

**Charakterisierung der Immunantwort im Harnblasenkarzinom nach  
photodynamischer Therapie mittels Tetrahydroporphyrin-Tetratosylat in  
einem orthotopen Rattenmodell**

**Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Dr. med.**

**an der Medizinischen Fakultät  
der Universität Leipzig**

**eingereicht von: Vincent Ricardo Johannes Eckert  
geboren am 23.07.1997 in Halle (Saale)**

**angefertigt an: der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig,  
im Forschungslabor  
der Klinik und Poliklinik für Urologie**

**Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Jochen Neuhaus  
Ko-Betreuerin: Dr. rer. nat. Mandy Berndt-Paetz**

**Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 19.12.2023**

## Inhaltsverzeichnis

<b><u>1</u></b>	<b><u>Abkürzungsverzeichnis</u></b>	<b><u>5</u></b>
<b><u>2</u></b>	<b><u>Einleitung</u></b>	<b><u>7</u></b>
<b>2.1</b>	<b>Urothelkarzinom</b>	<b>7</b>
2.1.1	Epidemiologie und Ätiologie des Urothelkarzinoms	7
2.1.2	Aktuelle Therapieoptionen des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms	8
<b>2.2</b>	<b>Anti-Tumor-Immunität</b>	<b>9</b>
2.2.1	Ausgewählte Prozesse des Immunsystems zum Verständnis der Anti-Tumor-Immunität	9
2.2.2	Tumormicroenvironment	11
2.2.3	Übersicht über die Hauptformen des Zelltods und immunmodulatorische Effekte	11
2.2.4	Damage associated molecular patterns	13
2.2.5	Tumorantigene	14
<b>2.3</b>	<b>Photodynamische Therapie</b>	<b>15</b>
2.3.1	Wirkprinzip	15
2.3.2	Photosensibilisatoren	16
2.3.3	Einfluss der PDT auf das Immunsystem	18
2.3.4	Die PDT des Harnblasenkarzinoms	19
2.3.5	Tetrahydroporphyrin-Tetratosylat: Ein neuer Photosensibilisator zur Therapie des MIBC	20
<b><u>3</u></b>	<b><u>Ziele der Arbeit</u></b>	<b><u>22</u></b>
<b><u>4</u></b>	<b><u>Material und Methoden</u></b>	<b><u>22</u></b>
<b>4.1</b>	<b>Materialien</b>	<b>22</b>
4.1.1	Asservierte Harnblasengewebeschnitte	22
4.1.2	Liste der Reagenzien, Verbrauchsmaterialien, Software und Geräte	23
<b>4.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>25</b>
4.2.1	Vorarbeiten der Forschungsgruppe [82, 83]	25
4.2.2	Färbeprotokoll Immunfluoreszenz	25
4.2.3	Etablierung der Antikörper	28
4.2.4	Aufnahmetechnik	32
4.2.5	Datenerhebung	34
4.2.6	Statistik	36

<b><u>5</u></b>	<b><u>Ergebnisse</u></b>	<b><u>37</u></b>
5.1	Versuchstiere	37
5.2	Charakterisierung des Datensatzes	37
5.3	Qualitative Auswertung	38
5.4	Quantitative Auswertung	42
5.4.1	Vergleich der Immunzellichte in Abhängigkeit von der Behandlung	42
5.4.1.1	CD45	42
5.4.1.2	CD3	42
5.4.1.3	CD8	45
5.4.1.4	CD4	45
5.4.1.5	CD19	46
5.4.1.6	CD45/CD3	47
5.4.1.7	CD3/CD8	48
5.4.1.8	CD3/CD4	49
5.4.1.9	Deskriptive und analytische Daten der Statistik	50
5.4.1.10	Zusammenfassung des Vergleichs der Immunzellichten	56
<b><u>6</u></b>	<b><u>Diskussion</u></b>	<b><u>57</u></b>
6.1	Methodendiskussion	57
6.1.1	Auswahl der Antikörper	57
6.1.2	Beurteilung der CD3-Antikörper	58
6.1.3	ROI-Auswahl und Beurteilung des Datensatzes	59
6.2	Ergebnisdiskussion	60
6.2.1	Beurteilung der Immunreaktion der THPTS-PDT im Kontext anderer PDTs	60
6.3	Beurteilung der Immunreaktionen beim Harnblasenkarzinom	64
6.4	Aussichtsreiche Kombinationstherapien	65
6.5	Umgang mit Schwierigkeiten	66
<b><u>7</u></b>	<b><u>Schlussbemerkung</u></b>	<b><u>67</u></b>
<b><u>8</u></b>	<b><u>Zusammenfassung</u></b>	<b><u>68</u></b>
<b><u>9</u></b>	<b><u>Darstellungsverzeichnis</u></b>	<b><u>73</u></b>
9.1	Abbildungen	73
9.2	Tabellen	74

<b><u>10</u></b>	<b><u>Literaturverzeichnis .....</u></b>	<b><u>75</u></b>
<b><u>11</u></b>	<b><u>Anlagen.....</u></b>	<b><u>83</u></b>
<b>11.1</b>	<b>Färbeprotokolle.....</b>	<b>83</b>
11.1.1	Immunfluoreszenz Doppelmarkierung CD45/CD3 .....	83
11.1.2	Immunfluoreszenz Doppelmarkierung CD3/CD4 .....	83
11.1.3	Immunfluoreszenz Doppelmarkierung CD3/CD8 .....	84
11.1.4	Immunfluoreszenz Einfachmarkierung CD19 .....	84
11.1.5	Lichtmikroskopie Standardprotokoll in der Etablierungsphase .....	85
<b><u>12</u></b>	<b><u>Selbstständigkeitserklärung .....</u></b>	<b><u>86</u></b>
<b><u>13</u></b>	<b><u>Lebenslauf.....</u></b>	<b><u>87</u></b>
<b><u>14</u></b>	<b><u>Publikationen .....</u></b>	<b><u>89</u></b>
<b><u>15</u></b>	<b><u>Danksagung.....</u></b>	<b><u>90</u></b>

## 1 Abkürzungsverzeichnis

A488	– Alexa 488 bzw. A555 – Alexa 555
Abb.	– Abbildung
AHM	– Aderhautmelanomzellen
AK	– Antikörper
ATP	– Adenosintriphosphat
BSA	– Bovines Serumalbumin
BCG	– Bacillus-Calmette-Guérin
BV	– Blood vessel (Blutgefäß)
CD	– Cluster of Differentiation
CI	– Checkpointinhibitor
CK	– Cytokeratin / Zytokeratin
COG	– Kontrollgruppe
CRT	– Calreticulin
CTL	– Cytotoxic t-lymphocytes (zytotoxische T-Lymphozyten)
DAB	– 3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	– 4',6-Diamidin-2-phenylindol, Dihydrochlorid
DAMPs	– Damage-associated-molecular-patterns
DC	– Dendritic cells (dendritische Zellen)
DFG	– Deutsche Forschungsgemeinschaft
DT-TBS	– DMS (Dimethylsulfoxid) + Triton X-100 – Tris-buffered saline
ER	– Endoplasmatisches Retikulum
FFPE	– Formalin-fixiert, in Paraffin eingebettet
FITC	– Fluoresceinisothiocyanat
GrB	– Granzym B
HE	– Hämatoxylin-Eosin
HMGB	– High mobility group box
HSP	– Hitzeschockprotein
HPF	– High Powerfield
ICD	– Immunogenic cell-death (immunogener Zelltod)
IgM	– Immunglobulin / Antikörper vom Typ M
IF	– Immunfluoreszenz
IL	– Interleukin
IR	– Ionic radiation (Strahlentherapie)
i.v.	– Intravenös
KG	– Körpergewicht

- LAG – Lokale Applikationsgruppe
- LC – Lymphzellcluster
- MHC – Major Histocompatibility complex
- MIBC – Muscle invasive bladder cancer (muskelinvasives Harnblasenkarzinom)
- Ms – Maus
- NMIBC – Non muscle invasive bladder cancer (nicht-muskelinvasives Harnblasenkarzinom)
- NMR – Nuclear magnetiv resonance (Kernspinresonanz)
- nT – Tumorfreier Bereich
- PDL-1 – Programmed cell-death ligand-1
- PDT – Photodynamische Therapie
- PBS – Phosphate-buffered saline
- PRR – Pattern-recognition-receptor
- PS – Photosensibilisator
- Rb – Rabbit (Kaninchen)
- RIPK – Receptor-interacting protein Kinase
- Roi – Region of Interest
- ROS – Reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
- RT – Raumtemperatur
- SAG – Systemische Applikationsgruppe
- TAA – Tumor-assoziiertes-Antigen
- T – Tumorzentrum
- TBS – Tris-buffered saline
- TH – T-Helferzellen
- TH1 – T-Helferzellen Subtyp 1
- TH2 – T-Helferzellen Subtyp 2
- THPTS – Tetrahydroporphyrin-Tetratosylat
- TME – Tumormicroenvironment
- TNM – Tumor, Nodus, Metastase
- TR – Tumorrand
- Treg – Regulatorische T-Helferzellen
- TRIS – Tris(hydroxymethyl)aminomethan
- TR+T – Gesamter Tumorbereich
- TRITC – Tetramethylrhodaminisothiocyanat
- TURB – Transurethrale Resektion der Blase
- TZ – Tumorzelle
- 5-Ala – 5-Aminolävulinsäure

## 2 Einleitung

Langfristig eine neue nicht-invasive Therapieoption für das muskelinvasive Harnblasenkarzinom zu etablieren, ist ein Ziel der Forschungsgruppe der urologischen Klinik des Universitätsklinikums Leipzig. Neben dem Goldstandard der radikalen Zystektomie gibt es derzeit nur begrenzte Möglichkeiten, bei multimorbiden und schwerkranken Patienten den Tumorprogress bei gleichzeitig akzeptabler Lebensqualität zu verlangsamen. Eine Lösungsmöglichkeit könnten Immuntherapien sein, die durch Aktivierung des Immunsystems eine zielgerichtete Destruktion des Tumors ohne relevante Nebenwirkungen ermöglichen. Dazu leistet die im Folgenden vorgestellte Promotion einen Beitrag, indem ein Wirkpfeiler der photodynamischen Therapie, die Induktion einer Anti-Tumor-Immunität, untersucht wurde.

Um die vorgenannte Rationale zu stützen und weiter zu vertiefen, sollen Einblicke in das Urothelkarzinom mit den aktuellen therapeutischen Optionen, das Immunsystem im Kontext der Anti-Tumor-Immunität und die photodynamische Therapie mit den Vorarbeiten der Forschungsgruppe gegeben werden.

### 2.1 Urothelkarzinom

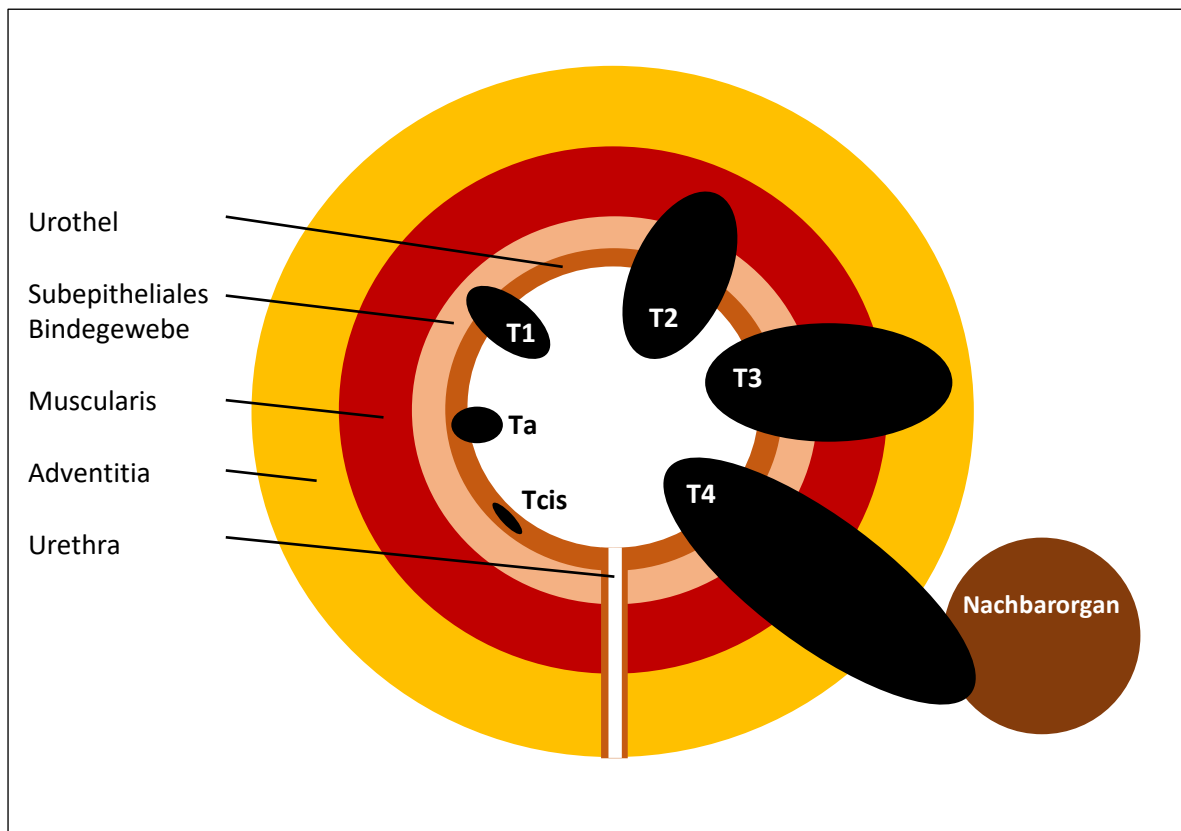
#### 2.1.1 Epidemiologie und Ätiologie des Urothelkarzinoms

Das Harnblasenkarzinom war 2020 die zehnthäufigste Tumorentität weltweit mit 573.278 Neuerkrankungen. Betrachtet man nur die männliche Bevölkerung so liegt es auf Rang sieben. In Westeuropa wurde die altersstandardisierte Inzidenz für Männer mit 21,5 und für Frauen mit 5,8 pro 100.000 Einwohnern angegeben [1, 2]. In Deutschland war 2018 die altersstandardisierte Rate etwas geringer. Sie betrug 19,7 bei den Männern und 5,5 pro 100.000 Einwohner bei den Frauen. In absoluten Zahlen waren es 17240 Neuerkrankungen [3].

Annähernd 75% der Patienten hatten ein nicht-muskelinvasives Harnblasenkarzinom (NMIBC) [4]. Hauptrisikofaktor für bösartige Neubildungen der Harnblase war der Konsum von Zigaretten sowohl aktiv als auch passiv. Dieser war verantwortlich für 40-65% der männlichen und 20-30% der weiblichen Erkrankten. Aktivraucher hatten ein dreifach erhöhtes Risiko gegenüber Nicht-Rauchern, wobei sich das Risiko nach einem Stopp des Zigarettenkonsums nahezu halbierte [5, 6]. Die berufliche Exposition durch Chemikalien wie aromatische Amine stellten wegen ihrer langen Latenzperiode den zweitwichtigsten Risikofaktor dar. Strahlentherapie und chronische Infektionen, wie zum Beispiel durch eine Schistosomiasis, hatten belegbare Einflüsse auf die Entstehung des Harnblasenkarzinoms. Diätetische, metabolische und genetische Faktoren wurden kontrovers diskutiert [4]. Das weibliche Geschlecht zeigte sich als prognostisch ungünstig mit 20% höheren Sterberaten, da die Krankheit, vermutlich wegen zahlreicher Differentialdiagnosen, häufig erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert wurde [7].

### 2.1.2 Aktuelle Therapieoptionen des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms

Bei der Betrachtung der Behandlungsoption wird in nicht-muskelinvasive und muskelinvasive Formen des Harnblasenkarzinoms unterteilt. Für den muskelinvasiven Typ (MIBC) ohne Metastasen, der in der TNM-Klassifikation ab T2 definiert ist, wird als Standardtherapie die radikale Zystektomie mit Harnableitung beschrieben. Weiterhin ist die operative Entfernung der Harnblase bei ausbleibendem Erfolg der BCG-Therapie eines NMIBC die einzige Therapieoption. Eine rein palliative Zystektomie zur Symptomkontrolle gilt als ebenso vorstellbar. Von transurethralen Resektionen (TURB) ist beim MIBC nach Möglichkeit abzusehen. Als zusätzliche Optionen für ungeeignete, die Zystektomie ablehnende oder palliative Patienten gelten eine alleinige oder kombinierte Chemo- und Radiotherapie und TURB. [4, 8, 9] Bei der als Goldstandard zu betrachtenden radikalen Zystektomie zeigen sich in einem sechsmonatigen Follow-Up erhöhte Schmerzen, posttraumatische Belastungsstörungen, Fatigue, Depressionen und eine unverändert reduzierte Lebensqualität bei Patientinnen und Patienten [10]. Es fehlt neben diesem operativen Verfahren für die beschriebenen Indikationen bei MIBC an weiteren, nicht-operativen, gut verträglichen Möglichkeiten zur zielgerichteten Therapie. Zur Etablierung zusätzlicher Therapieverfahren soll die in dieser Promotionsarbeit untersuchte photodynamische Therapie (PDT) mittels Tetrahydroporphyrin-Tetratosylat (THPTS) einen Beitrag leisten.



**Abb. 1: Schematische Darstellung der Tumorstadien (T) des Harnblasenkarzinoms nach TNM-Klassifikation [9].**

Tcis = Karzinom in situ

Ta = papilläres, nicht invasives Karzinom

T1 = Karzinom infiltriert in subepitheliales Bindegewebe

T2 = Karzinom infiltriert die Muscularis

T3 = Karzinom infiltriert in perivesikales Gewebe

T4 = Karzinom infiltriert Nachbarorgane

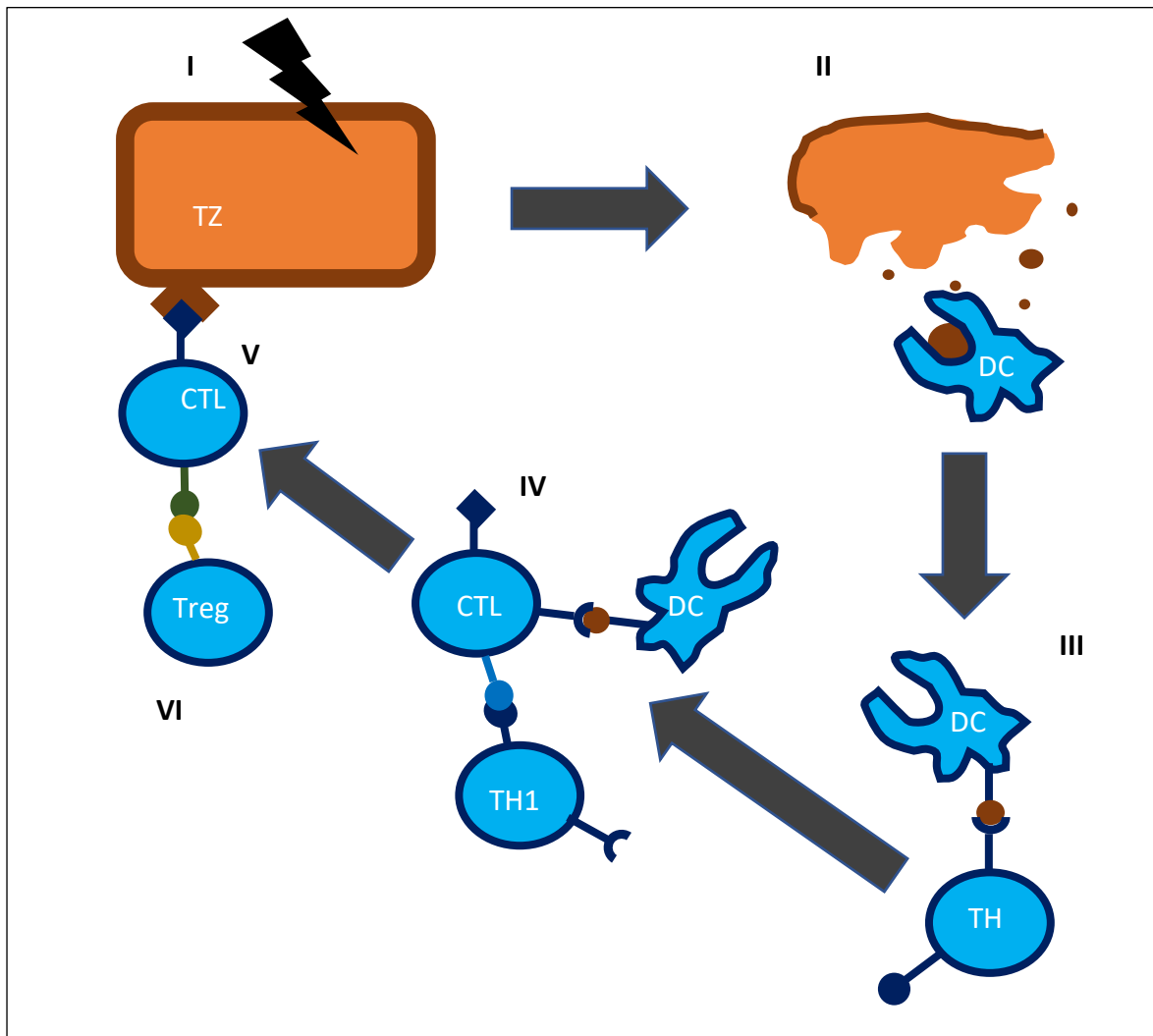


## 2.2 Anti-Tumor-Immunität

### 2.2.1 Ausgewählte Prozesse des Immunsystems zum Verständnis der Anti-Tumor-Immunität

Maligne Neubildungen gehen mit einer Veränderung der Proteinexpression der Krebszellen im Vergleich zu gesunden Zellen einher. Dadurch erscheinen die Tumorzellen dem Immunsystem als fremd. Diese Veränderungen zeigen sich in der Expression des Major Histocompatibility Complex (MHC)-I, die von natürlichen Killerzellen und zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) registriert werden können, um dann die entarteten Zellen abzutöten. [11, 12] Die MHC-Moleküle binden und transportieren Antigene, die in menschlichen Zellen generiert wurden, um diese schließlich auf der Zelloberfläche zu präsentieren. Diese können daraufhin von den Rezeptoren der T-Zellen erkannt werden. Man unterscheidet MHC-I und -II. Der MHC-I dient der Antigenpräsentation gegenüber den CTL, MHC-II gegenüber den T-Helferzellen (TH). THs bewirken eine zusätzliche Aktivierung von Makrophagen und verstärken durch ausgeschüttete Zyto- und Chemokine die adaptive Immunantwort. [13, 14] Die Antigenpräsentation zur Aktivierung der THs erfolgt durch dendritische Zellen (DC) [15]. Die THs differenzieren sich in Subtypen, die unterschiedliche Prozesse für die Aufgaben des Immunsystems einleiten. T-Helferzellen Subtyp 1 (TH1) unterstützen Makrophagen, DCs und die Abwehr von intrazellulären Störungen, wie malignen Entartungen. Sie werden wiederum durch Zytokine von DCs, Makrophagen und natürlichen Killerzellen aktiviert. T-Helferzellen Subtyp 2 (TH2) helfen eosinophilen und basophilen Granulozyten, Mastzellen und B-Zellen in der Antwort auf parasitäre Infektionen. Sie dienen hauptsächlich der Entwicklung einer Umgebung zur Erholung und Reparatur von Gewebe. Die Zellen des angeborenen Immunsystems, die eine TH2-Differenzierung bewirken, sind noch nicht identifiziert. Der Subtyp der regulatorischen T-Helferzellen (Treg) kontrolliert und limitiert die Aktivität anderer T-Helferzellen und der CTL, um überschießende Immunreaktionen zu verhindern. Um CTLs für die Elimination erkrankter Zellen zu aktivieren, wird in den meisten Fällen eine Co-Stimulation durch DCs und THs benötigt. [12, 16–18] Durch die Antigenspezifität der CTLs werden nur erkrankte Zellen attackiert. Es erfolgt eine Apoptoseinduktion, die einerseits durch zytotoxische Granula zur Porenbildung, wie Perforin, Granulosin, Serglycin und durch Granzyme zur Proteolyse realisiert wird. Andererseits werden über exprimierte FAS-Liganden durch Rezeptorinteraktion intrazelluläre Caspasen und Endonukleasen aktiviert. [12, 19, 20] Diese Abläufe sind in Abbildung 2 (Abb. 2) schematisch dargestellt.

Die beschriebenen Prozesse suggerieren, dass unser Immunsystem ausgezeichnet dazu in der Lage ist, Tumore ohne weitere Folgeschäden zu bekämpfen. Bei der Entwicklung von malignen Entartungen schafft das Tumorgewebe jedoch ein Umfeld, in dem es das Immunsystem manipuliert und in seiner Wirksamkeit begrenzt. Dieser Bereich wird als Tumormicroenvironment bezeichnet.



**Abb. 2: Schematische Darstellung der Abläufe zum Verständnis der Anti-Tumor-Immunität.** TZ = Tumorzelle, DC = dendritische Zelle, TH = T-Helferzelle, TH1 = T-Helferzelle Subtyp 1, CTL= T-Killerzelle, Treg = regulatorische T-Helferzelle.

**I)** Die Tumorzelle ist Stress ausgesetzt (bspw. O<sub>2</sub>-Mangel durch zu schnelles Tumorwachstum). **II)** Der Prozess der Nekrose setzt ein. Die Dendritische Zelle nimmt die freigesetzten Tumorproteine auf. **III)** Die dendritische Zelle präsentiert die Tumorproteine der T-Helferzelle und aktiviert diese. **IV)** Die dendritische Zelle präsentiert einer T-Killerzelle Tumorproteine. Die Kostimulation der T-Killerzelle durch die T-Helferzelle Subtyp 1 bewirkt eine Aktivierung der T-Killerzelle. **V)** Die T-Killerzelle erkennt die Tumorzelle, die die Tumorproteine präsentiert. **VI)** Ein alternativer Weg ist die Aktivierung einer regulatorischen T-Helferzelle durch die Freisetzung von Tumorproteinen. Die regulatorische T-Helferzelle deaktiviert die T-Killerzelle.

### 2.2.2 Tumormicroenvironment

Das Immunsystem wirkt als Selektionsfaktor in der Tumorentwicklung. Es entstehen Tumorzellen mit geringer Immunität [21]. Die folglich abgeschwächte Reaktion der Leukozyten gegen den Tumor wird zusätzlich durch die autologe Herkunft der entarteten Zellen begründet [22]. Der Tumor schafft sich damit ein Tumormicroenvironment (TME), welches in seiner Gesamtheit immunprivilegiert und immunsuppressiv wirkt [22, 23]. Grundlage sind verschiedene Resistenzmechanismen des TMEs. So wird die Immunität durch eine Zunahme von Treg, sinkender MHC-I-Präsentationen und einer Senkung von T-Zell-Rezeptoraktivitäten gewährleistet. Gleichzeitig werden Zytokine, wie IL-10, und Immuncheckpointliganden, wie PDL-1, freigesetzt, um eine aktive Immunsuppression zu bewirken und durch Inhibition von Caspasen und Granzym B eine Resistenz gegen Zellyse entwickelt [21]. So gibt es Berichte über dysfunktionale tumorspezifische CTLs, die den Tumorprogress erlauben [24]. Neben diesen lokalen Effekten im TME können solide Tumore auch Einfluss auf das gesamte Immunsystem nehmen. Die Entwicklung bestimmter Zelllinien kann durch Störungen der Hämatopoese beeinträchtigt werden. So wirken vermehrte unreife neutrophile Granulozyten und Monozyten immunsuppressiv [25]. B- und T-Zellen reduzieren sich global, währenddessen der T-Helferzell-Subtyp Treg zunimmt [26, 27].

Diese lokal und systemisch beschriebenen Effekte der Tumoren auszuhebeln, ist zentrales Ziel von Immuntherapien. Eine Grundlage dazu bildet die Modalität des Zelltodes, die einen erheblichen Einfluss auf die Immunstimulation hat.

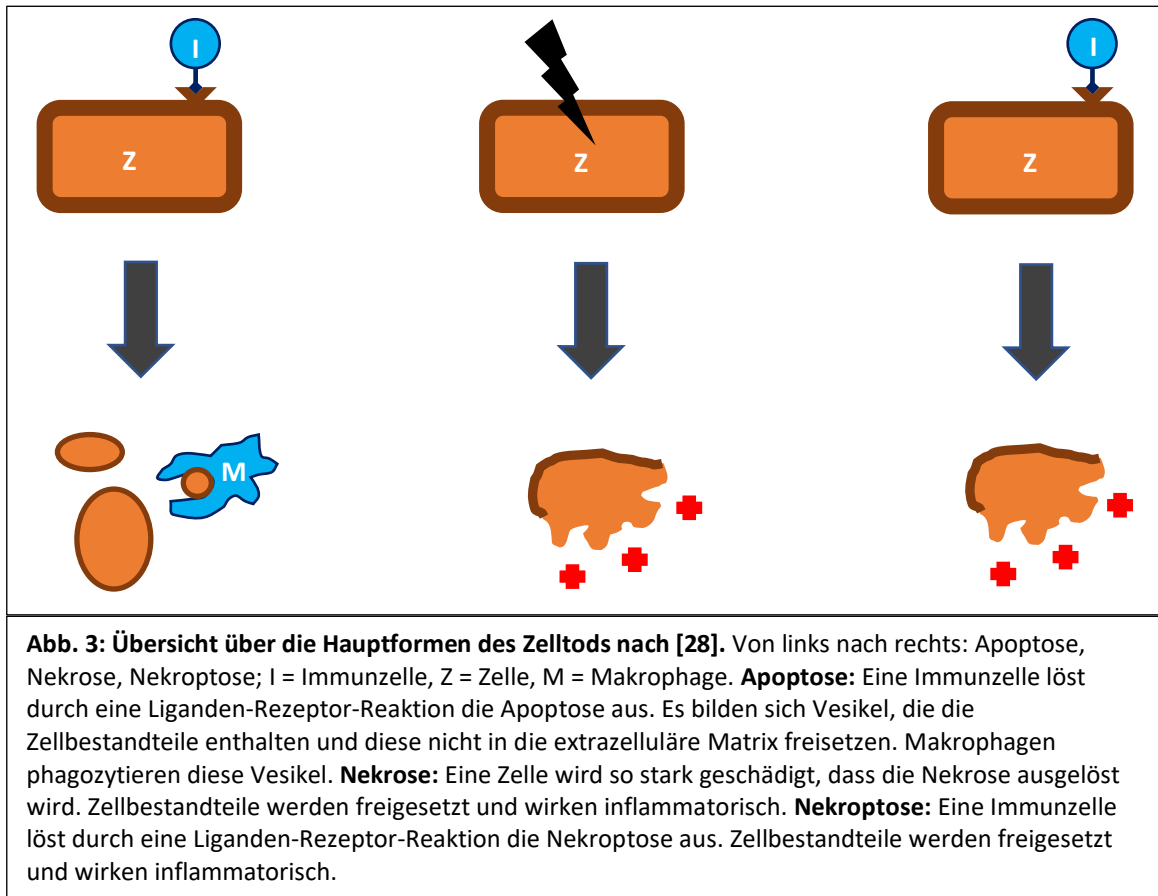
### 2.2.3 Übersicht über die Hauptformen des Zelltods und immunmodulatorische Effekte

Apoptose beschreibt eine regulierte Form des Zelltods, die eine mit minimalem Schaden für umgebendes Gewebe einhergehende Zellauflösung zum Ziel hat. Diese kann intrinsisch, durch die Zelle selbst, bei detektierten Schäden oder extrinsisch, durch Interaktion mit Immunzellen, in Gang gesetzt werden. Eine zentrale Stellung bei den Abläufen haben die Proteasen der Caspase-Familie. Schließlich werden die Zellreste durch phagozytierende Immunzellen abgebaut. [28, 29]

Nekrose bezeichnet als Gegensatz grundsätzlich eine nicht regulierte Form des Zelltods, meist durch Gewebeschädigung, die den Zellinhalt unvermittelt, energieunabhängig in das umgebende Gewebe abgibt. Dadurch entstehen entzündliche und schädigende Reaktionen gegenüber den umliegenden Zellen. Das Immunsystem wird aktiviert. [28, 29]

Die Unterform der Nekrose ist der regulierte Zelltod Nekroptose, die vor allem in Bereichen mit ausbleibender Apoptose bei Caspasehemmung auftritt. Zentrale Stellung für deren Ablauf hat die Receptor-interacting protein Kinase 1 und 3 (RIPK). [28–30] Nekroptose gilt als Initiator für entzündliche Prozesse und DAMPs-Freisetzung, die weiter untersucht werden müssen [31, 32]. Es wurden bereits immunogene Anti-Tumor-Effekte nachgewiesen [33].

Autophagie stellt einen Prozess dar, in dem zelluläre Bestandteile in Lysosomen abgebaut werden. Meistens dient diese dazu, beschädigte Zellorganellen zu recyceln oder bei mangelnder Nährstoffzufuhr Energie zu gewinnen. Sie kann aber auch im Zelltod enden. [28]



Bei der Einordnung von immunogenen Effekten der verschiedenen Formen des Zelltods lassen sich Unterschiede erkennen. Die Folgen von Nekrose und Apoptose im Tumorgewebe sind uneinheitlich und können sowohl die Immunreaktion steigern als auch langfristig immunsuppressiv wirken [34]. Grundsätzlich bewirkt ein lokalisierendes Trauma eine protektive Reaktion des Immunsystems [35]. Entscheidend für den weiteren Verlauf ist die Art des Zelltodes. Die Nekrose und die tolerogene Apoptose, letztere ohne starken immunmodulatorischen Effekt, werden vor allem durch Makrophagen bestimmt [34]. Auftretende Effekte hinsichtlich des Immunsystems, vor allem bei der Nekrose, zeigen eine Tendenz zur vermehrten Treg- und T-Helferzellen Subtyp 2 (TH2)-Aktivierung [25]. Der als Sonderform der Apoptose einzuordnende immunogene Zelltod (ICD) geht mit einer Damage-associated-molecular-patterns (DAMPs)-Freisetzung einher [23, 33, 34, 36]. So ist das DAMP Calreticulin (CRT) als ein zentraler Marker des ICDs etabliert [36]. Der ICD zeigt eine Tendenz zur vermehrten Aktivierung von DCs, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und infolgedessen von THs und CTLs [34, 37]. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) haben eine Schlüsselstellung für den ICD [23], da die Induktion des ICD durch die oxidative Wirkung der ROS im endoplasmatischen Retikulum (ER)

als am effektivsten angesehen wird [21, 23, 33, 36]. Schließlich gilt die Annahme grundsätzlich höherer Immunogenität von Nekrose und Nekroptose gegenüber der Apoptose mit der Unterform des ICDs nicht mehr [21, 21, 23, 36]. Im Rahmen von Anti-Tumor-Therapien, wie Chemo-, Strahlentherapie und mittels onkolytischer Viren, wird die Aktivierung des Immunsystems durch Apoptose dominiert. [36] Auch die Sonderform Nekroptose führt zu einer Aktivierung von DCs und CTLs, wobei der Einfluss von DAMPs diskutiert wird [33].

DAMPs haben eine Schlüsselstellung für die immunstimulierende Wirkung des ICDs und in dessen Folge für die Anti-Tumor-Immunität.

