Aus der Klinik für Urologie und Kinderurologie der Philipps-Universität Marburg
-Geschäftsführender Direktor: Univ.- Prof. Dr. R. Hofmann-

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Immunhistochemische Subtypisierung der lokalen lymphozytären Zellinfiltration und Expression von ICAM-1 nach instillativer Behandlung mit stimulativen CpG-ODN am orthotopen, murinen Harnblasenkarzinommodell

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Marwin Klebe

aus Lahn-Gießen

Marburg, 2021

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 19.07.2021

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekanin: Frau Prof. Dr. D. Hilfiker-Kleiner
Referent: Herr Prof. Dr. A. Hegele
1. Korreferent: Herr Prof. Dr. M. Kalder

Inhalt

1 Einleitung und Hintergrund 10

1.1 Einführung 10
1.2 Das Urothelkarzinom der Harnblase 11
1.2.1 Epidemiologie 11
1.2.2 Ätiologie 12
1.2.3 Tumorstaging und -grading 13
1.2.4 Genetik 14
1.2.5 Chirurgische Therapie 15
1.2.6 Rezidivprophylaxe 16
1.3 Immunologische Grundlagen 19
1.3.1 Bacillus Calmette-Guérin 19
1.3.2 Wirkmechanismus der intravesikalen BCG-Therapie 20
1.3.3 Pattern Recognition 22
1.3.4 CpG-Oligodesoxynukleotide 25
1.3.5 Wirkweise von CpG-ODN am TLR9 27
1.3.6 Intercelllular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) 30
1.4 Fragestellung 34

2 Material und Methoden 36

2.1 Materialien 36
2.1.1 Zellkultur 36
2.1.2 Tiermodell 37
2.1.3 Präparation und Anfertiung der Gefrierschnitte 38
2.1.4 Immunhistochemie 38
2.2 Methoden 40
2.2.1 Zellkultur 40
2.2.2 Tiermodell 43

2.2.3 Präparation und Anfertigung der Gefrierschnitte 49
2.2.4 Sekundärantikörper für CD3, CD8a, CD19 und CD54 (ICAM-1) 53
2.2.5 Sekundärantikörper und ABC-Reagenz für CD4 53
2.2.6 Farbreaktion mit DAB 54
2.2.7 Gegenfärbung mit Hämalaun.....54

3 Ergebnisse.....56

3.1 Beobachtungen bei der Zellkultur und Tierversuch 56
3.2 Beobachtungen beim Tierversuch 56
3.2.1 Allgemeine Beobachtungen.....56
3.2.2 Gewichtsverlauf.....57
3.2.3 Gruppenstärke und -verluste 59
3.3 Ergebnisse der Immunhistologie 60
3.3.1 Technisches Ergebnis 60
3.3.2 Detektion und Protokollierung von CD3, CD4 und CD8 und CD19 als lymphozytärer Oberflächenmarker.....60
3.3.3 Detektion von ICAM.....66

4 Diskussion 71

4.1 Versuchsreihe 1 – Subtypisierung der Lymphozyteninfiltration 72
4.2 Versuchsreihe 2 - Expression von ICAM-1 75

5 Zusammenfassung 78

6 Summary 81

7 Literaturverzeichnis 83

8 Anhang 92

8.1 Lebenslauf.....92
8.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer 93
8.3 Danksagung 94
8.4 Ehrenwörtliche Erklärung.....95

Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen-presenting Cell (antigenpräsentierende Zelle)
BCG	Bacillus Calmette Guerin
CAM	Cell adhesion molecule (Zelladhäsionsmolekül)
CD	Cluster of differentiation („Unterscheidungsgruppen“)
Cis	Carcinoma in situ
CpG-ODN	CpG-Oligodesoxynukleotid
cSMAC	Central supramolecular activation cluster (zentraler supramolekularer Adhäsionskomplex)
CTL	Cytotoxic T lymphocyte (zytotoxische T-Zelle)
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DC	Dendritic cell (dendritische Zelle)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EAU	European Association of Urology (Europäische Gesellschaft für Urologie)
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor)
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell (humane Nabelschnurvenenendothelzelle)
ICAM	Intercellular adhesion molecule (Interzelluläres Adhäsionsmolekül)
IFNα	Interferon α
IFNγ	Interferon γ
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IRAK	Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase

Abkürzungsverzeichnis

IRF7	Interferonregulierender Faktor
IS	Immunologische Synapse
IVC	Individual ventilated cage (Individuell ventilierter Käfig)
LAK	Lymphokinaktivierte Killerzelle
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1 (funktionelles Lymphozyten-Antigen 1)
LRR	Leucin-rich repeats (Leucin-reiches Motiv)
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88 (myeloischer Differenzierungsfaktor 88)
NK	Natürliche Killerzelle
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern (pathogen-assoziierte molekulare Muster)
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell (periphere mononukleäre Zellen)
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PD-1	Programmed cell death protein 1
PD-L1	Programmed death-ligand 1
pDC	Peripher dendritic cell (Periphere dendritische Zelle)
PRR	Pattern recognition receptor (Mustererkennungsrezeptor)
pSMAC	Peripher supramolecular activation cluster (Peripherer supramolekularer Adhäsionskomplex)
RPM	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SMAC	(Supramolecular activation cluster) supramolekularer Adhäsionskomplex
STIKO	Ständige Impfkommission
TCR	T-Cell Receptor (T-Zell-Rezeptor)

Abkürzungsverzeichnis

Th1	Typ-1-T-Helferzelle
Th2	Typ-2-T-Helferzelle
TIR	Toll/Interleukin-1-Rezeptor
TLR	Toll-like Receptor (Toll-ähnlicher Rezeptor)
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand (Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die TLR9 Rezeptor Familie. Nach spezifischer Bindung hochkonservierter PAMPs erfolgt in der intraplasmatischen Domäne über Adaptermoleküle die Auslösung einer Signalkaskade, an deren Ende insbesondere die Expression von Zytokinen steht (modifiziert nach Kawai & Akira 2006, Liu et al. 2007) 24

Abbildung 2: Transkriptionsaktivierende Signalwege nach TLR9-Stimulation. Von links nach rechts: Dimerisierung von IRF7, MAP-Kinase-Weg, NF-κB-Aktivierung (modifiziert nach Kawai & Akira, 2006).....28

Abbildung 3: Zellvermittelte Tumorimmunität (modifiziert nach Moynihan & Irvine, Cancer Research 2017).....30

Abbildung 4: T-Zell-Migration ins Zielgewebe. 1. Rollen: Selektinkomplexe verlangsamen die T-Zellen und versetzen sie in eine Rollbewegung. 2. Aktivierung: Von dendritischen Zellen ausgeschüttete Zytokine aktivieren die Integrine (z.B. LFA-1) auf der T-Zell-Oberfläche. 3. Adhäsion: CAMs (u.a. ICAM-1) binden fest an die aktivierten Integrine der T-Zelle. 4. Diapedese: Adhäsionskomplexe ermöglichen die Transmigration zwischen den Endothelzellen, auch hier ist ICAM-1/LFA-1 beteiligt. (modifiziert nach Iijima & Iwasaki 2015) 31

Abbildung 5: Schematischer Aufbau der immunologischen Synapse zwischen APC und T-Zelle (modifiziert nach Male, Immunology).....33

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 6: Katheterisierung der Tiere mit 24G-Venenverweilkanülen (eigenes Bildmaterial).....45

Abbildung 7: Instillation (eigenes Bildmaterial). 46

Abbildung 8: Entwicklung des Durchschnittsgewichtes in g nach Gruppen in Versuchsreihe 1 58

Abbildung 9: Entwicklung des Durchschnittsgewichtes in g nach Gruppen Versuchsreihe II 59

Abbildung 10: Bewertungsspiegel der mikroskopischen, semiqantitativen Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von CD3. 62

Abbildung 11: Bewertungsspiegel der mikroskopischen, semiqantitativen Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von CD4. 63

Abbildung 12: Bewertungsspiegel der mikroskopischen, semiqantitativen Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von CD8 64

Abbildung 13: Bewertungsspiegel der mikroskopischen, semiquantitativen Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von CD19 65

Abbildung 14: Immunhistochemisches Bild einer tumorfreien Blase nach CpG-ODN Instillation. Uro=Urothel, V=Gefäß, Pfeile= infiltrierende Leukozyten 67

Abbildung 15: Tumortragende Blase ohne CpG-ODN-Behandlung. 68

Abbildung 16: Tumortragende Blase nach CpG-ODN-Behandlung. 69

1 Einleitung und Hintergrund

1.1 Einführung

Mit seiner erheblichen Inzidenz und seinen hohen Rezidiv- und Progressionsraten hat das Urothelkarzinom der Harnblase eine herausragende Stellung unter den urologischen Tumorentitäten. Die Tatsache, dass die operative und radiochemotherapeutische Therapie lokal fortgeschrittener Stadien deutliche Eingriffe in die körperliche Integrität der betroffenen Patienten bedeutet und metastasierte Stadien meist keiner kurativen Therapie mehr zugänglich sind, erfordert eine frühe und suffiziente Diagnostik und Therapie.

Durch die Kombination der endourologischen Resektion mit einer aufgrund der anatomischen Gegebenheiten möglichen topischen, zytostatischen oder immunmodulatorischen Therapie konnte eine deutliche Senkung der Rezidivhäufigkeit erreicht werden. Eine darüberhinausgehende Progressionsprophylaxe mit der Vermeidung muskelinvasiver und metastasierender Stadien wird bisher allenfalls der instillativen Immuntherapie mit Bacillus Calmette-Guérin (BCG) zugeschrieben (Bohle & Bock, 2004), die 1976 von Morales eingeführt wurde (Morales et al, 1976). Die Datenlage ist hier jedoch nicht eindeutig, andere Studien zeigten diesbezüglich keine Überlegenheit (Malmstrom et al, 2009). Die Behandlung ist der intrakavitären zytostatischen Therapie auch in der Senkung des Rezidivrisikos überlegen (Malmstrom et al, 2009), diesem Vorteil steht jedoch eine deutlich erhöhte Toxizität entgegen.

Seit der Etablierung des Therapieschemas zu Beginn der 1980er Jahre konnte kein klinisch relevanter Fortschritt des Ansprechens in der Adjuvanz des nicht muskelinvasiven Urothelkarzinoms der Harnblase mehr erreicht werden. Trotz regelrecht durchgeführter BCG-Therapie kommt es bei nahezu 20% der Patienten mit pT1G3-Tumor innerhalb von 5 Jahren zu einem muskelinvasiven Stadium (Cambier et al, 2016). Hinzu kommt eine nicht unerhebliche Therapieabbruchrate, die in der Toxizität begründet liegt.
Auf der Suche nach dem weiterhin unklaren Wirkungsmechanismus von BCG wurden 1984 erstmalig CpG-Motive entdeckt (Tokunaga et al, 1984). Diese kurzen, bakterienspezifischen DNA-Sequenzen können eine Th1-gewichtete Immunantwort auslösen (Heeg & Zimmermann, 2000), die in der Lage ist, Tumorwachstum zu supprimieren.
Ein antineoplastischer Effekt konnte auch für das Urothelkarzinom im murinen subkutanen (Hegele et al, 2004) und orthotopen Modell nachgewiesen werden (Hegele et al, 2005).
In dieser Arbeit wird die Expression verschiedener zellulärer Oberflächenmarker an diesem Tiermodell immunhistochemisch untersucht, um die immunologischen Vorgänge im Tumorgewebe weiter zu erhellen.

1.2 Das Urothelkarzinom der Harnblase

1.2.1 Epidemiologie

Jährlich sterben in der Bundesrepublik Deutschland etwa 6000 Menschen an einem Harnblasenkarzinom.
Mit einer altersstandardisierten Inzidenz von 13,4:100 000 Fällen pro Jahr ist das Harnblasenkarzinom der fünfthäufigste maligne Tumor in Deutschland,

was 28.000 neuen Fällen im Jahr entspricht (Ferlay et al, 2015). Die Tendenz ist steigend; innerhalb der letzten 50 Jahre hat sich die Zahl der Neuerkrankungen verdoppelt. Männer sind etwa drei- bis viermal häufiger betroffen als Frauen, der Altersgipfel liegt bei 70 Jahren (Jocham et al, 2007).
Bei Erstdiagnose liegt in etwa 75% ein sogenanntes nicht-muskelinvasives Harnblasenkarzinom oder ein Carcinoma in situ vor (Ta, T1, Tis), 20% der Patienten haben zu diesem Zeitpunkt ein invasives, 5% bereits ein metastasiertes Harnblasenkarzinom.
Histologisch handelt es sich in 94% um Urothelkarzinome. Seltener kommen Plattenepithel- und Adenokarzinome vor, die keinen Bezug zu dem in dieser Arbeit eingesetzten MB49-Urothelkarzinommodell haben.

1.2.2 Ätiologie

Exogene Toxine spielen bei der Entstehung des Urothelkarzinoms eine übergeordnete Rolle und sind hervorragend erforscht. Schon 1895 postulierte Rehn bei Farbarbeitern, bei denen sich die Erkrankung häufig manifestierte, einen Zusammenhang mit Anilin (Dietrich & Dietrich, 2001). Seither wurden zahlreiche Kanzerogene identifiziert, von vielen sind aromatische und nichtaromatische Amine deren aktive Metaboliten (Kälble, 2001).
Auch die Urothelkarzinom-Zelllinie MB49 wurde ursprünglich durch Inkubation von murinen Urothelzellen mit 7,12-Dimethylbenzanthrazen induziert, ebenfalls einem aromatischen Fluorkohlenwasserstoff (Bohle et al, 1993).

1.2.3 Tumorstaging und -grading

Wie bei vielen malignen Erkrankungen ist für die Wahl der Therapie eine vorherige Stadienbestimmung notwendig. Die Tabelle illustriert die TNM-Klassifikation beim Urothelkarzinom der Harnblase (Brierley et al, 2017).

T	**Invasionstiefe**		
Tx	Primärtumor nicht beurteilbar		
Ta	Nichtinvasives papilläres Karzinom		Oberflächliches Harnblasenkarzinom
Tis	Carcinoma in situ (flaches Karzinom)		
T1	Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe		
T2a	Tumor infiltriert Muskularis	innere Hälfte	Muskelinvasives Harnblasenkarzinom
T2b		äußere Hälfte	
T3a	Tumor infiltriert perivesikales Fettgewebe	mikroskopisch	
T3b		makroskopisch	
T4a	Tumor infiltriert Nachbarorgane	Uterus, Vagina oder Prostata	
T4b		Becken/Bauchwand oder andere Organe	
N	**LK-Befall**		
N0	keine Lymphknotenmetastasen		
N1	Solitäre regionäre LK-Metastase		<2cm
N2	solitäre regionäre LK-Metastase		2-5cm
	oder multiple LK-Metastasen		5cm
N3	solitäre oder multiple regionäre LK-Metastasen		>5cm
M			
M0	keine Fernmetastasen		
M1	Fernmetastasen		

Außerdem ist eine Evaluation des Differenzierungsgrades erforderlich. Hier gibt es aktuell zwei Richtlinien der WHO, die parallel Verwendung finden:

WHO-Grading 1973

G	**Differenzierungsgrad**
GX	Differenzierungsgrad nicht bestimmbar
G1	hoch differenziertes Karzinom
G2	mäßig differenziertes Karzinom
G3	schlecht differenziertes Karzinom
G4	undifferenziertes Karzinom
Die Diagnose „Carcinoma in situ“ (Tis) setzt definitionsgemäß eine G3-Grading voraus.	

WHO-Grading 2004

Urotheliales Papillom
Papilläre urotheliale Neoplasie mit niedriger maligner Potenz (PUNLMP)
Papilläres urotheliales Low-Grade-Carcinom
Papilläres urotheliales High-Grade-Carcinom

Die Überarbeitung des Gradings von 2004 sollte eine klarere Unterscheidung bezüglich der Risikostratifizierung nicht-muskelinvasiver Urothelkarzinome bringen.
Viele klinische Empfehlungen, so auch die Leitlinien zum Urothelkarzinom der Europäischen Gesellschaft für Urologie (EAU), beruhen jedoch weiterhin auf der erprobten alten Klassifikation, so dass diese bis heute oft noch die klinisch gebräuchlichere ist (Babjuk et al, 2019).

1.2.4 Genetik

Das Urothelkarzinom weist je nach histologischem Wachstumsmuster unterschiedliche genetische Veränderungen auf. Die genomischen

Aberrationen nehmen generell mit der Invasivität des Tumors zu, man spricht von abnehmender genetischer Stabilität.
Bestimmte Alterationen sind mit der Invasivität des Tumors assoziiert. Hier ist beispielsweise die Mutation des p53-Tumorsuppressorgens zu nennen, die in der Mehrzahl der invasiven Tumoren, aber auch im Carcinoma in situ zu finden ist, das heute als Vorstufe invasiver Urothelkarzinome gilt.
Eine Verwertbarkeit der p53-Positivität als zuverlässiger prognostischer Marker bzw. gar als Entscheidungshilfe zur Wahl eines Therapieregimes konnte jedoch bisher nicht eindeutig belegt werden (Jocham et al, 2007).

1.2.5 Chirurgische Therapie

Bei Verdacht auf ein Urothelkarzinom der Harnblase ist für die histologische Sicherung und Stadieneinteilung eine Biopsie unerlässlich. Diese erfolgt endoskopisch durch eine transurethrale Resektion (TUR). Hierbei werden mit einer Elektroschlinge unter Sicht makroskopisch erkennbare Tumoranteile möglichst komplett abgetragen und, unter Umständen getrennt davon, eine Probe vom Tumorgrund entnommen, die bis zur Muscularis reichen muss. Nach histologischer Aufarbeitung können Informationen über die Tumorausdehnung (T) und den Differenzierungsgrad (G) getroffen werden. Im Falle eines intrainterventionellen Verdachtes auf eine inkomplette Resektion, eines Fehlens glatter Muskulatur im Präparat, eines schlechten Differenzierungsgrades (G3, außer bei Tis) oder eines Stadiums T1 wird eine Nachresektion im Abstand von 2-6 Wochen zum Ausschluss von Tumorresiduen bzw. eines „Understagings“ empfohlen. Bis zum Stadium T1 ist, eine R0-Resektion vorausgesetzt, mit der TUR die operative Therapie abgeschlossen und kurativ.
Wird ein muskelinvasives Wachstum festgestellt (pT≥2), ist die Indikation zur radikalen Zystektomie mit pelviner Lymphadenektomie gegeben; dies gilt auch

für rezidivierende, schlecht differenzierte T1-Tumoren und das rezidivierende, auf adjuvante Instillationstherapie mit Bacillus Calmette Guérin (BCG) nicht ansprechende Cis (sog. „BCG-Versager“).
Alternativ steht bei inoperablen Befunden die kombinierte Radiochemotherapie zur Verfügung.
Eine Indikation zur Blasenteilresektion beim muskelinvasiven Harnblasenkarzinom besteht nur im Einzelfall (z.B. bei solitären Befunden am Blasendach) und muss individuell sorgfältig geprüft (Witjes et al, 2019).

1.2.6 Rezidivprophylaxe

Nach transurethraler Resektion ist die 5-Jahres Rezidivrate hoch. Sie liegt bei einem kleinen, erstmalig diagnostizierten, hochdifferenzierten, monofokalen Ta-Tumor bereits bei über 30% und steigt bei einem multifokalen T1/G3-Tumor auf über 60% an (Sylvester et al, 2006).
Für einen Teil der Urothelkarzinomrezidive werden Reimplantationsvorgänge abgeschilferter Urothelkarzinomzellen sowie nach TUR verbleibende okkulte Mikrotumoren verantwortlich gemacht (Heney et al, 1983).
Daher sollten alle Patienten noch innerhalb von 24 Stunden nach dem Eingriff eine Instillations-Single-Shot-Chemotherapie erhalten (Kontraindikationen wie Perforation ausgenommen). Mit etwa äquivalenter Effektivität stehen hier Mitomycin C, Epirubicin und Doxirubicin zur Verfügung (Babjuk et al, 2019).
Die Empfehlung weiterer adjuvanter Therapieoptionen in Form einer fraktionierten Instillationstherapie hängt vom prognostischen Rezidiv- und Progressionsrisiko ab. Hochdifferenzierte Neubildungen neigen weniger zur Progression als zum Rezidiv, high-grade Tumoren sowohl als auch.
Das Risiko lässt sich anhand von Rezidiv- und Progression-Scores abschätzen. Der gebräuchliche EORTC-Risk-Score berücksichtigt die Charakteristika Zahl der Tumoren, Tumordurchmesser, Rezidivfrequenz, T-

Stadium, Existenz eines Begleit-Cis und Differenzierungsgrad, die für die Kategorien Rezidiv- und Progressionswahrscheinlichkeit jeweils mit Punkten bewertet werden. Mit den zu einem Gesamtscore summierten Punkten können über Tabellen die entsprechenden Wahrscheinlichkeiten vorausgesagt werden (Sylvester et al, 2006).

Basierend auf den Wahrscheinlichkeiten der EORTC-Scores erfolgt eine vereinfachte Einteilung der Tumoren in drei Risikogruppen, aus der sich die Indikation zu einer adjuvanten Instillationsbehandlung und die Auswahl des Therapeutikums ableiten lässt. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die risikoadaptierten Therapieempfehlungen nach den aktuellen Leitlinienempfehlungen (Babjuk et al, 2019).

