

Aus dem Institut für Pathologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

ICAM-1 als prädiktiver Marker für das Ansprechen auf Immuncheckpoint-Inhibitoren
beim muskelinvasiven Urothelkarzinom

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

Vorgelegt von

Annekathrin Freude
aus Waren (Müritz)

Mainz, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. Philipp Drees

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 15. April 2026

Nachnutzungslizenz: CC-BY-4.0

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Abstract.....	1
2. Literaturdiskussion	3
2.1 Das Harnblasenkarzinom	3
Definition und Epidemiologie	3
Risikofaktoren	4
Die TMN-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms	6
Die Therapie des Harnblasenkarzinoms	7
2.2. Tumورimmunologie	13
PD-1/PD-L1-Achse	14
Die immunologische Synapse.....	16
2.3 ICAM-1	17
Die Bedeutung von ICAM-1 im Tumorgeschehen.....	19
3. Material und Methoden	21
3.1 Geräte, Chemikalien und Reagenzien, Verbrauchsmaterial und Antikörper	21
Laborgeräte und Mikroskop	21
Verbrauchsmaterial und Chemikalien/Reagenzien	21
Programme	22
3.2 Patientenkollektive	23
Kollektiv 1: Unbehandelte Entdeckungskohorte.....	23
Kollektiv 2: Therapie-Kohorte.....	23
3.3 Die Herstellung und Färbung der Tissue-Microarrays.....	24
Hämatoxylin-Eosin-Färbung	25
Immunhistochemischen Färbungen.....	25
3.4 Beurteilung und visuelles Scoring der TMAs.....	26
3.5 Automatisierte Bildanalyse.....	28
3.6 Statistische Analysen	29
4. Ergebnisse	32
4.1 Entdeckungskohorte	32
4.2 Expression von PD-L1 und ICAM-1 in der Entdeckungskohorte.....	33
4.3 Kaplan-Meier Analysen der Entdeckungskohorte	35
4.4 CTL-Infiltration und Verteilung in Abhängigkeit von der PD-L1 und ICAM1-Expression	39
4.5 Uni- und multivariate Analyse	43

4.6 Beschreibung der Therapiekohorte	45
4.7 Kaplan-Meier-Analysen der Therapiekohorte.....	47
4.8 Vergleich der Prädiktionsmarker von ICAM-1 und PD-L1	49
5. Diskussion	51
5.1 Limitationen der Patientenkohorte.....	51
5.2 Expressionsverteilung und Wahl der Grenzwerte von PD-L1 und ICAM-1	52
5.3 Überlebenszeitanalysen	54
PD-L1.....	54
ICAM-1.....	55
Zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs).....	56
5.4 Die CTL-Infiltration und Verteilung	56
5.6 Multivariate Analyse	58
5.7 Der Einfluss von ICAM-1 auf die ICI-Therapie	60
5.8 Vergleich des prädiktiven Werts von ICAM-1 und PD-L1	61
6. Literaturverzeichnis	1
7. Anhang.....	1
Korrelationsanalysen nach Pearson.....	1
8. Danksagung.....	2
9. Tabellarischer Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigenpräsentierende Zellen
BC	Blasenkarzinom
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
BOR	bestes Gesamtüberleben
bspw	beispielsweise
CPS	Combined positive Score
CR	complete response
CRC	Kolorektales Karzinom
CT	Computertomografie
CTCAE	Common Terminology Criteria for Adverse Events
CTLA-4	zytotoxische T-Lymphozyten Antigen 4
CTLs	zytotoxische T-Lymphozyten
DAB	Diaminobenzidin
DCR	Disease Control Rate
DCs	Dendritische Zellen
ECOG	Eastern Cooperative Group
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
et al	et alii/ et aliae
FDA	Food and Drug Administration
GC	Gemcitabin und Cisplatin
ggü.	gegenüber
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
IC	immune score
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IL	Interleukin
LFA-1	Lymphocyte function associated antigen 1
MIBC	muskelinvasives Harnblasenkarzinom
MRT	Magnetresonanztomografie
MVAC	Methotrexat, Vinblastin, Doxorubicin und Cisplatin
NICE	National Institute for Health and Care
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NMIBC	nicht-muskelinvasives Harnblasenkarzinom
NPV	negativer prädiktiver Wert
NYHA	New York Heart Association
ORR	overall response rate, Objective Response Rate
PD	Progressive Erkrankung
PD-1	Programmed Cell Death Protein 1
PD-L1	programmed cell death-ligand 1
PPV	positiver prädiktiver Wert
PR	Partielle Remission
RC	radikale Zystektomie
SD	Stabile Erkrankung
SMAC	Supramolecular activation cluster
TCR	T-Zellrezeptor
TILs	tumorinfiltrierende Lymphozyten
TMA	Tissue-Microarrays
TRS	Target Retrieval Solution
TUR	transurethrale Resektion
UC	Urothelkarzinom
vs.	versus

1. Abstract

Das Harnblasenkarzinom gehört weltweit zu den zehn häufigsten Krebserkrankungen. Die Therapie des Harnblasenkarzinoms hängt vom Krankheitsstadium ab. Oberflächliche Tumore können durch transurethrale Resektion oder intravesikale medikamentöse Therapien kontrolliert werden, während fortgeschrittene, muskelinvasive Tumore in der kurativen Erstlinientherapie mittels einer Cisplatin-basierten neoadjuvanten Chemotherapie und anschließender radikaler Zystektomie behandelt werden. Da das Harnblasenkarzinom mit einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 70 Jahren vor allem ein Leiden des älteren Menschen ist, kann aufgrund von Nierenerkrankungen oder anderen Komorbiditäten die Erstlinientherapie häufig nicht angewandt werden. Im lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Stadium (Stadium IV) wird eine palliative Cisplatin-basierte Therapie empfohlen. Bei fehlender Cisplatin-Eignung oder Cisplatin-Refraktärität können seit 2016 Immuncheckpoint-Inhibitoren in der palliativen Erst- bzw. Zweitlinientherapie eingesetzt werden. Verschiedene Immuncheckpoint-Inhibitoren können dabei je nach Medikamentenauswahl biomarkerabhängig und -unabhängig eingesetzt werden.

Immuncheckpoint-Inhibitoren sind therapeutische Antikörper, die die immunsuppressiven Moleküle *programmed cell death protein 1* (PD-1) oder *programmed cell death-ligand 1* (PD-L1) blockieren. Im physiologischen Kontext trägt dieses Rezeptor-Liganden-Paar zur Kontrolle von Immunreaktionen bei und begrenzt so das Ausmaß einer Immunreaktion und potenzieller Autoimmunität. Einige Tumore exprimieren PD-L1 als Escape-Strategie, um die Anti-Tumor-Antwort zu umgehen, und bieten so einen Angriffspunkt für die Immuncheckpoint-Blockade. Bisherige Untersuchungen weisen darauf hin, dass Tumoren mit einer hohen PD-L1-Expression besser auf eine Immun-Checkpoint-Inhibition ansprechen als PD-L1-negative Tumoren. Insgesamt kann auf der Basis der immunhistochemisch bestimmten PD-L1-Expression nur unzureichend das individuelle Ansprechen auf die verschiedenen Immuncheckpoint-Inhibitionen vorhergesagt werden, nicht zuletzt, weil unterschiedliche diagnostische Antikörper-Scoring-Systeme und Schwellenwerte zum Einsatz kommen. Ein wichtiges Ziel der aktuellen Forschung ist es daher, die Interaktion zwischen dem Immunsystem und dem Harnblasenkarzinom besser zu verstehen und auf diesem Weg zuverlässigere prädiktive Selektionskriterien für Patienten zu finden, die wahrscheinlich von einer Immuncheckpoint-Blockade

profitieren. Die entscheidende Anti-Tumor-Immunität findet an der immunologischen Synapse statt, die die funktionelle Verbindung zwischen der tumorantigenspezifischen zytotoxischen T-Zelle und der Tumorzelle darstellt. Möglicherweise sind Bestandteile der immunologischen Synapse daher ebenfalls geeignete Biomarker für die Vorhersage eines Therapieansprechens auf Immuncheckpoint-Inhibitoren.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Eignung des interzellulären Zelladhäsionsmoleküls 1 (ICAM-1) als prädiktiven Biomarker für das Ansprechen auf Immuncheckpoint-Inhibitoren zu untersuchen. ICAM-1 ist ein essenzieller Bestandteil der immunologischen Synapse, indem es eine stabile Adhäsion zwischen Tumor- und T-Zelle vermittelt und so eine zuverlässige Tumorzell-Zytolyse ermöglicht. Zur Beantwortung dieser Frage wurden zunächst die Expression von ICAM-1 und PD-L1 sowie die Dichte zytotoxischer T-Lymphozyten in einem großen Patientenkollektiv mit muskelinvasivem Harnblasenkarzinom untersucht, um deren Verteilung und Häufigkeit zu erfassen. Im zweiten Teil der Arbeit wurden diese Marker in Tumorproben von Patienten untersucht, die eine Immuncheckpoint-Therapie erhalten hatten, um den tatsächlichen prädiktiven Wert der Biomarker zu bestimmen. Diese Analysen könnten es ermöglichen eine Patientengruppe mit besonders gutem oder besonders schlechtem Therapieansprechen zu identifizieren und so die klinische Entscheidungsfindung zu unterstützen.

2. Literaturdiskussion

2.1 Das Harnblasenkarzinom

Definition und Epidemiologie

Das Harnblasenkarzinom (BC) ist eine maligne Neoplasie der Harnblase. Der häufigste histomorphologische Typ ist mit 90 % das Urothelkarzinom (UC), gefolgt vom Plattenepithel- und Adenokarzinom (1).

Weltweit ist das Harnblasenkarzinom die zehnthäufigste diagnostizierte Krebsart beider Geschlechter, wobei die Inzidenzrate der Männer mit 9,5 pro 100 000 etwa viermal häufiger ist als die der Frauen (2,4 pro 100 000). Wird die isolierte Inzidenzrate des männlichen Geschlechts betrachtet, steigt das Harnblasenkarzinom auf den sechsten Platz der diagnostizierten Krebsarten (Abbildung 1) und ist die neunthäufigste Krebstodesursache (2).

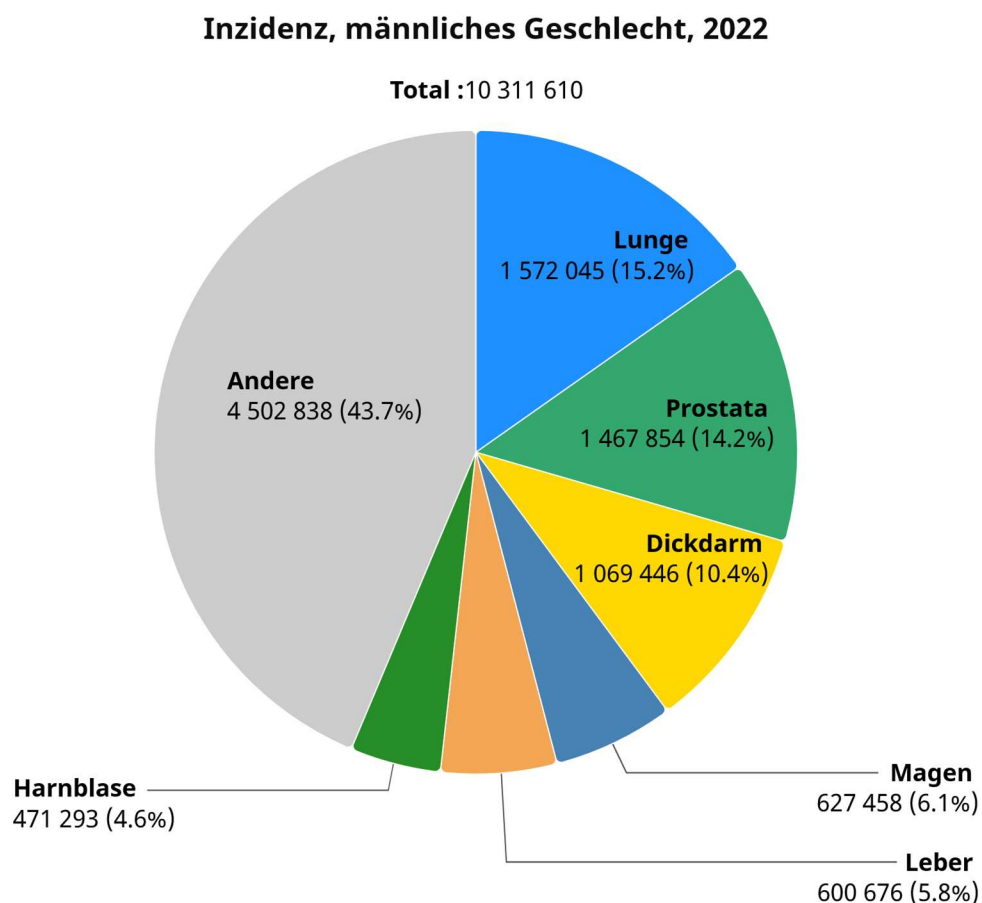


Abbildung 1: Inzidenz und Mortalität der 6 häufigsten Krebsarten für das männliche Geschlecht weltweit im Jahr 2022. Das Harnblasenkarzinom ist beim männlichen Geschlecht die sechshäufigste neudiagnostizierte Krebsarten (links). Die Mortalität des Harnblasenkarzinoms liegt auf dem neunten Platz (rechts). Adaptiert aus GLOBOCAN 2022 (2)

Geographisch betrachtet weisen Europa sowie Nordamerika die höchsten Inzidenzzahlen beider Geschlechter auf (Abbildung 2) (2). Dies lässt sich unter anderem durch die Risikofaktoren erklären. Obwohl genetische Prädispositionen des Harnblasenkarzinoms (wie bspw. die genetischen Varianten des langsamen Acetylators N-Acetyltransferase) existieren, spielen diese vor allem im Zusammenspiel mit den exogenen Risikofaktoren eine größere Rolle (3).