#### 2.2.4 Damage associated molecular patterns

DAMPs können auch als „Danger Signals“ bezeichnet werden. Sie werden in Folge von Zellschädigungen bzw. -stress freigesetzt und sind in der Lage, die Immunogenität sterbender Krebszellen zu steigern. Die Moleküle sind essenzielle, genetisch konservierte, sich physiologisch im Zellinnern befindende und dadurch dem Immunsystem unbekannt Strukturen. DAMPs können sowohl durch Nekrose als auch ICD auftreten. Der Zelltod oder auch Zellstress bestimmen die Art der Freisetzung. In diesem Kontext werden sie dem Immunsystem durch Expression auf der Zelloberfläche und Sekretion bei Apoptose oder passive Freisetzung vor allem in Folge der Zerstörung der Zellstruktur bei Nekrose präsentiert. Die Registrierung durch das Immunsystem erfolgt durch pattern recognition receptors (PRRs). [21, 22, 32, 38, 39] Beispiele für DAMPs, die durch einen ICD freigesetzt werden, sind CRT, HMGB1, ATP, HSP 70 und HSP 90 [40]. Es entsteht im Gegensatz zu pathogen-associated-molecular-patterns (PAMPs), die durch Viren oder Bakterien freigesetzt werden, eine sterile Inflammation, da es sich um körpereigene Strukturen handelt [41]. DAMPs besitzen eine geringe Autoimmunität bei gleichzeitiger Unterstützung einer erhöhten Reaktivität gegenüber Krebszellen. So können sie die TH1-Entwicklung fördern und weiterhin DCs, Makrophagen und natürliche Killerzellen aktivieren. Konkret können DAMPs die funktionelle Reifung DCs und die Unterstützung in der Präsentation von Tumor-assoziierten-Antigenen (TAAs) bewirken. Die Phagozytose und Oponierung von Tumorzellen wird erleichtert. Es werden inflammatorische Prozesse durch die gesteigerte Transkription von Genprogrammen gefördert. [21] Zusammenfassend kann ein Wiedererwachen des Immunsystems im TME bewirkt werden [22]. So beeinflussen DAMPs die Tumorentwicklung und -biologie [36]. DAMPs haben grundsätzlich eine kleine Wirkreichweite durch eine schnelle Inaktivierung und haben so nur Effekte auf Immunzellen in der direkten Umgebung. Es gibt jedoch Hinweise auf die Möglichkeit der Aktivierung des virale-response-gene-expression (VRGE)-Programm, durch das die ICDs über das Interferon-System und die Interleukin-1-Familie eine größere Wirkreichweite erreichen können [21]. Letztlich bestimmen trotz der aufgeführten vielversprechenden Eigenschaften für die Anti-Tumor-Immunität die Art der DAMPs und die registrierenden Rezeptoren die ablaufende Immunreaktion [22]. Chronische Entzündungsprozesse begünstigen die Tumorentstehung auch durch

die teilweise immunsuppressive Wirkung von DAMPs [36]. So können persistierende DAMPs auch zu Pro-Tumorprozessen mit Metastasen und erhöhter Malignität beitragen [22]. Die Tabelle 1 stellt eine Übersicht zu ausgewählten DAMPs und Ihrer Wirkung auf die Anti-Tumor-Immunität dar.

**Tabelle 1: Übersicht über ausgewählte DAMPs und Wirkung auf die Anti-Tumor-Immunität aus [36]**

DAMPs	DAMPs-registrierende Rezeptoren mit zugehörigen Zellen		Effekt auf die Anti-Tumor-Immunität
		Unmittelbare Wirkung	
Adenosine	A2A-Rezeptor der T-Zellen	Immunsuppression	Tumorprogression
	A2A-Rezeptor der NK	Immunsuppression	Tumorprogression
S100-Protein	RAGE der Tumorzelle	Proliferation	Tumorprogression
	RAGE der Makrophagen	Inflammation	Tumorprogression
HMGB1	TIM-3-Rezeptor der DCs	Immunsuppression	Tumorprogression
	RAGE der Endothelzellen	Angiogenese	Tumorprogression
	RAGE der Neutrophilen	Inflammation	Tumorprogression
	TLR4 oder RAGE der DCs	Aktivierung der DCs, Präsentation der Tumorantigene	Anti-Tumor-Immunantwort
ATP	P2Y2- oder P2X7-Rezeptor der DCs	Aktivierung der DCs, Präsentation der Tumorantigene	Anti-Tumor-Immunantwort
Ecto-CRT	CD91 der DCs	Tumorantigene	Immunantwort

Für die Induktion der Anti-Tumor-Immunantwort sind die stimulierenden Effekte der DAMPs entscheidend. Die Spezifität der Immunreaktion lässt sich durch Tumorantigene erklären.

### 2.2.5 Tumorantigene

Man unterscheidet unter anderem zwei Typen von Tumorantigenen: Tumor-assoziierte-Antigene (TAAs) und Tumor-Neo-Antigene. TAAs sind Proteine, die auch in gesundem Gewebe vorkommen, die aber von Tumorzellen überexprimiert werden. Dadurch besteht eine geringe Rezeptorbindung begründet in der peripheren Toleranz der Immunzellen, die verhindert, dass gesunde körpereigene Zellen abgetötet werden. [42] Tumor-Neo-Antigene entstehen durch somatische Mutationen und sind ausschließlich im Tumorgewebe zu finden. Sie sind stark immunogen und somit wichtig für die Anti-Tumor-Immunität. [42]

Neben der Immunreaktion gegen die Tumor-Neo-Antigene besteht auch spezifische Immunreaktion gegenüber den TAAs im Tumorgewebe. Dies könnte in der immunstimulierenden Umgebung, die sich durch den ICD und die DAMPs entwickelt, begründet liegen. Im Gegenzug entsteht im gesunden Gewebe die Immunreaktion nicht, da keine immunstimulierenden Effekte vorherrschen.

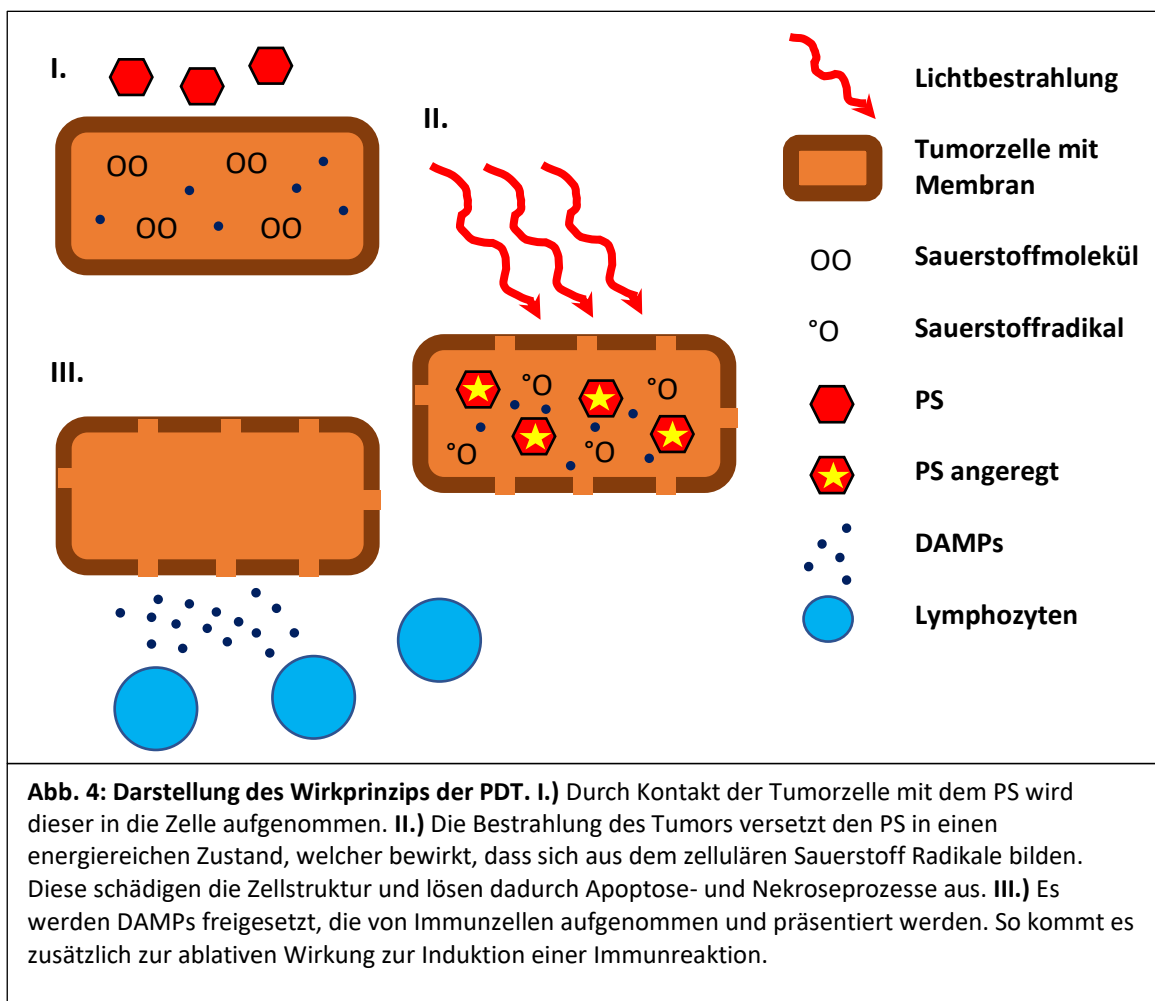
Die Rationale dieser Arbeit begründet sich in der Fragestellung, ob die PDT mittels THPTS die Ausbildung einer Anti-Tumor-Immunität fördern kann.

## 2.3 Photodynamische Therapie

### 2.3.1 Wirkprinzip

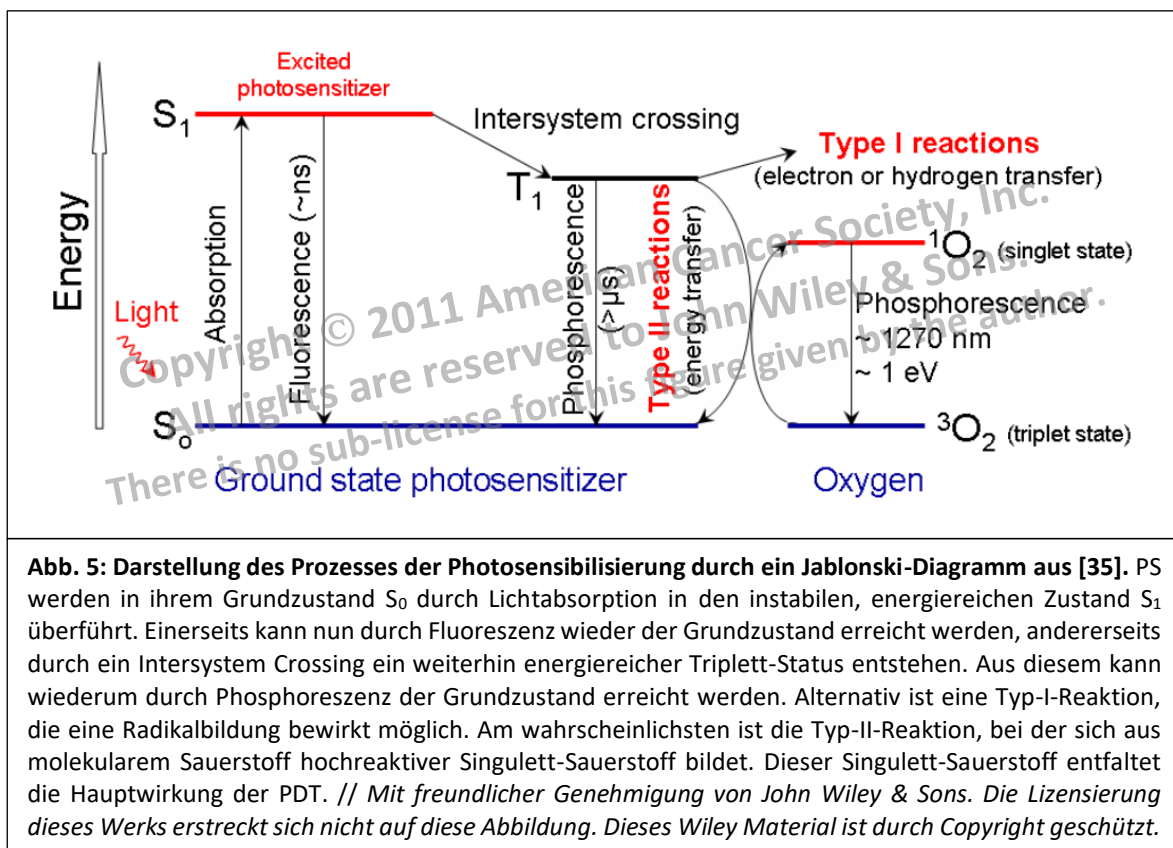
Bei der PDT handelt es sich um eine minimalinvasive, das Normalgewebe schonende Behandlung solider Tumore, welche nur gegen die tumortragenden Gewebereiche gerichtet ist [35, 43]. Neben der direkten Tumor-ablativen Wirkung und Gefäßokklusion kann bei der PDT eine Immunstimulation im Bereich des Tumors erfolgen [35, 43–45]. Die primär lokal begrenzte Wirkung ist als Limitation zu verstehen, da so eine Metastasenbehandlung nicht möglich erscheint. Die Induktion einer systemischen Immunreaktion durch die PDT könnte als Lösungsansatz dienen. Eine multimodale Kombinationstherapie mit Chemo-, Radiotherapie oder Tumorchirurgie ist vorstellbar [35].

Das Prinzip der PDT beruht auf der Photoaktivierung von nicht-toxischen, lichtreaktiven Farbstoffen, sog. Photosensibilisatoren (PS). In Folge dieses Prozesses werden aus Sauerstoff reaktive Sauerstoffspezies (ROS) im bestrahlten Tumorgewebe gebildet [35, 43, 44]. Durch die nachfolgenden Apoptose- und Nekroseprozesse der Krebszellen entstehen die primär ablativ Wirkung, die Schädigung von Gefäßen und die Freisetzung von DAMPs, die eine zielgerichtete Immunreaktion gegen die Krebszellen auslösen können [44]. Dieses Prinzip soll in Abbildung 1 (Abb. 1) verdeutlicht werden.



### 2.3.2 Photosensibilisatoren

PS bilden die Grundlage der PDT. Durch Bestrahlung mit Licht einer spezifischen Wellenlänge werden die PS angeregt. Die daraus resultierende Instabilität des energiereichen Zustands führt einerseits zu Fluoreszenz und/oder Erwärmung, andererseits durch Intersystem Crossing zur Bildung eines stabileren energiereichen Triplett-Status. Bei Rückkehr aus diesem in den Grundzustand wird Energie abgegeben, die einerseits eine Typ-1-Reaktion mit zellulären organischen Molekülen zur direkten Bildung von ROS bewirken kann oder, als Typ-2-Reaktion, unter Reaktion mit Sauerstoff die Entstehung von hochreaktivem Singulett-Sauerstoff fördert. Dieser ist nun in der Lage, ebenfalls ROS entstehen zu lassen. Die Typ-2-Reaktion ist der präferierte Weg unter PDT [35, 44–46]. Die beschriebene Produktion von ROS bewirkt Zellschädigungen, die zu Apoptose-, Nekrose und Autophagieprozessen führen [47–50]. Der Prozess der Photosensibilisierung soll in Abbildung 2 (Abb. 2) verdeutlicht werden.



Grundlegende Anforderungen an den optimalen PS sind eine hohe Reinheit, unkomplizierte, kostengünstige Produktion und Stabilität bei Raumtemperatur in der Lagerung. Weiterhin ist eine möglichst spezifische Akkumulation im Tumorgewebe mit gleichzeitig geringer Dunkeltoxizität günstig, um eine Schädigung des umliegenden gesunden Gewebes zu vermeiden. Sie entfalten ihre Wirkung lokal durch eine zielgerichtete Bestrahlung und eine kurze Halbwertszeit von 10-320ns der ROS aufgrund einer schnellen enzymatischen Inaktivierung. [35, 45, 51] So ist der Ort der intrazellulären Anreicherung entscheidend, um effektive Nekrose- und Apoptose-Prozesse einzuleiten. PS akkumulieren größtenteils im Kern, Mitochondrien, Lysosomen und endoplasmatischen Retikulum und haben somit günstige Lokalisationen [52]. Eine besonders effektive Entwicklung der Anti-Tumor-



Immunität wird mit Lokalisierungen im endoplasmatischen Retikulum beschrieben [43]. Eine weitere Anforderung zur verbesserten Tumorkontrolle ist ein hohes Absorptionsmaximum für Rotlicht einer Wellenlänge zwischen 600-800nm, da so ein Eindringen in tiefere Gewebeschichten möglich ist [35, 46]. Gleichzeitig ist ein Absorptionsminimum bei 400-600nm günstig, um die Photosensibilität durch Tageslicht zu reduzieren [45]. Eine Erklärung für die selektive Anreicherung der PS im Tumorgewebe ist deren bevorzugte Bindung an low-density Lipoproteine (LDL), die von stark proliferierenden Krebszellen vermehrt aufgenommen werden [45].

Um diesen Eigenschaften gerecht zu werden, wurden PS stetig weiterentwickelt. Die erste Generation beruht auf Hämatoporphyrin, dessen Derivate und unterschiedliche Mischungen zunehmende Tumorselektivität und verminderte Photosensibilisierungen der Haut zeigen. Geringe Reinheit, ein Absorptionsmaximum bei Wellenlängen von 630nm mit daraus resultierender kleiner Gewebeeindringtiefe und eine bestehende Empfindlichkeit der Haut gegenüber Tageslicht nach Behandlung führten zur Entwicklung der Folgegeneration. Die erste Generation bildet das Prodrug 5-Aminolävulinsäure (ALA), Benzoporphyrin-, Texaphyrin-, Thiopurinderivate, Chlorin, Bacteriochlorinanaloga und Phthalocyanide. So konnten die Nachteile der ersten Generation ausgeglichen und durch weitere Eigenschaften ergänzt werden. Diese zweite Generation zeigt eine erhöhte Bildung von ROS, eine tiefere Gewebeeindringtiefe durch ein Absorptionsmaximum bei 650-800nm und geringere Nebenwirkungen durch verbesserte Tumorselektivität und eine schnellere Elimination. Größter Nachteil ist die geringe Wasserlöslichkeit, die eine intravenöse Gabe einschränkt. In der weiterentwickelten dritten Generation der PS liegt das Augenmerk auf der Verbesserung der Applikationsform sowie einer noch stärkeren Tumoraffinität, um Schäden in gesundem Gewebe zu reduzieren. Dazu wird die zweite Generation mit spezifischen Molekülen des jeweiligen Zielrezeptors, mit LDL oder mit spezifischen Antikörpern kombiniert. [45] Eine Übersicht über gängige PS zeigt Tabelle 2.

**Tabelle 2: Übersicht über ausgewählte PS, modifiziert und ergänzt [35, 53]**

<b>Generation</b>	<b>Gruppe</b>	<b>ausgewählte Vertreter</b>	<b>Absorbti- ons- maximum</b>
1	Porphyrinderivate	Hämatoporphyrin Photofrin	630nm 630nm
2	Porphyrinderivat-Vorstufe	ALA	635nm
2	Chlorinderivate	Foscan Verteporfin	652nm 690nm
2	Phthalocyaninderivate	Siliziumphthalozyanid	675nm
2	Benzoporphyrinderivate	Visudyne	690nm
2	Texaphyrinderivate	Motexafin lutetium	732nm
2	Bacteriochlorinderivate	Padoporfin (TOOKAD)	762nm
3	Konjugierte PS	Heptamethincyanin konjugiert mit Triphenylphosphoniumderivat	662nm [54]

---

2	Tetrahydroporphyrine	Tetrahydroporphyrin-Tetratosylat (in dieser Arbeit verwendeter PS)	760nm [55]
---	----------------------	---	---------------

### 2.3.3 Einfluss der PDT auf das Immunsystem

Die PDT bewirkt ein lokalisiertes Trauma mit einer starken Immunreaktion und Ödemen. Dadurch werden protektive Prozesse aktiviert, die die Homöostase und Integrität des Gewebes wiederherstellen sollten. Dazu zählen die Entfernung geschädigter Zellen, die Stimulation zur Regeneration und Wiederherstellung der ursprünglichen Funktion, die durch das Immunsystem vermittelt werden. [35] Die Zellen der unspezifischen Immunantwort registrieren durch PRRs die durch den Zelltod freigesetzten DAMPS, in deren Folge es zur Aktivierung des Immunsystems kommt. Dendritische Zellen stimulieren nun die adaptive Immunantwort [35, 44, 56].

Es sind verschiedene Reaktionen bezüglich des Immunsystems durch die PDT beschrieben. Dazu soll ein kurzer Überblick gegeben werden. Für Bacteriochlorin als PS konnte eine Anti-Tumor-Immunität im Mausmodell mit Effekten auf das Langzeitüberleben, ein Immungedächtnis bei erneuter Gabe von Tumorzellen und Metastasenkontrolle gezeigt werden [57]. Auch eine systemische wirkende Tumorregression soll bei mit PDT lokal behandelten Brustkrebspatienten bestehen [58]. Die PDT hat Effekte auf die verschiedenen Zellen des Immunsystems. So ist nachgewiesen, dass neutrophile Granulozyten in das Tumorgewebe, wie auch in drainierende Lymphknoten einwanderten [59, 60]. Eine B-Zell-Depletion bewirkte ein vermindertes Einwandern von neutrophilen Granulozyten in drainierende Lymphknoten, sodass für die B-Zellen eine Schlüsselrolle in diesem Prozess gezeigt werden konnte [60]. Durch die PDT wirkten Makrophagen vermehrt destruktiv gegenüber Adenokarzinomzellen der Lunge [61]. Das infolge der PDT aus nekrotischen Zellen freigesetzte Hitzeschockprotein (HSP) 70 war entscheidend für die Aktivierung der dendritischen Zellen, die die Grundlage zur Aktivierung von T- und B-Lymphozyten darstellen [62]. In vitro konnte eine Aktivierung dendritischer Zellen nachgewiesen werden [63]. Die zentrale Stellung der T-Lymphozyten für die Effektivität der PDT und deren Aktivierung vor allem zur Metastasen- und Rezidivkontrolle wurde beschrieben [35]. T-Zellen waren durch PDT in der Lage, tumorspezifische Antigene zu erkennen und dadurch sowohl lokal als auch systemisch gegen dieses Antigen tragende Zellen zu wirken [64]. Regulatorische T-Helferzellen (Treg) bildeten dabei ein Gegengewicht zur Anti-Tumor-Immunität, wirken tumorprotektiv [65]. Sie wurden als Hauptgrund für Rezidive unter PDT am Mausmodell vermutet [66]. Den natürlichen Killerzellen wurde im Rahmen der PDT eine Stellung zur Aktivierung cytotoxischer T-Zellen zugeschrieben [67].

Diese in der Literatur beschriebenen Effekte bekräftigen die Rationale dieser Arbeit, die Möglichkeit der Entwicklung einer Anti-Tumor-Immunität zu untersuchen und damit einen Beitrag für eine weitere, zukünftige Therapie des Harnblasenkarzinoms zu leisten.

### 2.3.4 Die PDT des Harnblasenkarzinoms

Für die PDT des Harnblasenkarzinoms gibt es verschiedene Photosensibilisatoren, die im Rahmen klinischer Studien getestet wurden. Photofrin erreichte in der Therapie von oberflächlichen Urothelkarzinomen eine 74%ige und in der Therapie von rezidivierenden Carcinoma in situ (CIS) der Blase eine 73,5%ige Response-Rate nach drei Monaten [68, 69]. Bei der Behandlung von rezidivierenden superfiziellen Urothelkarzinomen mit 5-ALA waren nach 23,7 Monaten 16 von 31 Patienten tumorfrei [70]. Die Nebenwirkungen durch die PDT waren gering. Zu ihnen zählten Dysurie, Hämaturie, Photosensitivität der Haut und Blasenwandfibrose mit verringerter Blasenkapazität [35]. Die Rückfallquote innerhalb eines Jahres bei rezidivierenden oberflächlichen Harnblasenkarzinomen therapiert mit 5-ALA nach Mitomycin C-Gabe lag bei 46% [71]. Bei der Verwendung von Hexaminolävulinat als PS konnte in einem adjuvanten Setting nach transurethraler Resektion der Harnblase (TURB) nach sechs Monaten eine Rezidivfreiheit von 52,9% erreicht werden [72]. Kulkarni et al. wiesen in einer Phase Ib-Studie zur TLD1433-PDT an sechs Patienten ohne ein Ansprechen auf die BCG-Standardtherapie die Verträglichkeit durch das Ausbleiben schwerer Nebenwirkungen nach [73]. TLD1433 ist ein PS, der an Transferrin bindet und durch die erhöhte Expression von Transferrin-Rezeptoren an Tumorzellen vermehrt von diesen aufgenommen wurde [74].

Derzeit gibt es zwei laufende klinische Studien für das NMIBC. Eine ist die Fortführung der Phase Ib-Studie von Kulkarni et al. als Phase II-Studie mit 100 Patienten. Mit der Studie soll die Effektivität der TLD1433-PDT beurteilt werden. Als Korrelat wird die Remission bei Patienten, bei denen die BCG-Standardtherapie zu keinem Erfolg führte, verwendet. Die weitere Studie vergleicht die postoperative Nachbehandlung von Patienten mit TURB. Dabei erhält eine Gruppe ausschließlich die Chemotherapie mit Gemcitabin, Mitomycin und Epirubicin, währenddessen die andere Gruppe mit der Chemotherapie kombiniert mit einer 5-ALA-PDT behandelt wird. [75–77]

Bis heute konnte keine Standard-PDT für das NMIBC etabliert werden. MIBC sind durch die geringe Eindringtiefe der Anregungswellenlängen und die hierdurch verringerte Wirkung in tieferen Gewebeschichten mit den bisherigen PS nicht effektiv zu behandeln. Einen Lösungsansatz bietet die PDT mittel THPTS. Eine Übersicht über die klinischen Studien zur PDT im Harnblasenkarzinom ist in Tabelle 3 dargestellt.

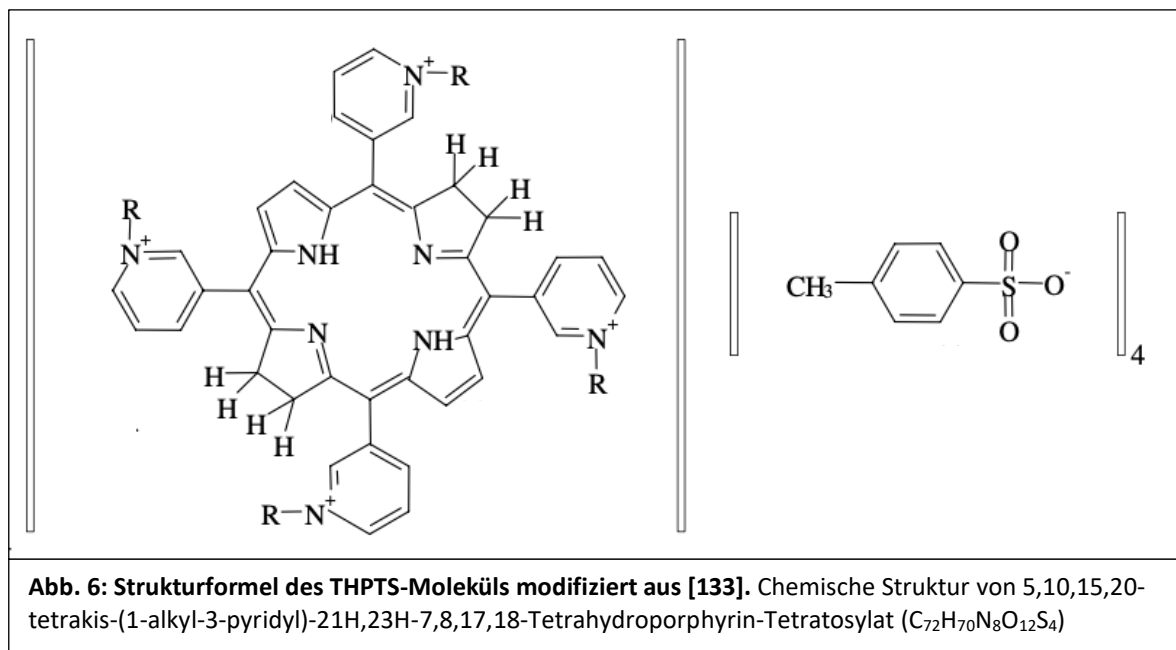
**Tabelle 3. Übersicht zu publizierten und laufenden klinischen Studien zur PDT des Harnblasenkarzinom**

Publikationsjahr	Art des Karzinoms	PDT-Intervention	Ansprechrate	Referenzen
1987	NMIBC	Photofrin II	74%	[68]
1995	NMIBC	Photofrin I	73,5%	[69]
2003	NMIBC	5-ALA-PDT	51,6%	[70]
2005	NMIBC	5-ALA-PDT	54%	[71]
2013	NMIBC	Hexaminolävulinat-PDT	52,9%	[72]
2022	NMIBC	TLD1433	-	[73]

laufend	NMIBC	TLD1433	-	[77]
laufend	NMIBC	5-ALA-PDT	-	[76]

### 2.3.5 Tetrahydroporphyrin-Tetratosylat: Ein neuer Photosensibilisator zur Therapie des MIBC

THPTS ist ein 4-fach positiv-geladener, wasserlöslicher PS für die PDT, dessen Absorptionsmaximum im nahen Infrarotbereich ( $760\pm 10\text{nm}$ ) liegt und daher eine Gewebepenetration von bis zu 15 mm erlaubt [78]. Damit erscheint die Therapie solider Tumoren, wie die des Harnblasenkarzinoms, mittels PDT möglich und maximal ausgereizt, da je nach Literatur Lichtwellenlängen  $>800\text{-}850\text{nm}$  energetisch nicht mehr zur Bildung von ROS ausreichen [35, 46]. Die positive Ladung des PS ermöglicht eine spezifische und stabile Anreicherung in den negativ geladenen Membranen der Mitochondrien der Zellen [55]. Diese Struktureigenschaft unterstützt in Kombination mit der erhöhten Aufnahme durch den verstärkten Stoffwechsel der Tumorzellen die selektive Anreicherung [55]. Im Kernspinresonanzspektrum (NMR-Spektrum) weist THPTS eine hohe Reinheit auf [55]. Die Strukturformel von THPTS ist in Abbildung 3 (Abb. 3) dargestellt.



In einem C26 Kolonkarzinom-Modell der BALB/C Nacktmaus reicherte sich THPTS im Tumorgewebe 16,7fach stärker an als in dem umgebenden Muskelgewebe [78]. Die Nebenwirkung hinsichtlich der Photosensitivität ist sehr gering, da innerhalb von 24h 90% der Ursprungskonzentration von THPTS über die gesunde Haut ausgeschieden werden können [78]. THPTS besitzt eine geringe Dunkel- ( $\text{LD}_{50}=6,0\text{mM}$  in 24h) und eine hohe Phototoxizität mit 91,6% Sterberate der Aderhautmelanomzellen (AHM-Zellen) (bei  $30\text{J}/\text{cm}^2$  mit  $150\mu\text{M}$  THPTS in 24h) [78]. Schastak et al. schlussfolgern, dass die THPTS-Verbindung derzeit eine der effektivsten PS für die PDT der Tumore ist [78].

Bei der Behandlung des Harnblasenkarzinoms kann eine signifikante Schädigung des gesunden Harnblasengewebes *in vivo* aufgrund geringer Lichtdosen von  $90\text{-}120\text{J}/\text{cm}^2$  weitestgehend

ausgeschlossen werden [79]. Die erste *in vitro*-Studie zur Wirkung von THPTS an Harnblasenkarzinomzellen erfolgte 2016. Berndt-Paetz et al. konnten eine selektive zytotoxische Wirkung in Karzinomzellen nachweisen. Hauptsächlich trat Apoptose auf, welche dosisabhängig bei 200µM THPTS bis zu 90% der Zellen tötete. Eine Akkumulation in gesunden Zellen widerlegte die vorgenannte These Schastaks zur selektiven Akkumulation in Tumorzellen. Hingegen blieb die zytotoxische Wirkung von THPTS hauptsächlich auf Karzinomzellen bzw. stark proliferierende Vorläuferzellen beschränkt. [80] In einer weiteren Studie zeigte sich hinsichtlich der subzellulären Lokalisation eine Anreicherung in Lysosomen und Endosomen, jedoch keine Anreicherung in Mitochondrien, wie von Walther et al. beschrieben [81]. Berndt-Paetz et al. begründeten dies mit unterschiedlichen, nicht näher charakterisierten, zellulären Transportmechanismen des Harnblasenkarzinoms und des Retinoblastoms. [82] Die Evaluierung von Sicherheit und Effektivität der THPTS-PDT erfolgte *in vivo* in einem orthotopen Harnblasentumormodell der Ratte, welches im vorliegenden Promotionsvorhaben als Untersuchungsmaterial diente. Das Harnblasentumormodell wurde in immunkompetenten Fischer F344-Ratten etabliert, was auch die Beurteilung der immunogenen Wirkung der PDT ermöglichte. Die PDT mittels THPTS zeigte keine nachweisbaren Nebenwirkungen. Das relative Tumolvolumen verringerte sich signifikant von 17,42%±4,43% auf 6,99%±4,07% (Mittelwert ± Standardabweichung). Eine Komplettremission wurde im Verlauf der 14-tägigen Nachbeobachtungszeit nicht erreicht und auf eine notwendige Optimierung der THPTS- und Lichtdosis, sowie ein Therapieregimen mit mehreren Zyklen verwiesen [82].

THPTS erscheint als ein nebenwirkungsarmer und effektiver PS, der in der Lage ist, MIBC zu therapieren. Die Immunreaktion, induziert durch THPTS-PDT, als weiteren möglichen Wirkpfeiler wurde bereits von Stenglein et al. untersucht [83]. Die dort beschriebene Erhöhung der T-Zellpopulation durch THPTS soll als ein Teil dieser Arbeit weitergehend beurteilt werden.

### 3 Ziele der Arbeit

Die vorgestellte Promotion sollte die primäre Immunreaktion im Harnblasenkarzinom ausgelöst durch die PDT mittels THPTS in einem orthotopen Rattenmodells charakterisieren.

Hypothesen:

- THPTS-PDT bewirkte in den Tumorbereichen eine verstärkte lokale adaptive Immunantwort durch eine erhöhte Konzentration von Leukozyten bestehend aus B-Zellen, T-Zellen und den Subtypen THs und CTLs.
- Die lokale THPTS-Applikation führte zu einer Konzentration der Immunreaktion im Tumorzentrum.
- Die systemische THPTS-Applikation führte zu einer Konzentration der Immunreaktion im Tumorrand.

Dazu sollten die Immunzellen in dem aus Vorexperimenten asserviertem Harnblasengewebe durch Multiplex-Immunfluoreszenz-Experimente nachgewiesen und quantifiziert werden. Die notwendigen Antikörper waren im Rattengewebe zu etablieren. Mittels Laserscanning-Mikroskopie sollten die unterschiedlichen Bereiche Tumorzentrum, Tumorrand, tumorfreie Areale aufgenommen werden. Die nachfolgende quantitative Analyse sollte die Dichte der verschiedenen Lymphozytenpopulationen in den verschiedenen Arealen beschreiben und ggf. Unterschiede zwischen der lokalen und der systemischen Applikation von THPTS aufdecken. Schließlich waren die Ergebnisse hinsichtlich ihrer Effekte auf die Anti-Tumor-Immunität gegenüber dem Harnblasenkarzinom im Vergleich zu anderen PDTs zu diskutieren.

## 4 Material und Methoden

Dieser Abschnitt soll einen Überblick über die unmittelbar genutzten Materialien aus den Vorarbeiten der Forschungsgruppe und das Vorgehen von der Antikörperetablierung bis zur statistischen Analyse der erhobenen Daten geben. Dazu wird für ein besseres Verständnis auch das Prinzip der Immunfluoreszenz beschrieben. Zentralen Stellenwert haben die standardisierten Bildaufnahmen, die Region of interest (ROI)-Definition und Datenerhebung durch Fiji, um ein möglichst repräsentatives Bild der Immunreaktion in der Rattenharnblase abzubilden.

### 4.1 Materialien

#### 4.1.1 Asservierte Harnblasengewebeschnitte

Die Harnblasengewebeschnitte stammen aus den Vorarbeiten der Forschungsgruppe [82, 83]. Als Versuchstiere wurden weibliche F344 Fischerratten verwendet, die einer Inzuchtlinie entstammen und sich als ein immunkompetentes orthotopes Harnblasenmodell eignen [84]. Zur Induktion der Harnblasenkarzinome wurden AY-27 Urothelkarzinomzellen verwendet, die von Cohen et al. durch

Fütterung des Karzinogens FANFT (N-(4-[5-nitro-2-furyl]-2-thiazolyl)formamide) in F344 Fischerratten erzeugt und in Zellkultur isoliert wurden [85]. Die Karzinomzellen waren damit in diesem Rattenmodell nicht immunogen.

