 % (31).

Tabelle 1: Epidemiologische Kennzahlen des KRK für Deutschland (31).

	Frauen	Männer
Neuerkrankungen	26.710	33.920
Mittleres Erkrankungsalter	75	72
standardisierte Erkrankungsrate¹	32,7	52,1
Sterbefälle	11.008	13.240
standardisierte Sterberate¹	11,3	18,9
5-Jahres-Prävalenz	89.700	109.800
10-Jahres-Prävalenz	150.400	183.300
relative 5-Jahres-Überlebensrate*	65 %	63 %
relative 10-Jahres-Überlebensrate*	62 %	57 %

¹ je 100.000 Personen, altersstandardisiert nach altem Europastandard

* berechnet nach Periodenmethode für 2017/2018

Dies ist zum einen auf die Koloskopie als primäre Screening-Untersuchung, welche seit Oktober 2002 von den gesetzlichen Krankenkassen angeboten wird, und zum anderen auf die Zunahme diagnostischer Koloskopien zurückzuführen. Vor allem die Inzidenzen von Rektumkarzinomen, und stärker ausgeprägt noch die des distalen Kolonkarzinoms, nahmen stark ab. Zudem konnte in den Jahren nach der Einführung des Angebotes der Vorsorgekoloskopie beobachtet werden, dass der Anteil der im Stadium I entdeckten Tumoren anstieg und in den späteren Jahren der Anteil der im Stadium IV entdeckten Tumoren sank. Dies demonstriert weitere positive Effekte der Koloskopien vor allem im Hinblick auf die proximalen Kolonkarzinome, bei denen die Inzidenz bei den Männern nicht sank und bei den Frauen kaum merklich, aber jedoch eine deutliche Verlagerung des Diagnosezeitpunktes hin zu früheren Stadien zu verzeichnen war. Zusätzlich werden bei den Vorsorgeuntersuchungen auch Vorstufen wie kolorektale Adenome erkannt und in der Regel bereits im Rahmen der Untersuchung abgetragen (32).

2.2 Pathogenese des KRK

Die meisten KRK entstehen auf dem Boden benigner Vorläuferläsionen, den sogenannten Adenomen. Zwar entwickeln sich nur wenige Adenome zu einem Karzinom und diejenigen, welche sich nicht zum Karzinom fortentwickeln, können spontan regredieren, während an anderer Stelle im Kolon wieder neue Adenome entstehen (33). Makroskopisch unterscheidet man drei Gruppen von Adenomen: exophytische, flache („*flat*“) und eingesunkene („*depressed*“). Die klassischen, histologischen Vorläuferläsionen – tubuläre (50–72 %), tubulovillöse (22–30 %) und villöse (5,5–15 %) Adenome (34) – entstehen aus adenomatösen Subtypen eines abnormen Kryptenfokus. Sie stellen eine klonale Subpopulation von

Kolonepithel dar, die sich von einer Krypte ausgehend zentrifugal ausbreitet. Dabei entstehen durch Einfaltungen des Oberflächenepithels die neu gebildeten, adenomatösen Krypten, wodurch die neoplastischen Veränderungen häufig nicht bis zur Kryptenbasis nachweisbar sind. Zunächst lässt sich eine Dysplasie beziehungsweise intraepitheliale Neoplasie (IEN) nachweisen. Hierbei lässt sich ein Fortschreiten der Kernatypien mit zunehmendem Verlust der Kernstratifizierung sowie in höheren Stadien eine Ausbildung von Sekundärarchitektur nachweisen. So entwickelt sich aus einer low-grade IEN über eine high-grade IEN/*Carcinoma in situ* ein invasives Karzinom, welches das Potenzial zur Metastasierung dazugewinnt und per definitionem eine Infiltration über die Lamina muscularis mucosae hinaus in andere Darmwandschichten beinhaltet. Insgesamt steigt das Risiko einer malignen Entartung mit zunehmender Größe des Adenoms, zunehmender villöser Architektur und mit dem multiplen Auftreten von Adenomen sowie mit zunehmendem Lebensalter an (35, 36). 60 % der sporadischen KRK entstehen über diese sogenannte Adenom-Karzinom-Sequenz (37) – erstmalig 1990 von Fearon und Vogelstein beschrieben –, bei der auf molekulargenetischer Ebene verschiedene Mutationen stattfinden, die zur Entwicklung eines Adenoms hin zu einem Karzinom beitragen. Bei diesem Prozess kommt es sowohl zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen als auch zur Aktivierung von Onkogenen. Die Inaktivierung des Adenomatous-Polyposis-coli-Tumorsuppressorgens (APC-Gens), welches auf Chromosom 5 lokalisiert ist, markiert dabei eines der wichtigsten und frühesten genetischen Ereignisse der Adenom-Karzinom-Sequenz. Eine wichtige Funktion des APC-Proteins ist die Regulation der intrazellulären β -Catenin-Expression. Fehlt dieses APC-Protein, akkumuliert zum einen β -Catenin, welches Teil des Wnt-Signalweges ist, intrazellulär und es kommt zu einer vermehrten Bindung von β -Catenin an den T-Zell-Faktor – ein Transkriptionsfaktor – wodurch wiederum eine Aktivierung der Transkription bestimmter Gene (z.B. c-myc und Cyclin D) stattfindet (38). Zum anderen fehlt die stabilisierende Wirkung des APC-Proteins bei der Chromosomensegregation, wodurch es zu einer defekten Chromosomentrennung und chromosomaler Instabilität kommt. Diese genetischen Schäden können wiederum zum Funktionsverlust weiterer Tumorsuppressorgene (z.B. p53, SMAD2, SMAD4 und DCC (engl.: *deleted in colorectal carcinoma*)) und zur Onkogenaktivierung (z.B. KRAS, engl.: *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (Vi-Ki-ras 2)*) führen. 17p ist die häufigste Region, in der ein Allel beim KRK verloren geht, hier ist das Allel für das Tumor Protein 53 (TP53) lokalisiert. Die zweithäufigste Region befindet sich auf 18q, wo die Gene für SMAD2, SMAD4 und DCC liegen (38). KRAS fungiert physiologisch als zentrale Schaltstelle in verschiedenen Signaltransduktionswegen, die für die Regulierung der Proliferation und Differenzierung von Zellen wichtig sind. KRAS gehört zur Familie der RAS (engl.: *rat sarcoma*)-Proteine. Hierbei gibt es drei humane Gene der RAS-Familie, die für die Proteine KRAS, HRAS (engl.: *Harvey rat sarcoma*) und NRAS (engl.: *Neuroblastoma rat sarcoma*) kodieren (39). Bei einer Mutation im KRAS-Gen verliert das RAS-Protein, welches Teil des MAPK (engl.: *mitogen-activated protein kinase*)-Signalweges ist, seine Guanosin-5'-Triphosphatase (GTPase)-Aktivität und das RAS-Protein bleibt dauerhaft aktiv, sodass es zu einer ständigen Stimulation des Zellwachstums kommt. Des Weiteren können RAS-Proteine direkt die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) aktivieren, welche Teil des PI3K/AKT/mTOR (engl.: *mechanistic target of Rapamycin*)-Signalweges ist. Dies führt zur Hemmung der Apoptose, zur Aktivierung der Proteintranslation und zur indirekten Stimulation der Zellteilung. Dieser Signalweg kann auch

durch eine Mutation in PIK3CA oder durch eine Mutation oder einen Verlust von PTEN (engl.: *phosphatase and tensin homolog*) aktiviert werden (40).

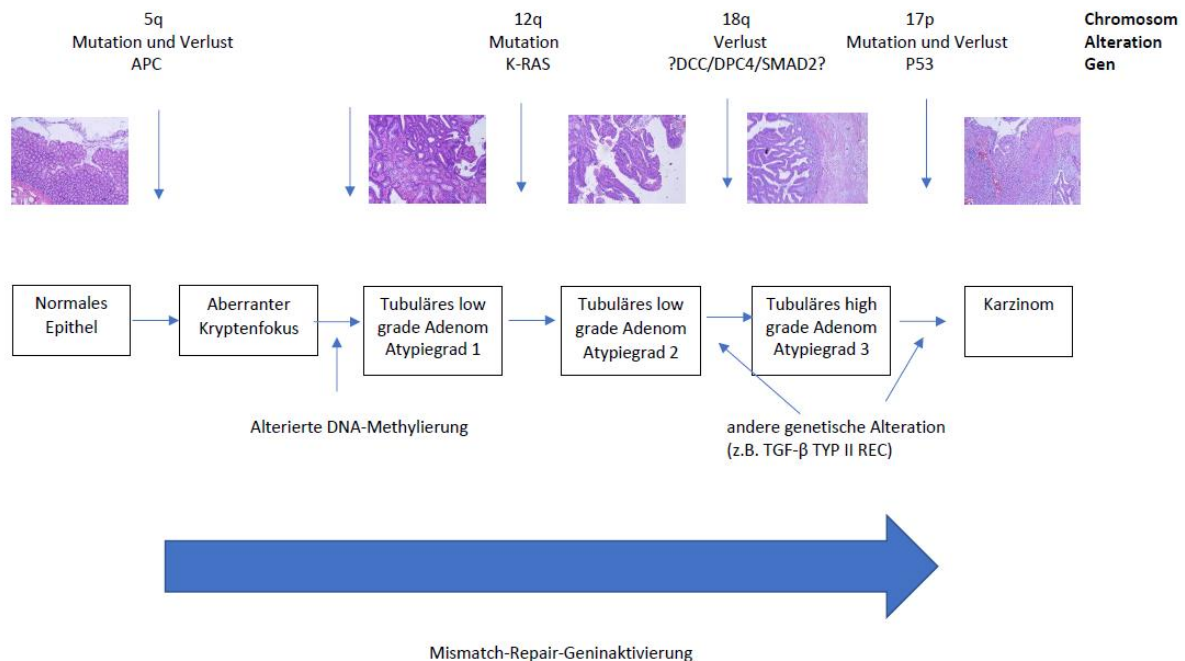


Abbildung 2: Adenom-Karzinom-Sequenz (modifiziert nach dem Modell von Fearon und Vogelstein (37)).

TGFBR2 (engl.: *transforming growth factor beta receptor 2*) = humanes Tumorsuppressorgen

Bei der Adenom-Karzinom-Sequenz erfüllt das APC-Gen eine regulierende Funktion für wichtige zelluläre Prozesse und wird aus diesem Grund auch als sogenannter „*gatekeeper*“, das heißt als molekularer „Türwächter“ bezeichnet, der sowohl bei der Tumorinitiation als auch bei der Tumorprogression eine zentrale Rolle einnimmt (41). Beim serratierten Karzinogeneseweg, als dessen Vorläuferläsionen die sessilen Läsionen gelten, kommt es zu einer Mutation im BRAF (engl.: *rat fibrosarcoma Isoform B*)-Gen, das Teil des RAS-/RAF-/ERK (engl.: *extracellular signal-regulated kinase*)-Signalweges ist. Dieser Signalweg steuert elementare Funktionen wie z.B. Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Dabei führen Störungen der Apoptose zu einer Überalterung von Zellen (42). Zusätzlich zeigt sich eine signifikante Assoziation zwischen BRAF-Mutationen und epigenetischen Veränderungen. Hierbei kommt es durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) zu einer Hypermethylierung der 5'-C-Phosphat-G-3' (CpG)-Inseln in den genregulierenden Abschnitten, wodurch die Transkription der betroffenen Gene verhindert wird und die Gene somit inaktiv werden. Man spricht dann vom sogenannten CpG-Insel-Methylierungsphänotyp (CIMP). Ist die Promotorregion der Mismatch-Reparaturenzym-Gene betroffen, kommt es zur Ausbildung eines Phänotyps mit hoher oder geringer Mikrosatelliteninstabilität. Der Entstehungsweg, der auf Mutationen in den Mismatch-Reparaturenzymen basiert, wird auch als „*caretaker pathway*“ bezeichnet (34). Die DNA (Desoxyribonukleinsäure, engl.: *deoxyribonucleic acid*)-

Mikrosatelliten sind kurze, meist nicht-kodierende DNA-Sequenzen von 2–6 Basenpaaren, die im menschlichen Genom oft wiederholt werden. In diesen Bereichen akkumulieren Fehler, da die DNA-Polymerase Schwierigkeiten hat, sich an diese repetierenden Genomsequenzen effizient zu binden. Kommt es bei der Synthese von neuen Strängen nun zu einer fehlerhaften Anzahl an Basen, die in diese Bereiche eingefügt werden müssen, entstehen sogenannte Rasterverschiebungsmutationen, die in Folge zu einem verkürzten oder nicht funktionsfähigen Protein führen. Physiologisch erkennt das Mismatch-Reparatur-System diese Fehler und führt eine DNA-Exzisionsreparatur vor der Tochterstrangreplikation durch. Liegt allerdings ein Mismatch-Reparaturgen-Defekt vor, z.B. durch Hypermethylierung des hMLH1 (engl.: *human mutL homolog 1*)-Gens, werden diese Fehler nicht erkannt und die fehlerhafte DNA wird nicht repariert. Dadurch werden die Mutationen beibehalten und an die Tochterzellen weitergegeben. Zusätzlich können immer weitere Mutationen entstehen. Bei dem alternativen Karzinogeneseweg, dessen Vorläuferläsionen sowohl traditionell serratierte Adenome als auch (tubulo-)villöse Adenome sein können, liegt initial eine Mutation im KRAS-Gen vor. Diese Mutation ist ebenfalls mit einer sekundären Hypermethylierung assoziiert, welche allerdings nicht so stark ausgeprägt ist wie bei einer BRAF-Mutation. Häufig ist ebenfalls das MGMT-(O-6-Methylguanin-DNS-Methyltransferase-)Gen mitbetroffen, was wiederum zu einem niedrig instabilen Mikrosatellitenstatus (MSI-L) führt. Ein niedriger Mikrosatellitenstatus bedeutet, dass ein Marker instabil ist. Darüber hinaus können auch Alterationen des APC- und p53-Signalweges auftreten, wodurch hier auch grobe chromosomale Alterationen und Aneuploidie bei Mikrosatellitenstabilität vorkommen können (43). Die klinische Relevanz dieser Unterscheidung ergibt sich daraus, dass Karzinome, die auf dem serratierten Weg entstehen, meist rechtsseitig/proximal lokalisiert sind und eine gute Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von > 70 % zeigen, wohingegen Karzinome, die über den alternativen Weg entstehen, überwiegend linksseitig/distal auftreten und eine ungünstige Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von < 30 % aufweisen (44).

Tabelle 2: Die verschiedenen Karzinogenesewege des (sporadischen) KRK (modifiziert nach (43, 45)).

Karzinogeneseweg	Präkanzeröse Läsion	Initiale Mutation	Sekundäre genetische Aberrationen	MSI-Status	Häufigkeit (%)	Lokalisation
Klassische Adenom-Karzinom-Sequenz	Adenom	APC	KRAS, p53	MSS	60	li. > re.
Alternativer Karzinogeneseweg	villöses oder traditionelles serratiertes Adenom	KRAS	CIMP low, APC, p53	MSI-L oder MSS	20	li. > re.
Serratiertes Karzinogeneseweg	sessiles serratiertes Adenom	BRAF	CIMP high, hMLH1	MSI-H (8 % MSS oder MSI-L, Typ 2 nach Jass, J.R.)	20	re. > li.

MSI-H (MSI-High, mindestens zwei der fünf Marker des international festgelegten Panels weisen eine Instabilität auf); MSI-L (MSI-Low, eine Instabilität ist lediglich in einem Marker nachweisbar) (46)

2.3 Hereditäre Formen des KRK

Etwa 5–10 % der KRK sind auf ein genetisches Syndrom, wie z.B. das hereditäre nicht-Polyposis-assoziierte kolorektale Karzinom (HNPCC; Lynch-Syndrom) oder die familiäre adenomatöse Polyposis coli (FAP), zurückzuführen (34). Die Notwendigkeit diese familiären KRK zu erkennen, liegt in der Risikoabschätzung gesunder Familienmitglieder an einem KRK oder an extrakolischen Tumoren (gut- sowie bösartig) zu erkranken und erfordert eine interdisziplinäre Betreuung der betroffenen Patienten und derer Familien (47).

Neben diesen beiden häufigsten genetischen Syndromen gibt es noch die seltenere, erstmals 2002 beschriebene MUTYH-assoziierte Polyposis (MAP), welche autosomal-rezessiv vererbt und durch biallelische Mutationen im MUTYH-Gen verursacht wird (48).

Des Weiteren gibt es unabhängig von diesen definierten genetischen Syndromen auch eine erbliche Komponente. Während das Lebenszeitrisiko an einem KRK zu erkranken bei Männern bei 6,5 % und bei Frauen bei 5,3 % liegt (49), haben Individuen mit einem Verwandten ersten Grades mit KRK, das nach dem 50. Lebensjahr aufgetreten ist, ein 2–3-fach höheres Risiko an einem KRK zu erkranken (50). Zusätzlich haben Menschen mit einem Verwandten ersten Grades mit KRK vor dem 45. Lebensjahr oder mit zwei Verwandten ersten Grades mit KRK ein 3–6-fach höheres Risiko ein KRK zu entwickeln im Vergleich zur Normalbevölkerung (51).

2.4 Risikofaktoren des KRK

Trotz der starken genetischen Komponente treten die meisten Fälle von KRK spontan auf. Das Auftreten von spontanen KRK wird stark mit einem sogenannten „*Western Lifestyle*“ in Verbindung gebracht. Zu den allgemeinen Risikofaktoren zählen eine ballaststoff- und vitaminarme sowie eine fett- und fleischreiche Ernährung, wobei vor allem rotes und gebratenes Fleisch das Risiko für die Entstehung eines KRK steigert. Auch vermehrter Nikotin- und Alkoholkonsum sowie Übergewicht erhöhen, wie bei anderen Krebsarten auch, das Karzinomrisiko. 1–2 % der KRK entstehen auf dem Boden einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung (34), wobei vor allem bei der Colitis ulcerosa mit zunehmender Erkrankungsdauer das Risiko steigt, ein KRK zu entwickeln. So liegt das KRK Erkrankungsrisiko nach 30 Erkrankungsjahren der Colitis ulcerosa bei 18 % (52). Auch der Morbus Crohn, vor allem bei frühem Krankheitsbeginn, bei lange bestehender Erkrankung und bei ausgedehnter Beteiligung des Kolons, ist mit einem erhöhten Risiko für KRK assoziiert (53). Vorherige Krebserkrankungen wie Dünndarm-, Mamma-, Endometrium- und Ovarialkarzinom sowie ein vorheriges KRK korrelieren ebenfalls mit einem gesteigerten Risiko, an einem KRK zu erkranken (34).

Als präventive beziehungsweise protektive Faktoren werden körperliche Bewegung, ballaststoff- und vitaminreiche sowie fettarme Ernährung angesehen. Daneben soll sich ein

hoher Vitamin-D-Spiegel im Serum ebenfalls positiv auf das Erkrankungsrisiko auswirken (54), allerdings gibt es hierzu bislang keine überzeugende Datenlage (55).

2.5 Makroskopie

Auch wenn in den letzten Jahren die Inzidenz proximaler Kolonkarzinome anstieg, sind die meisten KRK nach wie vor im Colon sigmoideum und im Rektum lokalisiert. Dabei liegt das Rektumkarzinom, gemessen mit einem starren Rektoskop, definitionsgemäß mit seinem aboralen Tumorrand 16 cm oder weniger von der Anokutanlinie entfernt (55). Die Lokalisationsverteilung im Kolorektum gestaltet sich wie folgt: Etwas 50 % der KRK sind im Rektum lokalisiert, 30 % im Colon sigmoideum, 10 % im Colon descendens und Colon transversum und 10 % im Colon ascendens und Coecum (56). Das makroskopische Erscheinungsbild KRK wird vom Stadium der Erkrankung bei Diagnosestellung mitbestimmt. Makroskopisch unterscheidet man demnach zwischen ulzerös-zerfallenden Karzinomen, polypös-exophytischen Karzinomen, welche vorwiegend intraluminal wachsen, diffus-infiltrierenden Karzinomen, die bei KRK eine extrem seltene Wachstumsform darstellen, und den sogenannten De-novo-Karzinomen. Diese sind als KRK ≤ 1 cm im Durchmesser und ohne Nachweis von Adenomresiduen im Randbereich des Karzinoms definiert. Insgesamt weisen jedoch zwei Drittel aller KRK die Form der ulzerös-zerfallenden Karzinome auf, die durch eine zentrale schüsselförmige Ulzeration mit wallartig aufgeworfenen Rändern charakterisiert sind (57).

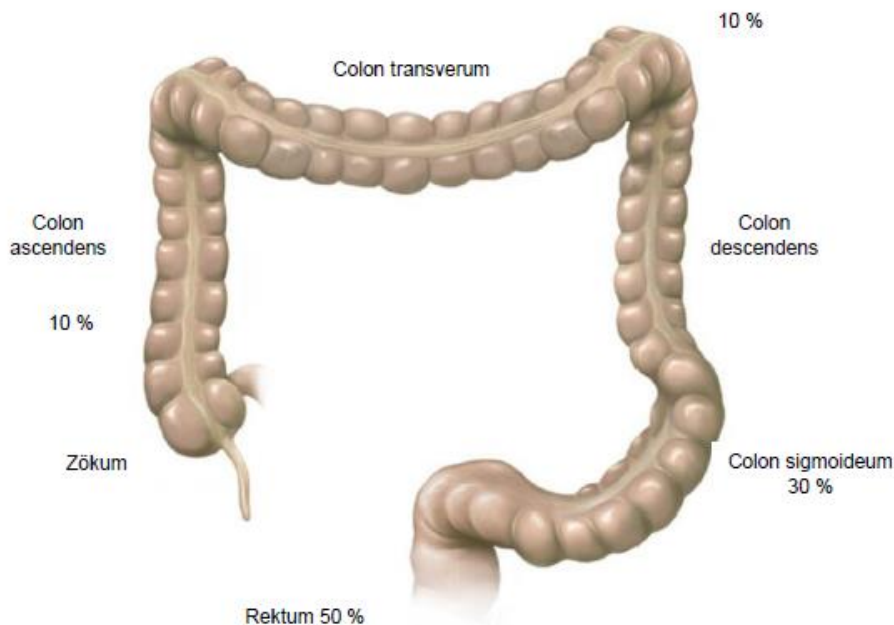


Abbildung 3: Häufigkeitsverteilung KRK im Kolorektum (modifiziert nach (56, 58)).

2.6 Histologie

Das Adenokarzinom macht als organtypische Variante des KRK 80–85 % aller Kolon- und 85–90 % aller Rektumkarzinome aus. Derweil werden wiederum spezielle Subtypen, wie das medulläre Karzinom, weiter unterschieden, welches 3,6 % aller KRK ausmacht, mit über 95 % im rechtsseitigen Kolon lokalisiert ist und sich in frühen Stadien durch eine sehr günstige Prognose auszeichnet. Die muzinösen Adenokarzinome, die definitionsgemäß eine mehr als 50 %ige muzinöse Differenzierung aufweisen sollen, zeichnen sich durch große extrazelluläre Schleimseen aus, in die einzelne Tumorzellen oder Tumorzellverbände eingebettet sind. Auch für die siegelringzelligen Adenokarzinome, die prominente intrazelluläre Muzinvakuolen aufweisen, gilt, dass mehr als 50 % des Tumors eine siegelringzellige Differenzierung aufweisen soll (59). Bei diesen beiden Subtypen ist für die Prognose vor allem der Mikrosatellitenstatus entscheidend. Während Karzinome mit MSI-H, als high-grade Karzinome klassifiziert werden und somit eine recht gute Prognose aufweisen, haben Karzinome der beiden zuletzt genannten Subtypen mit dem Nachweis von MSS oder MSI-L, eine vergleichsweise deutlich schlechtere Prognose. 7,5 % aller KRK lassen sich den serratierten Adenokarzinomen zuordnen. Neben der histomorphologischen Unterteilung in drei Subtypen – serratierte, muzinöse und trabekuläre Form – ist die Unterscheidung der zwei molekularen Subtypen prognoseentscheidend. Dabei liegt in 80 % der Fälle ein sogenannter Hochrisiko-Subtyp, welcher durch MSS oder MSI-L gekennzeichnet, meist linksseitig lokalisiert und häufig mit einem traditionell serratierten Adenom assoziiert ist, vor. Ihnen wird mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 30 % eine ungünstige Prognose zugeordnet. Deutlich seltener liegt ein sogenannter Niedrigrisiko-Subtyp vor, der meist im rechtsseitigen Kolon anzutreffen ist, eine Assoziation mit dem sessil serratierten Adenom demonstriert, als mikrosatelliteninstabil gilt und mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 70 % eine deutlich bessere Prognose aufweist (45). Das mikropapilläre Karzinom des Dickdarms tritt eher selten auf und offenbart, neben einer Expression von MUC1 (60) und Villin (45, 61), häufig eine erhaltene CDX2-Expression, welche die intestinale Differenzierung belegt (62). Weitere seltene Varianten des KRK sind das adenosquamöse Karzinom, welches in seinem biologischen Verhalten dem Adenokarzinom gleicht und einen Adenokarzinom- und Plattenepithelkarzinom-Anteil besitzt, das reine Plattenepithelkarzinom (63) und das spindelzellige Karzinom, das mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (59). Zudem erwähnenswert sind die undifferenzierten Karzinome, die in der Regel (in 80 % der Fälle) als MSS gelten und eine pathologische p53-Expression zeigen (64, 65). Diese sind differenzialdiagnostisch von Lymphomen, kleinzelligen Karzinomen und leukämischen Infiltrationen abzugrenzen (57).

Anhand des histomorphologischen Erscheinungsbildes erfolgt eine Graduierung (G = engl.: *Grading*) der Tumordifferenzierung. Diese ist basierend auf dem Anteil an glandulären Strukturen wie folgt einzuteilen: G1 = gut differenziert (mehr als 95 % glanduläre Strukturen), G2 = mäßig differenziert (50–95 % glanduläre Strukturen), G3 = schlecht differenziert (5–50 % glanduläre Strukturen) und G4 = undifferenziert (weniger als 5 % glanduläre Strukturen). Alternativ zu dieser vierstufigen Graduierung wird auch eine Unterteilung in low-grade- und high-grade-Karzinome angewandt. Dabei werden die gut und mäßig differenzierten Karzinome zu den low-grade-Karzinomen und die schlecht differenzierten und undifferenzierten Karzinome zu den high-grade-Karzinomen zusammengefasst (57).

2.7 Stadieneinteilung des KRK

KRK werden anhand ihrer lokalen Infiltrationstiefe in die Darmwand (T-Stadium), anhand der Anzahl der befallenen lokoregionären Lymphknoten (N-Stadium) und dem Vorhandensein von Fernmetastasen (M-Stadium) klassifiziert. Dies wird dann in der TNM-Klassifikation zusammengefasst und auf Basis dieser TNM-Klassifikation wurde von der UICC (franz.: *Union Internationale Contre le Cancer*) eine Stadieneinteilung entwickelt, die alle entscheidenden Merkmale der Tumorklassifikation berücksichtigt und eine Gewichtung dieser vorsieht.

Tabelle 3: TNM-Klassifikation (66).

T-Primärtumor	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	<i>Carcinoma in situ</i> : hochgradige Dysplasie oder Infiltration der Lamina propria mucosae
T1	Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe
T4	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen und/oder perforiert viszerale Peritoneum
T4a	Tumor perforiert viszerale Peritoneum
T4b	Tumor infiltriert direkt in andere Organe und Strukturen
N-regionäre Lymphknoten	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1 bis 3 regionären Lymphknoten
N1a	Metastase in einem regionären Lymphknoten
N1b	Metastasen in 2 bis 3 regionären Lymphknoten
N1c	Tumorknötchen beziehungsweise Satellit(en) im Fettgewebe der Subserosa oder im nichtperitonealisierten perikolischen/perirektalen Fettgewebe ohne regionäre Lymphknotenmetastasen
N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten
N2a	Metastasen in 4 bis 6 regionären Lymphknoten
N2b	Metastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknoten
M-Fernmetastasen	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
M1a	Metastase(n) auf ein Organ beschränkt (Leber, Lunge, Ovar, nichtregionäre Lymphknoten), ohne Peritonealmetastasen
M1b	Metastasen in mehr als einem Organ
M1c	Metastasen im Peritoneum mit/ohne Metastasen in anderen Organen

Tabelle 4: Stadieneinteilung des KRK nach TNM 2016 (66).

Stadium	T-Stadium	N-Status	M-Status
0	Tis	N0	M0
I	T1, T2	N0	M0
II	T3, T4	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
III	jedes T	N1, N2	M0
IIIA	T1, T2	N1	M0
	T1	N2a	M0
IIIB	T1, T2	N2b	M0
	T2, T3	N2a	M0
	T3, T4a	N1	M0
IIIC	T3, T4a	N2b	M0
	T4a	N2a	M0
	T4b	N1, N2	M0
IV	jedes T	jedes N	M1
IVA	jedes T	jedes N	M1a
IVB	jedes T	jedes N	M1b
IVC	jedes T	jedes N	M1c

2.8 Klinik des KRK

Der Großteil (etwa 77–92 % (34, 67, 68)) aller KRK verläuft lange Zeit symptomfrei beziehungsweise symptomarm. Ein mögliches Warnzeichen für ein KRK kann eine okkulte oder sichtbare Blutbeimengung im Stuhl sein. Diese tritt insbesondere bei Rektumkarzinomen auf. Bei rechtsseitigen KRK lassen sich Blutbeimengungen im Stuhl allerdings nur in 1/6 der Fälle beobachten. Auch bei bekanntem Hämorrhoidalleiden, als mögliches Korrelat der Blutbeimengungen, sollte ein mögliches KRK abgeklärt werden, da altersbedingt in 50 % der Fälle sowohl ein Hämorrhoidalleiden als auch ein KRK vorliegt. Des Weiteren sollte jeder plötzlichen Veränderung der Stuhlgewohnheiten bei Patienten älter als 40 Jahre weiter nachgegangen werden. Dazu zählen Schmerzen, Tenesmen, Obstipation beziehungsweise paradoxe Diarrhö, Hämatochezie, Dyschezie sowie Bleistiftstühle. Dies sind allerdings Symptome, die vor allem auf distale KRK hindeuten. Einen weiteren Hinweis liefert auch eine chronische Anämie, insbesondere eine mikrozytäre, hypochrome Anämie (Eisenmangelanämie). In solchen Fällen sollte auch an eine gastrointestinale Blutung, die eventuell durch einen Tumor verursacht wird, gedacht werden. Dies ist neben einem Leistungsknick und einem unklaren Gewichtsverlust auch ein Symptom, das bei proximalen KRK öfter zu beobachten ist (69). Komplikationen, die bedingt durch ein KRK auftreten können, sind Stenosen oder Obstruktionen des Darmlumens, die wiederum einen Dickdarmileus auslösen können. So ist die Ausbildung eines Dickdarmileus in 6–16 % der Fälle die Erstmanifestation eines KRK. Gerade beim alten Menschen ist das KRK mit 60 % die häufigste Ursache des Dickdarmileus. Auch eine Darmperforation kann bei 2–12 % der Patienten mit einem KRK beobachtet werden, wobei die Perforation meistens im Bereich des Karzinoms lokalisiert ist. Eine Kombination aus Obstruktion und Perforation ist ebenfalls möglich (67, 68, 70). Da es keine zuverlässigen

Frühsymptome beim KRK gibt, kommt den Vorsorgeuntersuchungen eine besondere Bedeutung zu, um die Karzinome in einem möglichst frühen Stadium zu diagnostizieren.

2.9 Diagnostik und Screening

Neben der digital-rektalen Untersuchung, durch die 10 % aller KRK ertastbar sind (69) und die ebenfalls eine Abschätzung der Infiltrationstiefe von Karzinomen im unteren Rektumdrittel ermöglicht, ist die komplette Koloskopie der Goldstandard zur Diagnose von Polypen und KRK. Sie erlaubt neben der visuellen Beurteilung der Darmschleimhaut auch eine bioptische Materialgewinnung, wodurch eine sichere histopathologische Diagnose möglich ist. Zudem ermöglicht sie auf diese Weise eine vollständige therapeutische Abtragung von Polypen beziehungsweise Adenomen mit möglichen low- beziehungsweise high-grade Atypien oder eines *Carcinoma in situ*. Ist eine komplette Koloskopie aufgrund einer nicht passierbaren Stenose oder ausgeprägten Adhäsionen nicht durchführbar, besteht die Alternative einer Computertomographie- (CT-) oder Magnetresonanztomographie- (MRT-)Kolographie. Im Falle eines stenosierenden Prozesses empfiehlt sich aber dennoch 3–6 Monate postoperativ eine komplette Koloskopie. Bei gesichertem KRK erfolgt ein präoperatives Staging, um eine mögliche Fernmetastasierung zu detektieren, als Basisuntersuchungen erfolgen dabei eine Sonographie des Abdomens sowie ein Röntgen-Thorax in zwei Ebenen. Im Falle unklarer Befunde oder des Verdachts auf Fernmetastasen beziehungsweise ausgeprägter lokaler Tumorausbreitung, können diese Basisuntersuchungen in Form eines CT/MRT des Thorax, des Abdomens und des Beckens erweitert werden. In Abhängigkeit vom Stadium der Erkrankung finden sich bei einem Teil der Patienten erhöhte Serumspiegel des carcinoembryonalen Antigens (CEA). CEA ist ein Glykoprotein, das als Zelladhäsionsmolekül physiologisch in drüsenhaltigem Gewebe wie z.B. der Kolonschleimhaut vorkommt. Das CEA kann sowohl im Rahmen maligner als auch entzündlicher Prozesse sowie bei Rauchern erhöht sein. Des Weiteren ist es nicht tumorspezifisch und kann somit auch bei vielen anderen Tumoren wie dem Magen-, Mamma-, Bronchial-, Pankreas-, Prostata- oder Ovarialkarzinom erhöht sein. Allgemein dient es nicht zur primären Diagnostik, sondern hat vor allem für die Überwachung der Nachsorge eine Bedeutung. So sollten sich nach einer radikalen Operation präoperativ erhöhte CEA-Werte normalisieren und im Falle eines Rezidivs wieder ansteigen. Aus diesem Grund empfiehlt sich eine regelmäßige postoperative Kontrolle (55).

Beim KRK spielen Vorsorgeuntersuchungen und Screenings eine besondere Rolle, da es zum einen zu den häufigsten Krebsarten gehört und sich zum anderen im Falle der Entstehung im Rahmen der Adenom-Karzinom-Sequenz über einen längeren Zeitraum (meist 10–15 Jahre (71)) entwickelt. Während der Vorsorgeuntersuchung können KRK oder dessen Vorläuferläsionen entdeckt und idealerweise therapiert werden. Bei Nicht-Risikopersonen wurde im Oktober 2002 eine Vorsorgekoloskopie ab dem 55. Lebensjahr in das gesetzliche Krebsfrüherkennungsprogramm in Deutschland aufgenommen (72). Diese sollte bei unauffälligem Befund nach 10 Jahren wiederholt werden. Die Leitlinie empfiehlt die Vorsorgekoloskopie bei der asymptomatischen Bevölkerung bereits ab dem 50. Lebensjahr, da sie mortalitätssenkend und kosteneffektiv ist und zudem gezeigt wurde, dass sie gegenüber anderen Präventionsmaßnahmen deutlich lebensverlängernd wirksam ist (73). Bei den

Patienten, die eine Vorsorgekoloskopie ablehnen, sollte laut aktueller Leitlinie ein jährlicher fäkaler okkultter Bluttest (FOBT) durchgeführt werden. Denn auch hier konnte evidenzbasiert die Wirksamkeit und Effektivität bezüglich einer Senkung der Mortalität nachgewiesen werden (74). Fällt der FOBT allerdings positiv aus, ist eine komplette Koloskopie zur Abklärung indiziert. Beim FOBT können verschiedene Verfahren unterschieden werden: Vor dem April 2016 war der am weitesten verbreitete FOBT der Guajak-Test (Haemoccult®). Dabei wird die phenolische Guajakonsäure durch Wasserstoffperoxid in Anwesenheit von Hämoglobin, was als Katalysator fungiert, zu einem hochkonjugierten Chinon oxidiert, und unterliegt unterdessen einem sichtbaren Farbwechsel von „weiß“ zu „blau“ (75). Allerdings verfälschten bestimmte Nahrungsmittel wie z.B. Vitamin C teilweise die Ergebnisse. Mittlerweile wird der sensitivere immunologische fäkale okkulte Bluttest (iFOBT) empfohlen, da eine signifikant höhere Detektionsrate nachgewiesen werden konnte (76). Hier basiert der Test auf dem spezifischen Nachweis von menschlichem Hämoglobin mittels Antikörper. Das Testergebnis wird so nicht durch Hämoglobin aus anderen Quellen beeinflusst. Eine Alternative zu FOBT ist der Nachweis tumorspezifischer Enzyme (z.B. Tumor M2-PK (M2-Pyruvatkinase)), dies sollte allerdings nicht für die Darmkrebs-Vorsorge/-Früherkennung in der asymptomatischen Bevölkerung eingesetzt werden.

2.10 Therapie des KRK

Um der Komplexität der Therapie eines KRK gerecht zu werden, ist eine Vorstellung der Patienten in einer interdisziplinären Tumorkonferenz erforderlich. Im nichtfernmetastasierten Tumorstadium von Kolon- oder Rektumkarzinomen des oberen Drittels ist die onkologische Resektion in kurativer Intention die Therapie der Wahl. Dies beinhaltet beim Kolon- beziehungsweise Rektumkarzinom des oberen Drittels neben der Einhaltung von ausreichend großen Sicherheitsabständen zum Tumor (minimal 2 cm), wobei das Ausmaß der Resektion maßgeblich von der Darmvaskularisation abhängt, eine komplette mesokolische Exzision beziehungsweise eine partielle mesorektale Exzision zur Gewährleistung der vollständigen Lymphadenektomie. Bei nichtfernmetastasierten Rektumkarzinomen des mittleren und unteren Drittels ist eine neoadjuvante (Radio-)Chemotherapie mit anschließender Operation bei einem UICC-Stadium II und III empfohlen. Die akzeptierten Sicherheitsabstände betragen abhängig vom *Grading* des Karzinoms und vom Vorliegen einer neoadjuvanten Therapie minimal 1–2 cm beziehungsweise 0,5 cm. Um eine vollständige Exzision des regionären Lymphabflussgebietes zu gewährleisten, ist eine totale mesorektale Exzision erforderlich. Bei fortgeschrittenem Tumorstadium, bei dem das Karzinom in Nachbarstrukturen infiltriert, empfiehlt sich eine En-bloc-Resektion der infiltrierten Strukturen. Entscheidend für die Prognose ist neben dem Resektionsstatus die Stadieneinteilung, in diesem Zusammenhang sinkt der Prozentsatz der tumorfreien 5-Jahres-Überlebensrate mit zunehmender Tumorausdehnung und der Metastasierung. Während beim Kolonkarzinom im UICC-Stadium I keine adjuvante Therapie empfohlen ist und beim Rektumkarzinom im UICC-Stadium I weder eine neoadjuvante noch eine adjuvante Therapie durchgeführt wird, werden Kolonkarzinome mit einem UICC-Stadium III, dies beinhaltet alle nodal-positiven Karzinome, adjuvant behandelt (55). Hierbei ist wiederum die Zahl tumorbefallener Lymphknoten

prognoseentscheidend, da die Anzahl der entfernten/untersuchten Lymphknoten mit der Prognose korreliert (77). Leitliniengemäß müssen derzeit mindestens 12 Lymphknoten histopathologisch untersucht und das Verhältnis von (tumor-)positiven zu negativen Lymphknoten angegeben werden (55). Bei Kolonkarzinomen im Stadium II sollte bei bestimmten Risikofaktoren, wie T4-Stadium oder einer Tumorperforation beziehungsweise einem Tumorriss, eine notfallmäßige Tumorsektion und/oder bei Nichterreichung der gewünschten Lymphknotenanzahl, eine adjuvante Therapie erwogen werden, da diese Patienten davon profitieren könnten. Bevor die Indikation für eine adjuvante Therapie gestellt wird, soll allerdings die Bestimmung des Mikrosatellitenstatus erfolgen, da Patienten mit mikrosatelliteninstabilen Karzinomen keinen Benefit von einer adjuvanten Therapie verzeichnen konnten (78). Im Stadium III sollten Oxaliplatin-haltige Regime eingesetzt werden, dabei werden Pyrimidin-Analoga wie 5-Fluorouracil und deren orales Prodrug Capecitabin zusammen mit Oxaliplatin eingesetzt. Liegen Kontraindikationen für ein Oxaliplatin-haltiges Regime vor, soll eine Monotherapie mit Fluoropyrimidin, bevorzugt in oraler Form, durchgeführt werden. Neben der klassischen zytostatischen Therapie kommen beim metastasierten KRK, bei dem als primäres Therapieziel die maximale Tumorreduktion angestrebt wird, noch mAK ergänzend hinzu (55). Deren Einsatz erfordert im Vorfeld eine molekularbiologische Diagnostik des RAS- und BRAF-Mutationsstatus sowie des Mikrosatellitenstatus. Der Anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab bindet den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF, engl.: *vascular endothelial growth factor*) und hemmt somit die Vaskularisierung bei RAS-Wildtyp und BRAF-Mutation. Der Einsatz von Anti-EGFR-Antikörpern wie Cetuximab und Panitumumab, die sich gegen den *epidermal growth factor receptor* (EGFR) richten, ist bei linksseitigen Karzinomen und RAS-Wildtyp indiziert. Liegt eine aktivierende Mutation im RAS- oder BRAF-Gen vor, ist eine Therapie mit Anti-EGFR-Antikörpern unwirksam, da der Signalweg unabhängig von der Hemmung des EGFR aktiviert bleibt (79). Neben diesen medikamentösen Optionen nimmt auch die Metastasen Chirurgie eine gewichtige Rolle ein. Indes können sowohl Leber- als auch Lungenmetastasen in kurativer Absicht reseziert werden, wenn keine weiteren nichtresektablen Tumormanifestationen vorliegen. Auch durch das gehäufte Vorstellen von Stadium IV-Patienten in der Tumorkonferenz ist die Rate der Metastasen Chirurgie gestiegen (80). Bei lokal fortgeschrittenem oder diffus metastasiertem Tumorleiden ist das Ziel eines palliativ medikamentösen und/oder chirurgischen Vorgehens, die Lebensqualität zu erhalten beziehungsweise zu steigern, bei alledem steht die symptomorientierte Behandlung im Fokus. Beispielsweise kann eine Umgehungsanastomose beziehungsweise ein künstlicher Darmausgang (Anus-*praeter*-Anlage) angelegt werden, um somit einen bevorstehenden oder bereits existierenden Ileus durch den Tumor zu verhindern, wenn eine komplette Resektion nicht möglich ist (55).

2.11 Immunsystem

2.11.1 Immunsystem allgemein

Der menschliche Organismus steht über die Körperoberfläche (der Haut) und über die Schleimhäute (Atemwege, Urogenitaltrakt, Gastrointestinaltrakt und Drüsenausführungsgänge) ab der Geburt permanent mit der Umgebung in Kontakt. Währenddessen gelangt der Organismus nicht nur mit dem kommensalen Mikrobiom, sondern auch mit schädlichen Stoffen und Krankheitserregern in Kontakt. Die Aufgabe den menschlichen Organismus vor solchen negativen äußeren Einflüssen zu schützen, kommt dem Immunsystem (lat. *immunis* = unberührt, frei, rein) zu. Dabei lässt sich das menschliche Immunsystem klassisch in das angeborene und in das adaptive Immunsystem unterteilen. Die angeborene Immunabwehr besteht aus einer zellulären Komponente – Monozyten, Makrophagen, polymorphkernigen Granulozyten, Mastzellen, interdigitierende dendritische Zellen, folliculäre dendritische Zellen und innate lymphoide Zellen – und einer humoralen Komponente – Komplementsystem, Zytokinen und Akute-Phase-Proteine. Monozyten zirkulieren nur für kurze Zeit im Blut und migrieren dann ins Gewebe, wo sie zu Makrophagen differenzieren. Im Rahmen der primären Immunantwort phagozytieren die Gewebsmakrophagen, die als Wächterzellen (engl.: *sentinel cells*) fungieren, die Erreger, oder sie sezernieren zytotoxische Substanzen wie z.B. Hydroxylradikale, Defensine, Lysozym oder Lactoferrin, was wiederum zur Zerstörung von vor allem Bakterien und Parasiten führt. Das Komplementsystem der extrazellulären Flüssigkeit führt über eine kaskadenartige Aktivierung mittels enzymatischer Spaltung von Proteinen zur Ausbildung eines Membranangriffskomplexes (MAC, engl.: *membrane attack complex*), der in der Zielzelle zur Formung einer Pore in der Zellmembran und somit zu ihrer Lyse führt. Ist das Problem dadurch nicht behoben, können Makrophagen und Mastzellen auch Zytokine (regulatorische Proteine, die der Signalübertragung zwischen den Zellen dienen und deren Proliferation und Differenzierung steuern) wie z.B. TNF α (Tumornekrosefaktor α), IL-1 (Interleukin-1) und IL-6 sezernieren, um weitere Immunzellen zu rekrutieren. Darunter befinden sich neben NK-Zellen auch Zellen des adaptiven Immunsystems, B- und T-Lymphozyten. Die B-Lymphozyten werden nach Antigenkontakt über den B-Zell-Rezeptor – ein membranverankertes Immunglobulin (Ig) – aktiviert und differenzieren zum Teil im weiteren Verlauf zu Plasmazellen, die große Mengen an Igs synthetisieren und diese in löslicher Form sezernieren. Diese Antikörper schützen vor extrazellulären Pathogenen und Toxinen und können wiederum das klassische Komplementsystem und dessen Signalwege aktivieren. Die T-Lymphozyten kann man wiederum in verschiedene Untergruppen mit unterschiedlichen Funktionen unterteilen. Die zytotoxischen T-Zellen (CTLs, engl.: *cytotoxic T lymphocyte*) – ausdifferenzierte CD8⁺ CTLs – sind darauf spezialisiert, Antigene zu erkennen, die zytosolischen beziehungsweise intrazellulären Ursprungs sind. Das heißt, sie töten „kranke“ körpereigene Zielzellen wie Tumorzellen, virusinfizierte Zellen oder Zellen mit einer zytoplasmatischen bakteriellen Infektion. Dabei können sie über zwei unterschiedliche Mechanismen die Apoptose der Zielzelle einleiten. Zum einen ist ihnen dies mittels ihrer zytoplasmatischen Granula und zum anderen über die Expression von Fas-Liganden auf ihrer Oberfläche möglich (81). Durch das Phänomen der Kreuzpräsentation (engl.: *cross presentation*) können auch extrazelluläre Antigene den CTLs präsentiert werden. Dieser

Prozess erlaubt es, dass sowohl endogene als auch exogene Antigene über einen MHC-I/Peptid-Komplex den CTLs dargeboten werden (82).

Neben den CTLs existiert noch die CD4⁺-T-Zell-Subpopulation der T-Helferzellen, die sich funktionell definieren und über ihr Zytokinspektrum charakterisiert sind (T_H1, T_H2, T_H17, T_H1 und T_{reg}). Die T-Helferzellen unterstützen das Immunsystem bei der Bekämpfung von extrazellulären und intrazellulären Pathogenen. Wobei ihnen die Antigene mittels MHC-II-Molekülen von antigenpräsentierenden Zellen dargeboten werden. Ihre Hauptaufgabe ist die Sekretion von Zytokinen. Nach der Aktivierung von T_H1-Helferzellen produzieren diese große Mengen an IFN- γ und TNF α , wobei IFN- γ einer der potentesten Makrophagenaktivatoren ist. Darüber hinaus unterstützen T_H1-Helferzellen die Differenzierung spezifischer CD8⁺ T-Zellen zu CTLs, sorgen mittels IFN- γ für eine Aktivierung von NK-Zellen und fördern den Antikörperklassenwechsel hin zu opsonisierenden IgG-Antikörpern. T_H2-Zellen fördern den Antikörperklassenwechsel hin zu „antiparasitären“ IgE-Antikörpern und wirken darüber hinaus auf Mastzellen, Eosinophile und Basophile ein. Des Weiteren begünstigt das von den T_H2-Zellen sezernierte IL-13 die Erneuerung des Darmepithels und sorgt mittels Schleimproduktion und Darmmotilität für einen verbesserten Schutz gegenüber Würmern. Die T_H17-Zellen wirken indirekt über IL-17 entzündungsfördernd, indem IL-17 die Mobilisation der Neutrophilenreserven aus dem Knochenmark bewirkt und deren Reifung fördert. Mittels IL-22 stimulieren T_H17-Zellen Epithelzellen zur Sekretion von antimikrobiellen Peptiden. Unabhängig vom Pathogen unterstützen T_H17-Zellen die Affinitätsreifung und den Klassenwechsel der Antikörperproduktion von B-Lymphozyten in den Lymphfollikeln. Entzündungsreaktionen schädigen nicht nur die mikrobiellen Invasoren, sondern auch Zellen und das Gewebe des Organismus. Aus diesem Grund muss die inflammatorische Immunantwort kontrolliert werden. Um eine überschießende Entzündungsreaktion oder eine Autoimmunität zu vermeiden, wirken T_{regs} meist supprimierend auf die anderen T-Zell-Subpopulationen ein (81).