Weltweite Inzidenzrate beider Geschlechter in 2022

Harnblasenkarzinom

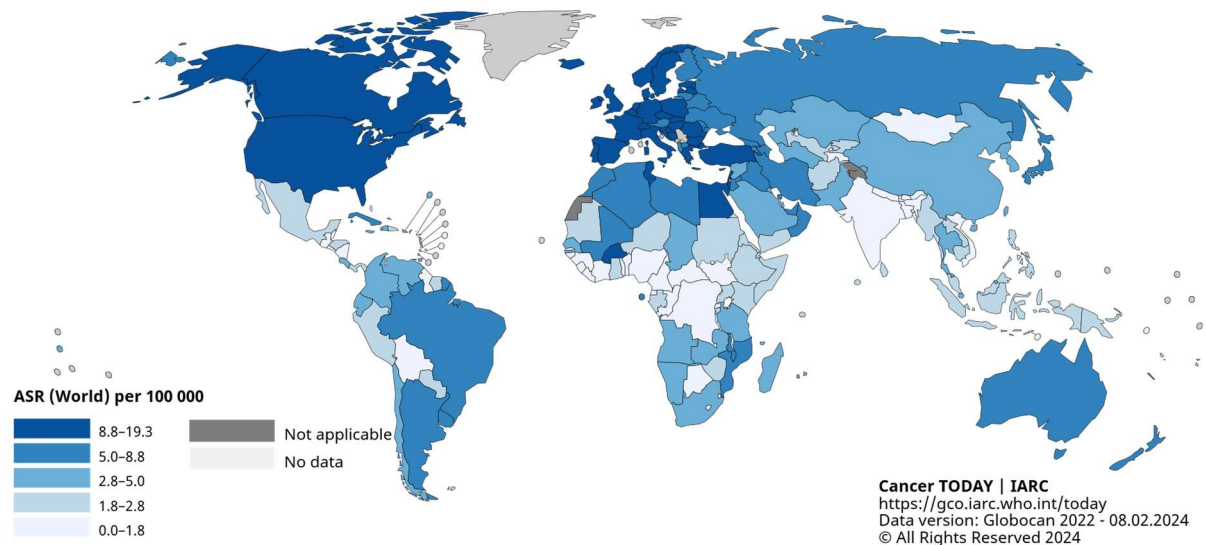


Abbildung 2: Weltweite altersstandardisierte Inzidenzrate für das Harnblasenkarzinom pro 100 000 Einwohner im Jahr 2022, beide Geschlechter berücksichtigt. Adaptiert aus GLOBOCAN 2022 (4)

Risikofaktoren

Das Harnblasenkarzinom ist eine Erkrankung des älteren Menschen. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei über 70 Jahren, weshalb das Alter in den industrialisierten Ländern zu einem der wichtigsten Risikofaktoren gezählt wird (12). Ein weiterer bedeutender Risikofaktor ist der Nikotinkonsum. Rauchen soll bei Männern schätzungsweise für 50-65 % und bei Frauen für 20-30 % der Fälle verantwortlich sein (4). Die Kausalität besteht darin, dass Tabakrauch aromatische Amine (bspw. Naphthylamin) enthält. Diese werden über die Niere ausgeschieden und sind an der Kanzerogenese des Harnblasenkarzinoms beteiligt (3). Eine Studie zeigte, dass bereits die passive Exposition in der Kindheit und im Erwachsenenalter einen signifikanten Zusammenhang mit dem Auftreten von UC aufweist (5).

Als dritthäufigster Risikofaktor gilt die berufliche Exposition gegenüber aromatischen Aminen, polyzyklisch aromatischen Kohlenwasserstoffen und Chlorkohlenwasserstoffen. Dies betrifft die Lackier-, Gummi- oder Aluminiumindustrie und Bereiche, in denen Erdölprodukte verarbeitet werden (3).

Es gibt zahlreiche weitere Risikofaktoren, die einen kleineren Anteil zur Kanzerogenese beitragen und zum Teil in der Literatur kontrovers diskutiert werden.

Geschlechterspezifisch betrachtet zeigt das weibliche Geschlecht eine niedrigere Inzidenzrate. Dies wird durch den historisch geringeren Nikotinkonsum und die niedrigere berufliche Exposition begründet (2, 3).

Umwelteinflüsse und regionale Faktoren spielen eine weitere Rolle. So wird beispielsweise die Bilharziose, eine endemische Infektionskrankheit mit *Schistosoma haematobium*, welche mit einer chronischen Entzündungsreaktion einhergeht, mit Harnblasenkarzinom assoziiert (6). Eine Arsenkontamination des Trinkwassers, wie sie im Norden von Chile aufgetreten ist, zeigt eine erhöhte Mortalität für Harnblasenkarzinome im Vergleich zu nicht exponierten Regionen des Landes (7, 8). Studien untersuchten das Auftreten von Harnblasenkarzinomen nach einer Strahlentherapie aufgrund eines Prostatakarzinoms. Abern et al. zeigten eine erhöhte altersstandardisierte Inzidenz der Probanden. Dies legt nahe, dass eine Exposition gegenüber ionisierenden Strahlungen das Erkrankungsrisiko steigert (9, 10).

Cyclophosphamid (Zytostatika aus der Gruppe der Alkylierungsmittel) und Pioglitazon (orales Antidiabetikum) wurden mit einer langfristigen und teils schwachen Inzidenzerhöhung des Harnblasenkarzinoms in Zusammenhang gebracht (3, 11, 12). Ein nutritiver Einfluss auf die Inzidenz des Harnblasenkarzinoms konnte bisher nicht sicher nachgewiesen werden. Dabei wurden beispielsweise der Einfluss des Trinkwassers (13, 14) sowie von Kaffee- (15) und Alkoholkonsum (16) untersucht. Eine prospektive Ernährungsstudie konnte keinen Zusammenhang zwischen dem Verzehr von rotem Fleisch bzw. Obst und Gemüse und dem Risiko von Harnblasenkarzinomen feststellen (17). Auch Einflüsse von Vitaminen und Mineralstoffen, das Erkrankungsrisiko des Harnblasenkarzinoms zu senken, konnten nicht signifikant nachgewiesen werden (18, 19).

Die TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms

Die TNM-Klassifikation ist eine Facettenklassifikation und hilft, das Harnblasenkarzinom in international gebräuchliche Kriterien einzuordnen (Tabelle 1). Dies erlaubt eine Einschätzung der Prognose und die optimale Therapieplanung.

Tabelle 1. Die TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms. Quelle: Klassifikation maligner Tumore, C. Wittekind (20)

Primärtumor	Erläuterung
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	kein Anhalt für Primärtumor
Ta	nichtinvasives papilläres Karzinom
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe
T2a	Tumor infiltriert die oberflächliche Muskulatur (innere Hälfte)
T2b	Tumor infiltriert die tiefe Muskulatur (äußere Hälfte)
T3a	Tumor infiltriert mikroskopisch perivesikales Fettgewebe
T3b	Tumor infiltriert makroskopisch perivesikales Fettgewebe
T4a	Tumor infiltriert Prostatastroma, Samenblase(n), Uterus oder Vagina
T4b	Tumor infiltriert Becken- oder Bauchwand
Regionäre LK	Erläuterung
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in solitärem Lymphknoten des kleinen Beckens (hypogastrische, Obturator-, externe iliakale oder präsakrale Lymphknoten)
N2	Metastase(n) in multiplen Lymphknoten des kleinen Beckens (hypogastrische, Obturator-, externe iliakale oder präsakrale Lymphknoten)
N3	Metastase(n) in Lymphknoten an Aa. Iliaca communis
Fernmetastasen	Erläuterung
M0	Keine Fernmetastasen
M1a	Metastasen in nichtregionären Lymphknoten
M1b	Andere Fernmetastasen

Die Therapie des Harnblasenkarzinoms

Für die Wahl der korrekten Therapiestrategie wird das Harnblasenkarzinom anhand der TNM-Klassifikation in drei klinische Stadien eingeteilt (21):

- Nicht-muskelinvasives Harnblasenkarzinom (NMIBC): pTis, pTa, pT1
- Muskelinvasives Harnblasenkarzinom (MIBC): $\geq$ pT2 und $<$ pT4, N0, M0
- Fortgeschrittenes/metastasiertes Harnblasenkarzinom: pT $\geq$ 4, N1-3, M1

Während das NMIBC und MIBC einen kurativen Ansatz verfolgen, nimmt das fortgeschrittene/metastasierte Harnblasenkarzinom aufgrund der palliativen Behandlungsintention eine eigene Rolle ein.

NMIBC

Das NMIBC wird üblicherweise transurethral reseziert (22). Im Vordergrund steht dabei der Funktionserhalt der Blase mit maximaler Schonung des tumorfreien Gewebes (23). Um das Rezidiv- oder Progressionsrisiko zu minimieren, kann je nach Risikoprofil des Patienten und Qualität der vorangegangenen Resektion eine TUR-Nachresektion erfolgen (24) und bei Bedarf eine adjuvante intravesikale Instillationstherapie angeschlossen werden. Dafür werden Patienten nach der EORTC-Risikoklassifikation in Niedrig-, Intermediär- und Hochrisikokarzinome eingeteilt. NMIBCs mit einem niedrigen Risikoprofil erhalten eine einmalige Mitomycin-Frühinstallation (25). Bei einem mittleren bis hohen Rezidivrisiko kann sowohl die Mitomycin-Instillation als auch eine Bacillus Calmette-Guerin-(BCG)-Therapie erfolgen, wobei nach BCG eine weitere Erhaltungstherapie über 1-3 Jahre notwendig ist (26, 27). Bei jedem NMIBC wird eine Nachsorge entsprechend der NICE-Leitlinie erforderlich, die abhängig vom Risikoprofil Zytoskopien, Urinzytologien und CT-Urographien bzw. MRT beinhalten kann (28). Abhängig vom Risikoprofil kommt es bei schätzungsweise 31 % bis 78 % der NMIBCs zu einem Rezidiv nach 5 Jahren (29), bei 10 % bis 25 % sogar zu einer Progression bis zur Muskelinvasivität oder Metastasierung (30). Rezidivierende oder multifokale Hochrisikokarzinome, ein hohes Progressionsrisiko oder Versagen der intravesikalen Therapie können bereits im nicht-muskelinvasiven Stadium zu einer radikalen Zystektomie führen (31).

MIBC

Patienten mit begrenztem muskelinvasiven Urothelkarzinom kann eine multimodale primär organerhaltende Therapie angeboten werden (32). Sie verfolgt mit der TUR, die

den Tumor möglichst komplett resektieren soll, und einer anschließenden Radiochemotherapie einen kurativen Ansatz (33). Eine Studie mit 415 Patienten erreichte nach einer TUR und Radio(chemo)therapie eine komplette Remission in 72 % der Fälle mit einem Blasenerhalt nach 10 Jahren von 62 % der Teilnehmenden, während eine Fernmetastasierung bei 35 % auftrat (34). Dieses Konzept eignet sich für Patienten, welche eine Zystektomie ablehnen oder nicht für diese geeignet sind. Insbesondere cT2N0-Tumoren kommen für die multimodale Therapie in Frage (32). Als Chemotherapiekomponente der simultanen Radiochemotherapie kommen eine Cisplatin-basierte Therapie oder eine 5-FU mit Mitomycin in Frage (35). Der Vorteil ist, dass man die multimodale Therapie unter Anwendung des Schemas 5-FU-Therapie und Mitomycin auch bei Cisplatin-ungeeigneten Patienten anwenden kann (siehe Abbildung 3).