#### 4.1.2 Liste der Reagenzien, Verbrauchsmaterialien, Software und Geräte

**Tabelle 4: Reagenzien**

<b>Histochemie</b>	
<b>Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>
3,3'-Diaminobenzidin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aqua dest.	Uniklinikum Leipzig
BSA 1 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Citratpuffer pH 6,0	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat/ Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Carl Roth, Karlsruhe
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol abs.	Hollborn, Leipzig
Hämatoxylin nach Mayer	Hollborn, Leipzig
Streptavidin Horseradish Peroxidase	Vector Laboratories, Orton Southgate, UK
Target Retrieval Puffer pH 9,0	Dako, Hamburg
TRIS	Carl Roth, Karlsruhe
TRITONX100	Carl Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid/ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Zytomed Systems, Berlin
Xylol	VWR International GmbH, Darmstadt
Normal Goatserum	Invitrogen
DAPI	Carl Roth, Karlsruhe,DE
Streptavidin AlexaFluor488	Thermo Sc., Waltham,USA

**Tabelle 5: Puffer und Lösungen**

<b>Lösungen</b>	<b>Rezeptur (je pro 1000 ml Aqua dest.)</b>
Blockinglösung	Normal Goatserum 1:10 in TBS 1 % BSA in TBS
DMSO TRITON/ DT	8 ml DMSO 2 ml TRITONX100
PBS/ Phosphate Buffered Saline 10-fach	80,01 g NaCl 15,6 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 2,7 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,01 g KCL
TBS/ Tris Buffered Saline 10-fach	30,28 g TRIS 87,66 g NaCl 2,24 g KCL

**Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Confocal-Matrix®	Micro Tech Lab, Graz, Österreich
Deckgläschen	Menzel, VWR International GmbH, Darmstadt
Fettstift PAP Pen	Immunotech, Frankreich
Mountex	Medite, Burgdorf
Objektträger Superfrost +	Menzel, VWR International GmbH, Darmstadt

**Tabelle 7: Verwendete Geräte**

Gerät	Hersteller
Dampfgarer MultiGourmet	Braun, Kronberg
Mikroskop LSM 800	Carl Zeiss
Mikrotom Rotary 3600 EM	PFM Medical, Köln
Wasserbad	PFM Medical, Köln

**Tabelle 8: Verwendete Software**

Programm	Hersteller
GraphPad Prism Version 9.3.1	GraphPad Software, San Diego, USA
Fiji Version 2.3.0/1.53f	Open Source, [86]
Fiji-PlugIn: StarDist	Open Source, [87]
Fiji-PlugIn: CSBDeep	Open Source, [88]
Microsoft Office Word, Excel, Powerpoint Version 16.67	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Apple Numbers Version 11.2	Apple Inc., Cupertino, USA

**Tabelle 9: Verwendete Antikörper**

*Rb = Kaninchen, Ms = Maus, RT = Raumtemperatur*

Primäre Antikörper				
Name/ Bestellnr.	Verdün- nung	Ink.Temp.	Spezies / Isotyp / Klonalität	Hersteller
Anti-CD45 / ab10558	1:200	4°C	Rb/IgG/poly	Abcam, Cambridge, UK
Anti-CD19 / orb10306	1:50	RT	Rb/IgG/poly	Biozol, Eching, DE
Anti-CD3 / ab16669	1:200	4°C	Rb/IgG/mono	Abcam, Cambridge, UK
Anti-CD3 / MA1-81580	1:200	4°C/RT	Ms/IgM/mono	Thermo Sc., Waltham, USA
Anti-CD8 (OX-8) / MCA48R	1:200	4°C	Ms/IgG/mono	BioRad, Feldkirchen, DE
Anti-CD8 / ab93278	1:200	4°C	Rb/IgG/mono	Abcam, Cambridge, UK
Anti-CD4 / NBP1-19371	1:50	4°C / RT	Rb/IgG/poly	Novus, Littleton, USA
Anti-CD4 / ab203034*	1:50	4°C	Rb/IgG/mono	Abcam, Cambridge, UK
Anti-CD4 / bs-0766R	1:200	4°C	Rb/IgG/poly	Bioss, Boston, USA
Anti-CD4 / bs-0647R	1:200	4°C	Rb/IgG/poly	Bioss, Boston, USA
Anti-FOXP3 / ab22510	1:25	4°C/37°C/RT	Ms/IgG1/mono	Abcam, Cambridge, UK
Anti-T-Bet / sc-21749	1:25	4°C/37°C/RT	Ms/IgG1/mono	Santa Cruz Biotech, Dallas, USA
Anti-Gata-3 / sc-268	1:25	4°C/37°C/RT	Ms/IgG1/mono	Santa Cruz Biotech, Dallas, USA
Anti-CD56 / NBP2-15184	1:50	4°C	Ms/IgG1/mono	Novus, Littleton, USA
Anti-CD161 / NB100-65297	1:50	4°C	Ms/IgG1/mono	Novus, Littleton, USA
Cytokeratin Pan Alexa Fluor 647 / NBP1-48348aF647	1:25	4°C	Ms/IgG1/mono	Novus, Littleton, USA
Sekundäre Antikörper				
Antigen / Bestellnr.	Verdün- nung	Ink.Temp.	Spezies	Hersteller
AlexaFluor 488 / A21121	1:500	RT	Ziege	Thermo Sc., Waltham, USA
AlexaFluor 555 / A21428	1:500	RT	Ziege	Thermo Sc., Waltham, USA
Anti-Mouse IgM biot. / BA-2020	1:500	RT	Ziege	Vector Labs., Burlingam, USA

\* Antikörper wurde mittlerweile aus dem Programm genommen (Stand: Februar 2023).



## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Vorarbeiten der Forschungsgruppe [82, 83]

Die nachfolgend beschriebenen Experimente wurden von der DFG unterstützt (DFG-Proj.: NE425/6-1; SCHA791/3-1) und sind unter der Tierversuchsnummer Landesdirektion Sachsen: TVV 47/11 registriert.

Zur Tumorinokulation wurden die Urothelkarzinomzellen transurethral in einer PBS-Lösung ( $4 \times 10^6$  Zellen/ml) für 1h in die Harnblase der Fischerratten instilliert. Im Vorfeld wurde eine diffuse Wundfläche mithilfe von 0,1N Salzsäure geschaffen. So bildeten sich innerhalb von zehn Tagen multifokale Harnblasenkarzinome unterschiedlicher Invasionstiefe. Dieses Verfahren stützte sich auf Experimente von Xiao et al. und El Kathib et al. [89, 90]. Am zehnten Tag erfolgte die THPTS-PDT und die Aufteilung der genetisch identischen Ratten in drei Gruppen.

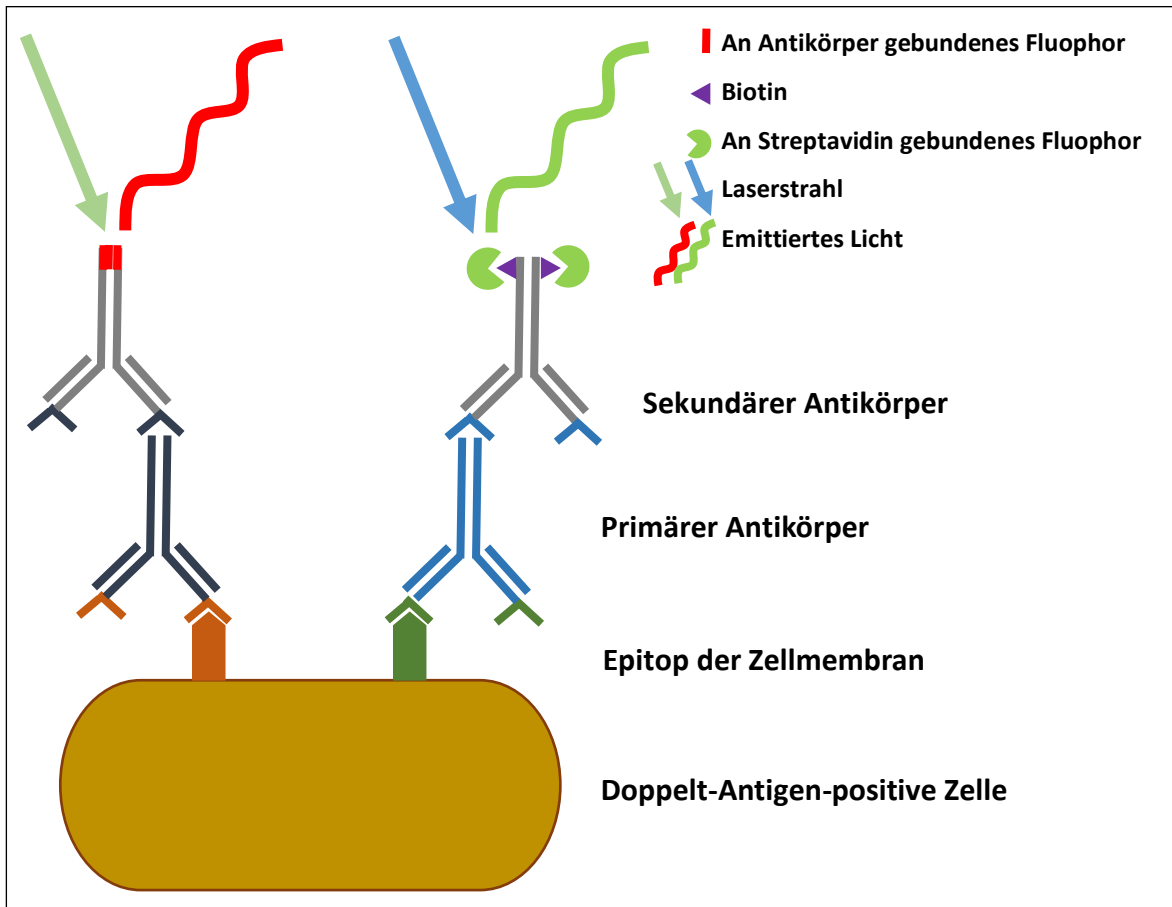
Die LAG erhielt transurethral 100  $\mu$ M THPTS mit einer Einwirkzeit von 2h in die Harnblase. Daraufhin wurde diese für 55 Sekunden mithilfe einer Glasfaser transurethral mit einem 760nm-Laser bestrahlt. Bei der SAG wurde 100  $\mu$ M THPTS mit 5mg/kg KG in 0,9%iger Kochsalzlösung i.v. verabreicht. Statt THPTS transurethral wurde bei der COG PBS gegeben. Die SAG und die COG wurden ebenfalls 2h inkubiert und anschließend die Harnblase wie bei der LAG beschrieben bestrahlt. Alle Gruppen erreichten eine Lichtdosis von 10J/cm<sup>2</sup>.

Nach 14d wurden die Tiere getötet und die Harnblasen entnommen. Das Gewebe wurde in 4%igem Formalin fixiert und anschließend paraffiniert. Von den entstehenden Paraffinblöcke wurden 7 $\mu$ m dicke Serienschnitte angefertigt, die die Grundlage für diese Arbeit bilden. Zur erleichterten Auswahl repräsentativer Gewebeschnitte wurde jeder 20. Schnitt in Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt.

### 4.2.2 Färbeprotokoll Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz (IF) beruht auf dem Prinzip der Immunhistochemie. Durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion binden AKs an ein Epitop, welches man als eine bestimmte Gewebeeigenschaft umschreiben könnte. Diese Bindung sollte möglichst spezifisch und stark sein. Ziel ist es, mithilfe eines Detektionssystems den Antikörper zu registrieren. [91] Im Falle der vorgestellten Promotion bindet nun ein weiterer sekundärer Antikörper den primären Antikörper [92]. Diese sekundären Antikörper sind in alkalischer Lösung kovalent mit Fluorochromen verbunden. Zu diesen zählen Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC). In der Laser-Fluoreszenzmikroskopie zeigt sich FITC grün mit einer Anregung bei 490nm und Emission bei 550nm und TRITC rot mit einer Anregung bei 520-554nm und Emission bei 582nm [93]. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung biotinylierter sekundärer Antikörper, welches von Streptavidin gebunden wird. Streptavidin kann mit einem Fluorochrom gekoppelt sein, wodurch dieses ebenfalls in der Laser-Fluoreszenzmikroskopie detektiert wird. [94] Dieses Verfahren wird wegen seiner hohen Sensitivität genutzt, da die zahlreich an den Antikörper gekoppelten Biotine wiederum von

Streptavidinen gebunden werden. So potenziert sich die Wirkung. [95] In der Abbildung 7 (Abb. 7) wird das Prinzip der Immunfluoreszenz schematisch dargestellt.



**Abb. 7: Darstellung des Prinzips der Immunfluoreszenz (IF).** Primärantikörper binden spezifisch an die Epitope auf der Zellmembran einer doppelt-Antigen-positiven Zelle. An diese Primärantikörper erfolgt darauf eine spezifische Bindung von Sekundärantikörper. In diesem Schema befindet sich links ein Sekundärantikörper direkt konjugiert mit Fluophor, rechts ein Sekundärantikörper konjugiert mit Biotin. An dieses Biotin bindet sich mit Fluophor konjugiertes Streptavidin. Die Fluophore emittieren als Reaktion auf Laserbestrahlung Licht einer spezifischen Wellenlänge.

Zur Färbung der sieben µm dicken Paraffinschnitte der Rattenharnblasen wurden die gewählten repräsentativen Gewebsschnitte mit einem standardisierten Färbeprotokoll behandelt. Dieses ist in Tabelle 10 dargestellt.

**Tabelle 10: Protokoll Doppelimmunfluoreszenz-Färbungen in Paraffinschnitten der Rattenharnblase**

<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Reagenzien</b>	<b>Dauer</b>
Entparaffinieren der Schnitte	Xylol	10min
	Xylol	10min
Rehydrierung der Schnitte	100%iges Ethanol	10min
	100%iges Ethanol	10min
	96%iges Ethanol in Aqua dest.	10min
	70%iges Ethanol in Aqua dest.	10min
Spülung	Aqua dest.	5min
Antigenmaskierung durch Hitzebehandlung im Dampfgarer	Target Retrieval Puffer (pH-Wert 9,0)	30min
Abkühlen auf Raumtemperatur		30min
Spülung	TBS	10min
Antigenmaskierung	DT-PBS	5min
Spülung	TBS	10min
Blocken unspezifischer Bindungen	1% BSA mit 1:10 Ziegen-Normalserum in TBS (pH-Wert 7,2)	2h
Inkubation mit Primärantikörper bei 4°C	Auflistung in Tabelle 7, Verdünnung in 1%igen-BSA-TBS-Lösung	16h
Spülung	TBS	10min
Spülung	TBS	10min
Spülung	TBS	10min
Inkubation mit Sekundärantikörper	Auflistung in Tabelle 7, Verdünnung in TBS	45min
Streptavidin-Signalverstärkung für anti-CD3-AK (Ms, IgM, monoklonal)	<i>Biotinyliertes Ziegen-Anti-Maus-IgM</i>	<i>45min</i>
<i>Zusätzliche Inkubation:</i>	<i>Fluoreszierendes Streptavidin</i>	<i>30min</i>
<i>Bei parallelen Protokollen Zeitüberbrückung:</i>	<i>TBS</i>	<i>30min</i>
Spülung	TBS	10min
Spülung	TBS	10min
Spülung	TBS	10min
Kernfärbung	Diamino-Phenylindol (DAPI) 1:5000 in TBS	10min
Eindecken, vorher Kurzspülung	Confocal-Matrix®, vorher Aqua dest.	

Zusätzlich wurde zu jeder Färbung parallel eine Negativkontrolle, d.h. ein Protokoll ohne Verwendung des primären Antikörpers, angefertigt. Die Lagerung der fertigen Objektträger fand bei 6°C lichtgeschützt statt.

#### 4.2.3 Etablierung der Antikörper

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war die Subtypisierung von Lymphozyten in der Rattenharnblase. Die Etablierung der Antikörper im Rattengewebe stellte eine Herausforderung dar und wurde parallel zu schon etablierten immunzytochemischen Experimenten durchgeführt. Zuerst wurde die Funktionsweise durch Färbungen für die Lichtmikroskopie geprüft und daraufhin auf die Fluoreszenzmikroskopie übertragen. Insgesamt wurden 16 Primärantikörper getestet (Tabelle 9), um sieben Membranproteine, drei Transkriptionsfaktoren und sieben Zytokeratine zu markieren (Tabelle 11).

**Tabelle 11: Zielstrukturen der verwendeten Antikörper**

Antikörper	Gefärbte Struktur	Markierter Zelltyp [96–100]
anti-CD45	CD45-Membranprotein	Leukozyten gesamt
anti-CD3	CD3-Membranprotein	T-Zellen
anti-CD8	CD8-Membranprotein	Subtyp: T-Killerzellen, natürliche Killerzellen
anti-CD4	CD4-Membranprotein	Subtyp: T-Helferzellen, Monozyten, Makrophagen, Granulozyten
anti-CD19	CD19-Membranprotein	B-Zellen, dendritische Zellen, Stammzellen
anti-T-Bet	Transkriptionsfaktor im Zellkern	Subtyp: T-Helferzellen Typ 1
anti-Gata-3	Transkriptionsfaktor im Zellkern	Subtyp: T-Helferzellen Typ 2
anti-FOX-P3	Transkriptionsfaktor im Zellkern	Subtyp: regulatorische T-Helferzellen
anti-CD56	CD56-Membranprotein	T-Zellen, natürliche Killerzellen
anti-CD161	CD161-Membranprotein	T-Zellen, natürliche Killerzellen
PAN-Zytokeratin	CK 4, 5, 6, 8, 10, 13, 18	Epithelgewebe, Karzinome

Zum Teil konnte auf die bereits für die lichtmikroskopische Immunhistochemie etablierten Antikörper zurückgegriffen werden [83], die für die Immunfluoreszenz (IF) weiter optimiert werden mussten. Aufgrund teilweise nur begrenzt verfügbarer Antikörper für das paraffinierte Rattengewebe mit schwacher Affinität der Primärantikörper wurde neben der indirekten IF für die Detektion von CD3 die labelled Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB) zur Verstärkung des Fluoreszenzsignals eingesetzt (Abb. 4). Die Qualität der Färbung wurde anhand von herstellerseitig bereitgestellten Aufnahmen markierter Zellen beurteilt. Zusätzlich sollten Antikörper, die Membranproteine färben, die Zellmembran vollständig oder teilweise markieren. In den zweidimensionalen Aufnahmen dieser Arbeit wurde die Zellmembran als ovale Linie um einen Zellkern definiert. Weiterhin sollten Transkriptionsfaktoren innerhalb des Zellkerns markiert werden. Der Zellkern wird durch die Kernfärbung DAPI in einer zweidimensionalen Aufnahme als runde Fläche dargestellt. DAPI lagert sich hauptsächlich an AT-reiche Bereiche der DNA-Doppelhelix an [101].

Die meisten kommerziellen Antikörper für CD-Marker wurden für die Flow-Cytometrie entwickelt. Die fehlende oder nur schwache Detektion der Antigene in Formalin-fixiertem Paraffin-eingebettetem (FFPE)-Gewebe und die oft schwache oder fehlende Kreuzreaktion mit Rattenantigenen führte dazu, dass von 18 getesteten AK lediglich sechs für die quantitative Analyse der Rattenharnblasen verwendet

werden konnten. So wurden drei Dreifachmarkierungen, charakterisiert durch zwei Zielantigene und die Kernmarkierung mittels DAPI sowie eine Doppelmarkierung, charakterisiert durch ein Zielantigen und die DAPI-Kernfärbung, erfolgreich etabliert. Diese sind in Tabelle 12 aufgelistet.

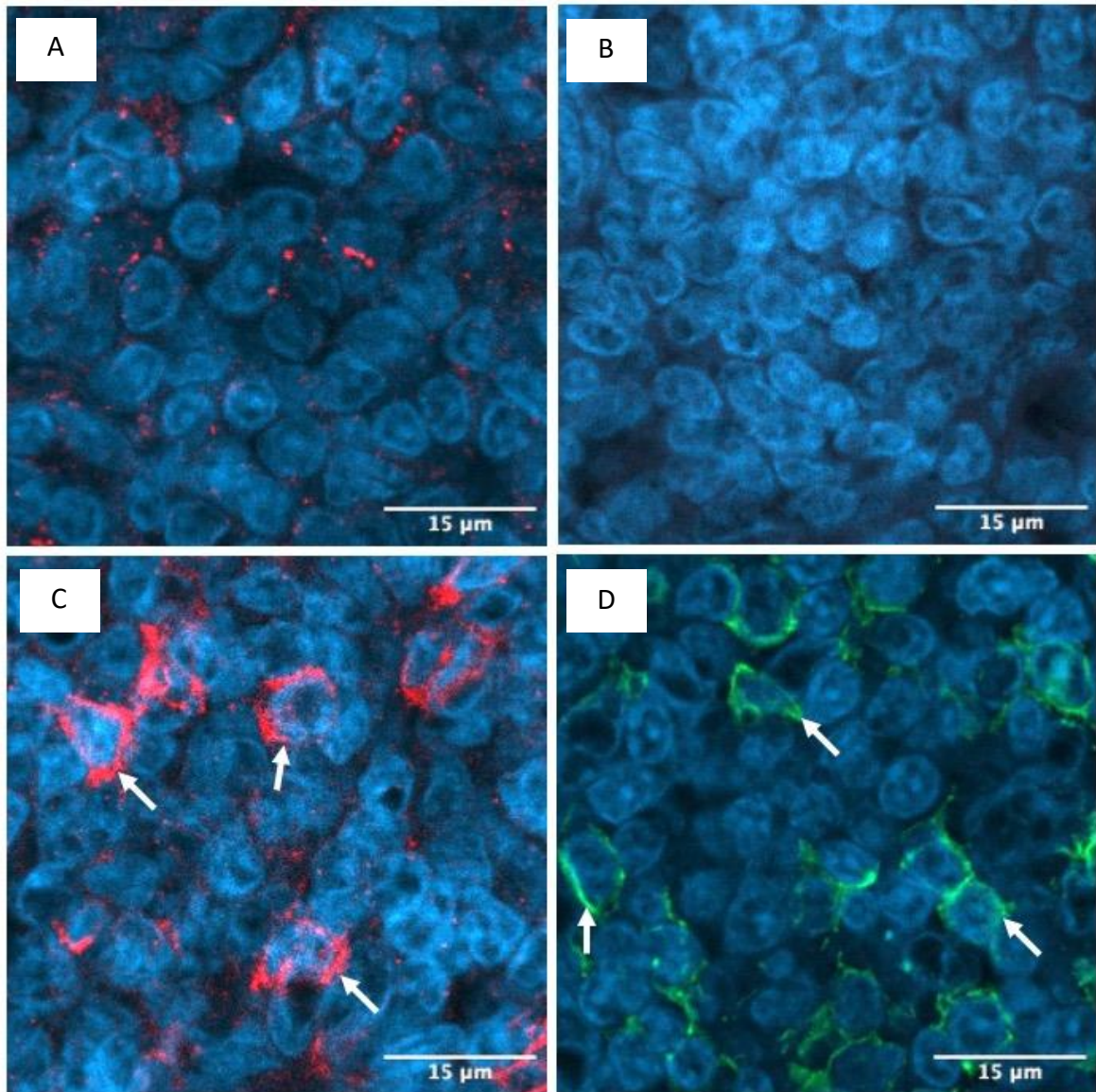
**Tabelle 12: Etablierte Antikörper und deren Kombination**

Zielzelle	Wirtstier,			Wirtstier,		
	Zielantigen 1	Isotyp, Klonalität	Detektio n	Zielantigen 2	Isotyp, Klonalität	Detektion
Leukozyten mit Subtyp T-Zelle	CD45	Rb IgG poly	IF	CD3	Ms IgM mono	IF
T-Zelle mit Subtyp T-Killerzelle	CD3	Rb IgG mono	IF	CD8	Ms IgG1 mono	IF
T-Zelle mit Subtyp T-Helferzelle	CD3	Ms IgM mono	IF	CD4	Rb poly	IF
B-Zelle	CD19	Rb IgG poly	IF	-	-	-

Die Etablierung des CD8-AKs (ab93278) von Abcam war mit Schwierigkeiten verbunden, da dieser nur unzureichend Kreuzreaktionen mit den zytotoxischen T-Zellen der F344 Ratte in der Immunfluoreszenzfärbung zeigte. In den immunhistologischen Vorarbeiten [83] zeigte dieser CD8-AK aufgrund der Signalverstärkung durch Verwendung der Streptavidin-Biotin-Komplex Methode eine auswertbare Markierung. Der zweite verwendete CD8-AK (MCA48R) von BioRad färbte entsprechend den Erwartungen die Zellmembranen deutlich an. Abbildung 8 (Abb. 8) soll die entsprechenden Punkte veranschaulichen.

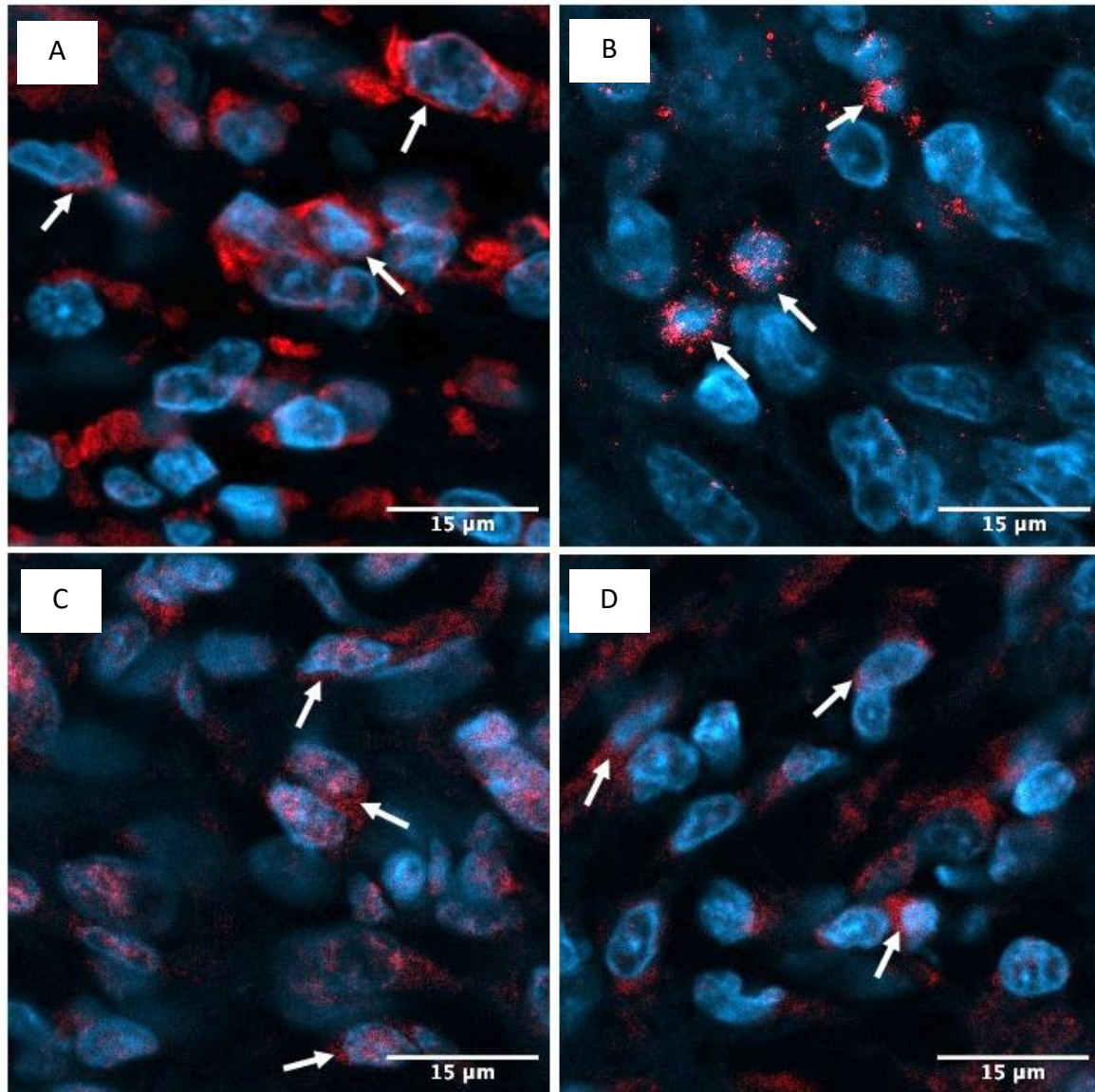
Zur Etablierung der CD4-Markierung wurden insgesamt vier verschiedene Antikörper von drei Firmen getestet. Es traten starke diffuse Markierungen im Tumorstroma und Urothel auf. Die Immunzellen und das Endothel der Blutgefäße hatten stark gefärbte Zellmembranen. Der anti-CD4-AK (ab203034) von Abcam wurde mittlerweile aus dem Programm genommen. Zur quantitativen Analyse fiel die Entscheidung auf den CD4-AK (NBP1-19371) von Novus. Dieser zeigte das beste Signal-Rausch-Verhältnis mit der stärksten Markierung der Zellmembranen (Abb. 9).

Die Ms-Antikörper für die Transkriptionsfaktoren T-Bet, Gata-3 und FOX-P3 konnten nicht auf das Rattengewebe übertragen werden. Es bestanden keine oder nur geringfügige Markierungen, die diffus verteilt und ohne Assoziation zum Zellkern waren. Gleiche diffuse, assoziationslose Markierungen zeigten sich beim CD56-Ms-AK. Der CD161-Ms-AK war nicht in FFPE-Gewebe verwendbar. Zur Darstellung von Urothelzellen wurde ein direkt mit Alexa-488 gekoppelter, pan-reaktiver, monoklonaler Maus-Antikörper getestet, der laut Hersteller die humanen Zytokeratine 4, 5, 6, 8, 10, 13 und 18 erkennt und eine Kreuzreaktion zu Maus aufweist. Dieser zeigte eine Kreuzreaktivität zu Ratten-Zytokeratinen mit einer spezifischen Markierung der Zellmembranen der Urothelzellen, jedoch keine Markierung im Urothelkarzinoms.



**Abb. 8: Etablierung der CD8-Immunhistologie.** (A) Der monoklonale Kaninchen CD8-AK (Abcam) zeigte keine adäquate Markierung im Thymus der Ratte, während in der humanen Tonsille eine deutliche Markierung der Zellmembran (rot, weiße Pfeile) zu beobachten war (C). (B) In der Negativkontrolle zu (A) zeigt sich keine Markierung durch den CD8-AK (Abcam). (D) Der monoklonale Maus CD8-AK (BioRad) zeigte hingegen im Rattenthymus eine zu (C) vergleichbare Markierung der Zellmembranen (grün). Beide Primärantikörper wurden in 1:200facher, der CD8-AK (Abcam) im Rattenthymus mit bis zu 1:20facher Verdünnung ü.N. bei 4°C inkubiert.

Der CD8-AK (MCA48R) von BioRad wurde zur Markierung der CTLs benutzt.

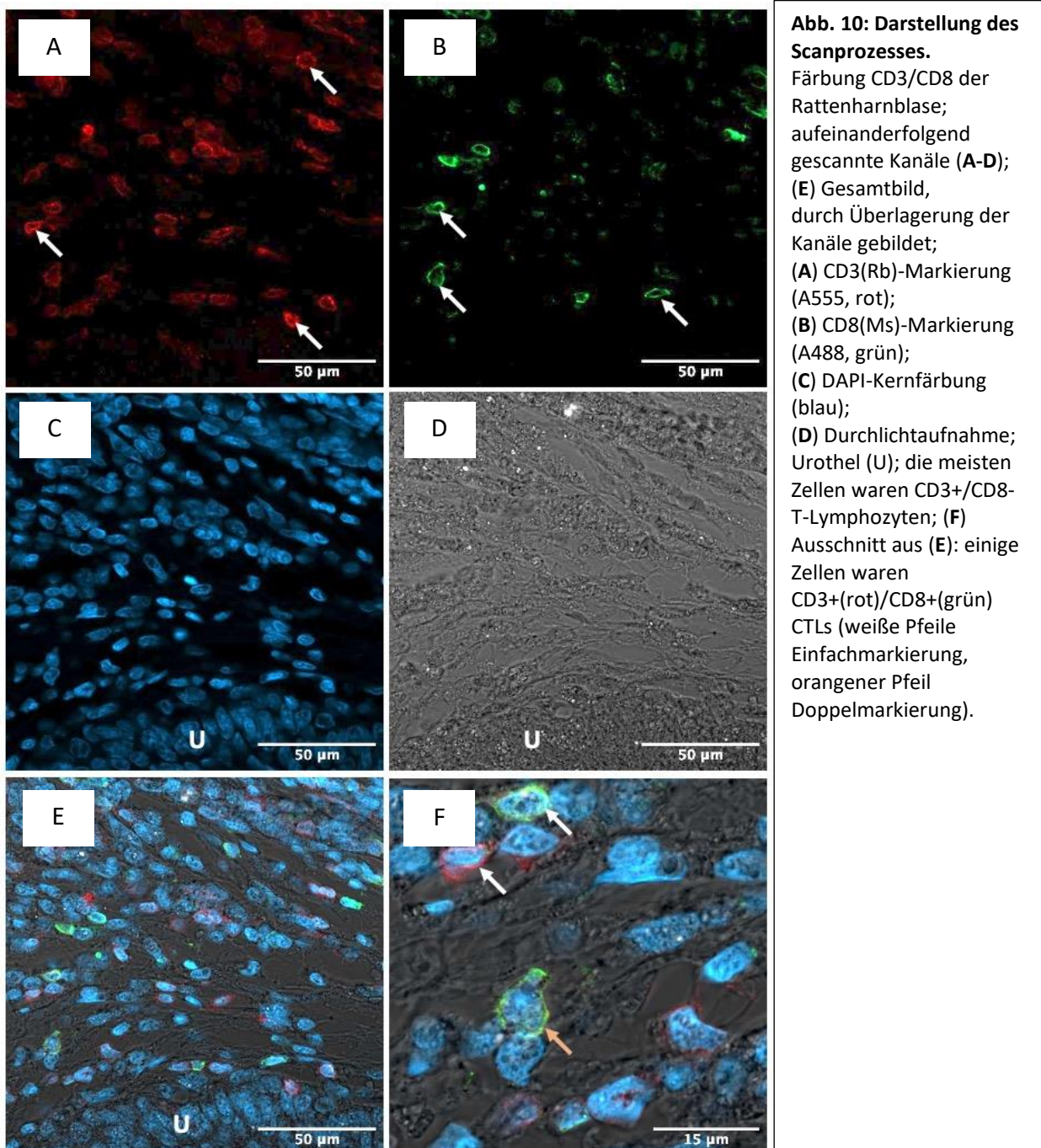


**Abb. 9: Etablierung der CD4-Immunhistologie.** (A) Der monoklonale Kaninchen CD4-AK von Novus zeigte eine starke Markierung der Zellmembranen von Karzinom-assoziierten Lymphozyten in der Rattenharnblase (rot, weiße Pfeile). Unspezifische Bindungen waren gering und traten in der extrazellulären Matrix auf. (B) Granuläre zytoplasmatische und perinukleäre Markierung mit dem polyklonalen Kaninchen CD4-AK von Abcam (rot, weiße Pfeile). (C) Der polyklonale Kaninchen CD4-AK von Biozol (0766R) zeigte deutliche Markierungen in den Zellkernen und im Zytoplasma (Pfeile). (D) Der polyklonale Kaninchen anti-CD4-AK von Biozol (0647R) zeigte eine vorwiegend zytoplasmatische Markierung (Pfeile). Kerne wurden nicht markiert. Die Novus und Abcam Primärantikörper wurden in 1:50facher, die Biozol mit 1:200facher Verdünnung ü.N. bei 4°C inkubiert.

Der CD4-AK (NBP1-19371) von Novus wurde zur Markierung der THs genutzt.