Die Aktivierung der T-Zellen erfolgt in der Regel über professionelle antigenpräsentierende Zellen, zu denen neben Monozyten, Makrophagen und DCs auch B-Lymphozyten zählen. Zudem tragen alle T-Zellen einen T-Zell-Rezeptor (TZR), der es ihnen ermöglicht mit dem MHC-I/Peptid-Komplex beziehungsweise dem MHC-II/Peptid-Komplex zu interagieren. Der TZR stellt ein Heterodimer dar, das bei 95 % der T-Zellen aus je einer α - und einer β -Peptidkette und bei 5 % aus einer γ - und δ -Peptidkette besteht, welche durch Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden sind. Sie bilden im Extrazellulärraum die Antigenbindungsstelle. Darüber hinaus ist der TZR mit weiteren Transmembranproteinen assoziiert, welche den CD3-Komplex bilden, und an der Signaltransduktion sowie an der Oberflächenexpression des TZRs beteiligt sind. Der CD3-Komplex setzt sich wiederum aus einer γ -, δ -, ϵ - und ζ -Kette zusammen, wobei die Letztere ein Homodimer bildet. Auf der intrazellulären Seite sind die γ -, δ - und ϵ -Kette des CD3-Komplexes mit jeweils einem ITAM (engl.: *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) assoziiert und das ζ -Homodimer weist jeweils drei ITAMs auf. Nach der Bindung des Antigens durch den TZR ist die Signalweiterleitung entscheidend von den ITAMs abhängig, die hierbei an ihren Tyrosinresten phosphoryliert werden (81).

2.11.2 Immunsystem und Tumorerkrankungen

Wie bereits unter 2.2 am Beispiel des KRK beschrieben, ist der vielschichtige Prozess der malignen Transformation eine Folge von Mutationen. Diese finden in Tumorsuppressor-Genen, Transkriptionsregulatoren, Proto-Onkogenen und weiteren Genen statt, die an der Regulation von Proliferation und dem Überleben der Zellen beteiligt sind. Hierbei kommt es unter anderem zu einer Veränderung der intrazellulären Proteine (37). Aus diesem Grund unterscheiden sich die Proteome von gesunden Zellen und die einer Tumorzelle voneinander. Als Tumorantigene werden somit veränderte Proteine bezeichnet, welche immunogene Determinanten hervorbringen. Tumorantigene werden teilweise intrazellulär prozessiert und als Peptide, gebunden an MHC-I-Moleküle, auf der Zelloberfläche präsentiert. Dabei lassen sich Tumorantigene entsprechend ihres Expressionsmusters in tumorsassoziierte und tumorspezifische Antigene aufgliedern (83). Die tumorsassoziierten Antigene werden sowohl vom Normal- als auch vom Tumorgewebe exprimiert, und dazu zählen die Amplifikations- und Differenzierungsantigene. Zu den tumorspezifischen Antigenen gehören bestimmte virale Antigene, tumorspezifische Translokationsantigene oder sie sind auf tumorspezifische Mutationen zurückzuführen. Die sog. *Cancer Testis Antigene (CTA)*, die physiologisch von testikulären Keimzellen oder plazentaren Trophoblasten exprimiert werden, können hingegen nicht zur Entstehung von antigenen Peptiden bei „gesunden“ Zellen beitragen, da sie physiologisch keine MHC I-Moleküle exprimieren, und sind somit ebenfalls tumorspezifisch. Differenzierungsantigene werden nur von bestimmten Geweben exprimiert, so z.B. die Tyrosinase, die bei der Produktion von Melanin beteiligt ist und sowohl in gesunden Melanozyten als auch in Melanomzellen exprimiert wird. Die Amplifizierungsantigene werden aufgrund einer Vervielfältigung des Gens im Tumorgewebe stärker exprimiert als im Normalgewebe, so z.B. HER2/neu (engl.: *human epidermal growth factor receptor 2/neuprotocogene*), dessen Expression-Status bei Mammakarzinomen routinemäßig bereits an den Stanzbiopsaten (84) bestimmt werden sollte und zunehmend auch bei Magenkarzinomen (85), KRK (55) und Bronchialkarzinomen (86) überprüft wird. Liegt in diesen Fällen eine HER2-Amplifikation vor, ergibt sich gegebenenfalls eine Therapieoption mit Trastuzumab. Bei den Differenzierungs- und Amplifizierungsantigenen kommt es zwar zu einer verstärkten Produktion der Proteine, wodurch diese in einer höheren Dichte präsentiert werden, sie finden sich jedoch auch auf normalen Zellen, sodass eine Immunreaktion gegen diese tumorsassoziierten Antigene als unerwünschte Wirkung auch eine Autoreaktivität gegen das Normalgewebe zur Folge haben kann (81).

Viele der bekannten Tumorantigene sind lediglich angehäuften, also überexprimierte Produkte des veränderten Zellstoffwechsels und keine mutierten Proteine, sodass sie von den physiologischen Toleranzmechanismen profitieren. Sie werden somit als körpereigen erkannt und besitzen nur eine geringe Immunogenität mit einer unzureichenden Aktivierung des Immunsystems. Dennoch ist die Induktion einer Immunreaktion gegen Tumore durch Impfung eines der Ziele der experimentellen Immuntherapie. Hierbei soll das Immunsystem dahingehend instruiert werden, die Unterschiede zwischen einem Selbst-Antigen und einem veränderten Selbst-Antigen zu erkennen (87).

Das Immunsystem ist prinzipiell in der Lage, entstehende Tumore zu erkennen und diese auch zu eliminieren. Dennoch gibt es verschiedene Mechanismen, die es dem Tumor ermöglichen,

sich dem Immunsystem zu entziehen. Spontan entstehende Tumore weisen zu Beginn möglicherweise keine Mutation auf, sodass sie noch nicht durch ein neues tumorspezifisches Antigen gekennzeichnet sind und dadurch keine T-Zell-Reaktion auslösen, da sie nicht als „fremd“ erkannt werden. Aber auch wenn sie ein tumorspezifisches Antigen exprimieren, das von den antigenpräsentierenden Zellen präsentiert werden kann, kommt es ohne kostimulatorische Signale zu keiner Aktivierung von T-Zellen. Zudem ist es möglich, dass abgestorbene Tumorzellen von DCs aufgenommen werden, es aber aufgrund des Fehlens weiterer Gefahrensignale zu keiner Aktivierung beziehungsweise zu keiner Reifung der DCs kommt, wodurch wiederum eine Aktivierung von T-Zellen ausbleibt und gegenteilig sogar die Sekretion von antiinflammatorischen Zytokinen erfolgen kann.

Darüber hinaus wird bei einigen Tumoren wie z.B. dem KRK und dem Zervixkarzinom ein bestimmtes MHC-Klasse-I-Molekül nicht mehr exprimiert (88, 89), wodurch die CTLs die Tumorzellen nicht mehr erkennen können. Dadurch werden sie allerdings auch anfälliger für den Angriff durch NK-Zellen (90). Verlieren die Tumorzellen allerdings nur ein MHC-Klasse-I-Molekül oder exprimieren nicht-klassische Klasse I HLA- (humanes Leukozytenantigen-)G Antigene (91), können sie eventuell der Erkennung durch CTLs entgehen und gleichzeitig eine Resistenz gegenüber NK-Zellen ausbilden. Dadurch hätten sie einen Selektionsvorteil gewonnen.

Tumorzellen können ferner dem Immunsystem entgehen, indem sie ein immunsuppressives Mikromilieu schaffen. Dazu produzieren viele Tumore immunsuppressive Zytokine. Der transformierende Wachstumsfaktor (TGF- β , engl.: *transforming growth factor β*), der nicht nur von den Tumorzellen, sondern auch von anderen Zellen der Tumormikroumgebung sezerniert wird, supprimiert auf der einen Seite CTLs, T_H1-Zellen, NK-Zellen und DCs in ihrer Funktion und sorgt auf der anderen Seite für eine Vermehrung von protumoralen T_{regs}, M2-Makrophagen, MDSCs (auf diese Subpopulation wird nochmals gesondert eingegangen) und IgA-produzierenden B-Zellen (92). So können in diesem Mikromilieu z.B. die Monozyten in Abhängigkeit von verschiedenen Stimuli zu M1-, M2- oder tumorassoziierten Makrophagen (TAM) differenzieren, wobei TAM ähnlich den M2-Makrophagen sind. Ihre Präsenz im Tumormikroenvironment ist mit einem schlechten klinischen Verlauf assoziiert. Mittels verschiedener nicht-immunologischer und immunologischer Mechanismen vermitteln sie ihre Effekte. Dabei zählen die Förderung der Angiogenese, die Erleichterung der Tumorzellinvasion und die Metastasierung sowie der Schutz der Tumorzellen vor der Chemotherapie-induzierten Apoptose zu den nicht-immunologischen Mechanismen. Darüber hinaus inhibieren TAM die antitumorale Immunität, indem sie die M1-Makrophagen-vermittelte, angeborene Immunantwort verdrängen und die T-Zell-Aktivierung beeinträchtigen. Physiologisch fördern M1-Makrophagen über die Produktion von IL-12 die Aktivierung von NK-Zellen und T_H1-Zellen, welche die Aktivierung von CTLs erleichtern. TAM produzieren kein IL-12, sondern IL-10, eines der wichtigsten antientzündlichen Zytokine, welches ebenfalls für die Entwicklung einer Immuntoleranz wichtig ist. Es kann auch von Tumoren sezerniert werden und wirkt in diesem Zusammenhang fördernd auf die Tumorentstehung. Hierbei schwächt es die Aktivität von DCs und kann die Aktivierung von T-Zellen blockieren (93), indem es die Entwicklung von T_H2-Zellen vorantreibt, welche wiederum nicht die zytotoxische T-Zell-Antwort unterstützen, sondern im Sinne eines positiven Feedback-Loops die Entwicklung weiterer TAM

fördern. Des Weiteren gehören TAM zu den ineffektiven antigenpräsentierenden Zellen. Sie produzieren CC-Chemokin-Ligand 22 (CCL22), welcher T_{regs} anlockt, die wiederum die T-Zell-Aktivierung hemmen. Darüber hinaus sezernieren sie Prostaglandin E2 (PGE2) und TGF- β , wodurch sie ebenfalls zur Immunsuppression beitragen. Zudem verursachen TAM durch die Expression von PD-L1 (engl.: *programmed death-ligand 1*), welcher an seinen Rezeptor PD1 (engl.: *programmed cell death protein 1*) auf aktivierten T-Zellen bindet, auch eine T-Zell-Apoptose durch programmierten Zelltod (94). Zusätzlich sind Tumorzellen auch in der Lage Enzyme wie Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) zu exprimieren, welche bei der Verstoffwechslung der essenziellen Aminosäure Tryptophan beteiligt ist, wobei das immunsuppressive Produkt Kynurenin gebildet wird, welches auf T-Zellen, vor allem T_H1-Zellen, supprimierend wirkt. Während einer Infektion besteht die Funktion der IDO darin, die Balance zwischen Immunantworten und Toleranzmechanismen zu bewahren. Sie kann aber auch in der Gleichgewichtsphase der Tumorentwicklung induziert werden (95). Tumore produzieren auch Substanzen wie Kollagen und errichten somit eine physikalische Barriere, um den Wechselwirkungen mit den Zellen des Immunsystems zu entgehen (Theorie der Stromabarriere (96)).

Kürzlich wurde gezeigt, dass DCs von tumortragenden Wirten nicht in der Lage sind, eine Immunantwort angemessen zu stimulieren und somit zur Tumor-Immunevasion beitragen (97). Dieser systemische DC-Defekt bei Krebs ist auf eine abnormale Differenzierung myeloischer Zellen zurückzuführen, die zu einer verminderten Produktion reifer, funktionell kompetenter DCs und zur Anhäufung von unreifen DCs (iDCs, engl.: *immature dendritic cells*) und unreifen myeloischen Zellen (iMC, engl.: *immature myeloid cells*) führt (98). Sowohl iDCs als auch iMCs hemmen direkt antigenspezifische T-Zell-Antworten (99-101). Diese aberrante myeloische Differenzierung wird durch mehrere tumorabgeleitete Faktoren beeinflusst, die z.B. zu einer konstitutiven Aktivierung von STAT3 (engl.: *signal transducer and activator of transcription*) führen, und durch den VEGF verursacht (102-104).

Die verstärkte Expression von Liganden wie PD-L1 oder Fas-Liganden für die Todesrezeptoren, wie z.B. PD1 und seltener auch Fas (CD95), durch die Tumorzellen oder auch TAM (wie bereits weiter oben ausgeführt) ist beteiligt an der Anergie der CTLs. Die Aktivierung von PD1 löst bei antigenspezifischen T-Zellen in Lymphknoten eine Apoptose aus und reduziert gleichzeitig die Apoptose von T_{regs}.

Die Tumorzellen unterliegen stetigen Veränderungen, die sich auf ihre genetische Struktur und somit auf das Proteom auswirken. Dadurch kommt es zu einer sich verändernden Präsentation der unterschiedlichen Peptide. Die permanente Auseinandersetzung des Tumors mit dem Immunsystem fördert somit die Vermehrung der Zellen, die vom Immunsystem nicht mehr erkannt werden können. Dieser Prozess der Selektion wird als *Immunoediting* bezeichnet (9).

Die Förderung und Aufrechterhaltung der Immunogenität des Tumors sowie die Stärkung der Effektormechanismen können somit Ziele der Immuntherapie sein.

Krebs-Immunoediting

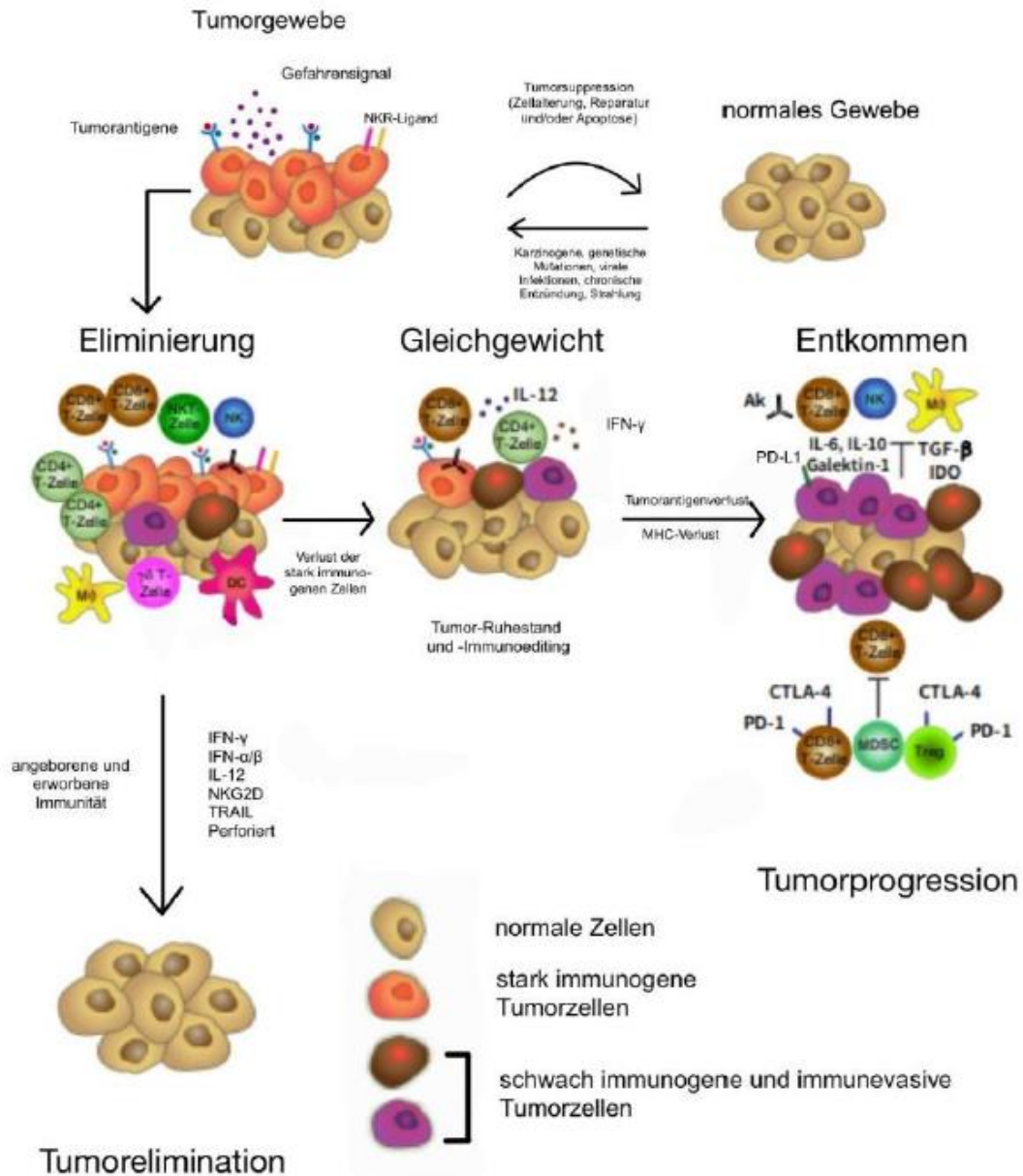


Abbildung 4: Krebs-Immunoediting (modifiziert nach (105)): Nachdem intrinsische Tumorzellsuppressionsmechanismen (DNA-Reparatur, Seneszenz, Apoptose) versagt haben, die zelluläre Transformation von einer normalen Zelle zur Tumorzelle stattgefunden hat und die extrinsischen Tumorsuppressionsmechanismen gescheitert sind, gehen tumorfördernde Entzündungsprozesse und protektive Tumorimmunität in ein dynamisches Gleichgewicht über. Dabei unterscheidet man nach dem Krebs-Immunoediting-Konzept drei Phasen:

Eliminierung: Währenddessen arbeiten die angeborene und die adaptive Immunität zusammen, um die sich entwickelnden Tumore, lange bevor sie klinisch sichtbar werden würden, zu eliminieren. Bei einem Erfolg des Immunsystems bleibt der Wirt frei von einem malignen Tumor.

Gleichgewicht (Equilibrium): Überleben allerdings einzelne Tumorzellen, werden diese durch das adaptive Immunsystem daran gehindert auszuwachsen. Derweilen können, als Folge des ständigen Immunoselektionsdrucks auch genetisch instabile Tumorzellen, Tumorzellvarianten entstehen, die nicht mehr durch das adaptive Immunsystem erkannt werden, unempfindlich gegenüber den Immuneffektormechanismen werden oder ein immunsuppressives Tumormilieu induzieren.

Entkommen: Tumorzellen können dem Immunsystem entkommen, wobei diverse Mechanismen beschrieben werden: fehlende oder unzureichende Antigen-Präsentation, eine vermehrte Bildung immunsuppressiver Substanzen, eine verstärkte Expression von Suppressorzellen, eine fehlende Aktivierung von TZR und eine verringerte Bildung von Überlebensfaktoren für B- und T-Lymphozyten. Diese Grafik basiert auf einer Abbildung von Dunn et al. (9, 106).

MΦ = Makrophagen; DC = dendritische Zellen; IDO = Indolamin-2,3-Dioxygenase; IL = Interleukin; TNF = Tumornekrosefaktor; IFN = Interferon; NK = natürliche Killerzellen; NKG2D = Immunrezeptor (wirkt als aktivierender Rezeptor auf NK-Zellen); PD-L1 = *programmed death ligand 1*; MDSC = *myeloid-derived suppressor cells*; CTLA-4 = *cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*; T_{reg} = regulatorische T-Zellen (inhibieren andere T-Zellen zur Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz)

2.11.3 Myeloische Suppressorzellen

Die MDSCs sind eine heterogene Gruppe von unreifen hämatopoetischen Zellen. Ihnen gemeinsam ist der myeloische Ursprung, die immunsuppressive Funktion und die systemische Ausbreitung in Zusammenhang mit Krebserkrankungen (107).

2.11.3.1 Ursprung und Begriffserklärung

Bereits vor 100 Jahren wurde bei manchen Tumoren ein verstärktes Vorkommen von unreifen myeloischen Zellen im peripheren Blut sowie eine Leukozytose in unterschiedlichem Ausmaß beschrieben (108, 109). Während der 1980er-Jahre und in den frühen 1990er-Jahren konnte in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden, dass es verschiedene Typen von myeloischen Zellen gibt, die das Immunsystem bei Krebspatienten hemmen (110). Zu Beginn wurden diese abnormen myeloischen Zellen uneinheitlich als sogenannte „Veto-Zellen“, „Null-Zellen“ oder auch „natürliche Suppressorzellen“ bezeichnet. 2007 wurde der Versuch unternommen, diese unterschiedlichen Beschreibungen der Zellpopulation zu vereinheitlichen, dazu wurde der Name myeloische Suppressorzellen (MDSCs, engl.: *myeloid-derived suppressor cells*) vorgeschlagen (111). Dieser Begriff hat sich bis heute durchgesetzt.

Die MDSCs sind eine heterogene Gruppe von unreifen hämatopoetischen Zellen, die unter bestimmten Bedingungen wie akuter oder chronischer Entzündung, Infektionen/Sepsis, Autoimmunerkrankungen, Traumata, Stress, Adipositas, Schwangerschaft und im Rahmen von Graft-versus-Host-Reaktionen expandieren (110, 112). Physiologisch wird die Myelopoese im Rahmen einer Immunantwort als Reaktion auf ein starkes Signal in Form von PAMP- (engl.: *pathogen-associated molecular pattern*) oder DAMP- (engl.: *danger-associated molecular pattern*) Molekülen aktiviert, wodurch es zur Phagozytose, zur Freisetzung von Sauerstoffradikalen und von proinflammatorischen Zytokinen kommt. Diese Prozesse enden

mit dem Wegfall des auslösenden Stimulus. Unter pathologischen Bedingungen kommt es zu einer permanenten Stimulation in niedriger Signalstärke, wodurch es zu einer permanenten Stimulation der Myelopoese kommt, in deren Rahmen vermehrt Zellen entstehen, die die potente Fähigkeit besitzen, verschiedene Arten der Immunantwort zu unterdrücken. Diese Mechanismen sind an der Schaffung und Aufrechterhaltung einer peripheren Toleranz beteiligt und schützen das Gewebe vor einer Schädigung durch eine überschießende Immunantwort (110).

Im Rahmen einer Tumorerkrankung kommt es in dem Organismus zu einer Ansammlung von MDSCs im Knochenmark, in den peripheren lymphatischen Organen und in der Tumormikroumgebung, wobei die Effekte, die sie bewirken, abhängig von ihrer Lokalisation sind (113).

2.11.3.2 MDSC-Subtypen und ihre phänotypische Charakterisierung

Bei den MDSCs unterscheidet man polymorphnukleäre (PMN-) MDSCs, die früher als granulozytäre (G-) MDSCs bezeichnet wurden, und monozytäre (M-) MDSCs. Die PMN-MDSCs teilen nicht nur ihren Ursprung, sondern auch phänotypische und morphologische Eigenschaften mit den physiologischen Neutrophilen, ähnlich verhält es sich bei den M-MDSCs und Monozyten (110, 114). PMN- und M-MDSCs haben wiederum nicht nur unterschiedliche phänotypische und morphologische Eigenschaften, sondern auch einheitliche und zum Teil überlappende funktionelle und biochemische Charakteristika, welche ihre unterschiedlichen Rollen unter variablen pathologischen Bedingungen reflektieren (107). Darüber hinaus wird eine dritte Subpopulation von MDSCs, die „*early-stage* (e-) MDSCs“ beschrieben. Diese weisen nicht die myeloischen linienspezifischen Marker der beiden anderen Subpopulationen auf (115). Sie stellen eine gemischte Gruppe von MDSCs dar, die aus einem größeren Anteil von unreifen Vorläufern bestehen (110) und sich auch funktionell und prognostisch von PMN- und M-MDSCs abgrenzen (115). Bei den meisten Krebsarten stellen die PMN-MDSCs ca. 80 % der MDSCs dar. Im Mausmodell wurden in verschiedenen Studien folgende Oberflächenmarker definiert: für PMN-MDSCs $CD11b^+Ly6G^+Ly6C^{lo}$ und für M-MDSCs $CD11b^+Ly6G^-Ly6C^{hi}$, wobei an weiteren Markern noch geforscht wird. Im menschlichen Organismus wurden folgende Oberflächencharakteristika beschrieben: für PMN-MDSCs $CD11b^+CD14^-CD15^+$ oder $CD11b^+CD14^-CD66b^+$ sowie $CD33^+$ und für M-MDSCs $CD11b^+CD14^+HLA-DR^{-/lo}CD15^-$ sowie $CD33^+$. Im Vergleich ist $CD33^+$ mehr bei M-MDSCs als bei PMN-MDSCs nachweisbar (110, 115). $CD10$ dient als Reifungs-Marker: reife/ $CD10^+$ beziehungsweise unreife/ $CD10^-$ neutrophile Granulozyten. Wobei in diesem Zusammenhang die $CD66^+CD10^+$ PMN-MDSCs die T-Zell-Proliferation und die $IFN-\gamma$ -Produktion durch die $CD18$ -vermittelte, kontaktabhängige Arginase I (ARG I)-Freisetzung inhibieren und die $CD66^+CD10^-$ PMN-MDSCs die Proliferation, das Überleben und die $IFN-\gamma$ -Produktion der T-Zellen, ebenfalls über einen $CD18$ -vermittelten, kontaktabhängigen Mechanismen, fördern (116). Angelehnt an diese in der Literatur erarbeiteten Marker wurden die Marker für diese Studie ausgewählt (siehe Material – Durchflusszytometrie).

Tabelle 5: Zusammenfassung der Phänotypen von MDSCs (110, 115, 117).

Kompartimente	Zellpopulation	Subpopulation	Phänotyp
Murines peripheres Blut	MDSCs	PMN-MDSCs	CD11b ⁺ GR1 ^{hi} LY6C ^{low} LY6G ⁺ CD49d ⁻
		M-MDSCs	CD11b ⁺ GR1 ^{mid} LY6C ^{hi} LY6G ⁻ CD49d ⁺
Humanes peripheres Blut	MDSCs	PMN-MDSCs	CD11b ⁺ CD14 ⁻ CD15 ⁺ oder CD11b ⁺ CD14 ⁻ CD66 ⁺ CD10 ⁺ oder CD11b ⁺ CD14 ⁻ CD66 ⁺ CD10 ⁻
		M-MDSCs	CD11b ⁺ CD14 ⁺ HLA-DR ^{-/low} CD15 ⁻

2.11.3.3 Expansion und Aktivierung von MDSCs

Myeloische Zellen sind durch eine ausgesprochene Plastizität charakterisiert. Dabei sind das umgebende Milieu und die löslichen Mediatoren dafür ausschlaggebend, ob eine Knochenmarkzelle ausreift und immunsupportiv wirkt oder in einem unreifen Zustand verbleibt und immunsuppressive Eigenschaften akquiriert (118). Neoplastische Zellen und das tumorassoziierte Stroma sezernieren multiple Faktoren, die das myeloische Kompartiment beeinflussen, darunter fallen Zytokine wie GM-CSF (engl.: *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), G-CSF (engl.: *granulocyte-colony stimulating factor*), M-CSF (engl.: *macrophage-colony stimulating factor*), SCF (engl.: *stem cell factor*), VEGF und IL-3, welche die Myelopoese fördern und gleichzeitig zur Blockade der myeloischen Zellreifung beitragen können. Lösliche Faktoren, die vom Tumor abstammen, wie zum einen die proentzündlichen Faktoren IL-1 β , IL-6, S100A8 und S100A9 und zum anderen die Zytokine IFN- γ , IL-4, IL-10 und IL-13, welche auch von aktivierten T-Zellen sezerniert werden, initiieren den immunsuppressiven Weg: unreife myeloische Zellen werden zu MDSCs, zu immunsuppressiven Makrophagen beziehungsweise DCs. Faktoren wie CCL2, CCL12, CXC-Chemokin-Ligand 5 (CXCL5), Prokineticin 2 (PROK2, BV8), S100A8 und S100A9, welche ebenfalls vom Tumor abstammen, locken unreife myeloische Zellen zum Tumorstroma. Dabei kommt gerade CCL2 beim KRK eine besondere Rolle zu, da gezeigt werden konnte, dass CCL2 eine Akkumulation von PMN-MDSCs sowie eine Steigerung von deren immunsuppressiver Funktion während der kolorektalen Karzinogenese bewirkt. Des Weiteren gehen gesteigerte Konzentrationen von CCL2 mit einer Progression des KRK einher (119).

Die Zytokine wirken zum Teil direkt auf die MDSCs, indem sie an die entsprechenden Rezeptoren auf der Oberfläche binden. Dies führt zu einer Aktivierung der Tyrosinkinase aus der Proteinfamilie der Janus-Kinasen (JAK), die wiederum Transkriptionsfaktoren der STAT-Gruppe phosphorylieren. Die Transkriptionsfaktoren der STAT-Gruppe beeinflussen die Transkription von Genen, die für die adaptive Immunantwort wichtig sind. Eine abnorme und persistierende Aktivität des STAT3-Signalweges durch die tumorassoziierten Faktoren, wie z.B. G-CSF, GM-CSF und VEGF, fördert zum einen die Proliferation von unreifen myeloischen Zellen und führt zum anderen zu einem Arrest der Differenzierung und zur Abwendung der Apoptose mittels einer gesteigerten Expression von Cyclin D1, c-Myc, Survivin und Bcl-xL

(120). Durch Induktion der NADPH-Oxidase 2- (NOX2-) (121) und ARG I-Expression (122) reguliert STAT3 direkt die immunsuppressive Wirkung von MDSCs, worauf im Abschnitt 2.11.3.5 weiter eingegangen wird. STAT3 induziert zudem die Genexpression von S100A8 und S100A9 aus der Familie der S100-Kalzium-bindenden Proteine, die mittels verschiedener Mechanismen eine wichtige Rolle im Rahmen von Entzündungsreaktionen einnehmen (114, 120). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Bindung von S100A8 und S100A9 an den carboxylierten N-Glykan-Rezeptor auf der Zelloberfläche von MDSCs die Migration dieser MDSCs zum Tumor fördern (123). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass TNF α ebenfalls über gesteigerte Expression von S100A8 und S100A9, welches an *N-glycan motif of the receptor for advanced glycation end products* (RAGE) bindet und über eine Signalkaskade den Transkriptionsfaktor NF- κ B (engl.: *nuclear factor `kappa-light-chain-enhancer` of activated B-cells*) aktiviert, die suppressive Aktivität von MDSCs fördern kann (124).

Bei Patienten mit einem KRK konnten im Bereich von Dysplasien und Adenomen vermehrt myeloische Vorläuferzellen nachgewiesen werden, welche S100A8 und S100A9 exprimieren (125). Die Produktion von IFN- γ , IL-4, IL-13, Liganden der Toll-like-Rezeptoren (TLR) und von TGF- β durch aktivierte T-Zellen und durch das Tumorstroma sorgt durch die Bindung an die entsprechenden Rezeptoren auf der Zelloberfläche von MDSCs für die Aktivierung von Signalkaskaden, welche die Transkriptionsfaktoren STAT6 und STAT1 ebenso wie NF- κ B miteinschließen (114, 126). Diese Aktivierung bewirkt eine Expansion von MDSCs und eine Immunsuppression unter anderem durch die gesteigerte Expression von ARG I und TGF- β , welche durch STAT6 (94) und durch die Aktivierung der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthetase (iNOS) über STAT1 vermittelt wird (127-129).

PGE₂, welches durch das Enzym Cyclooxygenase 2 (COX2) aus Arachidonsäure generiert wird, wird von vielen menschlichen Tumorzellen produziert. Hierbei fördert PGE₂ die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen in MDSCs, wodurch vermehrt MDSCs entstehen (130). Darüber hinaus unterstützt COX2 mittels vermehrter Produktion von PGE₂ die immunsuppressiven Eigenschaften von MDSCs, indem sie die ARG I-Aktivität induziert und steigert (131). T_H17-Zellen, die nach ihrem Leitzytokin IL-17 benannt wurden, sind besonders bei der Abwehr von extrazellulären Bakterien und Pilzen wirksam (132). IL-17 wirkt indirekt auf die Hämatopoese, indem seine Wirkung durch eine Zytokinkaskade durch Stromazellen vermittelt wird, an deren Ende als Antwort auf IL-17-Signale G-CSF und Chemokine freigesetzt werden. Bei Krebspatienten konnten ebenfalls erhöhte Spiegel an IL-17 nachgewiesen werden, die wiederum das intratumorale Vorkommen von MDSCs und die Aktivität von ARG I, COX2, Matrix-Metalloprotease (MMP) 9, MMP13 undIDO steigern (133). So konnte bei Patienten mit einem KRK eine vermehrte Produktion von IL-17, TNF α und GM-CSF durch $\gamma\delta$ T17-Zellen mit begleitender Akkumulation von PMN-MDSCs im Bereich des Tumors beobachtet werden (134).

Unter hypoxischen Bedingungen im Bereich des Tumors kommt es zu einer gesteigerten Produktion von *Hypoxia-inducible Factor-1 α* (HIF1 α) (135). Auch das Chemokin CCL5 ist in der Lage, die HIF1 α -Signalkaskade zu aktivieren, die wiederum eine gesteigerte Produktion von VEGF induziert. HIF1 α fördert durch Phosphorylierung und Aktivierung von STAT3 zudem

die vermehrte Expression von PD-L1 auf tumorinfiltrierenden MDSCs, wodurch der Tumor eine potentere supprimierende Aktivität akquiriert (136). Eine gesteigerte Expression von PD-L1 durch MDSCs ist zudem mit einer vermehrten Expression von ARG I und einer vermehrten Produktion von TGF- β assoziiert (113).

Die einzelnen Mechanismen beeinflussen beziehungsweise überlappen sich zum Teil gegenseitig, denn Hypoxie hat ebenfalls einen Einfluss auf die durch IFN- γ induzierte PD-L1-Expression (137). Neben STAT1, STAT3 und STAT6 ist noch ein weiterer Transkriptionsfaktor STAT5 in die Regulation von MDSCs involviert. Durch seine Aktivierung kommt es zur Inhibition von *Interferon Regulatory Factor 8* (IRF-8), wodurch darauffolgend die Differenzierung zu reifen myeloischen Zellen gehemmt und damit einhergehend die Expansion von MDSCs gefördert wird (138).

2.11.3.4 Immunmodulatorische Funktion von MDSCs

MDSCs nutzen eine Fülle an Mechanismen, um die erworbene und angeborene Immunantwort zu beeinflussen. Diese Mechanismen kann man in vier Klassen eingruppiert. Der erste Mechanismus wird durch die Wegnahme von Nährstoffen klassifiziert. Die Hydrolyse von L-Arginin durch die vermehrte Expression von ARG I durch M-MDSCs (139) sorgt für einen Verbrauch von L-Arginin. Das extrazelluläre L-Cystein, um das diverse Immunzellen konkurrieren, darunter MDSCs, antigenpräsentierende Zellen und T-Zellen, wird dem Extrazellulärraum durch MDSCs und antigenpräsentierenden Zellen entzogen. Diese myeloischen Zellen geben die Aminosäure wiederum nicht mehr in den Extrazellulärraum zurück, wodurch L-Cystein den T-Zellen nicht mehr zur Verfügung steht (140). Die Depletion der Aminosäuren L-Arginin und/oder L-Cystein führt zu einer Herunterregulation der ζ -Kette im TZR-Komplex und stoppt die Proliferation von antigenaktivierten T-Zellen (94).

Beim zweiten Mechanismus wird oxidativer Stress generiert. Dabei werden von der kombinierten und kooperativen Aktivität von NOX, ARG I und iNOS vermehrt reaktive Stickstoffspezies (RNS) wie Peroxynitrit und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie Wasserstoffperoxid produziert. Die reaktiven Spezies sorgen durch die Blockade von verschiedenen Molekülen in den T-Zellen ebenfalls für einen Expressionsverlust der ζ -Kette des TZR (141), einer Störung des IL-2-Rezeptorsignalweges (142) und einer Nitration des TZR (143). Dies beeinträchtigt die TZR/MHC-Interaktion und dadurch die Antigenerkennung durch die T-Zellen.

Eine Störung der Lymphozytenaktivität und ihrer Lebensfähigkeit – der dritte Mechanismus – wird durch die Expression von ADAM17 auf der Zelloberfläche von MDSCs erzeugt. ADAM17 sorgt für eine verringerte Expression von CD62L auf der Zelloberfläche von naiven CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, dies beeinträchtigt die T-Zell-Rezirkulation zu den Lymphknoten. Peroxynitrit modifiziert wiederum den CCL2, wodurch die Migration von CD8⁺ T-Effektorzellen zum Tumorkern beeinflusst wird (144). Des Weiteren exprimieren MDSCs Galectin 9, welches an TIM-3 (engl.: *T cell immunoglobulin and mucin-domain containing protein-3*) auf der Oberfläche von Lymphozyten bindet und somit die T-Zell-Apoptose induziert. Zudem werden durch weitere zellmembranabhängige Mechanismen die Anzahl an NK-Zellen reduziert und

die Funktion von NK-Zellen inhibiert. MDSCs exprimieren weitere hemmende Liganden, die zu der Familie der B7-Familie gehören, wie PD-L1 und PD-L2 (engl.: *programmed death-ligand 2*), wodurch sie ebenfalls zur Suppression der T-Zellen beitragen (139).

Der vierte Mechanismus betrifft die Aktivierung und Expansion der T_{reg}-Zellpopulation. MDSCs fördern die klonale Expansion von antigenspezifischen natürlichen T_{regs} (nT_{regs}) und induzieren die Umwandlung von naiven CD4⁺ T-Zellen in induzierte T_{regs} (iT_{regs}). Des Weiteren fördern humane MDSCs die Expansion von T_{regs} durch die Produktion von TGF- β , IL-10 (145) und Retinsäure (146). Die T_{regs} wiederum supprimieren die T-Effektorzellen (147).

2.11.3.5 MDSCs und Tumorprogression

Der Tumor und die MDSCs kommunizieren bidirektional miteinander, so sezernieren MDSCs, die durch Tumorzellen und das tumorassoziierte Stroma aktiviert werden, Chemokine, Zytokine und Enzyme (148), die zur Tumorprogression, -invasion und -metastasierung beitragen.

MDSCs sezernieren MMPs, insbesondere MMP9, welche durch eine Auflockerung der Basalmembran und der extrazellulären Matrix die Tumordinvasion fördern (149). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass MMP9 während der Tumorentstehung auch angiogen wirkt, indem es die Freisetzung von VEGF aus der extrazellulären Matrix fördert (150). Zusätzlich wird die VEGF-Freisetzung auch unter hypoxischen Bedingungen in der Tumormikroumgebung gesteigert (151). PROK2, welches ebenfalls von MDSCs produziert wird, fördert zudem die Angiogenese (152). Endotheliale Vorläuferzellen (engl.: *endothelial progenitor cells*, EPCs) sind ebenfalls in die Vaskulogenese des Tumors involviert, dazu sezerniert der Tumor VEGF, G-CSF oder GM-CSF (109).

Die Rekrutierung von MDSCs trägt zur lokalen Produktion von IL-6 und IL-11 bei, wodurch STAT3 aktiviert wird, was dazu führt, dass apoptotische und pro-proliferative Gene translatiert werden. Dies treibt die Tumorentstehung, -förderung und -progression voran (153, 154).

Ultraviolettes Licht sorgt bei Melanomen dafür, dass *high mobility group box 1* (HMGB1) durch Keratinozyten sezerniert wird, wodurch Neutrophile angezogen werden, welche die Migration von Tumorzellen zu den Endothelzellen fördern. Dabei wird die Rekrutierung über den TLR4 und die Migration durch den TNF vermittelt (155). Darauf formiert sich ein heterotoper Embolus aus Tumorzellen, Leukozyten und Thrombozyten, wobei die MDSCs die Größe des Embolus bestimmen, wodurch sie den Arrest des Embolus verbessern und die Tumorzellen vor einer Schädigung schützen. Hier spielen dann wiederum MMPs, Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (kurz uPA) und PROK2, die von den MDSCs und den Tumorzellen sezerniert werden, eine Rolle, da sie den Tumorzellen die Invasion aus dem Gefäß ins angrenzende Parenchym erleichtern (156). Dabei helfen auch NETs – *Neutrophil Extracellular Traps*, kurz NETs, die ein Netzwerk aus extrazellulären Fasern, die primär aus der DNA neutrophiler Granulozyten bestehen, darstellen –, die hohe Konzentrationen an MMP9 beinhalten können (157). Des Weiteren bereiten Neutrophile, vor allem PMN-MDSCs, organspezifische prämetastatische Nischen vor, um die Ausbildung von Metastasen zu erleichtern (158). Dies wird durch

Chemokine wie CXCL1, CXCL2 und CXCL5 vermittelt, welche alle an den gleichen Rezeptor, nämlich CXCR2 binden, wodurch MDSCs im Bereich des Tumors oder im Bereich der prämetastatischen Nischen akkumulieren (156). TGF- β , von den Tumorzellen und MDSCs sezerniert, steigert über autokrine und parakrine Effekte die Invasivität und Metastasenbildung von Tumoren. Dabei kann TGF- β die epithelial-mesenchymale Transition stimulieren, welche ein essentieller Bestandteil für die Migration und Metastasierung ist (159, 160).

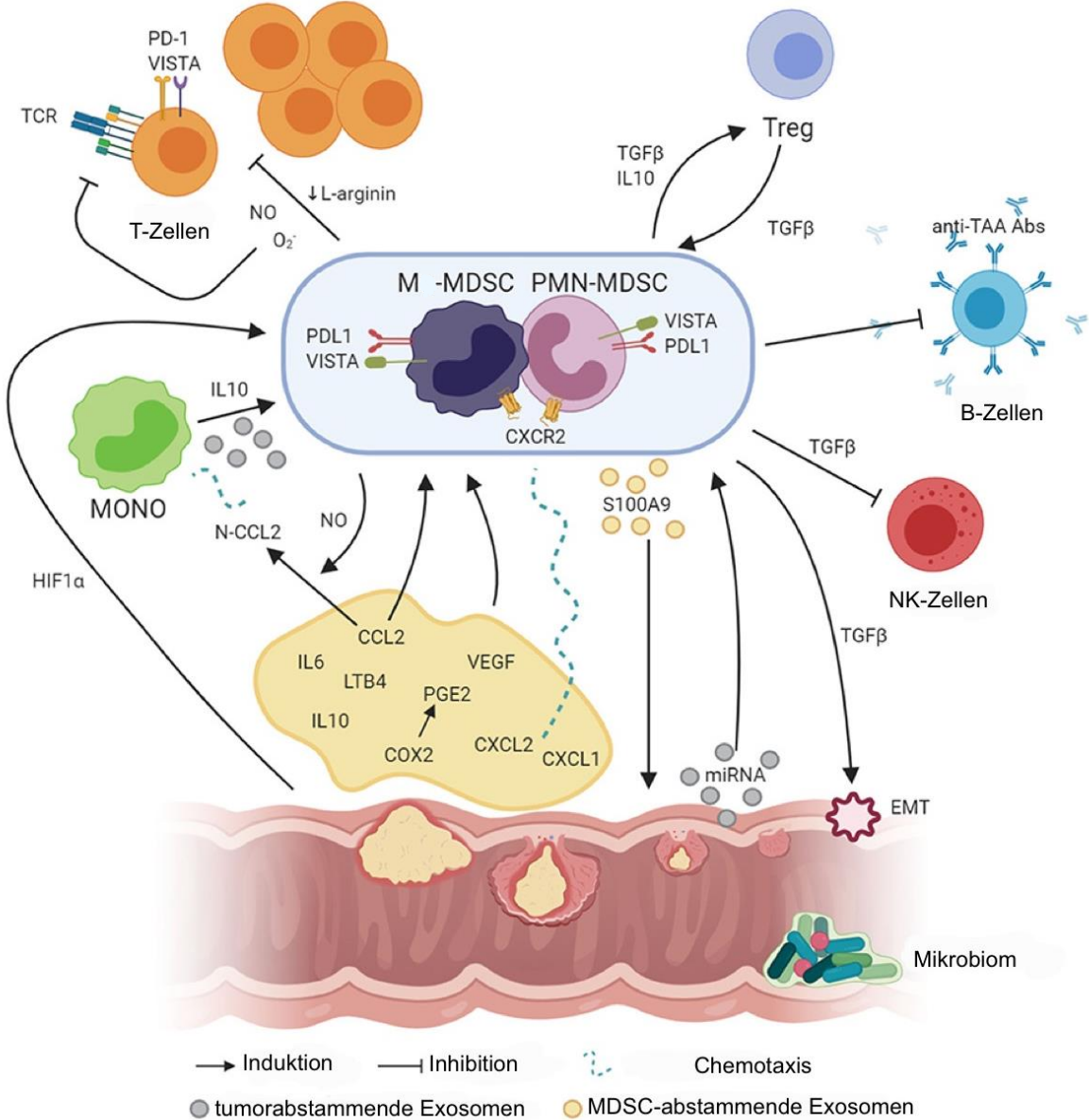


Abbildung 5: Kommunikation zwischen MDSCs und der Tumormikroumgebung. Bei der Induktion von MDSCs sind Faktoren wie PGE2, IL-6, IL-10 und Leukotrien B4 (LTB4) involviert. Dabei ist speziell IL-10 auch bei der Differenzierung von im peripheren Blut zirkulierenden Monozyten

zu M-MDSCs beteiligt. Weiterhin wird NO, das durch iNOS synthetisiert wird, für die Produktion von N-CCL2 aus CLL2 verwendet, welches als chemischer Lockstoff für Monozyten wirkt. Auch CXCL1 und CXCL2 rekrutieren durch die Bindung an den CXCR2 MDSCs zum Tumormikroenvironment. Parallel sezernieren PMN-MDSCs S100A9-Proteine, welche die Tumorprogression unterstützen. Des Weiteren finden sich in der Tumormikroumgebung biologisch aktive tumorbezogene Faktoren z.B. Proteine und miRNA, die durch den Tumor generiert werden und möglicherweise auch an der Induktion von MDSCs durch infiltrierende Monozyten beteiligt sind. Darüber hinaus bewirken ein hypoxisches Milieu und Hypoxie-bezogene Faktoren, wie z.B. HIF1 α ebenfalls eine Expression von suppressiven Molekülen wie VISTA oder PD-L1 auf der Oberfläche von MDSCs, die ihre Wirkung über den VISTA-Rezeptor und PD1 auf T-Zellen entfalten. Ebenso hat TGF- β , welches von MDSCs produziert wird, eine suppressive Wirkung, z.B. können MDSCs durch TGF- β den Übergang von Epithelzellen zu Mesenchymzellen (EMT) induzieren, der für die Metastasenbildung wesentlich ist, oder NK-Zellen hemmen. Überdies hat TGF- β zusammen mit IL-10 einen großen Einfluss auf die Induktion von T_{regs}. Dabei induzieren T_{regs}, die TGF- β produzieren, wiederum MDSCs im Sinne einer positiven Rückkopplungsschleife. Des Weiteren können MDSCs auch die Produktion von Antikörpern und T-Zellen hemmen, die gegen tumorassoziierte Antigene wie MUC1 gerichtet sind. Darüber hinaus inhibieren NO, O₂⁻ und eine niedrige Konzentration von L-Arginin, die durch die MDSC-Aktivität im Tumormikromilieu beeinflusst werden, die T-Zell-Proliferation. Zusätzlich kann NO selbst die TZR-Struktur modifizieren und die T-Zell-Apoptose induzieren. Modifiziert nach Sieminska und Baran (161).