Risikogruppe	*Definition*	*Therapieempfehlung*
Niedriges Risiko	Primärtumoren, unifokal, Ta, G1, <3cm, kein Cis	Einmalige instillative Chemotherapie nach TUR-B
Mittleres Risiko	Alle Tumoren, die nicht in eine der anderen Gruppen fallen und somit zwischen niedrigem und hohem Risiko liegen	Ein Jahr BCG-Instillationstherapie (Induktion und 3 wöchentliche Erhaltungszyklen nach 3,6 und 12 Monaten) oder instillative Chemotherapie für max. ein Jahr (optimales Schema unklar).
Hohes Risiko	Eines der folgenden Kriterien - T1 - G3 - Cis - Multiple und rezidivierende und große (>3cm) TaG1G2/Low-grade Tumoren	BCG Instillationstherapie mit Induktions- und Erhaltungszyklen für 1-3 Jahre oder Radikale Zystektomie

Als potentestes Instillationstherapeutikum steht BCG zur Verfügung. Es bewirkt die sicherste Rezidivprophylaxe und verhindert im Gegensatz zu instillativen Chemotherapeutika möglicherweise auch den Progress. Daher empfiehlt sich BCG zur Behandlung aller urothelialen Neoplasien ab einem intermediären Rezidiv- und Progressionsrisiko.

Meist wird BCG nach einem bereits vor fast 40 Jahren von Morales vorgeschlagenem Schema verabreicht: Auf eine wöchentliche Applikation in der Induktionsphase von 6 Wochen folgt eine 3-monatliche Wiederholung

eines halben Induktionszyklus für optimal 3 Jahre, mindestens aber 1 Jahr mit regelmäßigen cystoskopischen und ggf. bioptischen Kontrollen.
Wegen der starken Nebenwirkungen des BCG werden bei Tumoren der intermediären Risikogruppe auch die weniger effektiven Zytostatika empfohlen (Babjuk et al, 2019).

1.3 Immunologische Grundlagen

1.3.1 Bacillus Calmette-Guérin

Anfang des 20. Jahrhunderts experimentierten die französischen Forscher Albert Calmette und Camille Guérin mit Kulturen von Mykobakterien. Durch wiederholtes Passagieren von Mycobacterium bovis auf speziellen Nährböden gelang ihnen 1921 die Entwicklung des nach Ihnen benannten attenuierten Lebendimpfstoffes gegen Tuberkulose (Calmette, 1931). Vor allem nach dem 2. Weltkrieg wurde BCG weltweit eingesetzt. Im Laufe der Jahre entstanden durch die Weiterkultivierung zahlreiche Tochter-BCG-Stämme.
Die Impfung bietet leider nur einen relativen Schutz, häufig zeigen sich Nebenwirkungen. Vor dem Hintergrund einer rückläufigen Tuberkuloseinzidenz empfiehlt die Ständige Impfkommission (STIKO) daher seit 1998 die Impfung in Deutschland nicht mehr (Roland-Koch-Institut, 2013). Heute hat BCG aber, wie schon erwähnt, in einem ganz anderen Zusammenhang einen hohen Stellenwert. Die Grundlagen hierfür legte Morales, der 1976 erstmals Patienten mit nicht-muskelinvasivem Urothelkarzinom der Harnblase erfolgreich durch intravesikale Instillation von BCG behandelte (Morales et al, 1976). Seitdem haben sich zahlreiche Gruppen der Untersuchung der Wirkungsweise gewidmet. Wenn auch bis

heute der genaue Mechanismus nicht entschlüsselt werden konnte, so konnten doch einige Eckpunkte geklärt werden.

1.3.2 Wirkmechanismus der intravesikalen BCG-Therapie

Biopsieanalysen von Patienten lieferten Hinweise auf eine spezifisch-immunologische Reaktion, die mittlerweile vielfach belegt werden konnte.
Nach Instillation von BCG kommt es zunächst zu einer Migration von Granulozyten und mononukleären Zellen in die Blasenwand. Gleichzeitig findet eine verstärkte Ausschüttung von Zytokinen statt. Immunkompetente Zellen wie auch Zytokine treten wegen der direkten Nachbarschaft in den Urin über, weswegen sie außer im Blasengewebe selbst auch im Harn quantitativ bestimmt werden können. Eine Vielzahl von Zytokinen ist nach BCG-Therapie im Urin regelhaft in erhöhten Konzentrationen nachweisbar, dazu gehören Interferon γ (IFN-γ), Tumornekrosefaktor α (TNF-α), die Interleukine (IL) IL-1, IL-2, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, TNF-verwandter Apoptose-induzierender Ligand (TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) und der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF).
Dieses Milieu entspricht in weiten Teilen dem einer Th-1-gewichteten Immunantwort, d.h. einer in der Folge zellvermittelten Wirkweise (De Boer et al, 2003). IL-4, das typischerweise eine Th-2-Differenzierung induziert, kann nicht nachgewiesen werden. Jedoch finden sich einige Th2-typische Faktoren (z.B. IL-5 und IL-10) und auch solche, die keinem der beiden Subsets zugeordnet werden können.

Differenzierung muriner T-Helferzellen nach Zytokinmilieu	
Th1	**Th2**
IL-12	IL-4
IFNγ	IL-10
TNF-α	

Histologisch zeigt sich eine leukozytäre Infiltration der Blasenwand, die nach dem anfänglichen mononukleär/granulozytärem Einstrom von $CD4^+$-T-Lymphozyten dominiert wird. Während dieses Prozesses ändern nicht nur die eingewanderten Immunzellen, sondern interessanterweise auch die gesunden und malignen Urothelzellen ihre Oberflächenkonfiguration. Es kommt zu einer Expression von Aktivierungsmarkern wie MHC Klasse II, CD 28, CD 80 und ICAM-1.

Diese Veränderungen sind zeitlich nicht unmittelbar mit der Applikation des Medikamentes assoziiert, sondern halten noch Monate nach der letzten Behandlung an (Bohle & Brandau, 2003).

Durch tierexperimentelle Untersuchungen und *in-vitro*-Studien ließen sich weitere funktionell aussagekräftigere Ergebnisse gewinnen.

Bei athymischen Nacktmäusen schlug eine beim Wildtyp erfolgreiche BCG-Therapie fehl. Durch den Transfer von syngenen, BCG-sensitivierten Splenozyten wurde die Wirksamkeit jedoch wiederhergestellt. Ähnliche Beobachtungen konnten mit T-Zell- und NK-Zell-depletierten Tieren gemacht werden. Die Ergebnisse legen also eine entscheidende Funktion von T- und NK-Zellen nahe.

Auch IFNγ- sowie IL-12-Knockout-Mäuse zeigten keinerlei Therapieansprechen auf eine BCG-Instillationsbehandlung. Dies unterstreicht die Bedeutung der Th1-typischen Zytokine für die Wirksamkeit von BCG.

In-vitro-Experimente ergaben weitere Erkenntnisse. Einige Zytokine, die unter BCG-Einfluss z.B. von mononukleären und urothelialen Zellen produziert werden, bewirken direkt eine Tumorsuppression.

Daneben scheint jedoch auch die Th1-typische Aktivierung zytotoxischer Zellen eine Rolle zu spielen. Bestimmte aktivierte Lymphozyten besitzen die Fähigkeit Urothelkarzinomzellen in Kultur MHC-unrestringiert zu töten. Dies gilt z.B. für lymphokinaktivierte Killerzellen (LAK), die durch Stimulation von mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (peripher blood mononuclear cells, PBMC) mit IL-2 und TNFα erzeugt wurden, und die von Thanhäuser und Böhle beschriebene BCG-aktivierte Killerzelle, die ebenfalls aus PBMC durch BCG-Induktion generiert wird (Thanhauser et al, 1993). Für diese zytotoxische Wirkung bedarf es bestimmter Oberflächenmoleküle, die eine Adhäsion der Effektorzelle an ihr potentielles Ziel ermöglichen. Auf Seiten der mononukleären Zellen ist dies das funktionelle Lymphozyten-Antigen 1 (lymphocyte fuction-associated antigen 1, LFA-1). Es ist der Hauptligand für das unter BCG-Einfluss auf den Tumorzellen exprimierte interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 (Intercellular Adhesion Molecule 1, ICAM-1).
Trotz der Aufklärung zahlreicher Effekte der instillativen Therapie konnte nach wie vor nicht geklärt werden, welche Komponenten des BCG für dessen immunogene und damit antineoplastische Wirkung verantwortlich sind und wie die Erkennung durch das Immunsystem erfolgt.

1.3.3 Pattern Recognition

Antigenpräsentierende Zellen (antigen-presenting cells, APC) sind in der Lage, hochkonservierte Strukturen verschiedener Pathogene, sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) zu erkennen, wobei die Antigenbindung an Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptors, PRR) zu einer Aktivierung mit subsequenter Mehrexpression von bestimmten Zytokinen und Oberflächenproteinen führt. PAMP sind z.B. spezifische bakterielle Bestandteile wie Flaggellin, Lipopolysaccharide und Teichonsäure; auch

bakterielle DNA und die im Folgenden noch beschriebenen CpG-Oligodesoxynukleotide (CpG-ODN) zählen dazu.
APC stellen ein Verbindungsglied zur adaptiven Immunantwort dar, indem sie über Zytokine und Antigenpräsentation Lymphozyten aktivieren. Gleichzeitig wird die Endozytose und Prozessierung von Antigenen und deren Präsentation gegenüber den T-Zellen gesteigert.
APC sind in der Lage, Antigene auf MHC-Klasse II T-Helferzellen zu präsentieren, die dann über den T-Zell-Rezeptor (T-cell receptor, TCR) CD4 restringiert erkannt werden. Daneben existiert der Weg der Cross-Präsentation, hierbei werden von professionellen APC, insbesondere peripheren dendritischen Zellen (peripher dendritic cells, pDC) Antigene aufgenommen und CD8-positiven naiven cytotoxischen T-Zellen (cytotoxic T-cells, CTL) mittels MHC I präsentiert.
Folglich wird über eine PAMP-Erkennung eine weitere Immunantwort initiiert und aufrechterhalten sowie eine Antigenprozessierung, -präsentation und -erkennung ermöglicht. Dies ist von großer Bedeutung für die zellvermittelte Tumorimmunität, da es die Primäraktivierung von cytotoxischen T-Zellen im Falle einer gleichzeitigen Interaktion der professionellen APC mit CD4-positiven T-Zellen ermöglicht. Der Prozess wird als Lizensierung der APC zur CTL-Aktivierung bezeichnet.
Eine wichtige Gruppe der PRRs bilden die Toll-artigen Rezeptoren (Toll-like receptors, TLR, *Abb. 1*), so benannt wegen ihrer Ähnlichkeit zu Toll, einem erstmals bei Drosophilae identifizierten Protein, das in der Embryogenese essentiell für die Determination der dorsoventralen Polarität ist.
Bisher sind beim Säuger mindestens 13 Varianten unterschiedlicher Signifikanz bekannt, von denen sich die meisten auf der Zelloberfläche mononukleärer Zellen befinden(Male, 2005; Male, 2006; Murphy et al, 2018).

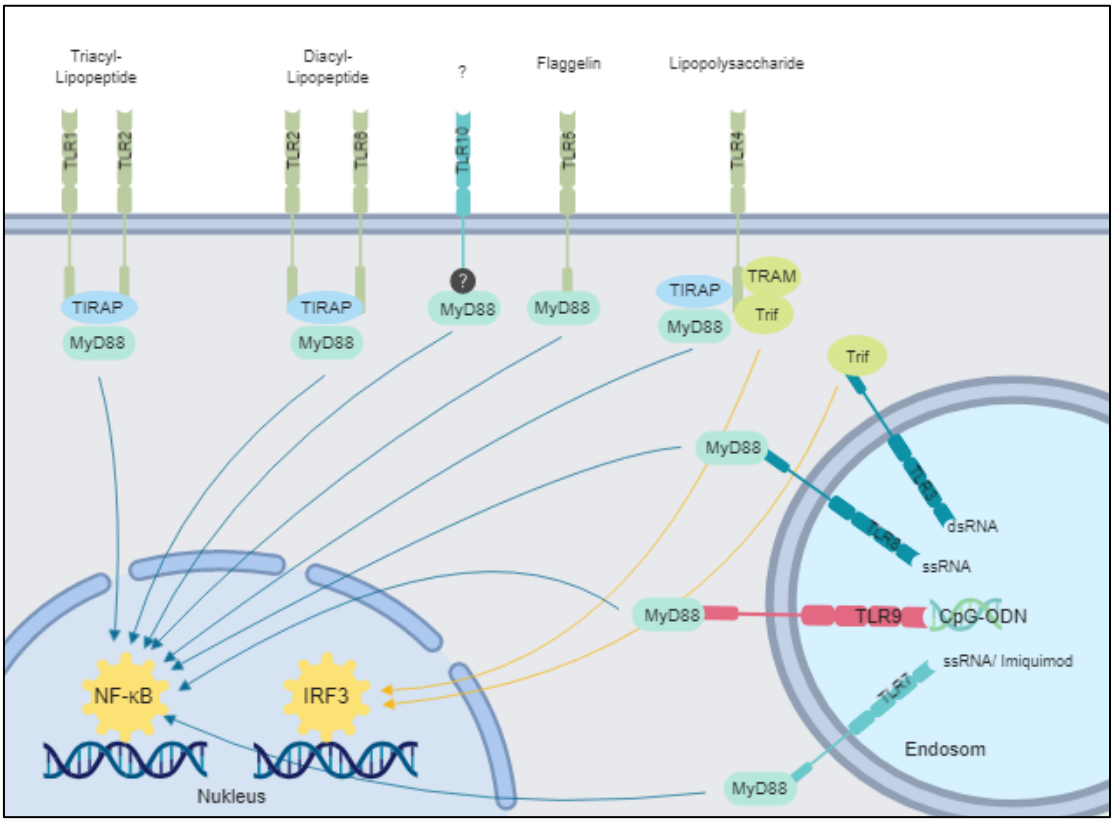


Abbildung 1: Die TLR9 Rezeptor Familie. Nach spezifischer Bindung hochkonservierter PAMPs erfolgt in der intraplasmatischen Domäne über Adaptermoleküle die Auslösung einer Signalkaskade, an deren Ende insbesondere die Expression von Zytokinen steht (modifiziert nach Kawai & Akira 2006, Liu et al. 2007)

Einige nukleinsäure-erkennende TLR, darunter der dem CpG-Motiv zugeordnete TLR9, befinden sich jedoch in den Membranen intrazellulärer Kompartimente. Möglicherweise ist eine enzymatische Freilegung der Nukleinsäuren vor einer Bindung an die entsprechenden Rezeptoren notwendig (Takeshita et al, 2001).

TLR bestehen aus einer Ektodomäne, die aus mehreren Blocks von Leucin-reichen Motiven (Leucin-rich repeats, (LRR) besteht, einer transmembranen α-Helix und als zytoplasmatischer Domäne dem Toll/Interleukin-1-Rezeptor (TIR), der die Signaltransduktion nach Antigenbindung übernimmt.

1.3.4 CpG-Oligodesoxynukleotide

Auf der Suche nach den immunogenen Teilen des BCG konnten Tokunaga et al. 1984 nachweisen, dass isolierte BCG-DNA ebenfalls eine Antitumorwirkung besitzt, die in ihrem Potential sogar die des BCG übertrifft. Andere Fraktionen des Bakteriums waren nicht oder kaum effektiv (Tokunaga et al, 1984). Einem klinischen Einsatz der gereinigten DNA stand jedoch die aufwendige Herstellung entgegen.

Im Jahr 1995 identifizierten Krieg et al. unmethylierte CpG-Motive als immunogene Bestandteile der bakteriellen DNA. Es handelt sich hierbei um Cytosin-(Phosphat)-Guanin-Sequenzen, die bei Prokaryonten im Vergleich zu Eukaryonten mit erhöhter Häufigkeit in der DNA festgestellt werden können und außerdem meist unmethyliert vorliegen. Mit synthetisch generierten Einzelstrang-CpG-ODN konnten ähnliche Immunreaktionen wie mit bakterieller DNA induziert werden (Krieg et al, 1995). Zur Erhöhung der Nukleaseresistenz enthalten therapeutische CpG-ODN in der Regel ein Phosphorthioesterrückgrat.

Es wurden verschiedene Klassen von CpG-ODN entwickelt, die nach den das CpG-Motiv flankierenden Basen, Modifikationen der Phosphat- und Zuckerreste des Rückgrats sowie der Sekundär- bzw. Tertiärstruktur unterschieden werden.

Ihr Effekt unterscheidet sich in der qualitativen und quantitativen Expression von Zytokinen und in der Stimulation der zellulären Immunantwort (Ballas et al, 2001).

Beim Menschen wurde eine starke Potenz des CG-Motives in folgendem Basenkontext festgestellt (Hartmann et al, 2000):

5'-Purinbase-Pyrimidinbase-C-G-Pyrimidinbase-Pyrimidinbase-3'.

Das entspricht z.B. der als optimal geltenden Hexamer-Sequenz

5’-G-T-C-G-T-T-3’

Da die TLR9-Struktur zwischen verschiedenen Spezies deutlich variiert, weicht auch die Nukleotidfolge, die im murinen Organismus eine maximale immunogene Effektivität erzielt, von diesem Schema ab (Bauer et al, 2001):

5’-G-A-C-G-T-T-3’

Die immunstimulatorische Wirkung von CpG-ODN wird mittlerweile in vielerlei Richtung erforscht (Krieg, 2012).
Teilweise experimentell, teilweise bereits in klinischen Studien wird der Einsatz in verschiedensten potentiellen Szenarien erprobt:

- als Adjuvanz bei etablierten Immuntherapien und Vakzinierungen
- in der Therapie von Autoimmunkrankheiten
- zur Verbesserung der körpereigenen Resistenzen gegen verschiedene Mikroorganismen
- allein oder in Kombination mit etablierten Behandlungsregimen in der Antitumortherapie.

Für die folgenden Versuche wurde CpG-ODN 1668 verwendet, die komplett über Phosporthioesterbindungen verknüpft sind und das Klasse-B typische Hexamermotiv 5’-GACGTT-3’ enthalten. Dieser CpG-ODN-Typ wurde bereits in verschiedenen Arbeiten im murinen Urothelkarzinommodell eingesetzt, wobei eine starke antineoplastische Wirkung nachgewiesen werden konnte (Hegele et al, 2004; Ninalga et al, 2005).

1.3.5 Wirkweise von CpG-ODN am TLR9

CpG-Motive, so auch CpG-ODN, werden durch den Toll-like Receptor 9 erkannt, der wie auch TLR-3, -7 und -8 im Unterschied zu den übrigen TLR endosomal lokalisiert ist.

CpG-ODN werden nach bisherigen Erkenntnissen ohne speziellen, aktiven Transportmechanismus endozytiert und binden im Endosom an die Ektodomäne von TLR9 (Hemmi et al, 2000).

Die zytoplasmatische Domäne des TLR-Moleküls wird aufgrund ihrer Analogie zur Endodomäne des Interleukin-1-Rezeptors auch als Toll/IL-1 Rezeptordomäne (TIR) bezeichnet. An die TIR binden an den unterschiedlichen TLRs verschiedene Adapterproteine, die über Signalkaskaden Transkriptionsfaktoren aktivieren.

Das Adapterprotein von TLR9 ist der myeloische Differenzierungsfaktor 88 (myeloid-differentiation-primary-response-88, MyD88), das die Interleukin-1-Rezeptor-aktivierten Kinasen (IRAK) 1, 2 und 4 rekrutiert. Über verschiedene Phosphorylierungsschritte werden drei Signalwege aktiviert (*Abb. 2*):

- der NF-κB-Pathway, der letztlich zu einer Aktivierung des nukleären Faktors κB (nuclear factor κB, NF-κB) führt,
- der MAP-Kinase-Weg, der in einer Aktivierung von Aktivatorprotein 1 (AP-1) mündet,
- die Dimerisierung des Interferon-regulierenden Faktors 7 (interferon regulatory factor 7, IRF7).

Die Endprodukte dieser Signalkaskaden stellen teilweise synergistisch wirkende Transkriptionsfaktoren dar. Diese wiederum fördern die Expression bestimmter Zytokine (z.B. IFNα, IL-12) (Kawai & Akira, 2006) aber auch die Transkription und Expression bestimmter Oberflächenmoleküle (El Kebir et al, 2009).