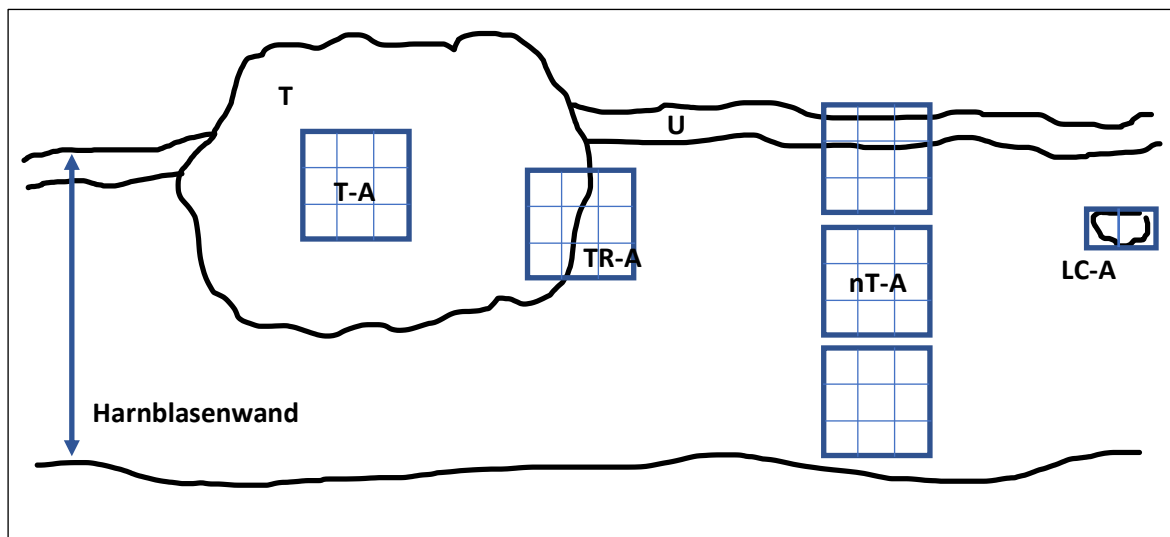
#### 4.2.4 Aufnahmetechnik

Für die quantitative Analyse wurden Kachel-Scans (Tile-Scans) mit einem Zeiss Plan-Apochromat 40x/0,95 an einem Zeiss LSM800 aufgenommen. Die Aufnahmen erfolgten in 16bit-Farbtiefe und bestanden in der Regel aus 9 Einzelscans. Die einzelnen Scans wurden mit 1892 x 1892 Pixeln (px) bei einer Auflösung von 84nm/px aufgenommen. Die Anregung erfolgte mittels Laserdioden bei 405nm für DAPI (Kernfärbung), 488nm für Alexa-488 (A488) oder Streptavidin-A488 und 561nm für Alexa-555 (A555). Zusätzlich erfolgte eine Durchlichtaufnahme (Abb. 10). Es wurde eine individuelle Anpassung der Laserdiodenparameter favorisiert, die sich auf Basis der Hintergrundfluoreszenz in der Negativkontrolle und der Intensität fluoreszierender Zielantigene orientierte.





In den Tumorbereichen und den tumorfreien Arealen wurden mit dem 40x Objektiv jeweils 3x3 Feldaufnahmen als zusammenhängende Tile-Scans aufgenommen. Eine Ausnahme bildeten die Lymphzellcluster, bei denen sich die Anzahl der Tile-Scans an deren Größe orientierten. Innerhalb der Gewebsschnitte wurden Feldaufnahmen aus allen Tumorarealen angefertigt. Zur eindeutigen Zuordnung waren die Tumorareale von rechts nach links im mikroskopischen Bild aufsteigend nummeriert. In der Regel wurden je nach Größe der Tumorareale maximal fünf Feldaufnahmen, entspricht 45 Einzelbildern, pro Bereich Tumorzentrum oder -rand angefertigt. Bei sehr kleinen Tumoren konnte in der Feldaufnahme keine Unterscheidung zwischen Tumorzentrum und -rand getroffen werden. Diese wurden gesondert gekennzeichnet. Der tumorfreie Bereich wurde als Querschnitt durch die Harnblasenwand abgebildet. Dieser bestand in der Regel aus zwei Feldaufnahmen, selten drei. Die Feldaufnahmen der verschiedenen Bereiche wurden jeweils anhand des Tumorrands festgelegt. Die Feldaufnahme des Tumorrands ließ die Grenze der Tumorzellen zum tumorfreien Gewebe möglichst zentral durch das Bild verlaufen. Daran anschließend erfolgten die Aufnahmen des Tumorzentrums direkt tumorseitig. Bei großen Tumorarealen wurden zentrale Tumorbereiche gewählt. Die tumorfreien Bereiche wurden in größerer Entfernung zum Tumorareal ohne ersichtliche Tumorzellinfiltrate aufgenommen. Diese Scans tumorfreier Bereiche wurden nur für Schnitte angefertigt, die wenigstens ein Tumorareal enthalten. Die Aufnahmen der Lymphzellcluster umfassten die gesamte Ansammlung der Immunzellen im tumorfreien Bereich, auch in Schnitten, in denen sich kein Tumorareal ausmachen ließ. Eine Übersicht über die Scanaufnahmen der verschiedenen Bereiche der Harnblasengewebeschnitte bietet Abbildung 11 (Abb. 11).



**Abb. 11: Schematische Übersicht der Scanaufnahmen der verschiedenen Harnblasen- und Tumorbereich.**

T = Tumor

T-A = Tumorzentrumaufnahme (3x3 Tile-Scans)

U = Urothel

TR-A = Tumorrandaufnahme (3x3 Tile-Scans)

nT-A = Aufnahme tumorfreier Bereich (3x3 Tile-Scans)

LC-A = Aufnahme Lymphzellcluster (Anzahl Tile-Scans an Größe orientiert)

Die Feldaufnahme des Tumorrands lässt die Grenze der Tumorzellen zum tumorfreien Gewebe möglichst zentral durch das Bild verlaufen. Die Feldaufnahmen des tumorfreien Bereichs bilden den Querschnitt der Harnblasenwand ab.

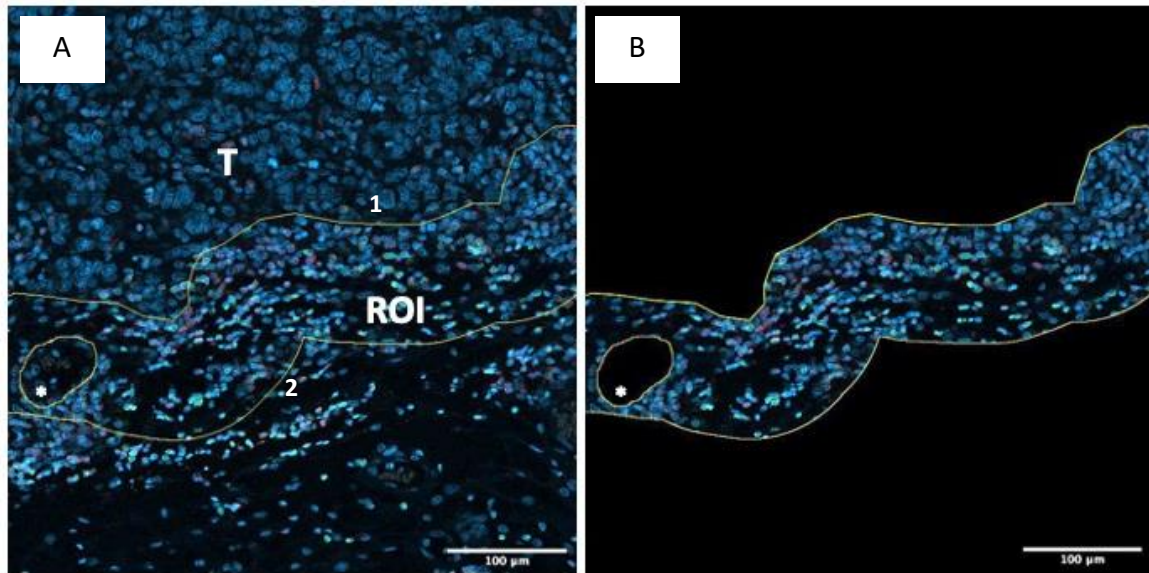
#### 4.2.5 Datenerhebung

Für jeden Gewebeschnitt wurden Tumorareale nach dem Zufallsprinzip ausgewählt. Die verschiedenen Tumorareale ergaben sich aus der Morphologie des Harnblasenschnittes. Die unterschiedlichen Bereiche der Harnblase bildeten Tumorareale, bestehend aus Rand und Zentrum, tumorfreie Bereiche und Lymphzellcluster. In den gescannten Feldaufnahmen der Harnblasenbereiche wurden vor der automatischen Auswertung die ROIs markiert und ausgeschnitten. Die Tumorzentrum-ROI bildete das gesamte Tumorgewebe der entsprechenden Aufnahme ab. Die Tumorrand-ROI befand sich in dem Bereich zwischen der Grenze der Tumorzellen und einer Entfernung von 100µm zu dieser. Die ROIs der tumorfreien Bereiche beinhalteten den gesamten Bereich der Aufnahme. Bei den Lymphzellclustern bestanden die ROIs ausschließlich aus den dicht formierten Immunzellen der Aufnahme. In allen ROIs wurden Artefakte, größere Blutgefäße, vor allem Arterien und Venen, das gesunde Urothel sowie gewebefreie Bereiche ausgeschnitten. Abbildung 12 (Abb. 12) zeigte beispielhaft die Erstellung eines ROIs im Tumorrandbereich.

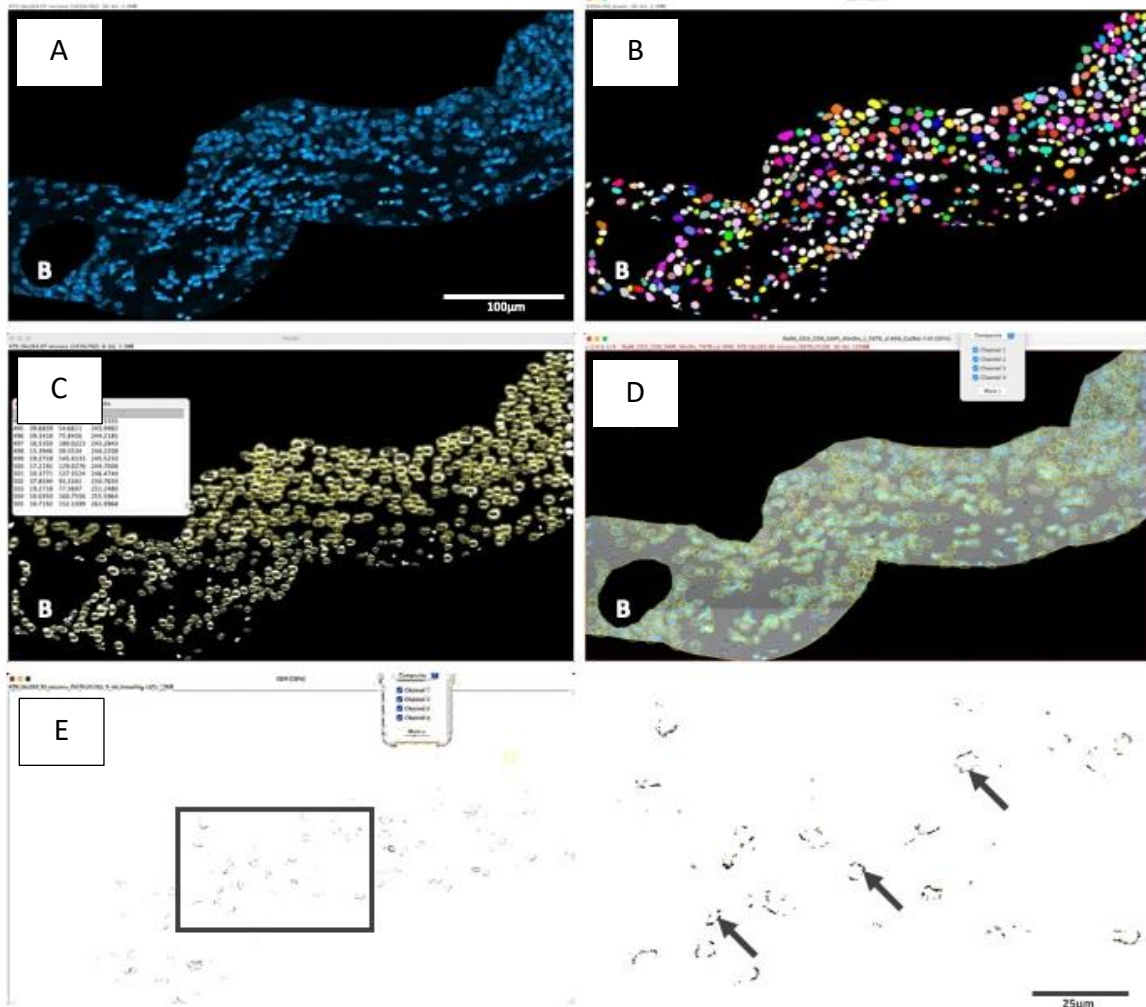
Die morphometrische Analyse erfolgte mittels der Open-Source-Software Fiji [86] und dem von Prof. Dr. Jochen Neuhaus eigens programmierten Macro zur automatischen Ausführung folgender Schritte:

1. Messung der ROI-Fläche der manuell ausgeschnittenen Bildbereiche;
2. Backgroundkorrektur, automatisch für die einzelnen Kanäle;
3. Segmentierung der Zellkerne, Markierung und Auszählung (exklusive der den Bildrand schneidenden Zellkerne\*) unter Verwendung des Fiji Addon Stardist [87]; \*wenn Bild- und ROI-Rand nicht deckungsgleich waren, wurden die Zellkerne, die den ROI-Rand berührten, gezählt;
4. Erweiterung der ROI-Fläche der Zellkerne um einen Rand von 1 µm;
5. Messung der prozentualen Überlappung der Immun- und Zellkern-ROI-Markierungen (A488 und A555).

Abbildung 13 veranschaulicht die Analyse anhand einer Doppelmarkierung von CD3 (A555) und CD8 (A488). Für jede Aufnahme wurde durch das Macro eine Tabelle ausgegeben, aus der dann die ROI-Fläche der einzelnen Bereiche ermittelt und die Gesamtzellzahl sowie die einfach- und doppeltmarkierten Zellen gezählt wurden. Die verwendete Software war Apple Numbers Version 11.2. Als positive Zelle wurden bei den CD45-Rb-, CD3-Rb-, CD3-Ms-, CD8-Ms- und CD19-Rb-Färbungen Kern-ROIs mit prozentualer Überlappung >0,00% gezählt, bei der CD4-Rb-Färbung >0,01% wegen des schlechteren Signal-Rausch-Verhältnisses in der extrazellulären Matrix. Zur Ermittlung der Immunzelldichte wurde die Anzahl der einfach- bzw. doppeltmarkierten Zellen durch die ROI-Fläche dividiert. Für jedes der übergeordneten Areale von Tumor, Rand und tumorfreiem Bereich wurde das arithmetische Mittel der einzelnen Feldaufnahmen berechnet. Für die Lymphzellcluster wurde auf die Berechnung des arithmetischen Mittels verzichtet, da sich diese nicht zu übergeordneten Arealen zusammenfügen ließen.



**Abb. 12: Erstellung des ROIs zum Bereich Tumorrand.** (A) Tumorzellen waren aufgrund ihrer Kerngröße deutlich zu identifizieren. In der Originalfeldaufnahme wurde das ROI eingezeichnet. Es wurde eine Linie (1) entlang der randständigen Tumorzellen gezogen. Eine parallele Linie (2) wurde durch die Software Fiji in 100µm Abstand eingezeichnet. Die Fläche dazwischen bildete das ROI-Tumorrand (ROI). Das eingeschlossene Blutgefäß (\*) wurde final ausgeschnitten; (B) Ergebnis des in (A) beschriebenen Ablaufs.



**Abb. 13: Datenerhebung mittels der programmierten Fiji-Software.** Ablauf nacheinander (A-E). (A) DAPI-Kernfärbung (blau) in der nativ-Kernaufnahme; (B) Markierung der Zellkerne; (C) Zählung der markierten Zellkerne; (D) Vergrößerung der Zellkern-ROIs um 1µm im Nativbild; (E) mit vergrößertem Ausschnitt (F); Antikörpermarkierungen (Pfeile), Ermittlung des Anteils der Überlappung zu vergrößerten Zellkern-ROIs

#### 4.2.6 Statistik

Die statistischen Analysen erfolgten mit Graph Pad Prism 9.3.1. Zuerst wurden die untersuchten Daten auf Normalverteilung mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests oder, bei zu geringer Wertanzahl, mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests untersucht. Bei Normalverteilung wurden die drei Gruppen durch eine One-Way-ANOVA miteinander verglichen. Bei ungleichen Standardabweichungen wurde der Brown-Forsythe- und Welch-ANOVA-Test durchgeführt. Bei fehlender Normalverteilung wurden die drei Gruppen mittels parameterfreien Kruskal-Wallis-Tests analysiert. Bei einem signifikanten Ergebnis erfolgte eine Post-hoc-Testung mit Dunn's multiple comparisons bei der jede Gruppe gegeneinander getestet wurde. Ergebnisse mit  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant gewertet.

Bei auffälligen Werten (Ausreißern) wurde eine abgleichende Kontrolle zwischen Software und Bildaufnahme durchgeführt. Bei Unstimmigkeiten wurden diese Artefakt-behafteten Scans in der betreffenden Einfach- und Doppelmarkierung aussortiert. Dies trat einerseits in der COG bei CD45/CD3-Färbungen auf, bei denen Gewebestreifen im tumorfreien Bereich durch hohe Autofluoreszenz von der Software fehlgedeutet wurden. Andererseits kam es in der COG und LAG bei CD3/CD8-Färbungen durch eine starke grüne Autofluoreszenz des Tumorstromas zu Softwarefehlern. Insgesamt betrafen diese Software-bedingten Messfehler in der CD45/CD3-gefärbten COG zwei Feldaufnahmen (6,06%), die von der Auswertung ausgeschlossen werden mussten. Die in die Analyse eingehende Anzahl der Mittelwerte der tumorfreien Bereiche reduzierte sich dadurch nicht. In der CD3/CD8-gefärbten COG wurden 16 Feldaufnahmen (21,91%) aussortiert, die die Anzahl der Mittelwerte der Tumorzentren zur Analyse um zwei (8,33%) verringerten. In der LAG mussten drei Feldaufnahmen (7,32%) ausgeschlossen werden, die keine Reduktion von Mittelwertanzahlen zur Analyse bewirkte. Die in zwei unterschiedlichen Färbungen mit dem CD3-Ms-AK-einfachmarkierten Zellen wurden gepoolt. Zu jeder Immunzellenmarkierung in den untersuchten Bereichen des Harnblasenkarzinoms wurde pro Rattengruppe Mittelwert und Standardabweichung berechnet.

## 5 Ergebnisse

Dieser Abschnitt soll zeigen, wie sich der Datensatz von 1732 Feldaufnahmen aus über 14500 HPF-Bildern auf die einzelnen Färbungen, Gruppen und Harnblasenbereich verteilt. Weiterhin werden die Färberesultate der Immunzellmarkierungen in der qualitativen Auswertung beschrieben und schließlich die quantitativen Ergebnisse, aufgeschlüsselt auf die einzelnen Harnblasenbereiche und Gruppen, dargestellt. In Tabelle 14 werden die statistischen Daten bestehend aus dem verwendeten Test, Anzahl der Werte, Mittelwert, Standardabweichung und p-Wert übersichtlich dargestellt.

### 5.1 Versuchstiere

Insgesamt konnten Harnblasenschnitte von 26 Tieren untersucht werden. In der LAG (lokale Applikationsgruppe) fand sich in acht von zehn Ratten mindestens ein Tumoreal eines Harnblasenkarzinoms. In der SAG (systemische Applikationsgruppe) war dies für vier der sechs Tiere der Fall. Neun von zehn Ratten der COG (Kontrollgruppe) hatten mindestens ein Tumoreal.

### 5.2 Charakterisierung des Datensatzes

Insgesamt 1732 Feldaufnahmen wurden für die vier Doppelmarkierungen: CD45/CD3, CD3/CD8, CD3/CD4 und die Einfachmarkierung für CD19 analysiert (Tabelle 13).

#### **Tabelle 13: Datensatz**

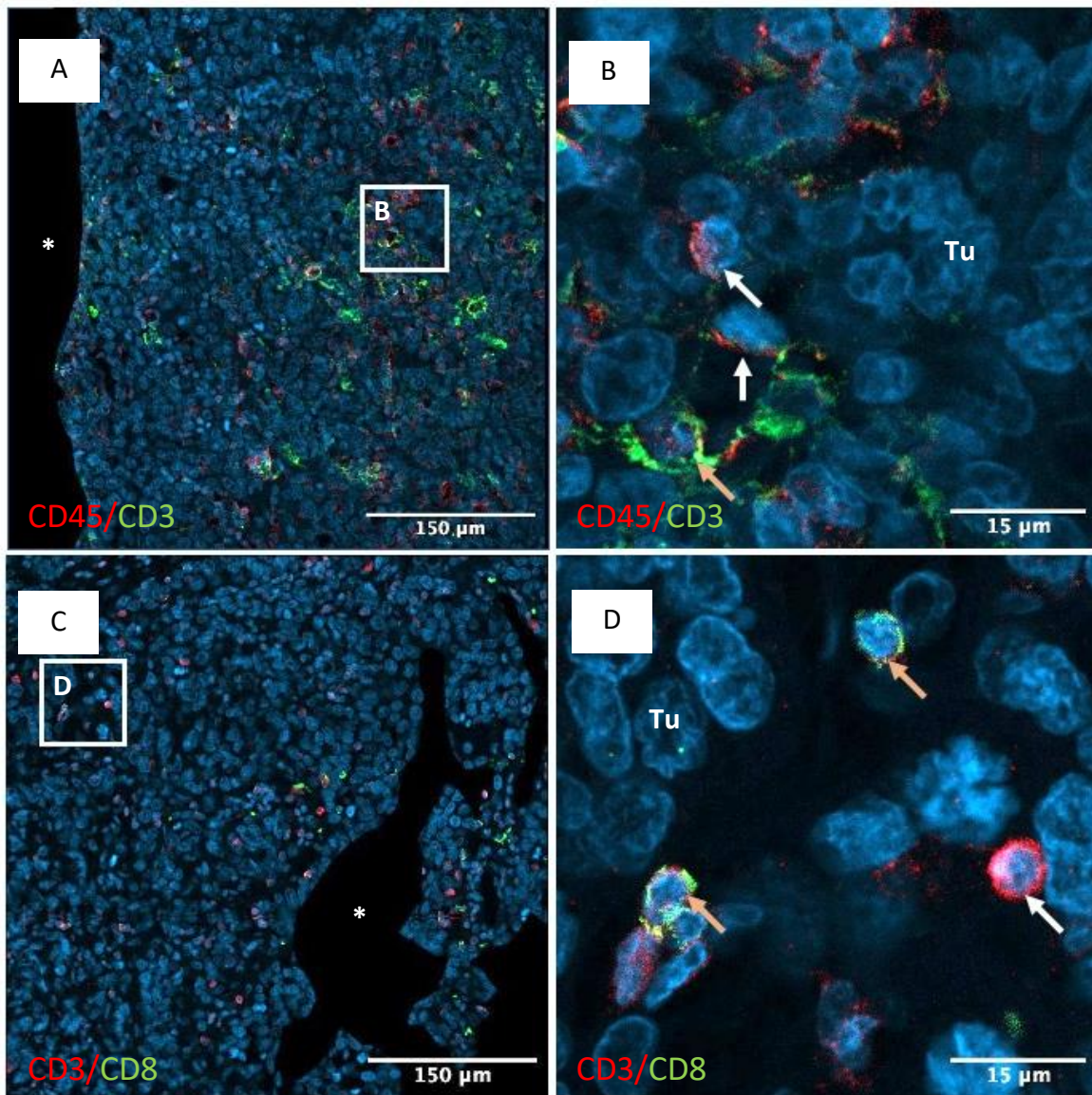
*Es wird die Gesamtzahl der Feldaufnahmen pro Immunzellmarkierung aufgelistet. Weiterhin wird gezeigt, wie sich die Anzahl der Feldaufnahmen auf die drei Rattengruppen (COG, LAG, SAG) und die definierten Bereiche des Harnblasenschnittes verteilen (Tumorzentrum, Tumorrand, tumorfreier Bereich, Lymphzellcluster). Zu jedem Bereich der Harnblasen der jeweiligen Rattengruppen gehören mehrere Areale, die sich aus der Gewebestruktur der Schnitte und durch mehrere Schnitte ergaben. Die Mittelwerte dieser Areale werden aus den zugehörigen Feldaufnahmen gebildet. Die Anzahl dieser in die Analyse eingehenden Mittelwerte ist dargestellt.*

Immunzellmarkierung	Felddaufnahmen gesamt	Felddaufnahmen pro Gruppe und Bereich	Mittelwerte je Areal
CD45/CD3	428	COG-Tumorzentrum: 74	23
		LAG-Tumorzentrum: 45	17
		SAG Tumorzentrum: 21	9
		COG-Tumorrand: 96	24
		LAG-Tumorrand: 51	17
		SAG-Tumorrand: 25	9
		COG-tumorfreier Bereich: 31	18
		LAG-tumorfreier Bereich: 28	14
		SAG-tumorfreier Bereich: 19	8
		COG-Lymphzellcluster: 15	-
		LAG-Lymphzellcluster: 16	-
SAG-Lymphzellcluster: 5	-		
CD3/CD8	435	COG-Tumorzentrum: 57	22
		LAG-Tumorzentrum: 38	17

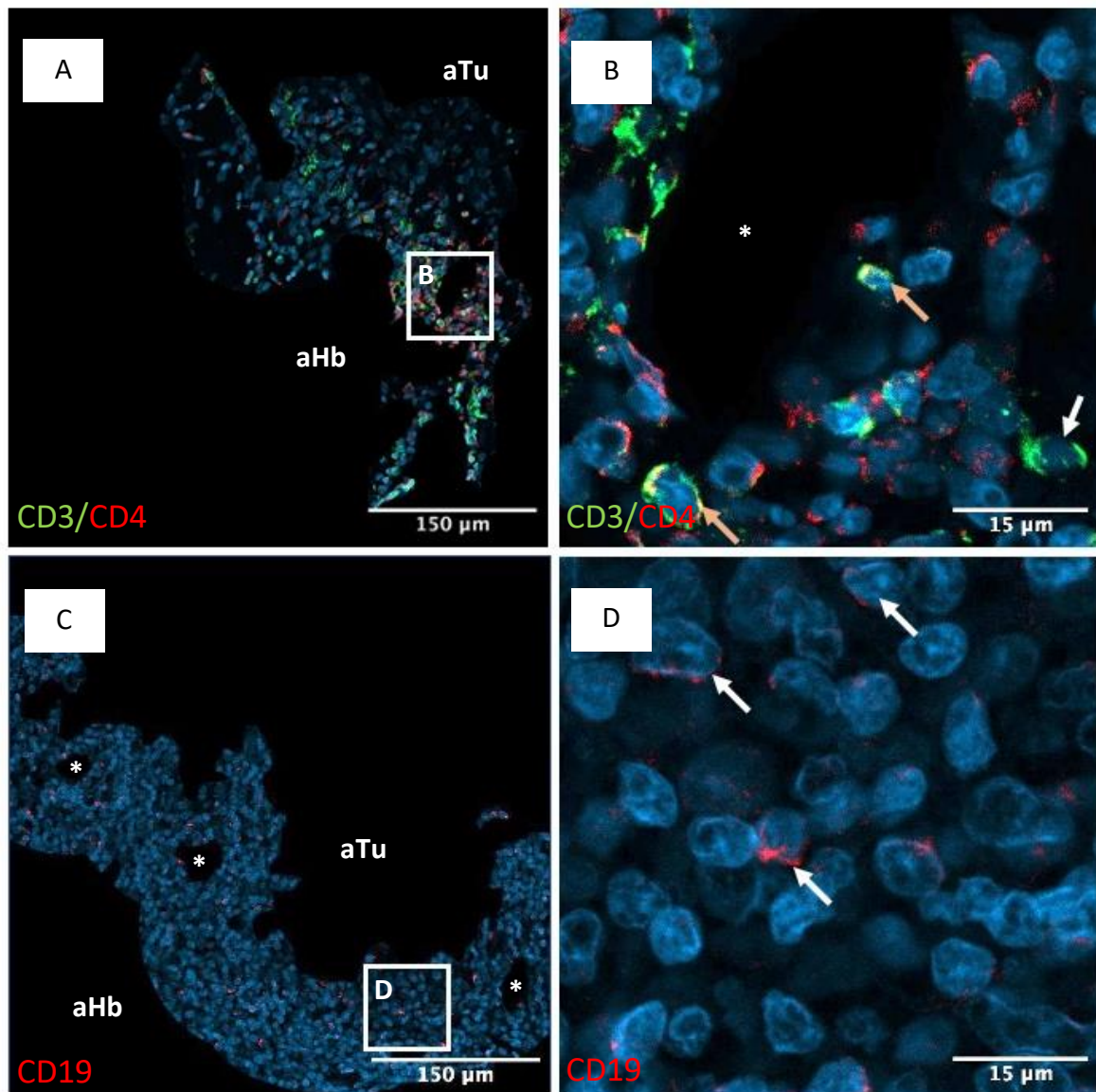
		SAG Tumorzentrum: 28	10
		COG-Tumorrand: 94	24
		LAG-Tumorrand: 50	17
		SAG-Tumorrand: 31	10
		COG-tumorfreier Bereich: 35	19
		LAG-tumorfreier Bereich: 28	14
		SAG-tumorfreier Bereich: 18	8
		COG-Lymphzellcluster: 15	-
		LAG-Lymphzellcluster: 17	-
		SAG-Lymphzellcluster: 5	-
CD3/CD4	434	COG-Tumorzentrum: 81	24
		LAG-Tumorzentrum: 38	15
		SAG Tumorzentrum: 25	10
		COG-Tumorrand: 96	24
		LAG-Tumorrand: 51	16
		SAG-Tumorrand: 29	10
		COG-tumorfreier Bereich: 36	18
		LAG-tumorfreier Bereich: 24	12
		SAG-tumorfreier Bereich: 17	8
		COG-Lymphzellcluster: 12	-
		LAG-Lymphzellcluster: 21	-
		SAG-Lymphzellcluster: 4	-
CD19	435	COG-Tumorzentrum: 79	24
		LAG-Tumorzentrum: 44	17
		SAG Tumorzentrum: 25	10
		COG-Tumorrand: 97	24
		LAG-Tumorrand: 50	17
		SAG-Tumorrand: 28	10
		COG-tumorfreier Bereich: 35	18
		LAG-tumorfreier Bereich: 28	14
		SAG-tumorfreier Bereich: 17	8
		COG-Lymphzellcluster: 10	-
		LAG-Lymphzellcluster: 18	-
		SAG-Lymphzellcluster: 3	-

### 5.3 Qualitative Auswertung

Die Markierung mit dem CD45-Rb-AK färbte die Zellmembran in der betrachteten Ebene partiell an. Unspezifische Bindungen bestanden in geringfügigerem Maße durch diffuse Färbung im Tumorstroma und Urothel. Der in zwei Antikörperkombinationen verwendete CD3-Ms-AK zeigte eine hohe Spezifität gegenüber der Zellmembran verbunden mit einer starken Fluoreszenz. Dies zeigten auch die Markierungen der Zellmembran durch den CD3-Rb- und den CD8-Ms-AK mit einer nahezu vollständigen Darstellung dieser. Der CD19-Rb-AK wies Markierungen nur von Teilen der Zellmembran auf. Weiterhin bestanden geringfügige diffuse unspezifische Bindungen im Tumorstroma und Urothel. Der CD4-Rb-AK stellte bei den Immunzellen und dem Endothel der Blutgefäße stark gefärbte Zellmembranen dar. Eine besonders starke Bindung zeigte sich zum Urothel. Weiterhin zeigten sich unspezifische Bindungen im Tumorstroma.

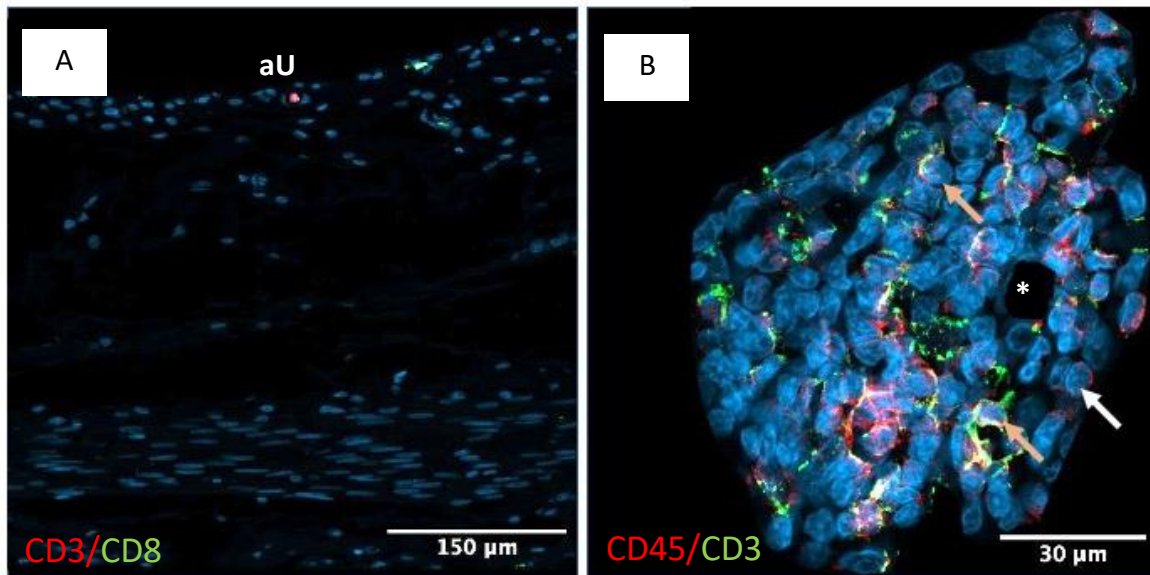


**Abb. 14: Immunfluoreszenz Doppelmarkierungen im Tumorzentrum.** (A) CD45 (rot) und CD3 (grün) im Tumorzentrum; zahlreiche CD45<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup> Lymphozyten sind zwischen den Tumorzellen (Tu) zu erkennen; die Zellkerne (blau) der Tumorzellen sind deutlich größer als die Zellkerne der Lymphozyten; in der Ausschnittsvergrößerung (B) wird deutlich, dass die Immunzellmarkierung meist dicht am Zellkern liegt, was die Identifizierung von positiven Zellen ermöglicht; die meisten Zellen zeigen Einfach- (weiße Pfeile) und Doppelmarkierungen (orangene Pfeile); (C) CD3 (rot) und CD8 (grün) im Tumorzentrum; vermehrt CD3<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Lymphozyten sind zwischen den Tumorzellen (Tu) zu erkennen; die Zellkerne (blau) der Tumorzellen sind deutlich größer als die Zellkerne der Lymphozyten; in der Ausschnittsvergrößerung (D) wird deutlich, dass die Immunzellmarkierung meist dicht am Zellkern liegt, was die Identifizierung von positiven Zellen ermöglicht; die meisten Zellen zeigen Einfach- (weiße Pfeile) und Doppelmarkierungen (orangene Pfeile). \* gemäß Protokoll ausgeschnittene gewebefreie Bildbereich



**Abb. 15: Immunfluoreszenz Doppelmarkierungen im Tumorrand.** (A) CD3 (grün) und CD4 (rot) im Tumorrand; zahlreiche CD3<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> Lymphozyten sind zu erkennen; es sind vor allem Zellkerne (blau) der Lymphozyten zu sehen; in der Ausschnittsvergrößerung (B) wird deutlich, dass die Immunzellmarkierung meist dicht am Zellkern liegt, was die Identifizierung von positiven Zellen ermöglicht; die meisten Zellen zeigen Einfach- (weiße Pfeile) und Doppelmarkierungen (orangene Pfeile); (C) CD19 (rot) im Tumorrand; CD19<sup>+</sup> Lymphozyten sind zu erkennen; es sind vor allem Zellkerne (blau) der Lymphozyten zu sehen; in der Ausschnittsvergrößerung (D) wird deutlich, dass die Immunzellmarkierung meist dicht am Zellkern liegt, was die Identifizierung von positiven Zellen ermöglicht; die positiven Zellen zeigen Einfachmarkierungen (weiße Pfeile). gemäß Protokoll ausgeschnittene Blutgefäße (\*) und ausgeschnittene Tumorseite (aTu) und ausgeschnittenes Harnblasengewebe der tumorfreien Seite (aHb)





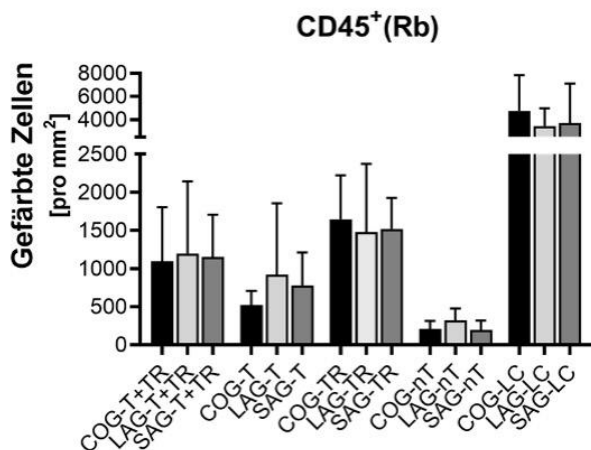
**Abb. 16: Immunfluoreszenz Doppelmarkierungen im verschiedenen Harnblasenbereichen. (A)** CD3 (rot) und CD8 (grün) im tumorfreien Bereich; vereinzelte CD3<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Lymphozyten sind zu erkennen; es sind vor allem Zellkerne (blau) der Fibroblasten und Muskulatur zu erkennen; **(B)** CD45 (rot) und CD3 (grün) in den Lymphzellcluster; zahlreiche CD45<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup> Lymphozyten sind zu erkennen; es sind vor allem Zellkerne (blau) der Lymphozyten zu erkennen; die Immunzellmarkierung sind meist dicht am Zellkern anliegend, was die Identifizierung von positiven Zellen ermöglicht; die meisten Zellen zeigen Einfach- (weiße Pfeile) und Doppelmarkierungen (orangene Pfeile). gemäß Protokoll ausgeschnittene Artefakte (\*) und ausgeschnittenes Urothel (aU)

## 5.4 Quantitative Auswertung

### 5.4.1 Vergleich der Immunzellichte in Abhängigkeit von der Behandlung

#### 5.4.1.1 CD45

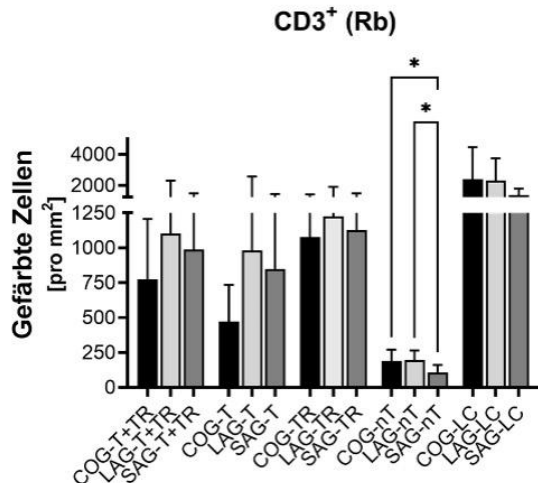
In den Einzelanalysen des CD45-Antigens zur Darstellung der gesamten Leukozytenpopulation zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der COG, LAG und SAG im gesamten Tumorbereich ( $p=0,7578$ ), im Tumorzentrum ( $p=0,3205$ ), Tumorrand ( $p=0,2472$ ), tumorfreien Bereich ( $p=0,0580$ ) und den Lymphzellclustern ( $p=0,1632$ ).