2.11.4 T_{regs}

T_{regs} sind eine spezialisierte Untergruppe der T-Lymphozyten, deren physiologische Aufgabe unter anderem die Inhibition von potenziell schädlichen Immunreaktionen ist (81, 162). In der Peripherie machen sie etwa 5–10 % der CD4⁺ T-Zellen (81) aus und sind unter anderem durch eine starke Membran-Expression von CD25 (162) und intrazellulär durch den Transkriptionsfaktor FOXP3 (engl.: *forkhead box protein 3*) charakterisiert (163). In dieser Studie wurden sie als CD4⁺CD25⁺⁺CD127^{-/+} T-Zellen definiert. Die Existenz dieser Zellpopulation war lange Zeit umstritten. Erstmals berichteten in den 1970er Jahren mehrere Forscher von dieser Zellpopulation, wobei sie damals als Suppressorzellen bezeichnet wurden (164). Daraufaufgehend konnten die molekularen Wirkmechanismen ab Mitte der 1990er Jahre zuverlässig beschrieben und erklärt werden (165). Sie regulieren die Selbsttoleranz des Immunsystems, indem sie die Immunantwort begrenzen, und wirken somit bei der Verhinderung von Autoimmunität mit (81). Dies erreichen sie, indem sie die Aktivierung, die Proliferation und die Effektorfunktionen – wie z.B. Zytokinproduktion – von diversen Immunzellen, vor allem CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, NK- und natürliche Killer-T-Zellen (NKT-Zellen), B-Zellen und antigenpräsentierende Zellen, supprimieren (162). Dabei unterscheidet man zwei Varianten von T_{regs}. Zum einen die nT_{regs}, die im Thymus gebildet werden und auch als thymische T_{regs} (tT_{regs}) bezeichnet werden (81, 163), und zum anderen die induzierten T_{regs}, die in der Peripherie aus naiven CD4⁺ T-Zellen entstehen und deshalb auch periphere T_{regs} (pT_{regs}) genannt werden (81, 148, 166).

2.11.4.1 T_{regs} und Krebs

Im Zusammenhang mit malignen Erkrankungen wird in den letzten Jahren ein vermehrtes Vorkommen von T_{regs} im peripheren Blut von Patienten beschrieben. Zu diesen malignen Erkrankungen zählen z.B. Lungen- (167), Brust- (168), Ovarial- (169), Ösophagus- (170),

Magen- (171) und Nieren-Krebs (172) sowie hepatozelluläre Karzinome (173), Leukämien (174), Lymphome (175) und Melanome (176). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass T_{regs} nicht nur im peripheren Blut, sondern auch im Bereich des Tumors, vermehrt anzutreffen sind und dort Anteil an dem *tumor immune escape* haben (105). Darüber hinaus ist eine hohe Anzahl an T_{regs} im Tumormilieu prädiktiv für ein reduziertes Überleben (177) und für einen reduzierten Behandlungserfolg anzusehen.

Die Mechanismen, die in diesem Zusammenhang beschrieben und durch T_{regs} vermittelt werden, sind die Hemmung der Proliferation und Sekretion von Zytokinen durch Effektor-T-Zellen, die Förderung der B-Zell-Anergie und die Inhibition der Antikörperproduktion. Darüber hinaus hemmen sie die Expression kostimulatorischer Moleküle, antigenpräsentierender Moleküle und proinflammatorischer Zytokine durch antigenpräsentierende Zellen, wodurch sie deren Fähigkeit einer T-Zell-Antwort zu stimulieren, reduzieren (81). Ferner fördern T_{regs} den Tryptophan-Katabolismus mittels des IDO-Signalweges in antigenpräsentierenden Zellen, wodurch das immunsuppressive Produkt Kynurenin gebildet wird, welches auf Effektor-T-Zellen, supprimierend wirkt (siehe 2.11.2) (95, 105). Des Weiteren wird die T_{reg} -vermittelte Suppression von Effektor-T-Zellen sowohl durch lösliche Faktoren (TGF- β , IL-10, IL-35, Perforine und Granzyme) wie auch durch zellassozierte Moleküle (CTLA-4, LAG 3 (engl.: *lymphocyte-activation gene 3*), CD39 und Neuropilin-1) vermittelt (162, 178). Zudem wird durch die Bindung von IL-2 an den hochaffinen IL-2-Rezeptor (CD25), IL-2 der Umgebung entzogen, womit die T_{regs} die Aktivierung von Effektor-T-Zellen behindern und die Apoptose von Effektor-T-Zellen fördern. Indes sind T_{regs} auch in der Lage, Adenosin zu produzieren, welches an mehreren zellulären Funktionen von der Immunsuppression bis hin zur Regulation der Gefäßproliferation und anderer zellulärer Reaktionen beteiligt ist. Mittels der Ektonukleotidase CD39 wird extrazelluläres ATP zu ADP und AMP abgebaut und durch CD73 wird AMP weiter zu Adenosin umgewandelt. Dieses entstandene Adenosin bindet an den A2a Adenosinrezeptor auf den Effektor-T-Zellen und dämpft dadurch ihre Immunantwort, indem ihre Zellaktivierung, ihre Proliferation und ihre Produktion proinflammatorischer Moleküle gehemmt wird (162).

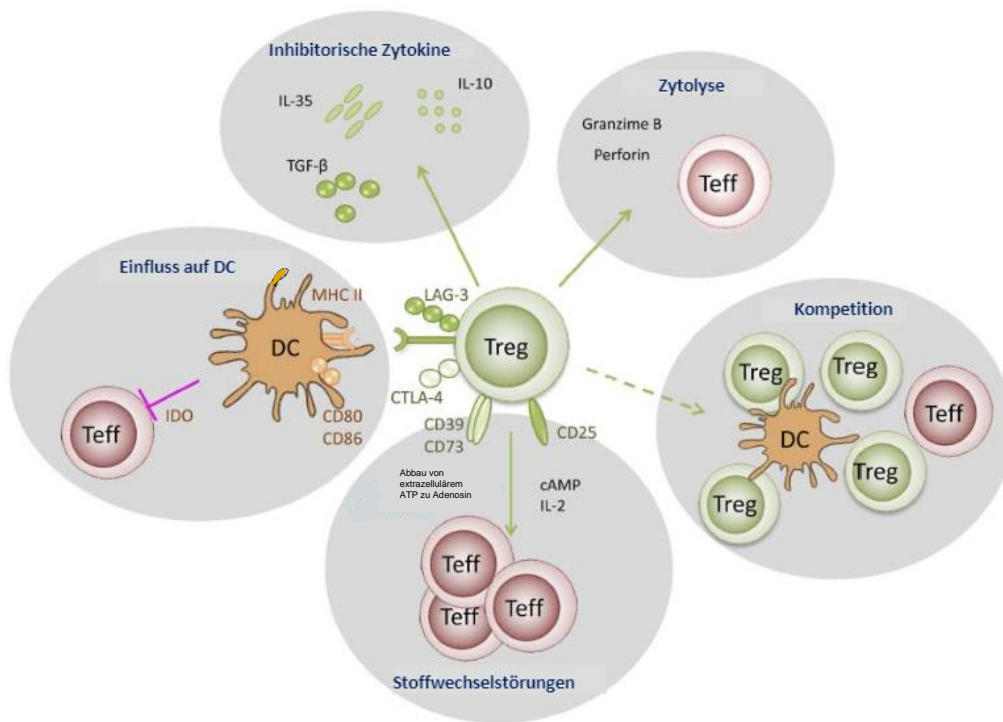


Abbildung 6: Funktionsmechanismen von T_{regs} (modifiziert nach (179)).

2.11.5 Strategien für immunologische Tumortherapie

Die Entwicklung der Checkpoint-Inhibitoren gilt zurzeit als einer der Durchbrüche in der Krebsimmuntherapie und ist einer der vielversprechendsten Therapieansätze. Über Feedback-Mechanismen wird die Immunantwort begrenzt, um eine überschießende Immunantwort zu verhindern. An dieser Negativregulation sind CTLA-4 und PD1 beteiligt. Durch die Blockade dieser Rezeptoren mittels mAK, wie z.B. Ipilimumab – anti-CTLA-4 mAK – und Pembrolizumab – anti-PD1 mAK –, bleibt das negative Feedback aus und die zielgerichtete Immunantwort bleibt weiterhin aktiv (180). Darüber hinaus wirkt sich eine Blockade dieser Rezeptoren auch auf die immunsuppressive Aktivität von MDSCs aus, da die ARG I-Expression gesenkt wird (113). Dennoch ist die Blockade der Immuncheckpoints nur ein Ansatz unter vielen, um die Immunogenität von Tumoren zu erhöhen und die Immuntoleranz zu überwinden. Im Folgenden sollen die maßgeblichen Therapieansätze erläutert werden. Dabei unterscheidet man aktive und passive sowie spezifische und unspezifische Arten der Immuntherapie (181).

2.11.5.1 Aktive Immuntherapie

Die Vakzinierung im Zusammenhang mit Krebserkrankungen zählt zur aktiven, spezifischen Immuntherapie (181) und wird in eine prophylaktische (präventive) und eine therapeutische

Vakzinierung unterteilt. Die prophylaktische Vakzinierung wird schon seit Jahren erfolgreich bei Krebserkrankungen viraler Genese eingesetzt. Dazu zählen zum einen die HBV (Hepatitis-B-Virus)- und zum anderen die HPV (humane Papillomaviren)-Impfung (182), deren Erfolg sich in den letzten Jahren herauskristallisiert hat (183). Die Entwicklung von therapeutischen Vakzinierungen, die das Ziel haben, die Anzahl der tumorspezifischen T-Zellen zu erhöhen und deren Rezeptoravidität zu steigern, birgt dabei eine größere Herausforderung, die es zu überwinden gilt. Zum einen müssen geeignete Antigene identifiziert werden, die eine Immunreaktion induzieren und die immunologische Toleranz durchbrechen, zum anderen müssen passende Adjuvanzen gefunden werden, die diesen Prozess verstärken. Dabei unterscheidet man verschiedene Ansätze von Vakzinen. Der Ganzzell-Impfstoff, der entweder autologe oder allogene Tumorzellen verwendet, wird mittels Bestrahlung, wiederholtem Einfrieren und Auftauen oder durch die Erzeugung von Lysaten weiter aufbereitet, um die Antigenbereitstellung zu maximieren. In Kombination mit immunologischen Adjuvantien injiziert, soll er eine Entzündungsreaktion auslösen, die antigenpräsentierende Zellen anlockt. Bei Peptid-Impfstoffen ist es entscheidend, das dominante Epitop von Tumorantigenen zu identifizieren, das zusammen mit dem passenden HLA-Molekül den T-Zellen präsentiert wird. Danach können große Impfstoffmengen hergestellt werden, die ebenfalls mit einem immunologischen Adjuvanz verabreicht werden. Allerdings ist der Impfstoff nur dann wirksam, wenn der Empfänger das passende HLA-Molekül besitzt, und letzteres weist innerhalb der Bevölkerung eine hohe Variabilität auf. Daneben gibt es noch Vakzinierungen, die sich viraler Vektoren, genetisch modifizierter Tumorzellen, DNA-Plasmiden oder der Fusion von Tumorzellen mit antigenpräsentierenden Zellen bedienen (184). Zudem gibt es noch die Möglichkeit des *Prime-Boost-Regimes*, bei dem verschiedene virale Vektoren eingesetzt werden, wenn der Organismus bereits eine humorale Immunantwort gegen den Vektor entwickelt hat, oder vielleicht sogar die Möglichkeit, eine Kombination aus verschiedenen Methoden anzuwenden, um die erwünschte Immunantwort zu generieren (185).

Zu den aktiven, nicht-spezifischen Immuntherapien zählen verschiedene Zytokine und BCG (*Bacille Calmette-Guérin*). Zytokine wirken physiologisch über autokrine und parakrine Effekte durch die Bindung an spezifische Rezeptoren. Dabei wurden IFN- α (13) und IL-2 zur Therapie von z.B. metastasierten Nierenzellkarzinomen und metastasierten malignen Melanomen eingesetzt (186). BCG wurde bereits 1976 zur Prävention eines Rezidivs des Urothelkarzinoms eingesetzt und ist auch heute noch eine Therapieoption beim nicht-muskelinvasiven Urothelkarzinom (186). Dabei soll BCG zum einen eine direkte Wirkung auf die Tumorzellen haben und zum anderen eine antitumorale Immunantwort induzieren (187).

2.11.5.2 Passive Immuntherapie

mAK zählen zu der passiven, spezifischen Immuntherapie. Dabei können sie unkonjugiert oder konjugiert mit chemischen oder radioaktiven Substanzen eingesetzt werden. Diese chemische Modifikation erleichtert die Lokalisation und Zerstörung der Tumorzellen. Mittlerweile haben sich zahlreiche mAK, wie z.B. Rituximab (anti-CD20 mAK), Trastuzumab (anti-HER2neu mAK) (186) und Bevacizumab (anti-VEGF mAK) in der Krebstherapie etabliert. Zur passiven, nicht-spezifischen Immuntherapie gehört der adoptive Zelltransfer, der schon früh therapeutische

Erfolge verzeichnen konnte (21, 188) und auch heute noch eine vielversprechende Therapieoption darstellt (189). Darunter fallen die Zytokin-aktivierten Killerzellen, LAK-Zellen, CAR-T-Zellen und tumorinfiltrierenden Leukozyten, welche patienteneigene Zellen darstellen, die ex vivo kultiviert, modifiziert und anschließend adoptiv transferiert werden (186).

2.12 LICC (engl.: *L-BLP25 in colorectal cancer*)-Studie

Die LICC-Studie ist eine randomisierte, doppelblinde, placebokontrollierte Phase-II-Studie, bei der insgesamt 121 Patienten mit kolorektalem Adenokarzinom im Stadium IV nach in kurativer Intention erfolgter Resektion von Lebermetastasen im Verhältnis 2:1 randomisiert wurden, um eine Behandlung mit L-BLP25 oder Placebo zu erhalten. Dabei wird L-BLP25/Placebo wöchentlich über acht Wochen verabreicht, gefolgt von einer Erhaltungsdosis alle 6 Wochen in den ersten zwei Jahren und alle 12 Wochen im dritten Jahr bis zum Rezidiv. Der primäre Endpunkt der Studie ist das rezidivfreie Überleben und die sekundären Endpunkte sind Gesamtüberleben, Sicherheit und Verträglichkeit (190, 191). Darüber hinaus wurden im Rahmen dieser Studie noch weitere Analysen wie z.B. die Charakterisierung der MUC1-Expression im Tumor, der Nachweis und die Quantifizierung der durch die L-BLP25-Vakzinierung aktivierten T-Zellen im Blut geimpfter Patienten und die Frequenz sowie der Phänotyp von MDSCs, von Effektor-T-Zellen sowie T_{regs} im peripheren Blut im Longitudinalverlauf (Woche 0, 9, 26, 50 und 98) durchgeführt. Die zuletzt genannte Analyse ist Bestandteil dieser Promotionsarbeit.

In der LICC-Studie waren die Ausgangscharakteristika der beiden Behandlungsgruppen (L-BLP25- und Placebo-Gruppe) weitgehend ausgeglichen. Das mediane rezidivfreie Überleben betrug 6,1 Monate (95 % KI 4,5–8,9) in der L-BLP25- und 11,4 Monate (95 % KI 3,7–21,2) ($p=0,1754$) in der Placebo-Gruppe und die 3-Jahres-Gesamtüberlebensrate belief sich auf 69,1 % in der L-BLP25- und 79,1 % in der Placebo-Gruppe. Das mediane Gesamtüberleben ergab 62,8 Monate (95 % KI 43,0 – n.a) in der L-BLP25-Gruppe und konnte für die Placebo-Gruppe zum Analysezeitpunkt noch nicht angegeben werden ($p=0,2141$). Darüber hinaus zeigten die Cox-Regressionsmodelle keinen Einfluss der MUC1-Expression auf das rezidivfreie oder Gesamtüberleben. Die häufigsten behandlungsbedingten Nebenwirkungen des Grades 3/4 im Zusammenhang mit L-BLP25 waren Durchfall, Anämie, Rückenschmerzen, Reaktionen an der Injektionsstelle und erhöhte Harnsäurewerte im Blut und im Zusammenhang mit dem Placebo Durchfall und Cholestase. Dabei wurden zwei Todesfälle im Kontext von behandlungsbedingten Nebenwirkungen in der L-BLP25-Gruppe dokumentiert, wobei einer in einem möglichen Zusammenhang mit der Vakzinierung steht (191).

Insgesamt zeigten die Patienten der LICC-Studie ein außergewöhnliches, verbessertes Überleben, auch wenn die Patienten der LICC-Gruppe im Vergleich zur Placebo-Gruppe keinen Nutzen durch die Behandlung für den primären Endpunkt rezidivfreies Überleben und den sekundären Endpunkt 3-Jahres-Gesamtüberlebensrate zeigten. Schimanski et al. brachte dies mit den besseren Parametern des Patientenkollektivs – jüngere Patientenkohorte und in 70 % der Fälle einen ECOG (engl.: *Eastern Cooperative Oncology Group*) Performance Status von 0 – sowie mit den besseren Tumorcharakteristika – mehr als 60 % der Patienten mit einem

Fong-Score von 0–2 und fast 90 % der Patienten mit R0-Resektion – in Verbindung (191). Darüber hinaus fand bei der LICC-Studie eine engmaschige Kontrolle der Patientenkohorte statt, indem die Patienten alle 12 Wochen während der Erhaltungstherapie für zwei Jahre untersucht wurden. Dies beinhaltete eine physikalische Untersuchung, eine Erhebung des ECOG Performance Status, eine Überprüfung der Vitalparameter, ein Labor und ein CT/MRT und eine Sonografie alle 6 Wochen. Dies sind weitere Parameter, die zum verlängerten Überleben beigetragen haben können. Des Weiteren könnten die selektiven Operationen der Lebermetastasen, die verbesserten Operationstechniken sowie ein verbessertes Ansprechen des Patienten auf die Therapie aufgrund einer kompletten Remission durch die sekundäre Resektion der Lebermetastasen zu einem längeren Überleben beigetragen haben (192). Diese Aspekte wurden beim Vergleich mehrerer Studien – CELIM- und FIRE-3-Studie –, die sich ebenfalls mit dem Überleben der Patienten nach sekundär resezierten Lebermetastasen beschäftigten, mit dem verbesserten Überleben in Einklang gebracht. Hierbei war die LICC-Studie, die aktuellste Studie und konnte von den Weiterentwicklungen und Verbesserungen der Therapien des KRK profitieren. Ein weiterer Punkt, der dabei herausgearbeitet werden konnte, war, dass die Überlebenszeiten in der LICC-Studie ab dem Zeitpunkt nach der Resektion der Lebermetastasen berechnet wurde und in der CELIM- und FIRE-3-Studie wurde das Überleben ab dem Zeitpunkt der neoadjuvanten Therapie berechnet. Somit kann davon ausgegangen werden, dass das Gesamtüberleben in der LICC-Studie im Vergleich zu den anderen Studien unterschätzt wurde (192). Mittlerweile sollte auch standardmäßig eine Bestimmung von RAS- und BRAF-Mutationen vor Einleitung der Erstlinientherapie erfolgen (55), wobei gerade Patienten mit einer RAS-Mutation, eine schlechtere Prognose aufweisen. Aus diesem Grund wurden in der CELIM- und FIRE-3-Studie nur Patienten mit KRAS-Wildtyp in die jeweilige Studie eingeschlossen, wohingegen bei der LICC-Studie der RAS-Mutationsstatus nicht untersucht wurde und somit auch Patienten mit RAS-Mutationen Teil des Studienkollektivs waren (192).

2.12.1 L-BLP25

Das in der Studie verwendete L-BLP25 ist ein therapeutischer Peptid-Impfstoff, der gegen das exponierte Kernpeptid MUC1 gerichtet ist. MUC1 ist ein transmembranöses muzinöses Glykoprotein, das weit verbreitet sowohl physiologisch auf normalem als auch pathologisch auf abnormalem Gewebe exprimiert wird. In diesem Rahmen ist es auf vielen epithelialen Tumoren und vor allem auch zahlreichen Adenokarzinomen überexprimiert. Biochemisch setzt sich MUC1 aus MUC1-N und MUC1-C zusammen. Dabei beinhaltet MUC1-N eine große NH₂-terminale Ektodomäne mit fünf potenziellen O-Glykosylierungsstellen an jeder seiner 20 Aminosäuren langen Tandem-Wiederholungen, die sich 20- bis 100-mal wiederholen können. MUC1-C besteht wiederum aus einer COOH-terminalen Domäne, welche eine kurze extrazelluläre Region, eine Transmembran-Ankerdomäne und einen zytoplasmatischen Schwanz aus 71 Aminosäuren enthält (193). Der zytoplasmatische Schwanz setzt sich aus hoch konservierten Serin- und Tyrosin-Resten zusammen, welche durch intrazelluläre Kinasen und Wachstumsfaktor-Rezeptoren phosphoryliert werden und dadurch Bindungsstellen für weitere Signalmoleküle wie PI3K, NF-κB, c-Src (engl.: *cellular and*

sarcoma) und β -Catenin darstellen (194). Durch zelluläre Transformation kommt es zu einem Verlust der Polarität von malignen Zellen, so dass MUC1 auch an der basolateralen Seite der Zelle exprimiert wird. MUC1 trägt so zur Tumorigenität (195), zur Tumorzellmigration (196, 197) und durch das Heraufregulieren der Expression des *Multidrug-Resistance*-Gens und -Proteins, insbesondere des *Multidrug-Resistance-Proteins 1* (MRP1, engl.: *multidrug-resistance-protein 1*), zur Resistenz gegenüber von Chemotherapeutika bei (198). Das MUC1-Antigen stellt somit ein attraktives Ziel für die Krebsimmuntherapie dar. Das BLP25-Lipopeptid und das Monophosphoryl-Lipid A (MPLA) sind mit der Lipiddoppelschicht koalitiert, die bei der Rehydratisierung des Trockenpulvers modelliert wird. Das nach der Rekonstitution gebildete Liposom vermittelt den aktiven Mechanismus von L-BLP25. Darüber hinaus ist nur die gesamte liposomale Formulierung, bei der das Antigen und das Adjuvans in die Lipiddoppelschicht integriert sind, in der Lage, die gewünschte Immunantwort gegen MUC1 zu induzieren. L-BLP25 wurde konzipiert, um eine zelluläre Immunantwort gegen MUC1-exprimierendes Tumorgewebe zu induzieren. Dabei soll es als Antwort auf das Peptid zu einer Proliferation von CD4⁺ T-Zellen kommen, die zusammen mit der Produktion von IFN- γ und der Aktivierung von CTLs MUC1-exprimierende Tumorzellen abtöten sollen. Hierbei dient das BLP25-Lipopeptid als spezifisches Antigen für die T-Zellantwort und das MPLA dient als Adjuvans zur Verstärkung der zellulären Antwort (190). Diese antigenspezifische T-Zell-Proliferation und IFN- γ -Sekretion konnten in Phase I- und II-Studien mit geringer Toxizität bestätigt werden (199, 200). Die erste Phase III-Studie mit L-BLP25 – START (engl.: *stimulating targeted antigenic responses to NSCLC*) – war eine randomisierte, placebokontrollierte, doppelblinde Studie mit 1.513 Patienten aus 33 Ländern, die sich hauptsächlich auf die kaukasische Bevölkerung konzentrierte (201). Sie bewertete die Sicherheit, Wirksamkeit und Verträglichkeit von L-BLP25 bei Patienten mit nicht resezierbarem, lokal fortgeschrittenem, nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC, engl.: *non small cell lung cancer*) im Stadium IIIA/IIIB ohne Progress bei initial kombinierter oder sequenzieller Radiochemotherapie. Hierbei zeigte sich kein statistisch signifikantes, längeres, medianes Überleben für die Patienten mit L-BLP25 und Cyclophosphamid im Vergleich zu den Patienten mit Placebo und physiologischer Kochsalzlösung (medianes Überleben: 25,6 Monate in der L-BLP25- gegen 22,3 Monate in der Placebo-Gruppe; $p=0,12$). Dennoch konnte bei einer Teilgruppe der Patienten – Patienten, die initial eine kombinierte Radiochemotherapie erhalten haben – ein um 10,2 Monate verlängertes, medianes Überleben (medianes Überleben: 30,8 Monate in der L-BLP25- und 20,6 Monate in der Placebo-Gruppe; $p=0,02$) in der L-BLP25-Gruppe nachgewiesen werden. Darauf folgend wurde eine neue Phase III-Studie START 2 initiiert, die sich wiederum auf die kaukasische Bevölkerung konzentrierte, um die Ergebnisse der START-Studie – das statistisch signifikante, längere, mediane Überleben bei Patienten mit initial kombinierter Radiochemotherapie – zu verifizieren (202). Dieser Effekt konnte in einer Studie mit japanischen Patienten mit nicht-resezierbarem Stadium III NSCLC ohne Krankheitsprogress nach primärer kombinierter Radiochemotherapie nicht bestätigt werden (203), sodass die laufenden Studien START 2 und INSPIRE eingestellt wurden. (204). Die INSPIRE-Studie konzentrierte sich auf Patienten aus der ostasiatischen Bevölkerung mit nicht resezierbarem, lokal fortgeschrittenem NSCLC im Stadium III (205).

Daneben liefen mehrere Phase II-Studien bei Patienten mit KRK (190), mit Rektumkarzinom (206), mit Prostatakarzinom (207) und mit Mammakarzinom (208). Beim Prostatakarzinom konnte eine Verzögerung der Verdopplungszeit des prostataspezifischen Antigens (PSA) in der L-BLP25-Gruppe beobachtet werden. Hier wurden hormonnaive Patienten mit biochemischem Versagen nach Prostatektomie und geringer Morbidität untersucht. Das Ergebnis könnte möglicherweise zu einem Aufschub der Hormontherapie führen (207). Beim Mammakarzinom wurde im Rahmen der prospektiven, randomisierten, offenen, zweiarmigen, multizentrischen Phase II-Studie ABCSG 34 (*Austrian Breast & Colorectal Cancer Study Group 34*) der Effekt einer zusätzlichen Immuntherapie mit dem Vakzin L-BLP25 untersucht. Dafür erhielt die Hälfte der Patientinnen, die alle eine moderne, präoperative Standardtherapie erhalten haben, die Immuntherapie. Die Standardtherapie beinhaltete dabei entweder eine Standard-Hormontherapie oder eine Standard-Chemotherapie in reverser oder normaler Sequenz. Das primäre Ziel war die Beurteilung der histopathologischen Reaktion auf die präoperative Standardbehandlung mit oder ohne L-BLP25-Immuntherapie gemessen am Residualtumor (RCB0/I versus RCBII/III) zum Zeitpunkt der Operation. Zu den sekundären Zielen gehörte die Beurteilung der pathologischen vollständigen Remission (ein Fehlen von invasiven Krebszellen in den chirurgischen Proben) bei Operationszeitpunkt, immunologische Parameter, Lebensqualität und Sicherheit. Durch die Gabe von L-BLP25 konnte keine Verringerung des Residualtumors oder eine komplette Remission im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden (208).

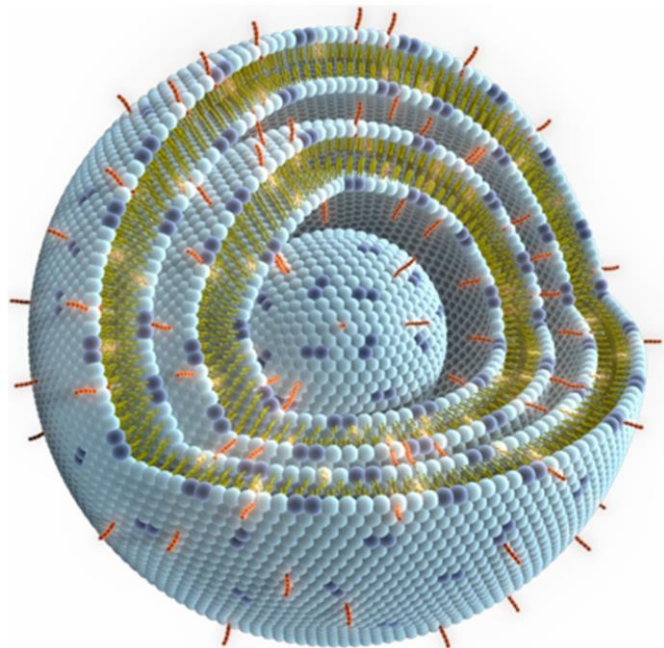


Abbildung 7: L-BLP25 (190)

2.13 Immunmonitoring

Durch den Fortschritt der Therapien, die erfolgreich die antitumorale Immunität modulieren und somit signifikant die Prognose von fortgeschrittenen Krebserkrankungen verbessern, wurde das Interesse geweckt, die zellulären und humoralen Mechanismen, die das Ansprechen und die Resistenz der Therapie beeinflussen, zu analysieren und zu verstehen. Deshalb wird die Messung pharmakodynamischer Marker häufig in klinischen Studien integriert. Dafür gibt es diverse Verfahren wie z.B. Immunhistochemie, Immunassays (209) oder Durchflusszytometrie (210). Ziel dieser Messungen ist es, zum einen das Verständnis zu verbessern und die Wirkungsweise zu bestätigen sowie festzustellen, ob Biomarker-Modulationen mit der klinischen Wirksamkeit korrelieren. Zum anderen sollen sie dazu beitragen, die Dosis-Wirkungs-Beziehung zu definieren und die möglichen Mechanismen der Therapieresistenz oder des *immune escape* zu identifizieren (211). Die Erkenntnisse, die man daraus gewinnt, können wiederum genutzt werden, um die Stärken und Schwächen einer Immuntherapie zu eruieren. Dadurch können sich neue wichtige Aspekte für die Entwicklung verbesserter Immuntherapien ergeben. Dieser Prozess wird in der Literatur als *immunoguiding* beschrieben (209). Dabei hat insbesondere die hochauflösende Analyse von Immunphänotypisierung und Einzelzellsignalprofilen das Potenzial, prognostische Marker, Biomarker und mögliche Reaktionsmechanismen aufzudecken (210).

Im Rahmen solcher Studien konnte zum einen Diaz-Montero et al. zeigen, dass verschiedene Chemotherapeutika sich unterschiedlich auf die MDSC-Frequenzen auswirken. Gemcitabin und Bevacizumab reduzierten die MDSCs, während Cyclophosphamid zu einer Zunahme der MDSCs führte (212). Zum anderen wurden z.B. im Rahmen einer Therapie mit dem Checkpoint-Inhibitor Atezolizumab die Dichte an CD8⁺ T-Zellen in der Tumormikroumgebung und die Expression von PD-L1 im Tumor mittels Immunhistochemie gemessen. Dabei konnten drei unterschiedliche (Immun-) Phänotypen in der Mikroumgebung des Tumors identifiziert werden, die mit dem Ansprechen der Therapie korrelieren. Eine bereits induzierte Immunantwort im naiven Gewebe war mit einem prädiktiven klinischen Nutzen assoziiert (211).

Die gewonnenen Biopsien von Patienten, die auf die Therapie ansprachen, zeigten eine bereits induzierte Immunität im naiven Gewebe und unter PD-L1-Hemmung waren sie durch eine erhöhte Dichte an proliferierenden intraepithelialen CD8⁺ T-Zellen gekennzeichnet. Dass diese CD8⁺ T-Zellen funktionell aktiv waren, zeigte sich durch eine erhöhte IFN- γ -Expression und eine gesteigerte Expression von PD-L1 durch die Tumorzellen und die tumorinfiltrierenden Lymphozyten. Die Patienten, die kein Ansprechen auf die Therapie mit Atezolizumab zeigten, ließen sich wiederum in zwei unterschiedliche Muster unterteilen. Zum einen fehlte eine nennenswerte Zunahme an CD8⁺ T-Zellen im Rahmen der Behandlung und die Tumore wiesen eine nicht funktionierende Immunantwort auf. Zum anderen führte die PD-L1-Inhibition zu einer Zunahme funktionell aktiver CD8⁺ T-Zellen, jedoch besaßen diese nicht die Fähigkeit, den Tumor zu infiltrieren (211). Diese Unfähigkeit der Infiltration wird des Weiteren auch bei Lebermetastasen von KRK beschrieben (213). Solche seriellen Probenentnahmen der Patienten liefern personalisierte Reaktionsprofile, die verwendet werden können, um die Behandlung in Echtzeit zu überprüfen beziehungsweise zu steuern (214).

Darüber hinaus wird der Erkenntnisgewinn vorausgegangener Studien genutzt, um bei der Entwicklung von synergistischen Kombinationen von Immuntherapeutika zu helfen. So untersuchen neuere Studienansätze die Kombination von Checkpoint-Inhibitoren und Krebsimpfstoffen. In diesem Zusammenhang konnte zum einen Fourcade et al. zeigen, dass durch die Impfung eine Hochregulation von PD1 auf spezifischen T-Zellen stattfindet (215) und zum anderen induzierte bei Fu et al. die T-Zellinfiltration eine intratumorale PD-L1-Expression (216). Diese vielversprechenden Ansätze sollen einen zusätzlichen klinischen Nutzen bieten.

2.14 Zielsetzung und Fragestellungen

Die anhaltend schlechte Prognose und die gravierenden Einschränkungen der Lebensqualität von Patienten mit fortgeschrittenem KRK verdeutlichen den akuten Bedarf an erfolgversprechenden Tumorthérapien. Ein Verständnissgewinn der Mechanismen, die zur Therapieresistenz führen und eine Analyse der daran beteiligten Akteure ist von entscheidender Bedeutung für die Verbesserung von Therapien. Das *immunomonitoring* bei Patienten mit KRK im Stadium IV nach in kurativer Intention erfolgter Resektion von Lebermetastasen im Rahmen der Vakzinierung mit L-BLP25 soll zu einem Verständnissgewinn der Mechanismen, die zur Therapieresistenz beitragen, führen und eine Analyse der daran beteiligten Akteure vornehmen.

Es war die Klärung folgender Fragestellungen zu Beginn dieser Arbeit von vordringlichem Interesse:

1. Wie verhalten sich die ausgewählten immunologisch relevanten Zelltypen über die Zeit in der Impf- & Kontrollgruppe?
2. Zeigen die ausgewählten Zelltypen in den beiden Gruppen ein unterschiedliches Verhalten?
3. Finden sich Korrelationen bestimmter Zell-Subpopulationen untereinander und mit wichtigen klinischen Parametern (Rezidive/Überleben)?

3 Materialien und Methoden

3.1 Studiendesign und Ablauf

3.1.1 Studiendesign

Es handelt sich um eine randomisierte, placebokontrollierte, multizentrische, binationale, doppelblinde Phase II-Studie (registriert bei ClinicalTrials. reg. Nr. NCT01462513), in deren Rahmen die Frequenz und der Phänotyp von MDSCs, von Effektor-T-Zellen und von T_{regs} im peripheren Blut im Longitudinalverlauf durch die AG Munder der Universitätsmedizin Mainz bestimmt wurden.

3.1.2 Ethikkommission, Fallzahlplanung und Aufklärung

Die Studie wurde gemäß der *Good Clinical Practice* sowie in Übereinstimmung mit den ethischen Standards des nationalen Forschungsausschusses und der Deklaration von Helsinki von 1964 und derer späteren Änderungen entworfen und durchgeführt. Das Studienprotokoll wurde von den Ethikkomitees der teilnehmenden Standorte und von dem Ethikausschuss der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz, Deutschland genehmigt.

Primär wurde eine Patientenzahl von 159 von 20 verschiedenen Zentren in drei Ländern geplant. Im Zeitraum von Oktober 2011 bis Dezember 2014 wurden 121 Patienten von 20 verschiedenen Zentren in zwei Ländern in die Studie eingeschlossen. Dies reichte aus, um den potenziellen Wirksamkeitstrend der untersuchten Population zu untersuchen.

Nach ausführlicher Aufklärung erfolgte die Einholung der schriftlichen, informierten Einwilligung. Darüber hinaus wurde eine regelmäßige Überwachung durch das *Data Safety Monitoring Board (DSMB)* während der Studie arrangiert, um die Sicherheit des Patienten und die Gültigkeit der Daten zu gewährleisten.

3.1.3 Ein- und Ausschlusskriterien

Die Patienten wurden im Verhältnis 2:1 zu der L-BLP25- oder zu der Placebo-Gruppe randomisiert und nach dem Resektionsstatus (R0/R1) stratifiziert. Der Einschluss beziehungsweise Ausschluss der Patienten erfolgte anhand folgender Kriterien:

Tabelle 6: Einschlusskriterien (die jeweils zu erfüllen sind)

<ul style="list-style-type: none">• Unterschriebene schriftliche Einverständniserklärung.
<ul style="list-style-type: none">• Männlich oder weiblich.
<ul style="list-style-type: none">• Mindestens 18 Jahre alt.
<ul style="list-style-type: none">• Patientinnen im gebärfähigen Alter (und gegebenenfalls männliche Patienten mit Partnerinnen im gebärfähigen Alter) müssen zur Anwendung einer angemessenen Verhütungsmethode für 4 Wochen vor, während und 12 Wochen nach der letzten Dosis der

<p>Studienmedikation bereit sein. Ein negativer Schwangerschaftstest ist für weibliche Probandinnen erforderlich. Angemessene Empfängnisverhütung für Frauen ist definiert als zwei Barrieremethoden oder eine Barrieremethode mit einem Spermizid oder Intrauterinpessar oder die Verwendung eines hormonellen Verhütungsmittels für die Frau. Für den Zweck dieser Studie sind Frauen im gebärfähigen Alter definiert als: „Alle weiblichen Probanden nach der Pubertät, es sei denn, sie sind seit mindestens zwei Jahren postmenopausal, chirurgisch steril oder sexuell inaktiv.“</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Histologisch bestätigte Diagnose eines Adenokarzinoms des Dickdarms oder Rektums mit vollständiger Resektion des Primärtumors und ohne Anzeichen eines lokalen Tumorrezidivs.
<ul style="list-style-type: none"> • Lebermetastasen mit kürzlich erfolgter (< 6 Wochen vor Randomisierung) Resektion (R0 oder R1) aller Lebermetastasen. Die Metastasektomie kann entweder synchron oder metachron erfolgt sein. Jegliche neoadjuvante Therapie darf maximal 3 Monate vor der Metastasektomie angewendet worden sein.
<ul style="list-style-type: none"> • Der Patient hatte innerhalb der letzten drei Monate vor Therapiebeginn eine Koloskopie oder Rektoskopie.
<ul style="list-style-type: none"> • Der Patient hat einen ECOG Leistungsstatus von 0 oder 1.
<ul style="list-style-type: none"> • Der Patient hat innerhalb von 2 Wochen vor Beginn der Therapie eine angemessene hämatologische, hepatische und renale Funktion, die sich durch Folgendes definiert: <ul style="list-style-type: none"> - Absolute Neutrophile > 1.500/mm³ und Thrombozyten > 140.000/mm³. - Bilirubin < 1,5 x Obergrenze des Normalwerts (ULN, engl.: <i>upper limit of normal</i>). - AST und ALT < 2,5 x ULN. - Kreatinin < 1,5 x ULN. - <i>International Normalized Ratio</i> (INR) und partielle Thromboplastinzeit (PTT) im Normbereich des örtlichen Labors.
<ul style="list-style-type: none"> • Bereitschaft, die Anforderungen des Studienprotokolls einzuhalten.

Tabelle 7: Ausschlusskriterien.

<ul style="list-style-type: none"> • Andere Metastasen als Lebermetastasen.
<ul style="list-style-type: none"> • R2 und RX resezierte Lebermetastasen. Patienten mit R1-resezierten Lebermetastasen können eingeschlossen werden, wenn eine weitere chirurgische Resektion nach Ansicht des Chirurgen als nicht indiziert oder erforderlich angesehen wird.
<ul style="list-style-type: none"> • Chemotherapie innerhalb von 4 Wochen vor der Randomisierung.
<ul style="list-style-type: none"> • Der Erhalt einer Immuntherapie (z.B. INF, TNF, IL oder Wachstumsfaktoren [GM-CSF, G-CSF, M-CSF], mAK) innerhalb von 4 Wochen (28 Tagen) vor der Randomisierung.
<ul style="list-style-type: none"> • Alle bekannten Autoimmunkrankheiten, vergangene oder aktuelle.
<ul style="list-style-type: none"> • Eine anerkannte Immunschwächekrankheit, einschließlich zellulärer Immunschwäche, Hypogammaglobulinämie oder Dysgammaglobulinämie sowie erbliche beziehungsweise angeborene Immundefekte.
<ul style="list-style-type: none"> • Bekannte oder neu diagnostizierte aktive Hepatitis-B- und/oder Hepatitis-C-Infektion, Autoimmunhepatitis, bekannte HIV (engl.: <i>human immunodeficiency virus</i>)-Infektion oder ein anderer infektiöser Prozess, der nach Ansicht des Untersuchers die Fähigkeit des Probanden beeinträchtigen könnte, eine Immunreaktion zu generieren oder die Wahrscheinlichkeit für ihn/sie durch die Therapie mehreren und/oder schwerwiegenden Nebenwirkungen ausgesetzt zu werden.

<ul style="list-style-type: none"> • Frühere oder aktuelle Vorgeschichte von anderen bösartigen Neoplasien als KRK, mit Ausnahme von kurativ behandeltem Hautkrebs (mit Ausnahme eines malignen Melanoms), von in-situ-Karzinomen des Gebärmutterhalses oder von anderen Krebsarten, die kurativ behandelt wurden und seit mindestens 5 Jahren keine Anzeichen einer Erkrankung aufweisen.
<ul style="list-style-type: none"> • Medizinische oder psychiatrische Bedingungen, die die Fähigkeit beeinträchtigen würden, eine Einverständniserklärung abzugeben, Nebenwirkungen mitzuteilen oder das Protokoll einzuhalten.
<ul style="list-style-type: none"> • Klinisch signifikante Herzerkrankung, z.B. Herzinsuffizienz der Klassen III–IV der <i>New York Heart Association</i>; unkontrollierte Angina pectoris, unkontrollierte Arrhythmie, unkontrollierter Bluthochdruck, Myokardinfarkt in den letzten 12 Monaten, bestätigt durch ein EKG.
<ul style="list-style-type: none"> • Splenektomie.
<ul style="list-style-type: none"> • Vorherige (weniger als 4 Wochen vor der Randomisierung) oder gleichzeitige Behandlung mit einem nicht zugelassenen Medikament.
<ul style="list-style-type: none"> • Schwangerschaft und Stillzeit.
<ul style="list-style-type: none"> • Teilnahme an einer anderen klinischen Studie innerhalb von 30 Tagen vor der Randomisierung.
<ul style="list-style-type: none"> • Bekannte Überempfindlichkeit gegen die Studienmedikamente.
<ul style="list-style-type: none"> • Bekannter Alkohol- oder Drogenmissbrauch.
<ul style="list-style-type: none"> • Geschäftsunfähigkeit oder beschränkte Geschäftsfähigkeit.
<ul style="list-style-type: none"> • Jeder andere Grund, der den Patienten nach Ansicht des Prüfarztes von der Teilnahme an dieser Studie ausschließt.

Der ECOG Performance Status, der Bestandteil der Einschlusskriterien war, liefert eine Skala und Kriterien, um den Krankheitsverlauf eines Patienten zu beurteilen. Dabei wird das Augenmerk auf die Auswirkungen der Krankheit auf die Fähigkeiten des Patienten im täglichen Leben gelegt, um eine angemessene Behandlung und Prognose festzulegen (217).

Tabelle 8: ECOG Performance Status (217).

Grad	ECOG Performance Status
0	Normale uneingeschränkte Aktivität wie vor der Erkrankung.
1	Einschränkung bei körperlicher Anstrengung, aber gehfähig; leichte körperliche Arbeit beziehungsweise Arbeit im Sitzen (z.B. leichte Hausarbeit oder Büroarbeit) möglich.
2	Gehfähig, Selbstversorgung möglich, aber nicht arbeitsfähig; kann mehr als 50 % der Wachzeit aufstehen.
3	Nur begrenzte Selbstversorgung möglich; 50 % oder mehr der Wachzeit an Bett oder Stuhl gebunden.
4	Völlig pflegebedürftig, keinerlei Selbstversorgung möglich; völlig an Bett oder Stuhl gebunden.
5	Tod.

Ein weiteres Einschlusskriterium war die Lebermetastasierung beziehungsweise die chirurgische Resektion der Lebermetastasen. Hierbei wurde der Fong-Score, der der präoperativen Abschätzung der Prognose bei Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen

dient, bestimmt. Er soll bei der Entscheidungsfindung hinsichtlich der chirurgischen Resektabilität der Metastasen behilflich sein. Es wird jeweils ein Punkt für folgende Kriterien vergeben:

Tabelle 9: Kriterien des Fong-Scores (218).

• Durchmesser der größten Lebermetastase in der Bildgebung > 5 cm
• Krankheitsfreies Intervall zwischen Resektion des Primärtumors und Diagnose der Lebermetastasen < 12 Monate
• Anzahl der Metastasen in der Bildgebung > 1
• Nodal positiver Primärtumor
• CEA präoperativ > 200 ng/ml

Dabei ergeben sich anhand des erreichten Punktwertes folgende Prognoseabschätzungen (218):

Fong-Score	5-Jahresüberleben
• 0–2	→ Ca. 50–60 %
• 3	→ 16 %
• 4	→ 8 %

3.1.4 Studienablauf und Zielgrößen

Nachdem von allen teilnehmenden Patienten die schriftliche Einverständniserklärung eingeholt worden war, bekamen die Patienten drei Tage vor der ersten Vakzine-Injektion 300 mg/m² Cyclophosphamid beziehungsweise physiologische Kochsalzlösung vor der ersten Placebo-Injektion injiziert, gefolgt von acht Vakzine-/Placebo-Injektionen in einer Dosis von 930 µg in wöchentlichen Abständen. Danach wurde die Vakzine/Placebo über zwei Jahre alle sechs Wochen verabreicht. Darauffolgend erhielten die Patienten die Vakzine/Placebo alle 12 Wochen für ein weiteres Jahr. Während der Behandlung wurde den Patienten zu fünf Zeitpunkten Blutproben entnommen: vor Behandlungsbeginn und nach 9, 26, 50 und 98 Wochen. Die entnommenen Blutproben wurden von den entsprechenden Zentren mittels temperaturgesicherten Transports bei Raumtemperatur in Sicherheitsboxen über Nacht in das zentrale Labor der AG Möhler der Universitätsmedizin Mainz gebracht und anschließend an die beteiligten Forschungsgruppen weiterverteilt. Im Durchflusszytometrie-Labor der III. Medizinischen Klinik erfolgte nach Ficollisierung die FACS-Analyse zur Bestimmung der immunreaktiven Zellpopulationen. Sämtliche Roh-Daten lagen zu Beginn der aktuellen Promotionsarbeit vor.