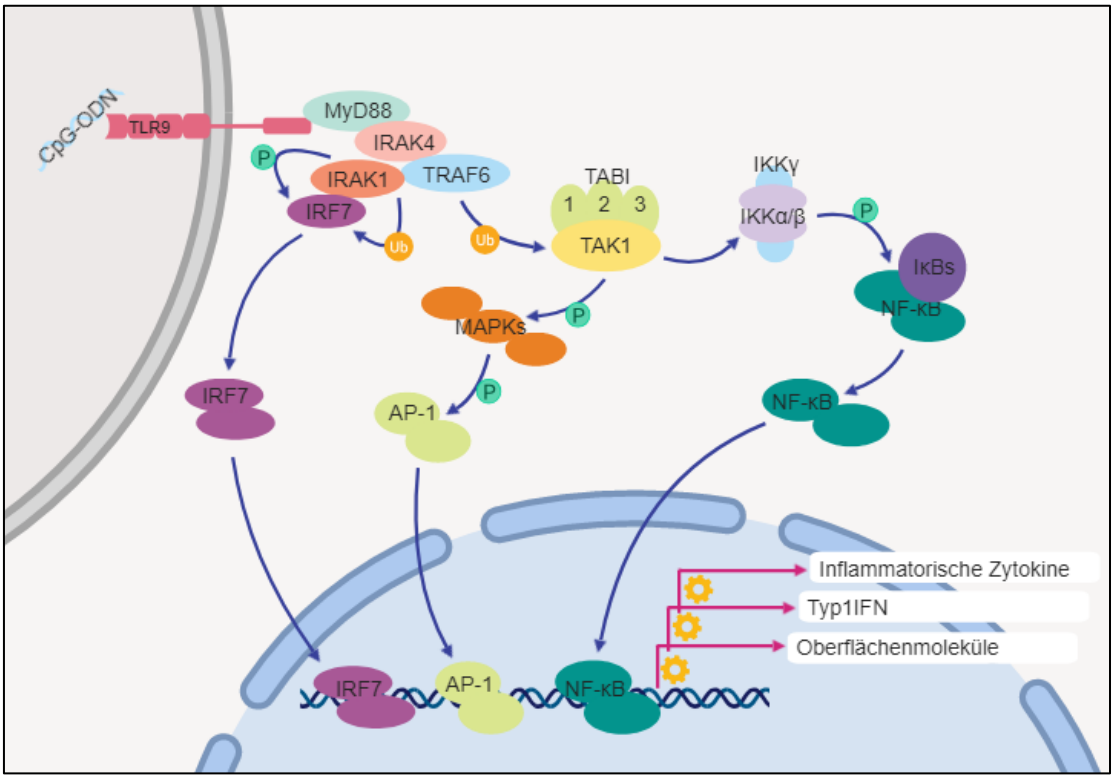


Abbildung 2: Transkriptionsaktivierende Signalwege nach TLR9-Stimulation. Von links nach rechts: Dimerisierung von IRF7, MAP-Kinase-Weg, NF-κB-Aktivierung (modifiziert nach Kawai & Akira, 2006)

Während man zunächst davon ausging, dass TLR9 beim Menschen nur von B-Zellen und plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) exprimiert wird, zeigen jüngere Arbeiten, dass TLR9 auch bei einer Vielzahl anderer Zellen nachgewiesen werden kann, z.B. in humanen und murinen Endothelien (El Kebir et al, 2009). Auch in gesunden menschlichen Urothel- und in Urothelkarzinomzellen werden verschiedene TLR, darunter auch TLR9, exprimiert (Ayari et al, 2011; LaRue et al, 2013).

Bereits vor Entdeckung des TLR9 wurde in verschiedenen Studien eine starke Th1-dominierte Immunantwort als Folge der CpG-Therapie in verschiedenen Zusammenhängen beschrieben, insbesondere eine erhöhte Produktion von IFNα und IL-12 (Klinman et al, 1996; Krieg, 2003).

Im murinen subkutanen Modell eines MB49-Tumors berichteten Ninalga et al. von einer im Vergleich zur Kontrollgruppe vielfach erhöhten Serumkonzentration von IL-12 als Folge einer repetetiven, lokalen CpG-ODN-

Behandlung. In der gleichen Arbeit konnte auch nachgewiesen werden, dass die Effektivität der antineoplastischen Wirkung T-Zell-abhängig ist: Wie auch BCG sind CpG-ODN bei athymischen Nacktmäusen nicht wirksam (Ninalga et al, 2005).
Unsere Arbeitsgruppe konnte ebenso eine direkte Hemmung der Proliferation von Tumorzellen der MB49-Linie *in vitro* ausschließen (Olbert et al, 2009).
Die CpG-ODN-Wirkung scheint also auf einer T-Zell-vermittelten, Th1-gewichteten Immunantwort zu beruhen.
Wenn auch die Effektorzelle bisher nicht sicher identifiziert werden konnte, so scheinen auch hier Natürliche Killerzellen (NK) und cytotoxische T-Zellen (CTL) eine Schlüsselrolle zu spielen (Abb.3). Für verschiedene solide Tumorentitäten im murinen Modell (Fibrosarkom AG104A, Fibrosarkom IE7, Melanom B16, Lungenkarzinom 3LL) ergaben sich bei CpG-ODN-Behandlung funktionell Hinweise für eine synergistische Wirkung von NK und CTL. Während eine alleinige CD8+-bzw. NK-Depletion bereits eine signifikante Einschränkung der Effektivität der Oligonukleotide zeigte, kam es nach kombinierter Depletion zu einer kompletten Aufhebung der Wirkung (Kawarada et al, 2001a).
Ähnliche Beobachtungen konnten auch in einem orthotopen C57/BL6/MB49 Modell gemacht werden, wie es in dieser Arbeit zum Einsatz kam. Auch hier konnte durch eine Depletion von NK- bzw. $CD8^+$-Zellen eine verringerte Wirksamkeit von CpG-ODN, insbesondere bei erneuter Konfrontation mit dem Tumor nach bereits erfolgreicher Therapie erzielt werden. Die Wirkung bei kombiniert depletierten Mäusen wurde hier jedoch nicht untersucht (Mangsbo et al, 2008).

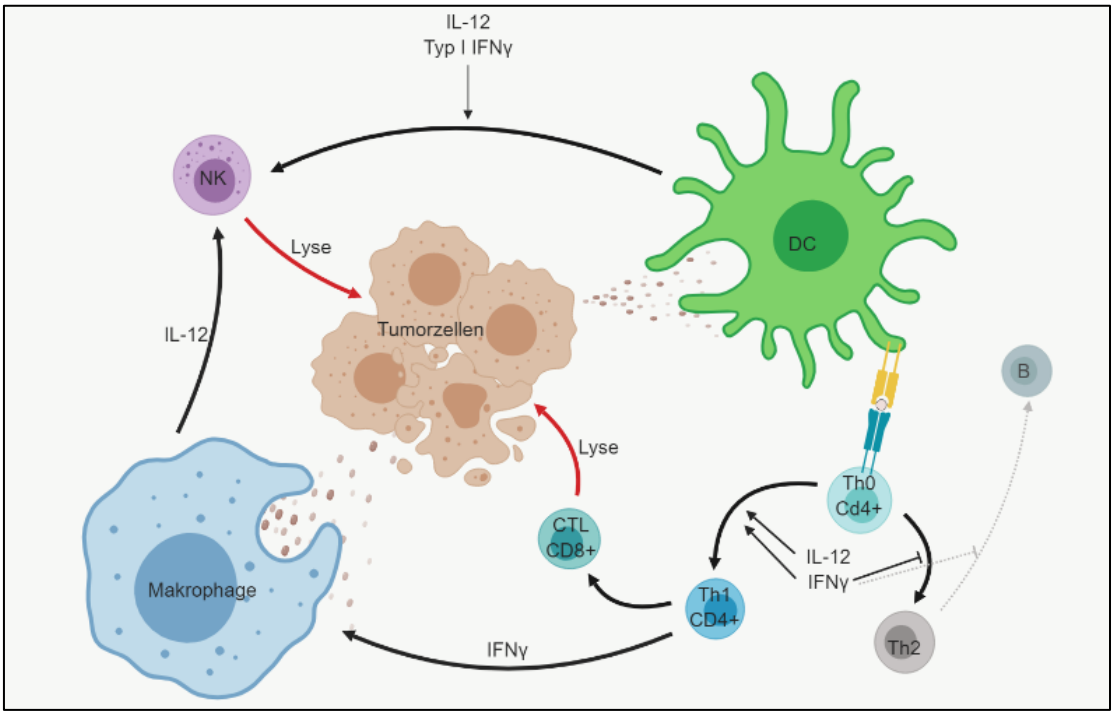


Abbildung 3: Zellvermittelte Tumorimmunität (modifiziert nach Moynihan & Irvine, Cancer Research 2017)

1.3.6 Intercelllular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1)

ICAM-1 (auch CD54) gehört zur Familie der zelluläre Adhäsionsmoleküle (celular adhesion molecules (CAM), einer Gruppe von Transmembranproteinen, die auf verschiedenen Körperzellen vorkommen. Auf der Zelloberfläche sind sie in der Lage Integrine zu binden, mit Ihrer Zytosol-Domäne sind sie im Zytoskelett verankert. Die CAMs werden teilweise konstitutiv exprimiert, teilweise durch inflammatorische Zytokine induziert (Male, 2006).

Vor der eigentlichen Interaktion von immunkompetenten Zellen untereinander und mit deren Zielen ist ein intensiver Kontakt notwendig. Das panleukozytäre LFA-1, das aus den Untereinheiten CD11a und CD18 aufgebaut ist, vermittelt

eine solche Adhäsion mit seinem Hauptliganden ICAM-1, weiterhin kann es auch ICAM-2 und ICAM-3 binden.

Durch verschiedene Zytokine oder PAMPs wie Lipopolysacchariden wird die Expression von ICAM-1 gesteigert (Hubbard & Rothlein, 2000; Roebuck & Finnegan, 1999; Stratowa & Audette, 1995). Das stimulierende Zytokinmilieu (IL12, IFNγ, TNF-α) entspricht dabei dem einer Th1-Polarisierung.

ICAM-1 wird zum Beispiel auf Endothelzellen inflammatorisch veränderter Gewebe exprimiert, was eine Migration immunkompetenter Zellen, z.B. T-Zellen und Phagozyten in das entsprechende Gewebe ermöglicht (Lyck & Enzmann, 2015)(*Abb.4*).

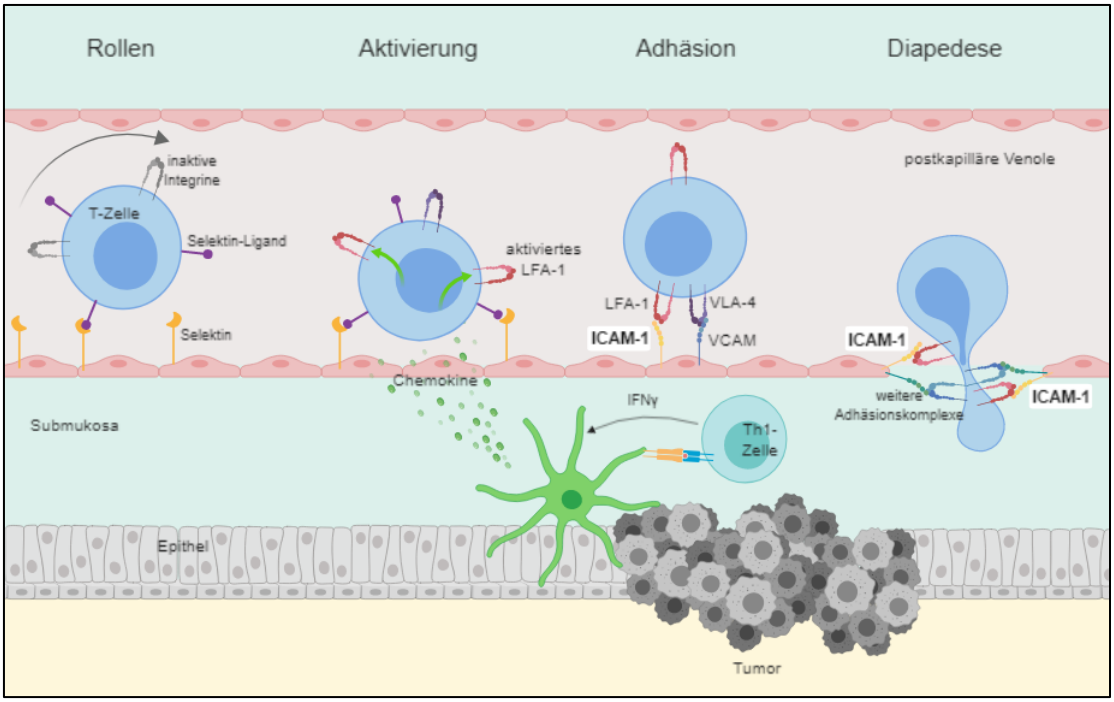


Abbildung 4: T-Zell-Migration ins Zielgewebe. 1. Rollen: Selektinkomplexe verlangsamen die T-Zellen und versetzen sie in eine Rollbewegung. 2. Aktivierung: Von dendritischen Zellen ausgeschüttete Zytokine aktivieren die Integrine (z.B. LFA-1) auf der T-Zell-Oberfläche. 3. Adhäsion: CAMs (u.a. ICAM-1) binden fest an die aktivierten Integrine der T-Zelle. 4. Diapedese: Adhäsionskomplexe ermöglichen die Transmigration zwischen den Endothelzellen, auch hier ist ICAM-1/LFA-1 beteiligt. (modifiziert nach Iijima & Iwasaki 2015)

In humanen Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVEC) wurde beispielsweise durch Stimulation mit CpG-ODN eine TLR9-vermittelte Mehrexpression von ICAM-1auf Transkriptionsebene über den NF-κB-Weg festgestellt (El Kebir et al, 2009). Die auch in dieser Arbeit verwendeten CpG-ODN 1668 konnten bei

murinen pulmonalen Endothelzellen *in-vitro* über einen NF-κB- und p38-MAPK-Signalweg eine ICAM-1-Mehrexpression hervorrufen. (Li et al, 2004).

Viele solide Tumoren supprimieren die endotheliale ICAM-1-Expression, wodurch die zellvermittelte Tumorimmunität des Organismus im Sinne einer „Immune-Escape-Strategie“ blockiert wird (Klein, 2018). Eine vermehrte ICAM-1-Expression auf Tumorgefäßen wurde bei verschiedenen Tumorentitäten mit einer günstigen Prognose assoziiert, eine Suppression mit einer Metastasierung (Bui et al, 2020; Harjunpaa et al, 2019).

Weiter ist es als Bestandteil der sog. immunologischen Synapse (IS), alternative Bezeichnung: supramolekularer Aktivierungskomplex (supramolecular activation cluster, SMAC) zwischen T-Zellen und deren Zielzellen sowie APC essenziell für eine effektive T-Zell-Aktivierung (Abb. 5). Vor einer Interaktion zwischen dem antigenbeladenen MHC-Komplex und dem TCR sowie mehreren kostimulatorischen Bindungen (z.B. MHC/CD4, B7/CD28) wird der Zell-Zellkontakt durch ringförmig angeordnete, membranständige Adhäsionsmoleküle hergestellt. Diese sind im peripheren Anteil (pSMAC) in erster Linie Komplexe aus ICAM-1 der APC-Oberfläche sowie LFA-1 auf Seiten der T-Zellen. Im Zentrum (cSMAC) kommt es dann zum MHC-Antigen/TCR-Kontakt (Dustin & Long, 2010). Mit PD-1 (programmed cell death protein 1), PD-L1 (PD-1-Ligand) und CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) sind weitere Bestandteile der IS bereits Zielmoleküle zugelassener Checkpoint-Inhibitoren (Dustin, 2014).

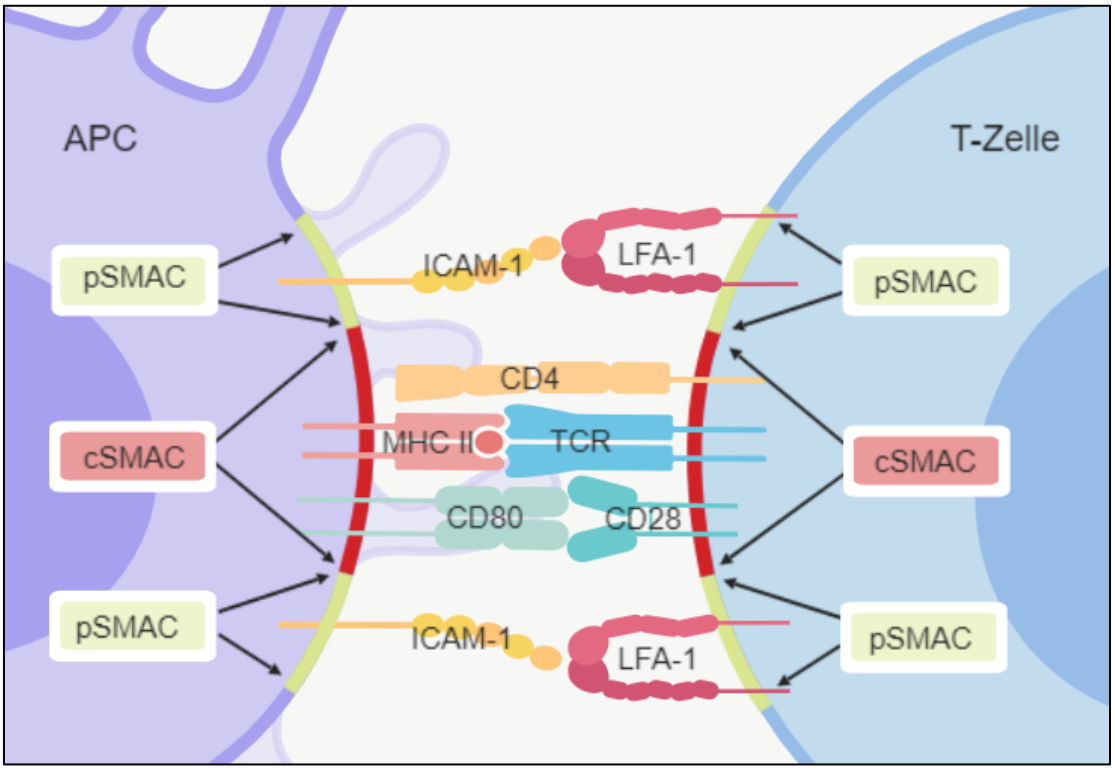


Abbildung 5: Schematischer Aufbau der immunologischen Synapse (IS) zwischen APC und T-Zelle (modifiziert nach Male, Immunology)

Weitere Arbeiten zeigten darüber hinaus eine zytokinunabhängige Beeinflussung der T-Zell-Polarisierung durch eine vermehrte ICAM-1/LFA-1-Komplexbildung. Eine Blockierung von ICAM-1 wie auch LFA-1 *in-vitro* reduzierte die Th1-polarisierende Wirkung von IL-12. Die T-Zell-Polarisierung scheint außer durch das Zytokinmilieu (insbesondere IL-4 und IL-12) auch durch Variation der Adhäsionskomplexe gesteuert zu werden (Smits et al, 2002; Verma et al, 2016).

Frühere Untersuchungen zeigten im Rahmen der instillativen BCG-Therapie eine vermehrte Expression von ICAM-1 u.a. auf den infiltrierenden mononukleären Zellen wie auch auf den Urothelzellen. Die Expression von ICAM ließ sich auch immunhistochemisch nachweisen (Ikeda et al, 2002; Jackson et al, 1994).

In weiteren *in-vitro* Versuchen konnte eine verminderte Zytotoxizität von durch BCG aktivierten Killerzellen gegenüber humanen Urothelkarzinomzellen nach Blockierung des ICAM-1 Rezeptors LFA-1 festgestellt werden. Bereits hier

wurde neben der essentiellen Rolle im Rahmen der Antigenpräsentation über MHC auch ein direkter Einfluss auf die Adhäsion cytotoxischer Effektorzellen an deren Ziele postuliert (Suttmann et al, 2002).

1.4 Fragestellung

In dieser Arbeit wird die zelluläre Immunantwort auf CpG-Desoxynukleotide, genauer der CpG-ODN B 1668, im mittlerweile etablierten, orthotopen BL6/MB49-Modell mit Hilfe immunhistologischer Methoden subtypisiert.
Nach Komplettierung eines im Folgenden näher ausgeführten Behandlungsschemas werden die Harnblasen der Tiere präpariert, Gefrierschnitte angefertigt, die dann immunhistologisch gefärbt werden.

Über die Darstellung der folgenden Oberflächenmarker soll eine Subtypisierung der infiltrierenden Lymphozyten in den Harnblasenwänden behandelter und nicht behandelter Mäuse mit orthotopem MB49-Tumor untersucht werden:

- **CD3** (TCR) als gängiger Oberflächenmarker sämtlicher T-Lymphozyten
- **CD4** (MHC-Klasse-II-Rezeptor) als Marker für T-Helferzellen
- **CD8** (MHC-Klasse-I-Rezeptor als Marker für CTL und NK
- **CD19** (B-Zell-Rezeptor) als Marker für B-Lymphozyten

Bei den behandelten Tieren wird weiterhin zwischen einer „Early“- und einer „Late-onset“-Gruppe differenziert, wobei erstere bereits am Tag nach Tumorimplantation eine instillative Behandlung erhielt, während die zweite erst an Tag 5 mit CpG-ODN therapiert wurde.
Hierbei stehen folgende Fragen im Vordergrund:

- Gibt es einen Unterschied bezüglich der lymphozytären Infiltration im Blasenstroma zwischen Placebo- und Verumgruppe?
- Verändert sich das T-Zell-Subsetting im Verlauf der Therapie („Early“- versus „Late-onset“)?
- Wo ist das Lymphozyteninfiltrat je nach Behandlungsregime lokalisiert?

Eine zweite Versuchsreihe widmet sich der immunhistochemischen Detektion von ICAM-1. Dessen vermehrte Expression spräche für Antigenpräsentationsvorgänge und würde die These einer Th1-gewichteten und somit zellvermittelten antineoplastischen Wirkung unterstützen.
Zur Klärung der folgenden Fragen wurden wiederum 3 Gruppen von Versuchstieren gebildet, wobei der ersten eine CpG-ODN-Behandlung ohne vorherige Tumorinduktion appliziert wurde, die zweite aus unbehandelten tumortragenden Mäusen bestand und die dritte sowohl Tumorzellen als auch ODN erhielt:

- Wird durch die Oligonukleotidapplikation wie bereits bei BCG beschrieben eine erhöhte Expression von ICAM-1 induziert?
- Lässt sich eine Aussage darüber treffen, welche Zellen diesen Oberflächenmarker exprimieren?
- Hat die Anwesenheit eines Tumors Auswirkungen auf die ICAM-1-Expression nach CpG-ODN-Instillation?