**Abb. 17: Einzelanalyse der Dichte der CD45<sup>+</sup> Zellen in den verschiedenen Arealen.** Es zeigen sich für keines der Areale signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (Areal: T+TR = gesamter Tumorbereich; T = Tumorzentrum; TR = Tumorrand; nT = tumorfreier Bereich; LC = Lymphzellcluster; Behandlungsgruppen: COG = Kontrollgruppe, LAG = lokale Applikationsgruppe, SAG = systemische Applikationsgruppe; Signifikanztestung: T+TR, T, TR, nT mit Kruskal-Wallis-Test, LC mit One-way-ANOVA; Signifikanzniveau:  $p \leq 0,05$ ). Darstellung: y-Achse mit gefärbten Zellen pro mm<sup>2</sup>, x-Achse mit Arealen und zugehörigen Behandlungsgruppen, Balkendiagramm, Mittelwert mit Standardabweichung.

#### 5.4.1.2 CD3

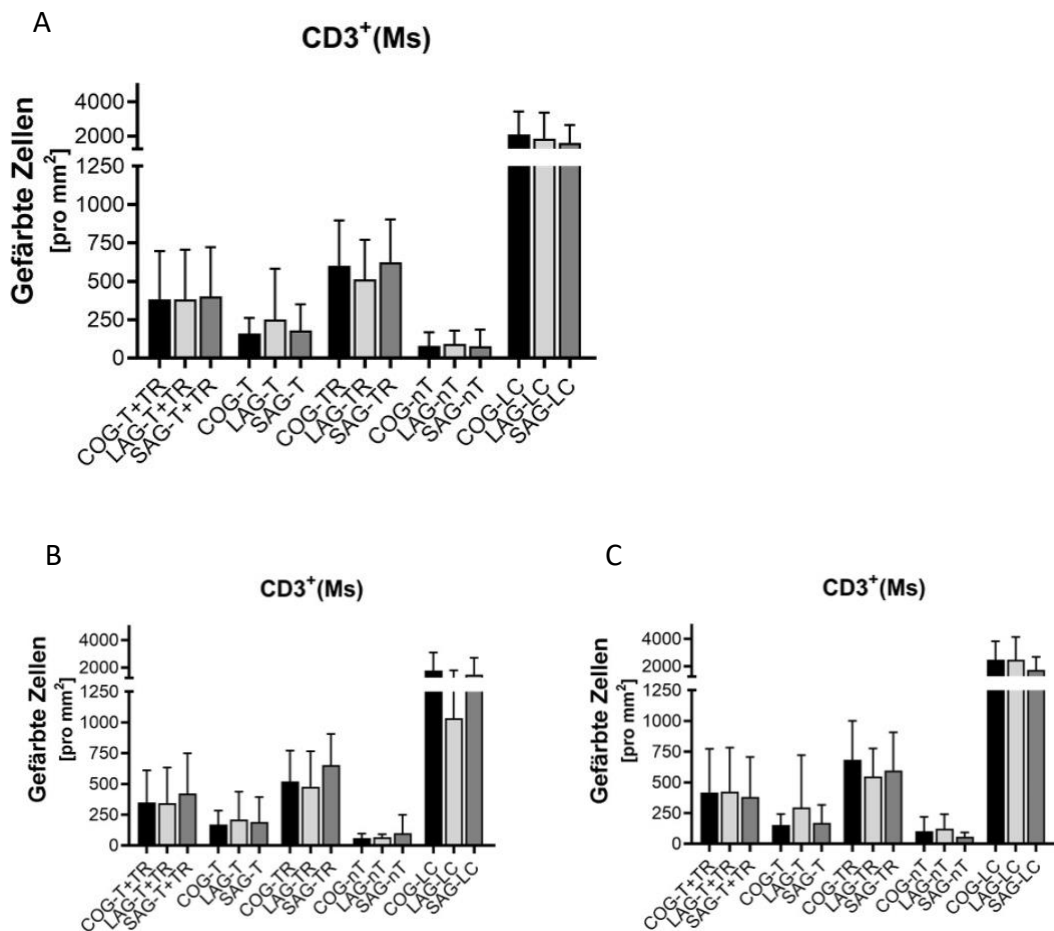
Die Analyse der CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten (Rb AK) zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen der COG, LAG und SAG im tumorfreien Bereich ( $p=0,0169$ ; One-way-ANOVA). Die Dichte der CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten war in der SAG gegenüber der COG und LAG signifikant reduziert ( $p_{SAG/COG}=0,0241$ ;  $p_{SAG/LAG}=0,0233$ ; Dunn's multiple comparisons). Im gesamten Tumorbereich ( $p=0,3127$ ), im Tumorzentrum ( $p=0,1682$ ), Tumorrand ( $p=0,9665$ ) und den Lymphzellclustern ( $p=0,4811$ ) bestanden keine signifikanten Unterschiede.



**Abb. 18: Einzelanalyse der Dichte der CD3<sup>+</sup> Zellen (Rb Ak) in den verschiedenen Arealen.** Es zeigen sich für den tumorfreien Bereich signifikante Ergebnisse (\* für  $0,01 < p \leq 0,05$ ). Für die weiteren Areale bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (Areal: T+TR = gesamter Tumorbereich; T = Tumorzentrum; TR = Tumorrand; nT = tumorfreier Bereich; LC = Lymphzellcluster; Behandlungsgruppen: COG = Kontrollgruppe, LAG = lokale Applikationsgruppe, SAG = systemische Applikationsgruppe; Signifikanztestung: T+TR, T, TR, LC mit Kruskal-Wallis-Test, nT mit One-way-ANOVA; Signifikanzniveau:  $p \leq 0,05$ ; Post-hoc-Testung mit Dunn's multiple comparisons). Darstellung: y-Achse mit gefärbten Zellen pro mm<sup>2</sup>, x-Achse mit Arealen und zugehörigen Behandlungsgruppen, Balkendiagramm, Mittelwert mit Standardabweichung.

In den Einzelanalysen des CD3-Antigens (Ms AK, gepoolt) zur Darstellung der T-Lymphozyten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der COG, LAG und SAG im gesamten Tumorbereich ( $p=0,9714$ ), im Tumorzentrum ( $p=0,6874$ ), Tumorrand ( $p=0,3191$ ), tumorfreien Bereich ( $p=0,1893$ ) und den Lymphzellclustern ( $p=0,5456$ ).

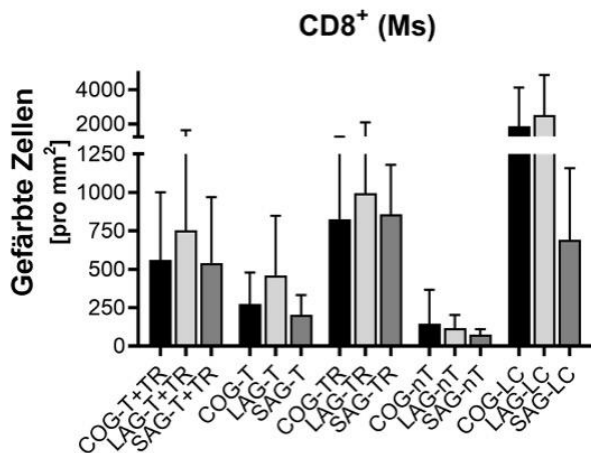
Beim Vergleich gleicher Markierungen in den zwei Färbezyklen des CD3-Ms-AK war nur der Unterschied im Lymphzellcluster der LAG signifikant ( $p=0,0002$ ; Mann-Whitney-Test). Die CD3-Markierung aus CD45/CD3 war gegenüber der CD3-Markierung aus CD3/CD4 reduziert. Die weiteren statistischen Analysen zeigten keine signifikanten Ergebnisse.



**Abb. 19: Einzelanalyse der Dichte der CD3<sup>+</sup> Zellen (Ms Ak) in den verschiedenen Arealen.** Es zeigen sich für keines der Arealen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (Areal: T+TR = gesamter Tumorbereich; T = Tumorzentrum; TR = Tumorrand; nT = tumorfreier Bereich; LC = Lymphzellcluster; Behandlungsgruppen: COG = Kontrollgruppe, LAG = lokale Applikationsgruppe, SAG = systemische Applikationsgruppe; Signifikanztestung: T+TR, T, TR, nT, LC mit Kruskal-Wallis-Test, TR aus (C) mit One-way-ANOVA; Signifikanzniveau:  $p \leq 0,05$ ). Darstellung: y-Achse mit gefärbten Zellen pro mm<sup>2</sup>, x-Achse mit Arealen und zugehörigen Behandlungsgruppen, Balkendiagramm, Mittelwert mit Standardabweichung. (A) gepoolt aus (B) und (C); (B) CD3<sup>+</sup>-Einzelanalyse aus der CD3<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>-Doppelmarkierung; (C) CD3<sup>+</sup>-Einzelanalyse aus der CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-Doppelmarkierung

### 5.4.1.3 CD8

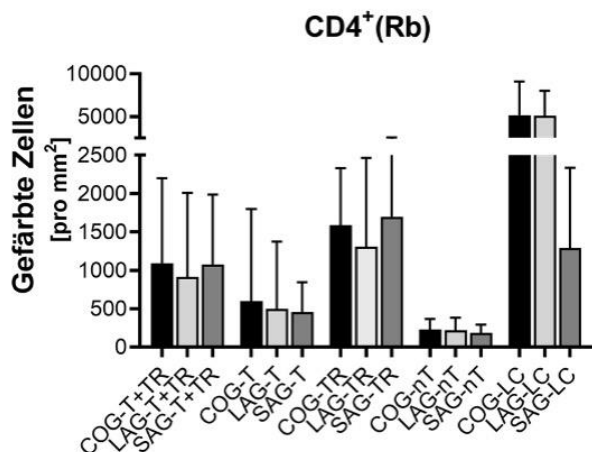
In den Einzelanalysen des CD8-Antigens zur Darstellung der T-Killerzellen (CTL) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der COG, LAG und SAG im gesamten Tumorbereich ( $p=0,5124$ ), im Tumorzentrum ( $p=0,1526$ ), Tumorrand ( $p=0,8796$ ), tumorfreien Bereich ( $p=0,6021$ ) und den Lymphzellclustern ( $p=0,1788$ ).



**Abb. 20: Einzelanalyse der Dichte der CD8<sup>+</sup> Zellen in den verschiedenen Arealen.** Es zeigen sich für keines der Arealen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (Areal: T+TR = gesamter Tumorbereich; T = Tumorzentrum; TR = Tumorrand; nT = tumorfreier Bereich; LC = Lymphzellcluster; Behandlungsgruppen: COG = Kontrollgruppe, LAG = lokale Applikationsgruppe, SAG = systemische Applikationsgruppe; Signifikanztestung: T+TR, T, TR, nT, LC mit Kruskal-Wallis-Test; Signifikanzniveau:  $p \leq 0,05$ ). Darstellung: y-Achse mit gefärbten Zellen pro mm<sup>2</sup>, x-Achse mit Arealen und zugehörigen Behandlungsgruppen, Balkendiagramm, Mittelwert mit Standardabweichung.

### 5.4.1.4 CD4

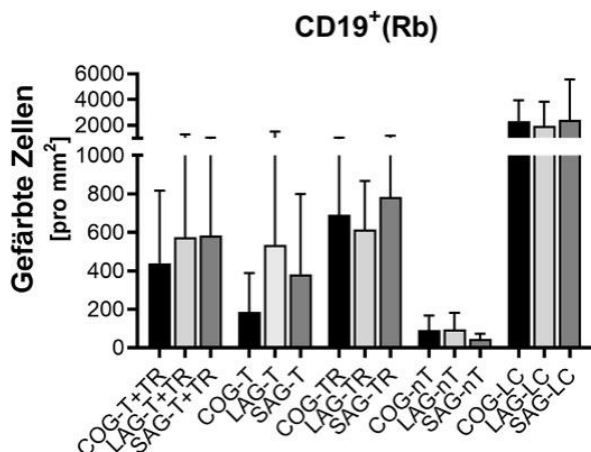
Die Analyse der CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen (TH) zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen der COG, LAG und SAG im gesamten Tumorbereich ( $p=0,6253$ ), im Tumorzentrum ( $p=0,7275$ ), Tumorrand ( $p=0,0968$ ), tumorfreien Bereich ( $p=0,7194$ ) und den Lymphzellclustern ( $p=0,0892$ ).



**Abb. 21: Einzelanalyse der Dichte der CD4<sup>+</sup> Zellen in den verschiedenen Arealen.** Es zeigen sich für keines der Arealen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (Areal: T+TR = gesamter Tumorbereich; T = Tumorzentrum; TR = Tumorrang; nT = tumorfreier Bereich; LC = Lymphzellcluster; Behandlungsgruppen: COG = Kontrollgruppe, LAG = lokale Applikationsgruppe, SAG = systemische Applikationsgruppe; Signifikanztestung: T+TR, T, TR mit Kruskal-Wallis-Test, nT, LC mit One-way-ANOVA; Signifikanzniveau:  $p \leq 0,05$ ). Darstellung: y-Achse mit gefärbten Zellen pro mm<sup>2</sup>, x-Achse mit Arealen und zugehörigen Behandlungsgruppen, Balkendiagramm, Mittelwert mit Standardabweichung.

#### 5.4.1.5 CD19

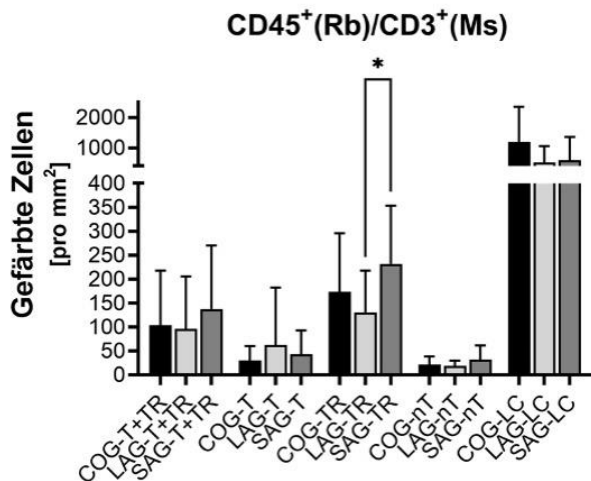
In den Einzelmarkierungen des CD19-Antigens zur Darstellung der B-Lymphozyten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der COG, LAG und SAG im gesamten Tumorbereich ( $p=0,3849$ ), im Tumorzentrum ( $p=0,1646$ ), Tumorrang ( $p=0,4363$ ), tumorfreien Bereich ( $p=0,1176$ ) und den Lymphzellclustern ( $p=0,6720$ ).



**Abb. 22: Einzelanalyse der Dichte der CD19<sup>+</sup> Zellen in den verschiedenen Arealen.** Es zeigen sich für keines der Areale signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (Areal: T+TR = gesamter Tumorbereich; T = Tumorzentrum; TR = Tumorrand; nT = tumorfreier Bereich; LC = Lymphzellcluster; Behandlungsgruppen: COG = Kontrollgruppe, LAG = lokale Applikationsgruppe, SAG = systemische Applikationsgruppe; Signifikanztestung: T+TR, T, nT, LC mit Kruskal-Wallis-Test, TR mit One-way-ANOVA; Signifikanzniveau:  $p \leq 0,05$ ). Darstellung: y-Achse mit gefärbten Zellen pro  $\text{mm}^2$ , x-Achse mit Arealen und zugehörigen Behandlungsgruppen, Balkendiagramm, Mittelwert mit Standardabweichung.

#### 5.4.1.6 CD45/CD3

In den CD45/CD3-Doppelmarkierungen der T-Lymphozyten zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der COG, LAG und SAG im Tumorrand ( $p=0,0347$ ; Kruskal-Wallis-Test). Die Dichte der CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten war in der LAG gegenüber der SAG signifikant reduziert ( $p_{\text{LAG/SAG}}=0,0301$ ; Dunn's multiple comparisons). Im gesamten Tumorbereich ( $p=0,4662$ ), im Tumorzentrum ( $p=0,4894$ ), im tumorfreien Bereich ( $p=0,1176$ ) und den Lymphzellclustern ( $p=0,1632$ ) bestanden keine signifikanten Unterschiede.

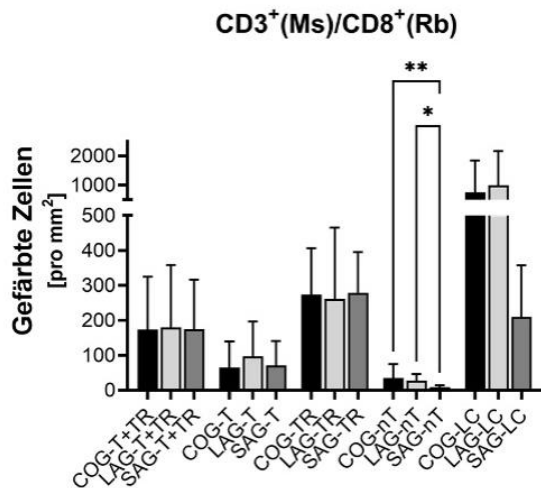


**Abb. 23: Analyse der Dichte der CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> Zellen in den verschiedenen Arealen.** Es zeigte sich für den Tumorrandbereich ein signifikantes Ergebnis (\* für 0,01<p≤0,05). Für die weiteren Areale bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (Areal: T+TR = gesamter Tumorbereich; T = Tumorzentrum; TR = Tumorrand; nT = tumorfreier Bereich; LC = Lymphzellcluster; Behandlungsgruppen: COG = Kontrollgruppe, LAG = lokale Applikationsgruppe, SAG = systemische Applikationsgruppe; Signifikanztestung: T+TR, T, TR, nT, LC mit Kruskal-Wallis-Test; Signifikanzniveau: p≤0,05; Post-hoc-Testung mit Dunn's multiple comparisons). Darstellung: y-Achse mit gefärbten Zellen pro mm<sup>2</sup>, x-Achse mit Arealen und zugehörigen Behandlungsgruppen, Balkendiagramm, Mittelwert mit Standardabweichung.

#### 5.4.1.7 CD3/CD8

In den CD3/CD8-Doppelmarkierungen der CTLs zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der COG, LAG und SAG im tumorfreien Bereich (p=0,0040, Kruskal-Wallis-Test). Die Dichte der CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-CTLs war in der SAG gegenüber der COG und LAG signifikant reduziert (p<sub>SAG/COG</sub>=0,0053; p<sub>SAG/LAG</sub>=0,0102; Dunn's multiple comparisons). Im gesamten Tumorbereich (p=0,8821), im Tumorzentrum (p=0,6466), im Tumorrand (p=0,9528) und den Lymphzellclustern (p=0,1468) bestanden keine signifikanten Unterschiede.

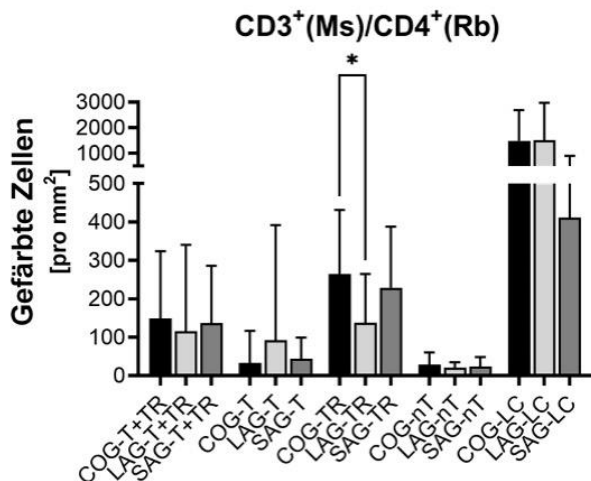




**Abb. 24: Analyse der Dichte der CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Zellen in den verschiedenen Arealen.** Es zeigen sich für den tumorfreien Bereich signifikante Ergebnisse (\* für  $0,01 < p \leq 0,05$ , \*\* für  $0,001 < p \leq 0,01$ ). Für die weiteren Arealen bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (Areal: T+TR = gesamter Tumorbereich; T = Tumorzentrum; TR = Tumorrand; nT = tumorfreier Bereich; LC = Lymphzellcluster; Behandlungsgruppen: COG = Kontrollgruppe, LAG = lokale Applikationsgruppe, SAG = systemische Applikationsgruppe; Signifikanztestung: T+TR, T, nT, LC mit Kruskal-Wallis-Test, TR mit One-way-ANOVA; Signifikanzniveau:  $p \leq 0,05$ ; Post-hoc-Testung mit Dunn's multiple comparisons). Darstellung: y-Achse mit gefärbten Zellen pro mm<sup>2</sup>, x-Achse mit Arealen und zugehörigen Behandlungsgruppen, Balkendiagramm, Mittelwert mit Standardabweichung.

#### 5.4.1.8 CD3/CD4

In den CD3/CD4-Doppelmarkierungen der THs zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der COG, LAG und SAG im Tumorrand ( $p=0,0450$ ; One-way-ANOVA). Die Dichte der CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-THs war in der LAG gegenüber der COG signifikant reduziert ( $p_{LAG/COG}=0,0359$ ; Dunn's multiple comparisons). Im gesamten Tumorbereich ( $p=0,4323$ ), im Tumorzentrum ( $p=0,2404$ ), tumorfreien Bereich ( $p=0,9691$ ) und den Lymphzellclustern ( $p=0,1182$ ) bestanden keine signifikanten Unterschiede.



**Abb. 25: Analyse der Dichte der CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Zellen in den verschiedenen Arealen.** Es zeigt sich für den Tumorrandbereich ein signifikantes Ergebnis (\* für 0,01<p≤0,05). Für die weiteren Areale bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (Areal: T+TR = gesamter Tumorbereich; T = Tumorzentrum; TR = Tumorrand; nT = tumorfreier Bereich; LC = Lymphzellcluster; Behandlungsgruppen: COG = Kontrollgruppe, LAG = lokale Applikationsgruppe, SAG = systemische Applikationsgruppe; Signifikanztestung: T+TR, T, nT, LC mit Kruskal-Wallis-Test, TR mit One-way-ANOVA; Signifikanzniveau: p≤0,05; Post-hoc-Testung mit Dunn's multiple comparisons). Darstellung: y-Achse mit gefärbten Zellen pro mm<sup>2</sup>, x-Achse mit Arealen und zugehörigen Behandlungsgruppen, Balkendiagramm, Mittelwert mit Standardabweichung.

#### 5.4.1.9 Deskriptive und analytische Daten der Statistik

Die deskriptiven und analytischen Daten der Statistik zum Vergleich der Immunzellendichte je Antikörpermarkierung und Harnblasenbereich sind in Tabelle 14 aufgelistet. Die Daten zur sich bei signifikanten Unterschieden anschließenden Post-hoc-Analyse finden sich gesondert in Tabelle 15. Die Tabelle 16 fasst die deskriptiven und analytischen Daten zum Vergleich der CD3-Ms-AK-Markierungen der CD45/CD3- und CD3/CD4-Doppelmarkierungen zusammen.

**Tabelle 14: Daten der statistischen Analyse zum Vergleich der Immunzellendichte**

Markierung & Bereich	Gruppe	Anzahl der analysierten Werte	Mittelwert (Zellen/mm <sup>2</sup> )	Standardabweichung	Statistischer Test	p-Wert
CD45(Rb-AK) T+TR	LAG	34	1199	945,6	Kruskal-Wallis	0,7578
	SAG	18	1151	556,2		
	COG	47	1094	711,3		
CD45(Rb-AK) T	LAG	17	919,4	937	Kruskal-Wallis	0,3205
	SAG	9	781,6	428,7		
	COG	23	519,7	187,2		
CD45 (Rb-AK) TR	LAG	17	1479	894,6	Kruskal-Wallis	0,2472
	SAG	9	1521	407,4		
	COG	24	1645	576		

CD45 (Rb-AK) nT	LAG	14	318,5	157,4	Kruskal-Wallis	0,0580
	SAG	8	195,7	122,2		
	COG	18	207,8	105,3		
CD45 (Rb-AK) LC	LAG	16	3460	1522	ANOVA	0,1632
	SAG	5	3697	3410		
	COG	15	4743	3084		
CD3 (Rb-AK) T+TR	LAG	34	1103	1219	Kruskal-Wallis	0,3127
	SAG	20	987,5	510,3		
	COG	48	774,2	432,1		
CD3 (Rb-AK) T	LAG	17	981,6	1600	Kruskal-Wallis	0,1682
	SAG	10	848,2	611,4		
	COG	24	472,3	263,2		
CD3 (Rb-AK) TR	LAG	17	1224	690,4	Kruskal-Wallis	0,9665
	SAG	10	1127	364,4		
	COG	24	1076	349,4		
CD3 (Rb-AK) nT	LAG	14	194,4	69,69	ANOVA	<b>0,0169</b>
	SAG	8	106,1	53,65		
	COG	19	189,7	79,68		
CD3 (Rb-AK) LC	LAG	17	2311	1435	Kruskal-Wallis	0,4811
	SAG	5	1393	405,8		
	COG	15	2403	2064		
CD3 (Ms-AK) von CD45/CD3 T+TR	LAG	34	344,5	288,8	Kruskal-Wallis	0,7124
	SAG	18	421,4	327,2		
	COG	47	348	262,3		
CD3 (Ms-AK) von CD45/CD3 T	LAG	17	209,9	227,2	Kruskal-Wallis	0,9632
	SAG	9	188,9	203,9		
	COG	23	169	113		
CD3 (Ms-AK) von CD45/CD3 TR	LAG	17	479,1	286,2	Kruskal-Wallis	0,1750
	SAG	9	653,8	253,7		
	COG	24	519,6	250,2		
CD3 (Ms-AK) von CD45/CD3 nT	LAG	14	65,76	24,89	Kruskal-Wallis	0,4080
	SAG	8	98,27	150,2		
	COG	18	57,86	37,81		
CD3 (Ms-AK) von CD45/CD3 LC	LAG	16	1034	758,7	Kruskal-Wallis	0,1990
	SAG	5	1493	1218		
	COG	15	1777	1319		
CD3 (Ms-AK) von CD3/CD4 T+TR	LAG	31	425,5	357	Kruskal-Wallis	0,9406
	SAG	20	383,4	322,8		
	COG	48	417,9	355		
CD3 (Ms-AK) von CD3/CD4 T	LAG	15	294,9	426	Kruskal-Wallis	0,6317
	SAG	10	169,5	146,2		
	COG	24	151,1	90,76		
CD3 (Ms-AK) von CD3/CD4 TR	LAG	16	548	228,9	ANOVA	0,3377
	SAG	10	597,3	311,4		
	COG	24	684,7	317,4		

CD3 (Ms-AK) von CD3/CD4 nT	LAG	12	122,6	118	Kruskal-Wallis	0,2163
	SAG	8	57,08	34,95		
	COG	18	102,1	116,6		
CD3 (Ms-AK) von CD3/CD4 LC	LAG	21	2470	1672	Kruskal-Wallis	0,6385
	SAG	4	1730	945,8		
	COG	12	2476	1342		
CD3 (Ms-AK) gepoolt T+TR	LAG	65	383,1	323,1	Kruskal-Wallis	0,9714
	SAG	38	401,4	321		
	COG	95	383,3	312,9		
CD3 (Ms-AK) gepoolt T	LAG	32	249,7	332,3	Kruskal-Wallis	0,6874
	SAG	19	178,7	171		
	COG	47	159,8	101,5		
CD3 (Ms-AK) gepoolt TR	LAG	33	512,5	258,3	Kruskal-Wallis	0,3191
	SAG	19	624,1	279,1		
	COG	48	602,1	294,8		
CD3 (Ms-AK) gepoolt nT	LAG	26	92,01	85,37	Kruskal-Wallis	0,1893
	SAG	16	77,68	107,5		
	COG	36	79,96	88,34		
CD3 (Ms-AK) gepoolt LC	LAG	37	1849	1521	Kruskal-Wallis	0,5456
	SAG	9	1599	1045		
	COG	27	2088	1350		
CD8 (Ms-AK) T+TR	LAG	32	754	875,6	Kruskal-Wallis	0,5124
	SAG	18	540,9	429,3		
	COG	44	560,8	441,1		
CD8 (Ms-AK) T	LAG	17	461	386,7	Kruskal-Wallis	0,1526
	SAG	10	203,4	127,5		
	COG	22	273,6	204,5		
CD8 (Ms-AK) TR	LAG	17	996,2	1098	Kruskal-Wallis	0,8796
	SAG	10	856,6	323,9		
	COG	24	825,4	434,1		
CD8 (Ms-AK) nT	LAG	14	118	84,2	Kruskal-Wallis	0,6021
	SAG	8	73,94	35,6		
	COG	19	143,4	223,2		
CD8 (Ms-AK) LC	LAG	17	2515	2347	Kruskal-Wallis	0,1788
	SAG	5	691,2	467		
	COG	15	1867	2260		
CD4 (Rb-AK) T+TR	LAG	31	913,4	1096	Kruskal-Wallis	0,6253
	SAG	20	1077	911,1		
	COG	48	1093	1107		
CD4 (Rb-AK) T	LAG	15	495,3	878,1	Kruskal-Wallis	0,7275
	SAG	10	457,7	386,2		
	COG	24	597,8	1201		
CD4 (Rb-AK) TR	LAG	16	1305	1159	Kruskal-Wallis	0,0968
	SAG	10	1696	866,6		
	COG	24	1587	742,1		

CD4 (Rb-AK) nT	LAG	12	219,7	160,2	ANOVA	0,7194
	SAG	8	182,2	109,3		
	COG	18	230,3	136,4		
CD4 (Rb-AK) LC	LAG	21	5089	2902	ANOVA	0,0892
	SAG	4	1291	1043		
	COG	12	5151	3924		
CD19 (Rb-AK) T+TR	LAG	34	575,4	701,3	Kruskal-Wallis	0,3849
	SAG	20	583,3	450,4		
	COG	48	439,6	377,7		
CD19 (Rb-AK) T	LAG	24	535,8	973,3	Kruskal-Wallis	0,1646
	SAG	17	382,6	416,3		
	COG	10	186,5	202,7		
CD19 (Rb-AK) TR	LAG	17	615	252,3	ANOVA	0,4363
	SAG	10	784	406,7		
	COG	24	692,8	341,7		
CD19 (Rb-AK) nT	LAG	14	96,25	85,74	Kruskal-Wallis	0,1176
	SAG	8	45,43	27,3		
	COG	18	92,42	74,72		
CD19 (Rb-AK) LC	LAG	18	1944	1887	Kruskal-Wallis	0,6720
	SAG	3	2421	3137		
	COG	10	2321	1629		
CD45 (Rb-AK) / CD3 (Ms-AK) T+TR	LAG	34	96,24	109,3	Kruskal-Wallis	0,4662
	SAG	18	137,7	132,3		
	COG	47	103,3	114,8		
CD45 (Rb-AK) / CD3 (Ms-AK) T	LAG	17	62,08	120,3	Kruskal-Wallis	0,4894
	SAG	9	43,32	49,42		
	COG	23	29,93	30,33		
CD45 (Rb-AK) / CD3 (Ms-AK) TR	LAG	17	130,4	87,6	Kruskal-Wallis	<b>0,0347</b>
	SAG	9	232,1	121,3		
	COG	24	173,7	122,1		
CD45 (Rb-AK) / CD3 (Ms-AK) nT	LAG	14	18,94	10,52	Kruskal-Wallis	0,4232
	SAG	8	31,9	29,66		
	COG	18	21	17,36		
CD45 (Rb-AK) / CD3 (Ms-AK) LC	LAG	16	517,9	537,5	Kruskal-Wallis	0,1632
	SAG	5	594,3	764,4		
	COG	15	1192	1153		
CD3 (Rb-AK) / CD8 (Ms-AK) T+TR	LAG	34	179,3	178,8	Kruskal-Wallis	0,8821
	SAG	20	175	141,7		
	COG	46	174	150,5		
CD3 (Rb-AK) / CD8 (Ms-AK) T	LAG	17	97,47	99,48	Kruskal-Wallis	0,6466
	SAG	10	71,13	69,67		
	COG	22	65,25	74,11		
CD3 (Rb-AK) / CD8 (Ms-AK) TR	LAG	17	261,2	204,5	ANOVA	0,9528
	SAG	10	278,9	116,3		
	COG	24	273,7	132,7		