3.2 Materialien

3.2.1 Antikörper für die Durchflusszytometrie

IGG1 Maus Kontrollantikörper FITC	Beckman Coulter GmbH
IGG1 Maus Kontrollantikörper PE	Beckman Coulter GmbH
IGG1 Maus Kontrollantikörper ECD	Beckman Coulter GmbH
IGG1 Maus Kontrollantikörper PC5	Beckman Coulter GmbH
IGG1 Maus Kontrollantikörper PC7	Beckman Coulter GmbH
CD 10 FITC	Beckman Coulter GmbH
CD 11b FITC	Beckman Coulter GmbH
CD 127 PE	Beckman Coulter GmbH
CD 13 PC5	Beckman Coulter GmbH
CD 14 ECD	Beckman Coulter GmbH
CD 15 PE	Beckman Coulter GmbH
CD 25 FITC	Beckman Coulter GmbH
CD 28 FITC	Beckman Coulter GmbH
CD 3 PE	Beckman Coulter GmbH
CD 3 ECD	Beckman Coulter GmbH
CD 33 PC5 (D3HL60.251)	Beckman Coulter GmbH
CD 4 PE	Beckman Coulter GmbH
CD 4 PC5	Beckman Coulter GmbH
CD 45 RA FITC	Beckman Coulter GmbH
CD 45 RO PE	Beckman Coulter GmbH
CD 45 RO ECD	Beckman Coulter GmbH
CD 66b FITC	Beckman Coulter GmbH
CD 8 PC7	Beckman Coulter GmbH
HLA-DR PC5	Beckman Coulter GmbH
CD 45 RO FITC	Beckman Coulter GmbH
CD 45 RA PE	Beckman Coulter GmbH
Immunoprep	Beckman Coulter GmbH
Immuno Troll low Control	Beckman Coulter GmbH
Immuno Troll Control	Beckman Coulter GmbH
Iso Flow™ Sheath Fluid	Beckman Coulter GmbH
PC7 (779/488) SET UP KIT	Beckman Coulter GmbH
Quick Comb 4 Kit	Beckman Coulter GmbH
Flow Check Pro Fluospheres	Beckman Coulter GmbH
Flow Clean Cleaning Agent (Navios)	Beckman Coulter GmbH
Flow Set Pro Fluospheres	Beckman Coulter GmbH
7-AAD Viability Staining	Biologend

3.2.2 Geräte

Navios EX Flow Cytometer 10C/3L AU 40294 und AU 40296	Beckman Coulter GmbH
--	----------------------

3.2.3 Software

SWRE KIT, NAVIOS TETRA SOFTWARE V1.0 NEW USER	Beckman Coulter GmbH
SWRE KIT, NAVIOS ACQ NEW USER SOFTWARE V1.2	Beckman Coulter GmbH
Pack Office 2007 PRO (<i>german</i>)	Microsoft Corporation
SWRE KIT, KALUZA 3 USER BUNDLE	Beckman Coulter GmbH
IBM SPSS Software	IBM Deutschland GmbH
SAS 9.4	SAS Institute GmbH
R Version 4.1.2	R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria

3.3 Methoden

3.3.1 Blutentnahme und Transport

Die Blutentnahme erfolgte in den jeweiligen Zentren und wurde mittels temperaturgesichertem Transport bei Raumtemperatur in Sicherheitsboxen über Nacht in das zentrale Labor der AG Möhler der Universitätsmedizin Mainz gebracht.

3.3.2 Ficoll-Separation

Die Ficoll-Separation ist ein Verfahren zur Trennung mononukleärer Zellen (PBMC, engl.: *Peripheral Blood Mononuclear Cell*) und anderer Komponenten des peripheren Blutes aufgrund deren unterschiedlicher Dichte. Die Dichte des Ficoll liegt bei 1,077 g/ml. Zu den Zellen mit einer höheren Dichte zählen Erythrozyten und polymorphkernige Leukozyten (basophile, eosinophile und neutrophile Granulozyten). Eine niedrigere Dichte haben die PBMCs wie Lymphozyten, NK-Zellen und Monozyten. Als erstes wird das Vollblut in ein 50 Falcon/Greiner-Röhrchen gegeben und mit 25 ml PBS aufgefüllt. Danach wird in ein frisches Falcon/Greiner-Röhrchen (50 ml) 22,5 ml Ficoll pipettiert und das Probenmaterial auf das Ficoll vorsichtig überschichtet. Die Grenzschicht sollte nicht durchbrochen werden. Dann werden die Zellen in der Zentrifuge bei 1600 U/min (entspricht 800 g) über 20 min ohne Bremse zentrifugiert. Die Zellen an der Grenzschicht werden abpipettiert, in ein leeres 50 ml-Röhrchen überführt und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Die Probe wird gut resuspendiert. Danach werden die Zellen erneut in der Zentrifuge bei 1400 U/min (entspricht 700 g) über 5 min mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wird mit der Pipette abgenommen. Die Zellen werden dann je nach Zelldichte in 2–20 ml PBS aufgenommen. Die Gesamt-Zelldichte sollte ca. 1 Mio./100 µl betragen.

3.3.3 Durchflusszytometrie (*Fluorescence-Activated Cell Sorting, FACS*)

Die Durchflusszytometrie mittels *fluorescence activated cell sorting* (FACS) ist eine lasergestützte Methode zur Bestimmung verschiedener physikalischer Parameter von Partikeln, im Speziellen von Zellen. Die Partikel passieren einen Laserstrahl und derweil werden das daraus resultierende Streulicht und die Fluoreszenzemission detektiert und ausgewertet. Bei der Messung werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom durch eine Messzelle geführt und dabei fokussiert (hydrodynamische Fokussierung). In der Messzelle passieren die Zellen verschiedene Laser mit unterschiedlicher Anregungswellenlänge, welche die jeweiligen antikörpergekoppelten Fluorophore anregen. Während der Anregung absorbieren sie Lichtenergie in einem für sie charakteristischen Wellenlängenbereich und geben diese Lichtenergie in Form eines Photons wieder ab (Emission). Die emittierte Photonenkonzentration wird von einem Photodetektor registriert und verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern/Zelle. Zusätzlich zur Fluoreszenz wird bei der Passage das Streulicht (Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht) gemessen. Die Menge des gestreuten Lichts korreliert mit der Größe der Zelle und mit ihrer Granularität. Das Vorwärtsstreulicht erlaubt eine Aussage über das Zellvolumen und das Seitwärtsstreulicht erlaubt eine Aussage über die Zellgranularität. Die FACS-Analysen in der vorliegenden Arbeit wurden am Navios Flow Cytometer von Beckman Coulter durchgeführt. Das Messsystem ist mit einem blauen Laser (488 nm), einem roten Laser (638 nm) und einem violetten Laser (405 nm) ausgestattet. Die mAK, die in dieser Arbeit verwendet wurden, waren mit folgenden Fluorophoren konjugiert:

Emissionsmaximum

- FITC (Fluorescein isothiocyanate) → 525 nm
- PE (Phycoerythrin) → 575 nm
- R Phycoerythrin-Texas Red®-X (ECD) → 613 nm
- R Phycoerythrin cyanin 5.1 (PC5) → 670 nm
- Phycoerythrin Cyanin 7 (PC7) → 770 nm

3.3.4 Statistik

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte anhand des kommerziellen Statistikprogramms SAS® (*Statistical Analysis Systems*), Version 9.4. Im nachfolgenden Ergebnisteil werden die stetigen Merkmale als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD), Minimum und Maximum sowie Median angegeben. Der Vorteil des Medians liegt darin, dass er weniger anfällig gegenüber Ausreißern ist.

Um einen linearen Zusammenhang zwischen zwei metrischen Variablen zu überprüfen, wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet. Zudem ist zu beachten, dass der Korrelationskoeffizient r nach Pearson sehr ausreißeranfällig ist.

Mittels Cox-Regression wurde der gemeinsame Effekt mehrerer potenzieller Einflussgrößen auf das rezidivfreie Überleben und auf das Gesamtüberleben (*Overall Survival*) untersucht. Auf diese Weise erfolgte die Schätzung des Therapieeffektes auf die bereits genannten Zielvariablen, adjustiert für die anderen Einflussgrößen. Als Signifikanzniveau wurde 5 % gewählt, was bedeutet, dass p -Werte $< 0,05$ als signifikant gelten.

4 Ergebnisse

4.1 Patientenkollektiv

Die Studie basiert auf einem Patientenkollektiv von 121 Patienten (primäres Studienziel waren 159 Patienten) mit hepatisch metastasiertem KRK (siehe Einschlusskriterien), die in 20 Zentren in zwei Ländern behandelt wurden. Das mediane Alter aller Patienten zum Zeitpunkt des Therapiestarts lag bei 60 Jahren (Minimum 24, Maximum 85). Das mediane Alter in der L-BLP25-Gruppe zum Zeitpunkt des Therapiestarts betrug 60 Jahre (Minimum 24, Maximum 84) und in der Placebo-Gruppe 58,5 Jahre (Minimum 30, Maximum 85).

Tabelle 10: Übersicht über die Altersverteilung des Studienkollektivs.

	Alter bei Therapiestart aller Patienten (in Jahren)	Alter bei Therapiestart in L-BLP25-Gruppe (in Jahren)	Alter bei Therapiestart in Placebo-Gruppe (in Jahren)
Median	60	60	58,5
Minimum	24	24	30
Maximum	85	84	85

Davon waren im Gesamtkollektiv 45 Patienten weiblich (37,2 %) und 76 Patienten männlich (62,8 %). In der L-BLP25-Gruppe waren 30 Patienten weiblich (38,0 %) und 49 Patienten männlich (62,0 %) und in der Placebo-Gruppe waren 15 Patienten weiblich (35,7 %) und 27 Patienten männlich (64,3 %). Insgesamt wiesen im Gesamtkollektiv 102 Patienten Komorbiditäten (84,3 %) auf, wohingegen 19 Patienten keine Komorbiditäten (15,7 %) zu verzeichnen hatten. Die Verteilung in der L-BLP25-Gruppe gestaltete sich folgendermaßen: 66 Patienten hatten Komorbiditäten (83,5 %) und 13 Patienten keine (16,5 %). In der Placebo-Gruppe wiesen 36 Patienten Komorbiditäten auf (85,7 %) und 6 Patienten demonstrierten keine Komorbiditäten (14,3 %). Im Gesamtkollektiv wiesen 85 Patienten (70,2 %) einen ECOG Performance Status von 0 und 36 Patienten (29,8 %) von 1 auf. In der L-BLP25-Gruppe ergab sich bei 61 Patienten (77,2 %) ein ECOG Performance Status von 0 und bei 18 Patienten (22,8 %) ein ECOG Performance Status von 1. In der Placebo-Gruppe hatten 24 Patienten (57,1 %) einen ECOG Performance Status von 0 und 18 Patienten (42,9 %) einen ECOG Performance Status von 1.

Die Verteilung bezüglich des Fong-Scores gestaltetet sich im Gesamtkollektiv folgendermaßen: Es wurde im Gesamtkollektiv in 10,7 % der Fälle (n=13) ein Score von 0 vergeben, in 25,6 % der Fälle (n=31) ein Score von 1, in 29,8 % der Fälle (n=36) ein Score von 2, in 22,3 % der Fälle (n=27) ein Score von 3, in 10,7 % der Fälle (n=13) ein Score von 4 und in 0,8 % der Fälle (n=1) ein Score von 5. Die absolute sowie die prozentuale Aufteilung in die L-BLP25- und Placebo-Gruppe ist in Abbildung 8 sowie 9 für das Gesamtkollektiv grafisch dargestellt. Daraus ergab sich für die L-BLP25-Gruppe folgende Verteilung: Es wurde in 11,4 % der Fälle (n=9) ein Score von 0 festgelegt, in 24,1 % der Fälle (n=19) ein Score von 1, in

35,4 % der Fälle (n=28) ein Score von 2, in 20,3 % der Fälle (n=16) ein Score von 3, in 8,9 % der Fälle (n=7) ein Score von 4 und nie (n=0) ein Score von 5. In der Placebo-Gruppe ergab sich folgende Verteilung: Es wurde in 9,5% der Fälle (n=4) ein Score von 0 erhoben, in 28,6 % der Fälle (n=12) ein Score von 1, in 19,0 % der Fälle (n=8) ein Score von 2, in 26,2 % der Fälle (n=11) ein Score von 3, in 14,3 % der Fälle (n=6) ein Score von 4 und in 2,4 % der Fälle (n=1) ein Score von 5.

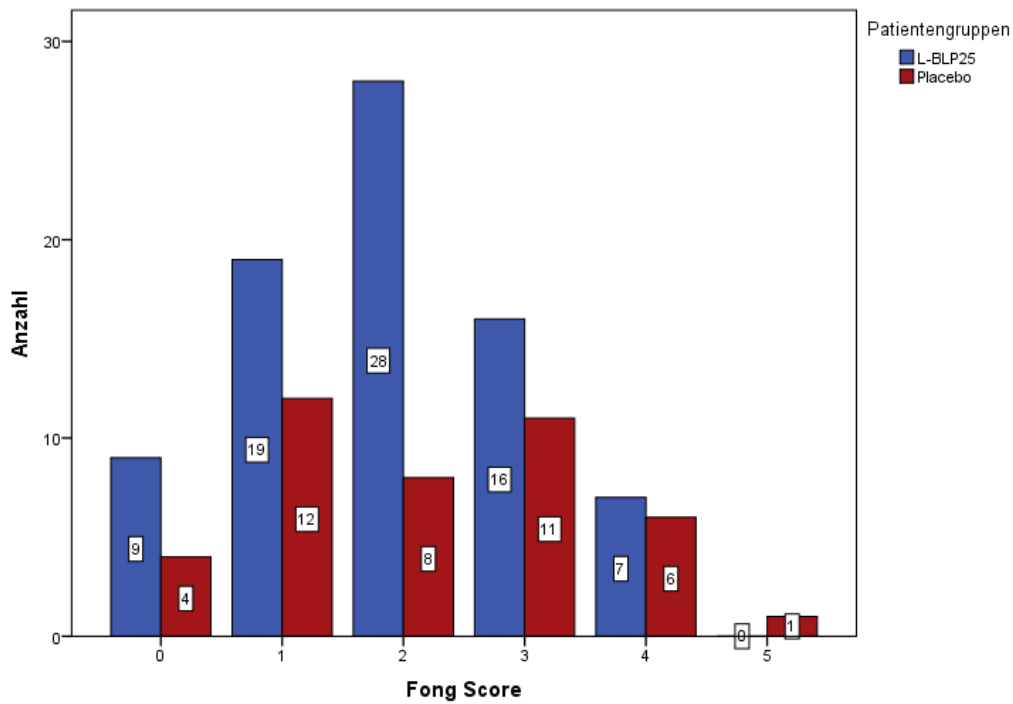


Abbildung 8: Graphische Darstellung der Fong-Score-Verteilung im Studienkollektiv (absolute Zahlen für das Gesamtkollektiv).

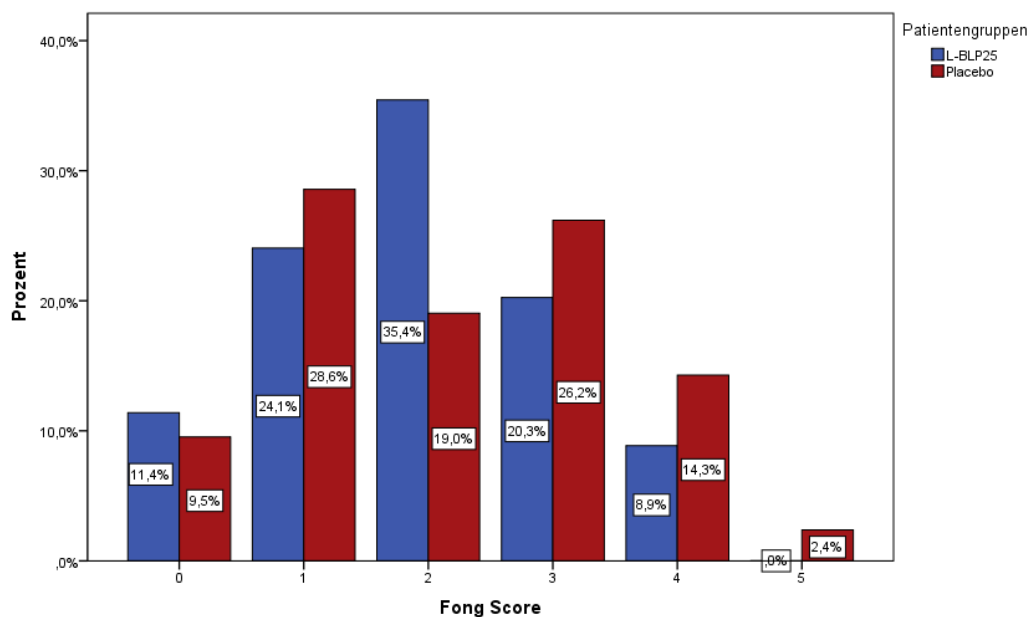


Abbildung 9: Graphische Darstellung der Fong-Score-Verteilung im Studienkollektiv (prozentuale Verteilung für das Gesamtkollektiv).

Zwischen dem Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zum Beginn der Vakzinierung lagen im Gesamtstudienkollektiv im Median 18,3 Monate (Minimum 0,9 Monate, Maximum 121,3 Monate). In der L-BLP25-Gruppe betrug die mediane Zeitspanne 20 Monate (Minimum 1,4 Monate, Maximum 121,3 Monate). In der Placebo-Gruppe ergab sich im Median ein Zeitraum von 12,6 Monaten (Minimum 0,9 Monate, Maximum 73,6 Monate).

Insgesamt erhielten 68,6 % der Patienten (n=83) vor der Vakzinierung eine Chemotherapie. Hingegen erfolgte bei 31,4 % der Patienten (n=38) vor der Vakzinierung keine Chemotherapie. In der L-BLP25-Gruppe bekamen 69,6 % der Patienten (n=55) vor der Vakzinierung eine Chemotherapie und bei 30,4 % der Patienten (n=24) entfiel die Chemotherapie vor der Vakzinierung. In der Placebo-Gruppe wurden 66,7 % der Patienten (n=28) vor der Vakzinierung mit einer Chemotherapie therapiert, bei 33,3 % der Patienten (n=14) erfolgte vor der Vakzinierung keine Chemotherapie. Eine adjuvante Chemotherapie ist im Stadium III eines Kolonkarzinoms oder eines Rektumkarzinoms im oberen Drittel indiziert und im Stadium II individuell zu erwägen. Im Gesamtkollektiv erfolgte bei 24,0 % der Patienten (n=29) vor der Vakzinierung eine Immuntherapie. Demgegenüber bekamen 76,0 % der Patienten (n=92) vor der Vakzinierung keine Immuntherapie. 26,6 % der Patienten (n=21) erhielten vor der Vakzinierung in der L-BLP25-Gruppe eine Immuntherapie und bei 73,4 % der Patienten (n=58) entfiel diese Immuntherapie. In der Placebo-Gruppe wurden 19,0 % der Patienten (n=8) vor der Vakzinierung mit einer Immuntherapie therapiert und 81,0 % der Patienten (n=34) erhielten hingegen keine.

Im Gesamtstudienkollektiv unterteilte sich die Lokalisationsverteilung der KRK folgendermaßen: Es lagen 9,9 % der KRK (n=12) im Colon ascendens, 4,1 % (n=5) im Colon transversum, 35,5 % (n=43) im Colon descendens, 39,7 % (n=48) im Rektum, 0,8 % (n=1)

traten multilokulär auf und bei 9,9 % der KRK (n=12) blieb die Lokalisation unbekannt. Unterscheidet man die L-BLP25- von der Placebo-Gruppe ergibt sich für die L-BLP25-Gruppe folgende Lokalisationsverteilung: 8,9 % der KRK (n=7) waren im Colon ascendens lokalisiert, 3,8 % (n=3) im Colon transversum, 31,6 % (n=25) im Colon descendens, 43,0 % (n=34) im Rektum, 1,3 % (n=1) traten multilokulär auf und bei 11,4 % der KRK (n=9) wurde die Lokalisation mit unbekannt angegeben. Die Lokalisationsverteilung in der Placebo-Gruppe war wie folgt: Es befanden sich 11,9 % der KRK (n=5) im Colon ascendens, 4,8 % (n=2) im Colon transversum, 42,9 % (n=18) im Colon descendens, 33,3 % (n=14) im Rektum, 0 % (n=0) traten multilokulär auf und bei 7,1 % der KRK (n=3) verblieb die Lokalisation unbekannt.

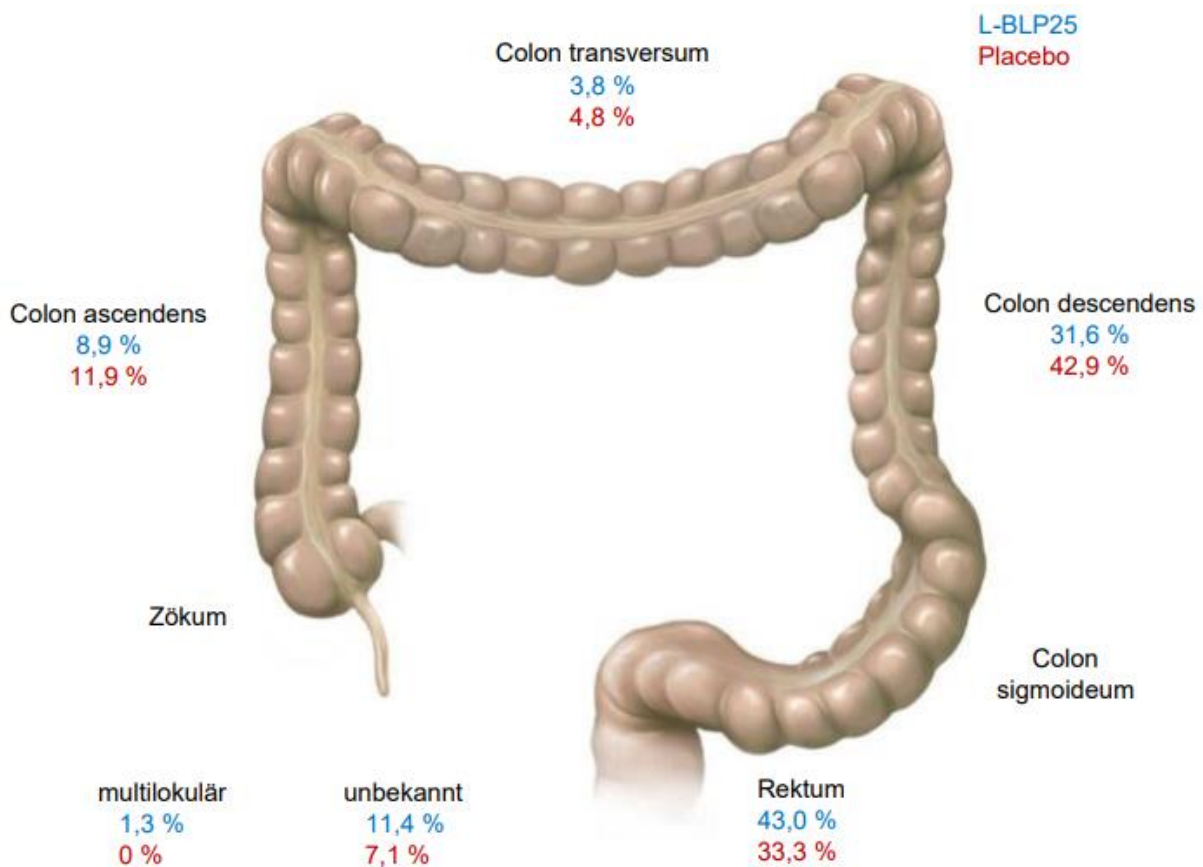


Abbildung 10: Lokalisationsverteilung der KRK im Vergleich beider Gruppen (modifiziert nach (58)).

Bei der Erstdiagnose lag im Gesamtkollektiv bei 1,7 % der Patienten (n=2) ein G1-Karzinom, bei 75,2 % der Patienten (n=91) ein G2-Karzinom, bei 16,5 % der Patienten (n=20) ein G3-Karzinom, bei 0,8 % der Patienten (n=1) ein G4-Karzinom vor und bei 5,8 % der Patienten (n=7) wurde ein GX vergeben. Für die L-BLP25- und die Placebo-Gruppe ergab sich hieraus folgende Verteilung: In der L-BLP25-Gruppe wurde in 1,3 % der Fälle (n=1) ein G1-Karzinom, in 77,2 % der Fälle (n=61) ein G2-Karzinom, in 13,9 % der Fälle (n=11) ein G3-Karzinom, in 0 % der Fälle (n=0) ein G4-Karzinom diagnostiziert und in 7,6 % der Fälle (n=6) wurde bei der

Graduierung ein GX angegeben. Wiederum in der Placebo-Gruppe wurden 2,4 % der KRK (n=1) als G1-Karzinom, 71,4 % der KRK (n=30) als G2-Karzinom, 21,4 % der KRK (n=9) als G3-Karzinom und 2,4 % der KRK (n=1) als G4-Karzinom graduert. In 4,8 % der Fälle (n=2) erfolgte die Graduierung mit GX.

Tabelle 11: Übersicht über die Graduierung der KRK im Studienkollektiv.

	L-BLP25-Gruppe		Placebo-Gruppe		Gesamtkollektiv	
	n	%	n	%	n	%
G1	1	1,3	1	2,4	2	1,7
G2	61	77,2	30	71,4	91	75,2
G3	11	13,9	9	21,4	20	16,5
G4	0	0,0	1	2,4	1	0,8
GX	6	7,6	2	4,8	7	5,8

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose wurden im Gesamtkollektiv folgende UICC-Stadien festgelegt: Es wurde in 2,5 % der Fälle (n=3) das Stadium I, in 9,1 % der Fälle (n=11) das Stadium II, in 25,6 % der Fälle (n=31) das Stadium III und in 53,7 % der Fälle (n=65) das Stadium IV vergeben. In 9,1 % der Fälle (n=11) blieb das Stadium unbekannt. In der L-BLP25-Gruppe ergab sich daraus folgende Aufteilung: Es wurde in 3,8 % der Fälle (n=3) das Stadium I, in 11,4 % der Fälle (n=9) das Stadium II, in 31,6 % der Fälle (n=25) das Stadium III und in 46,8 % der Fälle (n=37) das Stadium IV festgelegt. In 6,3 % der Fälle (n=5) war das Stadium unbekannt. Die Zusammenstellung in der Placebo-Gruppe sah wie folgt aus: Es wurde in 0 % der Fälle (n=0) das Stadium I, in 4,8 % der Fälle (n=2) das Stadium II, in 14,3 % der Fälle (n=6) das Stadium III und in 66,7 % der Fälle (n=28) das Stadium IV angegeben. In 14,3 % der Fälle (n=6) war das Stadium unbekannt.

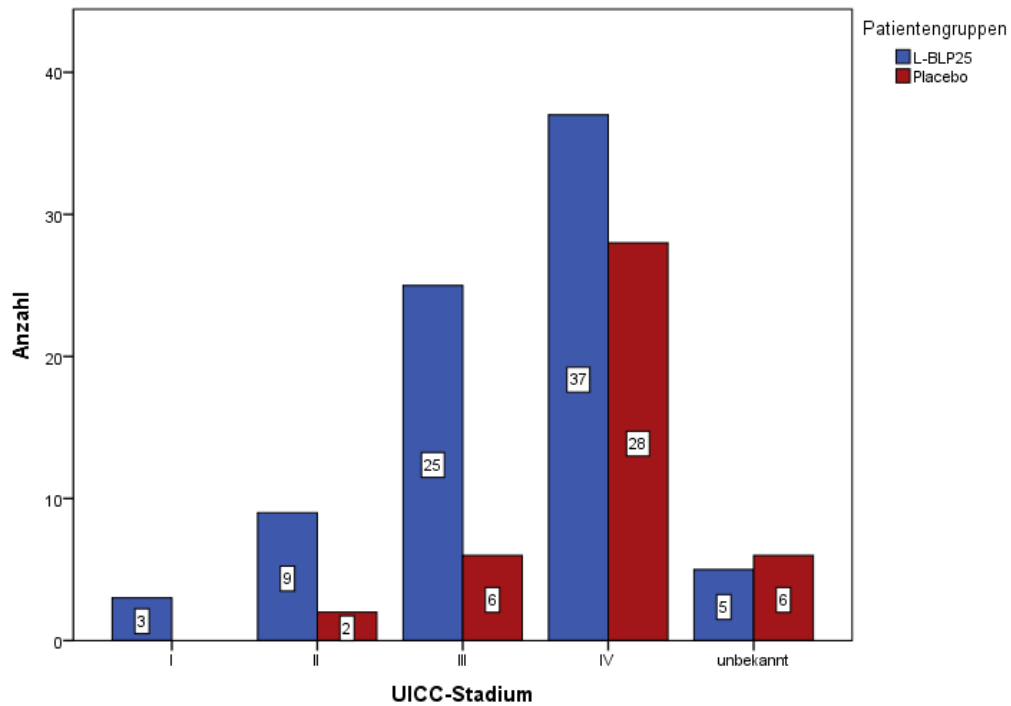


Abbildung 11: Graphische Darstellung der UICC-Stadien im Studienkollektiv (absolute Zahlen für das Gesamtkollektiv).

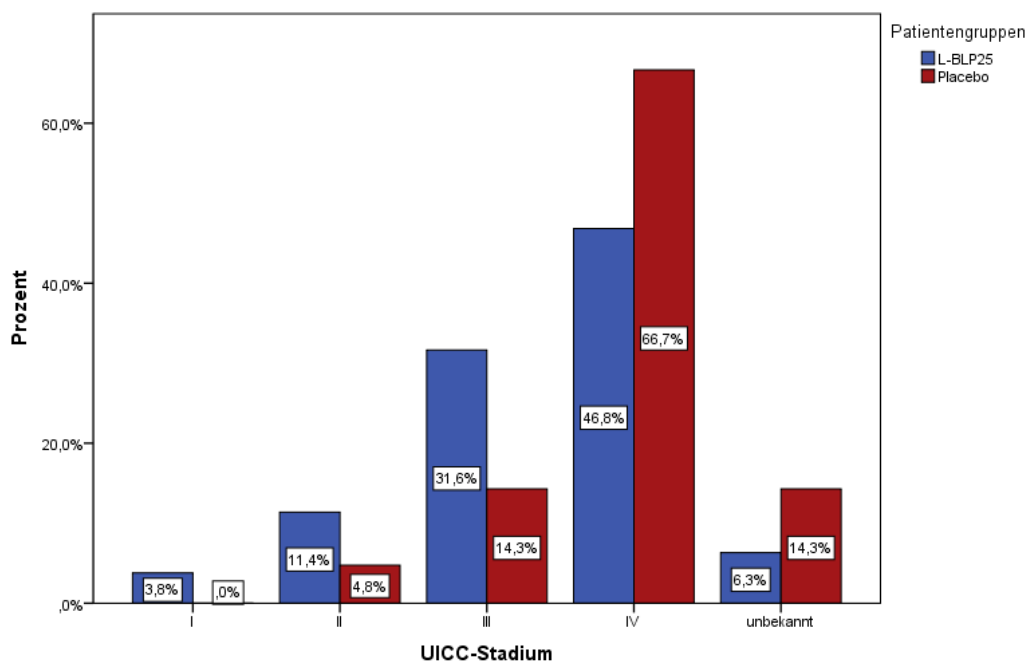


Abbildung 12: Graphische Darstellung der UICC-Stadien im Studienkollektiv (prozentuale Verteilung für das Gesamtkollektiv).

Insgesamt waren im Gesamtkollektiv 66,1 % der Fälle (n=80) primär resektabel und 33,9 % der Fälle (n=41) wurden sekundär reseziert. In der L-BLP25-Gruppe fand in 63,3 % der Fälle (n=50) eine primäre und in 36,7 % der Fälle (n=29) eine sekundäre Resektion statt. In der Placebo-Gruppe ergab sich in 71,4 % der Fälle (n=30) eine primäre und in 28,6 % der Fälle (n=12) eine sekundäre Resektibilität.

Es wurden im Gesamtkollektiv in 86,0 % der Fälle (n=104) weniger als fünf Metastasen reseziert, in 11,6 % der Fälle (n=14) waren es zwischen fünf und zehn Metastasen und in 2,5 % der Fälle (n=3) waren es mehr als 10 Metastasen. In der L-BLP25-Gruppe sah die Verteilung wie folgt aus: In 88,6 % der Fälle (n=70) fand eine Resektion von weniger als fünf Metastasen statt, in 10,1 % der Fälle (n=8) eine Resektion von fünf bis zehn Metastasen und in 1,3 % der Fälle (n=1) eine Resektion von mehr als zehn Metastasen. Dies verteilte sich in der Placebo-Gruppe folgendermaßen: In 81,0 % der Fälle (n=34) wurden weniger als fünf Metastasen reseziert, in 14,3 % der Fälle (n=6) zwischen fünf und zehn und in 4,8 % der Fälle (n=2) mehr als zehn.

Tabelle 12: Übersicht über die Anzahl der resezierten Lebermetastasen im Studienkollektiv.

Anzahl der resezierten Lebermetastasen	L-BLP25-Gruppe		Placebo-Gruppe		Gesamtkollektiv	
	n	%	n	%	n	%
< 5	70	88,6	34	81,0	104	86,0
5–10	8	10,1	6	14,3	14	11,6
> 10	1	1,3	2	4,8	3	2,5

Der Resektionsstatus für das Gesamtkollektiv wurde in 88,4 % der Fälle (n=107) als eine R0-Resektion, in 10,7 % der Fälle (n=13) als eine R1-Resektion und in 0,8 % der Fälle (n=1) als eine R2-Resektion festgelegt. In der L-BLP25-Gruppe wurde der Resektionsstatus wie folgt angegeben: In 87,3 % der Fälle (n=69) lag eine R0-Resektion, in 11,4 % der Fälle (n=9) eine R1-Resektion und in 1,3 % der Fälle (n=1) eine R2-Resektion vor. Die Verteilung in der Placebo-Gruppe sah wie folgt aus: In 90,5 % der Fälle (n=38) wurde eine R0-Resektion, in 9,5 % der Fälle (n=4) eine R1-Resektion und in keinem der Fälle (n=0) eine R2-Resektion festgelegt. Des Weiteren wurde im Gesamtkollektiv die MUC1-Expression wie folgt detektiert: In 13,2 % der Fälle (n=16) lag ein schwach positives Ergebnis, in 39,7 % der Fälle (n=48) ein mäßig positives Ergebnis und in 26,4 % der Fälle (n=32) ein kräftig positives Ergebnis vor. In 19,8 % der Fälle (n=24) war die MUC1-Expression nicht evaluierbar und in 0,8 % der Fälle (n=1) war sie nicht bestimmt worden. Die MUC1-Expression verteilt sich wie folgt auf die L-BLP25- und Placebo-Gruppe: In der L-BLP25-Gruppe wurde in 13,9 % der Fälle (n=11) MUC1 schwach, in 38,0 % der Fälle (n=30) mäßig und in 27,8 % der Fälle (n=22) kräftig exprimiert. In 20,3 % der Fälle (n=16) war eine Evaluierung nicht möglich und in 0 % der Fälle (n=0) fehlte die Angabe der MUC1-Expression. In der Placebo-Gruppe wurde in 11,9 % der Fälle (n=5) eine schwache, in 42,9 % der Fälle (n=18) eine mäßige und in 23,8 % der Fälle (n=10) eine

kräftige MUC1-Expression detektiert. In 19,0 % der Fälle (n=8) konnte kein valides Ergebnis erzielt werden und in 2,4 % der Fälle (n=1) erfolgte keine Bestimmung der MUC1-Expression.

Tabelle 13: Übersicht über die immunhistochemische MUC1-Expression im Studienkollektiv.

Immunhistochemische MUC1-Expression	L-BLP25-Gruppe		Placebo-Gruppe		Gesamtkollektiv	
	n	%	n	%	n	%
schwach	11	13,9	5	11,9	16	13,2
mäßig	30	38,0	18	42,9	48	39,7
kräftig	22	27,8	10	23,8	32	26,4
nicht evaluierbar	16	20,3	8	19,0	24	19,8
fehlend	0	0	1	2,4	1	0,8

4.2 FACS-Analysen

Zur Klassifizierung der MDSCs und anderer Zellpopulationen wurde eine Ficoll-Separation mit anschließender Durchflusszytometrie durchgeführt. Darauf folgte die Berechnung des absoluten Anteils an der Gesamtpopulation der in der Ficoll-Separation enthaltenen Zellen. Dies erfolgte mittels folgender Formel:

$$= \frac{\text{Totale Anzahl an der Gesamtsubpopulation in der Ficoll – Separation (in \%)} \times \text{Gegateter Anteil (in \%)} \times \text{Gesamtsubpopulation in der Ficoll – Separation (in \%)}}{100}$$

Hier wird der Übersicht halber nur auf die Variablen eingegangen, die im Vorfeld ausgewählt wurden. Bei der Auswahl wurde das Augenmerk sowohl auf die MDSCs, die T_{regs} als auch auf die Effektorzellen gelegt. Darüber hinaus wurden noch die CD15⁺ *low density* PMN und die CD3⁺ T-Lymphozyten sowie die CD3⁺ T-Lymphozyten und HLA-DR⁺CD14⁺ Monozyten zueinander ins Verhältnis gesetzt, um die „Neutrophilen/Lymphozyten-Ratio (NLR)“ und die „Lymphozyten/Monozyten-Ratio“ zu bestimmen. Dabei ist allerdings hervorzuheben, dass die Literaturangaben zum NLR und zum Lymphozyten/Monozyten-Ratio sich auf die Bestimmung im Vollblut beziehen und nicht auf die Bestimmung aus der Ficoll-Fraktion.

4.2.1 CD15⁺ low density PMN und CD10⁺CD15⁺ low density PMN

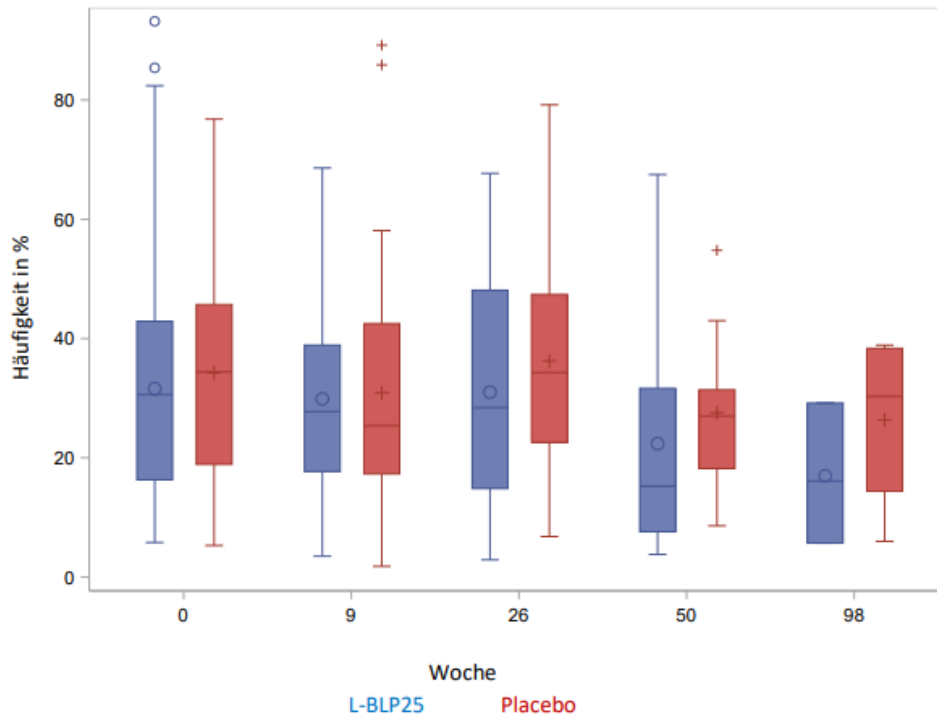


Abbildung 13: CD15⁺ low density PMN im zeitlichen Verlauf. Es sind der Median, der Mittelwert, die Standardabweichung sowie die Ausreißer im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe dargestellt.

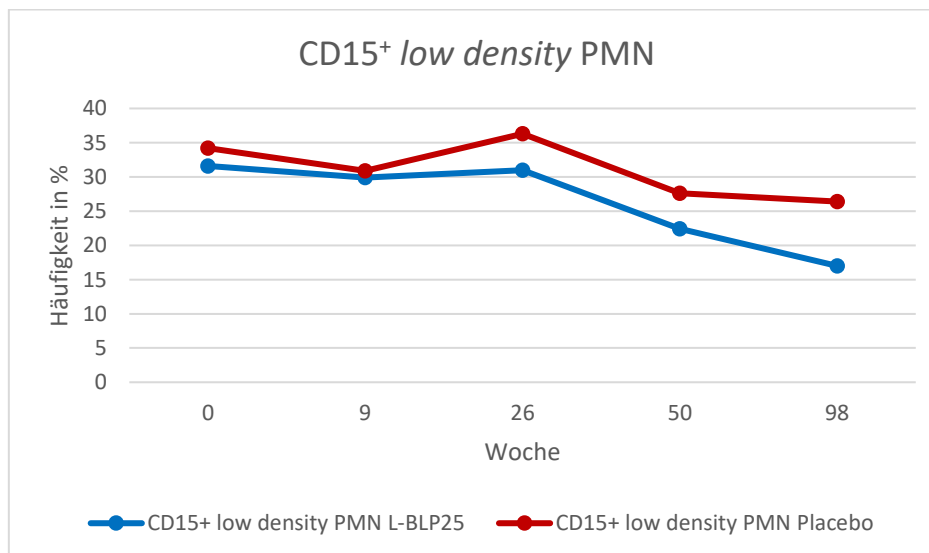


Abbildung 14: CD15⁺ low density PMN im Mittel und im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe.

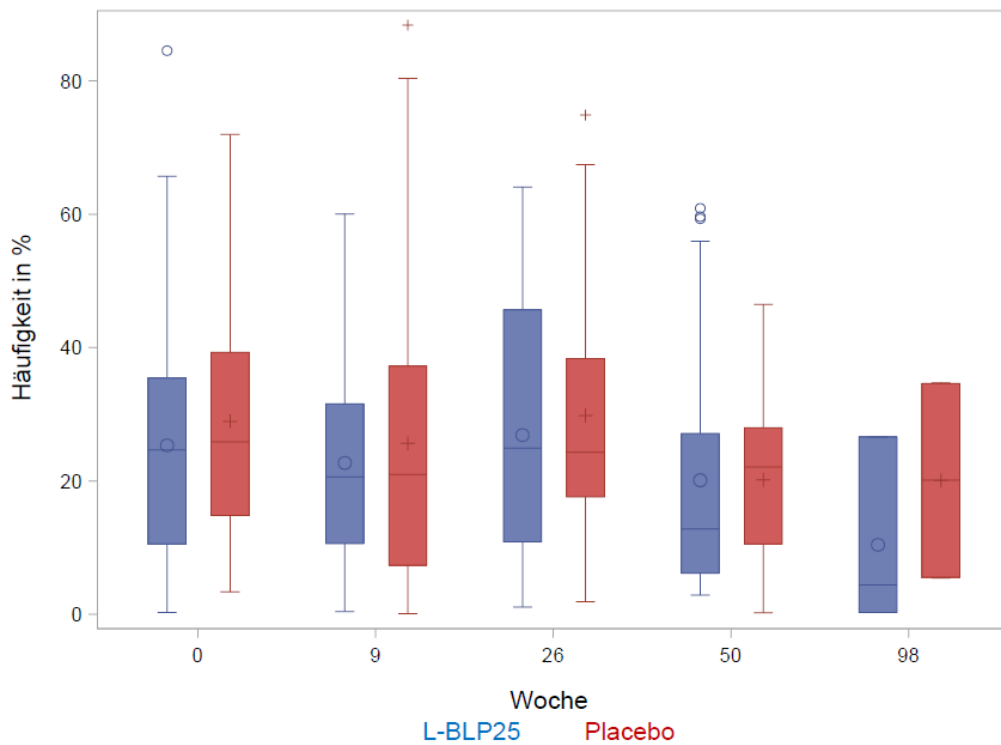


Abbildung 15: CD10⁺CD15⁺ low density PMN im zeitlichen Verlauf. Es sind der Median, der Mittelwert, die Standardabweichung sowie die Ausreißer im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe dargestellt.

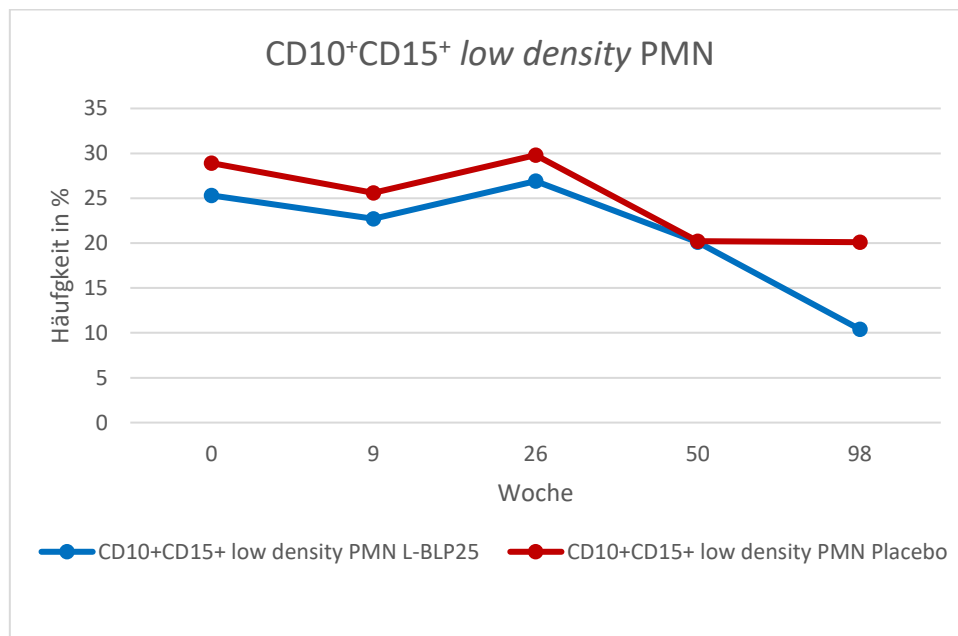


Abbildung 16: CD10⁺CD15⁺ low density PMN im Mittel und im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe.

Wie in Abbildung 13 bis 16 zu sehen ist, wiesen die CD15⁺ *low density* PMN sowie die CD10⁺CD15⁺ *low density* PMN im Mittel über die Zeit kontinuierlich höhere Werte in der Placebo- als in der L-BLP25-Gruppe auf und mit Ausnahme von Woche 26 nahmen die Werte dabei über die Zeit ab. Des Weiteren demonstrierten beide Subpopulationen sowie beide Patientengruppen über die Zeit ähnliche Verläufe. Insgesamt zeigten die Werte der untersuchten Variablen über die Zeit im gesamten Patientenkollektiv in beiden Gruppen eine breite Streuung mit mancherlei Ausreißern (mit z.B. Werten zwischen 0,3 % und 84,5 %, wobei das Konfidenzintervall (KI) zwischen 10,6 % und 35,4 % lag [siehe Anhang]). Dabei ist zudem zu beachten, dass die Anzahl an untersuchten Patienten über die Zeit von n=118 in Woche 0 hin zu n=7 in Woche 98 abnahm.

4.2.2 CD10⁺CD15⁺ PMN-MDSCs

Bei den CD10⁺CD15⁺ PMN-MDSCs in Woche 0 gestaltete sich die Verteilung für die Gesamtpopulation (n=118) wie folgt: mittlere Häufigkeit von 5,9 % ± 9,9 % (Minimum 0,3 %, Maximum 53,8 %, Median 2,6 %) und aufgeteilt in die L-BLP25-Gruppe (n=77) mit einer mittleren Häufigkeit von 6,3 % ± 10,8 % (Minimum 0,3 %, Maximum 53,8 %, Median 2,5 %) und in die Placebo-Gruppe (n=41) mit einer mittleren Häufigkeit von 5,3 % ± 7,9 % (Minimum 0,7 %, Maximum 48,5 %, Median 2,8 %). In Woche 9 wiesen die CD10⁺CD15⁺ PMN-MDSCs für die Gesamtpopulation (n=101) eine mittlere Häufigkeit von 6,5 % ± 9,8 % (Minimum 0,4 %, Maximum 68,2 %, Median 3,1 %) auf und eine detaillierte Betrachtung der L-BLP25- (n=66) und der Placebo-Gruppe (n=35) demonstrierte zum einen eine mittlere Häufigkeit von 7,2 % ± 11,2 % (Minimum 0,4 %, Maximum 68,2 %, Median 3,3 %) in der L-BLP25-Gruppe und zum anderen eine mittlere Häufigkeit von 5,3 % ± 6,4 % (Minimum 0,4 %, Maximum 24,9 %, Median 2,1 %) in der Placebo-Gruppe. Die mittlere Häufigkeit bei den CD10⁺CD15⁺ PMN-MDSCs in Woche 26 in der Gesamtpopulation (n=65) belief sich auf 5,0 % ± 8,2 % (Minimum 0,2 %, Maximum 53,1 %, Median 2,8 %). Getrennt betrachtet, zeigte sich in der L-BLP25-Gruppe (n=40) eine mittlere Häufigkeit von 4,1 % ± 4,9 % (Minimum 0,4 %, Maximum 29,2 %, Median 2,6 %) und in der Placebo-Gruppe (n=25) eine mittlere Häufigkeit von 6,4 % ± 11,8 % (Minimum 0,2 %, Maximum 53,1 %, Median 2,8 %). Die CD10⁺CD15⁺ PMN-MDSCs zeigten in Woche 50 in der Gesamtpopulation (n=47) eine mittlere Häufigkeit von 4,3 % ± 7,4 % (Minimum 0,0 %, Maximum 42,8 %, Median 2,0 %). Aufgeteilt auf die L-BLP25-Gruppe (n=28) gelang eine mittlere Häufigkeit von 2,3 % ± 2,4 % (Minimum 0,0 %, Maximum 9,5 %, Median 1,2 %) und in der Placebo-Gruppe (n=19) eine mittlere Häufigkeit von 7,4 % ± 10,8 % (Minimum 1,0 %, Maximum 42,8 %, Median 2,7 %) zur Darstellung. Die Gesamtpopulation (n=7) der CD10⁺CD15⁺ PMN-MDSCs wies in der Woche 98 eine mittlere Häufigkeit von 6,4 % ± 7,0 % (Minimum 0,6 %, Maximum 17,1 %, Median 3,1 %) und eine genauere Betrachtung der L-BLP25- (n=3) und der Placebo-Gruppe (n=4) legte zum einen eine mittlere Häufigkeit von 6,6 % ± 8,0 % (Minimum 1,3 %, Maximum 15,8 %, Median 2,6 %) in der L-BLP25-Gruppe und zum anderen eine mittlere Häufigkeit von 6,3 % ± 7,4 % (Minimum 0,6 %, Maximum 17,1 %, Median 3,7 %) in der Placebo-Gruppe dar (siehe Abbildung 17 und 18).