Die neoadjuvante Cisplatin-basierte Chemotherapie und darauffolgende radikale Zystektomie (RC) ist die Standardtherapie bei cisplatin-geeigneten Patienten mit resektablem MIBC (36). Meeks et al. zeigten, dass das Gesamtüberleben durch eine neoadjuvante Therapie im Vergleich zu einer alleinigen Operation verbessert wird (37). Die chirurgische Morbidität wird durch eine vorangegangene Chemotherapie nicht erhöht (38). Für die Chemotherapie gibt es kein obligat empfohlenes Schema. Im Allgemeinen haben sich zwei Therapien durchgesetzt, ein MVAC-Regime (Methotrexat, Vinblastin, Doxorubicin und Cisplatin) und Gemcitabin plus Cisplatin (GC) (23). Eine Phase-3-Studie vergleicht die MVAC mit der GC-Therapie im perioperativen Setting. In der MVAC-Gruppe wurde eine bessere lokale Kontrollrate erfasst, aber auch eine höhere Toxizität, vor allem mit Asthenie und unerwünschten gastrointestinalen Nebenwirkungen (39). Weitere Studien zeigen teils eine ähnliche Wirksamkeit beider Chemotherapien (40), teils auch eine bessere Verträglichkeit der GC-Therapie (41-43). Die Ansprechrate auf die oben genannte Erstlinienchemotherapie beträgt bis zu 50 %, wobei die Dauer des Behandlungserfolgs begrenzt ist und die Prognose bei Rezidiven und Fortschreiten der Erkrankung schlecht ausfällt (44). Weiterhin müssen die Patienten für die Durchführung einer neoadjuvanten Chemotherapie gewisse Voraussetzungen erfüllen. Folgende Kriterien sind Kontraindikationen für eine Cisplatin-basierte Therapie und sollten auch während der laufenden Therapie nicht überschritten werden (21):

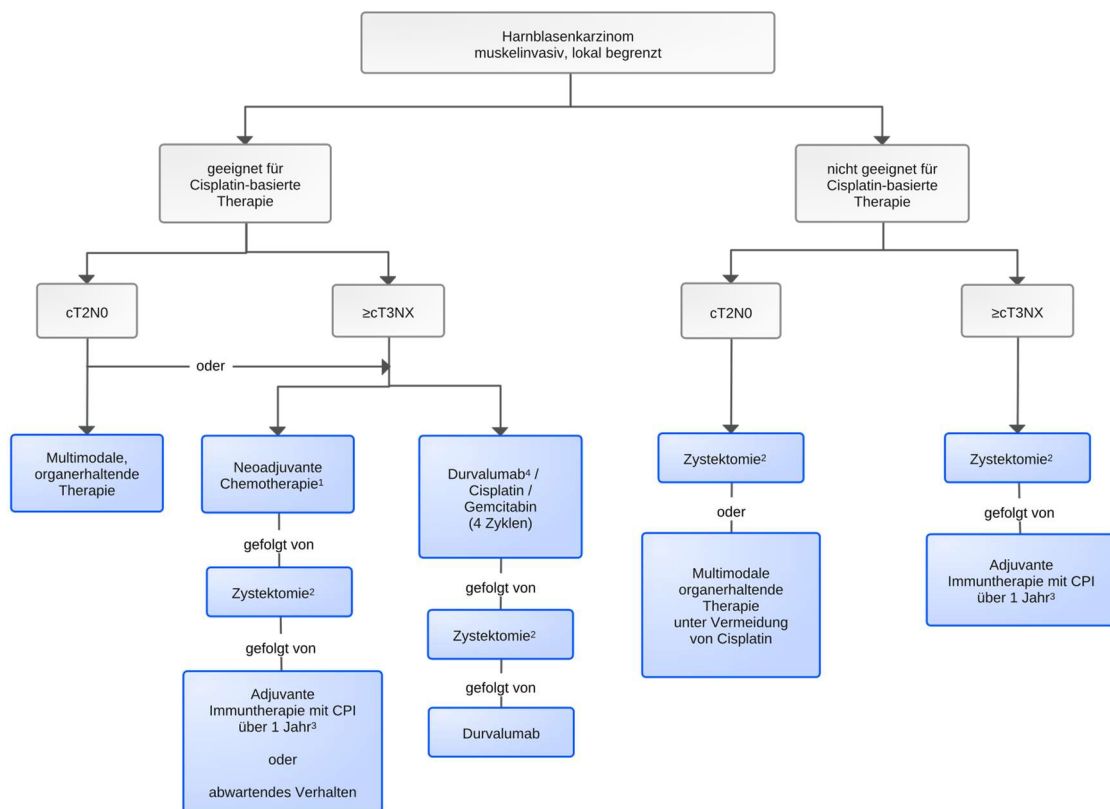
- Eine Kreatinin-Clearance ≤ 60 ml/min (zwischen 40 – 60 ml/min ist eine Dosisanpassung notwendig)

- ECOG Performance Status (PS) von ≥ 2 oder Karnofsky PS ≤ 70 %
- Eine Herzinsuffizienz NYHA-Klasse $\geq III$
- Hörverlust in der Audiometrie ($\geq$ Grad 2 der CTCAE)
- Periphere Neuropathie ($\geq$ Grad 2 der CTCAE)

Studien über die Eignung der Patienten für eine perioperative Cisplatin-basierte Chemotherapie zeigten, dass etwa die Hälfte der Patienten, die sich einer radikalen Zystektomie unterziehen, allein aufgrund des Nierenfunktionsstatus für die perioperative Chemotherapie ungeeignet ist (45, 46). Alternativ kann man Cisplatin-ungeeigneten eine Zystektomie anbieten (47). Bei einem Tumor, der das perivesikuläre Fettbindegewebe infiltriert (cT3), sollte eine adjuvante Immuntherapie mit Nivolumab auf die Operation folgen, da das progressionsfreie Überleben nach 2-3 Jahren verlängert ist (48). Eine Übersicht der Erstlinientherapiestrategien des MIBC findet sich in (Abbildung 3).

Es wurden zahlreiche Studien zu multimodalen Therapieansätzen durchgeführt, etwa zur neoadjuvanten Immuntherapie oder zur Kombination von Chemo- und Immuntherapie. Insgesamt zeigten die bisher durchgeführten Phase-II-Studien mit neoadjuvanten Immunmonotherapien oder Kombinationstherapien durchaus ein Downstaging des Tumors bis hin zur kompletten Remission mit unterschiedlichem Erfolg (49-51). Powles et al. zeigen, dass eine perioperative Therapie mit Cisplatin/Gemcitabin plus Durvalumab, gefolgt von einer Erhaltungstherapie, das ereignisfreie Überleben (EFS) und Gesamtüberleben (OS) im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie signifikant verbessert (52). Die Rolle der Immuncheckpoint-Inhibition in alleiniger oder kombinierter Form, sowohl im neoadjuvanten als auch im adjuvanten Setting, ist weiterhin Gegenstand aktueller Forschung.

Erstlinientherapie des lokal begrenzten muskelinvasiven Urothelkarzinoms der Harnblase



Legende:

 kurative Intention;

¹ neoadjuvante Therapie = ddMVAC oder Gemcitabin/Cisplatin

² plus bilaterale pelvine Lymphadenektomie

³ bei PD-L1 ≥ 1 (Zulassung Nivolumab); Pembrolizumab noch nicht zugelassen

⁴ noch nicht zugelassen

CPI = Immunecheckpointinhibitor

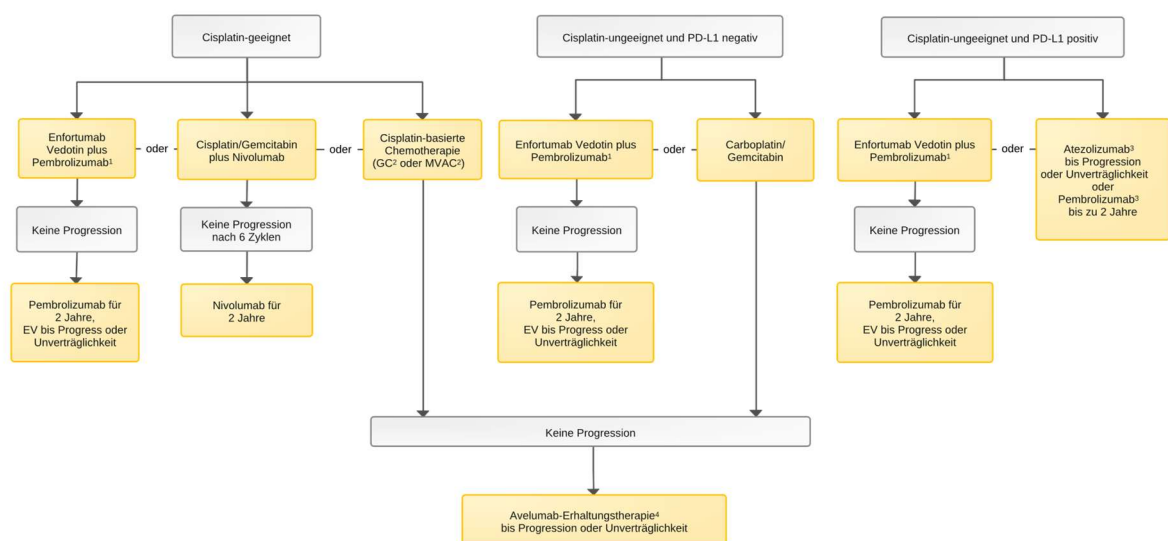
Abbildung 3: Schematisch dargestellte Erstlinientherapie des lokal begrenzten muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms. Adaptiert aus Onkopedia Harnblasenkarzinom.

Fortgeschrittenes/metastasiertes Harnblasenkarzinom

Beim fortgeschrittenen bzw. metastasierten Harnblasenkarzinom (entspricht dem UICC-Stadium IV) fokussiert sich die Behandlung im Rahmen eines palliativen Konzeptes und unter Verzicht auf die operative Resektion auf eine medikamentöse Tumorthherapie. Das *Antigen-Drug-Conjugate* (ADC) Enfortumab Vedotin, ein gegen Nectin 4 gerichteter Wirkstoff, wurde 2019 von der FDA und 2022 von der EMA für die Behandlung des metastasierten Urothelkarzinoms zugelassen (53, 54). Die präferierte Erstlinientherapie besteht aus der Kombination aus Enfortumab Vedotin (EV) und Pembrolizuma, wobei sich diese Therapie ubiquitär für jede Patientengruppe eignet (cisplatin- und PD-L1-unabhängig). Die KEYNOTE-A39/EV-302-Studie zeigte, dass diese Kombination aus Immunecheckpointinhibitor mit dem gegen Nectin-4 gerichteten

Immuntoxinkonjugat im Vergleich zur ehemals Erstlinien-Chemotherapie zu einer signifikanten Verlängerung des Gesamtüberlebens führte (von 16,1 Monate auf 31,5 Monaten) (55). Alternativ kann cisplatin-geeigneten Patienten eine Kombination aus Cisplatin-haltiger Chemotherapie mit der Immuntherapie Nivolumab angeboten werden (56). Sollten EV und Pembrolizumab sowie die Kombination GC und Nivolumab aufgrund von Kontraindikationen nicht infrage kommen, können die zwei bekannten Chemotherapie-Regimen (GC oder MVAC) in Betracht gezogen werden. Cisplatin-ungeeignete Patienten, welche PD-L1-negativ sind, können alternativ eine Carboplatin-haltige Therapie erhalten (36). Bei Cisplatin-ungeeigneten Patienten mit einem positiven PD-L1-Status kann eine Immuntherapie mit Atezolizumab oder Pembrolizumab erfolgen. Eine Übersicht der Behandlungsstrategien zeigt Abbildung 4.

Medikamentöse Erstlinientherapie des metastasierten oder lokal nicht kurativ behandelbaren Urothelkarzinoms der Harnblase.



Legende:

nicht-kurative Intention

¹ Präferierter Erstlinien-Standard

² GC: Gemcitabin/Cisplatin; MVAC: Methotrexat/Vinblastin/Doxorubicin/Cisplatin

³ Atezolizumab-Zulassung bei PD-L1 $\geq 5\%$; Pembrolizumab zugelassen bei PD-L1 (CPS) ≥ 10

⁴ insbesondere bei PD-L1-Positivität

Abbildung 4: Medikamentöse Erstlinientherapie des fortgeschrittenen Harnblasenkarzinoms. Quelle: Adaptiert aus Onkopedia Blasenkarzinom.

Die klinische Realität der Immuncheckpoint-Inhibition

Insgesamt stehen seit der EMA-Zulassung 2016 vier Immuncheckpoint-Inhibitoren zur Verfügung (Pembrolizumab, Nivolumab, Atezolizumab und Avelumab) (30), die mittlerweile auch im Rahmen multimodaler Therapiekonzepte eingesetzt werden. Doch wie kam es zu heutigen Indikationen und welche Ansprechraten konnten in klinischen Studien beobachtet werden?

Maiorano et al. untersuchten in einer Metaanalyse von 14 Studien die Signifikanz von ICIs im fortgeschrittenen Harnblasenkarzinom. Sie zeigten, dass eine PD-L1-Expression im Tumor mit einer verbesserten objektiven Ansprechraten (13.8 % - 78.6 % ggü. 5.1 % - 63.2 %) und einem verbesserten Gesamtüberleben (8.4 - 24.1 Monate ggü. 6.0 - 19.1 Monate) einhergeht, im Vergleich zu PD-L1-negativen Tumoren. Das Sterberisiko und das Progressionsrisiko waren signifikant verringert, was zu einem verbesserten progressionsfreien Überleben führt. Diese Studie räumt aber eine fehlende prädiktive Rolle des Biomarkers ein (57). Zu einem ähnlichen Ergebnis kam auch die Metaanalyse der Gruppe Guo et al., welche 16 Studien umfasste. Vor allem das Gesamtüberleben der PD-L1-positiven Patienten war signifikant verlängert (58).