CD3 (Rb-AK) / CD8 (Ms-AK) nT	LAG	14	27,93	18,82	Kruskal-Wallis	<b>0,0040</b>
	SAG	8	8,801	5,534		
	COG	19	34,39	40,44		
CD3 (Rb-AK) / CD8 (Ms-AK) LC	LAG	17	994,4	1179	Kruskal-Wallis	0,1468
	SAG	5	209,9	147,3		
	COG	15	748,7	1097		
CD3 (Ms-AK) / CD4 (Rb-AK) T+TR	LAG	31	115,6	224,8	Kruskal-Wallis	0,4323
	SAG	20	136	149,7		
	COG	48	148,7	175,2		
CD3 (Ms-AK) / CD4 (Rb-AK) T	LAG	15	92,02	300	Kruskal-Wallis	0,2404
	SAG	10	43,43	55,42		
	COG	24	32,89	83,60		
CD3 (Ms-AK) / CD4 (Rb-AK) TR	LAG	16	137,8	126,5	ANOVA	<b>0,0450</b>
	SAG	10	228,6	158,7		
	COG	24	264,5	166,6		
CD3 (Ms-AK) / CD4 (Rb-AK) nT	LAG	12	20,22	14,25	Kruskal-Wallis	0,9691
	SAG	8	23,72	24,2		
	COG	18	28,93	30,94		
CD3 (Ms-AK) / CD4 (Rb-AK) LC	LAG	21	1513	1460	Kruskal-Wallis	0,1182
	SAG	4	411,7	492,4		
	COG	12	1493	1196		

Tabelle 15: Daten der post-Hoc-Analyse zum Vergleich der Immunzellichte

Markierung & Bereich	Vergleichsgruppen	Post-hoc-Analyse	p-Wert
CD3 (Rb-AK) / nT	LAG vs. COG	Dunn's multiple comparisons	0,9809
	SAG vs. COG		<b>0,0241</b>
	LAG vs. SAG		<b>0,0233</b>
CD45 (Rb-AK) / CD3 (Ms-AK) TR	LAG vs. COG	Dunn's multiple comparisons	0,4527
	SAG vs. COG		0,3632
	LAG vs. SAG		<b>0,0301</b>
CD3 (Rb-AK) / CD8 (Ms-AK) nT	LAG vs. COG	Dunn's multiple comparisons	>0,9999
	SAG vs. COG		<b>0,0053</b>
	LAG vs. SAG		<b>0,0102</b>
CD3 (Ms-AK) / CD4 (Rb-AK) TR	LAG vs. COG	Dunn's multiple comparisons	<b>0,0359</b>
	SAG vs. COG		0,8090
	LAG vs. SAG		0,3145

Tabelle 16: Daten der statistischen Analyse zum Vergleich der CD3-Ms-AK-Markierungen

Gruppe & Bereich	Markierung	Anzahl der analysierten Werte	Mittelwert (Zellen/mm <sup>2</sup> )	Standardabweichung	Statistischer Test	p-Wert
COG T+TR	CD45/CD3	47	348	262,3	Mann-Whitney	0,5607
	CD3/CD4	48	417,9	355		

LAG T+TR	CD45/CD3	34	344,5	288,8	Mann-Whitney	0,3638
	CD3/CD4	31	425,5	357		
SAG T+TR	CD45/CD3	18	421,4	327,2	Mann-Whitney	0,8285
	CD3/CD4	20	383,4	322,8		
COG T	CD45/CD3	23	168	113	Mann-Whitney	0,8744
	CD3/CD4	24	151,1	90,76		
LAG T	CD45/CD3	17	209,9	227,2	Mann-Whitney	0,6018
	CD3/CD4	15	294,9	426		
SAG T	CD45/CD3	9	188,9	203,9	Mann-Whitney	>0,9999
	CD3/CD4	10	169,5	146,2		
COG TR	CD45/CD3	24	519,6	250,2	Mann-Whitney	0,0507
	CD3/CD4	24	684,7	317,4		
LAG TR	CD45/CD3	17	479,1	286,2	Mann-Whitney	0,2604
	CD3/CD4	16	548	228,9		
SAG TR	CD45/CD3	9	653,8	253,7	T-Test	0,6722
	CD3/CD4	10	597,3	311,4		
COG nT	CD45/CD3	18	57,86	37,81	Mann-Whitney	0,2788
	CD3/CD4	18	102,1	116,6		
LAG nT	CD45/CD3	14	65,76	24,89	Mann-Whitney	0,2972
	CD3/CD4	12	122,6	118		
SAG nT	CD45/CD3	8	98,27	150,2	Mann-Whitney	0,8785
	CD3/CD4	8	57,08	34,95		
COG LC	CD45/CD3	15	1777	1319	Mann-Whitney	0,1257
	CD3/CD4	12	2476	1342		
LAG LC	CD45/CD3	16	1034	758,7	Mann-Whitney	<b>0,0002</b>
	CD3/CD4	21	2470	1672		
SAG LC	CD45/CD3	5	1493	1218	Mann-Whitney	0,7591
	CD3/CD4	4	1730	945,8		

#### *5.4.1.10 Zusammenfassung des Vergleichs der Immunzellichten*

Zusammenfassend ergaben sich in den drei experimentellen Gruppen (LAG = lokale Applikation von THPTS; SAG = systemische i.v. Applikation und COG = Kontrollgruppe ohne Applikation) keine auffälligen, signifikanten Unterschiede in der Dichte der Lymphozytenpopulationen hinsichtlich der Einzelanalyse der CD45<sup>+</sup> Gesamtleukozyten, T-Zellpopulationen (CD8<sup>+</sup> CTL, bzw. CD4<sup>+</sup> TH) und der CD19<sup>+</sup> B-Lymphozyten. Es zeigte sich tendenziell eine erhöhte Anzahl von T-Zellen (CD3<sup>+</sup>) und CTL (CD8<sup>+</sup>) im Tumorzentrum insbesondere in der LAG gegenüber der COG (Abb. 18, 19, 20). Auch die B-Lymphozyten fielen durch eine höhere Dichte bei der LAG im Tumorzentrum auf (Abb. 22), während die Einzelanalyse der THs lediglich eine tendenzielle Reduktion der SAG in den Lymphzellclustern aufwies (Abb. 21). Die SAG zeigte weiterhin bei den T-Zellen (CD3<sup>+</sup>, Rb AK) eine signifikante Reduktion im tumorfreien Bereich (Abb. 18). Zusätzlich bestanden geringere Immunzellichten bei den Lymphzellclustern und im tumorfreien Bereich von T-Zellen (CD3<sup>+</sup>, Rb AK) und CTLs (CD8<sup>+</sup>) (Abb. 18, 20).

Interessanterweise waren CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> CTL in den tumorfreien Bereichen in der SAG gegenüber LAG und COG signifikant vermindert (Abb. 24). CD45<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> Lymphozyten zeigten eine signifikante Reduktion im TR in der LAG (Abb. 23), was sich wahrscheinlich auf TH zurückführen lässt, da die CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Zellen ebenfalls signifikant reduziert waren (Abb. 25).



## 6 Diskussion

In diesem Abschnitt soll zunächst die Validität der Arbeit durch die Diskussion der Antikörperauswahl und die Zusammensetzung des Datensatzes belegt werden. Danach werden die Ergebnisse in den Kontext immunmodulatorischer Effekte anderer PDTs gestellt sowie der Einfluss von Immunzellen auf die Prognose des Harnblasenkarzinoms diskutiert. Abschließend werden aussichtsreiche Kombinationstherapien vorgestellt, die notwendig sind, um deutlichere Ergebnisse zu erreichen. Zusätzlich soll ein kurzer Überblick zu den Schwierigkeiten im Verlauf der Arbeit dargestellt werden.

### 6.1 Methodendiskussion

#### 6.1.1 Auswahl der Antikörper

Die Auswahl der Antikörper orientierte sich an der Vorarbeit der Projektgruppe von Stenglein et al. in der 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Färbung [83]. Die Etablierung der AKs in der Immunfluoreszenz wies folgende Vorteile auf: Einerseits war eine bessere Beurteilung der Spezifität der Antikörper durch die höhere Auflösung möglich. Andererseits konnten einige Immunzelltypen durch Doppelmarkierungen mit höherer Sicherheit identifiziert werden.

Ziel dieser Arbeit war die umfassende Darstellung der adaptiven Immunantwort als zentralen Wirkpfeiler der Anti-Tumor-Immunität [35]. Dazu wurden die zugehörigen Zelltypen durch anerkannte CDs identifiziert: die T-Zellen durch CD3 bzw. CD45/CD3, deren Subtypen von THs durch CD4 bzw. CD3/CD4, CTLs durch CD8 bzw. CD3/CD8 und die B-Zellen durch CD19 [96, 102, 103]. Die zugehörige Subtypenklassifizierung der THs sollte durch etablierte Transkriptionsfaktoren kenntlich gemacht werden, da differenzierte Schlüsse hinsichtlich der TH-Wirkung erst durch Analyse dieser gezogen werden können [44, 104, 105]. Die T-Helferzellen Subtyp 1 sollten durch die Transkriptionsfaktoren T-Bet-, die TH2 durch Gata-3- und die Treg durch FOXP-3-Marker markiert werden [106]. Ob diese im Rattenmodell wie bei humanen THs zu charakterisieren sind, wurde in der Literatur geprüft [107–109]. Trotzdem war eine Etablierung in der Immunfluoreszenz des Rattenmodells, wie schon in der Vorarbeit, nicht möglich. Die Transkriptionsfaktoren ließen sich nicht spezifisch anfärben, was sich durch Markierungen vor allem außerhalb des Zellkerns in der extrazellulären Matrix zeigte. Untergeordnetes Ziel war der Nachweis von natürlichen Killerzellen mithilfe des CD161-AKs, da diese neben ihrer zytotoxischen Wirkung als bedeutsam für die Aktivierung von CTLs bezeichnet wurden [67, 110]. Dies ließ sich leider nicht umsetzen, da der verwendete Antikörper nicht für in Paraffin-eingebettete Gewebe geeignet war. Ein weiterer Versuch mit einem CD56-AK war ebenfalls nicht erfolgreich.

Bei den verwendeten AKs handelte es sich einerseits um die in DAB etablierten aus der Dissertation von P.Stenglein und andererseits um gänzlich neue. Ersteres traf auf den CD45-Rb-, CD3-Rb-AK und den letztlich zur TH-Markierung verwendeten CD4-Rb-AK der Firma Novus zu. Trotz der bereits

vorhandenen DAB-Protokolle mussten diese für die Immunfluoreszenz und schließlich die Doppelmarkierungen etabliert werden. Aus diesem Grund wurde der CD8-Rb-Ak durch den CD8-Ms-AK ersetzt werden, da ersterer unspezifische Färbungen im Zellkern anstelle spezifischer Färbungen der Zellmembran in der Immunfluoreszenz aufwies. Die Auswahl eines geeigneten CD4-Antikörpers gestaltete sich aufgrund von diffusen Hintergrundfärbungen und starken Markierungen des Uro- und des Endothels neben der eigentlichen Zellmembranmarkierung der Immunzellen besonders schwierig. Im Vergleich mit drei weiteren CD4-AKs ergab sich, dass der Novus-AK das beste Signal-Rausch-Verhältnis hatte. Zusätzlich wurden die störenden Kreuzreaktivitäten des Endothels der Blutgefäße und Urothels durch das Ausschneiden dieser bei der ROI-Markierung ausgeschlossen. Die diffuse Hintergrundfärbung wurde durch automatische Backgroundeinstellung der programmierten Software zur Datenerhebung und eine zusätzlich strengere Zählweise positiver Zellen ( $>0,01\%$ -ROI-Überlappung) verbessert. Färbungen, die keine Assoziation zu Zellkernen hatten, wurden durch die programmierte Software nicht gezählt. Mit dem zusätzlichen Hauptaugenmerk auf die Doppelmarkierungen, hier die Kombination mit dem spezifisch färbenden CD3-Ms-AK, entschieden wir uns, die CD4-Markierung mit in die Auswertung zu nehmen. In der durchgeführten Literaturrecherche konnte keine Publikation gefunden werden, die einen CD4-AK für die Immunfluoreszenz im paraffin-eingebetteten Rattengewebe nutzte. Die Arbeit von Kates et al. wies im paraffin-fixiertem Rattenharnblasengewebe die CD4<sup>+</sup> Zellen durch Flow Cytometrie nach. Hingegen wurde zum Nachweis von CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und FOXP-3<sup>+</sup> Zellen die Immunhistochemie genutzt. Daraus lässt sich auf ähnliche Schwierigkeiten schließen [111].

Die Etablierung von AKs in paraffinierten Rattengewebe gestaltete sich schwierig. Besonderes Gewicht ist daher, aufgrund der höheren Spezifität, der Analyse der doppelt- gegenüber den einfachmarkierten Zellen zugekommen. Zukünftige Arbeiten sollten das Hauptaugenmerk auf die Charakterisierung der T-Zell-Subtypen legen.

### 6.1.2 Beurteilung der CD3-Antikörper

Aufgrund der Spezies-Verfügbarkeit der für die Doppelmarkierungen zu kombinierenden CD-AK wurden in den Experimenten zur Detektion von CD3<sup>+</sup> T-Zellen ein monoklonaler Maus-AK (CD45/CD3; CD3/CD4) und ein monoklonaler Kaninchen-AK (CD3/CD8) verwendet. Alle drei Färbungen zeigten ähnliche Verhältnisse bezüglich der Immunzellichten der jeweiligen Gruppen und Bereiche. Der monoklonale Kaninchen-AK detektierte deutlich mehr Zellen als der monoklonale Maus-AK. Deshalb sollten sich Vergleiche zwischen unterschiedlichen Markierungen maximal auf die Betrachtung von Verhältnissen beschränken (Abb. 18, 19). Es gab lediglich einen signifikanten Unterschied im nT-Bereich mit dem Rb-CD3-AK, der sich nicht bei den Markierungen mit dem Maus-AK widerspiegelte (Abb. 18, 19). Dies ist wahrscheinlich auf die geringere Anzahl der für die Analyse des Bereichs zur Verfügung stehenden Bilder zurückzuführen. Im tumorfreien Areal zeigte der CD3-Ms-AK im

Doppelmarkierungsexperiment CD45/CD3 gegenüber CD3/CD4 eine höhere Detektionsrate. Diese Erhöhung spiegelte sich in allen weiteren Bereichen wider und war in seiner Ursache schwierig zu eruieren. In der statistischen Analyse waren die Unterschiede der CD3-Ms-AK-Markierungen zu vernachlässigen, da nur ein signifikanter Unterschied in den Lymphzellclustern beim Vergleich der LAG auftraten. Dies lässt sich, durch die für diesen Bereich geringere Anzahl zu analysierender Feldaufnahmen begründen. So ist kein Unterschied in der Qualität der Markierung zu erwarten. Zur Erhöhung der statistischen Aussagekraft wurden diese CD3-Ms-AK Einfachmarkierungen schließlich gepoolt.

### 6.1.3 ROI-Auswahl und Beurteilung des Datensatzes

Die ROIs dienten der Differenzierung von Tumorzentrum (T), Tumorrand (TR), tumorfreiem Bereich (nT) und Lymphzellclustern (LC), die über das Harnblasengewebe verteilt waren. Diese Bereiche wurden gemäß Definition (Abb. 11) standardisiert erfasst. Tumorzentrum und Tumorrand waren die primären Wirkorte der PDT aufgrund der Selektivität des Photosensibilisators (PS) THPTS für Tumorgewebe. Sie konnten sich durch unterschiedliche Charakteristika der Gabe des PS, lokal (LAG) oder i.v. (SAG) und der Gewebestruktur, gekennzeichnet von großen Gefäßen im Randbereich oder einer großen Zelldichte im Tumorcenter, unterscheiden. Diese Untergliederung des Tumorgewebes war für eine möglichst differenzierte Betrachtung notwendig. Die Untersuchung von tumorfreien Bereichen diente durch die geringe Lymphozytendichte als interne Kontrolle für die Spezifität der Immunmarkierung und gibt zudem Hinweise auf eine möglicherweise verstärkte Zellmigration. Einer erhöhten Anzahl von Lymphzellclustern wird ein positiver Einfluss auf die Prognose des Harnblasenkarzinoms beim Menschen zugeschrieben. Pfannstiel et al. berichteten weiterhin über Keimzentren aus B-Zellen, Makrophagen und CTLs mit Assoziation zum TME. [112] Keimzentren waren in den Lymphzellclustern der Rattenharnblase nicht zu identifizieren. Weiterhin war keine klare Assoziation zum Tumor auszumachen, sodass die Lymphzellcluster dieser Arbeit nicht als gleichwertig einzustufen sind. Wir beschränkten uns daher auf die Analyse ihrer zellulären Zusammensetzung und nicht eines Vergleichs der Anzahl zwischen den Rattengruppen.

Die Entscheidung fiel, wie auch in der Vorarbeit [83], zur Erhöhung der Anzahl der Werte auf den Vergleich von Tumorarealen pro Gruppe und nicht von Ratten. Dies war möglich, da es sich um eine homogene Inzuchtlinie der Versuchstiere handelte, die Tumorareale, soweit es möglich war, in gleicher Menge pro Tier erhoben wurden und im Gewebeschnitt eindeutig voneinander abgrenzbar waren. Um repräsentative Aussagen zu erhalten, waren die Werte der Tumorareale Mittelwerte aus bis zu fünf 3x3-HPF-Aufnahmen der definierten ROI-Bereiche. So konnten Daten aus 555 Tumorzentrum- und 698 Tumorrandskans erhoben werden. Im tumorfreien Bereich wurden durchschnittlich zwei 3x3-HPF-Aufnahmen angefertigt. 318 Aufnahmen lagen hierzu zur Analyse vor. Pro Bereich wurde der Mittelwert gebildet. Bei den 141 Scans der Lymphzellcluster konnten aufgrund deren geringer Größe

nicht mehrere Bilder aufgenommen werden. Die HPF-Scans wurden entsprechend angepasst. Bilder mit verfälschend hohen Hintergrundfluoreszenzen in den CD45/CD3- und CD3/CD8-Färbungen wurden manuell aussortiert. Auf den zu analysierenden Datensatz waren die Auswirkungen gering, da pro Bereich und Tumorareal Mittelwerte gebildet wurden. Lediglich im Bereich des Tumorzentrums der COG mit der Färbung CD3/CD8 reduzierte sich der zu analysierende Datensatz um 8,33%. So bildete sich ein großer repräsentativer Datensatz zur Fragestellung.

Abschließend lässt sich diese Arbeit als in der Lage beurteilen, ein Gesamtbild der Immunreaktion in Folge von THPTS-PDT darzustellen. Den Ergebnissen bezüglich einzelner Färbungen im tumorfreien Bereich und den Lymphzellclustern sollte durch die geringeren Bildanzahlen nicht die gleiche Validität wie denen des Tumorzentrums und -rand zugestanden werden. Das Hauptaugenmerk liegt auf den Resultaten von Tumorzentrum und -rand, da hier die PDT ihre primäre Wirkung entfaltet.

## 6.2 Ergebnisdiskussion

### 6.2.1 Beurteilung der Immunreaktion der THPTS-PDT im Kontext anderer PDTs

1. Hypothese: Die THPTS-PDT bewirkte in den Tumorbereichen eine verstärkte lokale adaptive Immunantwort durch eine erhöhte Konzentration von Leukozyten bestehend aus B-Zellen, T-Zellen und den Subtypen THs und CTLs.

Betrachtet man die Einfachmarkierungen der Gesamtleukozyten, der T-Zellen, der THs, CTLs und B-Zellen, so zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen COG, LAG und SAG für den gesamten Tumorbereich (T+TR) (Tab. 14). Gleiches lässt sich auch für die Doppelmarkierungen von T-Zellen, THs und CTLs feststellen. Die Hypothese einer lokalen Aktivierung des adaptiven Immunsystems und damit weiterer langfristig systemischer Effekte lässt sich durch erhöhte Zelldichten im gesamten Tumorbereich nicht belegen. Mroz et al. beschrieben eine generelle Aktivierung der Anti-Tumor-Immunantwort als grundlegend für eine längerfristige Effektivität der PDT [44]. Korbelik et al. zeigten, dass eine langfristige Heilung durch PDT unter Immunsuppression im Mausmodell eingeschränkt ist. Ein Transfer von T-Zellen vor der Photofrin-PDT zeigte positive Effekte hinsichtlich der Rezidivfreiheit nach 90 Tagen. Gleichzeitige oder spätere T-Zellübertragungen hatten keinen Einfluss [113]. Dieses Ergebnis spricht für eine zeitlich begrenzte Aktivierung der T-Zellen durch die PDT und weist darauf hin, dass eine simple Erhöhung der Anzahl der Lymphozyten nicht unbedingt einen positiven Einfluss auf die Effektivität der PDT hat. Canti et al. nutzten ein Fibrosarkom-Mausmodell, welches sie einer PDT-Behandlung mit Aluminium-disulfonierte-Phthalocyanide unterzogen. Nach einem 100-Tage Zeitfenster bis zur zweiten Tumorinduktion zeigte sich eine erhöhte Überlebenschance von im Vorfeld behandelten Mäusen ohne Immunsuppression mit Cyclophosphamid, wohingegen die behandelten immunsupprimierten Mäuse verstarben [114]. Diese Ergebnisse belegen die entscheidende langfristige Wirkung des Immunsystems.

Die gemessenen Unterschiede in der B-Zelldichte (CD19+) im Tumorbereich (T und T+TR, Abb. 22) zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen in den jeweiligen Bereichen und liefern keine Hinweise auf eine B-Zell-Reaktion durch die THPTS-PDT. Für B-Zellen wurden sowohl Tumorprogress-fördernde als auch positive Effekte in der lokalen Anti-Tumor-Immunität dokumentiert [115, 116]. Für die PDT-induzierte Immunantwort sind die B-Zell-Effekte kaum untersucht. Falk-Mahapatra et al. zeigten in einem Kolonkarzinom-Mausmodell, dass nach Depletion von B-Lymphozyten die durch eine immun-aktivierende PDT-Behandlung induzierte, Interleukin 17-abhängige Migration von Neutrophilen in die tumor-drainierenden Lymphknoten signifikant reduziert war. Die Mäuse mit B-Zell Depletion wiesen eine signifikante Verringerung im Überleben auf, was sich durch einen geringeren Effekt der 2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide-a-PDT begründen lässt. [60] Anzumerken ist, dass in der angeführten Studie die Betrachtung der B-Zellen in den tumor-drainierenden Lymphknoten erfolgte und deshalb offenblieb, ob den B-Zellen eine eindeutige Bedeutung im Tumorgewebe selbst zukommen könnte.

Die Analyse der Doppelmarkierungen zeigte eine Tendenz zur Erhöhung der CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen im Tumorzentrum der LAG (Abb. 25) und eine signifikante Reduktion im Tumorrand. Bei den CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> CTLs (Abb. 24) zeigte sich in den Tumorbereichen kein signifikantes Ergebnis. Somit scheinen diese Ergebnisse keinen relevanten Effekt der durchgeführten Experimente auf CTLs und THs zu belegen. In der Literatur wird die PDT-Anti-Tumor-Immunität entscheidend durch CTLs bedingt. Korbelik et al. gaben Hinweise auf die zentrale Stellung CTLs, die sich durch ausbleibende kurative Effekte bei CTL-Depletion der transferierten Splenozyten auf immundefiziente Mäuse zeigten. Eine supportive Funktion von THs wurde durch lediglich reduzierte kurative Effekte bei Depletion belegt. Die Bildung von Gedächtniszellen durch den Vergleich von immundefizienten und nicht -defizienten Mäusen konnte nachgewiesen werden. Die Experimente erfolgten mit einer Photofrin-PDT und einem 90d Follow-up [113]. Kabingu et al. beschrieben keinen relevanten Einfluss der CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach lokaler PDT bei der Reduktion der Anzahl lokal unbehandelter Mammakarzinomzellen in der Lunge. Stattdessen bestätigten Sie die zentrale Stellung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die durch die lokale PDT sensibilisiert wurden durch Depletionsexperimente. Die Mäuse wurden mittels Photofrin-PDT behandelt und hatten ein 40d Zeitfenster bis zur erneuten Untersuchung [67]. Hier wurde, wie auch von Gomer et al. ein positiver Einfluss auf entfernte Tumore durch eine lokale PDT beschrieben [67, 117]. Gomer et al. führten ihre Experimente ebenfalls am Mausmodell unter Photofrin II-Therapie mit 21d Zeitfenster bis zur Beurteilung der Immunreaktion durch [117]. Eine weitergehende differenzierte Beurteilung der CTLs wäre neben der Zellzahlveränderung der Aktivierungszustand. Ein Biomarker wäre Granzyme B (GrB) [118].

Fazit: Die zentrale Stellung eines durch PDT sensibilisierten Immunsystems, insbesondere von T-Zellen, B-Zellen und CTLs, speziell für langfristige systemische Anti-Tumor-Effekte, wie in der Literatur beschrieben, lässt sich auf Grundlage der ersten Hypothese für die THPTS-PDT nicht annehmen.

2. Hypothese: Die lokale THPTS-Applikation führte zu einer Konzentration der Immunreaktion im Tumorzentrum.

Es ist eine Tendenz in der LAG zu erhöhten Immunzellen bei doppelt markierten T-Zellen, THs, CTLs und einfachmarkierten B-Zellen in den Tumorzentrum zu erkennen (Abb. 23, 24, 25, 22). Signifikante Unterschiede zeigen sich zwischen LAG und SAG hinsichtlich einer Reduktion im Tumorrandbereich bei doppeltmarkierten T-Zellen und zwischen LAG und COG doppeltmarkierten THs. Dies könnte für eine Migration dieser Immunzellen ins Zentrum und damit für deren Aktivierung sprechen. Die hohe Dichte der Immunzellen des Rands hätte sich in den flächenmäßig deutlich größeren Tumorzentren stärker verteilen können. Aus diesem Grund wäre deswegen nur eine tendenzielle Erhöhung und nicht ein signifikanter Unterschied nachweisbar. Diese Ergebnisse zum Tumorzentrum der LAG deckten sich nicht mit der Vorarbeit Stengleins. Hier wurde eine Migration von Immunzellen als schwierig betrachtet aufgrund des fehlenden Anreizes durch schlechtes Eindringen des THPTS durch nachgewiesene Tight Junctions [83]. Im Vergleich der SAG und der LAG wäre die unmittelbare Wirkung bei der LAG im Tumorzentrum anzunehmen, da durch die Verabreichung über die Harnblase THPTS direkt ohne zwischengelagertes Gewebe an der Lokalisation des Tumors appliziert wird. Dieser Punkt unterstützt die Ergebnisse zusätzlich.

Fazit: Die Hypothese ist nur indirekt mit geringer Evidenz zu belegen. Bewertet man die Verschiebung der Immunzellendichten zwischen den unterschiedlichen Harnblasenbereichen als Migration und damit als Aktivierung der T-Zellen, THs, CTLs und B-Zellen, so kann von einem Einfluss der lokal applizierten THPS-PDT (LAG) auf die immunogene Wirkung im Tumorzentrum ausgegangen werden. Diese lokalen Effekte könnten sich, wie bereits durch Literatur belegt, im Verlauf auch systemisch auswirken.

3. Hypothese: Die systemische THPTS-Applikation führte zu einer Konzentration der Immunreaktion im Tumorrand.

Hinweise auf eine Migration sind für die SAG durch eine Reduktion der Immunzellen im nT-Bereich und den LC zu sehen. Signifikante Ergebnisse im tumorfreien Bereich bestehen dafür lediglich im Bereich der T-Zell-Einfachmarkierung und der CTL-Doppelmarkierung zwischen der SAG und der COG (Abb. 18, 24). In diesem Falle hätte sich die geringe Anzahl von Lymphozyten aus diesen Bereichen im Tumorrand verteilen können, wobei der Effekt durch die hohen Zellzahlen im Tumorrand kaum zu detektieren gewesen wäre. Dieser Fakt ist eine indirekte Stützung der Hypothese, die die SAG-Reaktion durch die PDT dem Tumorrand zuordnet.

In den Vorarbeiten und der Literatur sah sie sich hingegen bestätigt. Das i.v. gegebene THPTS wirkte durch die Blutgefäße, die hauptsächlich im Randbereich lokalisiert sind. Dies konnte durch erhöhte T-Zellflächenanteile in der Arbeit von Stenglein und erhöhte T- und B-Zellzahlen von Preise et al. im Tumorrandbereich bestätigt werden [83, 119]. Stenglein konnte im PDT-behandelten Tumor eine Erhöhung von Granzym B in der SAG gegenüber der LAG nachweisen [83]. Eine Aktivierung der CTLs, gekennzeichnet durch Granzym B, würde durch die hier vermutete CTL-Migration bestätigt. Die Daten von Stenglein basierten auf der Detektion mittels DAB-Immunhistochemie, einer Methode, die aufgrund der Verstärkung durch die Verwendung der Biotin-Streptavidin Technik (vgl. Abb. 7) eine höhere Sensitivität als die indirekte Immunfluoreszenz aufweist. Aufgrund der geringeren Sensitivität der aktuell verwendeten konfokalen Immunfluoreszenz zeigten sich in den untersuchten Harnblasenbereichen zwar z.T. deutliche Tendenzen, die jedoch bis auf wenige Ausnahmen nicht signifikant sind.

Fazit: Die Hypothese ist so nur indirekt mit geringer Evidenz zu belegen. Bewertet man die Verschiebung der Immunzellichten zwischen den unterschiedlichen Harnblasenbereichen als Migration und damit als Aktivierung der T-Zellen und CTLs so kann von einem Einfluss der systemisch applizierten THPS-PDT (SAG) auf die immunogene Wirkung im Tumorrand ausgegangen werden. Diese lokalen Effekte könnten sich, wie bereits durch Literatur belegt, im Verlauf auch systemisch auswirken.

Insgesamt lässt sich die Anti-Tumor-Immunität in den untersuchten Experimenten der THPTS-PDT nicht abschließend beurteilen. Anzumerken ist, dass in der bereits beschriebenen Literatur meist längere Zeitfenster von 21 bis 90 Tagen zur Beurteilung von durch Lymphozytenpopulationen beeinflussten Effekten, wie Rezidivfreiheit, Überlebenswahrscheinlichkeit und Tumorreduktion bei PDT genutzt werden. Preise et al. beschreiben bei der vascular-targeted-PDT mit i.v. WST11-PS am Mausmodell bereits nach zwei Wochen einen Schutz vor Rezidiven [119]. Diese spezielle Form der PDT ist jedoch nicht mit der hier beschriebenen THPTS-PDT gleichzusetzen. Die WST11-PDT bewirkt Gefäßverschlüsse, die einen Sauerstoff- und Nährstoffmangel für den Tumor bedeuten und durch diese Prozesse ablativ und immunogene Wirkungen, wie ausbleibende Metastasenbildung und Entwicklung eines Immungedächtnisses, entfalten. Es ist jedoch denkbar, dass die Zeitabläufe bei der Aktivierung des Immunsystems vergleichbar sind. So ist der Effekt der vaskulären PDT auf das Migrationsverhalten der T- und B-Zellen folgender: nach 24 Stunden wandern diese in das Tumorgewebe ein und erreichen nach 48 Stunden wieder das Ausgangsniveau [119]. Dies kann den Blickwinkel auf die THPTS-PDT ändern: Womöglich gibt es eine Anti-Tumor-Immunität, die auf Grundlage der Immunzellzahlen im Primärtumor nicht nachgewiesen werden konnte. Die Bildung eines Immungedächtnisses ist nicht auszuschließen. 14 Tage nach der THPTS-PDT scheint die lokale

Immunantwort nicht mehr relevant für die Einschmelzung des Primärtumors. Aussagen über die Rolle der akuten, lokalen Immunantwort lassen sich aus den vorliegenden Daten nicht treffen. Eine zusätzliche Begrenzung des Primärtumors durch das Immunsystem ist abschließend durch die Ergebnisse als unrealistisch zu betrachten. Gleichzeitig sind systemische Anti-Tumor-Effekte weiterhin vorstellbar.

Aus der vorangegangenen Diskussion ergeben sich neue Zielsetzungen zukünftiger Arbeiten. Es sollte einerseits eine Verbesserung der Wirkung auf das Immunsystem angestrebt werden, andererseits ein anderer Zeitrahmen zur Detektion von Immunzellen im Harnblasengewebe verwendet werden. Die Anti-Tumor-Immunität sollte anhand von Langzeiteffekten überprüft und der Aktivierungszustand der Lymphozyten untersucht werden. Weiterhin erscheint eine Optimierung der Reduktion des Primärtumors sinnvoll, um die negativen Wirkungen des TMEs weiter zu begrenzen [25, 26]. Etwaige Ansätze werden unter dem Punkt Kombinationstherapie diskutiert.

### 6.3 Beurteilung der Immunreaktionen beim Harnblasenkarzinom

Beim Harnblasenkarzinom scheinen höhere Zahlen infiltrierender Lymphozyten eine Assoziation mit einer verbesserten Prognose zu haben [120]. Jacobs et al. konnten diesen Effekt für intratumorale CTLs beim MIBC zeigen [121]. Jiang et al. untersuchten die Prognose von MIBC unter adjuvanter platinbasierter Chemotherapie bezüglich infiltrierender B-Zellen. Eine signifikante Überlebenszeitverlängerung ging mit höheren B-Zellkonzentrationen einher. Weiterhin konnte eine zusätzliche Aktivierung von THs durch die B-Zellen gezeigt werden [122]. Trotzdem gab es Hinweise, dass auch gegenläufige Reaktionen, mitunter vor Behandlung, bestehen. So begrenzten eine höhere Anzahl von Treg, myeloiden Suppressorzellen und innate lymphoide Zellen der Gruppe 2 (ILC2) mit ähnlicher Wirkung wie die TH2s die Wirkung einer BCG-Behandlung [123]. Gegenläufige Effekte bestätigten auch Jacobs et al., die Patienten mit NMIBC infolge TURB mit IL-2 behandelten. Es zeigte sich eine gesteigerte Rezidivrate durch immunsupprimierende CTLs, die eine geringe CD8-Expression hatten oder CD57 positiv waren [121]. Krpina et al. hingegen fanden eine negative Korrelation der Rezidivrate beim NMIBC mit CD8+ CTLs und aktivierten GrB+/CD8+ CTLs, wobei die CTLs nicht weiter subtypisiert wurden. Interessanter Weise zeigte sich keine Korrelation mit CD4+ THs [103]. Diese Recherchen lassen auf ein geteiltes Bild bezüglich der Effekte von Lymphozyten beim Harnblasenkarzinom schließen. Anhand der alleinigen Analyse von Immunzellen kann keine sichere Prognose abgegeben werden. Trotzdem zeigt es die Relevanz der von uns untersuchten Lymphozytenpopulationen.

Um zukünftig zielgerichteter die PDT-Effekte auf das Immunsystem beurteilen zu können, ist eine weitere Subtypenanalyse sowohl von THs als auch von CTLs notwendig. Außerdem ist das Hauptaugenmerk auf die infiltrierenden Immunzellen, also auf die Immunzellen im Tumorcenter, zu



richten, was die LAG, aufgrund von Tendenzen zu stärkeren Effekten in diesem Bereich, favorisiert. Wesentlich dürfte die zeitliche Verlaufsanalyse der tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) sein, die einzig Aufschluss über die akute Immunantwort geben kann. Um die Prognose künftig ausreichend beurteilen zu können, wäre eine längere Nachbetrachtungszeit mit Überlebenszeitanalyse sinnvoll.

#### 6.4 Aussichtsreiche Kombinationstherapien

Die im Vorfeld diskutierten Ergebnisse zeigen, dass die THPTS-PDT zur Optimierung der immunogenen Effekte von Kombinationstherapien profitieren würde.

Die THPTS-PDT wurde bereits mit Strahlentherapie (IR) kombiniert. Es konnte gezeigt werden, dass Glioblastomzellen *in vitro* verstärkt durch diese multimodale Behandlung im Vergleich zu den Einzeltherapien abgetötet wurden [124]. Eine Kombination aus Strahlentherapie und PDT ergibt Sinn, da so die primäre Tumormasse weiter reduziert werden kann, um möglicherweise eine Komplettremission zu erreichen oder die Immunreaktion durch Tumormassenreduktion zu verstärken. Tumorcenter kleinerer Tumore werden besser durch Immunzellen infiltriert, was sich einerseits durch die geringere Größe und andererseits durch ein nachgewiesenes schwächeres TME erklären lässt [25].

Weiterhin sind DAMPs-Freisetzungen durch IR mit einer stimulierten Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten verbunden, die sich theoretisch mit der PDT potenzieren könnten [125]. Anzumerken bleibt bei der benannten Studie, dass hier vor allem Nekrose ausgelöst wurde. Viele klinische Studien belegen jedoch indirekt auch die Induktion des immunogenen Zelltods (ICD) [126].