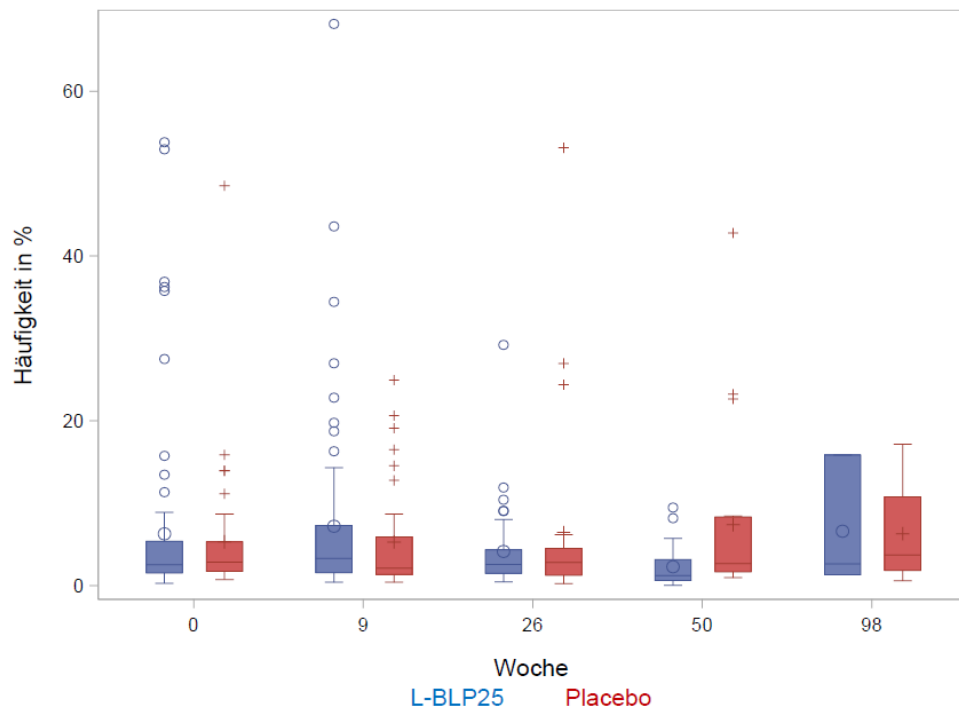


Abbildung 17: CD10⁻CD15⁺ PMN-MDSCs im zeitlichen Verlauf. Es sind der Median, der Mittelwert, die Standardabweichung sowie die Ausreißer im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe dargestellt.

Zusammengefasst zeigten die CD10⁻CD15⁺ PMN-MDSCs im Mittel tendenziell in der L-BLP25-Gruppe etwas höhere Werte als in der Placebo-Gruppe, ausgenommen die Wochen 26 und 50, in denen es sich umgekehrt verhält. Dabei liegen außer in Woche 50 die Werte der L-BLP25- und Placebo-Gruppe ungefähr in der gleichen Größenordnung (Diese Daten ließen erstmals nur Tendenzen erkennen, die Auswertung bezüglich statistisch signifikanter Unterschiede lag derzeit noch nicht vor).

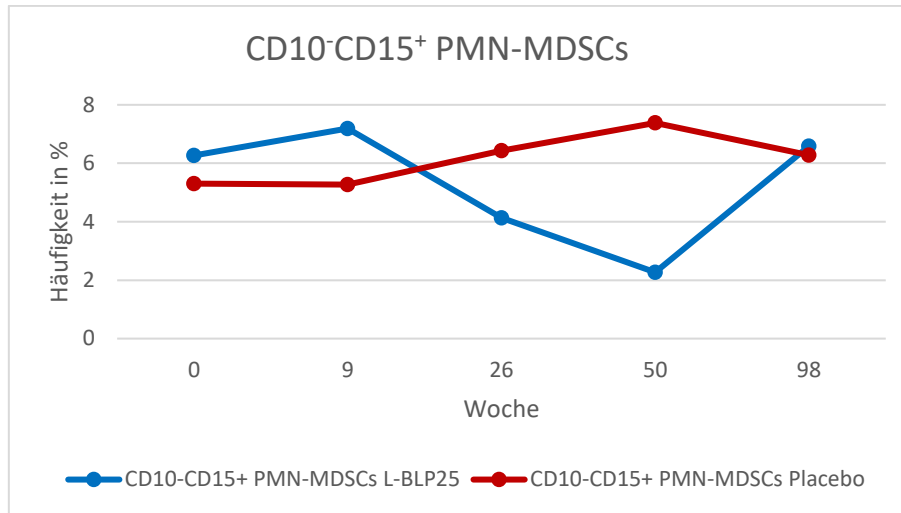


Abbildung 18: CD10⁻CD15⁺ PMN-MDSCs im Mittel und im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe.

4.2.3 HLA-DR⁺CD14⁺ Monozyten und HLA-DR⁻CD14⁺ M-MDSCs

Die HLA-DR⁺CD14⁺ Monozyten behielten über die Zeit einen relativ konstanten Mittelwert. Wobei in Woche 0, 9 und 26 der Mittelwert der Placebo-Gruppe geringfügig höher lag als in der L-BLP25-Gruppe und in Woche 50 und 98 lagen die Mittelwerte in der L-BLP25-Gruppe etwas höher als in der Placebo-Gruppe. Dabei zeigt sich, wie in Abbildung 19 und 20 dargestellt, ein leichter Anstieg der HLA-DR⁺CD14⁺ Monozyten nach Woche 26.

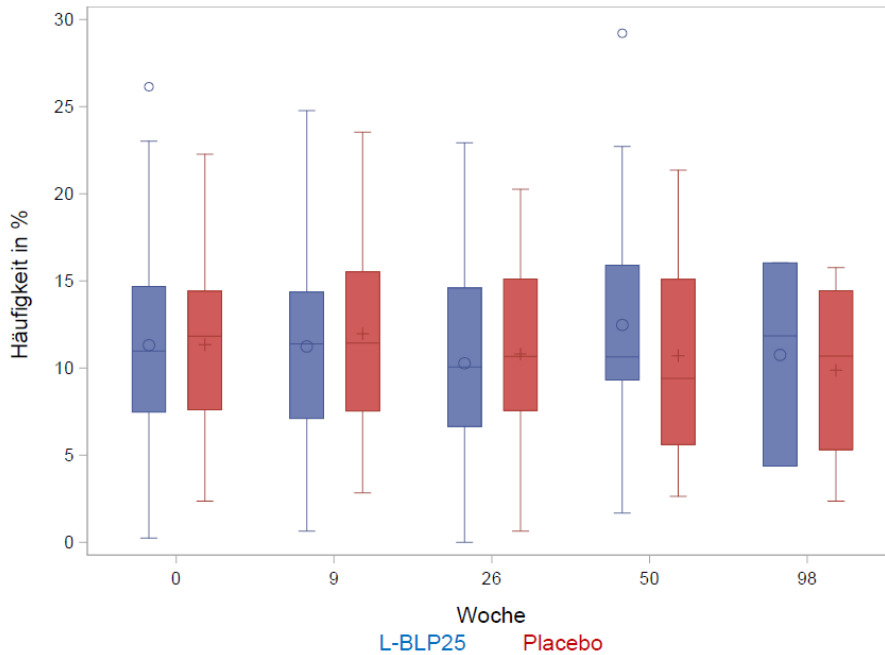


Abbildung 19: HLA-DR⁺CD14⁺ Monozyten im zeitlichen Verlauf. Es sind der Median, der Mittelwert, die Standardabweichung sowie die Ausreißer im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe dargestellt.

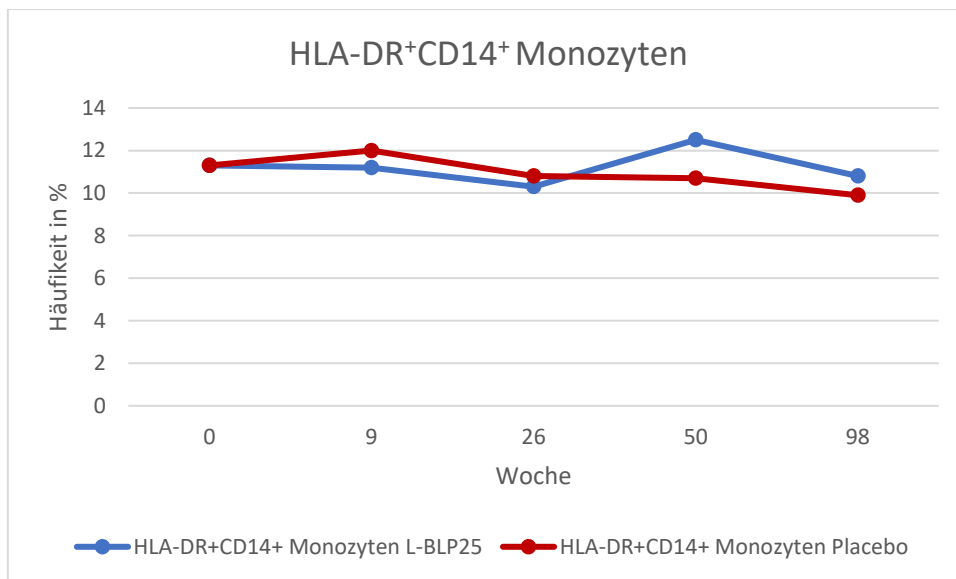


Abbildung 20: HLA-DR⁺CD14⁺ Monozyten im Mittel und im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe.

Die HLA-DR⁺CD14⁺ M-MDSCs verzeichnen im Mittel ebenfalls gleichartige Werte zwischen der L-BLP25- und Placebo-Gruppe. Insgesamt lagen die Werte in der Placebo-Gruppe geringfügig höher als in der L-BLP25-Gruppe mit Ausnahme von Woche 0, da war der Unterschied zwischen den Gruppen im Mittel allerdings auch am niedrigsten. Dabei lag, wie in

Abbildung 21 zu sehen, vor allem in Woche 9 und in Woche 50 in der Placebo-Gruppe eine breite Streuung der Werte vor.

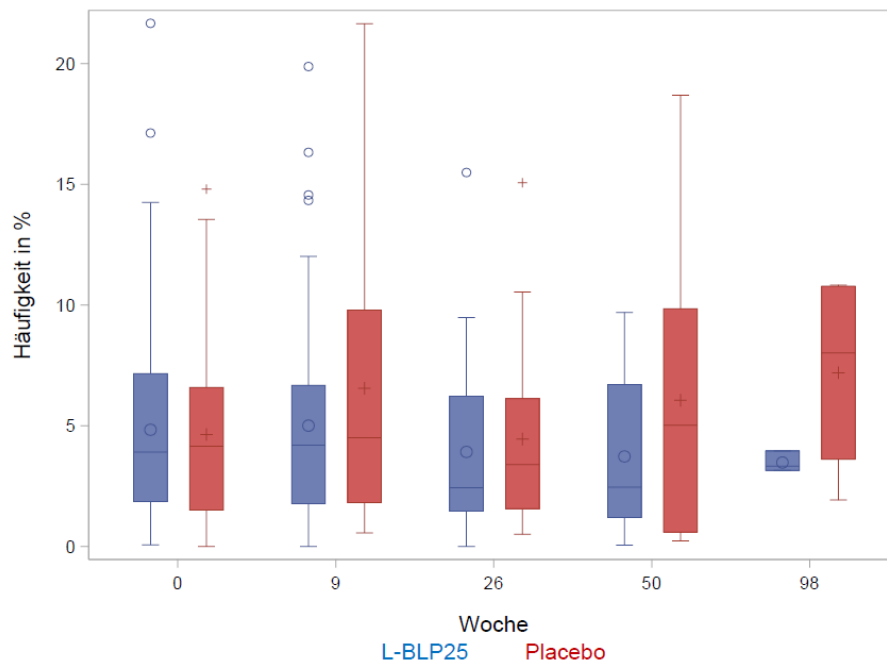


Abbildung 21: HLA-DR⁻CD14⁺ M-MDSCs im zeitlichen Verlauf. Es sind der Median, der Mittelwert, die Standardabweichung sowie die Ausreißer im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe dargestellt.

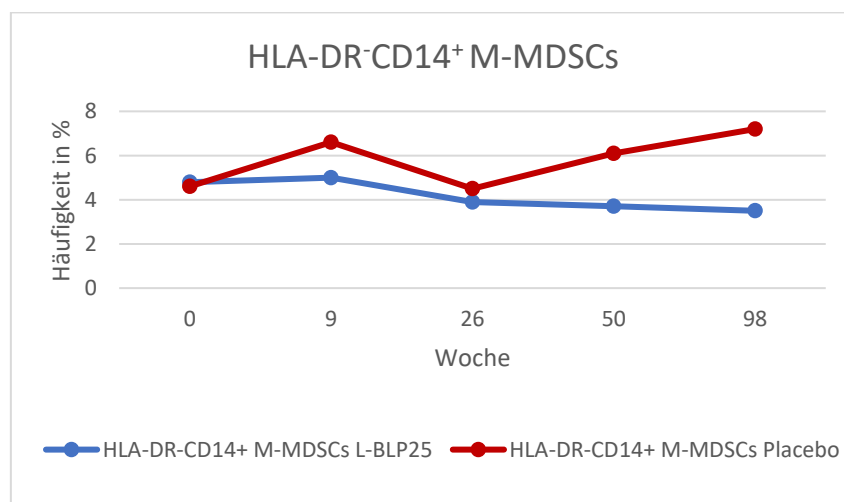


Abbildung 22: HLA-DR⁻CD14⁺ M-MDSCs im Mittel und im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe.

4.2.4 CD3⁺ T-Lymphozyten

Die CD3⁺ T-Lymphozyten verzeichneten ebenfalls keinen nennenswerten Unterschied im Mittel über die Zeit, dabei konnte in der Placebo-Gruppe im Durchschnitt kontinuierlich ein geringerer Wert nachgewiesen werden als in der L-BLP25-Gruppe. Wobei in der L-BLP25-Gruppe ein geringer kontinuierlicher Anstieg an CD3⁺ T-Lymphozyten mit Ausnahme von Woche 26 stattfand. In der Placebo-Gruppe hingegen zeigt sich mit Ausnahme von Woche 50 eher eine Abnahme.

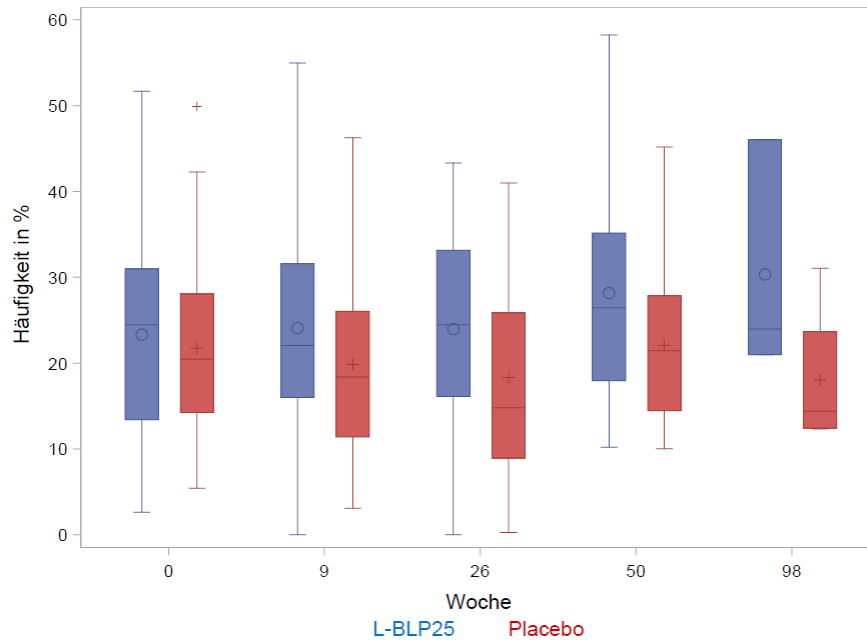


Abbildung 23: CD3⁺ T-Lymphozyten im zeitlichen Verlauf. Es sind der Median, der Mittelwert, die Standardabweichung sowie die Ausreißer im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe dargestellt.

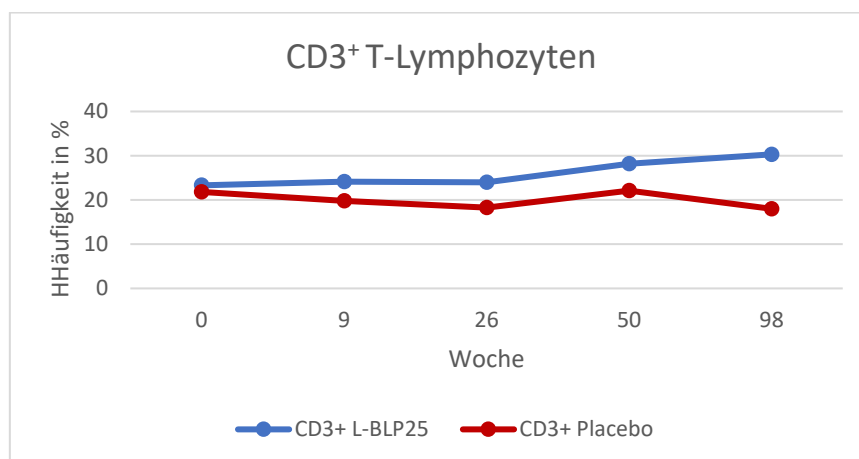


Abbildung 24: CD3⁺ T-Lymphozyten im Mittel und im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe.

4.2.5 CD28⁻CD4⁺ und CD28⁻CD8⁺ T-Zellen

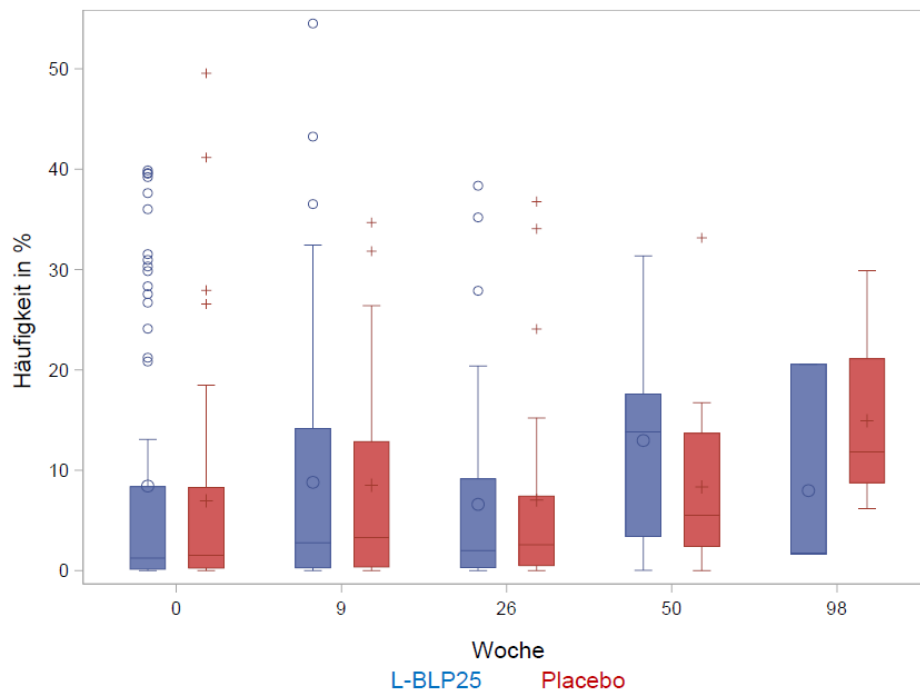


Abbildung 25: CD28⁻CD4⁺ T-Zellen im zeitlichen Verlauf. Es sind der Median, der Mittelwert, die Standardabweichung sowie die Ausreißer im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe dargestellt.

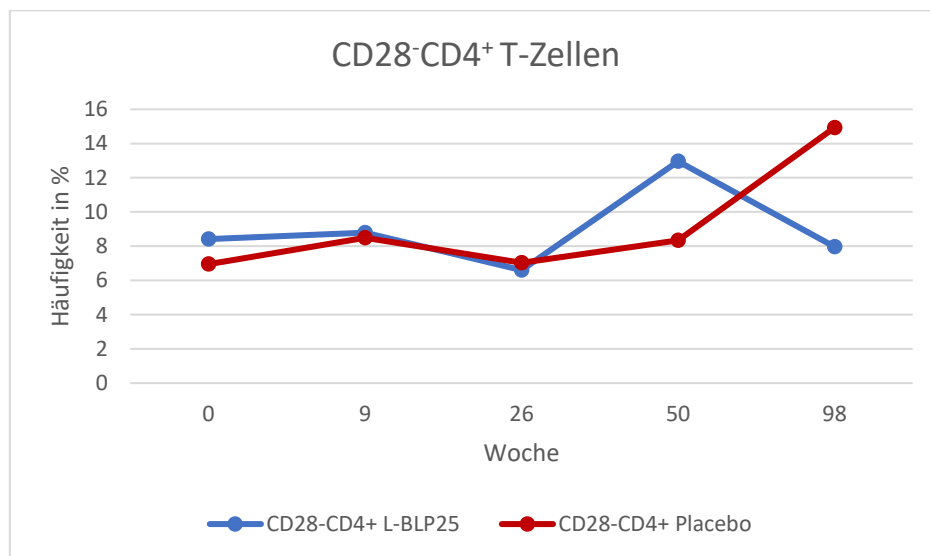


Abbildung 26: CD28⁻CD4⁺ T-Zellen im Mittel und im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe.

Wie in Abbildung 25 und 26 zu sehen ist, zeigten die CD28⁺CD4⁺ T-Zellen im Mittel, im Vergleich der L-BLP25- und Placebo-Gruppe und im Bezug zueinander keinen konstanten Verlauf über die Zeit gesehen. Hierbei zeigt sich ab Woche 50 ein konträrer Verlauf der L-BLP25- und Placebo-Gruppe, bei dem die Werte in der L-BLP25-Gruppe abnahmen und in der Placebo-Gruppe anstiegen.

Die CD28⁺CD8⁺-Subpopulation demonstrierte hingegen in der durchgeführten Studie über die Zeit relativ konstante Werte, wobei die L-BLP25-Gruppe etwas höhere Werte verzeichnen konnte als die Placebo-Gruppe (siehe Abbildung 27 und 28).

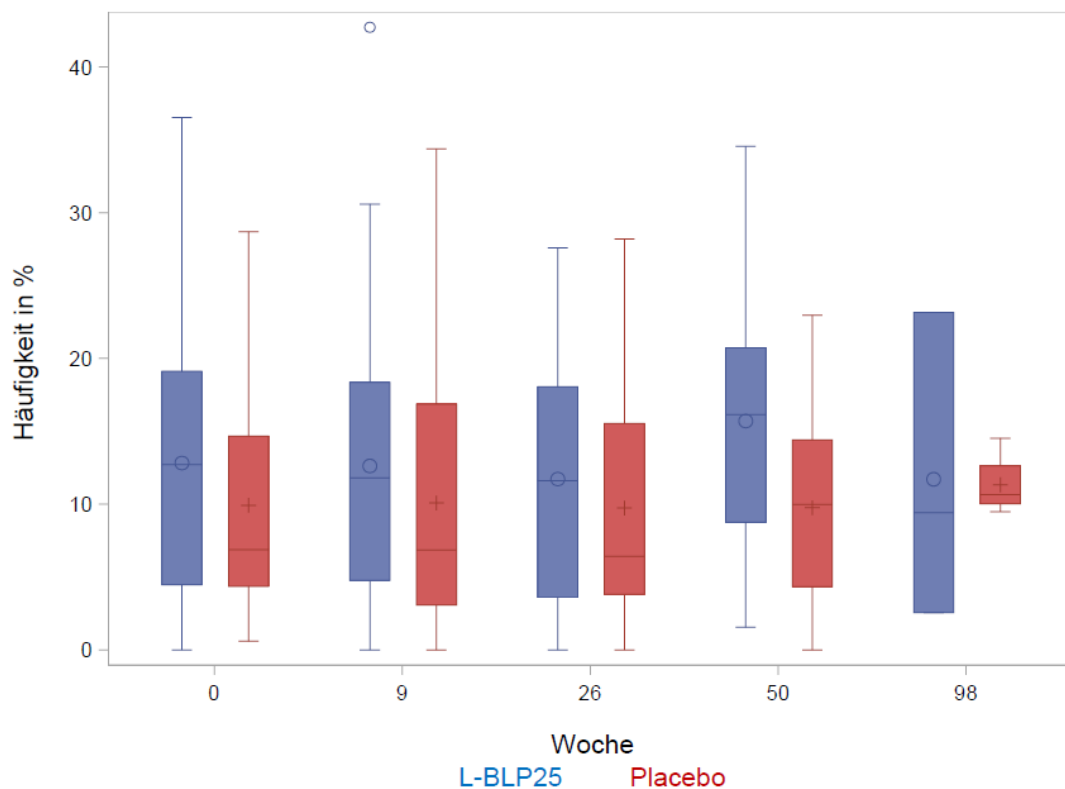


Abbildung 27: CD28⁺CD8⁺ T-Zellen im zeitlichen Verlauf. Es sind der Median, der Mittelwert, die Standardabweichung sowie die Ausreißer im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe dargestellt.

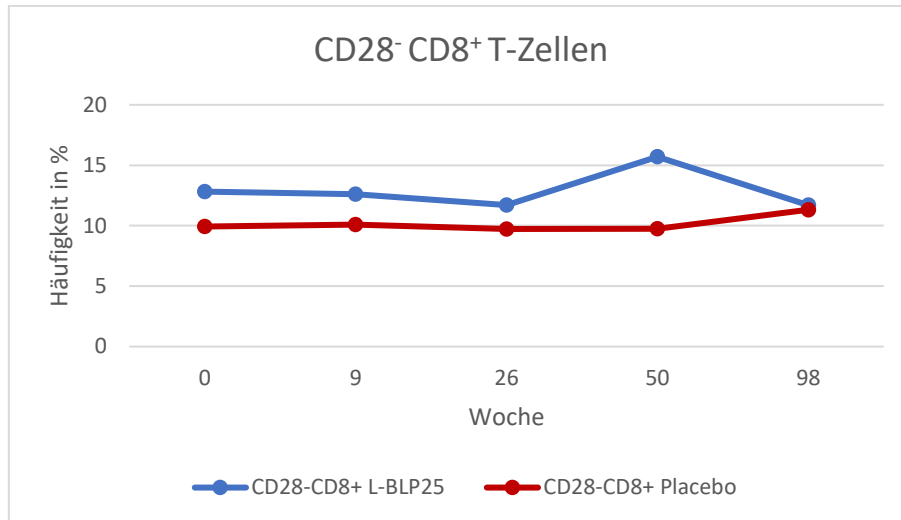


Abbildung 28: CD28⁻CD8⁺ T-Zellen im Mittel und im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe.

4.2.6 CD45RA⁺ und CD45RO⁺ T-Zellen

Bei den CD45RO⁺CD4⁻- und CD45RA⁺CD8⁺-T-Zellen zeigten sich tendenziell relativ konstante Werte in der L-BLP25-Gruppe über die Zeit. Des Weiteren lagen die Werte der CD45RO⁺CD4⁻-, CD45RO⁺CD8⁻-, CD45RA⁺CD4⁻- und CD45RA⁺CD8⁺-T-Zellen in der L-BLP25-Gruppe im zeitlichen Verlauf (mit Ausnahme von CD45RO⁺CD8⁺ T-Zellen in Woche 98) höher als in der Placebo-Gruppe.

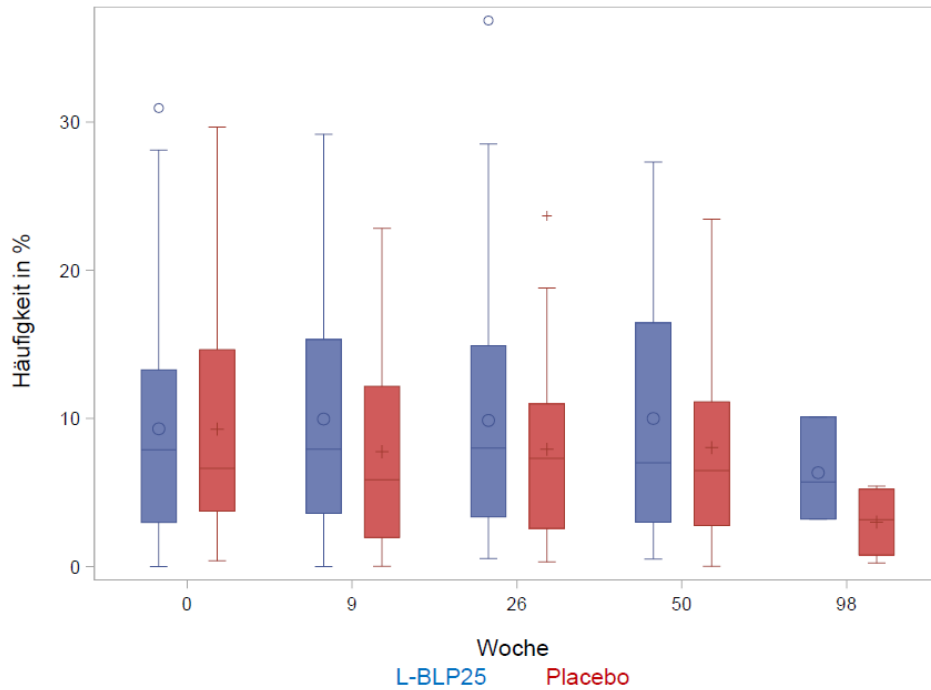


Abbildung 29: CD45RA+CD4+ T-Zellen im zeitlichen Verlauf. Es sind der Median, der Mittelwert, die Standardabweichung sowie die Ausreißer im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe dargestellt.

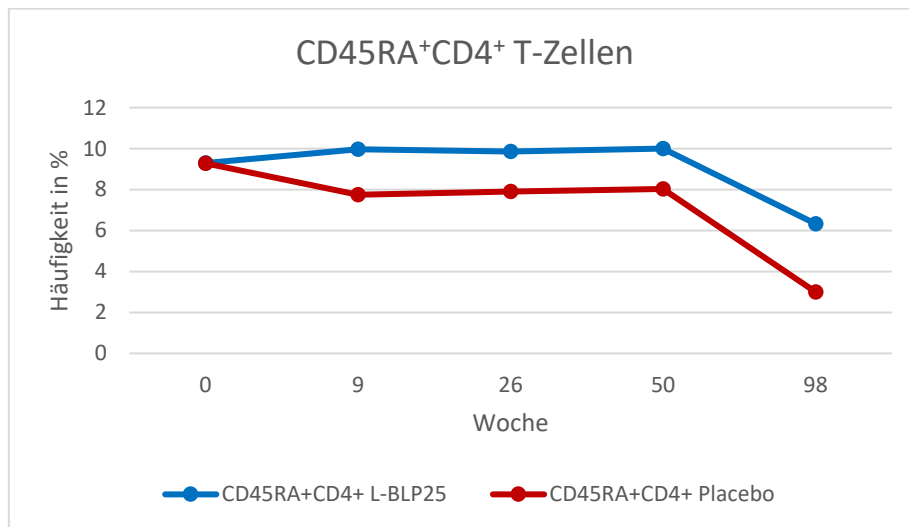


Abbildung 30: CD45RA+CD4+ T-Zellen im Mittel und im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe.

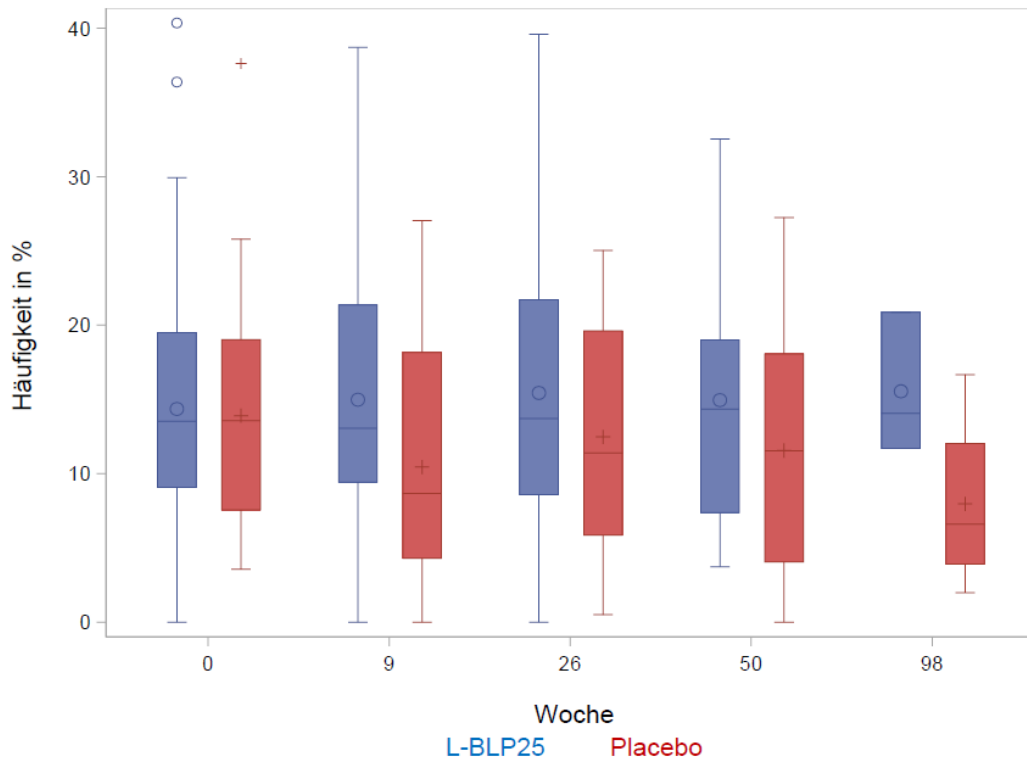


Abbildung 31: CD45RA+CD8+ T-Zellen im zeitlichen Verlauf. Es sind der Median, der Mittelwert, die Standardabweichung sowie die Ausreißer im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe dargestellt.

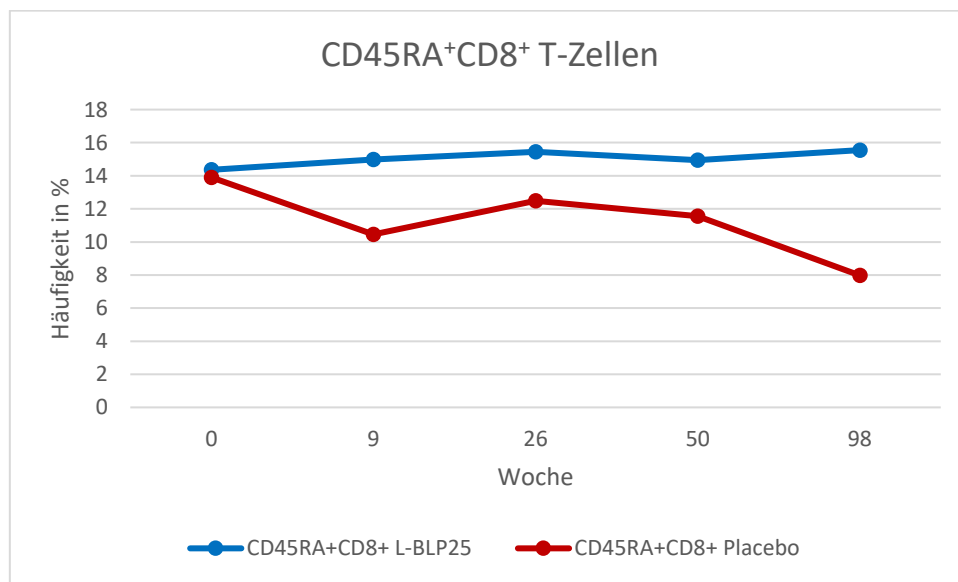


Abbildung 32: CD45RA+CD8+ T-Zellen im Mittel und im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe.

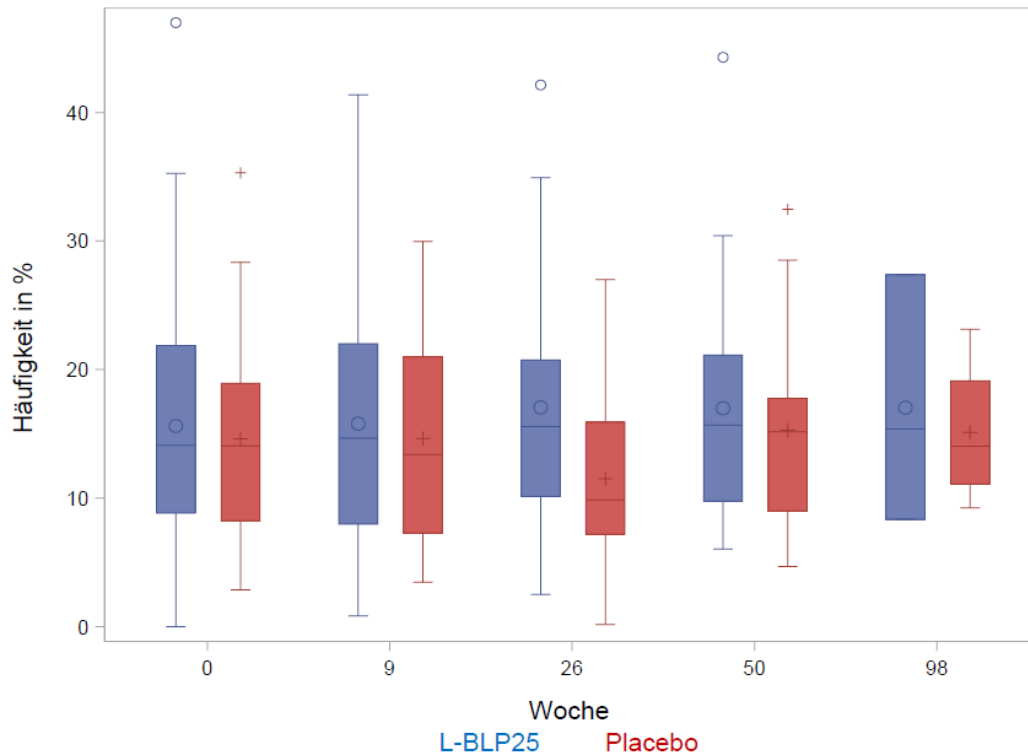


Abbildung 33: CD45RO+CD4+ T-Zellen im zeitlichen Verlauf. Es sind der Median, der Mittelwert, die Standardabweichung sowie die Ausreißer im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe dargestellt.

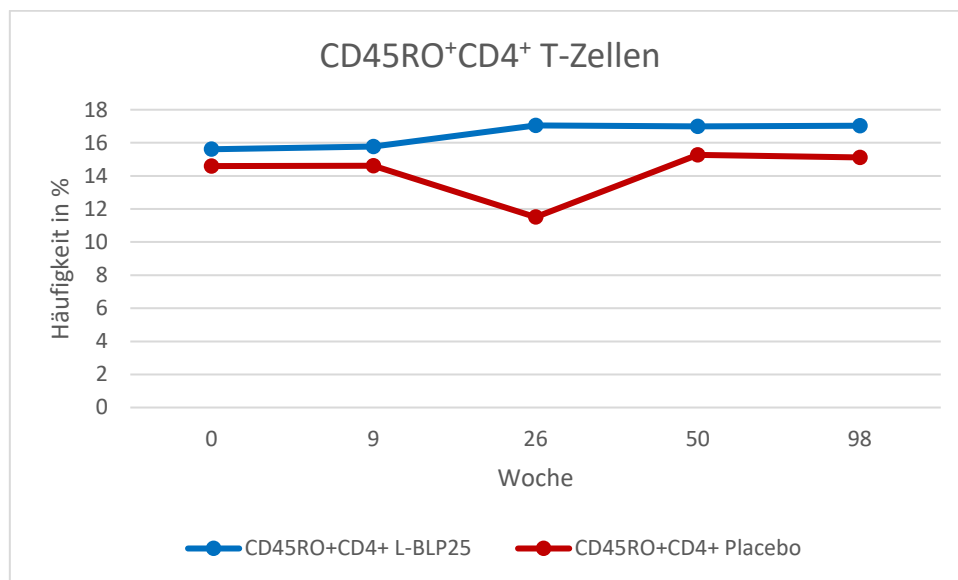


Abbildung 34: CD45RO+CD4+ T-Zellen im Mittel und im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe.

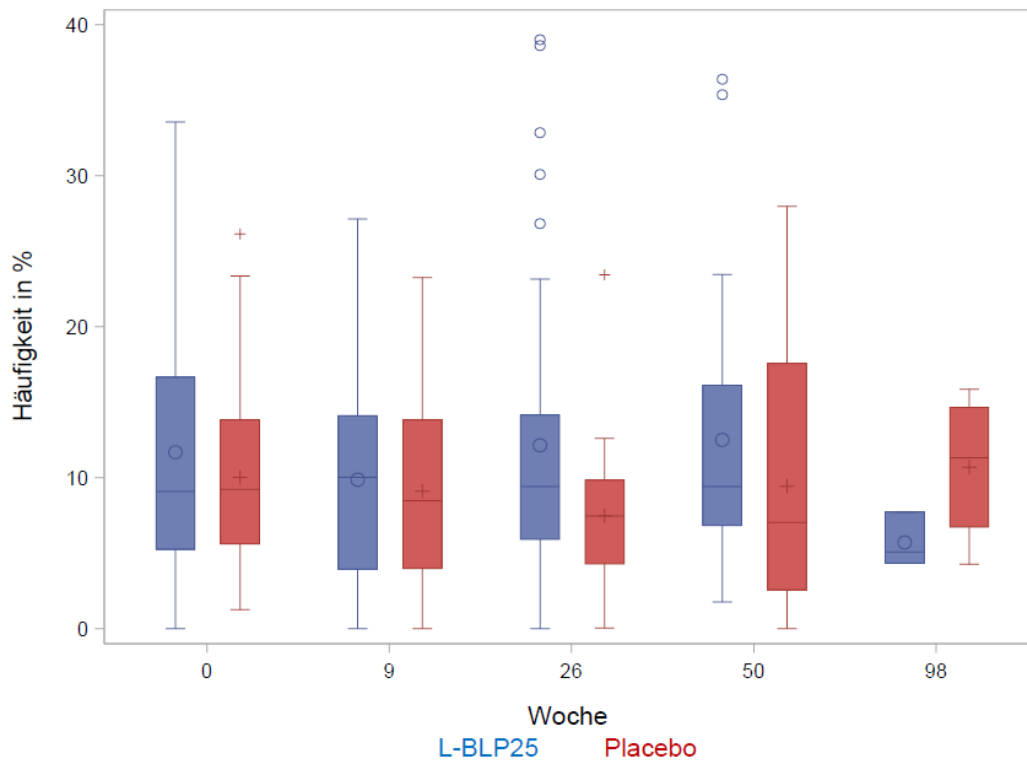


Abbildung 35: CD45RO+CD8+ T-Zellen im zeitlichen Verlauf. Es sind der Median, der Mittelwert, die Standardabweichung sowie die Ausreißer im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe dargestellt.

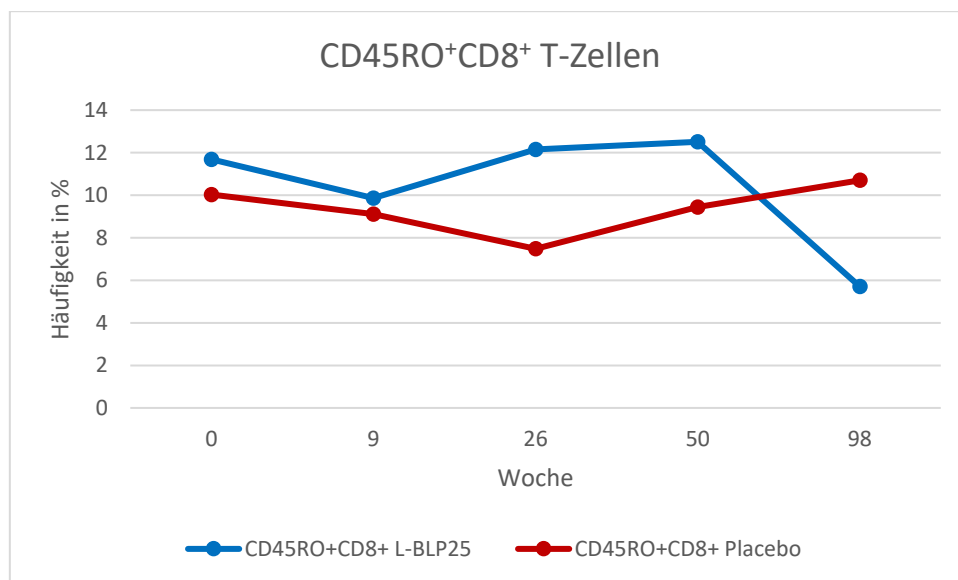


Abbildung 36: CD45RO+CD8+ T-Zellen im Mittel und im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe.