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Zellkultur

2.1.1.1 Chemikalien/ Pharmaka

D-MEM + Glutamax	Gibco, BRL Technology Inc.	Eggenheim, D
Fetal Bovine Serum Gold	PAA- The Cell Company	Cölbe, D
Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate-buffered saline, PBS)	PAA- The Cell Company	Cölbe, D
Penicillin/Streptomycin-Lösung	PAA- The Cell Company	Cölbe, D
DMSO (Dimethyl-Sulfoxide)	Sigma-Aldrich-Chemie	München, D
Trypanblue	ICN Biomedical	Aurora, USA

2.1.1.2 Geräte

Bench: Hera Safe	Heraeus	Hanau, D
Phasenkontrastmikroskop: Eclipse 200	Nikon	Düsseldorf, D
Kulturflaschen: Cellstar	Greiner-bio-one	Frickenhausen, D
Zentrifugenröhrchen, 50ml	Greiner-bio-one	Frickenhausen, D
Wasserbad		

Wärmeschrank: Hera Cell	Heraeus	Hanau, D
Neubauer-Zählkammer 0,0025mm²	Carl Roth GmbH&Co. KG	Karlsruhe, D
Zentrifuge: Biofuge Stratos	Heraeus	Hanau, D
Pipettierhilfe: Pipettus akku	Hirschmann	
Pipetten: Cellstar	Greiner-bio-one	Frickenhausen, D

2.1.2 Tiermodell

2.1.2.1 Chemikalien/ Pharmaka

Ketamin 100mg/2ml	CuraMED	Karlsruhe, D
Rompun (Xylazinhydrochlorid 2%)	Bayer	Leverkusen, D
NaCl-Lösung 0,9%	Braun	Melsungen, D
Instilla Gel	Farco Pharma	Köln, D
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich-Chemie	München, D
CpG-ODN 1668	TIB-MolBiol	Berlin, D

2.1.2.2 Geräte

Tuberkulinspritzen: Omnifix-F	Braun	Melsungen, D
Venenverweilkanülen: Intracan 24 Gauge	Braun	Melsungen, D
Kombistopper	Braun	Melsungen, D
Mikrolitherspritze	Cal Roth GmbH&Co KG	Karlsruhe, D

2.1.3 Präparation und Anfertigung der Gefrierschnitte

2.1.3.1 Chemikalien

Einbettmedium: Cryocompound	Leica Microsystems	Wetzlar, D
Flüssigstickstoff		

2.1.3.2 Geräte

Cryo-Tubes, 3,6 ml	Nunc	Wiesbaden, D
Klingen: High profile type 818	Leica Microsystems	Wetzlar, D
Kryomikrotom: Leica CM3050 S	Leica Microsystems	Wetzlar, D
Objektträger: Superfrost Plus	Menzel	Braunschweig, D

2.1.4 Immunhistochemie

2.1.4.1 Chemikalien/ Reagenzien

Isopropanol	Riedel de Haën	Seelze, D

PBS	Roche	Mannheim, D
Aqua dest.	hauseigene Anlage	Klinikum Marburg
Endogenous Enzymeblock	DakoCytomation	Hamburg, D
Normal Horse Serum	Vector Laboratories	Burlingame, USA
Avidin-/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories	Burlingame, USA
CD3 Rat Monoclonal Antibody	Novocastra Laboratories	Newcastle, GB
Antibody Diluent	DakoCytomation	Hamburg, D
Rat Anti-Mouse CD4 Purified Antibody	Caltag Laboratories	Burlingame, USA
Rat Anti-Mouse CD8a Purified Antibody	Caltag Laboratories	Burlingame, USA
Rat Anti-Mouse CD19 Purified Antibody	Caltag Laboratories	Burlingame, USA
Affinity Purified Anti-Mouse CD54 (ICAM-1)	eBioscience	San Diego, USA
Simple Stain Mouse MAX PO (Rat)	Nichirei Corporation	Tokyo, Japan
Biotinylated Anti-Rat igG (H+L), Affinity Purified, Mouse Adsorbed	Vector Laboratories	Burlingame, USA
Elite ABC Kit	Vector Laboratories	Burlingame, USA
Liquid DAB System	DakoCytomation	Hamburg, D
Hämalaun n Mayer	Merck	Darmstadt, D
Ethanol 70%, 96%, 100%	Otto Fischer GmbH	Saarbrücken, D
Xylol	Acros Organics	New Jersey, USA
Entellan	Merck	Darmstadt, D

2.1.4.2 Geräte

Pipetten, Pipettenspitzen	Eppendorf	Köln, D
Zentrifuge		
Reaktionsgefäße	Eppendorf	Köln, D

Deckgläser	Menzel	Braunschweig, D

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Für unsere Versuche fand die C57/BL6-syngene Urothelkarzinomzellreihe MB49 Verwendung. Sie geht auf Summerhayes zurück, der sie durch Behandlung von murinen Urothelzellen in Kultur durch 7,12-Dimethylbenzanthracen gewann (Summerhayes & Franks, 1979).
Alle Arbeiten mit der Zellkultur wurden unter streng aseptischen Bedingungen durchgeführt.

2.2.1.1 Kulturmedium

Das Kulturmedium für die MB49-Zellen wurde wie folgt angesetzt:

88,9 ml	DMEM+ Glutamax
10 ml	Fetales Kälberserum (FCS)
1 ml	Penicillin/Streptomycin
0,1 ml	Natrium-Pyruvat
= 100 ml	Kulturmedium

Die einmal angesetzte Lösung war bei 4° etwa 3 Wochen haltbar. Vor Gebrauch wurde das Medium auf 37°C im Wasserbad erwärmt.

2.2.1.2 Auftauen der Zellen

Die in 1ml Eppendorf-Gefäßen eingefrorenen Zellen wurden bei 37° C im Wasserbad erwärmt und danach sofort in 10 ml Kulturmedium in einem 20 ml Zentrifugenröhrchen suspendiert. Nach 5-minütigem Zentrifugieren (1500 Umdrehungen pro Minute (RPM) wurde der Überstand abgegossen und verworfen. Das Pellet wurde erneut wie oben suspendiert und zentrifugiert. Schließlich wurden die Zellen mit 20 ml Kulturmedium aufgeschüttelt, in zwei 50ml-Kulturflaschen gegeben und ad 20 ml aufgefüllt.

2.2.1.3 Kultur

Die Zellen wurden im Wärmeschrank (37°C, 5% CO_2) bei halb geöffnetem Deckel bebrütet.

2.2.1.4 Mediumwechsel

Das Kulturmedium wurde alle 3 Tage gewechselt. Nach einer mikroskopischen Kontrolle im Phasenkontrast wurden die Zellen auf zwei neue Flaschen aufgeteilt. Das parallele Arbeiten mit zwei getrennten Nährböden diente als

Sicherheit im Falle einer Kontamination mit Mikroorganismen. Die nicht benutzte Kultur wurde jeweils verworfen.
Es wurde zunächst die verbrauchte Nährlösung aus der Flasche verworfen und direkt durch 10 ml frisches Medium ersetzt. Mittels der Pipettierhilfe (im „Blow-out-Mode“) und der verbleibenden Flüssigkeit konnte der am Flaschenboden haftende Zellrasen leicht abgespült werden. Das Suspensat wurde im Folgenden auf zwei neue Kulturflaschen aufgeteilt und mit frischem Medium (Raumtemperatur) auf 20 ml aufgefüllt.

2.2.1.5 Aufbereitung der Zellen zur Instillation

Am Tag der Tumorimplantation wurde ein auf 10^6 Zellen/50µl(2x 10^7 Zellen/ml) normalisiertes Suspensat aufbereitet.
Die Zellen zweier Kulturflaschen wurde hierfür wie beim Mediumwechsel mit frischem Medium vom Boden abgespült. Das gewonnene Suspensat wurde in ein Greinerröhrchen überführt und zentrifugiert (5min bei 1500 RPM), der Überstand abpipettiert und das Pellet in 10 ml Medium resuspendiert. Nach einer Wiederholung des Zentrifugierens wurde das Pellet nun noch in 1 ml Kulturlösung aufgeschüttelt.
Von dem Gemisch wurden 10µl mit 90µl Trypanblau vermischt und mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer die Zellzahl nach folgendem Schema hochgerechnet:

$$\bar{n} / 0{,}0025 mm^2 \cdot 10 \cdot 10000 = Zellzahl / ml$$

$\bar{n}$ = Mittelwert der Auszählung der 4 Quadranten der Zählkammer

Die so annähernd bestimmte Zellzahl lag über der gewünschten Konzentration von 2x 10^7 Zellen/ml, so dass entsprechend verdünnt werden musste.

Bis zur Applikation wurden die Zellen in einem Eppendorfcap auf Eis gelagert.

2.2.2 Tiermodell

Ein von Günther et al. entwickeltes und von Ninalga et al. optimiertes murines, orthotopes Urothelkarzinommodell kam für unsere Versuche in modifizierter Form zum Einsatz (Gunther et al, 1999; Hegele et al, 2005; Ninalga et al, 2005) .

Eine Genehmigung des Tierversuches durch das Regierungspräsidium Gießen lag vor (U63-19C20-15(1)MR20/20#28/2003).

2.2.2.1 Haltung der Tiere

Die weiblichen C57/BL6 Mäuse (20-30g, Harlan, Borchen) wurden einzeln in Individual Ventilated Cages (IVC) bei einem Hell-/Dunkelrhythmus von 12h/12h gehalten. Futter und Wasser standen bis auf die Behandlungszeiträume 24 Stunden am Tag ad libitum zur Verfügung. Es wurden keine Antibiotika verabreicht.

2.2.2.2 Narkose

Alle invasiven Maßnahmen wurden unter Vollnarkose durchgeführt. Als Narkotikum diente Ketamin (10mg/ml; Ketamin, CuraMED, Karlsruhe) und Xyalazin (1mg/ml; Rompun, Bayer, Leverkusen) in 0,9%iger Kochsalzlösung

(Braun). Die intraperitoneale Applikation wurde mit Tuberkulinspritzen (Braun) und Subkutankanülen durchgeführt.
Mit einer Dosierung von 0,1 mg Ketamin / 0,01 mg Xyalazin pro Gramm Körpergewicht konnte eine ausreichende Narkosedauer von ca.1,5 h erreicht werden.

2.2.2.3 Verwiegen

Um den Gewichtsverlauf während des gesamten Versuches zu erheben, wurden die Tiere zu jedem Behandlungszeitpunkt gewogen.

2.2.2.4 Katheterismus

Für die Instillation der Tumorzellen und der CpG-ODN wurde ein transurethraler Katheter gelegt. Hierfür eigneten sich Venenverweilkanülen (24 Gauge; Introcan, Braun, Melsungen), wobei ein Lubrikant (Instillagel, Farco Pharma, Köln) verwendet und die Stahlkanüle etwa 2mm zurückgezogen wurde, um Traumata der Harnröhre zu vermeiden (*Abb. 6*).
Erst wurden Genital der Tiere und Katheter mit Instillagel benetzt, dann ließ sich der Katheter vorsichtig in die Blase vorschieben. Der Austritt von Urin nach Entfernen der Stahlkanüle signalisierte eine korrekte Lage.

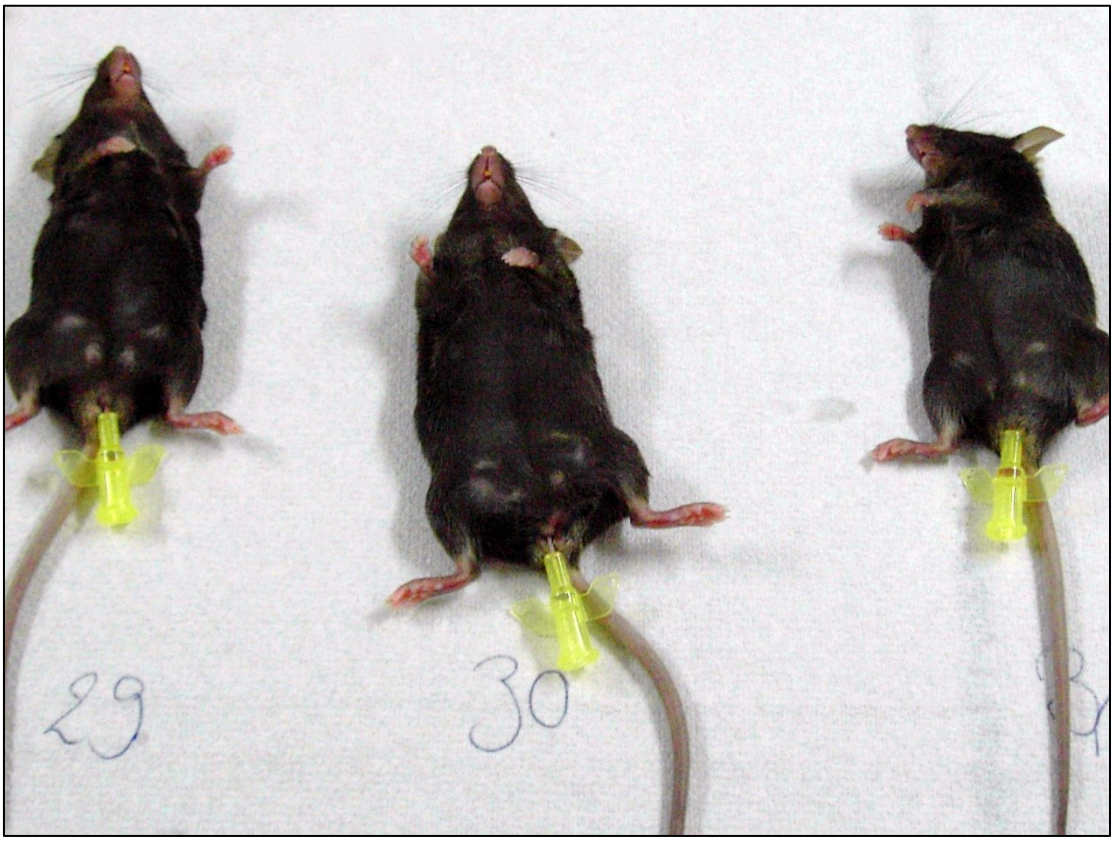


Abbildung 6: Katheterisierung der Tiere mit 24G-Venenverweilkanülen (eigenes Bildmaterial).

2.2.2.5 Urinasservierung

Für weitere Experimente der Arbeitsgruppe wurden bei jedem Katheterisieren Urinproben asserviert.
Daher wurde die Kontrollgruppe ebenso häufig katheterisiert wie die behandelten Tiere.

2.2.2.6 Instillation

Zur Instillation von Poly-L-Lysin, Tumorzellsuspension und ODN fand eine 25µl Hamiltonspritze mit einzementierter Kanüle Verwendung, die direkt auf das Ende des 24 Gauge Katheters aufgesetzt wurde (*Abb. 7*). Eventuell in den Konus der umfunktionierten Venenverweilkanüle austretende Flüssigkeit ließ sich mit einer luftgefüllten Tuberkulinspritze wieder in die Blase zurückdrücken.

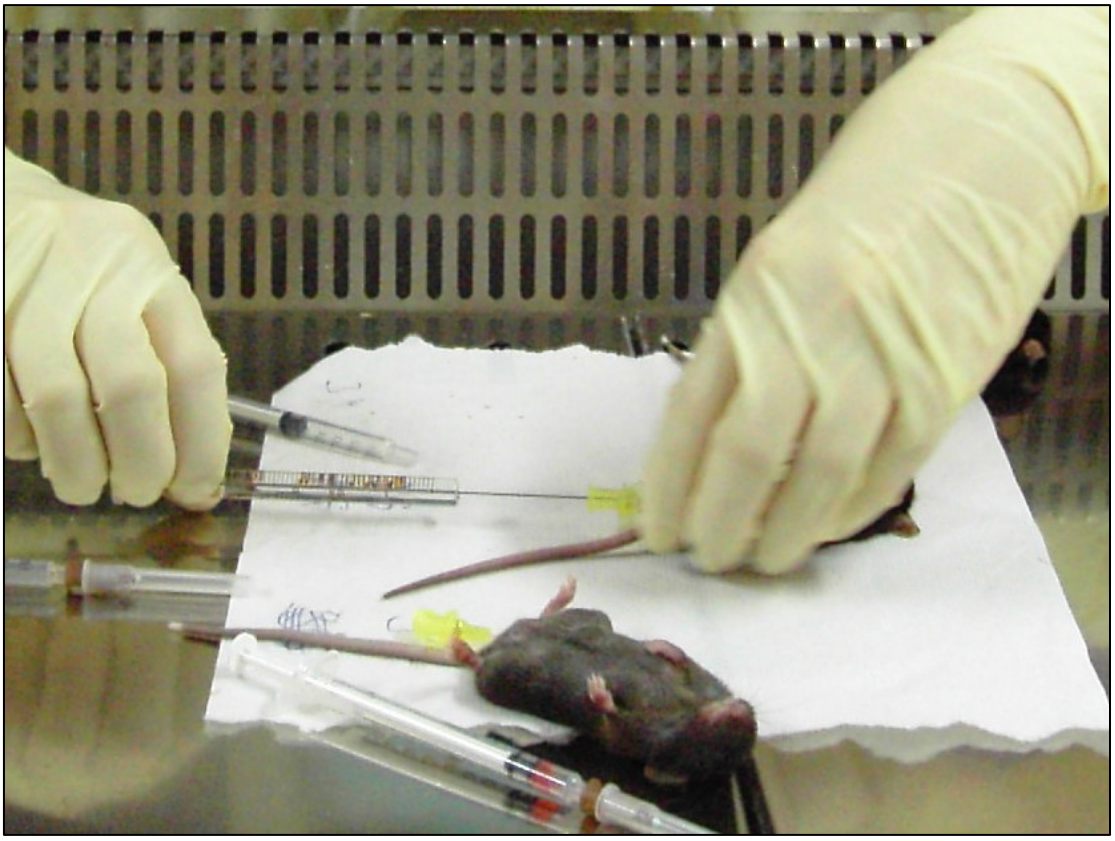


Abbildung 7: Instillation (eigenes Bildmaterial).

Anschließend wurde der Katheter mit einem Kombistopper bis zum Ende der Applikationsdauer verschlossen. Am Ende jeder Behandlungseinheit wurde der urethrale Zugang vor dem Erwachen der Tiere entfernt.

2.2.2.7 Tumorimplantation

Die Tumorinduktion erfolgte an Tag 0. Unmittelbar vor der Instillation der Tumorzellen erfolgte eine 20minütige Füllung der Blase mit dem Polykation Poly-L-Lysin über den Katheter. Hiermit wird eine Verbesserung der Adhäsion und somit des Tumor-Takes erreicht.
Nach der vollständigen Blasenleerung wurden jedem Tier 50µl der zuvor aufgeschüttelten Tumorzellsuspension instilliert (entsprechend 10^6 Zellen) und für 1 h intravesikal belassen.

2.2.2.8 Behandlung mit CpG-ODN

Die Dauer der Instillation von CpG-ODN betrug bei jeder Einheit 45 min. Nach Entnahme vorbereiteter 50µl/10nmol-Aliquots aus dem Gefrierschrank bis zur Instillation wurde die Lösung auf Eis gelagert.

2.2.2.9 Behandlungsschema

Im ersten experimentellen Teil wurden 36 Tiere untersucht.
Die Tiere wurden zufällig 3 Gruppen zugeteilt:

- Die Kontrollgruppe erhielt nach Implantation der Tumorzellen keine Behandlung.
- Die „Early-Onset“-Gruppe erhielt die stimulativen CpG-ODN bereits ab Tag 1 und in der Folge jeden zweiten Tag.
- Bei der „Late-Onset“-Gruppe erfolgte die Behandlung mit CpG-ODN erst ab Tag 5, ebenfalls alle 48 Stunden.

Ein 14tägiger Versuchszyklus umfasste 12 Mäuse, je vier bildeten eine Gruppe. Insgesamt wurden zeitlich nacheinander 3 Zyklen nach dem in der folgenden Tabelle zusammengefassten Schema durchgeführt.

Tag	Gruppe		
	Kontrolle	„Early Onset“	„Late Onset“
0	Tumorimplantation	Tumorimplantation	Tumorimplantation
1		CpG-ODN	
2			
3		CpG-ODN	
4			
5		CpG-ODN	CpG-ODN
6			
7		CpG-ODN	CpG-ODN
8			
9		CpG-ODN	CpG-ODN
10			
11		CpG-ODN	CpG-ODN
12			
13		CpG-ODN	CpG-ODN
14	†	†	†

Im zweiten Teil, der sich dem Expressionsmuster von ICAM-1 (CD54) widmete, wurde der Ansatz modifiziert. Hauptsächlich änderte sich Folgendes: Die CpG-ODN-Instillation fand nur noch zu einem Zeitpunkt statt und die Laufzeit wurde verkürzt. Es wurden 12 Tiere in 3 Gruppen (je 4 Tiere) eingeteilt. Die folgende Tabelle fasst das Behandlungsregime zusammen.

Tag	Gruppe		
	Kontrolle1 kein Tumor/CpG-ODN	Kontrolle2 Tumor/keine Therapie	Versuchsgruppe Tumor/CpG-ODN
0		Tumorimplantation	Tumorimplantation
1	CpG-ODN		CpG-ODN
2			
3			
4			
5			
6			
7	†	†	†

2.2.3 Präparation und Anfertigung der Gefrierschnitte

2.2.3.1 Präparation

Am 14. Tag wurden die Tiere in Narkose durch zervikale Dislokation getötet. Direkt danach wurde der Eingeweideraum eröffnet, Harnblase und Milz entnommen (letztere als Positivkontrolle für die Immunhistochemie, IHC) und sofort in flüssigen Stickstoff und von dort in vorgekühlte, beschriftete Kryotubes verbracht. Diese wurden zum Transfer ebenfalls in flüssigem Stickstoff gekühlt. Insgesamt wurde darauf geachtet, dass die Zeit vom Tod der Tiere bis zum Einfrieren der Asservate zwei Minuten nicht überschritt.