Auf der Verwendung von Checkpointinhibitoren (CI) basiert eine der wichtigsten Anti-Tumor-Immuntherapien. Die PDT- und CI-Wirkungen miteinander zu kombinieren, scheint naheliegend. So gibt es mittlerweile zahlreiche Studien, die diese Kombination untersuchen. Die hier aufgeführten Studien zeigten an Mausmodellen mit Kolonkarzinom oder Brustkrebs mit Lungenmetastasen die Therapieeffekte. Diverse PS in Kombination mit CI wiesen deutlich bessere Ergebnisse als die jeweiligen Einzeltherapien auf [127–130]. Eine PDT mit tumorspezifischen PLZ4-Nanoporphyrinen kombiniert mit CI zeigte in Mäusen mit Harnblasenkarzinom signifikant bessere, synergistische Effekte als ohne oder mit Einzeltherapie. Eine von sieben Mäusen verstarb unter Kombinationstherapie nach 75 Tagen, wohingegen in den restlichen Gruppen im gleichen Zeitraum keine Mäuse überlebten [131].

Die Kombination mit einem Chemotherapeutikum zeigte auch bei der PDT verbesserte Ergebnisse. Durch eine Benzoporphyrin-PDT war am Mausmodell in einem 90d Follow-up bei Kombination mit low-Dose Cyclophosphamid eine 60%ige Rezidivfreiheit zu erreichen. Mit alleiniger PDT oder Cyclophosphamid-Therapie beschrieben Castano et al. keine permanente Heilung [66]. In einer erneuten Wiederholung des Experiments durch die Arbeitsgruppe wurde die spezifische Reduktion von Tregs durch low-Dose Cyclophosphamid im Lymphknoten nachgewiesen [132], was eine Erklärung

für diese Effekte lieferte. Die abgeschwächte adaptive Immunität im Rattenharnblasenkrebs durch Tregs konnte durch Kates et al. gezeigt werden [111]. Dies unterstreicht die Relevanz einer Kombination mit Cyclophosphamid.

Bei der bereits klinisch genutzten BCG-Therapie wurde von Kates et al. im NMIBC der Ratte eine Rekrutierung von THs nachgewiesen, die jedoch nicht aktiviert wurden [111]. Eine Kombination mit der PDT könnte durch den ICD für eine geeignete Anti-Tumor-Immunität sorgen, wodurch sich die beiden Ansätze synergistisch verstärken würden.

Es gibt zahlreiche vielversprechende Ansätze der Kombinationstherapien, die auch Triple-Therapien und damit eine immer effektivere Tumorkontrolle denkbar machen und weiterer Forschung bedürfen.

## 6.5 Umgang mit Schwierigkeiten

Die Arbeit an der vorgestellten Promotion erstreckte sich bis zum Beginn der Verschriftlichung auf drei Jahre. In dieser Zeit traten immer wieder Schwierigkeiten und Rückschläge auf. Es war ein wichtiger Lernprozess, mit diesen umzugehen und Lösungen zu finden. Jederzeit konnte ich dabei auf die Erfahrungen und den Rat der Forschungsgruppe zurückgreifen.

Bei der Etablierung der Antikörper für die Markierung der Immunzellen bestanden Schwierigkeiten aufgrund des gewählten Tiermodells. Hauptsächlich mussten Antikörper für humane Gewebe mit Kreuzreaktivitäten in der Ratte genutzt werden, da keine gleichwertigen Ratten-spezifischen Antikörper erhältlich waren. Durch einen standardisierten Prozess konnten langfristig bei den ausgewerteten Markierungen akzeptable Resultate erzielt werden. Die Hersteller weisen in beigefügten Protokollen Gewebe, Verdünnungen und Arbeitsschritte aus und stellen in Bildern die bestmöglichen Färbeergebnisse dar. Diese Empfehlungen wurden umgesetzt, mit den laboreigenen Protokollen und Erfahrungen kombiniert und gegebenenfalls weiter modifiziert hinsichtlich verwendeter Puffer, Verdünnungen, Inkubationszeiten und -temperaturen.

Bei der Etablierung der automatischen Auswertung durch das Programm Fiji war der erste Versuch eine manuelle Auszählung der markierten Zellen, die sich zeitnah aufgrund der großen Menge als unrealistisch herausstellte. Zusätzlich wären Kontrollauszählungen durch weitere Mitglieder der Forschungsgruppe notwendig gewesen, um die Validität zu verbessern. Der zweite Versuch lässt sich am besten als halbautomatisch beschreiben, da weiterhin für jedes Bild der Hintergrund zum Ausblenden von Autofluoreszenz und diffusen Gewebefärbungen eingestellt wurde, woraufhin die Software die markierten Zellen auszählte. Hier bestand vor allem das Problem, dass dicht gelagerte Zellverbände nicht gezählt werden, da die Kerne nicht separiert werden konnten. Deshalb erfolgte nun die Umstellung auf die Ermittlung von gefärbten Flächen. Diese hatte wiederum den Nachteil, dass nur sich überdeckende Markierungen gezählt werden konnten und die erhobenen Daten stark abhängig von der Qualität der Färbung waren. Schließlich konnte die vorbeschriebene Fiji-Programmierung

mithilfe des seit 2019 verfügbaren Addons Stardist [87] etabliert werden, die eine automatische Einstellung des Hintergrunds, wie auch eine kernbasierte Zellzählung vornahm. Bei diesen Entwicklungen konnte ich als primärer Nutzer der Programmierungen hauptsächlich auf die Probleme hinweisen. Prof. Neuhaus leistete die Hauptarbeit hinsichtlich des Programmierens und diskutierte die Lösungen mit mir.

## 7 Schlussbemerkung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse der adaptiven Immunantwort infolge der THPTS-PDT in einem orthotopen Rattenmodell des Harnblasenkarzinoms. Die Aktivierung des Immunsystems als effektive und nebenwirkungsarme Behandlungsform ist ein wichtiges Ziel aktueller Krebstherapien. In Vorarbeiten [82, 83] wurde bereits die ablativ Wirkung der Therapie in den Tieren nachgewiesen und es erfolgte eine erste Beurteilung der Zusammensetzung der tumorassoziierten Lymphozytenpopulation. Anhand des verbleibenden Schnittmaterials sollten die Immunzellen weiter charakterisiert und Unterschiede in den verschiedenen Harnblasenbereichen untersucht werden.

Größere, signifikante Verschiebungen in das Harnblasengewebe waren in den Lymphozytenpopulationen nicht festzustellen, was dafür spricht, dass die akute Phase der Immunaktivierung zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme bereits abgeschlossen war. Im Vergleich der Lymphozytenkonzentration in den unterschiedlichen Bereichen der Harnblase ergeben sich bei den behandelten Gruppen Hinweise für Lymphozytenmigrationen. Damit könnte ein Priming des Immunsystems durch die PDT vorzuliegen, welches sich auch über 14 Tage nach Behandlung noch nachweisen lässt, und im Sinne einer möglichen Fernwirkung der PDT interessant ist.

Bei der Auswahl zukünftiger Kombinationstherapien sollte einerseits auf eine effektive Eradikation des Primärtumors als auch eine Verstärkung der Anti-Tumor-Immunität abgezielt werden. Das Therapieregime sollte den Zeithorizont zur Untersuchung der Effekte auf das Immunsystem engmaschiger erfassen und erweitern. Zusätzlich ist eine stärkere Analyse der Immunzellsubtypen für eine differenzierte Bewertung tumorprotektiver und -destruktiver Prozesse notwendig.

Diese Promotion wurde durch eine Förderung der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig ermöglicht.

## 8 Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

### **Charakterisierung der Immunantwort im Harnblasenkarzinom nach photodynamischer Therapie mittels Tetrahydroporphyrin-Tetratosylat an einem orthotopen Rattenmodell**

eingereicht von: Vincent Ricardo Johannes Eckert

angefertigt an: der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig,  
im Forschungslabor Urologie des Universitätsklinikum  
Leipzig

betreut von: Prof. Dr. rer. nat. Jochen Neuhaus  
und Dr. rer. nat. Mandy Berndt-Paetz

April 2023

Das Harnblasenkarzinom war 2020 weltweit die zehnthäufigste Tumorentität. 2018 erkrankten in Deutschland 19,7 Männer und 5,5 Frauen pro 100.000 Einwohner. Für die muskelinvasive Form des Harnblasenkarzinoms ist eine radikale Zystektomie mit Harnableitung die Standardtherapie. Dieses Verfahren führt zu keiner Verbesserung der Lebensqualität der Patienten. Die vorliegende Arbeit untersucht eine alternative Therapieform hinsichtlich ihres Einflusses auf die Anti-Tumor-Immunität. Das Immunsystem ist grundsätzlich in der Lage, entartete Zellen durch veränderte Proteinexpression der Major-histocompatibility-Komplexe zu erkennen und diese durch natürliche Killerzellen und zytotoxische T-Lymphozyten abzutöten. Subtypen der T-Helferzellen nehmen dabei eine zentrale Stellung in der Verstärkung der Anti-Tumor-Immunität, aber auch der Begrenzung dieser ein. Solide Tumore können durch Selektionsprozesse in ihrer Entwicklung ein Tumormicroenvironment ausbilden, das immunprivilegiert ist und immunsuppressiv wirkt. Diese Effekte schränken nicht nur lokale Reaktionen, sondern das gesamte Immunsystem ein. Ein zentrales Ziel von Immuntherapien ist es, die Wirkung des Tumormicroenvironments aufzuheben. Möglich ist dies unter anderem durch bestimmte

Formen des Zelltods, wie den immunogenic cell death als Apoptoseunterform, der Damage associated molecular patterns freisetzt. Diese Moleküle befinden sich physiologisch im Zellinnern, sind dem Immunsystem unbekannt und werden durch Zellschädigung und -stress freigesetzt. Eine Registrierung dieser Strukturen durch das Immunsystem bewirkt eine sterile Inflammation, die sowohl die Reaktivität der Immunzellen gegenüber dem Tumor erhöhen, aber auch immunsuppressiv wirken können.

Die photodynamische Therapie (PDT) ist eine minimalinvasive, zielgerichtete Therapie solider Tumore, die mit geringen Nebenwirkungen einhergeht. Unter dieser Behandlung zeigen sich ablativ Effekte, Gefäßokklusionen und eine Immunstimulationen. Das Wirkprinzip besteht in der Photoaktivierung von nicht-toxischen, lichtreaktiven Photosensibilisatoren (PS), die durch Energieabgabe zur Bildung von Singulett-Sauerstoff führen, welcher reaktive Sauerstoffspezies bildet. Diese Produkte schädigen die Tumorzellen durch schnelle Inaktivierung lokal und lösen dadurch Apoptose- und Nekroseprozesse aus, wodurch Damage associated molecular patterns freigesetzt werden können. Diese Arbeit beschäftigt sich mit den Effekten der untersuchten PDT auf die Immunzellpopulationen im Harnblasenkarzinom. In der Therapie maligner Harnblasentumore ist kein Standardverfahren der PDT etabliert. Tetrahydroporphyrin-Tetratosylat (THPTS) als PS mit seinem Absorptionsmaximum im nahen Infrarotbereich (760nm) ermöglicht eine Gewebepenetration von bis zu 15mm und damit die Therapie muskelinvasiver Tumore. Sicherheit und Effektivität durch eine signifikante Reduktion der Tumormasse sind an einem orthotopen Rattenharnblasenmodell, welches der vorliegenden Arbeit als Untersuchungsmaterial dient, nachgewiesen. Der Wirkpfiler der Immunreaktion wurde im Vorfeld lichtmikroskopisch eruiert.

### **Ziele der Arbeit**

Die vorgestellte Promotion soll eine Charakterisierung der primären lokalen adaptiven Immunreaktion durch die THPTS-PDT im Harnblasenkarzinom eines orthotopen Rattenmodells vornehmen.

### **Methodik**

Die Harnblasengewebeschnitte stammen aus den Vorarbeiten der Forschungsgruppe. Als Versuchstiere wurden weibliche F344 Fischerratten verwendet, die einer Inzuchtlinie entstammen und sich als ein immunkompetentes orthotopes Harnblasenmodell eignen. Zur Bildung des Harnblasenkarzinoms wurden AY-27 Urothelkarzinomzellen verwendet.

Zur Tumoringokulation wurden die Urothelkarzinomzellen transurethral in die Harnblase der Fischerratten instilliert. So bildeten sich innerhalb von zehn Tagen multifokale Harnblasenkarzinome unterschiedlicher Invasionstiefe. Am zehnten Tag erfolgte die THPTS-PDT. Die lokal behandelte Gruppe (LAG) erhielt den Wirkstoff transurethral. Bei der systemisch behandelten Gruppe (SAG) wurde der

Wirkstoff i.v. verabreicht. Die Kontrollgruppe (COG) erhielt Phosphat-gepufferte Saline transurethral. Daraufhin wurden die Gruppen mithilfe einer Glasfaser mit einem 760nm-Laser bestrahlt. Nach 14d wurden die Tiere getötet und die Harnblasen entnommen. Es konnten Schnitte von insgesamt n=26 Ratten untersucht werden: nicht-bestrahlte Kontrollgruppe (COG, n=9), lokale Applikation von THPTS (LAG, n=8), systemische Applikation von THPTS (n=4).

Das Gewebe wurde immunhistochemisch für die Fluoreszenzmikroskopie nach einem standardisierten Protokoll gefärbt. Dazu erfolgte das Entparaffinieren und die Antigendemaskierung mittels basischen Puffers im Dampfgerät und Dimethylsulfoxid-Triton X-100-Tris-buffered-Saline. Es wurde mit bovinem Serumalbumin und Ziegen-Normalserum für 2h geblockt und mit den Primärantikörpern zur Doppelmarkierung über Nacht inkubiert. Die genutzten Primärantikörperkombinationen sind CD45/CD3, CD3/CD8, CD3/CD4 und CD19. Danach wurden fluoreszierende oder biotinylierte Sekundärantikörper genutzt, wobei letztere wiederum mit fluoreszierendem Streptavidin gekoppelt wurden. Schließlich erfolgte die Kernmarkierung mittels Diamino-Phenylindol (DAPI). Zu jeder Färbung wurde eine Negativkontrolle angefertigt. Die Antikörper wurden in Gewebe mit erhöhter Expression der Zielepitope etabliert und daraufhin auf das Rattenharnblasengewebe übertragen sowie für die Doppelimmunfluoreszenz kombiniert.

Die Bildaufnahmen erfolgten mithilfe des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops mit einem Plan-Apochromat 40x/0.95 Luft-Objektiv. Jede Aufnahme besteht aus vier Kanälen entsprechend der genutzten Laser: 405nm für die Kerne, 488nm für die Mausantikörper, 561nm für die Kaninchenantikörper und eine Durchlichtaufnahme zur Strukturdarstellung. Jeweils neun Bilder bilden eine quadratische Feldaufnahme mit Ausnahme der Lymphzellcluster, bei denen sich die zusammengeführten Bilder nach der Größe richten. Pro Bereich wurden abhängig von der Ausdehnung maximal fünf Feldaufnahmen angefertigt. Die Bereiche sind Tumorzentrum, Tumorrand, tumorfreier Bereich und Lymphzellcluster. Letztere sind als Lymphzellansammlungen im Harnblasengewebe unabhängig vom Tumor definiert.

Zu analysierende Bereiche (ROI, regions of interest) wurden manuell definiert und mithilfe der Software Fiji (ImageJ2) und einem eigens programmierten Macro die Fläche und die positiv markierten Zellen ermittelt. Die statistische Analyse erfolgte mittels der Software Graph Pad Prism 9.3.1 mit einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05\%$ .

## **Ergebnisse**

Der Datensatz besteht aus insgesamt 1732 Feldaufnahmen, die sich wiederum aus über 14500 High-Powerfield-Bildern zusammensetzen und analysiert wurden. Für die Färbungen ergeben sich pro Tumoreal aufgeschlüsselt auf die Harnblasenbereiche folgende Anzahl an Mittelwerten zur statistischen Analyse:

Tumorzentrum	COG 24, LAG 15-17, SAG 9-10;	Tumorrand	COG 23-24, LAG 16-17, SAG 9-10;
Tumorfreier Bereich	COG 18-19, LAG 12-14, SAG 8;	Lymphzellcluster	COG 10-15, LAG 16-21, SAG 3-5

Folgende Immunfluoreszenzmarkierungen konnten etabliert werden: CD45-Antikörper zur Darstellung der gesamten Leukozytenpopulation, CD3-Antikörper für die T-Zellen, CD8-Antikörper für den Subtyp der zytotoxischen T-Zellen (CTL), der CD4-Antikörper für den Subtyp der T-Helferzellen (TH) und der CD19-Antikörper für die B-Zellen. Kreuzreaktionen bzw. Hintergrundfluoreszenz traten vor allem im Tumorstroma und dem Endothel bei CD45-, CD19- und CD4-Antikörper auf. Das Signal-Rausch-Verhältnis war jedoch in den meisten Fällen aufgrund der intensiveren Markierung der Lymphozyten-Zellmembranen für die quantitative Analyse ausreichend. Lediglich die Markierung der T-Helferzellen mit dem CD4-Antikörper bereitete durch stärkere Kreuzreaktivitäten Probleme.

In der quantitativen Analyse zeigen sich folgende signifikante Ergebnisse:

- Reduzierte T-Zelldichte (CD3) der SAG gegenüber der COG im tumorfreen Bereich
- Erhöhte T-Zelldichte (CD45/CD3) der SAG gegenüber der LAG im Tumorrand
- Reduzierte cytotoxische T-Zelldichte (CD3/CD8) der SAG gegenüber der COG im tumorfreen Bereich
- Reduzierte T-Helferzellen (CD3/CD4) der LAG gegenüber der COG im Tumorrand

Zieht man die nicht signifikanten Tendenzen der einzelnen Gruppen mit in Betracht, besteht eine verstärkte Immunzell-dichte im Tumorzentrum der LAG, wohingegen eine Abnahme dieser im Tumorrand auffällt. Die SAG weist punktuell Reduktionen in der Peripherie, nämlich den tumorfreen Bereichen und Lymphzellclustern auf. Veränderungen im gesamten Tumorbereich, zusammengefasst aus -center und -rand, sind in keiner Immunzellmarkierung vorhanden.

## Diskussion

Die Auswahl der Antikörper erfolgte gemäß aktueller Literatur. Die Spezifität der Immunzellmarkierungen wurde durch die Verwendung von Doppelmarkierungen erhöht. Die Auswahl der untersuchten Bereiche (Tumorzentrum, Tumorrand, tumorfreen Region und Lymphzellcluster) ergeben ein Gesamtbild der Aktivierung des Immunsystems in der Harnblase und erreichen durch die Zahl von insgesamt 1272 Feldaufnahmen des Tumorbereichs eine hohe Repräsentativität.

In der Literatur wird die zentrale Stellung der Immunreaktion durch verschiedene PDTs für die Metastasen- und Rezidivkontrolle beschrieben. Dieser Effekt konnte anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht untersucht werden. Bei Betrachtung des gesamten Tumorbereichs zeigen sich in keiner Immunzellmarkierung signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen, was eine zusätzliche primäre Tumorkontrolle unwahrscheinlich werden lässt. Hinweise auf Einflüsse auf die Ausbildung einer differenzierten Anti-Tumor-Immunität lassen sich in einer Reduktion der Immunzell-dichte im Tumorrand der LAG bei T- und T-Helferzellen und ebenfalls eine Verringerung bei T- und T-Killerzellen

in der Peripherie der SAG sehen. Diese Ergebnisse könnten auf eine Migration bei der LAG ins Tumorzentrum und bei der SAG zum Tumorrand verweisen, die sich auch in der tendenziell erhöhten Immunzellichte des Tumorzentrums der LAG widerspiegelt. Systemische Anti-Tumor-Effekte bleiben so weiterhin vorstellbar.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Hauptaugenmerk auf die Erfassung der Dichte von Immunzellen in den relevanten Bereichen gelegt. Eine Analyse der Aktivität z.B. der CTL erfolgte nicht. Der Einfluss von Immunzellen auf die Prognose des Harnblasenkarzinoms wird kontrovers diskutiert und ist nicht eindeutig einzuordnen. Kombinationstherapien mit ionisierender Strahlung, Checkpointinhibitoren oder Low-Dose Cyclophosphamid könnten verbesserte Resultate in zukünftigen Arbeiten ermöglichen. Weiterhin sollte ein Augenmerk auf den Zeitrahmen zur Detektion von immunogenen Effekten gelegt werden, vor allem, um akute (48 Stunden) und langfristige (bis zu 90 Tagen) zu detektieren. Subtypenanalyse von T-Helfer- und zytotoxischen T-Zellen sollten erfolgen, um die Anti-Tumor-Immunität differenzierter beurteilen zu können.



## 9 Darstellungsverzeichnis

### 9.1 Abbildungen

Abb. 1:	Schematische Darstellung der Tumorstadien (T) des Harnblasenkarzinoms nach TNM-Klassifikation.....	8
Abb. 2:	Schematische Darstellung der Abläufe zum Verständnis der Anti-Tumor-Immunität..	10
Abb. 3:	Übersicht über die Hauptformen des Zelltods.....	12
Abb. 4:	Darstellung des Wirkprinzips der PDT.....	15
Abb. 5:	Darstellung des Prozesses der Photosensibilisierung durch ein Jablonski-Diagramm..	16
Abb. 6:	Strukturformel des THPTS-Moleküls.....	20
Abb. 7:	Darstellung des Prinzips der Immunfluoreszenz (IF).....	26
Abb. 8:	Etablierung der CD8-Immunhistologie.....	30
Abb. 9:	Etablierung der CD4-Immunhistologie.....	31
Abb. 10:	Darstellung des Scanprozesses.....	32
Abb. 11:	Schematische Übersicht der Scanaufnahmen der verschiedenen Harnblasen- und Tumorbereich.....	33
Abb. 12:	Erstellung des ROIs zum Bereich Tumorrand.....	35
Abb. 13:	Datenerhebung mittels der programmierten Fiji-Software.....	35
Abb. 14:	Immunfluoreszenz Doppelmarkierungen im Tumorzentrum.....	39
Abb. 15:	Immunfluoreszenz Doppelmarkierungen im Tumorrand.....	40
Abb. 16:	Immunfluoreszenz Doppelmarkierungen in verschiedenen Tumorarealen.....	41
Abb. 17:	Einzelanalyse der Dichte der CD45 <sup>+</sup> Zellen in den verschiedenen Arealen.....	42
Abb. 18:	Einzelanalyse der Dichte der CD3 <sup>+</sup> Zellen (Rb Ak) in den verschiedenen Arealen.....	43
Abb. 19:	Einzelanalyse der Dichte der CD3 <sup>+</sup> Zellen (Ms Ak) in den verschiedenen Arealen.....	44
Abb. 20:	Einzelanalyse der Dichte der CD8 <sup>+</sup> Zellen in den verschiedenen Arealen.....	45
Abb. 21:	Einzelanalyse der Dichte der CD4 <sup>+</sup> Zellen in den verschiedenen Arealen.....	46
Abb. 22:	Einzelanalyse der Dichte der CD19 <sup>+</sup> Zellen in den verschiedenen Arealen.....	47
Abb. 23:	Analyse der Dichte der CD45 <sup>+</sup> /CD3 <sup>+</sup> Zellen in den verschiedenen Arealen.....	48
Abb. 24:	Analyse der Dichte der CD3 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> Zellen in den verschiedenen Arealen.....	49
Abb. 25:	Analyse der Dichte der CD3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> Zellen in den verschiedenen Arealen.....	50

## 9.2 Tabellen

Tabelle 1:	Übersicht über ausgewählte DAMPs und Wirkung auf die Anti-Tumor-Immunität.....	14
Tabelle 2:	Übersicht über ausgewählte PS.....	17
Tabelle 3:	Übersicht zu publizierten und laufenden klinischen Studien zur PDT des Harnblasenkarzinom.....	19
Tabelle 4:	Reagenzien.....	23
Tabelle 5:	Puffer und Lösungen .....	23
Tabelle 6:	Verbrauchsmaterialien .....	23
Tabelle 7:	Verwendete Geräte.....	24
Tabelle 8:	Verwendete Software.....	24
Tabelle 9:	Verwendete Antikörper.....	24
Tabelle 10:	Protokoll Doppelimmunfluoreszenz-Färbungen in Paraffinschnitten der Rattenharnblase.....	27
Tabelle 11:	Zielstrukturen der verwendeten Antikörper.....	28
Tabelle 12:	Etablierte Antikörper und deren Kombination.....	29
Tabelle 13:	Datensatz.....	37
Tabelle 14:	Daten der statistischen Analyse zum Vergleich der Immunzell-dichte.....	50
Tabelle 15:	Daten der post-Hoc-Analyse zum Vergleich der Immunzell-dichte.....	54
Tabelle 16:	Daten der statistischen Analyse zum Vergleich der CD3-Ms-AK-Markierungen.....	54

## 10 Literaturverzeichnis

1. International Agency for Research on Cancer. Bladder. 2020.
2. International Agency for Research on Cancer. World. 2020.
3. Robert Koch-Institut. Krebs in Deutschland für 2017/2018. 2021.
4. European Association of Urology. Guideline Muscle-Invasive-Bladder-Cancer. 2022.
5. Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA*. 2011;306:737–45. doi:10.1001/jama.2011.1142.
6. van Osch FH, Jochems SH, van Schooten FJ, Bryan RT, Zeegers MP. Quantified relations between exposure to tobacco smoking and bladder cancer risk: a meta-analysis of 89 observational studies. *Int J Epidemiol*. 2016;45:857–70. doi:10.1093/ije/dyw044.
7. Liu S, Yang T, Na R, Hu M, Zhang L, Fu Y, et al. The impact of female gender on bladder cancer-specific death risk after radical cystectomy: a meta-analysis of 27,912 patients. *Int Urol Nephrol*. 2015;47:951–8. doi:10.1007/s11255-015-0980-6.
8. European Association of Urology. Guideline Non-Muscle-invasive-Bladder-Cancer. 2022.
9. Leitlinienprogramm Onkologie. S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms: Version 2.0. AWMF online. 2020.
10. Benner C, Greenberg M, Shepard N, Meng MV, Rabow MW. The Natural History of Symptoms and Distress in Patients and Families Following Cystectomy for Treatment of Muscle Invasive Bladder Cancer. *THE JOURNAL OF UROLOGY*. 2014;Vol. 191:937–42. doi:10.1016/j.juro.2013.10.101.
11. 17-5 Immune response to cancer have similarities with those to virus infected cells. In: Parham P, editor. *The immune system: Fourth edition*. 4th ed. New York, Abingdon: Garland Science; 2015. p. 514–515.
12. Raskov H, Orhan A, Christensen JP, Gögenur I. Cytotoxic CD8+ T cells in cancer and cancer immunotherapy. *Br J Cancer*. 2021;124(2):359–67. doi:10.1038/s41416-020-01048-4.
13. 5-6 T-cell receptors recognize peptide antigens bound to MHC molecules. In: Parham P, editor. *The immune system: Fourth edition*. 4th ed. New York, Abingdon: Garland Science; 2015. p. 121.
14. 5-7 Two classes of MHC molecules present peptide antigens to two types of t cell. In: Parham P, editor. *The immune system: Fourth edition*. 4th ed. New York, Abingdon: Garland Science; 2015. p. 122–123.
15. 8-2 Dendritic cells are adept and versatile at processing pathogen antigens. In: Parham P, editor. *The immune system: Fourth edition*. 4th ed. New York, Abingdon: Garland Science; 2015. p. 202–203.
16. 8-9 Activation of naive CD4 T cells gives rise to effector CD4 T cells with distinctive helper functions. In: Parham P, editor. *The immune system: Fourth edition*. 4th ed. New York, Abingdon: Garland Science; 2015. p. 211–213.
17. 8-10 The cytokine environment determines which differentiation pathway a naive t cell takes. In: Parham P, editor. *The immune system: Fourth edition*. 4th ed. New York, Abingdon: Garland Science; 2015. p. 213–214.
18. 8-12 Naive CD8 T cells require stronger activation than naive CD4 T cells. In: Parham P, editor. *The immune system: Fourth edition*. 4th ed. New York, Abingdon: Garland Science; 2015.
19. 8-16 Cytotoxic CD8 T cells are selective and serial killers of target cells at sites of infection. In: Parham P, editor. *The immune system: Fourth edition*. 4th ed. New York, Abingdon: Garland Science; 2015. p. 222–223.
20. 8-17 Cytotoxic T cells kill their target cells by inducing apoptosis. In: Parham P, editor. *The immune system: Fourth edition*. 4th ed. New York, Abingdon: Garland Science; 2015. p. 223–224.

21. Garg AD, Dudek AM, Agostinis P. Cancer immunogenicity, danger signals, and DAMPs: what, when, and how? *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*. 2013;Volume 39, Number 4:355–67. doi:10.1002/biof.1125.
22. Ma Y, Pitt JM, Li Q, Yang H. The renaissance of anti-neoplastic immunity from tumor cell demise. *Immunol Rev*. 2017;280:194–206. doi:10.1111/imr.12586.
23. Garg AD, Agostinis P. Molecular and Translational Classifications of DAMPs in Immunogenic Cell Death. *Front. Immunol*. 2015. doi:10.3389/fimmu.2015.00588.
24. Philip M, Fairchild L, Sun L, Horste EL, Camara S, Shakiba M, et al. Chromatin states define tumour-specific T cell dysfunction and reprogramming. *Nature*. 2017;545:452–6. doi:10.1038/nature22367.
25. Hiam-Galvez KJ, Allen BM, Spitzer MH. Systemic immunity in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2021;21:345–59. doi:10.1038/s41568-021-00347-z.
26. Allen BM, Hiam KJ, Burnett CE, Venida A, DeBarge R, TenVooren I, et al. Systemic dysfunction and plasticity of the immune macroenvironment in cancer models. *Nat Med*. 2020;26:1125–34. doi:10.1038/s41591-020-0892-6.
27. Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstien B. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin. Cancer Res*. 2003;9(2):606–12.
28. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019;43:582–92. doi:10.1002/cbin.11137.
29. Martin SJ, Henry CM. Distinguishing between apoptosis, necrosis, necroptosis and other cell death modalities. *Methods*. 2013;61:87–9. doi:10.1016/j.ymeth.2013.06.001.
30. Vanden Berghe T, Grootjans S, Goossens V, Dondelinger Y, Krysko DV, Takahashi N, Vandenabeele P. Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. *Methods*. 2013;61:117–29. doi:10.1016/j.ymeth.2013.02.011.
31. Pasparakis M, Vandenabeele P. Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*. 2015;517:311–20. doi:10.1038/nature14191.
32. Murao A, Aziz M, Wang H, Brenner M, Wang P. Release mechanisms of major DAMPs. *Apoptosis*. 2021;26:152–62. doi:10.1007/s10495-021-01663-3.
33. Ahmed A TS. Targeting immunogenic cell death in cancer. *Molecular Oncology*. 2020;14:2994–3006. doi:10.1002/1878-0261.12851.
34. Garg AD, Agostinis P. Cell death and immunity in cancer: From danger signals to mimicry of pathogen defense responses. *Immunol Rev*. 2017;280:126–48. doi:10.1111/imr.12574.
35. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin*. 2011;61:250–81. doi:10.3322/caac.20114.
36. Hernandez C, Huebener P, Schwabe RF. Damage-associated molecular patterns in cancer: a double-edged sword. *Oncogene*. 2016;35:5931–41. doi:10.1038/onc.2016.104.
37. Garg AD, Galluzzi L, Apetoh L, Baert T, Birge RB, Bravo-San Pedro JM, Breckpot K, Brough D, Chaurio R, Cirone M, Coosemans A, Coulie PG, De Ruyscher D, Dini L, de Witte P, Dudek-Peric AM, Faggioni A, Fucikova J, Gaipf US, Golab J, Gougeon ML, Hamblin MR, Hemminki A, Herrmann M, Hodge JW, Kepp O, Kroemer G, Krysko DV, Land WG, Madeo F, Manfredi AA, Mattarollo SR, Maueroder C, Merendino N, Multhoff G, Pabst T, Ricci JE, Riganti C, Romano E, Rufo N, Smyth MJ, Sonnemann J, Spisek R, Stagg J, Vacchelli E, Vandenabeele P, Vandenberk L, Van den Eynde BJ, Van Gool S, Velotti F, Zitvogel L, Agostinis P. Molecular and Translational Classifications of DAMPs in Immunogenic Cell Death. *Front Immunol*. 2015;6:588:1–24. doi:10.3389/fimmu.2015.00588.
38. Radic M, Marion T, Monestier M. Nucleosomes Are Exposed at the Cell Surface in Apoptosis. *J Immunol*. 2004;172:6692–700. doi:10.4049/jimmunol.172.11.6692.
39. Panaretakis T, Kepp O, Brockmeier U, Tesniere A, Bjorklund AC, Chapman DC, Durchschlag M, Joza N, Pierron G, van Endert P, Yuan J, Zitvogel L, Madeo F, Williams DB, Kroemer G.

- Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J.* 2009;28(5):578–90. doi:10.1038/emboj.2009.1.
40. Li X. The inducers of immunogenic cell death for tumor immunotherapy. *Tumori.* 2018;104:1–8. doi:10.5301/tj.5000675.
  41. Zindel J, Kubes P. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation. *Annu Rev Pathol.* 2020;15:493–518. doi:10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032847.
  42. Li L, Goedegebuure SP, Gillanders WE. Preclinical and clinical development of neoantigen vaccines. *Annals of Oncology.* 2017;28:xii11-xii17. doi:10.1093/annonc/mdx681.
  43. Hamblin MR, Abrahamse H. Factors Affecting Photodynamic Therapy and Anti-Tumor Immune Response. *Anticancer Agents Med Chem.* 2021;21:123–36. doi:10.2174/1871520620666200318101037.
  44. Mroz P, Hashmi JT, Huang YY, Lange N, Hamblin MR. Stimulation of anti-tumor immunity by photodynamic therapy. *Expert Rev Clin Immunol.* 2011;7:75–91. doi:10.1586/eci.10.81.
  45. Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, Saczko J, Kędzierska E, Knap-Czop K, et al. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2018;106:1098–107. doi:10.1016/j.biopha.2018.07.049.
  46. Yoon I, Li JZ, Shim YK. Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. *Clin Endosc.* 2013;46:7–23. doi:10.5946/ce.2013.46.1.7.
  47. Xue LY, Chiu SM, Azizuddin K, Joseph S, Oleinick NL. The Death of Human Cancer Cells Following Photodynamic Therapy: Apoptosis Competence is Necessary for Bcl-2 Protection but not for Induction of Autophagy. *Photochemistry and Photobiology.* 2007;83:1016–23. doi:10.1111/j.1751-1097.2007.00159.x.
  48. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part two— cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 2005;2:1–23. doi:10.1016/S1572-1000(05)00030-X.
  49. Almeida RD, Manadas BJ, Carvalho AP, Duarte CB. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004;1704(2):59–86. doi:10.1016/j.bbcan.2004.05.003.
  50. Granville DJ, McManus BM, Hunt DW. Photodynamic therapy: shedding light on the biochemical pathways regulating porphyrin-mediated cell death. *Histol. Histopathol.* 2001;16(1):309–17. doi:10.14670/HH-16.309.
  51. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one— photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 2004;1:279–93. doi:10.1016/S1572-1000(05)00007-4.
  52. Moan J, Berg K, Kvam E, Western A, Malikt Z, Ruck A, Schneckenburger H. Intracellular localization of photosensitizers. 1989;146:95–107. doi:10.1002/9780470513842.ch7.
  53. Shi X, Zhang CY, Gao J, Wang Z. Recent advances in photodynamic therapy for cancer and infectious diseases. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2019;11(5):e1560. doi:10.1002/wnan.1560.
  54. Noh I, Lee D, Kim H, Jeong CU, Lee Y, Ahn JO, Hyun H, Park JH, Kim YC. Enhanced Photodynamic Cancer Treatment by Mitochondria-Targeting and Brominated Near-Infrared Fluorophores. *Adv Sci (Weinh).* 2017;5(3):1700481. doi:10.1002/advs.201700481.
  55. 5.1 Tetrahydroporphyrine (THP) als neue Photosensibilisatoren. In: Schastak S, editor. *Habilitationschrift: Experimentelle Untersuchungen zur minimal-invasiven photodynamischen Therapie von Tumoren und antibiotika-resistenten Bakterien: Medizinische Fakultät Universität Leipzig; 2009.* p. 37–39.
  56. Korbelik M. PDT-associated host response and its role in the therapy outcome. *Lasers Surg Med.* 2006;38:500–8. doi:10.1002/lsm.20337.