4.2.7 CD4⁺CD25⁺⁺CD127^{+/-} T_{regs}

Die CD4⁺CD25⁺⁺CD127^{+/-} T_{regs} zeigten für die Gesamtpopulation (n=118) in Woche 0 eine mittlere Häufigkeit von $1,3 \pm 1,0$ % (Minimum 0,0 %, Maximum 5,5 %, Median 1,1 %). Die Aufteilung in der L-BLP25-Gruppe (n=77) zeigte eine mittlere Häufigkeit von $1,3 \pm 1,1$ % (Minimum 0,0 %, Maximum 5,5 %, Median 1,1 %) und in der Placebo-Gruppe (n=41) von $1,2 \pm 0,9$ % (Minimum 0,0 %, Maximum 4,4 %, Median 1,0 %). Die mittlere Häufigkeit von $1,3 \pm 1,0$ % (Minimum 0,0 %, Maximum 5,6 %, Median 1,2 %) ließ sich in Woche 9 für die Gesamtpopulation (n=101) demonstrieren. In der L-BLP25- (n=66) und in der Placebo-Gruppe (n=35) konnte zum einen eine mittlere Häufigkeit von $1,4 \pm 1,0$ % (Minimum 0,0, Maximum 5,6, Median 1,2) in der L-BLP25-Gruppe und zum anderen eine mittlere Häufigkeit von $1,2 \pm 1,0$ % (Minimum 0,0 %, Maximum 3,3 %, Median 1,0 %) in der Placebo-Gruppe verzeichnet werden. Die Gesamtpopulation (n=65) wies in Woche 26 eine mittlere Häufigkeit von $1,3 \pm 1,9$ % (Minimum 0,0 %, Maximum 14,7 %, Median 0,8 %) auf. Dies distribuierte sich folgendermaßen auf die L-BLP25- (n=40) und Placebo-Gruppe (n=25), somit wies die mittlere Häufigkeit zum einen einen Wert von $1,6 \pm 2,4$ % (Minimum 0,0 %, Maximum 14,7 %, Median 0,8 %) in der L-BLP25-Gruppe und zum anderen einen Wert von $0,9 \pm 0,7$ % (Minimum 0,0 %, Maximum 2,1 %, Median 0,8%) in der Placebo-Gruppe auf. Des Weiteren zeigte sich in Woche 50 bei der Gesamtpopulation (n=47) eine mittlere Häufigkeit von $1,1 \pm 0,9$ % (Minimum 0,0 %, Maximum 3,2 %, Median 0,9 %). Aufgeteilt auf die L-BLP25-Gruppe (n=28) gelang eine mittlere Häufigkeit von $1,2 \pm 0,8$ % (Minimum 0,1 %, Maximum 3,2 %, Median 0,9 %) und in der Placebo-Gruppe (n=19) eine mittlere Häufigkeit von $1,1 \pm 0,9$ % (Minimum 0,0 %, Maximum 3,2 %, Median 0,9 %) zur Darstellung. In Woche 98 verzeichnete die Gesamtpopulation (n=7) eine mittlere Häufigkeit von $0,7 \pm 0,6$ % (Minimum 0,2 %, Maximum 1,6 %, Median 0,6 %). Die L-BLP25-Gruppe (n=3) verzeichnete eine mittlere Häufigkeit von $0,9 \pm 0,7$ % (Minimum 0,2 %, Maximum 1,6 %, Median 1,0 %) und die Placebo-Gruppe (n=4) eine mittlere Häufigkeit von $0,6 \pm 0,5$ % (Minimum 0,2 %, Maximum 1,3 %, Median 0,5 %). Zusammengefasst sind die Daten in Abbildung 37 dargestellt.

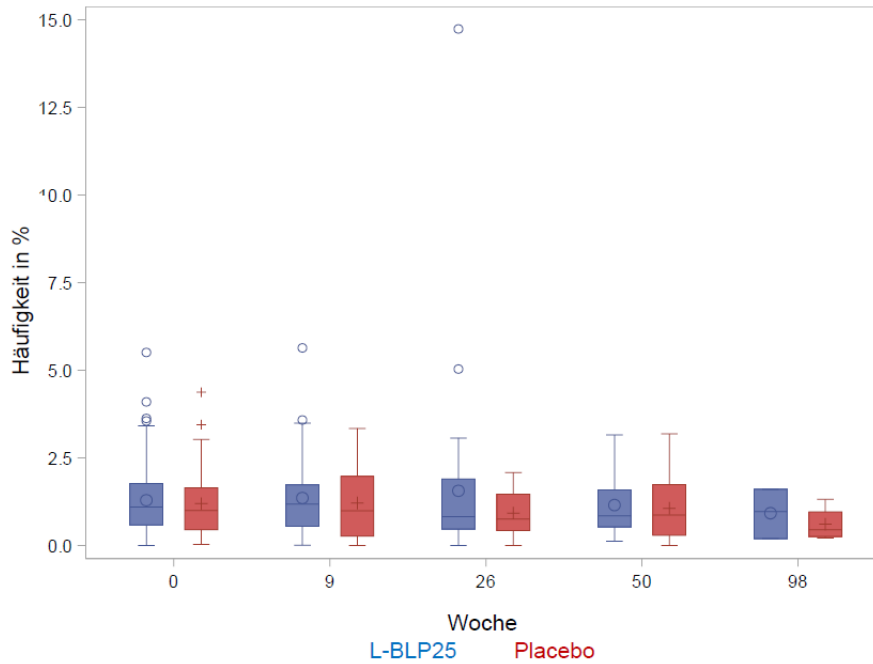


Abbildung 37: CD4⁺CD25⁺⁺CD127^{-/+} T_{regs} im zeitlichen Verlauf. Es sind der Median, der Mittelwert, die Standardabweichung sowie die Ausreißer im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe dargestellt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die CD4⁺CD25⁺⁺CD127^{-/+} T_{regs} im Durchschnitt die geringsten Werte aller Subpopulationen aufwiesen und die L-BLP25-Gruppe im Mittel geringfügig höhere Werte als die Placebo-Gruppe zeigte. Darüber hinaus fand ab Woche 26 eine Abnahme des Mittelwertes der CD4⁺CD25⁺⁺CD127^{-/+} T_{regs} in beiden Patientengruppen statt (siehe Abbildung 38).

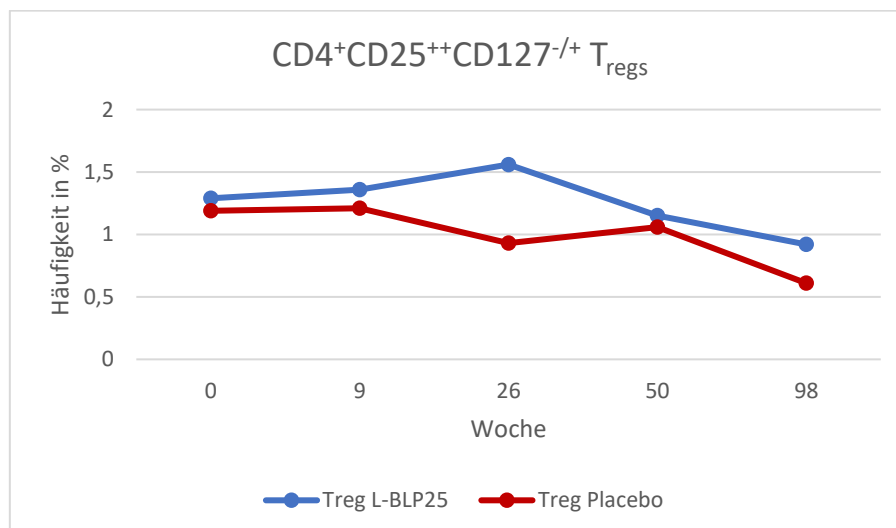


Abbildung 38: CD4⁺CD25⁺⁺CD127^{-/+} T_{regs} im Mittel und im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe.

Des Weiteren wurden noch die NLR für die Mittelwerte, wie folgt, hergeleitet und ausgewertet:

$$\frac{\text{Neutrophilen}}{\text{Lymphozyten}} - \text{Ratio} = \frac{\text{CD15pos low - density PMN im Durchschnitt}}{\text{CD3pos T - Lymphozyten im Durchschnitt}}$$

Dabei konnte in Woche 0 insgesamt ein NLR von 1,4 für die Gesamtpopulation errechnet werden, wobei sich in der L-BLP25-Gruppe ein NLR von 1,4 und in der Placebo-Gruppe von 1,6 nachweisen ließ. In Woche 9 zeigte die Gesamtpopulation ein NLR von 1,4. Hierbei verzeichnete die L-BLP25- und die Placebo-Gruppe zum einen ein NLR von 1,2 in der L-BLP25-Gruppe und zum anderen von 1,6 in der Placebo-Gruppe. Ein NLR von 1,5 konnte in Woche 26 für die Gesamtpopulation kalkuliert werden. Die L-BLP25-Gruppe demonstrierte ein NLR von 1,3 und die Placebo-Gruppe von 2,0. Daneben konnte in Woche 50 für die Gesamtpopulation ein NLR von 1,0 herausgearbeitet werden. Dabei zeigte die L-BLP25-Gruppe ein NLR von 0,8 und die Placebo-Gruppe von 1,3. In Woche 98 konnte ein NLR von 1,0 für die Gesamtpopulation errechnet werden. Währenddessen konnte für die L-BLP25-Gruppe ein NLR von 0,5 und für die Placebo-Gruppe ein NLR von 1,5 ableiten werden. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der NLR in der Placebo-Gruppe höhere Werte zeigte als in der L-BLP25-Gruppe. Wobei im zeitlichen Verlauf in der L-BLP25-Gruppe mit Ausnahme von Woche 26 eine Abnahme des NLR zu verzeichnen war. In der Placebo-Gruppe zeigte sich ein variabler Verlauf über die Zeit.

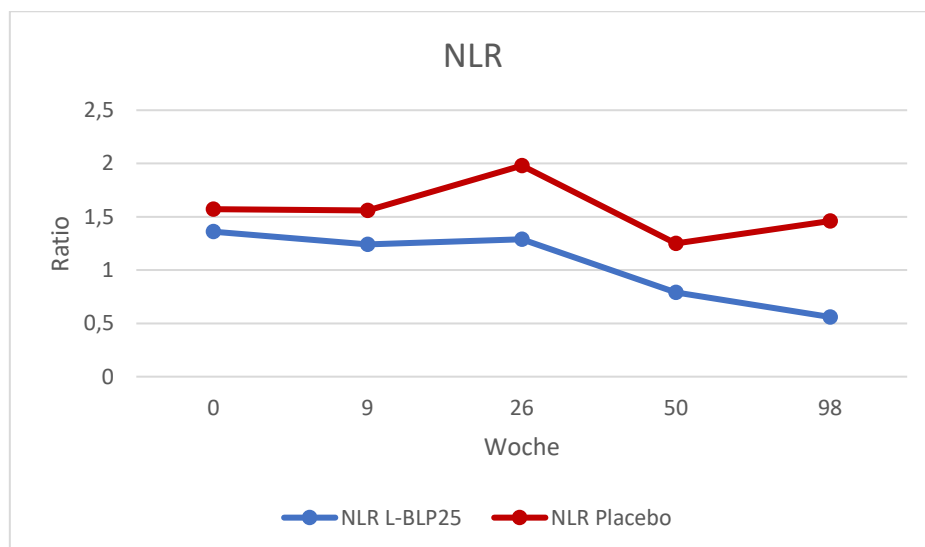


Abbildung 39: NLR im Mittel und im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe.

Anhand der erhobenen Daten wurden ebenfalls noch die Lymphozyten/Monozyten-Ratio für die Mittelwerte, wie folgt, hergeleitet und ausgewertet:

$$\frac{\text{Lymphozyten}}{\text{Monozyten}} - \text{Ratio} = \frac{\text{CD3pos T} - \text{Lymphozyten im Durchschnitt}}{\text{CD14pos Monozyten im Durchschnitt}}$$

Der Lymphozyten/Monozyten-Ratio wurde über die Zeit in der Placebo-Gruppe immer niedriger gemessen als in der L-BLP25-Gruppe und verschob sich über die Zeit zu Gunsten der Lymphozyten.

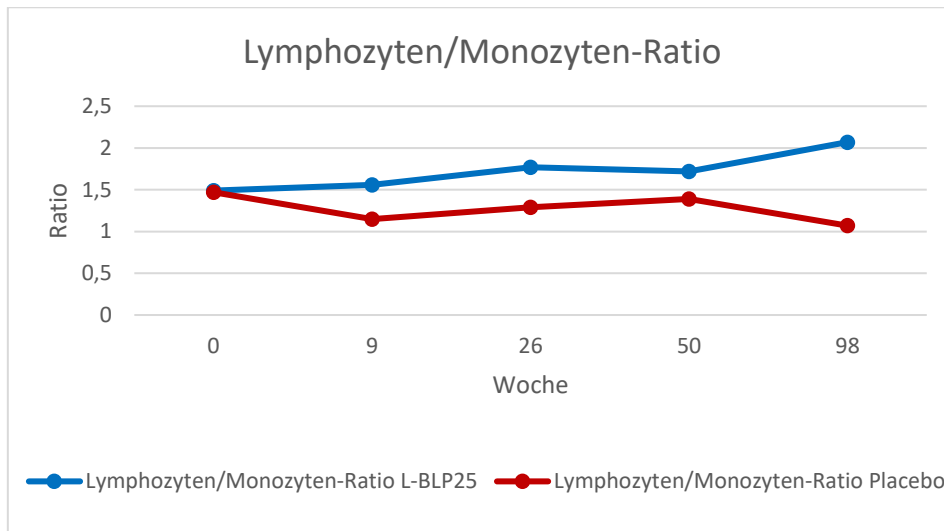


Abbildung 40: Lymphozyten/Monozyten-Ratio im Mittel und im zeitlichen Verlauf sowie getrennt in L-BLP25- und Placebo-Gruppe.

4.3 Korrelationen

Nachdem die ausgewählten Subpopulationen bezüglich ihres Vorkommens und ihres Verhaltens in der L-BLP25- und Placebo-Gruppe über die Zeit beschrieben wurden, stellte sich die Frage, ob die einzelnen Subpopulationen über die Zeit in gleichem Ausmaß beeinflusst werden oder sich die einzelnen Subpopulationen gegenseitig beeinflussen. Die hier erhobenen Daten beziehen sich auf das gesamte Patientenkollektiv, wobei keine Aufschlüsselung in die L-BLP25- und Placebo-Gruppe vorgenommen wurde (Diese Daten lagen zum Zeitpunkt der Auswertung noch nicht vor).

4.3.1 CD10⁺CD15⁺ *low density* PMN und CD3⁺ T-Lymphozyten

Über die Zeit konnte in Woche 0, 9, 26 und 50 eine negative, statistisch signifikante Korrelation (p -Werte $< 0,05$) zwischen CD10⁺CD15⁺ *low density* PMN und CD3⁺ T-Lymphozyten, auf das gesamte Patientenkollektiv bezogen, herausgearbeitet werden. Dabei lag insgesamt gesehen über die Zeit mit einem Korrelationskoeffizient um -0,5 eine eher mäßige Korrelation zwischen den beiden Subpopulationen (siehe Tabelle 13) vor.

Tabelle 14: Korrelation zwischen CD10⁺CD15⁺ low density PMN und CD3⁺ T-Lymphozyten. r = Pearson Korrelationskoeffizient; p = Signifikanzniveau; n = Anzahl der untersuchten Proben

	CD3 ⁺ T-Lymphozyten					
	Woche 0	Woche 9	Woche 26	Woche 50	Woche 98	
CD10 ⁺ CD15 ⁺ low density PMN	-0,6	-0,5	-0,5	-0,4	-0,5	r
	< ,0001	< ,0001	< ,0001	0,0089	0,2088	p
	117	101	65	45	7	n

4.3.2 CD10⁺CD15⁺ low density PMN und CD45RO⁺CD4⁺ T-Zellen

In Woche 0 und 26 lag hier eine statistisch signifikante (p -Werte < 0,05), negative Korrelation vor, die insgesamt wiederum mit einem Korrelationskoeffizient von -0,5 eine mäßige Korrelation zeigte. In den Wochen 9 und 50 ergab sich wie bei den vorherigen Korrelationen eine statistische Signifikanz, die allerdings mit schlechten Korrelationskoeffizienten ($r < 0,5$) einhergingen. In Woche 98 konnte keine statistisch signifikante (p -Werte = 0,6) Korrelation nachgewiesen werden.

Tabelle 15: Korrelation zwischen CD10⁺CD15⁺ low density PMN und CD45RO⁺CD4⁺ T-Zellen. r = Pearson Korrelationskoeffizient; p = Signifikanzniveau; n = Anzahl der untersuchten Proben

	CD45RO ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen					
	Woche 0	Woche 9	Woche 26	Woche 50	Woche 98	
CD10 ⁺ CD15 ⁺ low density PMN	-0,5	-0,4	-0,5	-0,4	-0,3	r
	< ,0001	< ,0001	< ,0001	0,0032	0,4892	p
	118	101	65	47	7	n

4.3.3 PMN-MDSCs und T_{regs}

Es zeigte sich eine statistisch signifikante (p -Werte < 0,05), negative Korrelation zwischen den CD10⁺CD15⁺ PMN-MDSCs und den CD4⁺CD25⁺⁺CD127^{-/+} T_{regs} in Woche 0, 9 sowie in Woche 50, wobei es sich insgesamt um eine schlechte Korrelation ($r < 0,5$) handelte.

Tabelle 16: Korrelation zwischen CD10⁺CD15⁺ PMN-MDSCs und CD4⁺CD25⁺⁺CD127^{-/+} T_{regs}. r = Pearson Korrelationskoeffizient; p = Signifikanzniveau; n = Anzahl der untersuchten Proben

	CD4 ⁺ CD25 ⁺⁺ CD127 ^{-/+} T _{regs}					
	Woche 0	Woche 9	Woche 26	Woche 50	Woche 98	
CD10 ⁺ CD15 ⁺ PMN-MDSCs	-0,2	-0,3	-0,2	-0,4	-0,5	r
	0,0146	0,0006	0,2079	0,0109	0,2192	p
	118	101	65	47	7	n

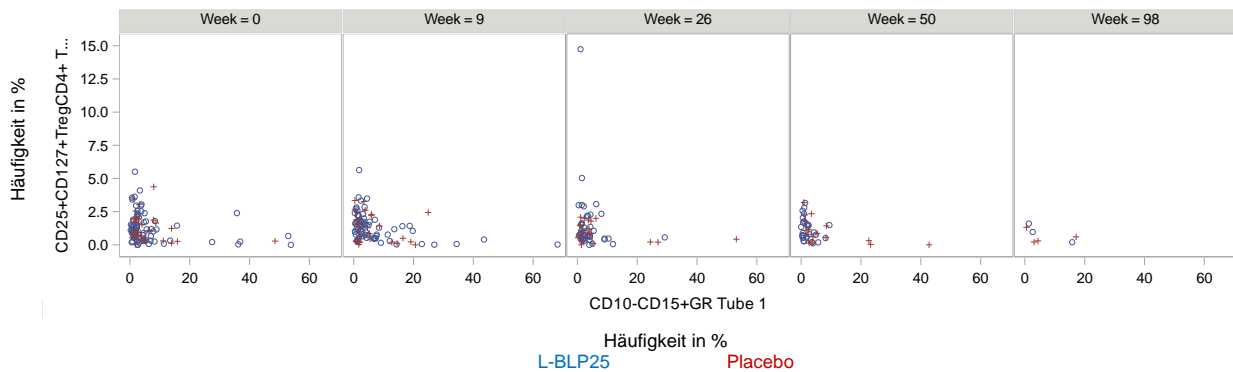


Abbildung 41: Korrelation zwischen CD10-CD15⁺ PMN-MDSCs und CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T_{regs} im zeitlichen Verlauf.

4.3.4 CD28⁻, CD45RO⁺ und CD45RA⁺ T-Zellen

Bei der CD28⁻CD8⁻ und bei der CD45RA⁺CD8⁺-Subpopulation, konnte im zeitlichen Verlauf (Woche 0, 9, 26 und 50) anhand unserer Daten eine statistisch signifikante (p -Werte $< 0,05$), positive Korrelation herausgearbeitet werden, wobei auch hier Korrelationskoeffizienten um 0,5, die sich somit als eine mäßige Korrelation darstellten, vorlagen.

Tabelle 17: Korrelation zwischen CD28⁻CD8⁺ T-Zellen und CD45RA⁺CD8⁺ T-Zellen. r = Pearson Korrelationskoeffizient; p = Signifikanzniveau; n = Anzahl der untersuchten Proben

	CD45RA ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen					
	Woche 0	Woche 9	Woche 26	Woche 50	Woche 98	
CD28 ⁻ CD8 ⁺ T-Zellen	0,4	0,5	0,5	0,6	0,6	r
	< ,0001	< ,0001	< ,0001	< ,0001	0,1667	p
	117	101	65	45	7	n

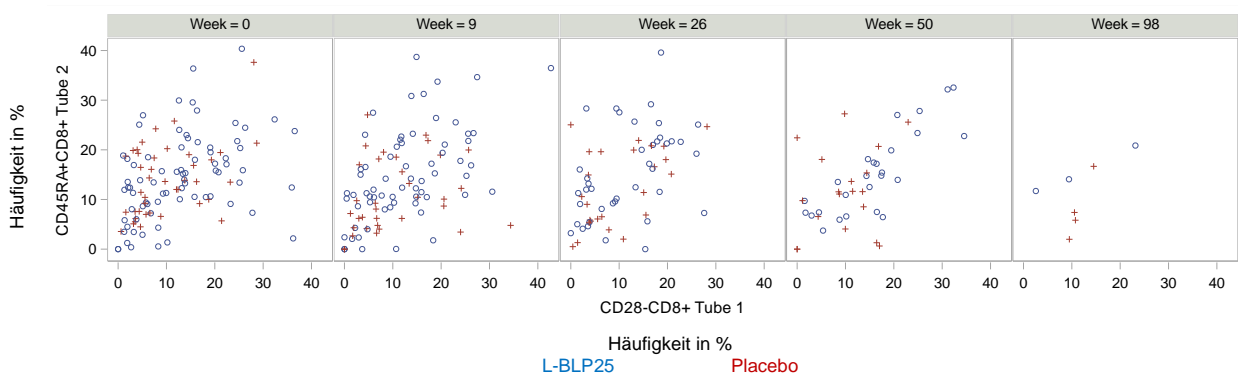


Abbildung 42: Korrelation zwischen CD28⁻CD8⁺ T-Zellen und CD45RA⁺CD8⁺ T-Zellen im zeitlichen Verlauf.

Insgesamt konnte in Woche 0 bis 50 eine statistisch signifikante, positive Korrelation zwischen der CD28⁺CD8⁺- und CD45RO⁺CD4⁺-Subpopulation gezeigt werden, wobei insgesamt in Woche 0 und 9 eine mäßige Korrelation mit $r = 0,5$ und in Woche 26 und 50 eine schlechte Korrelation mit $r < 0,5$ vorlag.

Tabelle 18: Korrelation zwischen CD28⁺CD8⁺ T-Zellen und CD45RO⁺CD4⁺ T-Zellen. r = Pearson Korrelationskoeffizient; p = Signifikanzniveau; n = Anzahl der untersuchten Proben

	CD45RO ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen					
	Woche 0	Woche 9	Woche 26	Woche 50	Woche 98	
CD28 ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen	0,5	0,5	0,4	0,4	0,7	r
	< ,0001	< ,0001	0,0040	0,0060	0,0717	p
	117	101	65	45	7	n

Auch bei der CD28⁺CD4⁺- und CD45RO⁺CD4⁺-Subpopulation zeigte sich in Woche 0, 9 und 26 eine statistisch signifikante, positive Korrelation. Hierbei zeigte sich in Woche 0 und 26 eine schlechte Korrelation mit $r < 0,5$ und in Woche 9 eine mäßige Korrelation mit $r = 0,5$.

Tabelle 19: Korrelation zwischen CD28⁺CD4⁺ T-Zellen und CD45RO⁺CD4⁺ T-Zellen. r = Pearson Korrelationskoeffizient; p = Signifikanzniveau; n = Anzahl der untersuchten Proben

	CD45RO ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen					
	Woche 0	Woche 9	Woche 26	Woche 50	Woche 98	
CD28 ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen	0,4	0,5	0,3	0,2	0,2	r
	< ,0001	< ,0001	0,0102	0,1804	0,6521	p
	118	101	65	45	7	n

4.3.5 CD4⁺CD25⁺⁺CD127^{+/-} T_{regs} und HLA-DR⁺CD4⁺ T-Zellen

Zwischen den CD4⁺CD25⁺⁺CD127^{+/-} T_{regs} und HLA-DR⁺CD4⁺ T-Zellen zeigte sich in Woche 0 und 9 eine mäßige positive Korrelation mit statistischer Signifikanz (p -Werte $< 0,05$), die in den darauffolgenden Wochen 26 und 50 ebenfalls nachweisbar war, wobei sie da als eher schlechte Korrelation (mit $r < 0,5$) zur Darstellung gelangte. In Woche 98 wiederum zeigte sich zwischen den beiden Populationen eine gute Korrelation ($r=1$). Allerdings ist dieses Ergebnis als eingeschränkt aussagekräftig anzusehen, da mit $n=7$ die erwünschten Voraussetzungen für die Berechnung des Pearson-Korrelationskoeffizienten mit $n > 30$ nicht mehr erreicht wurden.

Tabelle 20: Korrelation zwischen CD4⁺CD25⁺⁺CD127^{+/-} T_{regs} und HLA-DR⁺CD4⁺ T-Zellen. r = Pearson Korrelationskoeffizient; p = Signifikanzniveau; n = Anzahl der untersuchten Proben

	HLA-DR ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen					
	Woche 0	Woche 9	Woche 26	Woche 50	Woche 98	
CD4 ⁺ CD25 ⁺⁺ CD127 ^{+/-} T _{regs}	0,7	0,5	0,3	0,3	1,0	r
	< ,0001	< ,0001	0,0154	0,0341	0,0010	p
	117	101	65	45	7	n

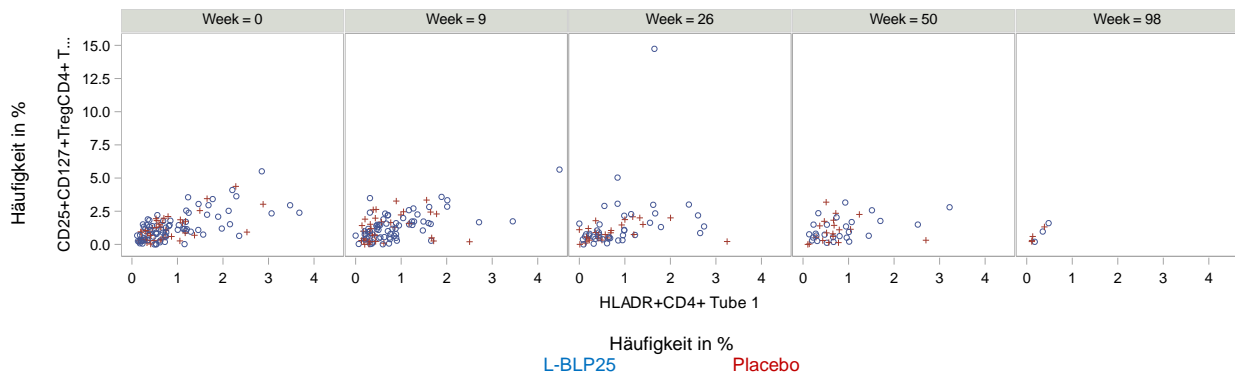


Abbildung 43: Korrelation zwischen CD4⁺CD25⁺⁺CD127^{+/-} T_{regs} und HLA-DR⁺CD4⁺ T-Zellen im zeitlichen Verlauf.

4.4 Gesamtüberleben

4.4.1 CD28⁺HLA-DR⁺CD4⁺, CD28⁻CD8⁺ und CD28⁻HLA-DR⁻CD8⁺ T-Zellen

Die Patienten der L-BLP25-Gruppe haben beim Vorliegen des Mittelwertes der CD28⁺HLA-DR⁺CD4⁺ T-Zellen in Woche 9 in der Gesamtpopulation – ein Hazard Ratio von 1,32 (95 % KI 0,67; 2,57), das heißt, eine Erhöhung der Inzidenz um 32 %. Es deutet sich ein Interaktionseffekt von Behandlung und CD28⁺HLA-DR⁺CD4⁺ T-Zellen an ($p=0,203$), daraus ergibt sich, dass die CD28⁺HLA-DR⁺CD4⁺ T-Zellen in der L-BLP25- und in der Placebo-Gruppe einen leicht unterschiedlichen Effekt haben. Während in der L-BLP25-Gruppe das Hazard Ratio bei Erhöhung der CD28⁺HLA-DR⁺CD4⁺ T-Zellen geringfügig reduziert wird (HR=0,71 pro Einheit, 95 % KI 0,36; 1,40), ist er in der Placebo-Gruppe deutlich erhöht (HR=3,68 pro Einheit, 95 % KI 1,09; 12,39). Diese Daten zeigen, dass höhere Werte an CD28⁺HLA-DR⁺CD4⁺ T-Zellen einen minimal protektiven Effekt in der L-BLP25-Gruppe bedeuten.

Auch bei den CD28⁻CD8⁺ T-Zellen ($p=0,0339$) und CD28⁻HLA-DR⁻CD8⁺ T-Zellen ($p=0,0370$) deutet sich in Woche 26 ein Interaktionseffekt von Behandlung und CD28⁻CD8⁺ T-Zellen an, das heißt, die CD28⁻CD8⁺ T-Zellen beziehungsweise die CD28⁻HLA-DR⁻CD8⁺ T-Zellen haben in der L-BLP25- und in der Placebo-Gruppe ebenfalls einen leicht unterschiedlichen Effekt. Während in der L-BLP25-Gruppe das Hazard Ratio bei Erhöhung der CD28⁻CD8⁺ T-Zellen (HR=0,95 pro Einheit, 95 % KI 0,88; 1,03) beziehungsweise der CD28⁻HLA-DR⁻CD8⁺ T-Zellen (HR=0,97 pro Einheit, 95 % KI 0,89; 1,05) geringfügig reduziert wird, ist das Hazard Ratio in der Placebo-Gruppe gering erhöht (CD28⁻CD8⁺ T-Zellen: HR=1,12 pro Einheit, 95 % KI 0,99; 1,27 beziehungsweise CD28⁻HLA-DR⁻CD8⁺ T-Zellen: HR=1,14 pro Einheit, 95 % KI 1,00; 1,31). Somit haben höhere Werte an CD28⁻CD8⁺ T-Zellen beziehungsweise CD28⁻HLA-DR⁻CD8⁺ T-Zellen gleichermaßen einen minimal protektiven Effekt in der L-BLP25-Gruppe.

4.4.2 HLA-DR⁺CD14⁺ M-MDSCs

Die HLA-DR⁺CD14⁺ M-MDSCs zeigten in Woche 9 einen signifikanten Unterschied beim Haupteffekt der Behandlung ($p=0,0445$), dies zeigt an, um welchen Faktor sich der Hazard Ratio durch die Behandlung ändert, wobei alle anderen Faktoren konstant gehalten werden. Die L-BLP25-Gruppe verzeichnete ein HR von 0,96 (95 % KI 0,87; 1,07) und die Placebo-Gruppe von 1,07 (95 % KI 0,98; 1,16). Somit liefern die Ergebnisse Hinweise darauf, dass eine Erhöhung von HLA-DR⁺CD14⁺ M-MDSCs einen minimalen protektiven Effekt in der L-BLP25-Gruppe haben.

4.4.3 CD3⁺ T-Lymphozyten

Auch bei den CD3⁺ T-Lymphozyten gelangte in Woche 9 ($p=0,0498$) und 26 ($p=0,0206$) ein signifikanter Unterschied beim Haupteffekt der Behandlung zur Darstellung. Die L-BLP25-Gruppe zeigte dabei ein HR von 0,98 (95 % KI 0,94; 1,01) beziehungsweise ein HR von 0,94 (95 % KI 0,89; 0,99) und die Placebo-Gruppe ein HR von 1,03 (95 % KI 0,97; 1,09) beziehungsweise ein HR von 1,03 (95 % KI 0,95; 1,12). Dies deutet an, dass CD3⁺ T-Lymphozyten einen leicht unterschiedlichen Effekt in der L-BLP25- und Placebo-Gruppe haben. Während in der L-BLP25-Gruppe das Hazard Ratio bei Erhöhung der CD3⁺ T-Lymphozyten geringfügig reduziert wird, wird es in der Placebo-Gruppe geringfügig erhöht. Diese Daten zeigen, dass höhere Werte an CD3⁺ T-Lymphozyten einen minimal protektiven Effekt in der L-BLP25-Gruppe bedeuten.

4.4.4 CD45RA⁺CD8⁺ T-Zellen und CD45RO⁺CD4⁺ T-Zellen

Vergleichbare Werte in Woche 9 zeigte auch die CD45RA⁺CD8⁺-Subpopulation, hier konnte ein signifikanter Unterschied ($p=0,0261$) bezüglich des Haupteffektes der Behandlung herausgearbeitet werden. Dies bedeutet, dass in der L-BLP25-Gruppe bei der Erhöhung der CD45RA⁺CD8⁺ T-Lymphozyten um eine Einheit, der Hazard Ratio leicht reduziert wird (HR=0,97 pro Einheit, 95 % KI 0,92; 1,02) und in der Placebo-Gruppe (HR=1,06 pro Einheit, 95 % KI 0,98; 1,14) leicht steigt. Dies bedeutet einen minimalen protektiven Effekt bei einem Ansteigen der CD45RA⁺CD8⁺ T-Zellen in der L-BLP25-Gruppe.

In Woche 26 demonstrierten die CD45RO⁺CD4⁺ T-Zellen einen signifikanten Unterschied beim Haupteffekt der Behandlung ($p=0,0203$). Eine Erhöhung von CD45RO⁺CD4⁺ T-Zellen in der L-BLP25-Gruppe führt zu einer geringfügigen Reduktion des Hazard Ratio (HR=0,92 pro Einheit, 95 % KI 0,86; 0,99) und in der Placebo-Gruppe zu einem geringfügigen Anstieg des Hazard Ratio (HR=1,06 pro Einheit, 95 % KI 0,93; 1,19). Somit können höhere Werte an CD45RO⁺CD4⁺ T-Zellen mit einem minimal protektiven Effekt in der L-BLP25-Gruppe in Verbindung gebracht werden.

Dabei ist festzuhalten, dass obwohl eine statistische Signifikanz vorliegt, in den meisten Fällen die Eins Teil des KI ist und sich die Werte nur geringfügig von eins unterscheiden. Bei dem

letztgenannten Punkt ist allerdings zu beachten, dass der Hazard Ratio sich pro zunehmende beziehungsweise abnehmende Einheit verändert.

4.5 Rezidivfreies Überleben

4.5.1 CD45RO⁻CD4⁺, CD45RO⁻CD45RA⁺CD8⁺ und CD45RO⁻CD8⁺ T-Zellen

Die Patienten der L-BLP25-Gruppe haben beim Vorliegen des Mittelwertes der CD45RO⁻CD4⁺ T-Zellen in Woche 26 in der Gesamtpopulation – ein Hazard Ratio von 1,19 (95 % KI 0,59; 2,39), das heißt, eine Erhöhung der Inzidenz um 19 %. Es deutet sich ein Interaktionseffekt von Behandlung und CD45RO⁻CD4⁺ T-Zellen an ($p=0,0160$), das heißt, die CD45RO⁻CD4⁺ T-Zellen haben in der L-BLP25- und in der Placebo-Gruppe einen leicht unterschiedlichen Effekt. Während in der L-BLP25-Gruppe das Hazard Ratio bei Erhöhung der CD45RO⁻CD4⁺ T-Zellen geringfügig reduziert wird (HR=0,96 pro Einheit, 95 % KI 0,90; 1,01), wird er in der Placebo-Gruppe geringfügig erhöht (HR=1,08 pro Einheit, 95 % KI 1,00; 1,16). Diese Daten zeigen, dass höhere Werte an CD45RO⁻CD4⁺ T-Zellen einen minimal protektiven Effekt in der L-BLP25-Gruppe bedeuten.

Ein vergleichbarer protektiver Effekt in Woche 26 zeigt sich für die CD45RO⁻CD45RA⁺CD8⁺ T-Zellen und CD45RO⁻CD8⁺ T-Zellen. So wird in der L-BLP25-Gruppe das Hazard Ratio bei Erhöhung der CD45RO⁻CD45RA⁺CD8⁺ T-Zellen geringfügig reduziert (HR=0,98 pro Einheit, 95 % KI 0,93; 1,03) und in der Placebo-Gruppe geringfügig erhöht (HR=1,08 pro Einheit, 95 % KI 1,00; 1,16). Bei Erhöhung der CD45RO⁻CD8⁺ T-Zellen wird in der L-BLP25-Gruppe das Hazard Ratio geringfügig reduziert (HR=0,96 pro Einheit, 95 % KI 0,92; 1,01) und in der Placebo-Gruppe geringfügig erhöht (HR=1,06 pro Einheit, 95 % KI 0,99; 1,13),

Auch hier sind die unter 4.4 genannten Punkte bei der Interpretation der Daten zu berücksichtigen.

5 Diskussion

Die folgende Diskussion der Ergebnisse orientiert sich an den im Vorfeld herausgearbeiteten Fragestellungen.

5.1 Patientenkollektiv

Diese Studie untersucht ein heterogenes Patientenkollektiv bezüglich des Alters bei Therapiebeginn. Dies spiegelt dennoch das Patientenkollektiv des KRK in Deutschland wider, da sich Neuerkrankungen ab einem Alter von 5 Jahren bis ins hohe Lebensalter dokumentieren lassen. Auch wenn das mittlere Erkrankungsalter der Studie tendenziell etwas niedriger angesiedelt ist als die Vergleichsdaten des Zentrums für Krebsregisterdaten des Robert-Koch-Instituts (30). Geschuldet kann dies unter anderem der Tatsache sein, dass Patienten mit klinisch signifikanter Herzerkrankung sowie Patienten mit einem ECOG Performance Status > 1, deren Inzidenz mit zunehmendem Lebensalter ansteigt (219), nicht in die Studie miteingeschlossen wurden. Des Weiteren lagen bei der Erstdiagnose überwiegend höhere UICC-Stadien vor, wobei hierbei hervorzuheben ist, dass die L-BLP25-Gruppe bei Erstdiagnose in absoluten Zahlen gemessen mehr Patienten mit dem UICC-Stadium IV vorzuweisen hatte als die Placebo-Gruppe. Bei Therapiebeginn wiesen dann alle Patienten das UICC-Stadium IV auf. Dies ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass bei den Patienten, die in die Studie eingeschlossen wurden, eine oder mehrere Lebermetastasen vorlagen. Des Weiteren ist festzuhalten, dass die mediane Zeitspanne von der Erstdiagnose bis zum Therapiebeginn in der L-BLP25-Gruppe 20 Monate (Minimum 1,4 Monate, Maximum 121,3 Monate) betrug und in der Placebo-Gruppe 12,6 Monate (Minimum 0,9 Monate, Maximum 73,6 Monate). Diese beiden letztgenannten Punkte können in einem engen Zusammenhang zueinanderstehen, da trotz der hohen initialen Anzahl an UICC-Stadium IV in der L-BLP25-Gruppe es im Vergleich zur Placebo-Gruppe auch mehr KRK im Stadium I und II gab. In der Placebo-Gruppe verteilte es sich hauptsächlich auf das Stadium III und IV. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz der Zeitspannen darstellen. Darüber hinaus wurden keine Patienten in die Studie eingeschlossen, bei denen eine Autoimmunerkrankung oder eine Immunschwäche bekannt war, wodurch potentielle Verzerrungen durch weitere intrinsische Einflüsse bei den Messungen der immunologisch reaktiven Zellen verringert wurden (107).

Nichtsdestotrotz spiegelt das Studienkollektiv die Prävalenzen der mit einem KRK assoziierten Daten gut wider. Sowohl die geschlechtliche Verteilung als auch die Lokalisation im Kolorektum stimmen mit den in der Literatur angegebenen Werten überein (30). Auch die hohen UICC-Stadien bei Erstdiagnose stimmen tendenziell mit den Literaturdaten überein (31), dabei ist zu beachten, dass es gerade für metastasierte KRK derzeit keine Standardbehandlungsrichtlinien gibt.

5.2 Verhalten ausgewählter immunologisch relevanter Zelltypen

Die Rezidive sind allgemein, wie bereits von Schimanski et al. beschrieben, in der L-BLP25-Gruppe früher aufgetreten als in der Placebo-Gruppe. Dies kann aufgrund der Ergebnisse unserer Daten eventuell auch im Kontext mit verschiedenen Zellpopulationen gesehen werden. Dabei zu nennen, sind die *low density* PMN, die zusammenfassend in der Placebo-Gruppe höhere Werte als in der L-BLP25-Gruppe aufwiesen. Dies könnte daraufhin deuten, dass höhere Werte an *low density* PMN mit einer besseren antitumoralen Antwort assoziiert sind, was allerdings den meisten publizierten Untersuchungen zu anderen Tumorentitäten diametral widersprechen würde (156, 220). Unklar bleibt daher, ob und wie bei höheren *low density* PMN auch eine effektivere antitumorale Immunantwort stattfinden konnte. Die Ausnahme in Woche 26 könnte in diesem Kontext gesehen, eventuell ebenfalls darauf zurückzuführen sein, dass viele Rezidive bereits früh im Patientenkollektiv aufgetreten sind und dadurch eine inflammatorische Reaktion ausgelöst wurde (221), wodurch es zu einem erneuten Anstieg der *low density* PMN kam. Insofern wären im Kontext der LICC-Studie die *low density* PMN gegebenenfalls eher als Ausdruck einer inflammatorischen Aktivität zu werten. Ein weiterer Aspekt, der zu dieser Ausnahme über die Zeit betrachtet, Einfluss genommen haben könnte, sind die protumoralen Effekte von neutrophilen Granulozyten.

Eine mögliche Erklärung könnte darin begründet sein, dass in einer Reihe von Studien die immunsuppressive Aktivität und andere Funktionen myeloider Zellen nicht getrennt bewertet wurden, wodurch es nicht möglich ist, zu schlussfolgern, ob die protumoralen Einflüsse auf *low density* PMN oder auf PMN-MDSCs zurückzuführen sind (156). Auch die höheren PMN-MDSC-Werte in Woche 0 und 9 können eventuell in Zusammenhang mit den frühen Rezidiven und dem schlechteren Verlauf der L-BLP25-Gruppe gebracht werden. Hypothetisch könnten Patienten mit höheren PMN-MDSCs früher ihr Rezidiv bekommen haben, wodurch im Verlauf nur die Patienten in die weiteren Auswertungen mit eingeflossen sind, die noch kein Rezidiv hatten und insgesamt niedrigere PMN-MDSC-Werte aufwiesen. Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen von Diaz-Montero et al., welche zeigten, dass das Ausmaß der metastatischen Tumorlast mit einem Ansteigen der MDSCs assoziiert ist (212). Des Weiteren beschrieb Zhou et al. die Fähigkeit von PMN-MDSCs, die Metastasierung über die Vorbereitung von organspezifischen prämetastatischen Nischen zu fördern (156). Darüber hinaus sind höhere Werte von PMN-MDSCs sowohl bei der Vakzinierung als Krebstherapie (222, 223) als auch im Rahmen der Standardimpfungen (224) in der Literatur mit einem schlechteren Ansprechen der Individuen auf die Vakzinierung assoziiert. Allgemein kann somit eventuell die Anzahl an PMN-MDSCs als Marker im Vorfeld einer Tumor-Vakzinierung dafür herangezogen werden, ob bei dem Patienten ein gutes Ansprechen auf die Vakzinierung zu erwarten ist.

Des Weiteren sind in diesem Kontext ebenfalls die Monozyten sowie die M-MDSCs näher zu betrachten. Die Monozyten können in eine klassische, nicht-klassische und intermediäre Subpopulation unterteilt werden (225). Dabei wirken die klassischen Monozyten (HLA-DR^{mid+}CD14⁺⁺) potentiell protumoral, indem sie die Tumorgenese und die Metastasenbildung fördern (226, 227). Die nicht-klassischen Monozyten (HLA-DR⁺CD14^{dim}) haben potentiell einen antitumoralen Effekt. Dieser wirkt der Tumorerkrankung in der Lunge, einem prädestinierten

Organ für Metastasen, entgegen, lockt NK-Zellen dorthin und fördert deren Aktivierung, wodurch sie zur Immunüberwachung von Krebs beitragen (226). Die intermediären Monozyten (HLA-DR⁺CD14⁺) sind spezialisiert auf die Antigenpräsentation, die Regulation der Apoptose z.B. über TNF α von verschiedenen Immunzellen (228) und der transendothelialen Migration von Leukozyten und intermediären Monozyten (225, 229). Unsere Ergebnisse zeigten, dass die HLA-DR⁺CD14⁺ Monozyten über die Zeit einen konstanten Mittelwert behielten. Dabei lag der Mittelwert der Placebo-Gruppe in Woche 0, 9 und 26 geringfügig höher als in der L-BLP25-Gruppe und in Woche 50 und 98 verhielt es sich umgekehrt, da lagen die Mittelwerte in der L-BLP25-Gruppe etwas höher als in der Placebo-Gruppe. Wie auch schon die vorherigen Ergebnisse, könnten sie ebenfalls als Hinweis gedeutet werden, dass die Placebo-Gruppe zu Beginn der Studie einen besseren Verlauf hatte, da mehr Zellen zur Verfügung standen, die an der Antigenpräsentation, der Regulation der Apoptose und der transendothelialen Migration beteiligt waren und somit eine adäquate Immunantwort möglich war. Die Ergebnisse zeigten allerdings nicht, dass es zu einer gesteigerten Produktion und Freisetzung von Monozyten als Reaktion auf die Vakzine kam. Möglich wäre allerdings, dass durch die Vakzine vermehrt Monozyten ins Gewebe migriert und dort zu Makrophagen differenziert sind. Deshalb wäre es in diesem Zusammenhang wichtig, vergleichen zu können, wie sich die Monozyten/Makrophagen im Blut und im Gewebe verhalten haben. Denn im Gewebe können die Monozyten in Abhängigkeit von verschiedenen Stimuli zu M1-, M2- oder TAM differenzieren, wobei TAM ähnlich den M2-Makrophagen sind und die antitumorale Immunität inhibieren. Ihre Präsenz im Tumormikroenvironment ist ebenfalls mit einem schlechten klinischen Verlauf assoziiert (94). Im Rahmen der LICC-Studie wurde von anderen Arbeitsgruppen auch das zelluläre Tumordinfiltrat (AG Halama, Heidelberg), wobei hier die tumorinfiltrierenden Lymphozyten im Vordergrund standen, und die MUC1-Expression im Tumor (AG Möhler/ Schimanski) untersucht.

Die Ergebnisse der M-MDSCs zeigten, dass eine Induktion von M-MDSCs als Reaktion auf die Vakzinierung nicht herausgearbeitet werden konnte, da die Placebo-Gruppe in der Tendenz höhere Werte aufwies als die L-BLP25-Gruppe. Dabei ist allerdings auch festzuhalten, dass dieser Anstieg von M-MDSCs in der Literatur vor allem einen Tag nach Vakzinierung zu beobachten war und dass M-MDSCs ca. sieben Tage nach der Vakzinierung wieder auf die jeweiligen Ausgangswerte abgefallen waren (230). Deshalb muss hier berücksichtigt werden, dass die Blutentnahme in unserem Studiendesign vor der Vakzinierung stattfand. Ferner wurde in der Literatur angegeben, dass es zu einer lokalen Akkumulation von M-MDSCs und Monozyten im Bereich der Injektionsstelle kommen kann, die vergleichbar mit den Werten im peripheren Blut waren (230). Betrachtet man M-MDSCs im Bereich des Tumors, differenzieren sie dort unter hypoxischen Bedingungen und dem Einfluss von HIF1 α zu TAM. Dabei werden Monozyten und M-MDSCs chemotaktisch zum Primärtumor und zur Metastase gelockt. Dies wird durch spezielle Chemokine CCL2 und CCL5 reguliert. Die Progression von KRK ist mit einem Ansteigen an CCL2 assoziiert. Ohne den Einfluss von HIF1 α differenzieren M-MDSCs im Tumormikroenvironment nicht zu TAM, sondern erwerben Marker von DCs (113).

Insgesamt zeigte sich, dass die phänotypisch als PMN-MDSCs (der Mittelwert betrug zwischen 2,3 % und 7,2 % in der L-BLP25-Gruppe und 5,3 % und 7,4 % in der Placebo-

Gruppe) definierten Zellen auch beim KRK in dieser Studie einen etwas größeren Anteil der MDSCs ausmachten. Die M-MDSCs wiesen einen Median zwischen 3,5 % und 5,0 % in der L-BLP25-Gruppe und zwischen 4,5 % und 7,2 % in der Placebo-Gruppe auf, wie dies bei den meisten Krebsarten der Fall ist (110). Hierfür sind vor allem die Daten der jeweiligen Untersuchungszeitpunkte interessant, da die Zellpopulationen über die Zeit zum Teil deutliche Schwankungen zeigten.

Die Auswirkungen der begleitenden Cyclophosphamid-Gabe in der L-BLP25-Gruppe spiegelt sich in unseren Daten nur bedingt wider, da die PMN-MDSCs zu Beginn einen Anstieg verzeichnen konnten, die M-MDSCs jedoch nicht. In der Literatur wird beschrieben, dass Cyclophosphamid dazu beiträgt, dass die MDSCs expandieren (212). Dabei steigt als Reaktion auf die Cyclophosphamid-Gabe die Konzentration von IL-8, G-CSF, MCP1 (Monozyten-Chemoattraktant-Protein-1) und GM-CSF an (231), was wiederum zu einer Mobilisation der entsprechenden Vorläuferzellen aus dem Knochenmark führt.