2.2.3.2 Lagerung der Organe

Die Lagerung der entnommenen Organe erfolgte bis zur weiteren Aufarbeitung im fest verschlossenen Kryotube bei -80°C.

2.2.3.3 Gefrierschnitt

Die Kryotubes wurden aus dem -80° Gefrierschrank entnommen und bis zum Schneiden in flüssigem Stickstoff zwischengelagert. Nach kurzem Akklimatisieren in der Box wurde das komplette Organ mit einem Tropfen Gefriereinbettmedium direkt auf einer gekühlten Objektplatte fixiert und im Objektkopf eingespannt.
Nach dem Antrimmen wurden aus der Organmitte Serienschnitte von 5µm Dicke angefertigt und mit den zuvor durchnummerierten Objektträgern aufgenommen. Auf jeden Objektträger wurden sowohl Blase als auch Milz (als Positivkontrolle) aufgebracht.

Temperatureinstellung		
	Boxtemperatur	Objekttemperatur
Blase	-20°C	-19°C
Milz	-15°C	-15°C

2.2.3.4 Lagerung der Schnitte

Nach 60-minütigem Trocknen an der Raumluft wurden die unfixierten Schnitte in Kunststoffbehältern bei -20°C aufbewahrt.

2.2.3.5 Immunhistochemie

Es wurde nach modifizierten Protokollen der Firma Dako (Key, 2006) unter Einbeziehung der Empfehlungen der entsprechenden Antikörper- und Reagenzienhersteller vorgegangen.
Von jedem Tier wurden je Antikörper 2 Gefrierschnitte immunhistologisch gefärbt. Dabei wurden für jeden Antikörper Schnitte aus verschiedenen Ebenen der Blase verwendet.

2.2.3.6 Fixierung der Gefrierschnitte

Die bei -20°C gelagerten Gefrierschnitte wurden zunächst auf Raumtemperatur gebracht und 30 Minuten getrocknet.
Die Verwendung von Aceton als Fixativum, die häufig beschrieben und empfohlen wird, zeigte eine Lösung der Silanbeschichtung der SuperFrost Plus Objektträger, wodurch die Schnitte abgeschwemmt und schlecht beurteilbar wurden.
Durch die 10-minütige Fixierung mittels auf Eis gekühlten Isopropanols konnte dieser Effekt vermieden werden. Danach wurden die Objektträger direkt in PBS 1:10 verbracht und hiermit dreimal gespült, wie auch nach jedem weiteren Reaktionsschritt, wenn nicht anders angegeben.

2.2.3.7 Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität

Die Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität mit Hilfe einer niedrigkonzentrierten Wasserstoffperoxidlösung stellte sich als nicht

ausreichend heraus. Erfolgreich war eine 10-minütige Inkubation der Schnitte mit jeweils 50 µl Dako Endogenous Enzymeblock.

2.2.3.8 Blockierung unspezifischer Bindungsstellen

Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte durch Pferdenormalserum.
Das Serum wurde mit sterilem PBS auf 1:10 verdünnt 10 Minuten auf den Schnitten belassen und nur leicht abgeklopft.

2.2.3.9 Biotin-Block

Um eine Kreuzreaktion von endogenem Gewebebiotin mit der ABC-Reagenz auszuschalten wurde bei den mit diesem System detektierten Schnitten (s.u.) zusätzlich 15min mit einem Biotin-Blocking-Kit inkubiert, das im Anschluss nur leicht abgeklopft wurde. Ein Spülen entfiel.

2.2.3.10 Primärantikörper

Die Primärantikörper (alle hergestellt in Ratte) wurden mit Dako Antibody Diluent in verschiedenen Verdünnungen angesetzt.

CD 3	1:50
CD 4	1:50
CD 8a	1:50
CD 19	1:50
CD 54	1:25

Jeder Schnitt wurde mit 50 µl Antikörperlösung 60 Minuten in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.

2.2.4 Sekundärantikörper für CD3, CD8a, CD19 und CD54 (ICAM-1)

Als Sekundärantikörper wurde Histofine Simple Stain Mouse MAX PO (Rat) (Nichiei, Medac) verwendet, ein gegen Maus präadsorbierter Peroxidasepolymerantikörper verwendet, der das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) direkt umsetzt.
50 µl Antikörperlösung wurde unverdünnt auf die Schnitte pipettiert. Die Inkubationszeit bei RT betrug 30 Minuten.

2.2.5 Sekundärantikörper und ABC-Reagenz für CD4

Für die immunhistologische Darstellung von CD4 stellte sich die Amplifikation durch den peroxidasemarkierten o.g. Sekundärantikörper als insuffizient dar. Daher wurde auf das VectaStain-ABC-Kit zurückgegriffen, mit dem die Färbung gelang. Hier kam ein biotinilierter, mausadsorbierter Anti-Rat-IgG Sekundärantikörper zum Einsatz.

Die Schnitte wurden mit 50 µl dieser Zweitantikörperlösung (5µg/ml) für 30 Minuten inkubiert und anschließend wie beschrieben gespült.
Danach wurde für 30 Minuten mit ABC-Reagenz überschichtet und der Sekundärantikörper so indirekt peroxidasemarkiert.

2.2.6 Farbreaktion mit DAB

Das Chromogen DAB diente als Detektionssystem für alle durchgeführten immunhistochemischen Färbungen. Zum Einsatz kam ein DAB Kit der Firma Dako.
Das Substrat Chromogen wurde mit dem mitgelieferten Puffer im Verhältnis 1:50 verdünnt und gevortext.
Jeder Schnitt wurde mit 50µl der Lösung bedeckt und 6 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert und danach sofort wie beschrieben gespült.

2.2.7 Gegenfärbung mit Hämalaun

Die Schnitte wurden aus dem PBS (letzter Spülschritt des vorherigen Schrittes) nacheinander für die aus der Tabelle ersichtlichen Zeiten in die entsprechenden Färbeküvetten verbracht.

30 sec	Leitungswasser	spülen
1 min	Meyers Hämalaun 1:2	
15 sec	Aqua dest.	spülen
4 min	Leitungswasser	bläuen
10 sec	70% Ethanol	spülen
10 sec	96% Ethanol	spülen
10 sec	96% Ethanol	spülen
10 min	100% Ethanol	
10 min	100% Ethanol	
10 min	Xylol	
10 min	Xylol	

Direkt darauf wurden die Schnitte direkt aus dem Xylol mit Entellan eingedeckt.

3 Ergebnisse

Die durchgeführten Versuche wurden in kleinen Serien durchgeführt. Folglich sind keine statistischen Wahrscheinlichkeitsberechnungen sinnvoll, sondern lediglich elementare Unterschiede zwischen den verschiedenen Therapiegruppen und Tendenzen herausstellbar.
Die Ergebnisse einzelner Tiere der verschiedenen Gruppen wurden dementsprechend getrennt betrachtet und auf gemeinsame, gruppeninterne Merkmale hin untersucht.

3.1 Beobachtungen bei der Zellkultur und Tierversuch

Die Zellkultur nach dem bereits erprobten Schema unserer Arbeitsgruppe gelang problemlos, zu einer Kontamination kam es nicht, für die Implantation standen jederzeit genug Zellen zur Verfügung.

3.2 Beobachtungen beim Tierversuch

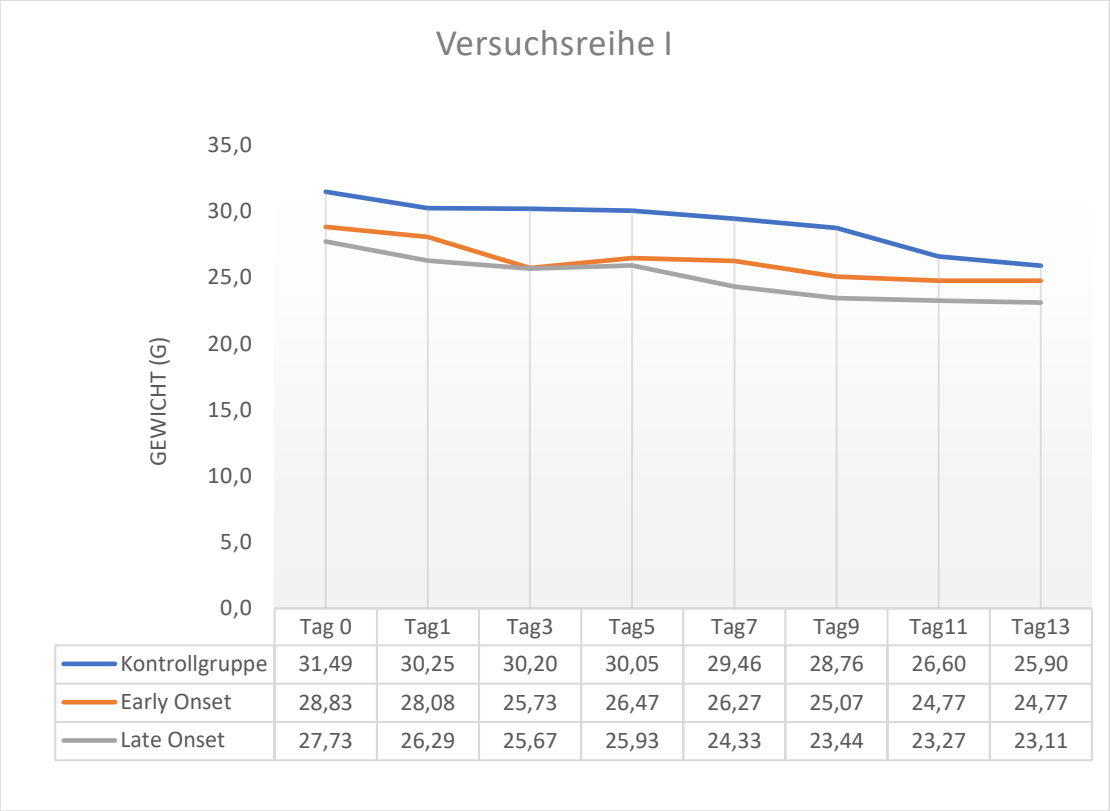
3.2.1 Allgemeine Beobachtungen

Technisch traten während der gesamten Versuchsreihe in Bezug auf Anästhesie, Katheterismus und Präparation keine systemischen Komplikationen auf.

Bei der Präparation konnte bei allen implantierten Tieren mit und ohne Behandlung ein makroskopischer Tumor festgestellt werden. Diese Tumor-Take-Rate von 100% entspricht den Beobachtungen aus anderen Arbeiten mit demselben murinen Modell (Hegele et al, 2005).
Klinisch konnte bei allen Tieren eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes und der Vitalität festgestellt werden, parallel konnte ein Gewichtsverlust beobachtet werden.

3.2.2 Gewichtsverlauf

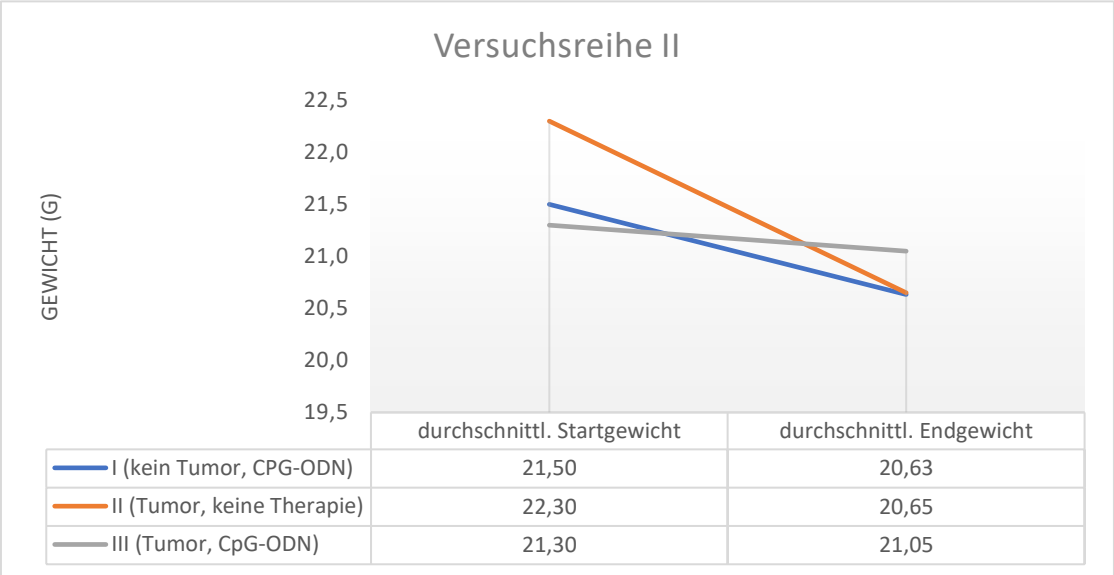
Der Gewichtsverlauf in der ersten Versuchsreihe wurde behandlungstäglich dokumentiert.
In allen 3 Gruppen kam es während der Behandlung zu einem Gewichtsverlust im Vergleich zum Ausgangswert. Dieser relative Gewichtsverlust betrifft alle 3 Gruppen und beträgt in der Kontrollgruppe 17,7%, in der „Early-Onset“-Gruppe 14,1% und in der „Late-Onset“-Gruppe 16,6% (*Abb. 8*).



	Tag 0	Tag1	Tag3	Tag5	Tag7	Tag9	Tag11	Tag13
Kontrollgruppe	31,49	30,25	30,20	30,05	29,46	28,76	26,60	25,90
Early Onset	28,83	28,08	25,73	26,47	26,27	25,07	24,77	24,77
Late Onset	27,73	26,29	25,67	25,93	24,33	23,44	23,27	23,11

Abbildung 8: Entwicklung des Durchschnittsgewichtes in g nach Gruppen in Versuchsreihe 1

In der 2. Versuchsreihe wurden aufgrund der selteneren Narkosen nur das Anfangs- und das Endgewicht erfasst. Es ergab sich eine ähnliche Tendenz. Es kam innerhalb des einwöchigen Versuchszeitraums in allen Gruppen zu einer Gewichtsreduktion, die in der folgenden Graphik dokumentiert ist (*Abb.9*). Damit kam es auch hier in allen Gruppen zu einem Gewichtsrückgang zwischen 1,2% und 7,4%.



	durchschnittl. Startgewicht	durchschnittl. Endgewicht
I (kein Tumor, CPG-ODN)	21,50	20,63
II (Tumor, keine Therapie)	22,30	20,65
III (Tumor, CpG-ODN)	21,30	21,05

Abbildung 9: Entwicklung des Durchschnittsgewichtes in g nach Gruppen Versuchsreihe II

3.2.3 Gruppenstärke und -verluste

Im Laufe des Versuches verstarben drei Tiere in der ersten Reihe, (zwei aus der „Early-Onset-Gruppe“, eines aus der „Late-Onset“-Gruppe“).
In der zweiten Reihe verstarb ein Tier, aus der 2. Gruppe (Behandlung, kein Tumor).
Die Organe dieser Tiere wurden nicht präpariert, folglich flossen auch keinerlei Daten dieser Tiere in die Bewertungen ein.

3.3 Ergebnisse der Immunhistologie

Die Auswertung der immunhistochemischen Präparate erfolgte an einem Leica Mikroskop im Institut für Pathologie der Universitätsklinik Marburg mit freundlicher Unterstützung von Prof. Dr. Peter Barth.

3.3.1 Technisches Ergebnis

Die bereits beschriebenen immunhistologischen Färbungen waren bis auf wenige Ausnahmen, in denen es zu einem Abschwimmen des Präparates oder einer unvollständigen Färbung kam, technisch verwertbar. Durch die auf jedem Objektträger vorhandenen Milz-Positivkontrollen konnte ein Versagen der Färbung ausgeschlossen werden.

3.3.2 Detektion und Protokollierung von CD3, CD4 und CD8 und CD19 als lymphozytärer Oberflächenmarker

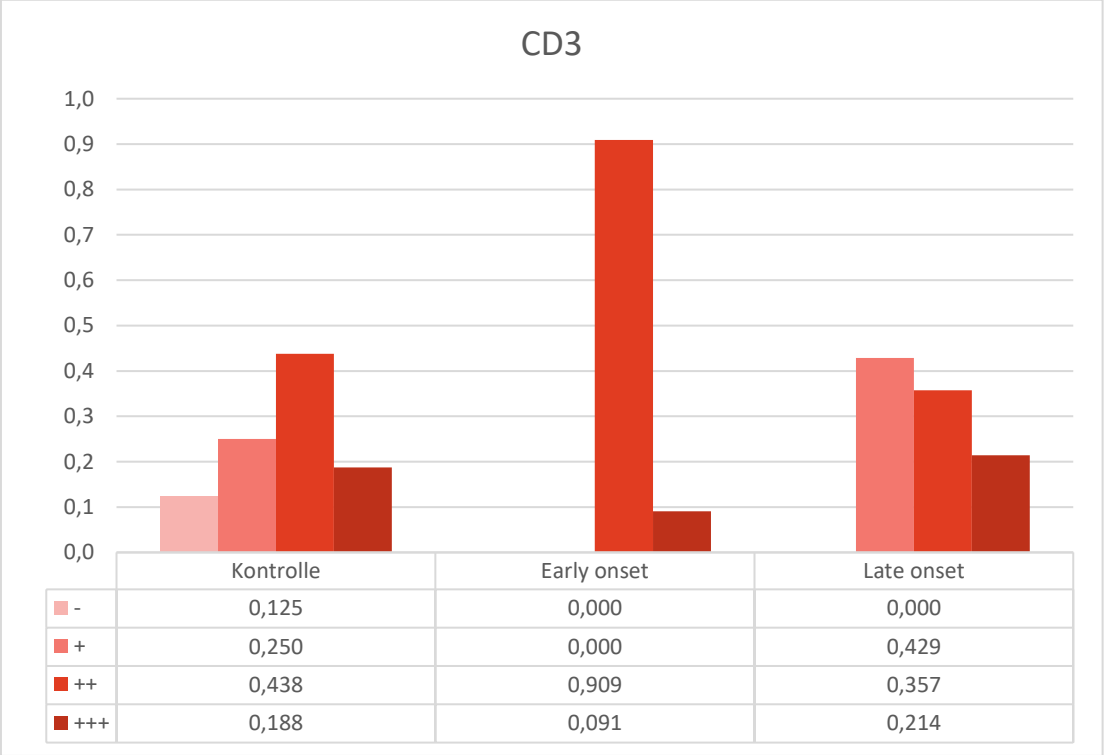
Zur Evaluation der Lymphozyteninfiltration wurden die gegen CD3, CD4, CD8 und CD 19 gefärbten Schnitte betrachtet und nach Dichte der positiven Zellen beurteilt.
Zum semiquantitativen Vergleich der Schnitte wurde das folgende Bewertungsschema zugrunde gelegt.

0 (-)	IHC negativ
1 (+)	einige positive Lymphozyten
2 (++)	zahlreiche positive Lymphozyten
3 (+++)	sehr viele positive Lymphozyten

Da die Anzahl der Präparate aufgrund der während des Versuches verstorbenen Tiere und der fehlenden Beurteilbarkeit einiger technisch unzureichender Präparate nicht in allen Gruppen gleich groß war, erfolgt die Auswertung relativ wie in den folgenden Tabellen und Diagrammen ersichtlich.

3.3.2.1 T-Lymphozyten (CD3)

T-Lymphozyten konnten über CD3, einen Bestandteil des T-Zell-Rezeptors in allen untersuchten Blasen in hoher Dichte identifiziert werden.
Die folgende Graphik illustriert eine relative Auswertung des oben genannten Bewertungsschlüssels nach Gruppen (*Abb. 10*).
Es fällt auf, dass in den behandelten Gruppen, insbesondere in der „Early-Onset-Gruppe“ ein höherer Anteil starker T-Zellinfiltrationen protokolliert wurde.

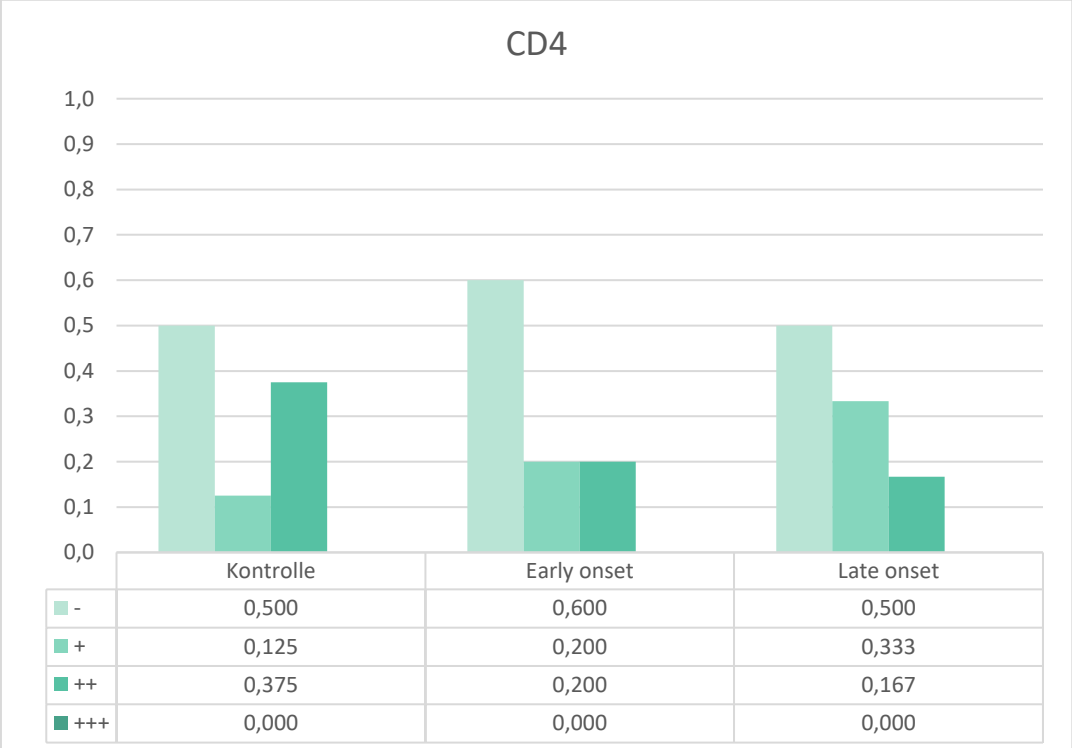


	Kontrolle	Early onset	Late onset
-	0,125	0,000	0,000
+	0,250	0,000	0,429
++	0,438	0,909	0,357
+++	0,188	0,091	0,214

Abbildung 10: Bewertungsspiegel der mikroskopischen, semiquantitativen Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von CD3.