Die Indikation war zunächst ein Krankheitsprogress trotz platinbasierter Chemotherapie im Rahmen einer Zweitlinientherapie (59). In diesem Zusammenhang können die Medikamente unabhängig von der PD-L1-Expression gegeben werden (60). Weitere Zulassungsstudien haben zu teilweise biomarkerabhängigen Indikationen geführt. Es wurde gezeigt, dass die Überlebenszeit von Patienten in den Monotherapie-Armen des jeweiligen Medikaments (IMvigor130: Atezolizumab, KEYNOTE-361: Pembrolizumab) mit niedrigem PD-L1 Status im Vergleich zu Patienten, welche eine Cisplatin- oder Carboplatin-basierte Chemotherapie erhielten, verkürzt war (61, 62). Daraufhin änderten die Studien ihr Rekrutierungsdesign (63) und die wichtigsten Arzneimittelzulassungsbehörden (FDA und EMA) empfahlen den Einsatz der oben genannten Immuncheckpoint-Inhibitoren nur bei der Überschreitung gewisser Grenzwerte (64). Seitdem sind Atezolizumab und Pembrolizumab eine Therapieoption im Rahmen einer Erstlinientherapie für Cisplatin-ungeeignete Patienten mit einem PD-L1-positiven Status (65, 66). Eine Herausforderung stellen dabei die mit dem Medikament variierenden Scores und Grenzwerte dar. Für Atezolizumab sollte beispielsweise ein IC-Score (immune score) ≥ 5 % vorliegen und für die Anwendung von Pembrolizumab ein CPS (combined positive score) ≥ 10 . Die

Prävalenzen (zu erwartenden Positivraten) von PD-L1 liegen für Atezolizumab bei 32 % (67) und für Pembrolizumab bei 30 % (68).

Des Weiteren variieren die Ansprechraten der einzelnen Medikamente, die die Studien meist im fortgeschrittenen oder metastasierten Stadium des Urothelkarzinoms erhoben, sehr stark. So wurde in der Keynote-052 Studie bei der Gabe von Pembrolizumab ein Gesamtansprechen (ORR) von 29 % und ein vollständiges Ansprechen (CR) von 7 % beobachtet (65). In einer ähnlichen Studie, die die Ansprechraten nach der Gabe von Atezolizumab untersuchte, zeigte sich ein Gesamtansprechen von 23 % und ein vollständiges Ansprechen (CR) von 9 % (59). Die CheckMate-275 Studie beschäftigte sich mit den Ansprechraten der Patienten mit fortgeschrittenem platinrefraktärem Urothelkarzinom bei Nivolumabgabe. Hier wurde ein bestätigtes objektives Ansprechen von 20 % der Patienten gezeigt (69). In Zusammenschau liegen die Ansprechraten je nach Medikament zwischen 20 % - 30 %. Dies bezieht sich lediglich auf die Ansprechraten der einzelnen Immuncheckpoint-Inhibitoren. Mittlerweile erfolgen immer mehr Kombinationstherapien, wie beispielsweise Pembrolizumab mit EV. Hier zeigte sich eine ORR von 67,7 % (55). Das ist ein erfolgsversprechenderes Ergebnis als die alleinige Gabe der Immuncheckpoint-Inhibitoren aufgrund des synergistischen *Bystander-Effektes* der ADC. Ebenso ist diese Therapie PD-L1-unabhängig. Trotzdem wird in mehreren wissenschaftlichen Arbeiten bereits auf die mangelhaften Ansprechraten hingewiesen (58). Es ist somit wünschenswert und notwendig, die Prädiktion der Therapie zu optimieren und weitere prädiktive Biomarker zu untersuchen.

2.2. Tumorimmunologie

Die Theorie, dass das Immunsystem Tumorzellen erkennt und frühzeitig die Tumorentstehung verhindert, existiert bereits sehr lange (70). Studien in immundefizienten Mäusen haben gezeigt, dass die Wirtsanfälligkeit sowohl für chemisch induzierte als auch sporadische Tumore erhöht ist (71). Schließlich konnte die Immunüberwachung im Menschen nachgewiesen werden (72). An der Überwachung sind sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem beteiligt, die quervernetzt ineinandergreifen. Die Hauptrolle nehmen dabei die CTLs ein, die für die Tumorzellerkennung und -vernichtung eine Präsentation von

Tumorantigenen auf MHC-1-Molekülen von APC benötigen. So kommt es zur Degranulierung und Apoptose (73). Weitere wichtige Komponenten für eine effektive Immunreaktion sind antikörperproduzierende B-Lymphozyten sowie die T-Helfer-Lymphozyten, welche eine untergeordnete Rolle spielen (74). Um der Tötung durch die CTLs zu entgehen, supprimieren viele Tumoren die Antigenpräsentation auf ihrer Oberfläche. Hier bekommen die natürlichen Killerzellen eine besondere Bedeutung, welche dieses „missing self“ erkennen und die Tumorzelle angreifen (73).

PD-1/PD-L1-Achse

PD-1 ist ein Transmembranprotein, welches auf T-Lymphozyten, NK-Zellen, B-Lymphozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen (DCs) und Monozyten exprimiert werden kann (75). In ruhenden Zellen wird der Rezeptor schwach exprimiert. Die Dichte kann jedoch unter Einfluss von Interferonen, insbesondere Interferon γ , hochreguliert werden (76). Es konnte festgestellt werden, dass PD-1 in besonders hohem Maße auf tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs), insbesondere T-Zellen, exprimiert wird (77, 78). PD-L1, der Ligand zum PD-1, ist ein Transmembranglykoprotein und wird von unterschiedlichen körpereigenen Zellen exprimiert. Dazu gehören vor allem Makrophagen und Epithelzellen (insbesondere unter entzündlichen Bedingungen) (79). Weiterhin ist PD-L1 auch in der Tumorzellmembran verankert und kann die PD-1/PD-L1-Achse entsprechend beeinflussen. Ursprünglich wurde PD-1 als Rezeptor für den Zelltod nachgewiesen, da er die Apoptose induzieren kann (80). Eine weitere, später entdeckte Funktion ist die Regulierung und Begrenzung der Immunantworten über eine inhibitorische Funktion (81-83). So führt die Aktivierung der Achse beispielsweise zu einer Hemmung der T-Zell-Rezeptor-vermittelten Lymphozytenproliferation und Zytokinsekretion (84). Dies schützt den Organismus vor überschießenden Immunreaktionen und hält die eigene Immuntoleranz aufrecht (85). Die physiologische Funktion wurde in unterschiedlichen Studien untersucht. So neigten beispielsweise PD-L1-defiziente Mäuse zur Entwicklung einer lupusähnlichen Symptomatik (86).

Einige Tumorzellen bedienen sich des Mechanismus, PD-L1 (aber auch PD-L2) zu exprimieren und so eine „Immune-Escape-Strategie“ für die Anti-Tumor-Antwort zu entwickeln (82). In Melanomen, Ovar-, Lungen- und Nierenzellkarzinomen konnte eine konstitutive PD-Liganden-Expression, insbesondere PD-L1, nachgewiesen werden (83). Aber auch weitere Tumorarten, wie beispielsweise Brustkrebs, CRC, Magen-,

Pankreas- und auch Urothelkarzinome, können durch die angeborene und adaptive Immunresistenz eine hochregulierte PD-L1-Expression mit unterschiedlichen Folgen aufweisen (84). Häufig entwickelt sich eine Tumormikroumgebung mit dysfunktionalen T-Zellen (Erschöpfung, Apoptose, Neutralisierung), die tolerant gegenüber dem Tumorwachstum ist (61, 84). Die vermehrte Ausschüttung von IL-10 innerhalb der Tumormasse verhindert die durch zytotoxische T-Zellen (CD 8) vermittelte Abtötung der Tumorzellen (84, 85). Es hat zur Folge, dass Tumore mit höherer PD-L1-Expression mit größerer Wahrscheinlichkeit bösartig sind, ein höheres Stadium erreichen können, häufiger rezidivieren und geringere Überlebensraten aufweisen (55, 86). Eine aktuelle Metaanalyse von 2019 untersuchte 1508 an Harnblasenkarzinom erkrankte Patienten aus 11 verschiedenen Studien. Dort wurde eine positive PD-L1-Expression auf Tumorzellen signifikant mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert (87). Die Immuncheckpoint-Inhibitoren verhindern die Dysfunktionalität und erhalten die Aktivität der T-Zellen (64, 65) (vgl. Abbildung 5). Essenziell für die antitumorale Tumorantwort ist die immunologische Synapse.

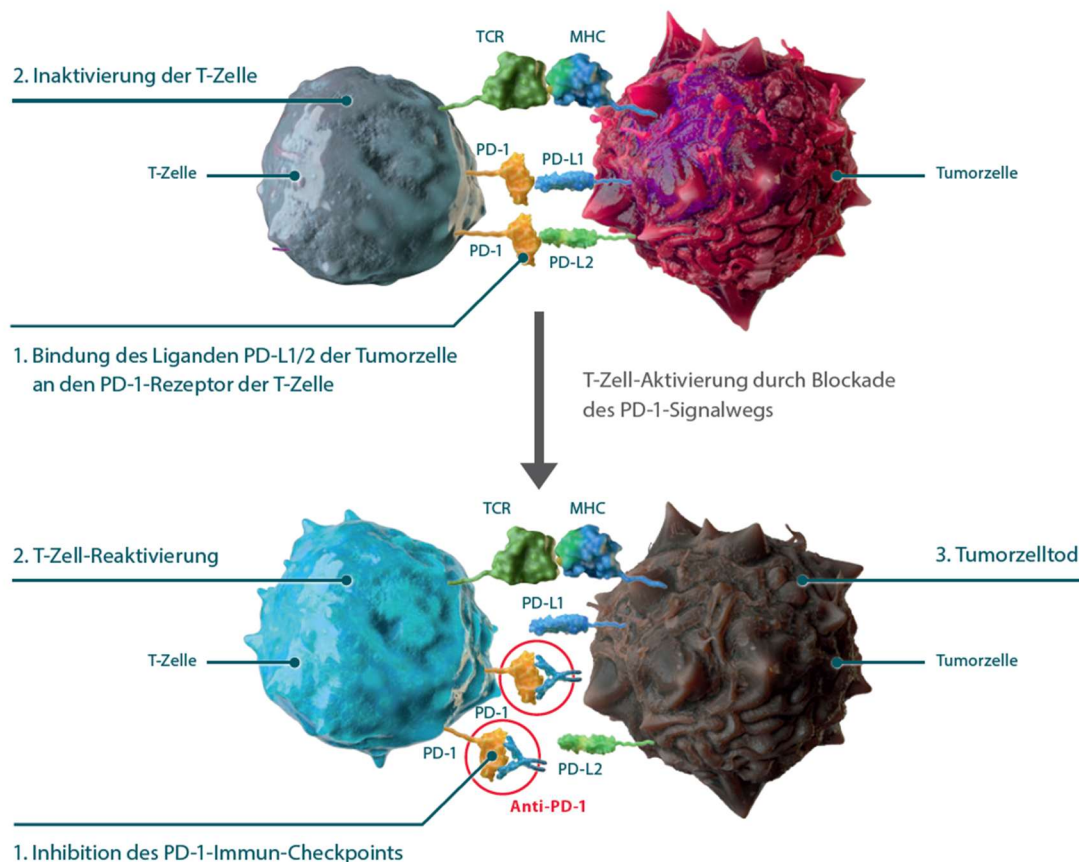


Abbildung 5: Mechanismus der PD-1/PD-L1-Blockade. **Oben:** T-Zell-Inhibition durch eine PD-L1 (bzw. PD-L2) exprimierende Tumorzelle als „immune escape“. **Unten:** Blockade am Beispiel der PD-1-Interaktion von Pembrolizumab oder Nivolumab mit konsekutiver T-Zell-Aktivierung und Eliminierung der Tumorzelle. TCR: T-Zell-Rezeptor, MHC: Major Histocompatibility Complex. Quelle: Adaptiert von Webpage der QuIP

Die immunologische Synapse

Als immunologische Synapse bezeichnet man eine temporäre Verbindung (10-30 min) (87) zwischen einem Lymphozyten (T- bzw. B-Zellen und NK-Zellen) und einer anderen Zelle, beispielsweise einer antigenpräsentierenden Zelle (APC) oder Körperzelle (88). Zielscheibenartig kann die Synapse in drei supramolekulare Adhäsionskomplexe (supramolecular activation cluster, kurz SMAC) eingeteilt werden; in den zentralen, peripheren und distalen Bereich (Abbildung 6) (89).