Auch die T_{regs} ließen bei der Auswertung unserer Daten keinen Rückschluss auf den Effekt der Cyclophosphamid-induzierten Depletion der T_{regs} im Vergleich beider Gruppen zu, da insgesamt zu Beginn sogar ein Anstieg der T_{regs} in der L-BLP25-Gruppe zu beobachten war und die Placebo-Gruppe geringere Werte aufwies als die L-BLP25-Gruppe. In der Literatur wurde die positive Auswirkung einer *low-dose* Cyclophosphamid-Gabe im Sinne einer Steigerung der antitumoralen Immunabwehr durch Stärkung der Effektor-T-Zell-Funktion und insbesondere einer Erschöpfung von T_{regs} beschrieben (232, 233). Die geringere Anzahl an T_{regs} in der Placebo-Gruppe könnte vielleicht mit dem besseren Verlauf der Placebo-Gruppe im Studienkollektiv in Verbindung gebracht werden und ein Indiz dafür sein, dass in der L-BLP25-Gruppe zu Beginn durch die Vakzinierung nicht der gewünschte Effekt eingetreten ist: Die Gabe von Cyclophosphamid trug nicht zur Effektivitätssteigerung der Krebs-Vakzinierung bei, indem sie die Anzahl der T_{regs} gesenkt hat (234, 235).

Weitere Ergebnisse, die sich nicht mit denen, die in der Literatur beschrieben wurden, deckten, waren die Korrelation zwischen PMN-MDSCs und T_{regs} . Es zeigte sich sogar eine signifikante negative Korrelation zwischen den PMN-MDSCs und den T_{regs} in Woche 0 sowie in Woche 50. Somit konnte anhand unserer Daten die positive Korrelation zwischen dem Ansteigen beziehungsweise Fallen der MDSCs und den T_{regs} nicht bekräftigt werden (148, 236). Zum Teil verhielten sie sich sogar umgekehrt als in der Literatur beschrieben, das heißt, dass die MDSCs im Verlauf anstiegen und die T_{regs} zurückgingen. Hier wäre die Aufschlüsselung in L-BLP25- und Placebo-Gruppe durchaus von Interesse gewesen, um zu eruieren, ob die beiden Gruppen Unterschiede zeigten. Ein weiterer Aspekt, der hier noch aufgeführt werden sollte, ist, dass die Patienten vielleicht mit unterschiedlichen Voraussetzungen in die Studie gestartet sind. Die Immuntherapie, die manche Patienten im Vorfeld erhalten hatten, könnte das Zusammenspiel des Immunsystems soweit beeinflusst haben, dass auch im weiteren Verlauf noch ein verändertes Verhalten der Immunzellen und immunmodulatorischen Molekülen vorgelegen hat. Dies wäre eine mögliche Erklärung für das von dem in der Literatur beschriebenen, abweichenden Verhalten. Hier wäre es interessant gewesen die Patienten im Vergleich zu den anderen Patienten näher zu betrachten, die diese Art der Vortherapie nicht erhalten haben. Da dies neue Erkenntnisse hätte liefern können, ob eine immunologische

wirksame Vortherapie eventuell Auswirkungen auf die Ergebnisse hatte. Leider lagen diese Daten, welche Patienten diese Art von Therapie erhalten haben, bei der Auswertung der Daten nicht vor.

5.2.1 Vakzinierung und Effektorzellen

Die Daten lieferten ebenfalls Tendenzen dahingehend, dass als Reaktion auf die Vakzinierung bestimmte Effektorzellen einen leichten Anstieg verzeichneten. So auch im Falle der CD3⁺ T-Lymphozyten, die in der L-BLP25-Gruppe einen geringen kontinuierlichen Anstieg (Ausnahme Woche 26) verzeichnen konnten. Dies kann auf die Vakzinierung zurückzuführen sein, da Wang et al. gezeigt hat, dass als Reaktion auf die Vakzinierung die CD3⁺ T-Lymphozyten anstiegen (237) und sich dadurch die Lymphozyten/Monozyten-Ratio, welche über die Zeit in der Placebo-Gruppe immer niedriger gemessen wurden als in der L-BLP25-Gruppe, zu Gunsten der Lymphozyten verschiebt. In der Literatur werden höhere Lymphozyten/Monozyten-Verhältnisse im peripheren Blut mit einem längeren rezidivfreien Überleben und einem besseren Gesamtüberleben bei Kolonkarzinomen des Stadium III assoziiert (238). Auf unsere Daten bezogen (unter Vorbehalt, da unsere Daten in der Ficoll-Fraktion erhoben wurden), könnte dies bedeuten, dass eine Erhöhung der CD3⁺ T-Lymphozyten bei konstanten Werten für die Monozyten einen Anstieg der Lymphozyten/Monozyten-Ratio zur Folge hat. Dies stellt eine mögliche Erklärung für den minimal protektiven Effekt in der L-BLP25-Gruppe dar, der sich ebenfalls auf ein verbessertes Gesamtüberleben auswirkt. Diese Annahme wird gestützt von der negativen Korrelation zwischen den *low density* PMN und den CD3⁺ T-Lymphozyten. Hierbei wurde in der Literatur ein erhöhter NLR präoperativ mit einem erhöhten Sterberisiko und einem erhöhten Risiko für ein Rezidiv bei Patienten mit operierten Lebermetastasen bei Patienten mit KRK in Verbindung gebracht und wies somit vorab auf eine schlechtere Prognose hin (239).

In diesen Kontext können anhand unserer Daten auch die CD28⁺CD8⁺ T-Zellen eingeordnet werden. Vermehrt CD28⁺CD8⁺ T-Zellen wurden unter anderem bei Patienten mit Krebs beobachtet, wo sie zum einen zur antitumoralen Immunantwort bei einem malignen Melanom beitragen (240) und zum anderen eine regulatorische Rolle bei der antitumoralen Immunantwort bei Lungenkarzinomen einnehmen (241). Zudem zeigte Karagöz et al., dass bei Patienten mit einem NSCLC in höheren UICC-Stadien prozentual höhere CD28⁺CD8⁺ T-Zellen unter den Lymphozyten vorlagen (242). Insgesamt werden mit den CD28⁺CD8⁺ T-Zellen sowohl zytotoxische als auch immunsuppressive Eigenschaften in Verbindung gebracht. Die CD28⁺CD8⁺-Subpopulation demonstrierte in der durchgeführten Studie über die Zeit relativ konstante Werte, wobei die L-BLP25-Gruppe etwas höhere Werte verzeichnen konnte als die Placebo-Gruppe. Die CD28⁺CD4⁺- und CD28⁺CD8⁺-Subpopulationen könnten somit ebenfalls Einfluss auf das etwas schlechtere Abschneiden der L-BLP25-Gruppe, genommen haben. Dies wird auch von den Daten von Song et al. gestützt, bei denen eine negative Korrelation zwischen CD28⁺CD8⁺ T-Zellen und dem progressionsfreien Überleben bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom unter Chemotherapie demonstriert werden konnte und höhere Werte an CD28⁺CD8⁺ T-Zellen mit einem kürzeren progressionsfreien Überleben assoziiert waren (243). Auf dem Boden dieser Daten bedarf es weiterer Untersuchungen, um

das Zusammenspiel dieser T-Zell-Subpopulationen mit der Vakzine und dem Metastasierungspotential eines KRK herauszuarbeiten. So könnte untersucht werden, ob eine erhöhte Anzahl an CD28⁺CD8⁺ T-Zellen dazu führt, dass keine adäquate Immunantwort auf die Vakzine erfolgt, beziehungsweise ob man durch eine Depletion der CD28⁺CD8⁺ T-Zellen im Vorfeld der Vakzine die nachfolgende immunologische Vakzine-Antwort steigern könnte.

Auch andere Ergebnisse lieferten Hinweise darauf, dass als Reaktion auf ein endogenes Antigen in Form der Vakzinierung vermehrt CD45RA⁺CD8⁺ T-Zellen und CD45RA⁺CD4⁺ T-Zellen gebildet wurden, da es über die Zeit tendenziell (Ausnahme in Woche 50 bei den CD45RA⁺CD8⁺ T-Zellen und Ausnahme in Woche 98 bei den CD45RA⁺CD4⁺ T-Zellen) zu einer kontinuierlichen Zunahme kam. Dabei ist die Ausnahme in Woche 98 allerdings nur eingeschränkt aussagekräftig, da zu diesem Zeitpunkt von der anfänglichen Population n=118 nur noch n=7 untersucht wurden. In ähnlicher Weise ist auch eine kontinuierliche Zunahme der CD45RO⁺CD4⁺ T-Zellen zu verzeichnen. Insgesamt sprechen die Ergebnisse dafür, dass nicht alleine die Unterscheidung von endogenen und exogenen Antigenen zu den Unterschieden zwischen der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellpopulation beitragen, sondern auch andere Faktoren, wie z.B. eine andere Kombination von Aktivierungssignalen, eine veränderte Schwelle in CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, die zu ihrer Aktivierung führt, oder eine unterschiedliche Signaltransduktion durch den TZR. Freilich ist auch nicht zu erwarten, dass innerhalb der T-Zellpopulation die durch Vakzine generierten beziehungsweise expandierten T-Zellen als quantitativ messbare Zunahme von CD45RO⁺ T-Zellen quantifizierbar sind. Zur Quantifizierung solcher Vakzine-induzierter Zellen benötigt man z.B. Tetramer-basierte Technologieverfahren, da sie eben keine hohe Frequenz aufweisen.

Die Induktion von T-Gedächtniszellen durch die Vakzinierung bietet großes Potential bei der effektiven protektiven Immunität gegenüber multiplen Pathogenen. Dabei scheint auch die Art und Weise der Applikation sowie der Zeitpunkt der Vakzination Einfluss auf deren Erfolg zu nehmen. Des Weiteren sei noch zu erwähnen, dass in dieser Promotionsarbeit nur die Zellen im peripheren Blut untersucht wurden. Dabei sollten die T-Gedächtniszellen, die sich im Gewebe bilden und danach nicht mehr ins Blut rezirkulieren, aber nicht vollständig außer Acht gelassen werden, da diese gerade auch im Bereich der Haut und Schleimhäute einen großen Anteil zur Immunität beitragen.

Betrachtet man die CD45RA⁺CD8⁺ T-Zellen, könnte dies in Zusammenhang mit der Annahme stehen, dass CD8⁺ T-Zellen in Verbindung mit MHC-Klasse-I-Molekülen zur Erkennung von endogenen Antigenen beitragen (244). Die Patienten der L-BLP25-Gruppe haben somit als Reaktion auf die Vakzinierung und/oder unspezifische Immunstimulation vermehrt CD45RA⁺CD8⁺ T-Zellen gebildet, wodurch gezeigt werden konnte, dass die Patienten eine entsprechende Reaktion auf die Vakzinierung generiert haben. Dieser Anstieg an CD45RA⁺CD8⁺ T-Zellen konnte auch schon in anderen Studien beobachtet werden (245). Bei den CD45RO⁺CD4⁺ T-Zellen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass als Reaktion auf die Stimulation durch die Vakzine eine vermehrte Bildung von CD45RO⁺CD4⁺ T-Zellen generiert wurde. Dies könnte als Indiz angesehen werden, dass die Steigerung der CD45RO⁺CD4⁺ T-

Zellen die Erzeugung einer Immunität unterstützt hat beziehungsweise unterstützen kann (246).

Insgesamt könnten diese Ergebnisse als Hinweis gedeutet werden, dass durch die Vakzine eine vermehrte Aktivierung von T-Zellen stattgefunden hat und im Rahmen der Vakzinierung ein weiterer Anstieg dieser Zellpopulationen zu einem längeren rezidivfreien Überleben führt. Ähnliche Ergebnisse lieferten auch schon Studien bei Frauen mit Brustkrebs, die postoperativ eine Radiotherapie erhalten haben (247). Darüber hinaus ist eine peritumorale Infiltration durch CD3⁺- und CD8⁺-T-Zellen bei diversen Malignomen mit der Prognose und einem längeren rezidivfreien Überleben assoziiert (248-251).

5.2.2 Verhalten der immunologisch relevanten Zellen untereinander

Das Zusammenspiel von einzelnen hier untersuchten Zellpopulationen wurde schon von anderen Autoren beschrieben. Allerdings fanden die Untersuchungen dieser Zellpopulationen zumeist bei nicht resezierter Krebserkrankung statt und nicht nach erfolgter R0-Resektion, die bei unserem Patientenkollektiv in 88,4 % der Fälle vorlag. Des Weiteren erfolgte bei einem Teil unseres Patientenkollektivs die adjuvante MUC-Vakzinierung mit L-BLP25. Die hier erhobenen Daten beziehen sich auf das gesamte Patientenkollektiv, wobei keine Aufschlüsselung in die L-BLP25- und Placebo-Gruppe vorgenommen wurde.

So lieferten unsere Ergebnisse Hinweise darauf, dass sich manche Zellpopulationen gegenseitig beeinflussen. So könnten *low density* PMN auch in Bezug auf die Bildung von CD45RO⁺CD4⁺ T-Zellen einen negativen und somit auch einen antitumoralen Effekt haben (252, 253). Des Weiteren liefern unsere Ergebnisse Hinweise darauf, dass eine vermehrte T-Zellaktivierung mit steigender Entwicklung von T-Gedächtniszellen assoziiert ist. Die suppressive Wirkung von CD28⁺ T-Zellen auf CD45RA⁺- und CD45RO⁺-T-Zellen konnte somit auch wie bei Karagöz et al. nicht bestätigt werden (242).

Darüber hinaus zeigte sich über die Zeit eine positive Korrelation zwischen den T_{regs} und den HLA-DR⁺CD4⁺ Zellen. In der Literatur wurde bisher eine negative Korrelation zwischen T_{regs} und aktivierten T-Zellen beschrieben. Demnach kontrollieren die T_{regs} die immunologische Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen (254). Auch hier wäre eine getrennte Betrachtung von L-BLP25- und Placebo-Gruppe sinnvoll gewesen, um eine eventuelle Auswirkung der Vakzine auf die Ergebnisse zu eruieren und somit eine mögliche Erklärung für die von den Literaturdaten abweichenden Ergebnisse zu finden.

5.3 Gesamtüberleben

Die Patienten der LICC-Studie zeigten insgesamt ein außergewöhnliches, verbessertes Überleben. Dies kann, wie von Schimanski et al. ausgeführt und hier im Kontext der Arbeit unter 2.12 erläutert, auf diverse klinische Aspekte zurückzuführen sein (191). Aber nichtsdestotrotz können ebenfalls immunologische Faktoren ihren Anteil dazu beigetragen haben.

Einzelne Zellpopulationen deuten ebenfalls an, dass sie in der L-BLP25-Gruppe einen positiven Effekt auf das Gesamtüberleben ausüben könnten. Betrachtet man die CD28⁺HLA-DR⁻CD8⁺ T-Zellen, so zeigten auch Sun et al., welche die Expression von CD28 im Tumormikroenvironment bei jungen Patienten mit einem Adenokarzinom der Lunge untersuchten, dass eine gesteigerte Expression von CD28 sich positiv auf das Gesamtüberleben der Patienten auswirkte. Die gesteigerte Expression von CD28 war dabei mit reichlichem Vorkommen von Lymphozyten assoziiert. Wenngleich in diesem Zusammenhang eine negative Assoziation mit dem krankheitsfreien Überleben herausgearbeitet werden konnte (255). Dies ist allerdings nur eingeschränkt auf unsere Daten übertragbar, da wir die Zellpopulationen im peripheren Blut untersucht haben und dabei ein unterschiedliches Verhalten der Zellpopulationen im peripheren Blut und im Tumormikroenvironment nicht außer Acht gelassen werden darf.

Des Weiteren wird in der Literatur bei soliden Tumoren (256), bei hämato-onkologischen Erkrankungen (257) wie auch myelodysplastischen Syndromen (258) eine Vermehrung von CD28⁻CD8⁺ T-Zellen sowohl im peripheren Blut als auch im Tumormikroenvironment beschrieben. Hierbei werden den CD28⁻CD8⁺ T-Zellen sowohl immunsuppressive als auch zytotoxische Eigenschaften zugeschrieben und auch der Einfluss eines weiteren Oberflächenmarkers (CD57) wird diskutiert (259). Unsere Daten zeigen eine positive Korrelation der Anzahl von CD28⁻CD8⁺ T-Zellen in Woche 26 mit dem Gesamtüberleben, was mit einer prädominant zytotoxischen Funktion dieser Zellfraktion vereinbar wäre. Es wird im Schrifttum weiterhin auch diskutiert, dass es Unterschiede in der Relevanz dieser CD8⁺ T-Zellen zwischen Krebsarten gibt (259).

Eine interessante Beobachtung konnte bei den M-MDSCs und dem Gesamtüberleben gemacht werden, da hier die Ergebnisse nicht konkordant zu den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen war. So zeigte sich in der Literatur eine negative Assoziation zwischen HLA-DR⁻CD14⁺ M-MDSCs und dem Überleben bei den Patienten mit einem Nierenzellkarzinom oder einem fortgeschrittenen malignen Melanom (148, 260). Dies legt die Vermutung nahe, dass weitere Variablen Einfluss auf das Gesamtüberleben genommen haben, die im allgemeinen Zusammenspiel dafür sorgen, dass eine Erhöhung der M-MDSCs zur Verlängerung des Gesamtüberlebens führen.

5.4 Rezidivfreies Überleben

5.4.1 CD45RO⁻CD4⁺, CD45RO⁻CD45RA⁺CD8⁺ und CD45RO⁻CD8⁺ T-Zellen

Insgesamt zeigten mehrere Studien, dass ein hoher Anteil von CD45RO⁺-tumorinfiltrierenden T-Zellen mit einem längeren krankheitsfreien Überleben und mit einem besseren Gesamtüberleben, vor allem bei KRK im Stadium II, assoziiert ist (261-264). Allgemein fanden sich weniger vergleichbare Daten für die CD45RO⁻ T-Zellen, weder für die tumorinfiltrierenden noch für die systemischen CD45RO⁻ T-Zellen. Dennoch haben wir diesbezüglich verschiedene Überlegungen angestellt. Zum einen, dass die CD45RO⁻ T-Zellen erst vor Ort im Tumormikroenvironment aktiviert werden und vorher im peripheren Blut als CD45RO⁻ T-Zellen

vorhanden sind. Dies würde bedeuten, dass bei einem systemischen Anstieg von CD45RO⁻ T-Zellen, auch mehr CD45RO⁻ T-Zellen zur Aktivierung dargeboten werden. Diese stehen somit konsekutiv für eine vermehrte Aktivierung zur Verfügung und es kann zu einer erhöhten Dichte von CD45RO⁺ T-Zellen im Tumormikroenvironment kommen. Zum anderen könnte die Mikrosatellitenstabilität beziehungsweise Mikrosatelliteninstabilität Einfluss auf die CD45RO⁻ Population genommen haben, da bei Noshio et al. auch gezeigt werden konnte, dass eine hohe Dichte an CD45RO⁺-tumorinfiltrierenden T-Zellen vor allem bei mikrosatelliteninstabilen KRK nachzuweisen waren (265). Dies könnte indirekt auf eine gesteigerte Immunogenität des Tumors zurückzuführen sein, wodurch es zu einer gesteigerten Produktion von CD45RO⁻ T-Zellen kommt, damit mehr CD45RO⁻ T-Zellen für die Aktivierung zur Verfügung stehen und dadurch eine effektivere Immunantwort erzeugt werden kann.

5.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Ein vielversprechender neuer immunologischer Therapieansatz ist die Vakzinierung, um eine Immunantwort gegen Tumoren zu induzieren. Dabei gibt es bislang einige Studien, die sich in diesem Zusammenhang auch mit der Untersuchung immunologisch reaktiver Zellen beschäftigen (222, 223). Wie im Großteil der zitierten Literatur vorbeschrieben, fand sich auch in der LICC-Studie in den Immunmonitoring-Analysen dieser Promotionsarbeit eine Assoziation der MDSC-Frequenzen mit einem schlechteren Therapieansprechen und einem schlechteren klinischen Ergebnis. Hier sind natürlich weitere Studien diesbezüglich wichtig. Darüber hinaus liefern unsere Ergebnisse Hinweise darauf, dass nicht nur die MDSCs, sondern auch die T_{regs} und die Effektorzellen auf den Ausgang der Studie miteingewirkt haben könnten, wie es ebenfalls schon in vorherigen Studien zu anderen Tumorentitäten gezeigt werden konnte. Schließlich modulieren diese Zellen die Immunität bei der Entstehung, der lokalen Progression sowie der Metastasierung eines Tumors. Ebenso scheinen sie auch bei dem Ansprechen auf eine Vakzine involviert zu sein (223).

Insgesamt sollten in zukünftigen Studien immunologisch reaktive Zellpopulationen bei KRK auch im Kontext des Mikrosatellitenstatus untersucht werden, da das Ansprechen von Immuntherapien auch mit dem Mikrosatellitenstatus in Verbindung gebracht werden kann und mikrosatellitenstabile und mikrosatelliteninstabile KRK ein unterschiedliches immunogenes Potential aufweisen. Mikrosatellitenstabile KRK sind aufgrund geringer Mutationsrate häufig weniger immunogen, wodurch sie von den Immunzellen weniger erkannt werden und daraus eine geringere Infiltration des Tumors durch T-Zellen resultiert (161). Für zukünftige Studien wäre auch ein direkter Vergleich von systemischen MDSCs und lokalisierten MDSCs z.B. im Bereich des Rezidivs interessant, da noch nicht ausreichend geklärt ist, ob sie nicht zum Teil unterschiedliche Auswirkungen im peripheren Blut und peritumoral haben. Des Weiteren sollte in zukünftigen Studien weiter herausgearbeitet werden, wie man die immunologischen Gegebenheiten eines Patienten dahin modulieren kann, dass er ein besseres Ansprechen auf die Immuntherapie zeigt, da ein bestimmter Ansatz – die T_{reg}-Depletion zur Verbesserung des

Therapieansprechens – in dieser Studie in Anlehnung an andere Studien nicht gezeigt werden konnte.

6 Zusammenfassung

Trotz sinkender Inzidenzen und eingeführten Vorsorgeuntersuchungen, zählt das KRK zu den häufigsten Krebsarten weltweit und auch heutzutage versterben weltweit noch eine Vielzahl an Patienten am KRK oder den damit einhergehenden Folgen. Dadurch ist das Interesse an erfolgsversprechenden Therapien – und in den letzten Jahren vor allem auch das Interesse an immunmodulatorischen Therapien – gestiegen. Dabei zeigte sich, dass das Ansprechen auf die immuntherapeutischen Verfahren, wie Checkpoint-Inhibitoren oder Krebs-Vakzinierungen in Zusammenhang mit dem Vorkommen verschiedener immunologisch reaktiver Zellpopulationen im peripheren Blut und in der Tumormikroumgebung steht. In diesem Kontext war das Ziel der vorliegenden Studie das Verhalten verschiedener immunologisch reaktiver Zellpopulationen bei Patienten mit KRK und Zustand nach in kurativer Intention operativ resezierten hepatischen Metastasen nach Immunisierung mit L-BLP25 zu untersuchen. Die potentielle klinische Wirksamkeit der Vakzine sollte korreliert werden mit ausgewählten immunologischen Zelltypen im peripheren Blut. Dieses Projekt war Teil eines umfangreicheren immunologischen Begleitprogramms der LICC-Studie. In der Zusammenschau aller Untersuchungen sollte ein Beitrag geleistet werden, um langfristig eine Optimierung individueller immunmodulatorischer Therapien und damit einer Verbesserung der Vorhersage eines individuellen Therapieansprechens zu ermöglichen.

Hierzu wurden mittels durchflusszytometrischer Analysen verschiedene Subpopulationen in der L-BLP25- (n=77) und in der Placebo-Gruppe (n=41) zu definierten Zeitpunkten nach Vakzination quantifiziert. Zusammenfassend spiegeln auch unsere Daten im Großen und Ganzen die Erkenntnisse vorheriger Studien wider, dass erhöhte Zahlen myeloischer, phänotypisch PMN- und M-MDSCs entsprechender Zellen mit einer schlechteren klinischen Prognose der Patienten assoziiert waren. Es zeigte sich ferner, dass neben den MDSCs auch vermehrt nachweisbare lymphatische immunsuppressive CD4⁺CD25⁺⁺CD127^{+/-} T-Zellen (T_{regs}) mit dem schlechteren klinischen Abschneiden der L-BLP25-Gruppe assoziiert waren. So könnte in zukünftigen Studien weiter herausgearbeitet werden, ob die Anzahl an PMN-MDSCs als Marker im Vorfeld einer Vakzinierung herangezogen werden kann, um das Ansprechen des Patienten auf die Vakzine zu prognostizieren oder ob eine vorherige Immuntherapie einen Einfluss haben kann auf das Immunprofil nach Vakzination. Im Gegensatz zu den publizierten Daten war kein Effekt einer *low-dose* Cyclophosphamid-Gabe auf die Frequenz von MDSCs und T_{regs} nachweisbar. Darüber hinaus zeigte sich abschnittsweise eine negative Korrelation zwischen den MDSCs und den T_{regs}, wobei in der Literatur überwiegend von einer positiven Korrelation berichtet wird. Hier wäre eine Aufschlüsselung in L-BLP25- und Placebo-Gruppe sinnvoll gewesen, um Diskrepanzen zwischen den beiden Gruppen exakter zu beschreiben (diese Daten lagen zum Zeitpunkt der Auswertung noch nicht vor). In Bezug auf das Gesamtüberleben und das rezidivfreie Überleben zeigte vor allem eine Steigerung der T-Zellpopulationen – insbesondere CD28⁺HLA-DR⁺CD4⁺-, CD28⁻CD8⁺- und CD28⁻HLA-DR⁻CD8⁺-T-Zellen (siehe 4.4.1) sowie CD45RO⁻CD4⁺-, CD45RO⁻CD45RA⁺CD8⁺- und CD45RO⁻CD8⁺-T-Zellen (siehe 4.5.1) in der L-BLP25-Gruppe einen möglichen protektiven Effekt.

Für zukünftige Studien wäre auch ein Vergleich der Häufigkeit von systemisch und lokal im Tumor-Milieu oder Gewebe des Rezidivs nachweisbaren immunsuppressiven Zellen wie MDSCs oder T_{regs} interessant. Des Weiteren sollte künftig weiter herausgearbeitet werden, wie man die immunologischen Gegebenheiten eines Patienten dahin modulieren kann, dass er ein besseres Ansprechen auf die Immuntherapie zeigt.

7 Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt. Krebs war 2019 für ein Viertel aller Todesfälle in Deutschland verantwortlich 2021 [Available from: https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2021/02/PD21_N010_231.html].
2. Sudhakar A. History of cancer, ancient and modern treatment methods. *Journal of cancer science & therapy*. 2009;1(2):1.
3. Joannidis M. Personalisierte Intensivmedizin im Zeitalter der Standardisierung. *Medizinische Klinik-Intensivmedizin und Notfallmedizin*. 2017;112(4):286-8.
4. Ehrlich P. Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung 1908.
5. Burnet FM. Immunological surveillance in neoplasia. *Transplantation reviews*. 1971;7:3-25.
6. Burnet M. Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications. *Br Med J*. 1957;1(5023):841-7.
7. Lewis T. On immunosurveillance in human cancer. *Yale J Biol Med*. 1982;55(3-4):329-33.
8. Lewis T. Cellular and humoral aspects of the hypersensitive states. New York: Hoeber-Harper. 1959:529-32.
9. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology*. 2002;3(11):991-8.
10. Busch W. Einfluss von Erysipel. *Berliner Klin Wschr*. 1866;3:245-6.
11. Coley WB. II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Annals of surgery*. 1891;14(3):199-220.
12. McCarthy EF. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *The Iowa orthopaedic journal*. 2006;26:154-8.
13. Issacs A. L, J. Virus interference: I. The interferon. By Alick Isaacs and Jean Lindenmann, 1957. CA: a cancer journal for clinicians. 1988;38(5):280-90.
14. Graham JB, Graham RM. The Effect of vaccine on cancer patients. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1959;24(5):535.
15. Miller JF, Mitchell GF, Weiss NS. Cellular basis of the immunological defects in thymectomized mice. *Nature*. 1967;214(5092):992-7.
16. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of experimental medicine*. 1973;137(5):1142-62.
17. Zinkernagel RM, Doherty PC. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*. 1974;248(5450):701-2.
18. Kiessling R, Klein E, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *European journal of immunology*. 1975;5(2):112-7.
19. Kiessling R, Klein E, Pross H, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *European journal of immunology*. 1975;5(2):117-21.
20. Rosenberg SA. IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. *J Immunol*. 2014;192(12):5451-8.
21. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Leitman S, Chang AE, Ettinghausen SE, et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *The New England journal of medicine*. 1985;313(23):1485-92.

22. Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity*. 1994;1(6):447-56.
23. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, et al. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(13):7556-61.
24. Eshhar Z, Waks T, Gross G, Schindler DG. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(2):720-4.
25. Young MR, Newby M, Wepsic HT. Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors. *Cancer research*. 1987;47(1):100-5.
26. Buessow SC, Paul RD, Lopez DM. Influence of mammary tumor progression on phenotype and function of spleen and in situ lymphocytes in mice. *Journal of the National Cancer Institute*. 1984;73(1):249-55.
27. Seung LP, Rowley DA, Dubey P, Schreiber H. Synergy between T-cell immunity and inhibition of paracrine stimulation causes tumor rejection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(14):6254-8.
28. Clarke SL, Betts GJ, Plant A, Wright KL, El-Shanawany TM, Harrop R, et al. CD4+ CD25+ FOXP3+ regulatory T cells suppress anti-tumor immune responses in patients with colorectal cancer. *PLoS one*. 2006;1(1):e129.
29. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2021;71(3):209-49.
30. Robert Koch-Institut. Krebsarten 2019 [Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/krebsarten_node.html].
31. Robert Koch-Institut. Darmkrebs 2021 [Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Darmkrebs/darmkrebs_node.html].
32. Cardoso R, Zhu A, Guo F, Heisser T, Hoffmeister M, Brenner H. Inzidenz und Mortalität proximaler und distaler kolorektaler Karzinome in Deutschland. *Dtsch Arztebl*. 2021;118:281-7.
33. O'Brien MJ, O'Keane JC, Zauber A, Gottlieb LS, Winawer SJ. Precursors of colorectal carcinoma Biopsy and biologic markers. *Cancer*. 1992;70(S3):1317-27.
34. Weitz J, Schalhorn A, Kadmon M, Büchler M, Krempien R. Kolon-und Rektumkarzinom. *Die Onkologie: Springer*; 2010. p. 848-97.
35. Jørgensen O, Kronborg O, Fenger C. The Funen adenoma follow-up study: Incidence and death from colorectal carcinoma in an adenoma surveillance program. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 1993;28(10):869-74.
36. O'Brien MJ, Winawer SJ, Zauber AG, Gottlieb LS, Sternberg SS, Diaz B, et al. The National Polyp Study: patient and polyp characteristics associated with high-grade dysplasia in colorectal adenomas. *Gastroenterology*. 1990;98(2):371-9.
37. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *cell*. 1990;61(5):759-67.
38. Leslie A, Carey F, Pratt N, Steele R. The colorectal adenoma–carcinoma sequence. *British Journal of Surgery*. 2002;89(7):845-60.
39. Vakiani E, Solit DB. KRAS and BRAF: drug targets and predictive biomarkers. *J Pathol*. 2011;223(2):220-30.

40. Naguib A, Cooke JC, Happerfield L, Kerr L, Gay LJ, Luben RN, et al. Alterations in PTEN and PIK3CA in colorectal cancers in the EPIC Norfolk study: associations with clinicopathological and dietary factors. *BMC cancer*. 2011;11:123.
41. Kinzler KW, Vogelstein B. Gatekeepers and caretakers. *Nature*. 1997;386(6627):761-3.
42. Makinen M. Colorectal serrated adenocarcinoma. *Histopathology*. 2007;50:131-50.
43. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*. 2007;50(1):113-30.
44. Mäkinen MJ, George SM, Jernvall P, Mäkelä J, Vihko P, Karttunen TJ. Colorectal carcinoma associated with serrated adenoma--prevalence, histological features, and prognosis. *J Pathol*. 2001;193(3):286-94.
45. Kirchner T, Reu S. Development of molecular-pathologic entities of colorectal cancer. *Der Pathologe*. 2008;29:264-9.
46. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer research*. 1998;58(22):5248-57.
47. Aretz S. The differential diagnosis and surveillance of hereditary gastrointestinal polyposis syndromes. *Deutsches Arzteblatt international*. 2010;107(10):163-73.
48. Jones S, Emmerson P, Maynard J, Best JM, Jordan S, Williams GT, et al. Biallelic germline mutations in MYH predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G: C→ T: A mutations. *Human molecular genetics*. 2002;11(23):2961-7.
49. Koch-Institut R. Darm 2021 [Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2021/kid_2021_c18_c20_darm.pdf?blob=publicationFile].
50. Burt RW. Colon cancer screening. *Gastroenterology*. 2000;119(3):837-53.
51. Johns LE, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. *The American journal of gastroenterology*. 2001;96(10):2992-3003.
52. Eaden J, Abrams K, Mayberry J. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*. 2001;48(4):526-35.
53. Pohl C, Hombach A, Kruis W. Chronic inflammatory bowel disease and cancer. *Hepato-gastroenterology*. 2000;47(31):57-70.
54. Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet (London, England)*. 2014;383(9927):1490-502.
55. Schmiegel W, Buchberger B, Follmann M, Graeven U, Heinemann V, Langer T, et al. S3-leitlinie–kolorektales karzinom. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 2017;55(12):1344-498.
56. Amboss. Kolorektales Karzinom [Available from: https://next.amboss.com/de/article/TS06_2].
57. Stolte M, Rüschoff J, Klöppel G. *Verdauungstrakt und Peritoneum*: Springer; 2013.
58. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker KH. 1.9 Dickdarm (Intestinum crassum): Caecum mit Appendix vermiformis und Colon. In: Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker KH, editors. *Prometheus LernAtlas - Innere Organe*. 5. Auflage ed: Georg Thieme Verlag KG; 2018.
59. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. WHO classification of tumours of the digestive system: World Health Organization; 2010.
60. Sakamoto K, Watanabe M, De La Cruz C, Honda H, Ise H, Mitsui K, et al. Primary invasive micropapillary carcinoma of the colon. *Histopathology*. 2005;47(5):479-84.
61. Wen P, Xu Y, Frankel WL, Shen R. Invasive micropapillary carcinoma of the sigmoid colon: distinct morphology and aggressive behavior. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2008;1(5):457.

62. Kim M-J, Hong S-M, Jang SJ, Yu E, Kim J-S, Kim K-R, et al. Invasive colorectal micropapillary carcinoma: an aggressive variant of adenocarcinoma. *Human pathology*. 2006;37(7):809-15.
63. Frizelle F, Hobday K, Batts K, Nelson H. Adenosquamous and squamous carcinoma of the colon and upper rectum. *Diseases of the colon & rectum*. 2001;44(3):341-6.
64. Lanza G, Gafà R, Matteuzzi M, Santini A. Medullary-type poorly differentiated adenocarcinoma of the large bowel: a distinct clinicopathologic entity characterized by microsatellite instability and improved survival. *Journal of Clinical Oncology*. 1999;17(8):2429-.
65. Rüschoff J, Dietmaier W, Lüttges J, Seitz G, Bocker T, Zirngibl H, et al. Poorly differentiated colonic adenocarcinoma, medullary type: clinical, phenotypic, and molecular characteristics. *The American journal of pathology*. 1997;150(5):1815.
66. Wittekind C. *TNM: Klassifikation maligner Tumoren*: John Wiley & Sons; 2016.
67. Aldridge M, Phillips R, Hittinger R, Fry J, Fielding L. Influence of tumour site on presentation, management and subsequent outcome in large bowel cancer. *Journal of British Surgery*. 1986;73(8):663-70.
68. Runkel N, Schlag P, Schwarz V, Herfarth C. Outcome after emergency surgery for cancer of the large intestine. *Journal of British Surgery*. 1991;78(2):183-8.
69. Herold G. *Innere medizin 2021*: De Gruyter; 2021.
70. Öhman U. Prognosis in patients with obstructing colorectal carcinoma. *The American journal of surgery*. 1982;143(6):742-7.
71. Seufferlein T, Adler G. Früherkennung kolorektaler Karzinome. *Der Onkologe*. 2002;8(10):1080-8.
72. Jung BdÄuKdV. Bekanntmachung des Bundesausschusses der Ärzte und Krankenkassen über eine Änderung der Richtlinien über die Früherkennung von Krebserkrankungen (Krebsfrüherkennungs-Richtlinien). In: *Gesundheit Bf*, editor. 21. Juni 2002.
73. Birkner B. Evidenz-basierte Prävention des kolorektalen Karzinoms. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 2003;128(49):2598-603.
74. Bernie T, Les I, Paul G, Jan K, David W, Chris S. A systematic review of the effects of screening for colorectal cancer using the faecal occult blood test, hemoccult. *Bmj*. 1998;317(7158):559-65.
75. Pox C. Aktuelle Verfahren zur Früherkennung kolorektaler Karzinome. *Gastroenterologie up2date*. 2012;8(01):13-23.
76. Hol L, Van Leerdam ME, Van Ballegooijen M, Van Vuuren AJ, Van Dekken H, Reijerink JC, et al. Screening for colorectal cancer: randomised trial comparing guaiac-based and immunochemical faecal occult blood testing and flexible sigmoidoscopy. *Gut*. 2010;59(01):62-8.
77. Prandi M, Lionetto R, Bini A, Francioni G, Accarpio G, Anfossi A, et al. Prognostic evaluation of stage B colon cancer patients is improved by an adequate lymphadenectomy: results of a secondary analysis of a large scale adjuvant trial. *Annals of surgery*. 2002;235(4):458.
78. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, Thibodeau SN, Labianca R, Hamilton SR, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28(20):3219.
79. Nguyen LH, Goel A, Chung DC. Pathways of colorectal carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2020;158(2):291-302.
80. Segelman J, Singnomklao T, Hellborg H, Martling A. Differences in multidisciplinary team assessment and treatment between patients with stage IV colon and rectal cancer. *Colorectal Disease*. 2009;11(7):768-74.

81. Bröker B, Schütt C, Fleischer B, VISUV. Grundwissen Immunologie: Springer; 2019.
82. Bevan MJ. Cross-priming. *Nature immunology*. 2006;7(4):363-5.
83. Stevanovic S. Identification of tumour-associated T-cell epitopes for vaccine development. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2(7):514-.
84. Kreienberg R, Albert U, Follmann M, Kopp I, Kühn T, Wöckel A. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. *Senologie-Zeitschrift für Mammadiagnostik und-therapie*. 2013;10(03):164-92.
85. Moehler M, Al-Batran S-E, Andus T, Arends J, Arnold D, Baretton G, et al. S3-Leitlinie Magenkarzinom–Diagnostik und Therapie der Adenokarzinome des Magens und des ösophagogastralen Übergangs–Langversion 2.0–August 2019. AWMF-Registernummer: 032/009OL. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 2019;57(12):1517-632.
86. Peters S, Zimmermann S. Targeted therapy in NSCLC driven by HER2 insertions. *Translational lung cancer research*. 2014;3(2):84.
87. Coulie PG, Brichard V, Van Pel A, Wölfel T, Schneider J, Traversari C, et al. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *The Journal of experimental medicine*. 1994;180(1):35-42.
88. Kloor M, Becker C, Benner A, Woerner SM, Gebert J, Ferrone S, et al. Immunoselective pressure and human leukocyte antigen class I antigen machinery defects in microsatellite unstable colorectal cancers. *Cancer research*. 2005;65(14):6418-24.
89. Dibbern ME, Bullock TN, Jenkins TM, Duska LR, Stoler MH, Mills AM. Loss of MHC Class I Expression in HPV-associated Cervical and Vulvar Neoplasia: A Potential Mechanism of Resistance to Checkpoint Inhibition. *Am J Surg Pathol*. 2020;44(9):1184-91.
90. Hicklin DJ, Dellaratta DV, Kishore R, Liang B, Kageshita T, Ferrone S. Beta2-microglobulin gene mutations in human melanoma cells: molecular characterization and implications for immune surveillance. *Melanoma research*. 1997;7:S67-74.
91. Guerra N, Lacombe M-JT, Angevin E, Chouaib S, Carosella ED, Caignard A, et al. Tumor-specific up-regulation of the nonclassical class I HLA-G antigen expression in renal carcinoma. *Cancer research*. 2001;61(18):6838-45.
92. Chen W, Ten Dijke P. Immunoregulation by members of the TGFβ superfamily. *Nature Reviews Immunology*. 2016;16(12):723-40.
93. Mannino MH, Zhu Z, Xiao H, Bai Q, Wakefield MR, Fang Y. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. *Cancer Lett*. 2015;367(2):103-7.
94. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nature reviews Immunology*. 2012;12(4):253-68.
95. Murphy K, Weaver C. *Janeway Immunologie*: Springer-Verlag; 2018.
96. Spiotto MT, Yu P, Rowley DA, Nishimura MI, Meredith SC, Gajewski TF, et al. Increasing tumor antigen expression overcomes “ignorance” to solid tumors via crosspresentation by bone marrow-derived stromal cells. *Immunity*. 2002;17(6):737-47.
97. Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(1):351-8.
98. Albert ML, Jegathesan M, Darnell RB. Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells. *Nature immunology*. 2001;2(11):1010-7.
99. Hoffmann TK, Müller-Berghaus J, Ferris RL, Johnson JT, Storkus WJ, Whiteside TL. Alterations in the frequency of dendritic cell subsets in the peripheral circulation of patients with squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clinical Cancer Research*. 2002;8(6):1787-93.
100. Kusmartsev S, Gabrilovich DI. Immature myeloid cells and cancer-associated immune suppression. *Cancer immunology, immunotherapy*. 2002;51(6):293-8.

101. Della Bella S, Gennaro M, Vaccari M, Ferraris C, Nicola S, Riva A, et al. Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer. *British journal of cancer*. 2003;89(8):1463-72.
102. Gabrilovich DI, Ishida T, Nadaf S, Ohm JE, Carbone DP. Antibodies to vascular endothelial growth factor enhance the efficacy of cancer immunotherapy by improving endogenous dendritic cell function. *Clinical cancer research*. 1999;5(10):2963-70.
103. Hoentjen F, Sartor RB, Ozaki M, Jobin C. STAT3 regulates NF- κ B recruitment to the IL-12p40 promoter in dendritic cells. *Blood*. 2005;105(2):689-96.
104. Nefedova Y, Huang M, Kusmartsev S, Bhattacharya R, Cheng P, Salup R, et al. Hyperactivation of STAT3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer. *The Journal of Immunology*. 2004;172(1):464-74.
105. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annual review of immunology*. 2011;29(1):235-71.
106. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annual review of immunology*. 2004;22:329-60.
107. Bronte V, Brandau S, Chen SH, Colombo MP, Frey AB, Greten TF, et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nature communications*. 2016;7:12150.
108. Sonnenfeld A. Leukämische reaktionen bei carcinoma. *Zeitschrift f Klin Med*. 1929;111:108.
109. Talmadge JE, Gabrilovich DI. History of myeloid-derived suppressor cells. *Nature reviews Cancer*. 2013;13(10):739-52.
110. Gabrilovich DI. Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer immunology research*. 2017;5(1):3-8.
111. Gabrilovich DI, Bronte V, Chen S-H, Colombo MP, Ochoa A, Ostrand-Rosenberg S, et al. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer research*. 2007;67(1):425-.
112. Veglia F, Perego M, Gabrilovich D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nature immunology*. 2018;19(2):108-19.
113. Kumar V, Patel S, Tcyganov E, Gabrilovich DI. The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Trends in immunology*. 2016;37(3):208-20.
114. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(3):162-74.
115. Lang S, Bruderek K, Kaspar C, Höing B, Kanaan O, Dominas N, et al. Clinical Relevance and Suppressive Capacity of Human Myeloid-Derived Suppressor Cell Subsets. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2018;24(19):4834-44.
116. Marini O, Costa S, Bevilacqua D, Calzetti F, Tamassia N, Spina C, et al. Mature CD10(+) and immature CD10(-) neutrophils present in G-CSF-treated donors display opposite effects on T cells. *Blood*. 2017;129(10):1343-56.
117. Greten TF, Manns MP, Korangy F. Myeloid derived suppressor cells in human diseases. *International immunopharmacology*. 2011;11(7):802-7.
118. Serafini P, Borrello I, Bronte V, editors. Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Seminars in cancer biology*; 2006: Elsevier.
119. Chun E, Lavoie S, Michaud M, Gallini CA, Kim J, Soucy G, et al. CCL2 promotes colorectal carcinogenesis by enhancing polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cell population and function. *Cell reports*. 2015;12(2):244-57.
120. de Haas N, de Koning C, Spilgies L, de Vries IJM, Hato SV. Improving cancer immunotherapy by targeting the STATe of MDSCs. *Oncoimmunology*. 2016;5(7):e1196312.

121. Corzo CA, Cotter MJ, Cheng P, Cheng F, Kusmartsev S, Sotomayor E, et al. Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells. *The Journal of Immunology*. 2009;182(9):5693-701.
122. Vasquez-Dunddel D, Pan F, Zeng Q, Gorbounov M, Albesiano E, Fu J, et al. STAT3 regulates arginase-I in myeloid-derived suppressor cells from cancer patients. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(4):1580-9.
123. Sinha P, Okoro C, Foell D, Freeze HH, Ostrand-Rosenberg S, Srikrishna G. Proinflammatory S100 proteins regulate the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. *The Journal of Immunology*. 2008;181(7):4666-75.
124. Sade-Feldman M, Kanterman J, Ish-Shalom E, Elnekave M, Horwitz E, Baniyash M. Tumor necrosis factor- α blocks differentiation and enhances suppressive activity of immature myeloid cells during chronic inflammation. *Immunity*. 2013;38(3):541-54.
125. Turovskaya O, Foell D, Sinha P, Vogl T, Newlin R, Nayak J, et al. RAGE, carboxylated glycans and S100A8/A9 play essential roles in colitis-associated carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2008;29(10):2035-43.
126. Condamine T, Gabilovich DI. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. *Trends in immunology*. 2011;32(1):19-25.
127. Movahedi K, Guillemins M, Van den Bossche J, Van den Bergh R, Gysemans C, Beschin A, et al. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2008;111(8):4233-44.
128. Kusmartsev S, Gabilovich DI. STAT1 signaling regulates tumor-associated macrophage-mediated T cell deletion. *The Journal of Immunology*. 2005;174(8):4880-91.
129. Gallina G, Dolcetti L, Serafini P, De Santo C, Marigo I, Colombo MP, et al. Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(10):2777-90.
130. Sinha P, Clements VK, Fulton AM, Ostrand-Rosenberg S. Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer research*. 2007;67(9):4507-13.
131. Rodriguez PC, Hernandez CP, Quiceno D, Dubinett SM, Zabaleta J, Ochoa JB, et al. Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma. *The Journal of experimental medicine*. 2005;202(7):931-9.
132. Curtis MM, Way SS. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology*. 2009;126(2):177-85.
133. Novitskiy SV, Pickup MW, Gorska AE, Owens P, Chytil A, Aakre M, et al. TGF- β receptor II loss promotes mammary carcinoma progression by Th17-dependent mechanisms. *Cancer discovery*. 2011;1(5):430-41.
134. Wu P, Wu D, Ni C, Ye J, Chen W, Hu G, et al. $\gamma\delta$ T17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer. *Immunity*. 2014;40(5):785-800.
135. Greijer A, Van der Wall E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *Journal of clinical pathology*. 2004;57(10):1009-14.
136. Noman MZ, Desantis G, Janji B, Hasmim M, Karray S, Dessen P, et al. PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 α , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *Journal of Experimental Medicine*. 2014;211(5):781-90.
137. van Duijn A, Willemsen KJ, van Uden NO, Hoyng L, Erades S, Koster J, et al. A secondary role for hypoxia and HIF1 in the regulation of (IFN γ -induced) PD-L1 expression in melanoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2021:1-12.