3.3.2.2 T-Helferzellen (CD4)

T-Helferzellen konnten in etwas niedrigerer Infiltrationsdichte etwa in der Hälfte aller beurteilten Gewebeschnitte nachgewiesen werden, wobei zwischen den Gruppen keine relevanten Unterschiede ausgemacht werden konnten *(Abb. 11)*.

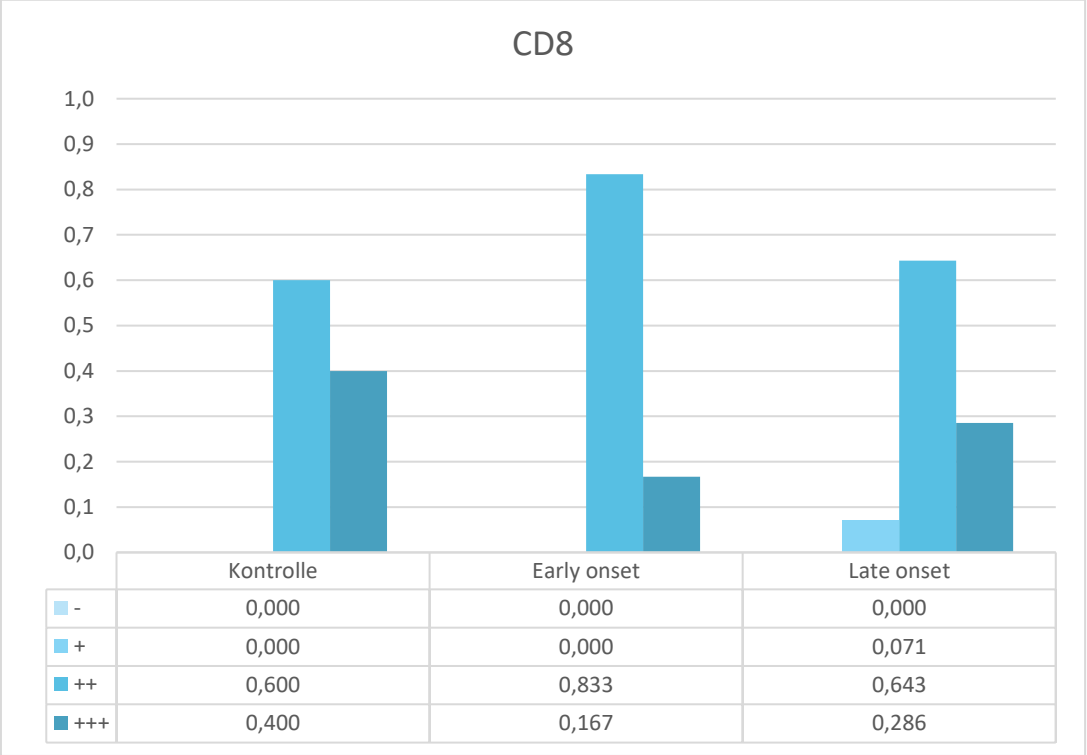


	Kontrolle	Early onset	Late onset
-	0,500	0,600	0,500
+	0,125	0,200	0,333
++	0,375	0,200	0,167
+++	0,000	0,000	0,000

Abbildung 11: Bewertungsspiegel der mikroskopischen, semiquantitativen Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von CD4.

3.3.2.3 Zytotoxische T-Zellen/ NK-Zellen (CD8)

CD8-positive Zellen, also zytotoxische T-Lymphozyten und NK-Zellen fanden sich in allen 3 Gruppen in hoher Dichte. Unterschiede in der Verteilung bei den behandelten und den nicht behandelten Tieren lassen sich nicht ablesen (*Abb. 12*).

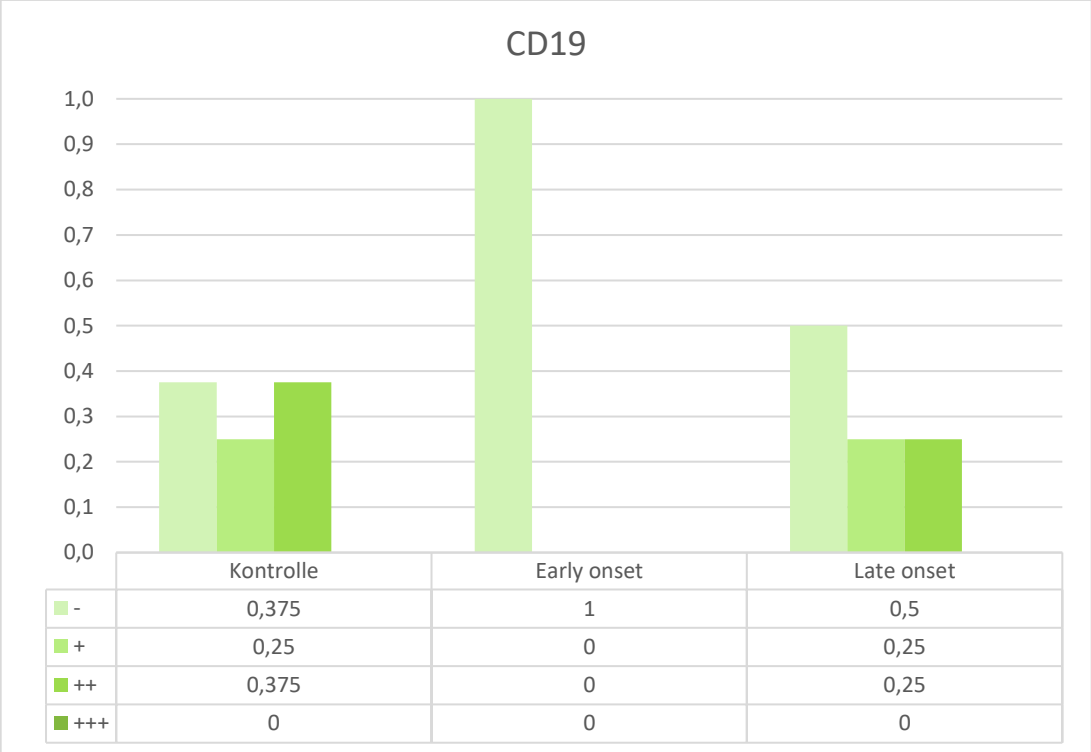


	Kontrolle	Early onset	Late onset
-	0,000	0,000	0,000
+	0,000	0,000	0,071
++	0,600	0,833	0,643
+++	0,400	0,167	0,286

Abbildung 12: Bewertungsspiegel der mikroskopischen, semiquantitativen Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von CD8

3.3.2.4 B-Lymphozyten (CD19)

Die Infiltration durch B-Lymphozyten war in der Kontrollgruppe sowie in der „Late-Onset-Gruppe“ nachweisbar. In der „Early-Onset-Gruppe“ konnte keine Infiltration durch B-Lymphozyten detektiert werden. Damit nimmt die B-Zell-Infiltration mit zunehmender Therapiedauer ab (*Abb. 13*).



	Kontrolle	Early onset	Late onset
-	0,375	1	0,5
+	0,25	0	0,25
++	0,375	0	0,25
+++	0	0	0

Abbildung 13: Bewertungsspiegel der mikroskopischen, semiquantitativen Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von CD19

Zusammenfassend lässt sich also eine vermehrte T-Zell-Infiltration in den Blasen der Tiere der Therapiegruppen nachweisen.

Es fällt auf, dass das durch CD4 charakterisierte T-Helfer-Subset behandlungsunabhängig nur in einem Teil der Proben überhaupt detektierbar ist.

CD-8-postitive Zellen finden sich wiederum bei allen Tieren in relativ hoher Dichte, ohne dass sich offensichtliche Unterschiede zwischen den Gruppen zeigen.

Ein vollständiges Fehlen der B-Zellinfiltration in der „Early-onset“-Gruppe ist die bemerkenswerteste Beobachtung bei Beurteilung der CD19 Färbung. In der Kontroll- und der „Late-Onset“-Gruppe ist dagegen bei über der Hälfte der Tiere eine B-Zell-Infiltration nachweisbar.

3.3.3 Detektion von ICAM

Die Färbung gegen ICAM-1 zeigte deutlichere, in der kleinen Serie reproduzierbare Unterschiede zwischen den 3 Gruppen. Die auf allen Schnitten vorhandenen Milz-Positivkontrollen zeigten eine deutliche lymphozytäre Oberflächenexpression, insbesondere im Bereich der Lymphfollikel (B-Zell-Zonen). In der mikroskopischen Betrachtung imponiert die Färbung von ICAM-1 braun, während die Gegenfärbung mit Hämalaun violett erscheint.

3.3.3.1 Gruppe I (tumorfreie Tiere unter CpG-ODN-Behandlung)

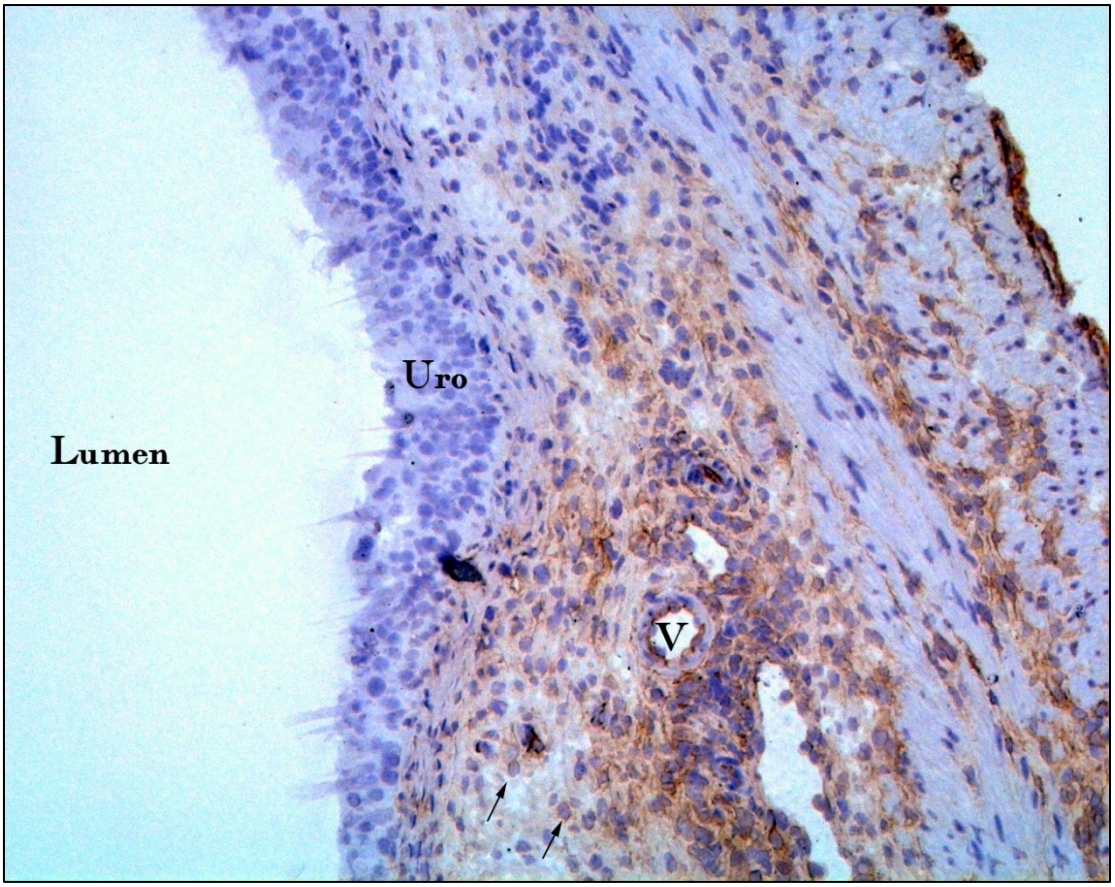


Abbildung 14: Immunhistochemisches Bild einer tumorfreien Blase nach CpG-ODN Instillation. Uro=Urothel, V=Gefäß, Pfeile= infiltrierende Leukozyten

Vorwiegend im Stroma der Lamina propria und der Muscularis zeigt sich eine Expression von ICAM-1. Im Bereich des gesunden Urothels und auf den Muskelzellen kann ICAM-1 nicht detektiert werden. Die Endothelien mitangeschnittener Gefäße wie auch einzelne Leukozyten sind ebenfalls positiv (*Abb. 14*).

3.3.3.2 Gruppe II (tumortragende Tiere ohne CpG-ODN-Behandlung)

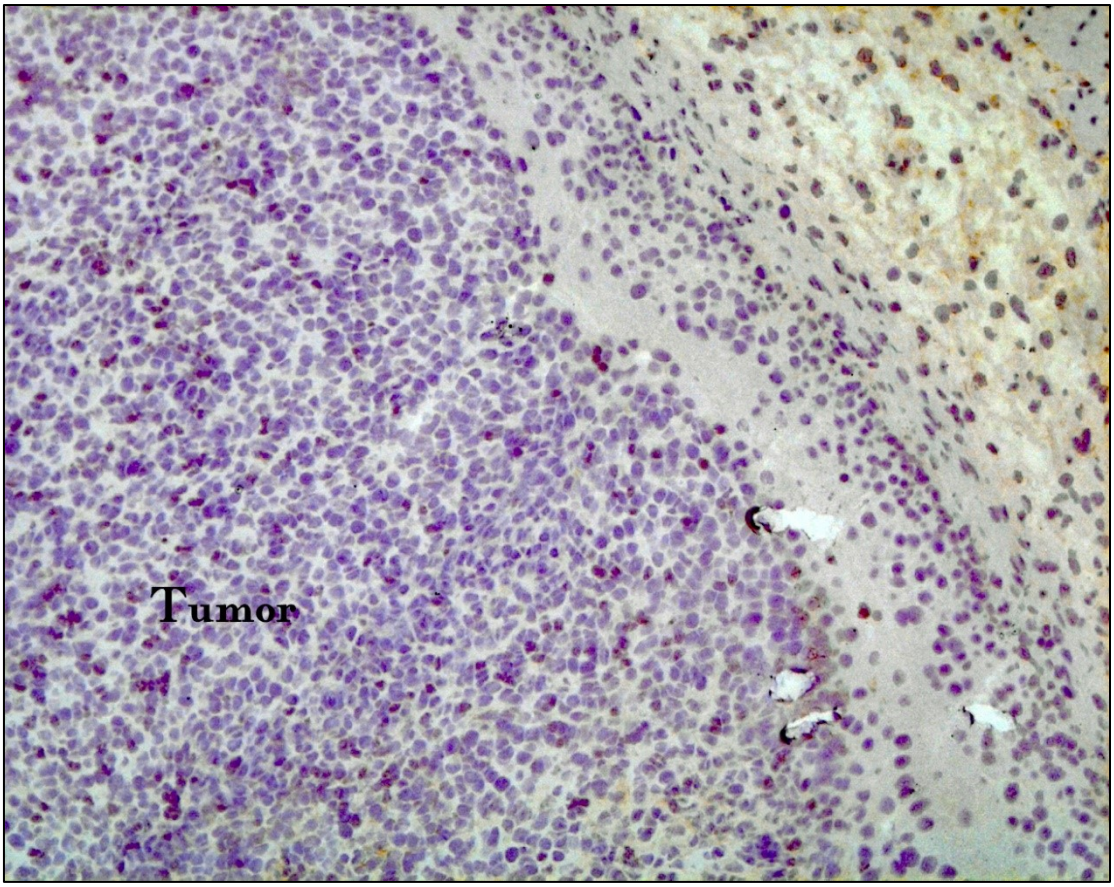


Abbildung 15: Tumortragende Blase ohne CpG-ODN-Behandlung.

Es finden sich einzelne angefärbte Leukozyten, im Bereich des Tumors keine oder nur minimale ICAM-1-Expression. Im Stroma findet sich ebenfalls leichte ICAM-1-Positivität (*Abb. 15*).

3.3.3.3 Gruppe III (tumortragende Tiere unter CpG-ODN-Behandlung)

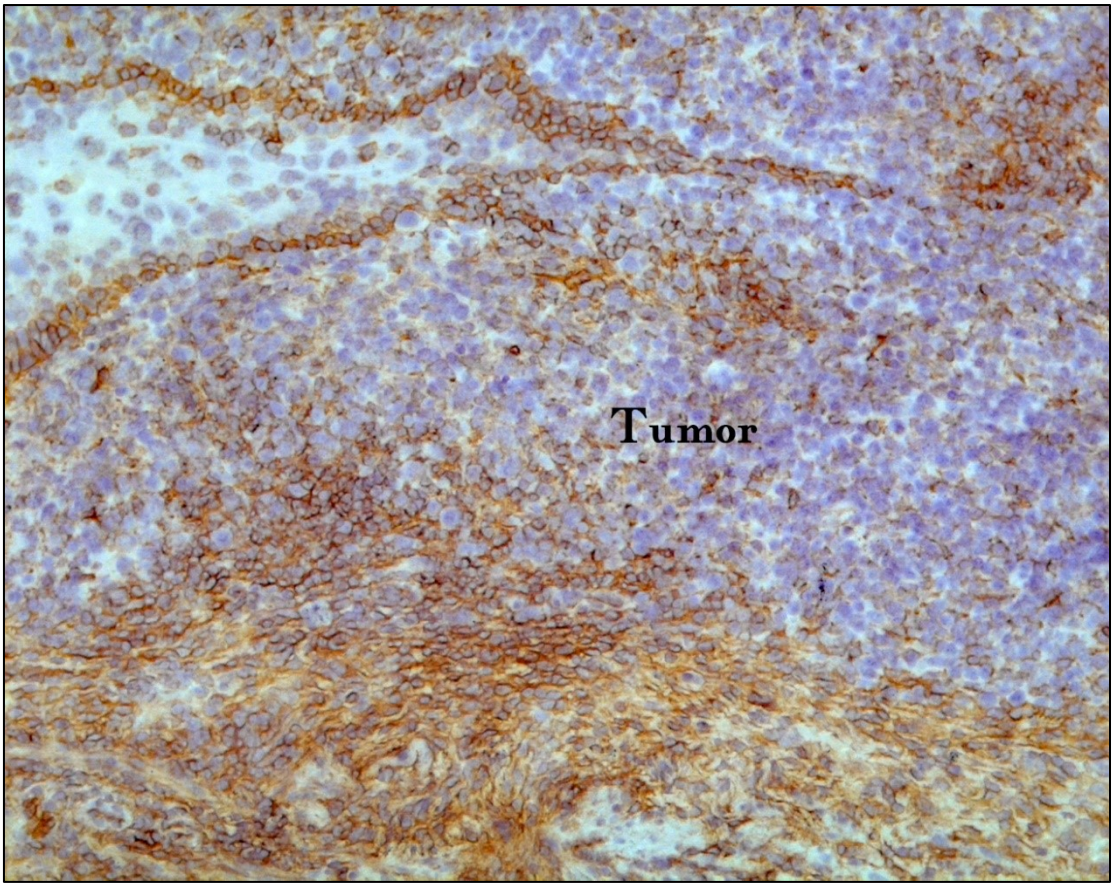


Abbildung 16: Tumortragende Blase nach CpG-ODN-Behandlung.

Expression von ICAM-1 durch infiltrierende Leukozyten, weiterhin durch die Endothelien angeschnittener Gefäße. Im Bereich des Tumors zeigt sich eine auffällig deutliche CD-54-Positivität an den Zelloberflächen, sowohl bei den Karzinomzellen als auch bei den infiltrierenden Leukozyten im Interstitium (Abb.16).

Einen semiquantitativen Überblick über die Ausprägung der ICAM-1-Expression gibt folgende Tabelle:

	ICAM-1-Expression		
	Gruppe I (kein Tumor, CpG-ODN)	Gruppe II (Tumor, keine Behandlung)	Gruppe III (Tumor, CpG-ODN)
Infiltrierende Leukozyten	+	+	++
Endothelien	+	-	+
Reguläres Urothel	-	- (soweit abgrenzbar)	nicht abgrenzbar
Stroma	+	(+)	+
Tumor	entfällt	-	++

Die Behandlung mit CpG-ODN führte also zu einer verstärkten Nachweisbarkeit von ICAM-1.

Der auffälligste Nachweis findet sich auf den Tumorzellen der mit den CpG-ODN behandelten Tiere, aber auch die infiltrierenden Leukozyten und Zellen der Lamina propria der nicht tumortragenden Blasen zeigen eine deutliche Oberflächenfärbung. Die nicht mit CpG-ODN behandelten Tiere zeigten dagegen keine erhöhte Expression von ICAM-1, so dass eine Induktion durch den Tumor an sich unwahrscheinlich ist.