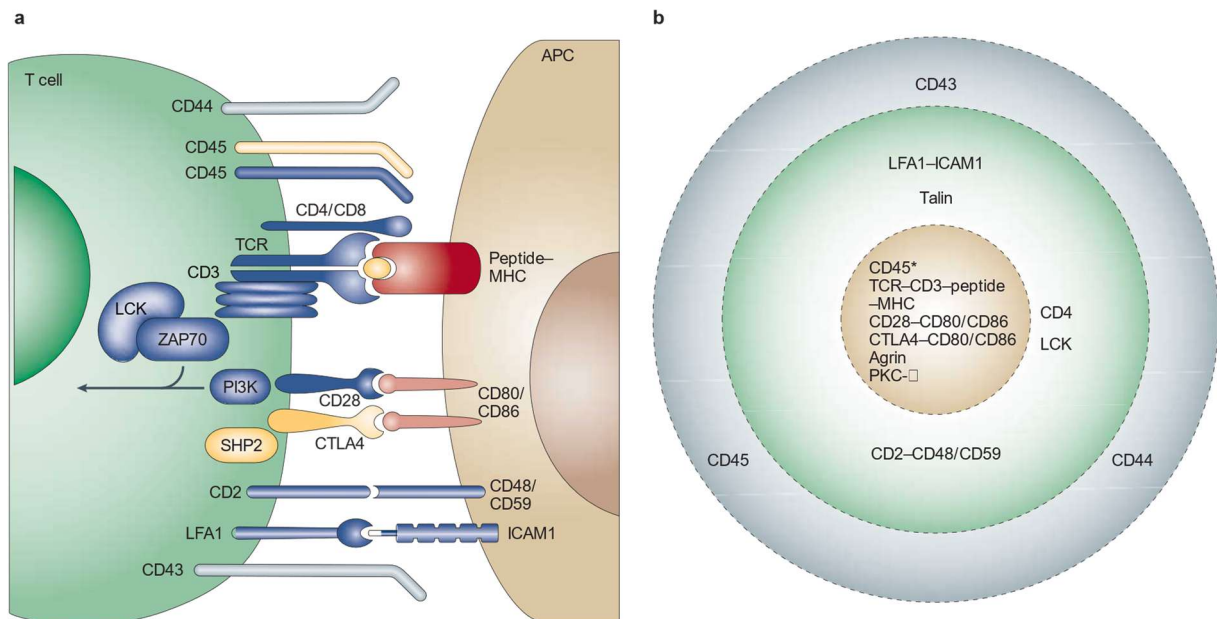


Abbildung 6: Schematische Darstellung einer reifen T-Zell-Synapse mit einer Auswahl der wichtigsten Ligandenpaare. (a) Profilansicht zwischen einer T-Zelle und einer antigenpräsentierenden Zelle (APC). Das stimulierende Peptid-MHC-Molekül ist rot dargestellt, aktivierende/kostimulatorische Moleküle sind blau, hemmende Moleküle sind gelb und Moleküle, die nicht zur Signalübertragung beitragen, sind grau. Der Pfeil zeigt konvergierende Signale an, die zur T-Zell-Aktivierung führen. ICAM-1 ist als kostimulatorisches Molekül beteiligt. (b) Die Frontalansicht auf eine T-Zelle mit der schematisch zielscheibenartigen Aufteilung der immunologischen Synapse in drei Regionen und deren Moleküle/Ligandenpaare, die darin angereichert gefunden werden. Das cSMAC ist braun dargestellt, das pSMAC grün und das dSMAC blau. Quelle: Huppa et al., 2003

Die zentrale Region (c-SMAC) enthält vor allem die TCRs. In dieser Region finden die Internalisierung und der Abbau statt und somit die Regulierung der immunologischen Synapse (90, 91). Die Theorie des Rezeptorabbaus im cSMAC wird von einigen Studien unterstützt, die Hinweise darauf fanden, dass die Ubiquitinierungsmaschinerie dort lokalisiert ist (91-93). Zelladhäsionsmoleküle (bspw. LFA-1 und ICAM-1) scheinen sich vor allem ringförmig um das Zentrum anzuordnen, im sogenannten p-SMAC (87, 89). Sie werden durch die TCR-Aktivierung initiiert und stärken mit ihrer Interaktion die Bindung der immunologischen Synapse (94). Weiterhin wird vermutet, dass der pSMAC zytolytischen CD8+ T-Zellen als „Dichtungsring“ dient und den Austritt zytolytischer Granula in die Umgebung verhindert (95). In der äußersten Region, dem

d-SMAC, wurden vor allem große Moleküle (beispielsweise CD43 und CD45) nachgewiesen, die dem Zell-Zell-Kontakt hinderlich wären und deshalb temporär umorganisiert wurden (94, 96). Trotz der Vorstellung dieses statischen Modells zeigte sich, dass innerhalb der immunologischen Synapse ein komplexes Verteilungsmuster verschiedener Moleküle mit hoher Dynamik und Reorganisation vorherrscht (97).

Die erfolgreiche Aktivierung einer naiven T-Zelle bedarf drei Arten von Signalen. Der Kontakt des TCRs beispielsweise mit einem Tumorantigen oder einer antigenpräsentierenden Zelle initiiert die Aktivierung und gilt als erstes Signal (88). Es folgt die Regulierung durch eine Vielzahl an kostimulatorischen und koinhibitorischen Rezeptoren als zweites Signal, den sogenannten Immuncheckpoints (98). Beispielsweise die kostimulatorische Bindung der B7-Moleküle auf Seiten der APC mit dem CD28-Molekül auf Seiten der T-Zelle (88). Als drittes Signal beeinflussen proinflammatorische Zytokine wie beispielsweise Interleukine die T-Zell-Aktivierung und damit die Differenzierung der T-Zelle (99). Nach der T-Zell-Aktivierung wird das zytotoxische T-Lymphozyten-Antigen-4 (CTLA-4), ein koinhibitorischer Rezeptor, induziert. Es hat eine höhere Bindungsaffinität für B7-Liganden als CD28 und kann diesen nach einiger Zeit verdrängen (80). Dadurch wird das co-stimulatorische Signal gehemmt und die Immunantwort limitiert (83). Ähnlich diesem Mechanismus kann PD-L1 als Teilhaber der immunologischen Synapse eine Immunantwort limitieren.

2.3 ICAM-1

ICAM-1 ist ein Zelloberflächenglykoprotein, welches zur Ig-Superfamilie gehört (100). Ein wichtiger Interaktionspartner ist LFA-1 (Lymphozytenfunktions-assoziiertes Antigen 1) (101). Mit einer geringen Dichte wird ICAM-1 auf Endothel-, Epithel- und Immunzellen (T- und B-Zellen, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen) exprimiert (102) und übernimmt somit eine Vielzahl an Funktionen (vgl. Abbildung 7)

In den Endo- und Epithelzellen dient ICAM-1 unter anderem der Zellmigration und Regulierung der Barrierefunktion, indem es das Aktin-Zytoskelett reorganisiert und die vaskuläre Permeabilität beeinflusst (101, 103, 104). Weiterhin begünstigt es als Adhäsionsmolekül die Diapedese und somit die Leukozytenrekrutierung zu Entzündungsherden (101). Dafür kann die Oberflächendichte als Reaktion auf zahlreiche, während der Entzündung ausgeschüttete Zytokine wie beispielsweise Interleukin 1 (IL1), Interferon γ (IFN γ) oder Tumornekrosefaktor α (TNF α)

hochreguliert werden, um die Adhäsion zu begünstigen (105, 106). Eine weitere Funktion von ICAM-1 in den Epithelzellen ist die Regulierung der Wundheilung. Sumagin et al. zeigten, dass epitheliales ICAM-1 eine wichtige Rolle bei der mukosalen Wundheilung bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen spielt (107). Außerdem wurde eine gehemmte Wundheilung in Mäusen ohne ICAM-1 nachgewiesen (108, 109). Die ICAM-1-Expression auf APCs ist essentiell für eine effektive T-Zell-Aktivierung, ihr Fehlen führt zu deutlich reduzierter T-Zell-Antwort (110). Die Interaktion mit dem Hauptliganden LFA-1 führt über ein kostimulatorisches Signal zu einer stabilen Adhäsion, was für die Ausbildung der immunologischen Synapse und somit für die wirksame T-Zellaktivierung notwendig ist (111).

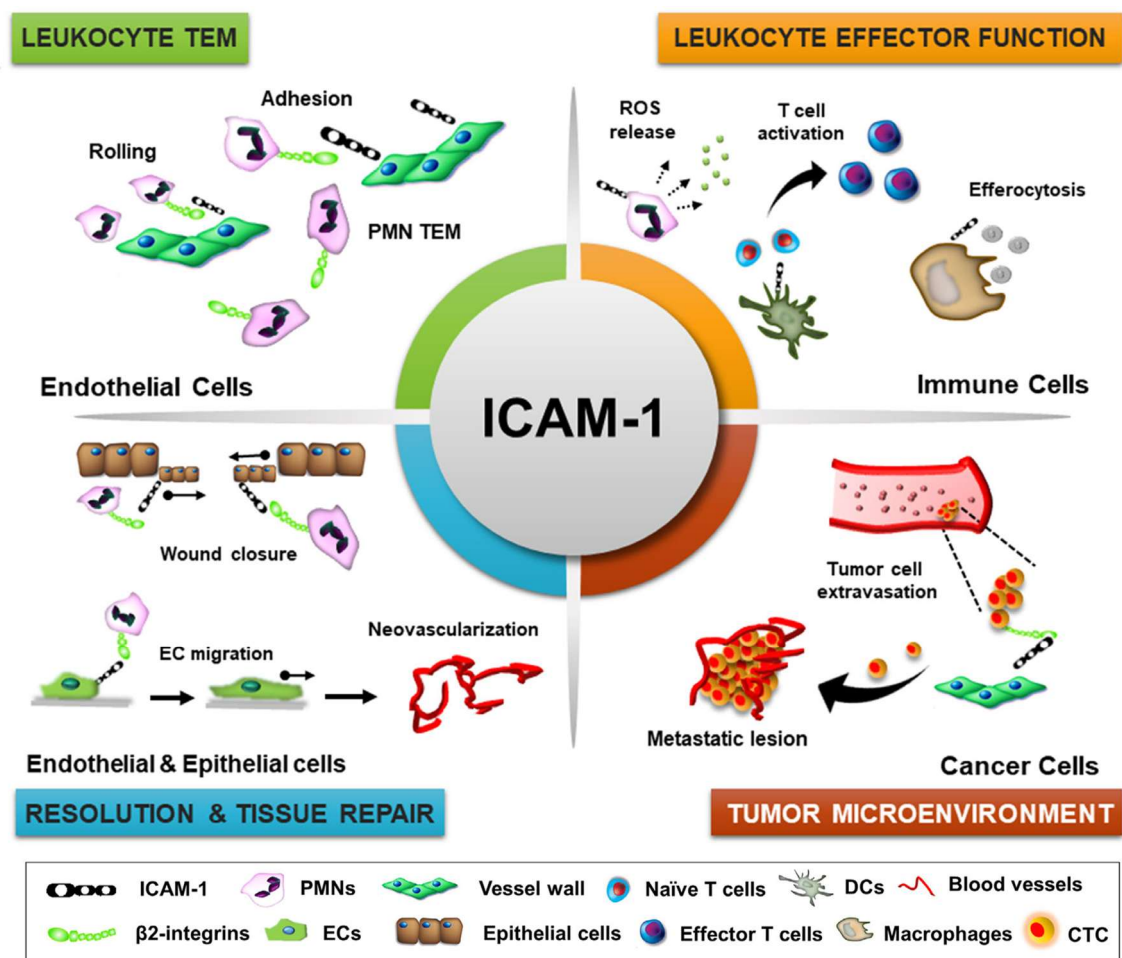


Abbildung 7: Schematische Darstellung der wichtigsten Funktionen von ICAM-1. Dazu gehören Leukozyten-Endothelzellen-Interaktionen und TEM (oben links), die Regulierung der Leukozyten-Effektor-Funktion bei Entzündungen (oben rechts), die Beteiligung an Gewebereparaturmechanismen durch Förderung der Neovaskularisierung und Reepithelisierung (unten links) sowie die Karzinogenese durch Erleichterung der Extravasation und Begünstigung der Metastasierung (unten rechts). Quelle: Bui et al., 2020

Die Bedeutung von ICAM-1 im Tumorgeschehen

Die Auswirkungen der verschiedenen Funktionen von ICAM-1 bei malignen Tumorerkrankungen werden in der Literatur kontrovers diskutiert. So berichten Maeda K. et al. über eine bessere Prognose für am kolorektalen Karzinom (CRC) erkrankte Patienten bei einer ICAM-1-Positivität (112). Auch Tachimori et al. zeigten, dass eine erhöhte ICAM-1-Expression im CRC mit einem gehemmten Tumorwachstum und damit verbundener besserer Prognose korrelierte (113). In anderen Studien allerdings war die ICAM-1-Expression mit einer schlechteren Prognose assoziiert. So berichten Lim et al. von einer durch den fördernden Einfluss von ICAM-1 bei der epithelialen mesenchymalen Transition und Angiogenese schlechteren Prognose des CRC. Weiterhin hat diese Studie festgestellt, dass Patienten mit Lymphknotenmetastasen eine höhere ICAM-1-Expression aufweisen als solche ohne. (114) Auch Ionescu et al. berichten von einem schlechteren Gesamtüberleben bei einer Überexpression von ICAM-1 (115).

Beim Magenkarzinom weisen Fujihara et al. eine negative Korrelation zwischen ICAM-1-Expression und lymphogener Metastasierung auf (116). Jung et al. wiederum korrelieren eine höhere ICAM-1-Expression des Magenkarzinoms mit klinisch-pathologisch ungünstigeren Faktoren (bspw. größere Tumorgroße, positive Lymphknotenbeteiligung, Fernmetastasierung, vermehrte perineurale Invasion). Außerdem zeigte eine Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse derselben Studie eine schlechtere 3-Jahres-Überlebensrate der ICAM-1-positiven Gruppe im Vergleich zur ICAM-1-negativen (54.9 % vs. 85.9 %) (117).

Beim malignen Melanom vermuten Johnson et al. eine durch multiple Mechanismen begünstigte Metastasierung beim Vorhandensein des Zelladhäsionsmoleküls (118).

Die Untersuchung des Mammakarzinoms zeigt unterschiedliche Ergebnisse. Während in-vitro-Untersuchungen eine höhere Invasivität und Proliferation von ICAM-1-exprimierenden Brustkrebszellen ergaben (119), zeigen Ogawa et al. in einer klinischen Studie, dass eine ICAM-1-Expression mit einer längeren rezidivfreien Überlebensrate einhergeht (120). Auch Schröder et al. wiesen einen signifikanten prognostischen Einfluss einer ICAM-1-Überexpression auf das rezidivfreie Überleben nach. Der Einfluss auf das Gesamtüberleben war in dieser Studie jedoch nicht signifikant (121).

