

Die Wahl der Methode bei der Herstellung von Gewebeproben kann zu abweichenden Ergebnissen bei der Überlebensanalyse von Krebspatienten führen:

- ▶ **Vollumfängliche Gewebeproben** bilden die Zusammensetzung des Tumormikromilieus besser ab als gewebssparende, gestanzte Proben.
- ▶ **Die Verwendung gestanzter Gewebeproben** könnte aufgrund der Heterogenität der Immunzellenverteilung im Tumor zu Abweichungen im Ergebnis der Quantifizierungsanalyse führen.



Immunmarkeranalyse

Größe der Tumorgewebefläche: entscheidend für die Einschätzung der Überlebensprognose

Die Immunogenität verschiedener Krebsarten spielt eine wesentliche Rolle zur Einschätzung der Überlebensprognose der Patienten. Beim kolorektalen Karzinom (CRC) hat sich die Dichte der T-Zellen als entscheidender prognostischer Faktor erwiesen (Immunoscore®). Bei hoch-immunogenen Tumoren kommt es hier zur Aktivierung der Immuncheckpoint-Achse, welche diese Tumoren für eine Immuntherapie zugänglich macht; diese Tumorgruppe bestreitet allerdings nur 15 % aller CRCs. Rezente Studien beschäftigen sich daher einerseits mit der Evaluierung von Immunbiomarkern zur Einschätzung der Überlebensprognose, andererseits mit der Induktion einer Immunstimulation durch verschiedene adjuvante Therapien (u. a. Radiotherapie).

Tumormikromilieu beim kolorektalen Karzinom

Die Zusammensetzung des Tumormikromilieus gilt als prognostischer Faktor bei Patienten mit CRC. Hierbei zeigen Tumoren mit einer hohen Dichte an CD3- und CD8-positiven T-Zellen nachweislich eine signifikant höhere Überlebensrate; diese Daten wurden zuletzt im Rahmen einer internationalen Multicenterstudie anhand eines Patientenkollektivs mit nicht-metastasiertem CRC (UICC TNM-Stadium I-III) validiert (Immunoscore®). Um eine opti-

male Tumorkontrolle zu erzielen, sollte die Zusammensetzung an Immunzellen im Tumormikromilieu möglichst ausbalanciert sein. Bei CRCs mit hoher Immunogenität, sog. Mikrosatelliten-instabile Tumoren, kommt es aufgrund einer hohen Mutationslast zur Akkumulation von Neoantigenen, welche eine Stimulation der angeborenen als auch der erworbenen Immunantwort induzieren. Es kommt zur konsekutiven Expression von Immuncheckpoint-Molekülen (PD-1, PD-L1) auf den Tumorzellen oder den tumorinfiltrierenden Immunzellen – dies stellt einen Schlüsselmechanismus für das Ansprechen auf eine Therapie mittels Immuncheckpoint-Inhibitoren (z. B. Pembrolizumab) dar. Hierdurch konnten langfristige Tumorremissionsraten erzielt werden; dennoch weist die überwiegende Mehrzahl an CRC-Patienten (75 %) Tumoren mit geringer Immuncheckpoint-Expression auf, die einer Immuntherapie nicht zugänglich sind.

Stimulation der Tumorimmunogenität beim Rektumkarzinom

Beim lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinom (RC) bildet die Radiotherapie einen immanenten Pfeiler der Behandlung. Bei organüberschreitenden Tumoren wird durch die präoperative Bestrahlung eine geringere Rezidivrate erzielt. Weiters kann durch die Bestrahlung des Tumors ein immunstimu-

lierender Effekt erzeugt werden, der von der Wahl der Bestrahlungsdosis, -fraktionierung und -sequenzierung beeinflusst wird. Im CRC-Tiermodell induzierten hohe Bestrahlungsdosen eine Zunahme an CD8-positiven T-Zellen, während eine fraktionierte Bestrahlung eine niedrige Dichte an tumorinfiltrierenden Lymphozyten nachwies. Im humanen RC-Kollektiv konnte in den lange Zeit bestrahlten Geweben im Vergleich zu unbestrahlten Geweben ein signifikantes Ausmaß an Infiltration mit CD8-positiven T-Zellen nachgewiesen werden, die Expression von Immuncheckpoint-Markern blieb jedoch unverändert. Zusätzlich war eine hohe Dichte an CD3- und CD8-positiven T-Zellen in den Tumorbiopsien mit einem guten histopathologischen Therapieansprechen nach präoperativer Bestrahlung vergesellschaftet. Die Mehrzahl an klinischen, retrospektiven Studien lieferten überwiegend inkonsistente Ergebnisse, welche einerseits auf die Heterogenität der präoperativ angewandten Bestrahlungsregime zurückzuführen sein könnten, andererseits auf die Auswahl der Methode zur Quantifizierung der Immunmarker.