4 Diskussion

Die immunmodulatorische topische Therapie mit Bacillus Calmette-Guérin (BCG) ist seit 40 Jahren gleichzeitig Grundpfeiler, extravagante Besonderheit und Relikt in der adjuvanten Therapie des nicht-muskelinvasiven Urothelkarzinoms der Harnblase.

Im Zeitalter zielgerichteter, molekularer Therapien handelt es sich bei diesem, auf empirischer Beobachtung fußenden und in seinem Mechanismus nie abschließend geklärten Therapieansatz weiterhin um die potenteste Waffe gegen Rezidive und Progression von High-Grade Tumoren und dem aggressiven Carcinoma in situ der Harnblase – und nebenbei um die älteste onkologische Immuntherapie in der Medizin (Babjuk et al, 2019).

Die Überlegenheit der zunächst zweckwidrig erscheinenden intravesikalen Anwendung des alten Tuberkuloselebendimpfstoffes gegenüber der instillativen Chemotherapie, die für weniger riskante Tumoren indiziert ist, wird dabei durch eine erhöhte Toxizität und durch die aufgrund der optimalerweise mehrjährigen Erhaltungszyklen längere Behandlungszeit erkauft (Sylvester et al, 2005).

Letztlich entwickeln ca. 20% aller Patienten mit pT1G3- Tumoren nach 5 Jahren einen Progress zu muskelinvasiven Stadien, trotz regelrecht durchgeführter BCG-Behandlung mit 1 bis 3 Jahren Erhaltungstherapie (Cambier et al, 2016).

Neuere Entwicklungen zur Verbesserung der Effektivität der topischen Zytostatikatherapien durch Techniken wie EMDA (Electromotive Drug Administration) und Hyperthermie brachten zwar erste ermutigende Ergebnisse, gehen jedoch wiederum mit erhöhten Nebenwirkungen einher (Colombo et al, 2003; Tan et al, 2017). Darüber hinaus illustriert der von Therapeuten und Patienten in Kauf genommene, erhöhte apparative und zeitliche Aufwand die gegenwärtige Suche nach effektiveren Alternativen.

Die Entdeckung der im Mittelpunkt dieser Arbeit stehenden CpG-ODN ist ebenfalls eng mit BCG verbunden. Tokunaga erkannte 1984 die immunstimulatorische Potenz der im Vergleich zum Vertebraten cytosin- und guaninreichen DNA des Mykobakteriums (Tokunaga et al, 1984).
Diese Entdeckung führte nach weiterer Eingrenzung der für die Wirkung relevanten Nukleinsäuresequenzen zur Entwicklung der CpG-ODN durch Krieg und Mitarbeiter (Krieg et al, 1995).
In der Folge wurden die Oligonukleotide Gegenstand weltweiter Forschungsaktivitäten. Potentielle Anwendungsgebiete sind neben der medikamentösen Tumortherapie der Einsatz als Impfadjuvans.
Obwohl mit der Identifizierung des TLR9 als Rezeptor für bakterielle DNA bzw. CpG-Motive wichtige Grundlagen für das molekulare Verständnis der antitumorösen Wirkung der Substanzklasse geklärt sind, sind wie bei BCG viele immunologische Details nach wie vor unklar.
Sowohl die Gruppe um Tötterman et al. als auch unsere Arbeitsgruppe konnte schließlich die Effektivität einer instillativen CpG-ODN-Therapie beim Urothelkarzinom der Harnblase in einem orthotopen murinen Tiermodell nachweisen (Hegele et al, 2005; Ninalga et al, 2005).
Lichtmikroskopisch konnte eine ausgeprägte entzündliche Gewebereaktion mit Einwanderung von Makrophagen gezeigt werden.

4.1 Versuchsreihe 1 – Subtypisierung der Lymphozyteninfiltration

Bei der in dieser Arbeit durchgeführten ersten Versuchsreihe, der immunhistologischen Typisierung verschiedener Lymphozytensubgruppen im tumortragenden murinen Blasengewebe und der Diskriminierung in T-Lymphozyten, T-Helferzellen, Zytotoxischen Zellen bzw. Killerzellen und B-Zellen ergaben sich im Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und den 9 bzw.

13 Tagen repetitiv mit CpG-ODN behandelten Tieren nur wenige auffällige Unterschiede zwischen den Gruppen.
Zunächst ist festzuhalten, dass bei den behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe eine stärkere Infiltration durch T-Zellen zu beobachten ist. Diese Beobachtung deckt sich mit den bisherigen Untersuchungen zur Wirkungsweise von CpG-ODN, in denen eine vorwiegend T-Zell-vermittelte Immunreaktion beschrieben wird. Die Unentbehrlichkeit der T-Zellen bei der BCG-Wirkung wurde bereits 1987 im Tierversuch an athymischen Nacktmäusen belegt (Ratliff et al, 1987). Für CpG-ODN konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine funktionierende zelluläre Immunantwort essentiell ist:
In einem subkutanen Tiermodell mit dem MB49 Tumor konnte bei immunkompetenten Tieren eine Tumorregression erreicht werden, während die Behandlung bei T-Zell-defizienten Tieren erfolglos blieb (Hegele et al, 2004; Mangsbo et al, 2008). Die immunhistologische Färbung in unserer Arbeit zeigt nun, dass diese Unverzichtbarkeit der T-Lymphozyten auch mit einer vermehrten Infiltration im tumortragenden Gewebe einhergeht.

Die weitere Subtypisierung der T-Lymphozyten ergab bei den durch CD4-charakterisierten T-Helferzellen keine gruppenspezifischen Auffälligkeiten. Eine erhöhte Dichte von CD4-positiven Zellen konnte zumindest in unserem vierstufigen, semiquantitativen Bewertungsschema nicht identifiziert werden.
Dies scheint zunächst überraschend, wird den CD4-tragenden Th1-Lymphozyten doch eine Schlüsselrolle in der zellvermittelten antineoplastischen CpG-ODN-Wirkung zuteil. Durch die Aktivierung von T-Helferzellen kommt es zu einem Th1-dominierten Zytokinmilieu, das die Stimulation der potentiellen antineoplastischen Effektorzellen bedingt (Krieg, 2008). Die essentielle Funktion der CD4-T-Lymphozyten, als T-Memory-Zellen insbesondere für die anhaltende Immunität konnte auch in Versuchen an einem subkutanen, murinen MB49-Modell nachgewiesen werden. Bei tumortragenden Mäusen, die zunächst mit CpG-ODN erfolgreich behandelt

wurden, verlief eine erneute Implantation von MB49 Zellen frustran. Wurde jedoch eine CD4-Depletion durchgeführt kam es zu einem erneuten Tumor-Take (Mangsbo et al, 2008).
Die in unseren Untersuchungen teilweise fehlende und zumindest in den Therapiegruppen nicht erhöhte Gewebeinfiltration durch T-Helfer-Zellen widerlegt diese Untersuchungsergebnisse nicht. Sie zeigt jedoch, dass sich trotz der wichtigen Rolle im CpG-Wirkmechanismus nach den von uns gewählten Therapiezeiträumen zumindest immunhistologisch keine wegweisenden numerischen Änderungen im Zielgewebe feststellen lassen. Möglicherweise wirken sich die Interaktionen zwischen APC und $CD4^+$-Lymphozyten, die ja hauptsächlich im Lymphknoten stattfinden, auch nicht unmittelbar auf die Zelldichte im Blasengewebe aus.

Mit der immunhistologischen Färbung von CD8 wurde mit der CTL eine der mutmaßlichen Effektorzellen in der TLR9-vermittelten Immuntherapie ins Visier genommen. Bisherige Modelle gehen von einer durch Th1-gewichteten zellvermittelten Immunantwort aus, in der die Aktivität von NK über Zytokine erhöht wird und CTL über Cross-Präsentationsvorgänge durch die APC mit Unterstützung von $CD4^+$-Lymphozyten differenziert und deren Proliferation induziert wird (Krieg, 2004). Depletionsversuche konnten auch im murinen Modell eine essenzielle Funktion von NK und CTL nachweisen. So konnte die Wirksamkeit einer CpG-ODN-Therapie nach Inaktivierung von $CD8^+$- und NK-Zellen reduziert werden, wobei nur durch eine kombinierte Depletion eine vollständige Aufhebung des antitumorösen Effekts erreicht wurde (Kawarada et al, 2001b).
In den 3 Gruppen der ersten Versuchsreihe fand sich in sämtlichen Blasen eine kräftige Infiltration $CD8^+$-Lymphozyten unabhängig von einer vorherigen Behandlung mit CpG-ODN. Für dieses Resultat sind ebenfalls verschiedene Erklärungen denkbar. So spielen CTL auch in der behandlungsnaiven Tumorimmunität eine Rolle und sind bei soliden Tumoren als Ausdruck einer körpereigenen antineoplastischen Immunabwehr verstärkt nachweisbar. Zum

anderen sind aktivierte CTL auch an der Abtötung sonstiger funktionell defizitärer Zellen beteiligt, so dass unspezifische Abläufe im teilweise nekrotischen Tumorgewebe eine vermehrte Rekrutierung von CD8-positiven Lymphozyten verursachen könnten.

Die Färbung der B-Lymphozyten mittels CD 19, die in den aktuellen Mechanismusmodellen der TLR9-agonistischen Tumortherapie insbesondere als antigenpräsentierende Zellen fungieren, zeigte eine deutliche Verminderung der initial dichten B-Zell-Infiltration nach Applikation der Oligonukleotide im Vergleich zur Kontrollgruppe. Während in der „Late-Onset"-Gruppe nach einer 9-tägigen Behandlung noch bei der Hälfte der Tiere B-Zellen im Blasengewebe nachgewiesen werden, konnten nach 13-tägiger Behandlung in keinem Präparat mehr CD19-positive Zellen nachgewiesen werden.
Dieser Befund reflektiert die durch die CpG-ODN-Bindung an TLR9 ausgelöste Th1-gewichtete Immunantwort, die durch ihr Zytokinmilieu, insbesondere IFNγ, die Th2-Proliferation und damit letztendlich die B-Zell-Proliferation unterdrückt. Damit findet sich auch auf immunhistochemischer Ebene ein Hinweis auf eine Th1-dominierte Immunantwort infolge der CpG-Stimulation über TLR9, obwohl ein direkter Nachweis über spezifische Oberflächenmarker bisher nicht geführt werden konnte.

4.2 Versuchsreihe 2 - Expression von ICAM-1

Die zweite für diese Arbeit durchgeführte Versuchsreihe beleuchtet mit der Färbung von ICAM-1 die Funktionsweise der stimulativen Oligonukleotide nicht unter dem Aspekt eines infiltrierenden Zelltyps, sondern hinsichtlich der Expression eines sowohl für die APC-T-Zell-Interaktion als auch für die Adhärenz beteiligter Immunzellen und mögliche Modifikation weiterer

Signalwege interessanten Moleküls auf der Oberfläche migrierender und ortsständiger Zellen.

Auffälligster Unterschied zwischen den 3 Gruppen (Gruppe 1: kein Tumor/CpG-ODN, Gruppe 2: Tumor/CpG-ODN-naiv, Gruppe 3: Tumor/CpG-ODN) war die kräftige Expression von ICAM-1 auf den Zellen des MB49-Tumors nach CpG-ODN-Behandlung und den Endothelien sowie, weniger auffällig, eine vermehrte ICAM-1-Expression durch infiltrierende Lymphozyten. Eine *in-vivo* Mehrexpression von ICAM-1 im Blasengewebe konnte bereits nach BCG-Instillation sowohl für den Menschen als auch im murinen Modell nachgewiesen werden (Ikeda et al, 2002; Jackson et al, 1994).
TLR9 könnte auch hier ein unmittelbares Bindeglied zwischen CpG-ODN und der ICAM-1-Expression darstellen. In anderem Zusammenhang wurde nach Stimulation von TLR9 eine NFκB-vermittelte Transkriptionssteigerung für ICAM-1 auf Endothelzellen sowohl im humanen als auch im murinen System nachgewiesen (El Kebir et al, 2009; Li et al, 2004).
Der TLR9, zunächst nur auf ausgewählten Immunzellen wie dendritischen Zellen und B-Zellen vermutet, wurde in neueren Arbeiten auch auf vielen anderen, insbesondere epithelialen Zellen im humanen und murinen System nachgewiesen, darunter auch auf Urothelzellen.
So könnte neben einer zytokin-vermittelten Steigerung der ICAM-1-Expression auch eine direkte Steigerung der Transkription über den TLR9-MyD88-NFκB-Weg vorliegen.
Wegen der Unentbehrlichkeit von ICAM-1 für zentrale Schritte der zellvermittelten Tumorimmunität, wie der Migration immunkompetenter Zellen ins Gewebe und der Ausbildung der IS, liegt ein kausaler Zusammenhang der Mehrexpression mit der Wirkung der CpG-ODN nahe (Bui et al, 2020).
Durch die Induktion von ICAM-1 auf den Tumorzellen könnte die Ausbildung einer zytotoxischen IS erleichtert, und die Tumorzelle so für die Effektorzelle erst angreifbar werden.

Insbesondere durch die gesteigerte Expression auf den mitangeschnittenen Endothelien könnte einem bekannten „Immune-Escape-Mechanismus“ solider Tumoren entgegengesteuert werden (Klein, 2018).
Von Interesse für das Verständnis der antineoplastischen Wirkung der CpG-ODN ist weiterhin die neuere Erkenntnis, dass eine Bindung von ICAM-1 auf der APC an seinen Rezeptor LFA-1 auf T-Lymphozyten neben einer Steigerung der Zell-Zell-Adhäsion wohl auch signaltransduzierende Funktionen hat (Verma et al, 2016; Verma & Kelleher, 2017). Die in vielen Arbeiten beschriebene von ICAM-1/LFA-1 vermittelte Polarisierung in Richtung einer Th1-Antwort ist möglicherweise ein wichtiger Schritt bei der Induktion und Erhaltung der CTL- oder NK-vermittelten Zytotoxizität.
Die deutliche Mehrexpression von ICAM-1 auch auf den Urothelkarzinomzellen der behandelten Tiere lässt auch eine Funktion derselben als nicht professionelle antigenpräsentierende Zellen vermuten.
Die Ergebnisse mögen Anlass geben, die Rolle von ICAM-1 weiter zu erforschen. So wären *in-vitro*-Untersuchungen einer möglichen ICAM-1-Induktion auf MB49 Zellen durch TLR9-Aktivierung denkbar, sicherlich würden auch Depletionsstudien im Tiermodell den Stellenwert von ICAM-1 im Gesamtkontext weiter aufklären.
Neben einem in vorangegangenen Arbeiten bereits skizzierten zukünftigen Einsatz von CpG-ODN als alternative topische Instillationstherapie beim nicht muskelinvasiven Urothelkarzinom der Blase eröffnen die neuen Erkenntnisse insbesondere bezügliche der Effekte auf ICAM-1 nun eine weitere Perspektive. Die Beinflussung von Schlüsselschritten der zellulären Tumorimmunität, die auch modernen Checkpoint-Inhibitoren als Angriffspunkte dienen, lässt CpG-ODN zu einem interessanten potentiellen Kombinationspartner dieser Substanzen werden.

5 Zusammenfassung

Die intravesikale, topische Anwendung des Tuberkulose-Lebendimpfstoffs Bacillus Calmette Guérin (BCG) findet seit Ende der 1970er Jahre im klinischen Alltag Anwendung und hat ihre Rolle als effektivste Rezidiv- und Progressionsprophylaxe beim nicht-muskelinvasiven Urothelkarzinom der Blase bis heute behauptet. Große Teile der Wirkungsweise der seit fast 40 Jahren im Einsatz befindlichen Substanz liegen indes weiter im Unklaren.

Auf der Suche nach den funktionstragenden Bestandteilen von BCG wurden im weiteren Verlauf unmethylierter cytosin- und guaninreiche Sequenzen (CG) der prokaryonten DNA identifiziert, die schließlich zur Entwicklung von synthetischen CpG-ODN mit starkem immunmodulatorischen Potential und einem nukleasefesten Phosphodiesterrückgrat führten.

Als Zielstruktur für die CpG-Motive konnte Toll-like-Receptor 9 (TLR9), ein Pattern-Recognition-Receptor identifiziert werden, der auf verschiedenen Signaltransduktionswegen Transkriptionsfaktoren stimuliert, was wiederum durch eine vermehrte Expression von Zytokinen und ko-stimulativen Faktoren eine zelluläre Immunantwort von Th1-Typ induziert.

Die antineoplastische Effektivität spezieller CpG-ODN, wurde mittlerweile für viele solide Tumoren im Tiermodell belegt, so auch für das in dieser Arbeit verwendete murine, orthotope MB49-Modell.

Für diese Arbeit wurde in einer ersten Versuchsreihe zunächst bei 36 C57/Bl6-Mäusen durch transurethrale Instillation ein MB49-Urothelkarzinom induziert. Im weiteren Verlauf erhielten 12 Tiere eine Kontrollbehandlung mit PBS, die restlichen Tiere erhielten über verschiedene Zeiträume (ab dem 1. bzw. 5. Tag post Tumortransfer) repetitiv CpG-ODN. Am 13. Tag wurden die Tiere geopfert und die Harnblasen zur immunhistologischen Aufarbeitung entnommen, wobei eine Lymphozytensubtypisierung anhand von CD3, CD4, CD8 und CD19 erfolgte.

Hier zeigte sich insbesondere eine vermehrte T-Zell-Infiltration (CD3) im Bereich des Tumors, wobei im semiquantitativen Bewertungsschema kein relevanter Trend in Bezug auf die Unterscheidung zwischen T-Helferzellen (CD4) und zytotoxischen T-Zellen (CD8) identifiziert werden konnte. Die Färbung der B-Lymphozyten (CD19) zeigte eine im Vergleich zur Kontrollgruppe mit zunehmender Therapiedauer abnehmende Infiltration durch B-Zellen als Zeichen einer über die Zeit zunehmenden Unterdrückung der Th2-Antwort.

In einer zweiten Reihe wurden 12 Tiere auf 3 Gruppen verteilt, wobei die erste keinen Tumortransfer, jedoch eine Behandlung mit CpG-ODN erhielt, in der zweiten ein Tumor induziert wurde, eine weitere Behandlung jedoch unterblieb, und in der letzten eine Behandlung an tumortragenden Tieren erfolgte. Die am 7. Tag präparierten Harnblasen dieser Tiere wurden immunhistochemisch auf Expression des interzellulären Zelladhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) untersucht, das in anderen Untersuchungen bereits nach intravesikaler BCG-Behandlung im murinen Modell vermehrt festgestellt werden konnte. Auch nach CpG-ODN Konfrontation zeigte sich eine massive Steigerung der im naiv nur diskret vorhandenen Oberflächenexpression von ICAM-1, wobei die Expression sich nicht auf Immunzellen beschränkte, sondern insbesondere auf den Tumorzellen selbst nachweisbar war. Das Ergebnis unterstreicht die bereits für die instillative BCG-Therapie und andere Tumormodelle unter CpG-ODN-Behandlung postulierte Schlüsselrolle von ICAM-1. Dabei geht die Funktion des Komplexes aus ICAM-1 und seinem Interaktionspartner funktionelles Lymphozyten-Antigen 1 (LFA-1), das auf vielen Immunzellen, darunter auch den T-Lymphozyten, exprimiert wird, möglicherweise über eine reine Adhäsionsvermittlung hinaus und stellt einen integralen Bestandteil bei der Schaffung und Erhaltung der Th1-gerichteten Immunantwort dar. Die Rolle von ICAM-1 bei der Migration immunkompetenter Zellen in den Tumor und bei der Ausbildung zytotoxischer immunologischer Synapsen (IS) könnten CpG-ODN als potentiellen Kombinationspartner für moderne Immuntherapien qualifizieren.

Um den erfolgversprechenden Ansatz der antineoplastischen CpG-ODN-Therapie für solide Tumoren wie das Urothelkarzinom in das humane System zu übertragen, sind sicherlich weitere funktionelle Untersuchungen insbesondere in Bezug auf ICAM-1 erforderlich.

6 Summary

The intravesical application of the tuberculosis vaccine Bacille Calmette Guérin (BCG) has been used for the last 40 years and to date is the most effective adjuvant treatment for non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC). However, the detailed mechanism of action remains to be determined.

Exploring the active ingredients of BCG, unmethylated cytosin- and guanin-rich sequences were identified. This subsequently gave rise to the development of synthetic CpG-oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) with a nuclease-resistant, phosphorothioate-modified backbone, inhering strong immunostimulatory properties.

CpG-ODN aim at toll-like-receptor 9 (TLR9), a pattern-recognition-receptor. By different signalling cascades, TLR9 activation increases the transcription and expression of cytokines and factors, which conclusively leads to a Th1-dominated, cell-mediated immune response.

Antineoplastic potential of some CpG-ODN has been verified for a variety of solid tumours in animal models, including the MB49-model used in this study.

In a first series, in 36 C57/Bl6 mice, a MB49-transitional cell carcinoma was implanted via transurethral instillation. Twelve of these received a control treatment with PBS, the other 24 were repeatedly instilled with CpG-ODN following different schedules. On day 13, the animals were sacrificed, and the bladders were harvested for immunohistochemical subtyping of the lymphocytic infiltration by staining CD3, CD4, CD8a and CD19.

Hereby an augmented T-cell-infiltration (CD3) of the tumour bearing tissue was observed, whereas a further subdifferentiation between T-helper-cells (CD4) and cytotoxic T-cells was not achievable on the applied semiquantitative scale. Staining of CD 19 showed a decreasing density of B-cells over the course of therapy, possibly indicating a suppression of the humoral Th2-response in favour of a Th1-polarization.