Insgesamt zeigt dies, dass die Rolle von ICAM-1 bisher kaum nachvollzogen wurde. Wahrscheinlich ist die Funktion des Membranrezeptors je nach Expressionsdichte, Kontext und individueller Mikroumgebung variabel.

Im Harnblasenkarzinom direkt wurde der Einfluss von ICAM-1 bisher kaum untersucht. NH Chow et al. untersuchten die ICAM-1-Konzentration im Urin in Bezug auf eine frühzeitige Rezidiverkennung (122). Dabei konnte zwar erhöhtes ICAM-1 im Urin bei Blasenkrebspatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe (gesunde Patienten) nachgewiesen werden. Es gab aber keinen signifikanten Unterschied zwischen Patienten mit aktiver Tumorerkrankung und solchen im tumorfreien Intervall. Die Prädiktion von ICAM-1 in Bezug auf die ICI-Therapie wurde bisher noch nicht untersucht, weder allein noch in Kombination mit anderen Oberflächeneigenschaften. Unsere Hypothese ist, dass ICAM-1-positive Harnblasentumore durch die verbesserte Adhäsion eine funktionellere immunologische Synapse hervorbringen als ICAM-1-negative Tumore und sich deshalb als prädiktiver Biomarker eignen.

3. Material und Methoden

3.1 Geräte, Chemikalien und Reagenzien, Verbrauchsmaterial und Antikörper

Laborgeräte und Mikroskop

Tabelle 2 Laborgeräte und Mikroskop, alphabetisch sortiert.

Gerät	Hersteller
Dampfgarer Multi-Gourmet	Braun GmbH, Deutschland
Färbeautomat, Leica ST 4040 Linear Stainer	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Deutschland
Färbeautomat LAB vision Autostainer 480S	Thermo Scientific™, USA
Kühlplatte, Paraffin cooling module TKF 22	Medite GmbH, Deutschland
Lichtmikroskop CX 23	Olympus Corporation, Japan
Objektträger-Trockner, OTS 40	Medite GmbH, Deutschland
Paraffinausgießstation, Leica EG 1160	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Deutschland
Rotationsmikrotom Hyrax M55	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Deutschland
Scanner NanoZoomer 2.0-HAT Slide	Hamamatsu Photonics K.K, Japan
TMArrayer™	Pathology Devices, USA
Wärmeschrank, Heraeus Function Line UT6	Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland

Verbrauchsmaterial und Chemikalien/Reagenzien

Tabelle 3: Verbrauchsmaterial, alphabetisch sortiert

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Deckgläschen	Waldemar Knittel Glasbearbeitung GmbH, Deutschland
Einbettkassetten ohne Deckel	Kabe Labortechnik GmbH, Deutschland
Färbestation	Sakura Finetek Germany GmbH, Deutschland
Mikrotomklingen	PFM Medical AG, Deutschland
Objektträger (25 x 75 x 0,1 mm)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland
Objektträgerhalterung für Färbestation	Sakura Finetek Germany GmbH, Deutschland
Permanentmarker	Staedler Mars GmbH & Co KG, Deutschland

Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien, alphabetisch sortiert.

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller
Aqua dest.	Hausleitung
Entellan	VWR International GmbH, Deutschland
EnVision™ FLEX KIT, High pH	Agilent DAKO Technologies, Santa Clara CA, USA
EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH	Agilent DAKO Technologies, Santa Clara CA, USA
Eosin	
Ethanol 70%	SAV Liquid Production GmbH, Deutschland
Ethanol 96%	SAV Liquid Production GmbH, Deutschland
Ethanol abs. (~99%)	SAV Liquid Production GmbH, Deutschland
Hämatoxylin	Agilent DAKO Technologies, Santa Clara CA, USA
Paraffin	Klinika Medical GmbH, Deutschland
Xylol	SAV Liquid Production GmbH, Deutschland

Programme

Tabelle 5: Während der Dissertation angewandte Programme mit Verwendungszweck.

Programm	Hersteller	Verwendung
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, USA	Erfassung der Kollektive
Microsoft Word	Microsoft Corporation, USA	Schreibprogramm der Dissertation
PathoPro	Institut für medizinische Software, Deutschland	Digitales Aktenarchiv
RGui	R-Foundation, Wien	Analyseprogramm
QuPath	The Queen's University of Belfast, Northern Ireland	Analyseprogramm
NDP.View2	Hamamatsu Photonics K.K, Japan	Bildwiedergabe gescannte TMAs
GIMP	Open Source	Bildbearbeitung
Inkscape	Open Source	Bildbearbeitung
EndNote X9	Microsoft Corporation, USA	Zitierprogramm

3.2 Patientenkollektive

Kollektiv 1: Unbehandelte Entdeckungskohorte

In einem retrospektiven Ansatz wurden alle männlichen Patienten eingeschlossen, bei denen im Zeitraum vom 01.04.1994 bis zum 31.12.2013 in der Klinik und Poliklinik für Urologie des Universitätsklinikums Mainz eine radikale Zystektomie aufgrund eines Harnblasenkarzinoms durchgeführt wurde. Es handelt sich um eine reine Männerkohorte, da parallel eine Studie zum Thema Zweitkarzinome (Harnblase und Prostata) durchgeführt wurde. In die retrospektive Patientenkohorte wurden Patienten eingeschlossen, die folgende Kriterien aufwiesen:

1. Nachweis eines invasiven Urothelkarzinoms
2. Verfügbarkeit von archivierten Schnitt- und Blockpräparaten
3. Verfügbarkeit einer adäquaten Menge vitalen Tumorgewebes
4. Verfügbarkeit von klinischen Überlebensdaten

Die folgenden histopathologischen Daten wurden aus den histologischen Befundberichten entnommen und in einer Microsoft-Excel-Tabelle dokumentiert: Patientendaten (Geburtsdatum, Datum der Operation), Archivnummer, die TMN-Klassifikation (einschließlich Differenzierung (G) und Invasion von Gefäß-, Lymphbahnen oder Perineuralscheiden (L, V, Pn)).

Insgesamt wurden 945 Patienten identifiziert. Nach Ausschluss von 560 Patienten aufgrund der o. g. Ausschlusskriterien wurden 385 Patienten in das Kollektiv eingeschlossen. Retrospektive Analysen in dem Überschussgewebe wurden von der Ethikkommission der Ärztekammer Rheinland-Pfalz genehmigt (Antrag 10679).

Kollektiv 2: Therapie-Kohorte

In die zweite Kohorte sind 38 Patienten und Patientinnen eingeschlossen worden, die aufgrund eines Harnblasenkarzinoms leitliniengerecht mit Immuncheckpointinhibitoren behandelt wurden. Die Behandlung und Nachsorge erfolgten in der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie der Universitätsmedizin Mainz. Neben der Erfassung klinisch-pathologischer Daten, wie bereits für das erste Kollektiv beschrieben, wurde zusätzlich das klinische Ansprechen auf die Immuntherapie anhand der *Response Evaluation Criteria In Solid Tumors* (RECIST) erfasst. Dabei wurde das beste Gesamtansprechen (BOR) in die Kategorien komplette Remission (CR), partielle Remission (PR), stabile Erkrankung (SD) und Progression (PD) eingeteilt und als *Objective Response Rate* (ORR, Summe aus CR und PR) bzw. als *Disease Control*

Rate (DCR, Summe aus CR, PR und SD) zusammengefasst. Retrospektive Analysen in dem Überschussgewebe wurden von der Ethikkommission der Ärztekammer Rheinland-Pfalz genehmigt (Antrag 10679).

3.3 Die Herstellung und Färbung der Tissue-Microarrays

TMAAs bieten eine ressourcensparende Möglichkeit, die Expression von Proteinen mittels immunhistochemischer Färbungen in zahlreichen Gewebeproben gleichzeitig zu untersuchen. Auf diese Weise können auch große Patientenkollektive schnell und mit einem Bruchteil der Färbekosten analysiert werden. Ein weiterer Vorteil besteht in der Tatsache, dass zahlreiche Proben unter identischen Bedingungen gefärbt werden können und auf diese Weise potentielle Einflussfaktoren reduziert werden (123). Als erster Schritt erfolgt die Anfertigung eines tabellarischen Stanzschemas, in dem jede Patientenprobe einer Lokalisation innerhalb des TMA-Blocks zugeordnet wird. Für eine Orientierung des TMA-Blocks wurde in der linken oberen Ecke zweimal glatte Muskulatur eingebracht. Weiterhin wurden leere Paraffinblöcke (Empfängerblöcke) mit der Leica-Paraffin-Ausgießstation EG 1160 hergestellt. Zunächst wurde das Gewebe mikroskopisch gesichtet und das Tumoreal auf dem Objektträger mittels Permanentmarker eingekreist. Dabei wurden möglichst zusammenhängende vitale Tumorzellen unter Ausschluss von Nekrosen gewählt.

Die Anfertigung der TMAAs erfolgte unter Verwendung des semiautomatischen *TMArrayer (Pathology devices)* mit einem Stanzendurchmesser von 1,5 mm. Der leere Empfängerblock wurde mit einer Hohlzahn (Recipient Punch) vorgestanz, um freie Plätze für die Gewebestützen zu schaffen. Danach wurde mit einer zweiten Hohlzahn aus den markierten Bereichen der Paraffinblöcke (Spenderblöcke) Tumorgewebe entnommen und in der Reihenfolge des Schemas in den Empfängerblock eingebracht. Die fertig beladenen Empfängerblöcke (TMA-Blöcke) wurden bei 37°C im Brutschrank gelagert, damit sich die eingebrachten Gewebestützen luftfrei und lückenlos in den Block einfügen. Die Lagerung der vollständig angefertigten TMA-Blöcke erfolgte bis zur weiteren Verarbeitung im Kühlschrank. Um die Heterogenität innerhalb des Tumors zu berücksichtigen, wurden bei geeigneter Tumorgöße pro Patient zwei Stützen entnommen (TMA-Serien A und B). Konnte nur eine Stanze entnommen werden, wurde sie automatisch der Serie A zugeordnet und der dazugehörige Platz der Serie B blieb leer. Von den erstellten TMA-Blöcken wurden mit einem Rotationsmikrotom Gewebeschnitte von 2,5 µm Dicke erstellt und auf einen

Objektträger aufgezogen. Die aufgezogenen Schnitte wurden im Brutschrank bei 37°C über Nacht getrocknet.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die HE-Färbung erfolgte im Linearstainer (Leica ST4040). Zu Beginn wurden die Schnitte für ungefähr 20 Minuten bei 66°C in den Wärmeschrank gelegt und für ca. 8 min in hydrophobes Xylol getaucht. Dies entfernte das Paraffin aus dem Gewebe. Für die Rehydrierung wurden die Objektträger in einer absteigenden Alkoholreihe, beginnend mit ca. 3 Minuten in 99%igem Ethanol, gefolgt von einer jeweils ca. 2-minütigen Vergabe in 96%iger und 70%iger Konzentration, aus dem Gewebe gewaschen und anschließend mit destilliertem Wasser gespült. Danach wurden die Objektträger für 2,5 Minuten in 4% Hämatoxylin getaucht, welches die basophilen Strukturen blau färbt. Nach einer Spülung des Gewebes mit Leitungswasser wurde es für ca. 2 Minuten in eine Eosin-Essigsäure-Mischung gegeben, welche die acidophilen Strukturen rot färbt. Abschließend durchlief das Gewebe eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 % Ethanol) für jeweils ca. 1 Minute sowie eine Vergabe in Xylol für ca. 2 Minuten. Die gefärbten Schnitte wurden zum Schutz unter Verwendung von Entellan mit Deckgläschen versehen.

Immunhistochemischen Färbungen

In dieser Arbeit wurden indirekte Färbungen angewandt und ein enzymatisches Detektormolekül gewählt. Alle Färbungen (PD-L1, ICAM-1 und CD8) wurden im *Vision Autostainer 480S* durchgeführt.

Zunächst wurden die Leerschnitte für 20 Minuten bei 66°C im Wärmeschrank gelagert, um überflüssiges Paraffin ablaufen zu lassen. Anschließend ließ man die Objektträger auf Raumtemperatur abkühlen. Danach wurden die Objektträger für 15 Minuten in hydrophobes Xylol gegeben, um das restliche Paraffin zu lösen. Zur Rehydrierung folgte eine absteigende Alkoholreihe: 3 Minuten in 99-%igem Ethanol, 2 Minuten in 96-%igem Ethanol und 2 Minuten in 70-%igem Ethanol, gefolgt von einem Spülen in Aqua destillata. Die vorbereiteten Objektträger wurden in Glasküvetten gegeben. Die Pufferlösung, bestehend aus Target Retrieval Solution (TRS, 1:50), wurde auf den für den Antikörper benötigten pH-Wert verdünnt und im Dampfgarer bei 95-99°C vorgeheizt. Zur hitzeinduzierten Epitop-Demaskierung wurden die Objektträger in der Pufferlösung gekocht: für PD-L1- und ICAM-1-Antikörper in Low-pH-Puffer für 35 Minuten, und für CD8-Antikörper in High-pH-Puffer für 20 Minuten. Nach dem

Kochen wurden die Küvetten mittels Wärmekonvektion unter fließendem Leitungswasser auf Raumtemperatur gebracht. Anschließend wurde der Waschpuffer im Verhältnis 1 : 20 mit Aqua destillata verdünnt und die Objektträger für 4 Minuten hineingestellt, um das Leitungswasser zu entfernen. Danach wurden die Objektträger in den Färbeautomaten einsortiert, um die automatisierte immunhistochemische Färbung nach einem programmierten Protokoll durchzuführen. Dieses Protokoll beinhaltete die Blockierung der endogenen Peroxidase zur Vermeidung falsch positiver Färbungen, die Inkubation mit dem Primär-Antikörper und anschließend mit dem Sekundär-Antikörper (rabbit- oder mouse-LINKER). Mittels des Tertiär-Antikörpers (HRP) und des chromogenen DAB+ wurden die Enzyme katalysiert und die Färbung sichtbar gemacht. Nach der automatisierten Färbung wurde eine HE-Färbung als Gegenfärbung durchgeführt und die Objektträger anschließend für 3 Minuten in Leitungswasser gebläut. Die Dehydrierung erfolgte mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe, gefolgt von einem abschließenden Versatz in Xylol. Schließlich wurden die Objektträger mit Entellan gedeckt. Im Färbeergebnis stellen sich die Zellkerne blau, das Zytoplasma und Bindegewebe hellblau bis grau und die positive Antikörperreaktion braun dar.