Methoden zur Immunmarkerquantifizierung

Die Heterogenität der Immunzellverteilung im Tumor wurde mehrfach beschrieben; einige Studien beschä-

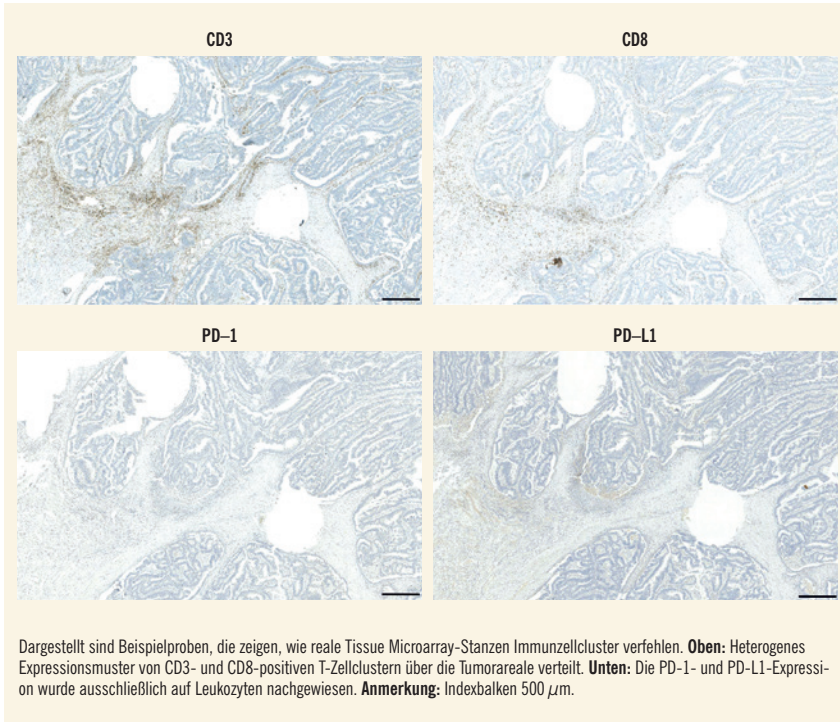


Abb. 1: T-Zelldichte (CD3, CD8) und Immuncheckpoint-Expression (PD-1, PD-L1) in vollumfänglichen Rektumkarzinomproben.

tigten sich mit der Art der Quantifizierungsmethode und den Vor- und Nachteilen der Wahl eines Tissue Microarrays (TMA). Zur Anfertigung derartiger Proben werden meist 2 mm große Stanzen aus dem in Paraffin gegossenen Tumorgewebe gewonnen und in einen separaten, vorgestanzen Paraffinblock eingebettet. Die Stanzen werden jeweils aus einem zufällig ausgewählten Areal der Tumorseite gewonnen, weswegen die Gefahr besteht, dass ein Areal mit niedriger Immunezell-dichte ausgestanzt und zur Analyse verwendet wird. Da dies jedoch erst nach immunhistochemischer Färbung evident wird, kann die Wahl dieser Methode somit in einer unwissentlichen Verfälschung der Quantifizierungsanalyse resultieren. Zur Errechnung des Immunoscores[®] beim RC wurden zwei Gewebsstanzen in jeweils zwei verschiedenen Tumorearealen (Tumorzentrum sowie invasive Tumorfrente) herangezogen. In einer rezenten Analyse, wel-

che die Immunezell-dichten im CRC-Primärtumor und dessen korrespondierenden Lebermetastasen verglichen, wurde gezeigt, dass eine Verwendung von bis zu 5 gestanzten Gewebsarealen nötig ist, um eine Annäherung an den durchschnittlichen Dichtewert an Immunezellen zu erreichen; es gilt zu bemerken, dass diese Analyse an den Lebermetastasen von CRC-Patienten durchgeführt wurde, welche eine homogene T-Zelldichte aufwiesen.

Immunmodulation und ihre Auswirkungen auf das Überleben

In der hier vorgestellten Studie untersuchten wir die immunmodulatorische Kapazität eines hyperfraktionierten Kurzzeit-Bestrahlungsregimes bei Patienten mit RC als auch die beschriebenen Unterschiede in der Dichte des Immunezellinfiltrats, welche mit der Wahl der Analyse-methode (vollumfängliche

Gewebe-proben vs. TMA) einhergeht. Das ursprüngliche Studienkonzept basierte auf der Hypothese, dass insbesondere die kurze Therapiedauer sowie die hyperfraktionierte Abgabe einer geringeren Strahlendosis eine Infiltration von T-Zellen (CD3, CD8) und konsequente Expression von Immuncheckpoint-Markern (PD-1, PD-L1) im RC induzieren. Hierzu wurde eine Studienkohorte von 75 Patienten definiert, wovon 60 Patienten präoperativ nach dem hyperfraktionierten Kurzzeit-Bestrahlungsregime (25 Gy: 2 x 2,5 Gy über 5 Tage, Resektion 3 Tage später) behandelt wurden; weitere 15 Patienten dienten als (unbestrahlte) Kontrolle.

Im Rahmen der mikroskopischen Immunmarkerquantifizierung an vollumfänglichen Gewebeproben zeigte sich die bereits beschriebene Heterogenität der Immunezellverteilung im Tumorgewebe. Der Fokus lag daher in weiterer Folge auf der Untersuchung der Quantifizierungsmethode, um eine etwaige Verfälschung der Analyse durch die gewählte Gewebefläche darzustellen. Die Überlegung ging dahingehend, dass die Verwendung kleiner Gewebestanden möglicherweise die Kontextualisierung heterogener Markerexpressionsmuster, die im Rahmen der Analyse vollumfänglicher Gewebeproben in Betracht gezogen werden können, verhindern würde.

Quantifizierung von Immunmarkern/ Virtueller Tissue Microarray: Hierfür etablierten wir in Kooperation mit der Firma TissueGnostics aus Wien einen virtuellen TMA auf gescannten vollumfänglichen Gewebeproben (**Abb. 1**); die Größe und Lokalisation der TMA-Stanzen basierte auf der zuvor beschriebenen Immunoscore[®]-Analyse beim RC (**Abb. 2**). Die entwickelte Software wurde hinsichtlich der Markerererkennung trainiert und bei Bedarf manuell korrigiert.