57. Rocha LB, Gomes-da-Silva LC, Dąbrowski JM, Arnaut LG. Elimination of primary tumours and control of metastasis with rationally designed bacteriochlorin photodynamic therapy regimens. *Eur J Cancer*. 2015;51(13):1822–30. doi:10.1016/j.ejca.2015.06.002.
58. Morrison SA, Hill SL, Rogers GS, Graham RA. Efficacy and safety of continuous low-irradiance photodynamic therapy in the treatment of chest wall progression of breast cancer. *J Surg Res*. 2014;192:235–41. doi:10.1016/j.jss.2014.06.030.
59. Gollnick SO, Evans SS, Baumann H, Owczarczak B, Maier P, Vaughan L, Wang WC, Unger E, Henderson BW. Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation. *Br J Cancer*. 2003;88(11):1772–9. doi:10.1038/sj.bjc.6600864.
60. Falk-Mahapatra R, Gollnick SO. Photodynamic Therapy-Induced Cyclooxygenase 2 Expression in Tumor-Draining Lymph Nodes Regulates B-Cell Expression of Interleukin 17 and Neutrophil Infiltration. *Photochemistry and Photobiology*. 2022;98(5):1207–14. doi:10.1111/php.13601.
61. Korbelik M KG. Enhanced macrophage cytotoxicity against tumor cells treated with photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 1994;60(5):497–502. doi:10.1111/j.1751-1097.1994.tb05140.x.
62. Korbelik M SJ. Photodynamic therapy-generated vaccine for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2006;900–9. doi:10.1007/s00262-005-0088-4.
63. Turubanova VD, Balalaeva IV, Mishchenko TA, Catanzaro E, Alzeibak R, Peskova NN, et al. Immunogenic cell death induced by a new photodynamic therapy based on photosens and photodithazine. *J Immunother Cancer*. 2019;7:350. doi:10.1186/s40425-019-0826-3.
64. Mroz P, Szokalska A, Wu MX, Hamblin MR. Photodynamic therapy of tumors can lead to development of systemic antigen-specific immune response. *PLoS One*. 2010;5:e15194. doi:10.1371/journal.pone.0015194.
65. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:295–307. doi:10.1038/nri1806.
66. Castano AP, Hamblin MR. Anti-tumor immunity generated by photodynamic therapy in a metastatic murin tumor model. *Proc. SPIE*. 2005;5695:7–16. doi:10.1117/12.589340.
67. Kabingu E, Vaughan L, Owczarczak B, Ramsey KD, Gollnick SO. CD8+ T cell-mediated control of distant tumours following local photodynamic therapy is independent of CD4+ T cells and dependent on natural killer cells. *Br J Cancer*. 2007;96:1839–48. doi:10.1038/sj.bjc.6603792.
68. Prout GR, Lin CW, Benson R, Nseyo UO, Daly JJ, Griffin PP, Kinsey J, Tian M, Lao Y, Mian YZ, Chen X, Ren FM, . Photodynamic Therapy with Hematoporphyrin Derivative in the Treatment of Superficial Transitional-Cell Carcinoma of the Bladder. *N Engl J Med*. 1987;312:1251–5. doi:10.1056/NEJM198711123172003.
69. Uchibayashi T, Koshida K, Kunimi K, Hisazumi H. Whole bladder wall photodynamic therapy for refractory carcinoma in situ of the bladder. *Br J Cancer*. 1995;71(3):625–8. doi:10.1038/bjc.1995.122.
70. Berger AP, Steiner H, Stenzl A, Akkad T, Bartsch G, Holtl L. Photodynamic therapy with intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid for patients with recurrent superficial bladder cancer: a single-center study. *Urology*. 2003;61:338–41. doi:10.1016/s0090-4295(02)02123-4.
71. Skyrme RJ, French AJ, Datta SN, Allman R, Mason MD, Matthews PN. A phase-1 study of sequential mitomycin C and 5-aminolaevulinic acid-mediated photodynamic therapy in recurrent superficial bladder carcinoma. *BJU Int*. 2005;95:1206–10. doi:10.1111/j.1464-410X.2005.05506.x.
72. Bader MJ, Stepp H, Beyer W, Pongratz T, Sroka R, Kriegmair M, Zaak D, Welschhof M, Tilki D, Stief CG, Waidelich R. Photodynamic therapy of bladder cancer - a phase I study using hexaminolevulinate (HAL). *Urol Oncol*. 2013;31(7):1178–83. doi:10.1016/j.urolonc.2012.02.007.
73. Kulkarni GS, Lilge L, Nesbitt M, Dumoulin-White RJ, Mandel A, Jewett MAS. A Phase 1b Clinical Study of Intravesical Photodynamic Therapy in Patients with Bacillus Calmette-Guérin-

- unresponsive Non-muscle-invasive Bladder Cancer. *Eur Urol Open Sci.* 2022;41:105–11. doi:10.1016/j.euros.2022.04.015.
74. Kaspler P, Lazic S, Forward S, Arenas Y, Mandel A, Lilge L. A ruthenium(ii) based photosensitizer and transferrin complexes enhance photo-physical properties, cell uptake, and photodynamic therapy safety and efficacy. *Photochem Photobiol Sci.* 2016;15(4):481–95. doi:10.1039/c5pp00450k.
75. ClinicalTrials.gov. PDT Bladder Cancer. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Bladder+Cancer&term=PDT&cntry=&state=&city=&dist=>. Accessed 29 Nov 2022.
76. First Affiliated Hospital Xi'an Jiaotong University. Blue Laser -5ala Photodynamic Therapy (PDT) in High-Risk Non-muscle Invasive Bladder Cancer (NMIBC) Patients (BL-PDT-RCT). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05547516?term=PDT&cond=Bladder+Cancer&draw=2&rank=1>. Accessed 29 Nov 2022.
77. Theralase Inc. Intravesical Photodynamic Therapy (PDT) in BCG Refractory/Intolerant Non-Muscle Invasive Bladder Cancer (NMIBC) Patients. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03945162?term=PDT&cond=Bladder+Cancer&draw=2&rank=3>. Accessed 29 Nov 2022.
78. Schastak S, Jean B, Handzel R, Kostenich G, Hermann R, Sack U, Orenstein A, Wang YS, Wiedemann P. Improved pharmacokinetics, biodistribution and necrosis in vivo using a new near infra-red photosensitizer: tetrahydroporphyrin tetratosylat. *J Photochem Photobiol B.* 2005;78(3):203–13. doi:10.1016/j.jphotobiol.2004.11.006.
79. Neuhaus J, Schastak S, Berndt M, Walther J, Dietel A, Sieger N, Stolzenburg JU. Die photodynamische Therapie des Harnblasenkarzinoms: Eine neue Option. *Urologe.* 2013;52:1225–32. doi:10.1007/s00120-013-3306-2.
80. Berndt-Paetz M, Weimann A, Sieger N, Schastak S, Riyad YM, Griebel J, et al. Tetrahydroporphyrin-tetratosylat (THPTS): A near-infrared photosensitizer for targeted and efficient photodynamic therapy (PDT) of human bladder carcinoma. An in vitro study. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 2017;18:244–51. doi:10.1016/j.pdpdt.2017.02.017.
81. Walther J, Schastak S, Dukic-Stefanovic S, Wiedemann P, Neuhaus J, Claudepierre T. Efficient photodynamic therapy on human retinoblastoma cell lines. *PLoS One.* 2014:e87453. doi:10.1371/journal.pone.0087453.
82. Berndt-Paetz M, Schulze P, Stenglein PC, Weimann A, Wang Q, Horn LC, Riyad YM, Griebel J, Hermann R, Glasow A, Stolzenburg JU, Neuhaus J. Reduction of Muscle-Invasive Tumors by Photodynamic Therapy with Tetrahydroporphyrin-Tetratosylat in an Orthotopic Rat Bladder Cancer Model. *Mol Cancer Ther.* 2019;18(4):743–50. doi:10.1158/1535-7163.MCT-18-1194.
83. Stenglein PC. Dissertationsschrift: Immunstimulierende Effekte der Photodynamischen Therapie des Harnblasenkarzinoms mit dem Photosensitizer THPTS im orthotopen Rattenmodell: Medizinische Fakultät Universität Leipzig; 2019.
84. Boorman GA (ed). *Pathology of the Fischer rat: Reference and atlas*, San Diego, Calif; 1990.
85. Cohen SM, Yang JP, Jacobs JB, Arai M, Fukushima S, Friedell GH. Transplantation and cell culture of rat urinary bladder carcinoma. *Invest Urol.* 1981;19:136–41.
86. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, ... Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods.* 2012;9(7):676–82. doi:10.1038/nmeth.2019.
87. Schmidt U, Weigert M, Broaddus C, Myers G. Cell Detection with Star-Convex Polygons. In *Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention.* 2018:265–73. doi:10.1007/978-3-030-00934-2\_30.
88. Buchholz TO, Prakash M, Schmidt D, Krull A, Jug F. DenoiSeg: Joint Denoising and Segmentation. *ECCV 2020: European Conference on Computer Vision.* 2020:1–12.

89. El Khatib S, Berrahmoune S, Leroux A, Bezdetnaya L, Guillemin F, D'Hallewin MA. A novel orthotopic bladder tumor model with predictable localization of a solitary tumor. *Cancer Biology & Therapy*. 2006;5:1327–31. doi:10.4161/cbt.5.10.3214.
90. Xiao Z, McCallum TJ, Brown KM, Miller GG, Halls SB, Parney I, Moore RB. Characterization of a novel transplantable orthotopic rat bladder transitional cell tumour model. 1999;81(4):638–46. doi:10.1038/sj.bjc.6690741.
91. Immunhistochemie 12.1 Prinzip. In: Lang G, editor. *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. 2nd ed. Wien; 2013. p. 270.
92. Immunhistochemie 12.7.3 Sekundäre Antikörper / Brückenantikörper. In: Lang G, editor. *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. 2nd ed. Wien; 2013. p. 285.
93. Immunhistochemie 12.4.2 Fluorochrome. In: Lang G, editor. *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. 2nd ed. Wien; 2013.
94. Immunhistochemie 12.4.3 Biotin. In: Lang G, editor. *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. 2nd ed. Wien; 2013. p. 276–277.
95. Immunhistochemie 12.4.4 Enzymkonjugierte Polymere. In: Lang G, editor. *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. 2nd ed. Wien; 2013.
96. BD Biosciences. *CD Marker Handbook*. 2010.
97. Caza T LS. Functional and Phenotypic Plasticity of CD4(+) T Cell Subsets. *Biomed Res Int* 2015. doi:10.1155/2015/521957.
98. Chiericato K, Zanon C, Castegnaro S, Bernardi M, Amati E, Sella S, Rodeghiero F, Astori G. The cytotoxic action of the CD56+ fraction of cytokine-induced killer cells against a K562 cell line is mainly restricted to the natural killer cell subset. *Blood Transfus*. 2017;15(1):93–100. doi:10.2450/2016.0263-15.
99. Groen B, Links TP, Lefrandt JD, van den Berg PP, de Vos P, Faas MM. Aberrant Pregnancy Adaptations in the Peripheral Immune Response in Type 1 Diabetes: A Rat Model. *PLoS One*. 2013;8(6):e65490. doi:10.1371/journal.pone.0065490.
100. Jiang Q, Fu Q, Chang Y, Liu Z, Zhang J, Xu L, Zhu Y, Wang Y, Zhang W, Xu J. CD19+ tumor-infiltrating B-cells prime CD4+ T-cell immunity and predict platinum-based chemotherapy efficacy in muscle-invasive bladder cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2019;68(1):45–56. doi:10.1007/s00262-018-2250-9.
101. Kapuscinski J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech Histochem*. 1995;70(5):220–33. doi:10.3109/10520299509108199.
102. Jiang Q, Fu Q, Chang Y, Liu Z, Zhang J, Le X, et al. CD19+ tumor-infiltrating B-cells prime CD4+ T-cell immunity and predict platinum-based chemotherapy efficacy in muscle-invasive bladder cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2019;68:45–56. doi:10.1007/s00262-018-2250-9.
103. Krpina K, Babarović E, Dorđević G, Fuckar Z, Jonjić N. The association between the recurrence of solitary non-muscle invasive bladder cancer and tumor infiltrating lymphocytes. *Croat Med J*. 2012;53:598–604. doi:10.3325/cmj.2012.53.598.
104. Melssen M, Slingluff C. Vaccines targeting helper T cells for cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 2017;47:85–92. doi:10.1016/j.coi.2017.07.004.
105. Valdes-Mora F, Handler K, Law AMK, Salomon R, Oakes SR, Ormandy CJ, Gallego-Ortega D. Single-Cell Transcriptomics in Cancer Immunobiology: The Future of Precision Oncology. *Front Immunol*. 2018;9:2582:1–30. doi:10.3389/fimmu.2018.02582.
106. Caza T LS. Functional and Phenotypic Plasticity of CD4+ T Cell Subsets. *Biomed Res Int*. 2015;2015:521957:1–13. doi:10.1155/2015/521957.
107. Mahdavejad L, Alahgholi-Hajibehzad M, Eftekharian MM, Zaerighane Z, Salehi I, Hajilooi M, Mahaki H, Zamani A. Extremely Low Frequency Electromagnetic Fields Decrease Serum Levels of Interleukin-17, Transforming Growth Factor- $\beta$  and Downregulate Foxp3 Expression in the Spleen. *J Interferon Cytokine Res*. 2018;38(10):457–62. doi:10.1089/jir.2018.0048.



108. Aierken A XP. Bacterial respiratory tract inflammation in neonatal rat model is attenuated by benzofuran through inhibition of GATA3. *Microb Pathog.* 2018;125:313–7. doi:10.1016/j.micpath.2018.09.043.
109. Ma ZG, Dai J, Yuan YP, Bian ZY, Xu SC, Jin YG, et al. T-bet deficiency attenuates cardiac remodelling in rats. *Basic Res Cardiol.* 2018;113:19. doi:10.1007/s00395-018-0678-x.
110. Adam C, King S, Allgeier T, Braumüller H, Lüking C, Mysliwietz J, Kriegeskorte A, Busch DH, Röcken M, Mocikat R. DC-NK cell cross talk as a novel CD4+ T-cell-independent pathway for antitumor CTL induction. *Blood.* 2005;106(1):338–44. doi:10.1182/blood-2004-09-3775.
111. Kates M, Nirschl T, Sopko NA, Matsui H, Kochel CM, Reis LO, Netto GJ, Hoque MO, Hahn NM, McConkey DJ, Baras AS, Drake CG, Bivalacqua TJ. Intravesical BCG induces CD4+ T-Cell Expansion in an Immune Competent Model of Bladder Cancer. *Cancer Immunol Res.* 2017;5(7):594–603. doi:10.1158/2326-6066.CIR-16-0267.
112. Pfannstiel C, Strissel PL, Chiappinelli KB, Sikic D, Wach S, Wirtz RM, Wullweber A, Taubert H, Breyer J, Otto W, Worst T, Burger M, Wullich B, Bolenz C, Fuhrich N, Geppert CI, Weyerer V, Stoehr R, Bertz S, Keck B, Erlmeier F, Erben P, Hartmann A, Strick R, Eckstein M. The Tumor Immune Microenvironment Drives a Prognostic Relevance That Correlates with Bladder Cancer Subtypes. *Cancer Immunol Res.* 2019;7(6):923–38. doi:10.1158/2326-6066.CIR-18-0758.
113. Korbely M, Dougherty GJ. Photodynamic therapy-mediated immune response against subcutaneous mouse tumors. *Cancer Res.* 1999;59(8):1941–6.
114. Canti G, Lattuada D, Nicolini A, Taroni P, Valentini G, Cubeddu R. Antitumor immunity induced by photodynamic therapy with aluminum disulfonated phthalocyanines and laser light. *Anticancer Drugs.* 1994;5(4):443–7. doi:10.1097/00001813-199408000-00009.
115. Montfort A, Pearce O, Maniati E, Vincent BG, Bixby L, Böhm S, et al. A Strong B-cell Response Is Part of the Immune Landscape in Human High-Grade Serous Ovarian Metastases. *Clinical Cancer Research.* 2017;23:250–62. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0081.
116. Pylayeva-Gupta Y, Das S, Handler JS, Hajdu CH, Coffre M, Korolov SB, Bar-Sagi D. IL35-Producing B Cells Promote the Development of Pancreatic Neoplasia. *Cancer Discov.* 2016;6:247–55. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0843.
117. Gomer CJ, Ferrario A, Murphree AL. The effect of localized porphyrin photodynamic therapy on the induction of tumour metastasis. *Br J Cancer.* 1987;56(1):27–32. doi:10.1038/bjc.1987.147.
118. Oudejans JJ, Jiwa NM, Kummer JA, Ossenkoppele GJ, van Heerde P, Baars JW, Kluijn PM, Kluijn-Nelemans JC, van Diest PJ, Middeldorp JM, Meijer CJ. Activated cytotoxic T cells as prognostic marker in Hodgkin's disease. *Blood.* 1997;89(4):1376–82.
119. Preise D, Oren R, Glinert I, Kalchenko V, Jung S, Scherz A, Salomon Y. Systemic antitumor protection by vascular-targeted photodynamic therapy involves cellular and humoral immunity. *Cancer Immunol Immunother.* 2009;58(1):71–84. doi:10.1007/s00262-008-0527-0.
120. Liakou CI, Narayanan S, Ng Tang D, Logothetis CJ, Sharma P. Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human bladder cancer. *Cancer Immun.* 2007;7:10:1–6.
121. Jacobs JLL, Characiejus D, Pašukonienė V, Jankevičius F, van Moorselaar JAR, Mauricas M, Otter W den. Recurrences of Superficial Bladder Carcinoma are Associated with a Raise of CD8high>CD57+ and CD8low T Lymphocytes in Peripheral Blood. *The Open Cancer Immunology Journal.* 2010;3:8–14. doi:10.2174/1876401001003010008.
122. Jiang Q, Fu Q, Chang Y, Liu Z, Zhang J, Le X, et al. CD19+ tumor-infiltrating B-cells prime CD4+ T-cell immunity and predict platinum-based chemotherapy efficacy in muscle-invasive bladder cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2019;68:45–56. doi:10.1007/s00262-018-2250-9.
123. Wu J, Abraham SN. The Roles of T cells in Bladder Pathologies. *Trends Immunol.* 2021;42:248–60. doi:10.1016/j.it.2021.01.003.

124. Hamsch P, Istomin YP, Tzerkovsky DA, Patties IA, Neuhaus J, Kortmann RD, et al. Efficient cell death induction in human glioblastoma cells by photodynamic treatment with Tetrahydroporphyrin-Tetratosylat (THPTS) and ionizing irradiation. *Oncotarget*. 2017;8:72411–23. doi:10.18632/oncotarget.20403.
125. Krombach J, Hennel R, Brix N, Orth M, Schoetz U, Ernst A, et al. Priming anti-tumor immunity by radiotherapy: Dying tumor cell-derived DAMPs trigger endothelial cell activation and recruitment of myeloid cells. *Oncol Immunology*. 2019;8:e1523097. doi:10.1080/2162402X.2018.1523097.
126. Zhu M, Yang M, Zhang J, Yin Y, Fan X, Zhang Y, et al. Immunogenic Cell Death Induction by Ionizing Radiation. *Front Immunol*. 2021;12:705361. doi:10.3389/fimmu.2021.705361.
127. Bao R, Wang Y, Lai J, Zhu H, Zhao Y, Li S, et al. Enhancing Anti-PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint Inhibitory Cancer Therapy by CD276-Targeted Photodynamic Ablation of Tumor Cells and Tumor Vasculature. *Mol Pharm*. 2019;16:339–48. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.8b00997.
128. Duan X, Chan C, Guo N, Han W, Weichselbaum RR, Lin W. Photodynamic Therapy Mediated by Nontoxic Core-Shell Nanoparticles Synergizes with Immune Checkpoint Blockade To Elicit Antitumor Immunity and Antimetastatic Effect on Breast Cancer. *J Am Chem Soc*. 2016;138:16686–95. doi:10.1021/jacs.6b09538.
129. Kleinovink JW, Franssen MF, Löwik CW, Ossendorp F. Photodynamic-Immune Checkpoint Therapy Eradicates Local and Distant Tumors by CD8 + T Cells. *Cancer Immunology Research*. 2017;5:832–8. doi:10.1158/2326-6066.CIR-17-0055.
130. Xu J, Xu L, Wang C, Yang R, Zhuang Q, Han X, et al. Near-Infrared-Triggered Photodynamic Therapy with Multitasking Upconversion Nanoparticles in Combination with Checkpoint Blockade for Immunotherapy of Colorectal Cancer. *ACS Nano*. 2017;11:4463–74. doi:10.1021/acsnano.7b00715.
131. Zhu Z, Ma AH, Zhang H, Lin TY, Xue X, Farrukh H, Zhu S, Shi W, Yuan R, Cao Z, Chittepu VCSR, Prabhala R, Li Y, Lam KS, Pan CX. Phototherapy with Cancer-Specific Nanoporphyrin Potentiates Immunotherapy in Bladder Cancer. *Clin Cancer Res*. 2022;28(21):4820–31. doi:10.1158/1078-0432.CCR-22-1362.
132. Castano AP, Mroz P, Wu MX, Hamblin MR. Photodynamic therapy plus low-dose cyclophosphamide generates antitumor immunity in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:5495–500. doi:10.1073/pnas.0709256105.
133. Schastak S, editor. Habilitationsschrift: Experimentelle Untersuchungen zur minimal-invasiven photodynamischen Therapie von Tumoren und antibiotika-resistenten Bakterien: Medizinische Fakultät Universität Leipzig; 2009.

## 11 Anlagen

### 11.1 Färbeprotokolle

#### 11.1.1 Immunfluoreszenz Doppelmarkierung CD45/CD3

Arbeitsschritt		Dauer
Entparaffinieren und Hydrierung	2xXylol, 2xabs.ETOH, 1x96% ETOH, 1x70%ETOH	je 10min
Spülen	Aqua destilliert	5min
Antigendemaskierung	HIER-Puffer pH 9 kochen (Hitzebehandlung)	30min
	Schnitte im Puffer abkühlen lassen	20min bei Raumtemperatur
Waschen	PBS	10min
	Schnitte mit Fettstift umranden	
Waschen	TBS	10min
2. Aufschluss	DT-TBS	5min
Blocken	1% BSA in TBS mit Goat Normalserum 1:10	2h Raumtemperatur
Primäre AKs mit verschiedenen Wirten/ Isotyp beachten	in 1% BSA in TBS <b>CD45 (Rb) 1:200</b> <b>CD3 (Ms) 1:200</b>	Über Nacht bei 4°C
Spülen	TBS	3x10min
Sekundär-AK passend zu Primär-AKs auswählen	in TBS 1:500 <b>Alexa 555 (Goat anti Rb)</b> <b>IgM biotinyliert (Goat anti Ms)</b> <b>+ Streptavidin Alexa 488</b> 1:1000	45min Raumtemperatur  30min Raumtemperatur
Spülen	TBS	3x10 min
Kern-Gegenfärbung	<b>DAPI 1:5000</b>	10min Raumtemperatur
Spülen	TBS	3x10min
Spülen	Aqua	
Eindecken	Flüssiges Eindeckmittel / Confocal Matrix	

#### 11.1.2 Immunfluoreszenz Doppelmarkierung CD3/CD4

Arbeitsschritt		Dauer
Entparaffinieren und Hydrierung	2xXylol, 2xabs.ETOH, 1x96% ETOH, 1x70%ETOH	je 10min
Spülen	Aqua dest	5min
Antigendemaskierung	HIER-Puffer pH 9 kochen (Hitzebehandlung)	30min
	Schnitte im Puffer abkühlen lassen	20min bei Raumtemperatur
Waschen	PBS	10min
	Schnitte mit Fettstift umranden	
Waschen	TBS	10min
2. Aufschluss	DT-TBS	5min
Blocken	1% BSA in TBS mit Goat Normalserum 1:10	2h Raumtemperatur
Primäre Antikörper mit verschiedenen Wirten/ Isotyp beachten	in 1% BSA in TBS <b>CD4 (Rb) 1:50</b> <b>CD3 (Ms) 1:200</b>	Über Nacht bei Raumtemperatur, Nachbestellung CD4 bei 4°C
Spülen	TBS	3x10min

Sekundär-AK passend zu Primär- AKs auswählen	in TBS 1:500 <b>Alexa 555</b> (Goat anti Rb) <b>IgM biotinyliert</b> (Goat anti Ms) <b>+ Streptavidin Alexa 488</b> 1:1000	45min Raumtemperatur  30min Raumtemperatur
Spülen	TBS	3x10min
Kern-Gegenfärbung	<b>DAPI 1:5000</b>	10min Raumtemperatur
Spülen	TBS	3x10min
Spülen	Aqua	
Eindecken	Flüssiges Eindeckmittel / Confocal Matrix	

### 11.1.3 Immunfluoreszenz Doppelmarkierung CD3/CD8

Arbeitsschritt		Dauer
Entparaffinieren und Hydrierung	2xXylol, 2xabs.ETOH, 1x96% ETOH, 1x70%ETOH	je 10min
Spülen	Aqua destilliert	5min
Antigendemaskierung	HIER-Puffer pH 9 kochen (Hitzebehandlung)	30min
	Schnitte im Puffer abkühlen lassen	20min bei Raumtemperatur
Waschen	PBS	10min
	Schnitte mit Fettstift umranden	
Waschen	TBS	10min
2. Aufschluss	DT-TBS	5min
Blocken	1% BSA in TBS mit Goat Normalserum 1:10	2h Raumtemperatur
Primäre Antikörper mit verschiedenen Wirten/ Isotyp beachten	in 1% BSA in TBS <b>CD3 (Rb) 1:200</b> <b>CD8 (Ms) 1:200</b>	Über Nacht bei 4°C
Spülen	TBS	3x10min
Sekundär-AKs passend zu Primär- AKs auswählen	in TBS 1:500 <b>Alexa 555</b> (Goat anti Rb) <b>Alexa 488</b> (Goat anti Ms)	45min Raumtemperatur  <i>-da Kombination mit CD45/CD3, Zeitausgleich mit TBS-</i>
Spülen	TBS	3x10min
Kern-Gegenfärbung	<b>DAPI 1:5000</b>	10min Raumtemperatur
Spülen	TBS	3x10min
Spülen	Aqua	
Eindecken	Flüssiges Eindeckmittel / Confocal Matrix	

### 11.1.4 Immunfluoreszenz Einfachmarkierung CD19

Arbeitsschritt		Dauer
Entparaffinieren und Hydrierung	2xXylol, 2xabs.ETOH, 1x96% ETOH, 1x70%ETOH	je 10min
Spülen	Aqua dest	5min
Antigendemaskierung	HIER-Puffer pH 9 kochen (Hitzebehandlung)	30min
	Schnitte im Puffer abkühlen lassen	20min bei Raumtemperatur
Waschen	PBS	10min
	Schnitte mit Fettstift umranden	
Waschen	TBS	10min
2. Aufschluss	DT-TBS	5min
Blocken	1% BSA in TBS mit Goat Normalserum 1:10	2h Raumtemperatur

Primärer Antikörper mit verschiedenen Wirten/ Isotyp beachten	in 1% BSA in TBS <b>CD19 (Rb) 1:50</b>	über Nacht bei Raumtemperatur
Spülen	TBS	3x10min
Sekundäre AKs passend zu Primär- AKs auswählen	in TBS 1:500 <b>Alexa 555 (Goat anti Rb)</b>	45min Raumtemperatur <i>-da Kombination mit CD4/CD3, Zeitausgleich mit TBS-</i>
Spülen	TBS	3x10min
Kern-Gegenfärbung	<b>DAPI 1:5000</b>	10min Raumtemperatur
Spülen	TBS	3x10min
Spülen	Aqua	
Eindecken	Flüssiges Eindeckmittel / Confocal Matrix	

### 11.1.5 Lichtmikroskopie Standardprotokoll in der Etablierungsphase

<b>Arbeitsschritt</b>		<b>Dauer</b>
Entparaffinieren und Hydrierung	2xXylol, 2xabs.ETOH, 1x96% ETOH, 1x70%ETOH	je 10min
Spülen	Aqua dest	5min
Antigendemaskierung	HIER-Puffer pH 9 oder Citrat-Puffer pH 6 kochen (Hitzebehandlung)	30min
	Schnitte im Puffer abkühlen lassen	20min bei Raumtemperatur
Waschen	PBS	10min
	Schnitte mit Fettstift umranden	
Waschen	TBS	10min
2. Aufschluss	DT-TBS	5min
Blocken	1% BSA in TBS mit Goat Normalserum 1:10	2h Raumtemperatur
Primärer Antikörper mit verschiedenen Wirten/ Isotyp beachten	in 1% BSA in TBS <i>zu etablierende Antikörper in unterschiedlichen Verdünnungen</i>	über Nacht bei 4°C
Spülen	TBS	3x10min
Blocken der endogenen Peroxidase	Peroxide Block / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10min
Spülen	TBS	3x10min
Sekundärer Antikörper	biotinylierte sek. Antikörper 1:400 in TBS	30min Raumtemperatur
Spülen	TBS	3x10min
Vektor	Streptavidin Horseradish Peroxidase 1:1000 in TBS	30min
Spülen	TBS	3x10min
Chromogenfärbung	3,3'-Diaminobenzidin	5min
Spülen	Aqua	5min
Kernfärbung	Hämatoxylin Mayer + Bläuen mit Leitungswasser	4min+10min
Entwässern + Eindecken	1x70%ETOH, 1x96% ETOH, 2xabs.ETOH + Mountex	je 10min

## 12 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

10.04.2023

Datum



Unterschrift

## 13 Lebenslauf

Vincent Ricardo Johannes Eckert,  
geboren am 23.07.1997 in Halle (Saale),

### Ausbildung

seit 11/2022	Praktisches Jahr des Medizinstudiums
10/2022	2. Staatsexamen: Note 2,0
09/2018	1. Staatsexamen: Note 1,0
seit 10/2016	Studium der Humanmedizin an der Universität Leipzig
06/2016	Allgemeine Hochschulreife: Note 1,0
2004 - 2016	Grundschule Wippra und Wilhelm und Alexander von Humboldt Gymnasium Hettstedt

### Klinische Erfahrung

02/2021 – 03/2022	Famulaturen
Urologische Facharztpraxis	Dr.med. Ralf Eckert
Intensivmedizin	Helios Klinikum Hettstedt
Notarzteinsatzfahrzeug	Klinikum St. Georg Leipzig
Urologie	Universitätsklinikum Leipzig
Rechtsmedizin	Medizinische Fakultät, Universität Leipzig
Hausarztpraxis	Gemeinschaftspraxis Kopp, Dr. Rolle, Dr. Gneist, Anders, Hettstedt
09/2019 – 10/2020	Studentische Hilfskraft des Universitätsklinikums Leipzig, Urologie

### Forschungstätigkeit

09/2020	On-demand-Vortrag: Characterization of bladder cancers immune reaction caused by a novel photodynamic therapy (PDT) in an orthotopic rat model. 72. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie e.V.
10/2019 – 09/2020	zwei Urlaubssemester zur Durchführung der Versuche am Forschungslabor Urologie, Universitätsklinikum Leipzig
10/2019 – 04/2021	Werksstudent der Numares AG als klinische Assistenz bei der Prometheus-Studie am Universitätsklinikum Leipzig, Urologie
seit 03/2019	Promotion im Forschungslabor Urologie, Universitätsklinikum Leipzig unter Betreuung von Prof. Dr. Jochen Neuhaus und Dr. Mandy Berndt-Paetz

**Stipendien**

10/2019 – 09/2020

Promotionsförderung der Medizinischen Fakultät für die  
Urlaubssemester während der Versuche im Forschungslabor Urologie

seit 10/2018

Deutschlandstipendium der Universität Leipzig, Förderer: Prof. Dr.  
Andreas Roth und das Bundesministerium für Bildung und Forschung

**Sprachkenntnisse**

Englisch

fließend in Wort und Schrift

Französisch

Grundkenntnisse



---

Vincent Eckert

Leipzig, den 10.04.2023



## 14 Publikationen

*V. Eckert, M. Berndt-Paetz, P. Stenglein, P. Schulze, J.-U. Stolzenburg, J. Neuhaus;*

**Characterization of bladder cancers immune reaction caused by a novel photodynamic therapy (PDT) in an orthotopic rat model.** (Vortrag)

72. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie e.V.

## 15 Danksagung

**Ich danke dem Team des urologischen Forschungslabors**, Herrn. Prof. Dr. Jochen Neuhaus, Frau Dr. Mandy Berndt-Paetz und Frau Annett Weimann für die Begleitung auf dem Weg zu meiner wichtigsten Erkenntnis im Rahmen dieser Arbeit: Dass sich der Wert des wissenschaftlichen Arbeitens nicht in einem Titel begründet, sondern in dem Verständnis, was evidenzbasierte Medizin bedeutet, so neue Erkenntnisse stets als relativ anzusehen; letztlich die Möglichkeit, dazu einen kleinen Teil beizutragen.

**Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Jochen Neuhaus:** Du hast als Doktorvater meine selbstständige Arbeit gefördert, mich immer wieder neu gefordert und standest trotzdem bei Unklarheiten und Problemen jederzeit kurzfristig zur Entwicklung von Lösungen und Strategien bereit. Deine in meinen Lernprozess zur wissenschaftlichen Arbeit investierte Zeit war für mich nie selbstverständlich und ist so für mich rückblickend umso wertvoller. Dass echte wissenschaftliche Fortschritte auch Rückschläge erfordern, war für mich eine harte Erkenntnis, bei der du nie die Zuversicht in diese Arbeit verloren hast. Danke, für die jederzeit bestehende Möglichkeit zur Diskussion, die diese Arbeit erst vollends zu meiner eigenen werden ließ.

**Ich danke Frau Dr. rer. med. Mandy Berndt-Paetz:** Du hast mich als Ko-Betreuerin durch die schwierige Phase der Etablierung der Antikörper begleitet und so mit mir die Grundlage für diese Arbeit gelegt.

**Ich danke Frau Annett Weimann:** Du hast mir die Expertise für die Laborarbeit vermittelt. Du warst die erste Instanz, die jedes meiner Probleme aufnahm und für Vieles den einzig notwendigen Rat hatte. Für mich bist du das Herz des urologischen Forschungslabors.

**Ich danke Herrn Peter Schreiber:** Du hast diese Arbeit als einer der letzten in ihrer endgültigen Fassung gelesen und hoffentlich die meisten der orthographischen und grammatikalischen Fehler gefunden, die ich übersehen habe.

**Ich danke meinen Eltern, Dipl.-Med. Elgin Eckert und Dr. med. Ralf Eckert:** Ihr wart anfangs keine Befürworter der aufwändigen Laborarbeit und habt meine Entscheidung trotzdem jederzeit voll unterstützt, bei jedem Rückschlag mit mir gelitten und jeden Erfolg umso mehr gefeiert. Ihr habt mir den Weg zur Humanmedizin vorgelebt und doch nie erzwungen, sodass es mein eigener Weg wurde.

**Ich danke meiner Ehefrau Josephin Eckert:** Du warst es, die aufwachte, wenn ich nachts um 4 Uhr ins Labor musste, um das Mikroskop auszuschalten und erst wieder einschliefe, als ich wieder da war. Du musstest zurückstehen, wenn ich Abend um Abend und Wochenende um Wochenende an dieser Arbeit saß. Danke für dein Verständnis, die Kraft, die du mir dazu jederzeit ohne Bedingungen gegeben hast und dein offenes Ohr bei allen Herausforderungen. Diese Arbeit ist unser gemeinsamer Erfolg.

**Ich danke der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig**, die mit der Promotionsförderung die zwei notwendigen Urlaubssemester zur Fokussierung auf diese Arbeit ermöglichte und mich in meinem Entschluss zu eben diesen bestätigte.