3.4 Beurteilung und visuelles Scoring der TMAs

Von den HE-gefärbten Objektträgern wurden mit dem Hamamatsu NanoZoomer 2.0-HAT-Scanner Bilder angefertigt, um eine digitale Sichtung zu ermöglichen. Mit dem Programm NDP.view2 erfolgte die Auswertung der Bilder. Für jede HE-gefärbte Stanze der TMAs wurde geprüft, ob genügend vitales Tumorgewebe getroffen wurde.

Die Bewertung wurde in der Datenbank wie folgt erfasst:

- 0 - keine Stanze vorhanden; kein vitaler Tumor im Gewebe
- 1 - genug Tumorzellen vorhanden (mind. 50 Zellen)
- 2 - nicht genügend Tumorzellen, potenziell 2. Schnittversuch möglich

Die PD-L1-Färbung wurde visuell mittels Combined Positive Score (CPS) ausgewertet. Wichtig ist, dass ein membräses Expressionsmuster vorliegt. Die Zellmembran kann vollständig zirkulär, aber auch partiell angefärbt sein, um als positiv gewertet zu werden, wobei die Färbeintensität beim visuellen Scoring keine Rolle spielte. Eine

ausschließlich zytoplasmatische bzw. nukleäre Färbung wurde gemäß etablierter Praxis als negativ bewertet.

Der CPS bezieht sowohl die vitalen Tumorzellen als auch die Immunzellen in das Verhältnis der Gesamttumorzellen ein. Mit einhundert multipliziert ergibt es einen dimensionslosen Score-Wert (keine Einheit), welcher theoretisch auch größer 100 sein kann, aber auf 100 begrenzt wurde. Für die Tumorzellen gelten dieselben Voraussetzungen wie beim TPS. Als Immunzellen wurden Lymphozyten und Makrophagen berücksichtigt, nicht aber neutrophile Granulozyten oder Plasmazellen (siehe Formel 2). Bei mehrfacher Stanzzyliinderentnahme von einem Patienten, wurden die Scores der Proben gemittelt.

$$CPS = \frac{n(PDL1^+ \text{ Tumorzellen}) + n(PDL1^+ \text{ Lymphozyten und Makrophagen})}{n(\text{gesamt Tumorzellen})} \times 100 \quad (1)$$

$$TPS = \frac{n(ICAM - 1^+ \text{ Tumorzellen})}{n(\text{gesamte Tumorzellen})} \times 100\% \quad (2)$$

Für die visuelle Bestimmung der ICAM-1-Expression existiert aktuell kein etabliertes Scoring-Verfahren. Daher haben wir die Kriterien analog zur Bestimmung der PD-L1-Expression auf Tumorzellen (Tumor proportion score, TPS; Formel 2) angewendet. Die membranöse vollständige oder unvollständige Expression in vitalen Tumorzellen wurde als positiv bewertet, wobei die Färbeintensität unberücksichtigt blieb (Abbildung 8). Eine nukleäre oder zytoplasmatische Färbung wurde als negativ eingestuft, und nekrotische Areale wurden ausgeschlossen. Darüber hinaus wurde die Expressionen in anderen Zellen des Tumormikromilieus, wie beispielsweise in Leukozyten und Endothelzellen, nicht bewertet.

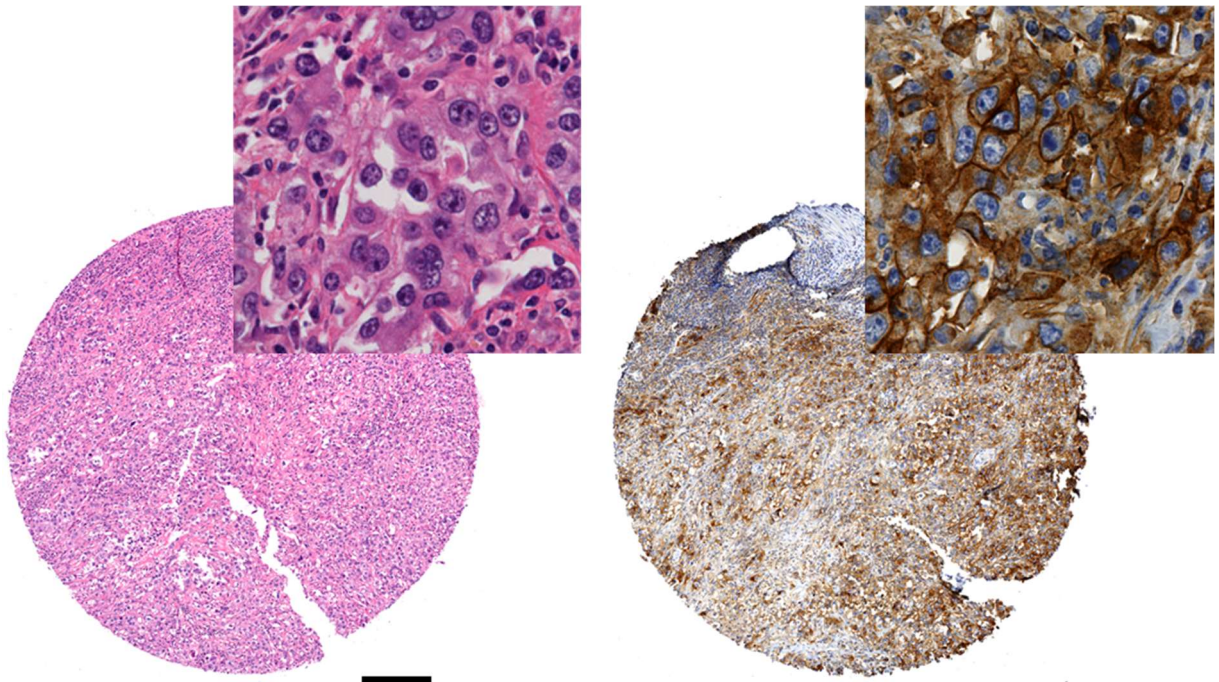


Abbildung 8: Beispiel für eine positive ICAM-1 Expression im Tumorgewebe (links HE, rechts ICAM1 IHC). In diesem Beispiel ist eine membranöse, kräftige Immunreaktion (Score 3+) der Tumorzellen zu erkennen. Maßstab 200 μm .

3.5 Automatisierte Bildanalyse

Die automatisierte Bildanalyse wurde mit der *open source* Software Plattform QuPath (124) durchgeführt, die auf die Bildanalyse ganzer digitaler Objektträger mit Größen von bis zu einem Gigabyte ausgerichtet ist. Zunächst wurden die Bilddateien eingeladen und mit der Funktion *TMA dearrayer* die jeweiligen TMA-Stanzen automatisiert erfasst. Diese Erfassung wurde kontrolliert und eventuell auftretende Fehlerkennungen und Überlappungen durch schnittbedingte Verzerrungen der Gewebestanzen manuell korrigiert (Abbildung 9, links). Danach wurde das tabellarische TMA-Schema importiert, so dass letztlich jeder erkannten TMA-Stanze das zugrunde liegende Gewebe zugeordnet werden kann. Für die Detektion CD8-positiver zytotoxischer T-Lymphozyten wurde zunächst die Funktion *Simple Tissue Detection* für die Annotation von Gewebe eingesetzt, da die Zahl CD8-positiver Zellen als Zellzahl pro Fläche bestimmt werden sollte und die TMA-Stanzen häufig nicht vollständig erfasst wurden bzw. kleiner als die TMA-Erkennung waren. Die erhaltenen Annotationen wurden hierarchisch den entsprechenden TMA-Stanzen untergliedert. Im nächsten Schritt wurde die Funktion *Positive Cell Detection* eingesetzt, um alle Zellen innerhalb der Annotationen zu erkennen und innerhalb dieser Zellen eine DAB-Färbung zu identifizieren (CD8-positive Zellen; Abbildung 9, Mitte).

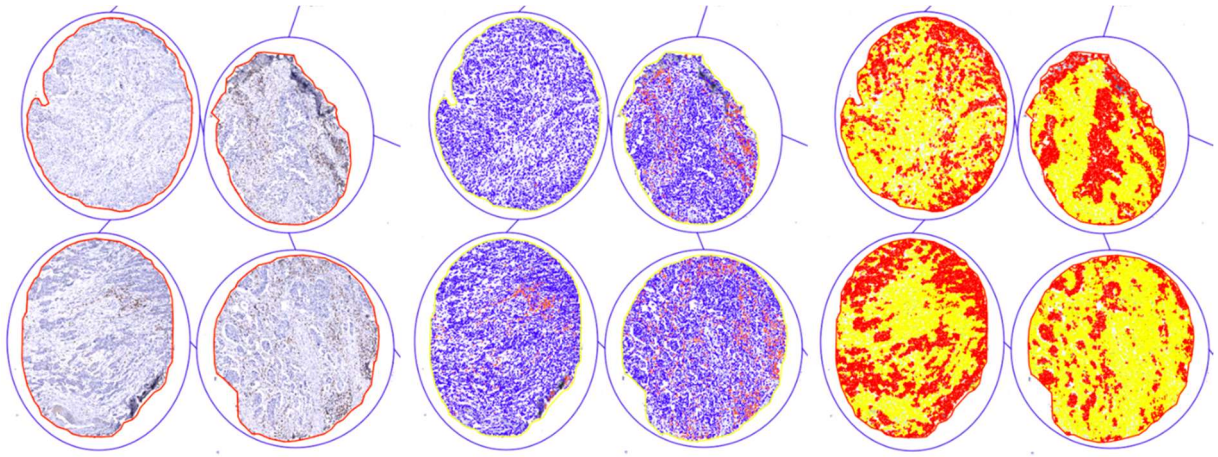


Abbildung 9: (Links) Automatisierte und manuell korrigierte Erkennung der TMA-Stanzen mit den Hierarchie-Ebenen TMA-Stanze (blau) und Annotation (rot). (Mitte) Detektion von Zellen mit DAB-Färbung (CD8-positiv, rot) und ohne DAB-Färbung (CD8-negativ, blau). (Rechts) Supervisierte Objektklassifizierung in Tumorzellen (rot) und Nicht-Tumorzellen (gelb).

Für die automatisierte Erfassung der ICAM1-Expression wurde zunächst eine supervisierte Objektklassifizierung mit dem Random-Trees-Klassifikator durchgeführt. Hierfür wurden exemplarisch Tumor- und Nicht-Tumorzellen annotiert und die DAB-Färbung generell für die Klassifikation ausgeschlossen. Das System wurde so lange trainiert, bis eine adäquate Klassifikation von Tumor- und Nicht-Tumorzellen erreicht wurde (Abbildung 9, rechts). Im nächsten Schritt wurden die DAB-Intensitäten (d.h. die Anfärbungen von ICAM-1) innerhalb der detektierten Zellen erfasst und nach einem vierstufigen System aufgetrennt (0, 1+, 2+ und 3+). Abschließend wurden die Farbeintensitäten für die jeweiligen Färbungen und Zellklassen als H-Score zusammengefasst (Formel 3).

$$\text{H-Score} = (0 \times \%1+) + (1 \times \%1+) + (2 \times \%2+) + (3 \times \%3+) \quad (3)$$

3.6 Statistische Analysen

Alle Analysen wurden mit RStudio (Version 2023.06.0) durchgeführt, unter Verwendung der Pakete readxl, ggplot2, ggpubr, rstatix, ggsci, dplyr, cutpointr, survminer, survival und MatchIt. Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$. Für die PD-L1-Expression wurden die klinisch etablierten Schwellenwerte $\text{CPS} \geq 1$ und ≥ 10 als niedrig/hoch definiert. Für ICAM1 wurde ein Grenzwert von $\text{TPS} \geq 1$ festgelegt. Für den Vergleich der CTL-Dichte und der räumlichen Parameter (Abstand CTL von Tumorzellen und Anzahl benachbarter CTL) in Abhängigkeit von der PD-L1- und ICAM1-Expression wurde für die Auswahl des geeigneten statistischen Tests zunächst in beiden Gruppen