138. Waight JD, Netherby C, Hensen ML, Miller A, Hu Q, Liu S, et al. Myeloid-derived suppressor cell development is regulated by a STAT/IRF-8 axis. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(10):4464-78.
139. Youn J-I, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol*. 2008;181(8):5791-802.
140. Srivastava MK, Sinha P, Clements VK, Rodriguez P, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer research*. 2010;70(1):68-77.
141. Schmielau J, Finn OJ. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer research*. 2001;61(12):4756-60.
142. Mazzoni A, Bronte V, Visintin A, Spitzer JH, Apolloni E, Serafini P, et al. Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism. *The Journal of Immunology*. 2002;168(2):689-95.
143. Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V, Kinarsky L, Sherman S, Kang L, et al. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nature medicine*. 2007;13(7):828-35.
144. Molon B, Ugel S, Del Pozzo F, Soldani C, Zilio S, Avella D, et al. Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2011;208(10):1949-62.
145. Huang B, Pan P-Y, Li Q, Sato AI, Levy DE, Bromberg J, et al. Gr-1+ CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer research*. 2006;66(2):1123-31.
146. Hoechst B, Gamrekashvili J, Manns MP, Greten TF, Korangy F. Plasticity of human Th17 cells and iTregs is orchestrated by different subsets of myeloid cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2011;117(24):6532-41.
147. Bruger AM, Dorhoi A, Esendagli G, Barczyk-Kahlert K, van der Bruggen P, Lipoldova M, et al. How to measure the immunosuppressive activity of MDSC: assays, problems and potential solutions. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2019;68(4):631-44.
148. Lindau D, Gielen P, Kroesen M, Wesseling P, Adema GJ. The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. *Immunology*. 2013;138(2):105-15.
149. Yang L, DeBusk LM, Fukuda K, Fingleton B, Green-Jarvis B, Shyr Y, et al. Expansion of myeloid immune suppressor Gr+CD11b+ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer cell*. 2004;6(4):409-21.
150. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature cell biology*. 2000;2(10):737-44.
151. Ostrand-Rosenberg S, Fenselau C. Myeloid-derived suppressor cells: immune-suppressive cells that impair antitumor immunity and are sculpted by their environment. *The Journal of Immunology*. 2018;200(2):422-31.
152. Coffelt SB, Wellenstein MD, de Visser KE. Neutrophils in cancer: neutral no more. *Nature Reviews Cancer*. 2016;16(7):431-46.
153. Lesina M, Kurkowski MU, Ludes K, Rose-John S, Treiber M, Klöppel G, et al. Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer. *Cancer cell*. 2011;19(4):456-69.
154. Fukuda A, Wang SC, Morris IV JP, Folias AE, Liou A, Kim GE, et al. Stat3 and MMP7 contribute to pancreatic ductal adenocarcinoma initiation and progression. *Cancer cell*. 2011;19(4):441-55.

155. Bald T, Quast T, Landsberg J, Rogava M, Glodde N, Lopez-Ramos D, et al. Ultraviolet-radiation-induced inflammation promotes angiotropism and metastasis in melanoma. *Nature*. 2014;507(7490):109-13.
156. Zhou J, Nefedova Y, Lei A, Gabrilovich D. Neutrophils and PMN-MDSC: Their biological role and interaction with stromal cells. *Seminars in immunology*. 2018;35:19-28.
157. Cools-Lartigue J, Spicer J, McDonald B, Gowing S, Chow S, Giannias B, et al. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(8):3446-58.
158. Yan HH, Pickup M, Pang Y, Gorska AE, Li Z, Chytil A, et al. Gr-1+ CD11b+ myeloid cells tip the balance of immune protection to tumor promotion in the premetastatic lung. *Cancer research*. 2010;70(15):6139-49.
159. Portella G, Cumming SA, Liddell J, Cui W, Ireland H, Akhurst RJ, et al. Transforming growth factor beta is essential for spindle cell conversion of mouse skin carcinoma in vivo: implications for tumor invasion. *Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 1998;9(5):393-404.
160. Do TV, Kubba LA, Du H, Sturgis CD, Woodruff TK. Transforming growth factor-beta1, transforming growth factor-beta2, and transforming growth factor-beta3 enhance ovarian cancer metastatic potential by inducing a Smad3-dependent epithelial-to-mesenchymal transition. *Mol Cancer Res*. 2008;6(5):695-705.
161. Sieminska I, Baran J. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Colorectal Cancer. *Frontiers in Immunology*. 2020;11.
162. Frydrychowicz M, Boruckowski M, Kolecka-Bednarczyk A, Dworacki G. The dual role of Treg in cancer. *Scandinavian journal of immunology*. 2017;86(6):436-43.
163. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nature Reviews Immunology*. 2010;10(7):490-500.
164. Gershon RK, Cohen P, Hencin R, Lieber SA. Suppressor T cells. *The Journal of Immunology*. 1972;108(3):586-90.
165. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *The Journal of Immunology*. 1995;155(3):1151-64.
166. Wang HY, Lee DA, Peng G, Guo Z, Li Y, Kiniwa Y, et al. Tumor-specific human CD4+ regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy. *Immunity*. 2004;20(1):107-18.
167. Petersen RP, Campa MJ, Sperlazza J, Conlon D, Joshi MB, Harpole Jr DH, et al. Tumor infiltrating Foxp3+ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. *Cancer*. 2006;107(12):2866-72.
168. Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, et al. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *Journal of clinical oncology*. 2006;24(34):5373-80.
169. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature medicine*. 2004;10(9):942-9.
170. Kono K, Kawaida H, Takahashi A, Sugai H, Mimura K, Miyagawa N, et al. CD4 (+) CD25high regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2006;55(9):1064-71.
171. Perrone G, Ruffini PA, Catalano V, Spino C, Santini D, Muretto P, et al. Intratumoural FOXP3-positive regulatory T cells are associated with adverse prognosis in radically resected gastric cancer. *European journal of cancer*. 2008;44(13):1875-82.

172. Li JF, Chu YW, Wang GM, Zhu TY, Rong RM, Hou J, et al. The prognostic value of peritumoral regulatory T cells and its correlation with intratumoral cyclooxygenase-2 expression in clear cell renal cell carcinoma. *BJU international*. 2009;103(3):399-405.
173. Gao Q, Qiu S-J, Fan J, Zhou J, Wang X-Y, Xiao Y-S, et al. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *Journal of clinical oncology*. 2007;25(18):2586-93.
174. Shenghui Z, Yixiang H, Jianbo W, Kang Y, Laixi B, Yan Z, et al. Elevated frequencies of CD4+ CD25+ CD127lo regulatory T cells is associated to poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia. *International journal of cancer*. 2011;129(6):1373-81.
175. Chang C, Wu S-Y, Kang Y-W, Lin K-P, Chen T-Y, Medeiros LJ, et al. High levels of regulatory T cells in blood are a poor prognostic factor in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *American journal of clinical pathology*. 2015;144(6):935-44.
176. Knol AC, Nguyen JM, Quéreux G, Brocard A, Khammari A, Dréno B. Prognostic value of tumor-infiltrating Foxp3+ T-cell subpopulations in metastatic melanoma. *Experimental dermatology*. 2011;20(5):430-4.
177. Xu W, Liu H, Song J, Fu H-X, Qiu L, Zhang B-F, et al. The appearance of Tregs in cancer nest is a promising independent risk factor in colon cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2013;139(11):1845-52.
178. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *cell*. 2008;133(5):775-87.
179. Caridade M, Graca L, Ribeiro RM. Mechanisms underlying CD4+ Treg immune regulation in the adult: from experiments to models. *Frontiers in immunology*. 2013;4:378.
180. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*. 2012;12(4):252-64.
181. Davis ID. An overview of cancer immunotherapy. *Immunology and cell biology*. 2000;78(3):179-95.
182. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*. 2011;480(7378):480-9.
183. Drolet M, Bénard É, Pérez N, Brisson M, Ali H, Boily M-C, et al. Population-level impact and herd effects following the introduction of human papillomavirus vaccination programmes: updated systematic review and meta-analysis. *The Lancet*. 2019;394(10197):497-509.
184. Nowak AK, Lake RA, Robinson BW. Combined chemoimmunotherapy of solid tumours: improving vaccines? *Advanced drug delivery reviews*. 2006;58(8):975-90.
185. Han L, Peng K, Qiu L-Y, Li M, Ruan J-H, He L-L, et al. Hitchhiking on controlled-release drug delivery systems: opportunities and challenges for cancer vaccines. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;12:1149.
186. Dobosz P, Dzieciatkowski T. The Intriguing History of Cancer Immunotherapy. *Frontiers in immunology*. 2019;10:2965.
187. Böhle A, Brandau S. Immune mechanisms in bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer. *The Journal of urology*. 2003;170(3):964-9.
188. Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, Solomon D, Topalian SL, Toy ST, et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *The New England journal of medicine*. 1988;319(25):1676-80.
189. Echchannaoui H, Dietrich K, Theobald M. Adoptiver Immuntransfer und CAR-T-Zellen bei malignen Erkrankungen. *Der Onkologe*. 2017;23(10):815-22.
190. Schimanski CC, Möhler M, Schön M, van Cutsem E, Greil R, Bechstein WO, et al. LICC: L-BLP25 in patients with colorectal carcinoma after curative resection of hepatic metastases: a randomized, placebo-controlled, multicenter, multinational, double-blinded phase II trial. *BMC cancer*. 2012;12:144.

191. Schimanski CC, Kasper S, Hegewisch-Becker S, Schröder J, Overkamp F, Kullmann F, et al. Adjuvant MUC vaccination with tecemotide after resection of colorectal liver metastases: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter AIO phase II trial (LICC). *Oncoimmunology*. 2020;9(1):1806680.
192. Moehler M, Folprecht G, Heinemann V, Holch JW, Maderer A, Kasper S, et al. Survival after secondary liver resection in metastatic colorectal cancer: Comparing data of three prospective randomized European trials (LICC, CELIM, FIRE-3). *International journal of cancer*. 2022;150(8):1341-9.
193. Sangha R, Butts C. L-BLP25: A peptide vaccine strategy in non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*. 2007;13(15):4652s-4s.
194. Nath S, Mukherjee P. MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends in molecular medicine*. 2014;20(6):332-42.
195. Li Y, Liu D, Chen D, Kharbanda S, Kufe D. Human DF3/MUC1 carcinoma-associated protein functions as an oncogene. *Oncogene*. 2003;22(38):6107-10.
196. Kondo K, Kohno N, Yokoyama A, Hiwada K. Decreased MUC1 expression induces E-cadherin-mediated cell adhesion of breast cancer cell lines. *Cancer research*. 1998;58(9):2014-9.
197. Makiguchi Y, Hinoda Y, Imai K. Effect of MUC1 mucin, an anti-adhesion molecule, on tumor cell growth. *Japanese journal of cancer research*. 1996;87(5):505-11.
198. Nath S, Daneshvar K, Roy LD, Grover P, Kidiyoor A, Mosley L, et al. MUC1 induces drug resistance in pancreatic cancer cells via upregulation of multidrug resistance genes. *Oncogenesis*. 2013;2(6):e51-e.
199. Palmer M, Parker J, Modi S, Butts C, Smylie M, Meikle A, et al. Phase I study of the BLP25 (MUC1 peptide) liposomal vaccine for active specific immunotherapy in stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer*. 2001;3(1):49-57; discussion 8.
200. North S, Butts C. Vaccination with BLP25 liposome vaccine to treat non-small cell lung and prostate cancers. *Expert Review of Vaccines*. 2005;4(3):249-57.
201. Butts C, Socinski MA, Mitchell PL, Thatcher N, Havel L, Krzakowski M, et al. Tecemotide (L-BLP25) versus placebo after chemoradiotherapy for stage III non-small-cell lung cancer (START): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *The lancet oncology*. 2014;15(1):59-68.
202. Wurz GT, Kao C-J, Wolf M, DeGregorio MW. Tecemotide: an antigen-specific cancer immunotherapy. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2014;10(11):3383-93.
203. Katakami N, Hida T, Nokihara H, Imamura F, Sakai H, Atagi S, et al. Phase I/II study of tecemotide as immunotherapy in Japanese patients with unresectable stage III non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2017;105:23-30.
204. Oliveres H, Caglevic C, Passiglia F, Taverna S, Smits E, Rolfo C. Vaccine and immune cell therapy in non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Disease*. 2018;10(Suppl 13):S1602.
205. Wu Y-L, Park K, Soo RA, Sun Y, Tyroller K, Wages D, et al. INSPIRE: a phase III study of the BLP25 liposome vaccine (L-BLP25) in Asian patients with unresectable stage III non-small cell lung cancer. *BMC cancer*. 2011;11(1):1-7.
206. KGaA M. Tecemotide (L-BLP25) in Rectal Cancer (SPRINT). NCT01507103.
207. North S, Graham K, Bodnar D, Venner P. A pilot study of the liposomal MUC1 vaccine BLP25 in prostate specific antigen failures after radical prostatectomy. *The Journal of urology*. 2006;176(1):91-5.
208. Singer CF, Pfeiler G, Hubalek M, Bartsch R, Stöger H, Pichler A, et al. Efficacy and safety of the therapeutic cancer vaccine tecemotide (L-BLP25) in early breast cancer: Results from a prospective, randomised, neoadjuvant phase II study (ABCSG 34). *Eur J Cancer*. 2020;132:43-52.

209. Van Der Burg SH. Therapeutic vaccines in cancer: moving from immunomonitoring to immunoguiding. Expert review of vaccines. 2008;7(1):1-5.
210. Bendall SC, Nolan GP, Roederer M, Chattopadhyay PK. A deep profiler's guide to cytometry. Trends in immunology. 2012;33(7):323-32.
211. Hegde PS, Karanikas V, Evers S. The where, the when, and the how of immune monitoring for cancer immunotherapies in the era of checkpoint inhibition. Clinical Cancer Research. 2016;22(8):1865-74.
212. Diaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI, Garrett-Mayer E, Cole DJ, Montero AJ. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin–cyclophosphamide chemotherapy. Cancer Immunology, Immunotherapy. 2009;58(1):49-59.
213. Halama N, Spille A, Lerchl T, Brand K, Herpel E, Welte S, et al. Hepatic metastases of colorectal cancer are rather homogeneous but differ from primary lesions in terms of immune cell infiltration. Oncoimmunology. 2013;2(4):e24116.
214. Greenplate AR, Johnson DB, Ferrell Jr PB, Irish JM. Systems immune monitoring in cancer therapy. European journal of cancer. 2016;61:77-84.
215. Fourcade J, Sun Z, Pagliano O, Chauvin J-M, Sander C, Janjic B, et al. PD-1 and Tim-3 Regulate the Expansion of Tumor Antigen–Specific CD8+ T Cells Induced by Melanoma Vaccines PD-1 and Tim-3 Regulate the Expansion of Vaccine-Induced CTL. Cancer research. 2014;74(4):1045-55.
216. Fu J, Malm I-J, Kadayakkara DK, Levitsky H, Pardoll D, Kim YJ. Preclinical Evidence That PD1 Blockade Cooperates with Cancer Vaccine TEGVAX to Elicit Regression of Established Tumors DC Activation and Anti-PD1 Can Induce Cancer Regression. Cancer research. 2014;74(15):4042-52.
217. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. American journal of clinical oncology. 1982;5(6):649-56.
218. Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH. Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. Annals of surgery. 1999;230(3):309-18; discussion 18-21.
219. Koch-Institut R. Herz-Kreislaufkrankungen 2013 [Available from: https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Themen/Chronische_Erkrankungen/HKK/HKK_node.html].
220. Ocana A, Nieto-Jiménez C, Pandiella A, Templeton AJ. Neutrophils in cancer: prognostic role and therapeutic strategies. Mol Cancer. 2017;16(1):137.
221. Moses K, Brandau S. Human neutrophils: Their role in cancer and relation to myeloid-derived suppressor cells. Seminars in immunology. 2016;28(2):187-96.
222. Kimura T, McKolanis JR, Dzubinski LA, Islam K, Potter DM, Salazar AM, et al. MUC1 vaccine for individuals with advanced adenoma of the colon: a cancer immunoprevention feasibility study. Cancer prevention research. 2013;6(1):18-26.
223. Ma P, Beatty PL, McKolanis J, Brand R, Schoen RE, Finn OJ. Circulating myeloid derived suppressor cells (MDSC) that accumulate in premalignancy share phenotypic and functional characteristics with MDSC in cancer. Frontiers in immunology. 2019;10:1401.
224. Kidzeru E, Gasper MA, Shao D, Edlefsen PT, Lejarcegui N, Havyarimana E, et al. Myeloid-derived suppressor cells and their association with vaccine immunogenicity in South African infants. Journal of leukocyte biology. 2021;110(5):939-50.
225. Kapellos TS, Bonaguro L, Gemünd I, Reusch N, Saglam A, Hinkley ER, et al. Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. Frontiers in Immunology. 2019;10.

226. Hanna RN, Cekic C, Sag D, Tacke R, Thomas GD, Nowyhed H, et al. Patrolling monocytes control tumor metastasis to the lung. *Science (New York, NY)*. 2015;350(6263):985-90.
227. Kubo H, Mensurado S, Gonçalves-Sousa N, Serre K, Silva-Santos B. Primary tumors limit metastasis formation through induction of IL15-mediated cross-talk between patrolling monocytes and NK cells. *Cancer immunology research*. 2017;5(9):812-20.
228. Zhao C, Tan YC, Wong WC, Sem X, Zhang H, Han H, et al. The CD14+/lowCD16+ monocyte subset is more susceptible to spontaneous and oxidant-induced apoptosis than the CD14+CD16- subset. *Cell Death & Disease*. 2010;1(11):e95-e.
229. Waschbisch A, Schröder S, Schraudner D, Sammet L, Weksler B, Melms A, et al. Pivotal role for CD16+ monocytes in immune surveillance of the central nervous system. *The Journal of Immunology*. 2016;196(4):1558-67.
230. Lin A, Liang F, Thompson EA, Vono M, Ols S, Lindgren G, et al. Rhesus macaque myeloid-derived suppressor cells demonstrate T cell inhibitory functions and are transiently increased after vaccination. *The Journal of Immunology*. 2018;200(1):286-94.
231. Koyama S, Takamizawa A, Sato E, Masubuchi T, Nagai S, Izumi T. Cyclophosphamide stimulates lung fibroblasts to release neutrophil and monocyte chemoattractants. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2001;280(6):L1203-L11.
232. Madondo MT, Quinn M, Plebanski M. Low dose cyclophosphamide: mechanisms of T cell modulation. *Cancer treatment reviews*. 2016;42:3-9.
233. Scurr M, Pembroke T, Bloom A, Roberts D, Thomson A, Smart K, et al. Low-dose cyclophosphamide induces antitumor T-cell responses, which associate with survival in metastatic colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*. 2017;23(22):6771-80.
234. Machiels J-PH, Reilly RT, Emens LA, Ercolini AM, Lei RY, Weintraub D, et al. Cyclophosphamide, doxorubicin, and paclitaxel enhance the antitumor immune response of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor-secreting whole-cell vaccines in HER-2/neu tolerized mice. *Cancer research*. 2001;61(9):3689-97.
235. Lutsiak MC, Semnani RT, De Pascalis R, Kashmiri SV, Schlom J, Sabzevari H. Inhibition of CD4+ 25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. *Blood*. 2005;105(7):2862-8.
236. Idorn M, Køllgaard T, Kongsted P, Sengeløv L. Correlation between frequencies of blood monocytic myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and negative prognostic markers in patients with castration-resistant metastatic prostate cancer. *Cancer immunology, immunotherapy*. 2014;63(11):1177-87.
237. Wang X, Liu Y, Diao Y, Gao N, Wan Y, Zhong J, et al. Gastric cancer vaccines synthesized using a TLR7 agonist and their synergistic antitumor effects with 5-fluorouracil. *J Transl Med*. 2018;16(1):120.
238. Stotz M, Pichler M, Absenger G, Szkandera J, Arminger F, Schaberl-Moser R, et al. The preoperative lymphocyte to monocyte ratio predicts clinical outcome in patients with stage III colon cancer. *British journal of cancer*. 2014;110(2):435-40.
239. Halazun K, Aldoori A, Malik H, Al-Mukhtar A, Prasad K, Toogood G, et al. Elevated preoperative neutrophil to lymphocyte ratio predicts survival following hepatic resection for colorectal liver metastases. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*. 2008;34(1):55-60.
240. Casado JG, Soto R, DelaRosa O, Peralbo E, Muñoz-Villanueva MdC, Rioja L, et al. CD8 T cells expressing NK associated receptors are increased in melanoma patients and display an effector phenotype. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2005;54(12):1162-71.
241. Meloni F, Morosini M, Solari N, Passadore I, Nascimbene C, Novo M, et al. Foxp3 expressing CD4+ CD25+ and CD8+ CD28- T regulatory cells in the peripheral blood of patients with lung cancer and pleural mesothelioma. *Human immunology*. 2006;67(1-2):1-12.

242. Karagöz B, Bilgi O, Gümüş M, Erikçi AA, Sayan Ö, Türken O, et al. CD8+ CD28- cells and CD4+ CD25+ regulatory T cells in the peripheral blood of advanced stage lung cancer patients. *Medical Oncology*. 2010;27(1):29-33.
243. Song G, Wang X, Jia J, Yuan Y, Wan F, Zhou X, et al. Elevated level of peripheral CD8+ CD28- T lymphocytes are an independent predictor of progression-free survival in patients with metastatic breast cancer during the course of chemotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2013;62(6):1123-30.
244. Cossarizza A, Ortolani C, Paganelli R, Barbieri D, Monti D, Sansoni P, et al. CD45 isoforms expression on CD4+ and CD8+ T cells throughout life, from newborns to centenarians: implications for T cell memory. *Mechanisms of ageing and development*. 1996;86(3):173-95.
245. Di Pucchio T, Pilla L, Capone I, Ferrantini M, Montefiore E, Urbani F, et al. Immunization of stage IV melanoma patients with Melan-A/MART-1 and gp100 peptides plus IFN- α results in the activation of specific CD8+ T cells and monocyte/dendritic cell precursors. *Cancer research*. 2006;66(9):4943-51.
246. Hueman MT, Stojadinovic A, Storrer CE, Dehqanzada ZA, Gurney JM, Shriver CD, et al. Analysis of naive and memory CD4 and CD8 T cell populations in breast cancer patients receiving a HER2/neu peptide (E75) and GM-CSF vaccine. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2007;56(2):135-46.
247. Cattin S, Fellay B, Calderoni A, Christinat A, Negretti L, Biggiogero M, et al. Circulating immune cell populations related to primary breast cancer, surgical removal, and radiotherapy revealed by flow cytometry analysis. *Breast Cancer Res*. 2021;23(1):64.
248. Nedergaard BS, Ladekarl M, Thomsen HF, Nyengaard JR, Nielsen K. Low density of CD3+, CD4+ and CD8+ cells is associated with increased risk of relapse in squamous cell cervical cancer. *Br J Cancer*. 2007;97(8):1135-8.
249. Mahajan UM, Langhoff E, Goni E, Costello E, Greenhalf W, Halloran C, et al. Immune Cell and Stromal Signature Associated With Progression-Free Survival of Patients With Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Gastroenterology*. 2018;155(5):1625-39.e2.
250. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science (New York, NY)*. 2006;313(5795):1960-4.
251. Pagès F, Mlecnik B, Marliot F, Bindea G, Ou F-S, Bifulco C, et al. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *The Lancet*. 2018;391(10135):2128-39.
252. Jaillon S, Ponzetta A, Di Mitri D, Santoni A, Bonecchi R, Mantovani A. Neutrophil diversity and plasticity in tumour progression and therapy. *Nature reviews Cancer*. 2020;20(9):485-503.
253. Furumaya C, Martinez-Sanz P, Bouti P, Kuijpers TW, Matlung HL. Plasticity in pro-and anti-tumor activity of neutrophils: shifting the balance. *Frontiers in immunology*. 2020:2100.
254. Rueda CM, Jackson CM, Chougnet CA. Regulatory T-Cell-Mediated Suppression of Conventional T-Cells and Dendritic Cells by Different cAMP Intracellular Pathways. *Frontiers in immunology*. 2016;7:216.
255. Sun D, Tian L, Bian T, Zhao H, Tao J, Feng L, et al. The role of CD28 in the prognosis of young lung adenocarcinoma patients. *BMC cancer*. 2020;20(1):1-11.
256. Tsukishiro T, Donnenberg AD, Whiteside TL. Rapid turnover of the CD8+ CD28-T-cell subset of effector cells in the circulation of patients with head and neck cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2003;52(10):599-607.
257. Urbaniak-Kujda D, Kapelko-Słowik K, Wołowicz D, Dybko J, Halań A, Jaźwiec B, et al. Increased percentage of CD8+ CD28-suppressor lymphocytes in peripheral blood and skin

- infiltrates correlates with advanced disease in patients with cutaneous T-cell lymphomas. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2009;63:355-9.
258. Kook H, Zeng W, Guibin C, Kirby M, Young NS, Maciejewski JP. Increased cytotoxic T cells with effector phenotype in aplastic anemia and myelodysplasia. *Experimental hematology*. 2001;29(11):1270-7.
259. Strioga M, Pasukoniene V, Characiejus D. CD8+ CD28- and CD8+ CD57+ T cells and their role in health and disease. *Immunology*. 2011;134(1):17-32.
260. Jordan KR, Amaria RN, Ramirez O, Callihan EB, Gao D, Borakove M, et al. Myeloid-derived suppressor cells are associated with disease progression and decreased overall survival in advanced-stage melanoma patients. *Cancer immunology, immunotherapy*. 2013;62(11):1711-22.
261. Pagès F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2005;353(25):2654-66.
262. Pagès F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, et al. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(35):5944-51.
263. Lee WS, Park S, Lee WY, Yun SH, Chun HK. Clinical impact of tumor-infiltrating lymphocytes for survival in stage II colon cancer. *Cancer*. 2010;116(22):5188-99.
264. Chew A, Salama P, Robbshaw A, Klopčič B, Zeps N, Platell C, et al. SPARC, FOXP3, CD8 and CD45 correlation with disease recurrence and long-term disease-free survival in colorectal cancer. *PLoS One*. 2011;6(7):e22047.
265. Noshō K, Baba Y, Tanaka N, Shima K, Hayashi M, Meyerhardt JA, et al. Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review. *J Pathol*. 2010;222(4):350-66.

8 Anhang

Die Tabelle zeigt zusammenfassend den Mittelwert, den Median, die Standardabweichung sowie das Minimum und Maximum der ausgewählten Variablen zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten. Darüber hinaus wird dargestellt, wie viele Patienten zu dem jeweiligen Untersuchungszeit noch an der Analyse teilgenommen haben.

		N	NMiss	Mean	Std	Min	Q1	Median	Q3	Max
CD10 ⁺ CD15 ⁺ GR_Wo0	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	77	1	25.33	17.45	0.27	10.55	24.64	35.42	84.54
	PLACEBO + Saline	41	0	28.93	18.26	3.36	14.82	25.86	39.28	71.98
	Total	118	1	26.58	17.74	0.27	14.28	24.75	38.47	84.54
CD10 ⁻ CD15 ⁺ GR_Wo0	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	77	1	6.27	10.78	0.26	1.52	2.53	5.35	53.80
	PLACEBO + Saline	41	0	5.30	7.89	0.72	1.72	2.82	5.31	48.52
	Total	118	1	5.93	9.85	0.26	1.52	2.55	5.35	53.80
HLA-DR ⁺ CD14 ⁺ Mo_Wo0	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	77	1	11.31	5.38	0.24	7.47	10.97	14.68	26.14
	PLACEBO + Saline	41	0	11.34	5.11	2.36	7.61	11.82	14.41	22.28
	Total	118	1	11.32	5.27	0.24	7.47	11.12	14.68	26.14
HLA-DR ⁻ CD14 ⁺ Mo_Wo0	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	77	1	4.84	4.24	0.07	1.87	3.91	7.17	21.67
	PLACEBO + Saline	41	0	4.64	3.79	0.00	1.51	4.15	6.59	14.81
	Total	118	1	4.77	4.07	0.00	1.51	3.92	7.01	21.67
CD3 ⁺ _Wo0_b er	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	76	2	23.31	11.39	2.63	13.42	24.47	30.97	51.67
	PLACEBO + Saline	41	0	21.75	10.47	5.43	14.26	20.45	28.06	49.89
	Total	117	2	22.77	11.05	2.63	13.59	23.46	30.29	51.67
CD28 ⁻ CD4 ⁺ _Wo0	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	77	1	8.42	12.56	0.00	0.14	1.23	8.36	39.87
	PLACEBO + Saline	41	0	6.95	11.46	0.00	0.25	1.51	8.27	49.56
	Total	118	1	7.91	12.16	0.00	0.17	1.28	8.36	49.56
CD28 ⁻ CD8 ⁺ _Wo0r	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	76	2	12.82	9.50	0.00	4.46	12.71	19.11	36.53
	PLACEBO + Saline	41	0	9.92	7.42	0.60	4.36	6.87	14.67	28.68
	Total	117	2	11.80	8.90	0.00	4.37	9.95	16.86	36.53
CD45RO ⁺ CD4 ⁺ _Wo0	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	77	1	15.61	9.00	0.00	8.83	14.11	21.87	46.99
	PLACEBO + Saline	41	0	14.60	7.55	2.86	8.23	14.07	18.93	35.30
	Total	118	1	15.25	8.50	0.00	8.82	14.09	21.82	46.99
CD45RA ⁺ CD4 ⁺ _Wo0	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	77	1	9.30	7.22	0.00	2.98	7.88	13.27	30.95
	PLACEBO + Saline	41	0	9.28	6.85	0.39	3.74	6.62	14.64	29.67
	Total	118	1	9.29	7.06	0.00	3.34	7.24	13.56	30.95
CD45RO ⁺ CD8 ⁺ _Wo0	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	77	1	11.69	8.29	0.00	5.27	9.08	16.65	33.56
	PLACEBO + Saline	41	0	10.03	6.04	1.26	5.62	9.23	13.82	26.15
	Total	118	1	11.11	7.60	0.00	5.27	9.20	16.06	33.56

		N	NMiss	Mean	Std	Min	Q1	Median	Q3	Max
CD45RA ⁺ CD8 ⁺ _Wo0	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	77	1	14.36	8.59	0.00	9.09	13.54	19.50	40.35
	PLACEBO + Saline	41	0	13.90	7.12	3.56	7.56	13.58	19.02	37.62
	Total	118	1	14.20	8.08	0.00	8.04	13.56	19.29	40.35
CD25 ⁺ CD127 ⁻ 7 ⁺ CD4 ⁺ Treg_ Wo0	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	77	1	1.29	1.07	0.00	0.58	1.10	1.77	5.51
	PLACEBO + Saline	41	0	1.19	0.94	0.03	0.45	1.00	1.65	4.37
	Total	118	1	1.26	1.03	0.00	0.48	1.07	1.74	5.51
CD10 ⁺ CD15 ⁺ GR_Wo9	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	66	12	22.70	16.14	0.41	10.62	20.62	31.55	60.05
	PLACEBO + Saline	35	6	25.62	22.12	0.08	7.36	20.96	37.21	88.37
	Total	101	18	23.71	18.37	0.08	8.61	20.96	35.50	88.37
CD10 ⁻ CD15 ⁻ GR_W o9	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	66	12	7.19	11.15	0.38	1.54	3.28	7.28	68.16
	PLACEBO + Saline	35	6	5.27	6.41	0.39	1.32	2.10	5.87	24.92
	Total	101	18	6.52	9.78	0.38	1.51	3.12	7.10	68.16
HLA- DR ⁺ CD14 ⁺ Mo _Wo9	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	66	12	11.24	4.92	0.64	7.10	11.39	14.36	24.78
	PLACEBO + Saline	35	6	11.96	5.48	2.84	7.53	11.43	15.53	23.54
	Total	101	18	11.49	5.11	0.64	7.53	11.43	14.92	24.78
HLA-DR ⁻ CD14 ⁺ Mo_ 9	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	66	12	5.01	4.03	0.00	1.77	4.20	6.68	19.88
	PLACEBO + Saline	35	6	6.56	6.12	0.57	1.82	4.50	9.79	21.66
	Total	101	18	5.55	4.88	0.00	1.82	4.42	6.98	21.66
CD3 ⁺ Wo9	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	66	12	24.09	12.12	0.00	16.00	22.07	31.59	54.98
	PLACEBO + Saline	35	6	19.83	10.22	3.09	11.40	18.39	26.06	46.27
	Total	101	18	22.61	11.63	0.00	13.78	21.50	31.13	54.98
CD28 ⁻ CD4 ⁺ _Wo9	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	66	12	8.79	12.15	0.00	0.27	2.78	14.14	54.51
	PLACEBO + Saline	35	6	8.50	11.00	0.00	0.37	3.30	12.84	34.68
	Total	101	18	8.69	11.71	0.00	0.30	3.02	12.84	54.51
CD28 ⁺ CD8 ⁺ _Wo9	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	66	12	12.62	9.01	0.00	4.77	11.81	18.35	42.71
	PLACEBO + Saline	35	6	10.08	8.70	0.00	3.07	6.86	16.87	34.37
	Total	101	18	11.74	8.94	0.00	4.40	10.69	17.28	42.71
CD45RO ⁺ CD4 ⁺ _Wo9	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	66	12	15.78	8.80	0.83	7.98	14.66	22.01	41.38
	PLACEBO + Saline	35	6	14.62	7.93	3.45	7.29	13.39	20.98	29.97
	Total	101	18	15.38	8.49	0.83	7.74	14.50	21.19	41.38
CD45RA ⁺ CD4 ⁺ _Wo9	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	66	12	9.96	7.53	0.01	3.59	7.91	15.33	29.18
	PLACEBO + Saline	35	6	7.75	6.66	0.02	1.97	5.87	12.17	22.82
	Total	101	18	9.19	7.29	0.01	3.15	7.15	14.20	29.18
CD45RO ⁺ CD8 ⁺ _Wo9	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	66	12	9.87	7.11	0.00	3.95	10.02	14.10	27.15
	PLACEBO + Saline	35	6	9.11	6.52	0.00	3.98	8.48	13.82	23.27
	Total	101	18	9.61	6.89	0.00	3.98	8.85	14.02	27.15

		N	NMiss	Mean	Std	Min	Q1	Median	Q3	Max
CD45RA ⁺ CD8 ⁺ _Wo9	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	66	12	14.98	9.28	0.00	9.44	13.05	21.36	38.70
	PLACEBO + Saline	35	6	10.45	7.44	0.00	4.31	8.68	18.16	27.04
	Total	101	18	13.41	8.92	0.00	7.17	11.48	19.40	38.70
CD25 ⁺ CD127 ⁻ 7 ⁺ CD4 ⁺ Treg_ Wo9	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	66	12	1.36	1.03	0.01	0.55	1.18	1.73	5.64
	PLACEBO + Saline	35	6	1.21	0.99	0.00	0.27	0.99	1.98	3.34
	Total	101	18	1.31	1.01	0.00	0.49	1.18	1.74	5.64
CD10 ⁺ CD15 ⁺ GR_Wo26	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	40	38	26.87	18.85	1.10	10.87	24.93	45.67	64.09
	PLACEBO + Saline	25	16	29.82	20.20	1.88	17.61	24.27	38.35	74.88
	Total	65	54	28.01	19.28	1.10	12.69	24.27	43.03	74.88
CD10 ⁻ CD15 ⁺ GR_W o26	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	40	38	4.13	4.93	0.42	1.48	2.56	4.33	29.20
	PLACEBO + Saline	25	16	6.43	11.75	0.22	1.24	2.78	4.51	53.12
	Total	65	54	5.01	8.24	0.22	1.35	2.77	4.35	53.12
HLA- DR ⁺ CD14 ⁺ Mo _Wo26	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	40	38	10.27	5.50	0.00	6.65	10.06	14.59	22.93
	PLACEBO + Saline	25	16	10.80	4.86	0.64	7.56	10.67	15.10	20.27
	Total	65	54	10.48	5.23	0.00	7.48	10.30	14.73	22.93
HLA-DR ⁻ CD14 ⁺ Mo_Wo 26	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	40	38	3.92	3.51	0.00	1.47	2.44	6.23	15.49
	PLACEBO + Saline	25	16	4.45	3.79	0.51	1.57	3.40	6.12	15.07
	Total	65	54	4.13	3.60	0.00	1.47	2.72	6.12	15.49
CD3 ⁺ _Wo26	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	40	38	23.96	11.16	0.00	16.10	24.47	33.15	43.33
	PLACEBO + Saline	25	16	18.32	11.84	0.26	8.94	14.82	25.87	41.00
	Total	65	54	21.79	11.67	0.00	11.72	21.95	31.23	43.33
CD28 ⁻ CD4 ⁺ _Wo26	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	40	38	6.60	9.62	0.00	0.30	1.99	9.14	38.35
	PLACEBO + Saline	25	16	7.03	10.38	0.00	0.48	2.56	7.42	36.77
	Total	65	54	6.76	9.84	0.00	0.36	2.48	8.95	38.35
CD28 ⁻ CD8 ⁺ _Wo26	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	40	38	12.24	9.15	0.00	5.17	12.13	16.26	40.87
	PLACEBO + Saline	25	16	8.58	8.34	0.00	2.89	6.33	11.15	34.76
	Total	65	54	10.83	8.97	0.00	4.66	8.49	15.06	40.87
CD45RO ⁺ CD4 ⁺ _Wo26	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	40	38	17.05	8.93	2.50	10.11	15.55	20.74	42.14
	PLACEBO + Saline	25	16	11.51	7.09	0.17	7.19	9.86	15.90	27.00
	Total	65	54	14.92	8.65	0.17	7.98	14.05	19.54	42.14
CD45RA ⁺ CD4 ⁺ _Wo26	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	40	38	9.86	8.15	0.55	3.35	8.00	14.90	36.86
	PLACEBO + Saline	25	16	7.91	6.44	0.31	2.58	7.30	10.98	23.67
	Total	65	54	9.11	7.55	0.31	2.82	7.30	13.92	36.86
CD45RO ⁺ CD8 ⁺ _Wo26	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	40	38	12.15	9.70	0.00	5.92	9.43	14.16	39.01
	PLACEBO + Saline	25	16	7.48	4.80	0.05	4.29	7.46	9.84	23.44
	Total	65	54	10.35	8.44	0.00	4.94	8.16	11.94	39.01

		N	NMiss	Mean	Std	Min	Q1	Median	Q3	Max
CD45RA ⁺ CD8 ⁺ _Wo26	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	40	38	15.44	9.16	0.00	8.59	13.71	21.71	39.59
	PLACEBO + Saline	25	16	12.48	7.82	0.50	5.86	11.40	19.62	25.04
	Total	65	54	14.30	8.73	0.00	6.52	13.19	20.99	39.59
CD25 ⁺ CD127 ⁻ 7 ⁺ CD4 ⁺ Treg_ Wo26	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	40	38	1.56	2.39	0.00	0.47	0.83	1.89	14.74
	PLACEBO + Saline	25	16	0.93	0.65	0.00	0.42	0.75	1.46	2.08
	Total	65	54	1.32	1.93	0.00	0.46	0.80	1.57	14.74
CD10 ⁺ CD15 ⁺ GR_Wo50	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	28	50	20.10	18.40	2.87	6.13	12.81	27.10	60.89
	PLACEBO + Saline	19	22	20.18	11.85	0.21	10.55	22.10	27.99	46.48
	Total	47	72	20.13	15.93	0.21	7.56	15.45	27.99	60.89
CD10 ⁻ CD15 ⁺ GR_W o50	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	28	50	2.27	2.38	0.01	0.61	1.18	3.15	9.46
	PLACEBO + Saline	19	22	7.38	10.79	0.95	1.65	2.66	8.32	42.79
	Total	47	72	4.34	7.44	0.01	0.96	1.96	3.96	42.79
HLA- DR ⁺ CD14 ⁺ Mo _Wo50	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	28	50	12.47	5.96	1.68	9.32	10.64	15.90	29.21
	PLACEBO + Saline	19	22	10.71	5.82	2.64	5.61	9.40	15.09	21.36
	Total	47	72	11.76	5.90	1.68	7.33	10.25	15.81	29.21
HLA-DR ⁻ CD14 ⁺ Mo_Wo 50	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	28	50	3.73	3.16	0.06	1.21	2.46	6.71	9.70
	PLACEBO + Saline	19	22	6.06	5.30	0.23	0.60	5.03	9.85	18.69
	Total	47	72	4.67	4.26	0.06	1.16	3.39	7.81	18.69
CD28 ⁻ CD4 ⁺ _Wo50	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	26	52	12.96	9.34	0.03	3.41	13.81	17.58	31.36
	PLACEBO + Saline	19	22	8.34	8.32	0.00	2.42	5.50	13.67	33.15
	Total	45	74	11.01	9.12	0.00	3.02	11.11	16.12	33.15
CD28 ⁻ CD8 ⁺ _Wo50	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	26	52	15.70	9.12	1.55	8.77	16.13	20.72	34.55
	PLACEBO + Saline	19	22	9.75	6.63	0.00	4.34	9.97	14.41	22.96
	Total	45	74	13.19	8.61	0.00	8.42	13.74	17.41	34.55
T2CD45RO ⁺ C D4 ⁺ _Wo50	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	28	50	16.99	8.57	6.04	9.76	15.69	21.11	44.29
	PLACEBO + Saline	19	22	15.27	7.87	4.68	8.99	15.15	17.75	32.47
	Total	47	72	16.30	8.25	4.68	9.70	15.33	20.46	44.29
CD45RA ⁺ CD4 ⁺ _Wo50	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	28	50	10.00	7.96	0.51	2.99	7.01	16.44	27.30
	PLACEBO + Saline	19	22	8.03	6.86	0.02	2.76	6.47	11.12	23.45
	Total	47	72	9.20	7.52	0.02	2.79	6.87	14.64	27.30
CD45RO ⁺ CD8 ⁺ _Wo50	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	28	50	12.51	8.66	1.77	6.84	9.42	16.12	36.40
	PLACEBO + Saline	19	22	9.44	8.55	0.00	2.58	7.04	17.57	27.98
	Total	47	72	11.27	8.66	0.00	4.82	9.13	16.52	36.40
CD45RA ⁺ CD8 ⁺ _Wo50	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	28	50	14.95	8.26	3.74	7.37	14.34	19.01	32.54
	PLACEBO + Saline	19	22	11.56	8.47	0.00	4.06	11.54	18.06	27.25
	Total	47	72	13.58	8.42	0.00	6.77	12.51	18.12	32.54

		N	NMiss	Mean	Std	Min	Q1	Median	Q3	Max
CD25 ⁺ CD127 ⁻ 7 ⁺ CD4 ⁺ Treg_ Wo50	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	28	50	1.15	0.84	0.12	0.53	0.85	1.59	3.16
	PLACEBO + Saline	19	22	1.06	0.90	0.00	0.29	0.87	1.74	3.18
	Total	47	72	1.12	0.85	0.00	0.51	0.87	1.68	3.18
CD10 ⁺ CD15 ⁺ GR_Wo98	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	3	75	10.41	14.16	0.27	0.27	4.39	26.59	26.59
	PLACEBO + Saline	4	37	20.09	16.79	5.44	5.55	20.10	34.63	34.73
	Total	7	112	15.94	15.32	0.27	4.39	5.66	34.54	34.73
CD10 ⁻ CD15 ⁺ GR_W o98	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	3	75	6.59	8.04	1.31	1.31	2.61	15.83	15.83
	PLACEBO + Saline	4	37	6.28	7.41	0.56	1.81	3.72	10.75	17.14
	Total	7	112	6.41	7.00	0.56	1.31	3.07	15.83	17.14
HLA- DR ⁺ CD14 ⁺ Mo _Wo98	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	3	75	10.75	5.91	4.37	4.37	11.84	16.04	16.04
	PLACEBO + Saline	4	37	9.87	5.89	2.36	5.32	10.68	14.43	15.77
	Total	7	112	10.25	5.40	2.36	4.37	11.84	15.77	16.04
HLA-DR ⁻ CD14 ⁺ Mo_Wo 98	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	3	75	3.48	0.42	3.16	3.16	3.33	3.96	3.96
	PLACEBO + Saline	4	37	7.20	4.36	1.93	3.62	8.02	10.78	10.83
	Total	7	112	5.61	3.68	1.93	3.16	3.96	10.74	10.83
CD3 ⁺ _LY_Wo 98	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	3	75	30.33	13.68	20.98	20.98	23.98	46.03	46.03
	PLACEBO + Saline	4	37	18.04	8.86	12.33	12.43	14.39	23.65	31.05
	Total	7	112	23.31	12.03	12.33	12.53	20.98	31.05	46.03
CD28 ⁻ CD4 ⁺ _Wo98	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	3	75	7.97	10.89	1.62	1.62	1.74	20.54	20.54
	PLACEBO + Saline	4	37	14.93	10.33	6.17	8.75	11.83	21.11	29.89
	Total	7	112	11.95	10.33	1.62	1.74	11.33	20.54	29.89
CD28 ⁻ CD8 ⁺ _Wo98	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	3	75	11.70	10.49	2.55	2.55	9.41	23.15	23.15
	PLACEBO + Saline	4	37	11.32	2.20	9.49	10.01	10.64	12.63	14.52
	Total	7	112	11.49	6.26	2.55	9.41	10.54	14.52	23.15
CD45RO ⁺ CD4 +_Wo98	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	3	75	17.03	9.63	8.34	8.34	15.37	27.38	27.38
	PLACEBO + Saline	4	37	15.11	5.88	9.23	11.09	14.04	19.13	23.13
	Total	7	112	15.93	7.02	8.34	9.23	15.13	23.13	27.38
CD45RA ⁺ CD4 +_Wo98	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	3	75	6.33	3.49	3.20	3.20	5.70	10.10	10.10
	PLACEBO + Saline	4	37	3.00	2.60	0.24	0.78	3.16	5.22	5.44
	Total	7	112	4.43	3.26	0.24	1.33	5.00	5.70	10.10
CD45RO ⁺ CD8 +_Wo98	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	3	75	5.71	1.78	4.34	4.34	5.08	7.73	7.73
	PLACEBO + Saline	4	37	10.70	5.10	4.27	6.73	11.33	14.66	15.86
	Total	7	112	8.56	4.60	4.27	4.34	7.73	13.46	15.86
CD45RA ⁺ CD8 +_Wo98	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	3	75	15.55	4.75	11.71	11.71	14.07	20.86	20.86
	PLACEBO + Saline	4	37	7.97	6.23	1.99	3.90	6.61	12.03	16.67
	Total	7	112	11.22	6.58	1.99	5.82	11.71	16.67	20.86

		N	NMiss	Mean	Std	Min	Q1	Median	Q3	Max
CD25⁺CD127⁻CD4⁺Treg _Wo98	Treatment Arm									
	L-BLP25 + Cyclophosphamide	3	75	0.92	0.70	0.20	0.20	0.97	1.60	1.60
	PLACEBO + Saline	4	37	0.61	0.50	0.21	0.26	0.45	0.96	1.32
	Total	7	112	0.74	0.57	0.20	0.21	0.60	1.32	1.60

9 Danksagung

Zuallererst danke ich an dieser Stelle ganz herzlich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Markus Munder für die Promotionsgelegenheit in der III. Medizinischen Klinik und die professionelle Betreuung dieser Arbeit, indem ich in ihm bei Rückfragen immer einen Ansprechpartner fand und er stets neue Anregungen und Ideen für das Projekt hatte.

Danach gilt mein Dank auch Herrn Prof. Dr. med. Markus Möhler sowie den MitarbeiterInnen seiner AG, Herrn Prof. Dr. med. Markus Radsak und den MitarbeiterInnen, insbesondere Frau [REDACTED] und Frau [REDACTED], des Durchflusszytometrie-Labors der III. Medizinischen Klinik für die Bereitstellung der Rohdaten sowie für die Beantwortung meiner Fragen.

Für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung sowie für die Beantwortung sich daraus ergebender Fragen sende ich ganz vielen lieben Dank an Frau Dr. Irene Schmidtman (IMBEI Mainz).

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meinen Freunden für ihre aufmunternden Worte und ihr Verständnis während der gesamten Studie. Bei [REDACTED] sowie bei meiner Schwester bedanke ich mich für das Korrekturlesen der Arbeit und ihre immerwährende Unterstützung.

Ein großer Dank gilt meiner Familie, die stets hinter mir steht, mich motiviert und inspiriert.

10 Lebenslauf