In a second series, 12 mice were divided in 3 groups. The first group was treated with CpG-ODN instillation without preceding tumour transfer, the second underwent tumour implantation without further treatment, while the last cohort received both, tumour and treatment. The animals were sacrificed on day 7 and bladders were resected and processed to finally immunohistochemically evaluate the presence of the surface protein Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), already known to be enhanced after BCG-Treatment in a murine model. After exposition to CpG-ODN a massive increase of the expression of ICAM-1 was observed not only by infiltrating immunocytes, but also by the cancer cells, suggesting a crucial role in the mode of action. The complex of ICAM-1 with its receptor Lymphocyte Function-Associated Antigen 1 (LFA-1) might exceed pure adhesion properties by representing a key aspect in the establishment and maintenance of Th1-type immune response. The crucial role of ICAM-1 in transmigration of immune cells and in the establishment of the cytotoxic immunological synapse suggests CpG-ODN as promising adjuvant for modern checkpoint inhibitors.
Further research will certainly need to illuminate the features and functions of ICAM-1 in CpG-ODN treatment to prospectively allow transferring this promising approach into the human system.

7 Literaturverzeichnis

Ayari, C., Bergeron, A., LaRue, H., Menard, C. & Fradet, Y. (2011) Toll-like receptors in normal and malignant human bladders. *J Urol*, 185(5), 1915-21.

Babjuk, M., Burger, M., Compérat, E., Gontero, P., Mostafid, A. H., Palou, J., Rhijn, B. W. G. v., Rouprêt, M., Shariat, S. F., Sylvester, R. & Zigeuner, R. (2019) EAU Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer. Edn. presented at the EAU Annual Congress Barcelona 2019. Arnhem, The Netherlands: EAU Guidelines Office.

Ballas, Z. K., Krieg, A. M., Warren, T., Rasmussen, W., Davis, H. L., Waldschmidt, M. & Weiner, G. J. (2001) Divergent therapeutic and immunologic effects of oligodeoxynucleotides with distinct CpG motifs. *J Immunol*, 167(9), 4878-86.

Bauer, S., Kirschning, C. J., Hacker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H. & Lipford, G. B. (2001) Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(16), 9237-42.

Bohle, A. & Bock, P. R. (2004) Intravesical bacille Calmette-Guerin versus mitomycin C in superficial bladder cancer: formal meta-analysis of comparative studies on tumor progression. *Urology*, 63(4), 682-6; discussion 686-7.

Bohle, A. & Brandau, S. (2003) Immune mechanisms in bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer. *J Urol*, 170(3), 964-9.

Bohle, A., Thanhauser, A., Ulmer, A. J., Ernst, M., Flad, H. D. & Jocham, D. (1993) Dissecting the immunobiological effects of Bacillus Calmette-Guerin (BCG) in vitro: evidence of a distinct BCG-activated killer (BAK) cell phenomenon. *J Urol*, 150(6), 1932-7.

Brierley, J. D., Gospodarowicz, M. K. & Wittekind, C. (2017) *TNM classification of malignant tumours*John Wiley & Sons.

Bui, T. M., Wiesolek, H. L. & Sumagin, R. (2020) ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. *J Leukoc Biol*.

Calmette, A. (1931) Preventive Vaccination Against Tuberculosis with BCG. *Proc R Soc Med*, 24(11), 1481-90.

Cambier, S., Sylvester, R. J., Collette, L., Gontero, P., Brausi, M. A., van Andel, G., Kirkels, W. J., Silva, F. C., Oosterlinck, W., Prescott, S., Kirkali, Z., Powell, P. H., de Reijke, T. M., Turkeri, L., Collette, S. & Oddens, J. (2016) EORTC Nomograms and Risk Groups for Predicting Recurrence, Progression, and Disease-specific and Overall Survival in Non-Muscle-invasive Stage Ta-T1 Urothelial Bladder Cancer Patients Treated with 1-3 Years of Maintenance Bacillus Calmette-Guerin. *Eur Urol*, 69(1), 60-9.

Colombo, R., Pozzo, L. F. D., Salonia, A., Rigatti, P., Leib, Z., Baniel, J., Caldarera, E. & Pavone-Macaluso, M. (2003) Multicentric Study Comparing Intravesical Chemotherapy Alone and With Local Microwave Hyperthermia for Prophylaxis of Recurrence of Superficial Transitional Cell Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 21(23), 4270-4276.

De Boer, E. C., Rooijakkers, S. J., Schamhart, D. H. & Kurth, K. H. (2003) Cytokine gene expression in a mouse model: the first instillations with viable bacillus Calmette-Guerin determine the succeeding Th1 response. *J Urol*, 170(5), 2004-8.

Dietrich, H. & Dietrich, B. (2001) Ludwig Rehn (1849-1930)--pioneering findings on the aetiology of bladder tumours. *World J Urol*, 19(2), 151-3.

Dustin, M. L. (2014) The immunological synapse. *Cancer Immunol Res*, 2(11), 1023-33.

Dustin, M. L. & Long, E. O. (2010) Cytotoxic immunological synapses. *Immunol Rev*, 235(1), 24-34.

El Kebir, D., Jozsef, L., Pan, W., Wang, L. & Filep, J. G. (2009) Bacterial DNA activates endothelial cells and promotes neutrophil adherence through TLR9 signaling. *J Immunol*, 182(7), 4386-94.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D. & Bray, F. (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 136(5), E359-86.

Gunther, J. H., Jurczok, A., Wulf, T., Brandau, S., Deinert, I., Jocham, D. & Bohle, A. (1999) Optimizing syngeneic orthotopic murine bladder cancer (MB49). *Cancer Res*, 59(12), 2834-7.

Harjunpaa, H., Llort Asens, M., Guenther, C. & Fagerholm, S. C. (2019) Cell Adhesion Molecules and Their Roles and Regulation in the Immune and Tumor Microenvironment. *Front Immunol*, 10, 1078.

Hartmann, G., Weeratna, R. D., Ballas, Z. K., Payette, P., Blackwell, S., Suparto, I., Rasmussen, W. L., Waldschmidt, M., Sajuthi, D., Purcell, R. H., Davis, H. L. & Krieg, A. M. (2000) Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo. *J Immunol*, 164(3), 1617-24.

Heeg, K. & Zimmermann, S. (2000) CpG DNA as a Th1 trigger. *Int Arch Allergy Immunol*, 121(2), 87-97.

Hegele, A., Dalpke, A., Barth, P., Varga, Z., Heeg, K., Hofmann, R. & Olbert, P. (2004) Antineoplastic effect of immunostimulatory DNA (CpG-ODN) in a murine C57-BL6/MB-49 transitional cell carcinoma model. *Anticancer Res*, 24(4), 2225-30.

Hegele, A., Dalpke, A., Heeg, K., Barth, P., Varga, Z., Hofmann, R. & Olbert, P. (2005) Immunostimulatory CpG oligonucleotides reduce tumor burden after intravesical administration in an orthotopic murine bladder cancer model. *Tumour Biol*, 26(5), 274-80.

Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. & Akira, S. (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 408(6813), 740-5.

Heney, N. M., Ahmed, S., Flanagan, M. J., Frable, W., Corder, M. P., Hafermann, M. D. & Hawkins, I. R. (1983) Superficial bladder cancer: progression and recurrence. *J Urol*, 130(6), 1083-6.

Hubbard, A. K. & Rothlein, R. (2000) Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med*, 28(9), 1379-86.

Ikeda, N., Toida, I., Iwasaki, A., Kawai, K. & Akaza, H. (2002) Surface antigen expression on bladder tumor cells induced by bacillus Calmette-Guerin (BCG): A role of BCG internalization into tumor cells. *Int J Urol*, 9(1), 29-35.

Jackson, A. M., Alexandroff, A. B., McIntyre, M., Esuvaranathan, K., James, K. & Chisholm, G. D. (1994) Induction of ICAM 1 expression on bladder tumours by BCG immunotherapy. *J Clin Pathol*, 47(4), 309-12.

Jocham, D., Miller, K., Albers, P., Allolio, B. & Andreas, J. (2007) *Praxis Urologie*Thieme.

Kawai, T. & Akira, S. (2006) TLR signaling. *Cell Death Differ*, 13(5), 816-25.

Kawarada, Y., Ganss, R., Garbi, N., Sacher, T., Arnold, B. & Hammerling, G. J. (2001a) NK- and CD8(+) T cell-mediated eradication of established tumors by peritumoral injection of CpG-containing oligodeoxynucleotides. *J Immunol*, 167(9), 5247-53.

Kawarada, Y., Ganss, R., Garbi, N., Sacher, T., Arnold, B. & Hämmerling, G. J. (2001b) NK- and CD8+ T Cell-Mediated Eradication of Established Tumors by Peritumoral Injection of CpG-Containing Oligodeoxynucleotides.

Key, M. (2006) Dako Education - Immunohistochemical Staining Methods, Fourth Edition.

Klein, D. (2018) The Tumor Vascular Endothelium as Decision Maker in Cancer Therapy. *Front Oncol*, 8, 367.

Klinman, D. M., Yi, A. K., Beaucage, S. L., Conover, J. & Krieg, A. M. (1996) CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(7), 2879-83.

Krieg, A. M. (2003) CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts? *Nat Med*, 9(7), 831-5.

Krieg, A. M. (2004) Antitumor applications of stimulating toll-like receptor 9 with CpG oligodeoxynucleotides. *Curr Oncol Rep*, 6(2), 88-95.

Krieg, A. M. (2008) Toll-like receptor 9 (TLR9) agonists in the treatment of cancer. *Oncogene*, 27(2), 161-7.

Krieg, A. M. (2012) CpG still rocks! Update on an accidental drug. *Nucleic Acid Ther*, 22(2), 77-89.

Krieg, A. M., Yi, A. K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretzky, G. A. & Klinman, D. M. (1995) CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, 374(6522), 546-9.

Kälble, T. (2001) Ätiopathologie, Risikofaktoren, Umwelteinflüsse und Epidemiologie des Harnblasenkarzinoms. *Der Urologe A*, 40(6), 447-450.

LaRue, H., Ayari, C., Bergeron, A. & Fradet, Y. (2013) Toll-like receptors in urothelial cells--targets for cancer immunotherapy. *Nat Rev Urol*, 10(9), 537-45.

Li, J., Ma, Z., Tang, Z.-L., Stevens, T., Pitt, B. & Li, S. (2004) CpG DNA-mediated immune response in pulmonary endothelial cells.

Lyck, R. & Enzmann, G. (2015) The physiological roles of ICAM-1 and ICAM-2 in neutrophil migration into tissues. *Curr Opin Hematol*, 22(1), 53-9.

Male, D. (2005) *Immunologie auf einen Blick*Elsevier, Urban & Fischer.

Male, D. K. (2006) *Immunology*Mosby Elsevier.

Malmstrom, P. U., Sylvester, R. J., Crawford, D. E., Friedrich, M., Krege, S., Rintala, E., Solsona, E., Di Stasi, S. M. & Witjes, J. A. (2009) An individual patient data meta-analysis of the long-term outcome of randomised studies comparing intravesical mitomycin C versus bacillus Calmette-Guerin for non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol*, 56(2), 247-56.

Mangsbo, S. M., Ninalga, C., Essand, M., Loskog, A. & Totterman, T. H. (2008) CpG therapy is superior to BCG in an orthotopic bladder cancer model and generates CD4+ T-cell immunity. *J Immunother*, 31(1), 34-42.

Morales, A., Eidinger, D. & Bruce, A. W. (1976) Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol*, 116(2), 180-3.

Murphy, K., Weaver, C. & Seidler, L. (2018) *Janeway Immunologie*Springer Berlin Heidelberg.

Ninalga, C., Loskog, A., Klevenfeldt, M., Essand, M. & Totterman, T. H. (2005) CpG oligonucleotide therapy cures subcutaneous and orthotopic tumors and evokes protective immunity in murine bladder cancer. *J Immunother*, 28(1), 20-7.

Olbert, P. J., Schrader, A. J., Simon, C., Dalpke, A., Barth, P., Hofmann, R. & Hegele, A. (2009) In vitro and in vivo effects of CpG-Oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) on murine transitional cell carcinoma and on the native murine urinary bladder wall. *Anticancer Res*, 29(6), 2067-76.

Ratliff, T. L., Gillen, D. & Catalona, W. J. (1987) Requirement of a thymus dependent immune response for BCG-mediated antitumor activity. *J Urol*, 137(1), 155-8.

Roebuck, K. A. & Finnegan, A. (1999) Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J Leukoc Biol*, 66(6), 876-88.

Roland-Koch-Institut (2013) RKI-Ratgeber "Tuberkulose". Robert-Koch-Institut.

Smits, H. H., de Jong, E. C., Schuitemaker, J. H., Geijtenbeek, T. B., van Kooyk, Y., Kapsenberg, M. L. & Wierenga, E. A. (2002) Intercellular adhesion molecule-1/LFA-1 ligation favors human Th1 development. *J Immunol*, 168(4), 1710-6.

Stratowa, C. & Audette, M. (1995) Transcriptional regulation of the human intercellular adhesion molecule-1 gene: a short overview. *Immunobiology*, 193(2-4), 293-304.

Summerhayes, I. C. & Franks, L. M. (1979) Effects of donor age on neoplastic transformation of adult mouse bladder epithelium in vitro. *J Natl Cancer Inst*, 62(4), 1017-23.

Suttmann, H., Jocham, D., Bohle, A. & Brandau, S. (2002) The role of LFA-1 in the lysis of bladder cancer cells by bacillus Calmette-Guerin and interleukin 2-activated killer cells. *Urol Res*, 30(4), 233-9.

Sylvester, R. J., van der Meijden, A. P., Oosterlinck, W., Witjes, J. A., Bouffioux, C., Denis, L., Newling, D. W. & Kurth, K. (2006) Predicting

recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol*, 49(3), 466-5; discussion 475-7.

Sylvester, R. J., van der Meijden, A. P., Witjes, J. A. & Kurth, K. (2005) Bacillus calmette-guerin versus chemotherapy for the intravesical treatment of patients with carcinoma in situ of the bladder: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol*, 174(1), 86-91; discussion 91-2.

Takeshita, F., Leifer, C. A., Gursel, I., Ishii, K. J., Takeshita, S., Gursel, M. & Klinman, D. M. (2001) Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. *J Immunol*, 167(7), 3555-8.

Tan, W. S., Palou, J., Kelly, J. & Group, H. I. a. H. I. C. T. (2017) MP15-18 Safety and tolerability analysis of hyperthermic intravesical Mitomycin to Mitomycin alone in HIVEC I and HIVEC II: An analysis of 307 patients. *Journal of Urology*, 197(4S), e177-e177.

Thanhauser, A., Bohle, A., Flad, H. D., Ernst, M., Mattern, T. & Ulmer, A. J. (1993) Induction of bacillus-Calmette-Guerin-activated killer cells from human peripheral blood mononuclear cells against human bladder carcinoma cell lines in vitro. *Cancer Immunol Immunother*, 37(2), 105-11.

Tokunaga, T., Yamamoto, H., Shimada, S., Abe, H., Fukuda, T., Fujisawa, Y., Furutani, Y., Yano, O., Kataoka, T., Sudo, T. & et al. (1984) Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst*, 72(4), 955-62.

Verma, N. K., Fazil, M. H., Ong, S. T., Chalasani, M. L., Low, J. H., Kottaiswamy, A., P, P., Kizhakeyil, A., Kumar, S., Panda, A. K., Freeley, M., Smith, S. M., Boehm, B. O. & Kelleher, D. (2016) LFA-1/ICAM-1 Ligation in

Human T Cells Promotes Th1 Polarization through a GSK3beta Signaling-Dependent Notch Pathway. *J Immunol*, 197(1), 108-18.

Verma, N. K. & Kelleher, D. (2017) Not Just an Adhesion Molecule: LFA-1 Contact Tunes the T Lymphocyte Program. *J Immunol*, 199(4), 1213-1221.

Witjes, J. A., Bruins, M., Cathomas, R., Compérat, E., Cowan, N. C., Gakis, G., Hernández, V., Lorch, A., Ribal, M. J., Thalmann, G. N., Heijden, A. G. v. d. & Veskimäe, E. (2019) EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer. Edn. presented at the EAU Annual Congress Barcelona 2019.

8 Anhang

8.1 Lebenslauf

17.11.1978	geboren in Lahn-Gießen
1985-1989	Grundschule Rechtenbach
1989-1995	Gesamtschule Schwingbach, Hüttenberg-Rechtenbach
1995-1998	Goetheschule Wetzlar
1998-1999	Zivildienst, Rotes Kreuz Wetzlar
1999-2006	Studium der Humanmedizin, Philipps-Universität Marburg und Universidad de Cádiz, Spanien
2001	Ärztliche Vorprüfung
2002	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2005	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2005-2006	Praktisches Jahr in Marburg (Innere Medizin), Ilanz, Schweiz (Chirurgie), Bozen, Italien (Urologie)
2006	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2007-2012	Assistenzarzt in Weiterbildung in der Klinik für Urologie und Kinderurologie, Krankenhaus Nordwest, Frankfurt am Main
2012	Facharzt für Urologie
2012	Fellow of the European Board of Urology (FEBU)
2012-2017	Tätigkeit als Facharzt und Funktionsoberarzt, Klinik für Urologie und Kinderurologie, Krankenhaus Nordwest, Frankfurt am Main
2013	Zusatzbezeichnung „Medikamentöse Tumortherapie“
seit 2017	Tätigkeit als Oberarzt, Klinik für Urologie und Kinderurologie, Krankenhaus Nordwest, Frankfurt am Main

8.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren:

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Becker, Berger, Bertalanffy, Bette, Beyer, Bien, Bonzel, Bullinger, Cardesa, Carrera, Christiansen, Daut, Dippold, Eilers, Feuser, Gemsa, Geueke, Geus, Gil Villar, Görg, Gotzen, Griss, Gudermann, Happle, Hellinger, Hertl, Hesse, Hofmann, Jungclas, Kann, Kern, Klenk, Klose, Köhler, König, Koolmann, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kuhlmann, Lang, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Martin, Meinhardt, Moll, Moodsdorf, Moran Penco, Mutters, Neubauer, Neumüller, Ortel, Plappert, Quiles, Remschmidt, Renz, Repp, Richter, Röhm, Röhrenbbeck, Rosenow, Rothmund, Sawatzki, Schifferli, Schmidt, Schüffel, Seitz, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wölfel, Wulf, Wündisch.

8.3 Danksagung

Nachdem das Fach der Urologie im Medizinstudium mein Interesse geweckt hat, fand ich an der Klinik für Urologie und Kinderurologie der Philipps-Universität Marburg die Möglichkeit zu promovieren – vielen Dank an die Klinik für Urologie und Kinderurologie.

Größten Dank richte ich auch an PD Dr. Peter J. Olbert und meinen Doktorvater Prof. Dr. Axel Hegele, die mich zunächst für das Thema begeisterten, mir während des experimentellen Teils praktisch und theoretisch zur Seite standen, für meine Ideen ein offenes Ohr hatten, mich schließlich beim Verfassen der Dissertation unterstützten und mich immer wieder beharrlich motivierten.

Für die Möglichkeit zur Anfertigung der Gefrierschnitte und die Befundung der Immunhistochemie möchte ich Prof. Dr. Mennel (Neuropathologie) und Prof. Dr. Barth (Pathologie) danken.

Renate Nottelmann will ich stellvertretend für die Mitarbeiter des molekularbiologischen Labors meine Dankbarkeit für die freundliche Zusammenarbeit im Allgemeinen und das Engagement bei der Anleitung und Optimierung immunhistologischer Prozesse im Speziellen aussprechen.

Meine beiden Mitdoktorandinnen Corinna Simon und Julia Scholl waren die besten Kollegen, die man sich in Tierstall und Labor wünschen kann.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass ich überhaupt studieren konnte.

Danke, Lena, für deine mentale Unterstützung, dein Verständnis und deine Geduld.

8.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Immunhistochemische Subtypisierung der lokalen lymphozytären Zellinfiltration und Expression von ICAM-1 nach instillativer Behandlung mit stimulativen CpG-ODN am orthotopen, murinen Harnblasenkarzinommodell“ in der Klinik für Urologie unter Leitung von Prof. Dr. R. Hofmann mit Unterstützung durch Prof. Dr. A. Hegele ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.
Ich versichere, dass ich sämtliche wörtlichen oder sinngemäßen Übernahmen und Zitate kenntlich gemacht habe.
Mit dem Einsatz von Software zur Erkennung von Plagiaten bin ich einverstanden.

Marburg, 19. Juli 2021

8.5 Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

1. Vortrag auf dem 71. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie:

Klebe, M; Olbert, P.J.; Barth, P.J.; Hofmann, R; Hegele, A., „Immunhistologische Subklassifizierung der lokalen Immunantwort nach Instillationsbehandlung mit CpG-Oligodesoxynukleotiden in einem murinen, orthotopen Urothelkarzinommodell“ und Publikation als Abstract *Abstracts des 71. Kongresses der Deutschen Gesellschaft für Urologie e.V. Urologe 58, 2–128 (2019). https://doi.org/10.1007/s00120-019-1018-y*

2. Aktuelle Urologie (angenommen, Online-Vorabveröffentlichung 04/2021)

Klebe, M., Olbert, P.J., Hofmann, R, Barth, P.J., Hegele, A. ICAM-1-Induktion durch CpG-ODN im murinen, orthotopen UCC-Modell – Immunhistochemische Analyse der lokalen Immunantwort auf immunstimulatorische DNA-Sequenzen [CpG-ODN instillation boosts ICAM-1 expression in an orthotopic murine UCC model: immunohistochemical evaluation of the local response to immunostimulatory DNA]. *Aktuelle Urol. 2021 Apr 14. German. doi: 10.1055/a-1268-2069. Epub ahead of print. PMID: 33853160.*