(niedrige und hohe Expression) die Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test geprüft. Sobald mindestens eine der Gruppen von der Normalverteilung abweicht ($p < 0,05$), wurde zur Analyse der Gruppenunterschiede ein nicht-parametrischer Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Bei Nachweis einer Normalverteilung in beiden Gruppen wurde ein t-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Für die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen krankheitsbezogenem Überleben und der Expression von PD-L1 und ICAM1 bzw. der Infiltration von CTL wurden zunächst die o. g. Schwellenwerte festgelegt (PD-L1 und ICAM1) bzw. ein optimierter Cutoff (CTL-Dichte: 461 Zellen/mm², mittlere Distanz zwischen CTL und Tumorzellen: 1,99 µm, Anzahl benachbarter CTL: 5,2) mittels Log-Rank-Statistik (Funktion `surv_cutpoint` aus dem `cutpointr`-Paket) ermittelt. Die Überlebenszeiten wurden mit der Kaplan-Meier-Methode geschätzt und mittels Log-Rank-Test auf Unterschiede zwischen den Gruppen geprüft. Zur Untersuchung potenzieller Einflussfaktoren auf das krankheitsbezogene Überleben wurde eine univariate Cox-Regression für folgende Faktoren durchgeführt: begleitendes Prostata-(Zweit-)Karzinom (ja vs. nein), pN-Status (pN0 vs. pN+), pT-Status (pT1 und 2 vs. pT3 und 4), Alter (≤ 60 Jahre vs. > 60 Jahre), PD-L1-Expression (CPS < 1 vs. ≥ 1 und CPS < 10 vs. ≥ 10), ICAM1-H-Score (< 1 vs. ≥ 1), CTL-Dichte im Tumor, mittlere Distanz zwischen CTL und Tumorzellen sowie die Anzahl benachbarter CTL. Für die univariate Analyse wurde für jeden Faktor ein separates Cox-Regression-Modell berechnet. Faktoren mit einem p-Wert $< 0,05$ wurden anschließend in ein gemeinsames multivariates Cox-Regression-Modell aufgenommen. Die Ergebnisse der Cox-Regression wurden als Hazard Ratios (HR) mit 95%-Konfidenzintervallen (CI) und den jeweiligen p-Werten dargestellt. Für den Vergleich des Überlebens der behandelten Patienten der ICI-Kohorte und der unbehandelten Patienten der Entdeckungskohorte, d. h. zur Abgrenzung eines potentiell prädiktiven Wertes der ICAM1-Expression gegenüber eines prognostischen Effekts, wurde ein *Propensity Score Matching* unter Verwendung des nearest neighbor-Verfahrens mit einem Mahalanobis-Distanzmaß (Paket `MatchIt`) durchgeführt. Dabei wurden die Kovariablen Alter und ICAM1-H-Score gematcht. Anschließend wurde der gematchte Datensatz extrahiert und für die weiteren Analysen verwendet. Im behandelten (ICI-) Kollektiv wurde eine Vierfeldertafel erstellt, um den Zusammenhang zwischen der ICAM1-Expression (positiv/negativ) und dem Ansprechen auf die Immuntherapie (Responder/Non-Responder) zu untersuchen. Zusätzlich wurden die folgenden

Testgütemaße (Präzisionsmaße) berechnet: Sensitivität, Spezifität, positiver Vorhersagewert (PPV) und negativer Vorhersagewert (NPV).

4. Ergebnisse

4.1 Entdeckungskohorte

Die Tabelle 6 zeigt eine Übersicht der 385 eingeschlossenen Patienten. Das mediane Alter beträgt 69,6 Jahre. 50 % der Patienten befinden sich im T3-Stadium, 35 % haben eine Lymphangiosis carcinomatosa. Die Invasion von Gefäßen (V1: 19 %) und Perineuralscheiden (Pn1: 9 %) ist deutlich seltener.

Tabelle 6: Übersicht der Eigenschaften der eingeschlossenen Patienten absolut und anteilig sowie die Altersverteilung zum Zeitpunkt der Operation.

		Jahre	n	(%)
Patienten gesamt			385	(100%)
Alter bei OP	Mittelwert	68,1		
	Median	69,6		
	SD	9,6		
	Max	90,4		
	Min	27,4		
Stadium	MIBC		385	(100%)
TMN	T2		112	(29%)
	T3		193	(50%)
	T4		80	(21%)
	Nx		19	(5%)
	N0		227	(59%)
	N1		55	(14%)
	N2		68	(18%)
	N3		16	(4%)
	Mx		281	(73%)
	M0		94	(24%)
	M1		10	(3%)
	Gx		3	(1,6%)
Differenzierung	G1		1	(0,4%)
	G2		59	(15%)
	G3		302	(78%)
	G4		20	(5%)
	Lx		245	(64%)
Lymphangiosis carcinomatosa	L0		5	(1%)
	L1		135	(35%)
	Vx		299	(78%)
Gefäßinvasion	V0		11	(3%)
	V1		75	(19%)
	Pnx		345	(90%)
perineurale Invasion	Pn0		5	(1%)
	Pn1		35	(9%)
	R0		358	(93%)
Resttumor	R1		27	(7%)

4.2 Expression von PD-L1 und ICAM-1 in der Entdeckungskohorte

Um eine Übersicht über die Inzidenz der ICAM-1- und PD-L1-Expression zu bekommen, haben wir uns zunächst die Expression dieser beiden Marker angesehen. Für beide Biomarker (PD-L1 und ICAM-1) musste ein membranöses Expressionsmuster vorliegen. Die Zellmembran kann vollständig zirkulär, aber auch partiell angefärbt sein, um als positiv gewertet zu werden, wobei die Färbeintensität beim manuellen Scoring keine Rolle spielte. Eine ausschließlich zytoplasmatische bzw. nukleäre Färbung wurde gemäß etablierter Praxis als negativ bewertet. Für PD-L1 existieren bei zahlreichen klinischen Anwendungen bereits mehrere Scores und Grenzwerte. In dieser Arbeit haben wir den CPS ≥ 1 und CPS ≥ 10 für die Analysen festgelegt. Für ICAM-1 wurde der Cutoff mit H-Score ≥ 1 festgelegt. Durch die Untersuchung der Population hinsichtlich beider Eigenschaften ergeben sich die in Abbildung 10 dargestellten vier Subgruppen. Es existieren Harnblasenkarzinome, die beide Eigenschaften exprimieren (Subgruppe A), solche, die jeweils nur eine Eigenschaft aufweisen (Subgruppe B und C), und die komplett negative Subgruppe D.

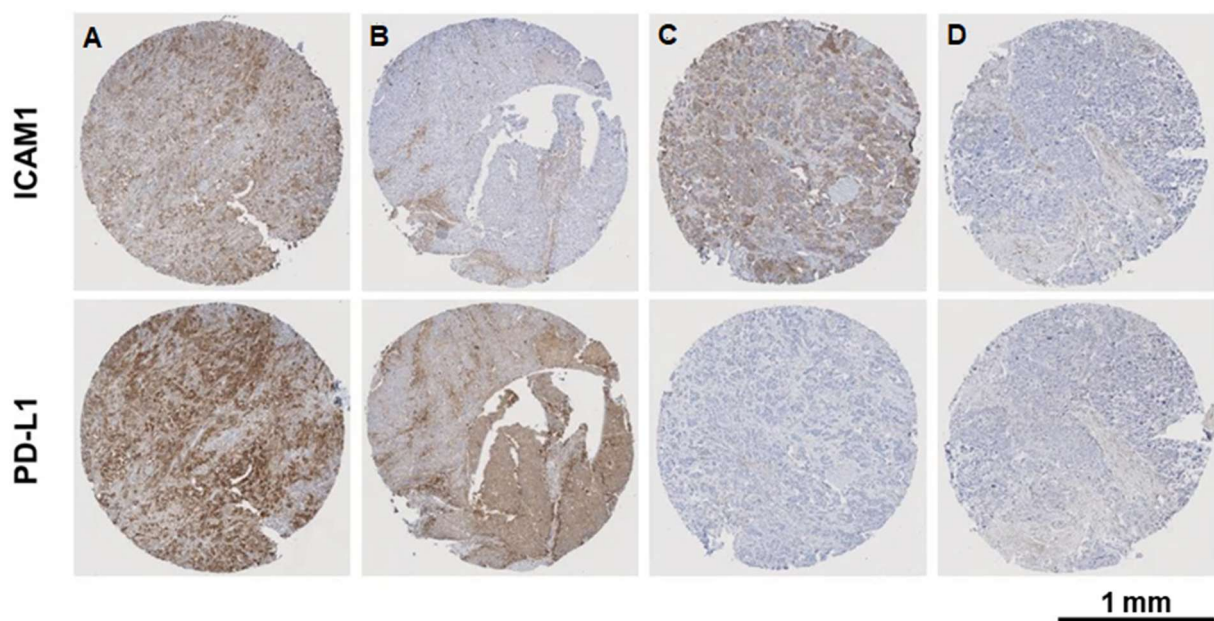


Abbildung 10: Repräsentative Bilder der Subgruppen (n=385). A: ICAM-1 und PD-L1 exprimiert. B: ICAM-1 ohne Expression, PD-L1 exprimiert. C: ICAM-1 exprimiert, PD-L1 ohne Expression. D: ICAM-1 und PD-L1 ohne Expression. Für die positiven Beispiele wurden stark exprimierende Proben gewählt.

Die Expressionsverteilung von PD-L1 und ICAM-1 deutet darauf hin, dass die Oberflächeneigenschaften nicht miteinander korrelieren, und führt zu unserer wichtigsten Grunderkenntnis: ICAM-1 und PD-L1 werden unabhängig voneinander

exprimiert. Dies ermöglicht es, den potenziell zusätzlichen Einfluss von ICAM-1 zu untersuchen.

Im nächsten Schritt haben wir uns die Verteilung von PD-L1 und ICAM-1 genauer angeschaut. Dabei zeigte sich, dass der Großteil, 332 Patienten, ICAM-1 exprimierte (89 %). Lediglich 11 % der Patienten ($n = 41$) exprimierten den Marker nicht (Abbildung 11 c). Bei PD-L1 fällt deutlich auf, dass für beide Grenzwerte der Anteil der negativen Patienten überwiegt (CPS ≥ 1 : 62 % und CPS ≥ 10 : 82 %). Der PD-L1-exprimierende Anteil macht bei einem CPS ≥ 1 etwas über ein Drittel (38 %) aus. Erhöhen wir den Cutoff auf CPS ≥ 10 , wird der positive Anteil erwartungsgemäß niedriger und liegt mit 69 Patienten bei lediglich 18 % (Abbildung 11 links und mittig). Interessanterweise hat ICAM-1 in der Entdeckungskohorte eine hohe Inzidenz im Vergleich zu PD-L1.

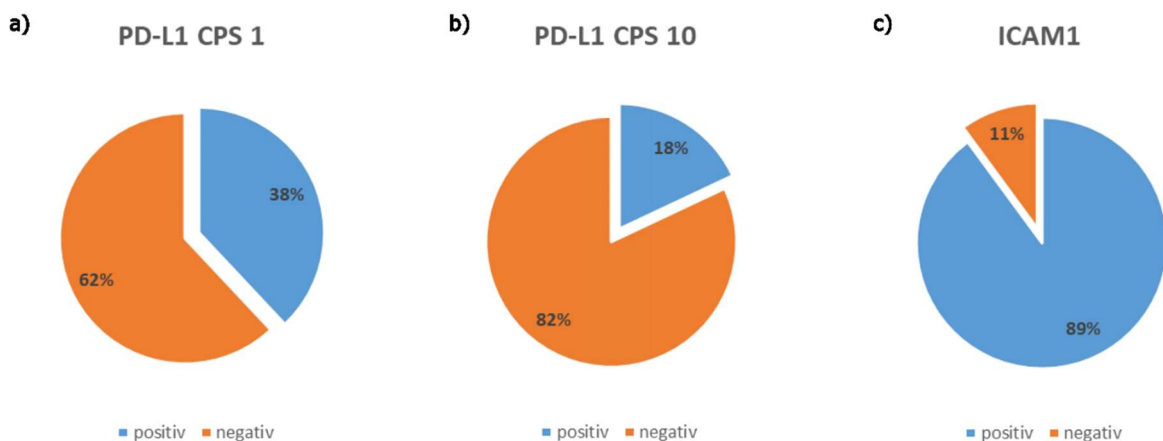


Abbildung 11: Prozentuale Verteilung von PD-L1 bei einem Grenzwert von CPS ≥ 1 (links) und ≥ 10 (Mitte) sowie von ICAM-1 bei einem Grenzwert von H-Score ≥ 1 (rechts).

4.3 Kaplan-Meier Analysen der Entdeckungskohorte

Zunächst haben wir mittels Kaplan-Meier-Analysen untersucht, welchen Einfluss die einzelnen Faktoren (PD-L1-Expression, ICAM-1-Expression und CTL-Dichte) auf die Prognose haben. Schaut man sich die PD-L1-Expression bei einem CPS ≥ 1 an, überlebten die PD-L1-positiven Patienten im Durchschnitt 4,3 Jahre, während die PD-L1-negativen Patienten mit 2,6 Jahren deutlich kürzer lebten (95%-KI [0,55-0,95], $p = 0,02$). Das bedeutet, dass die PD-L1-positive Gruppe einen Überlebensvorteil von 1,7 Jahren hat (siehe Abbildung 12). Die Hazard Ratio (HR = 0,72) zeigt, dass das Risiko für einen Todesfall bei Patienten mit PD-L1-Expression etwa 27 % niedriger ist als bei denen ohne PD-L1. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Patienten mit PD-L1-Expression einen klaren Überlebensvorteil haben.

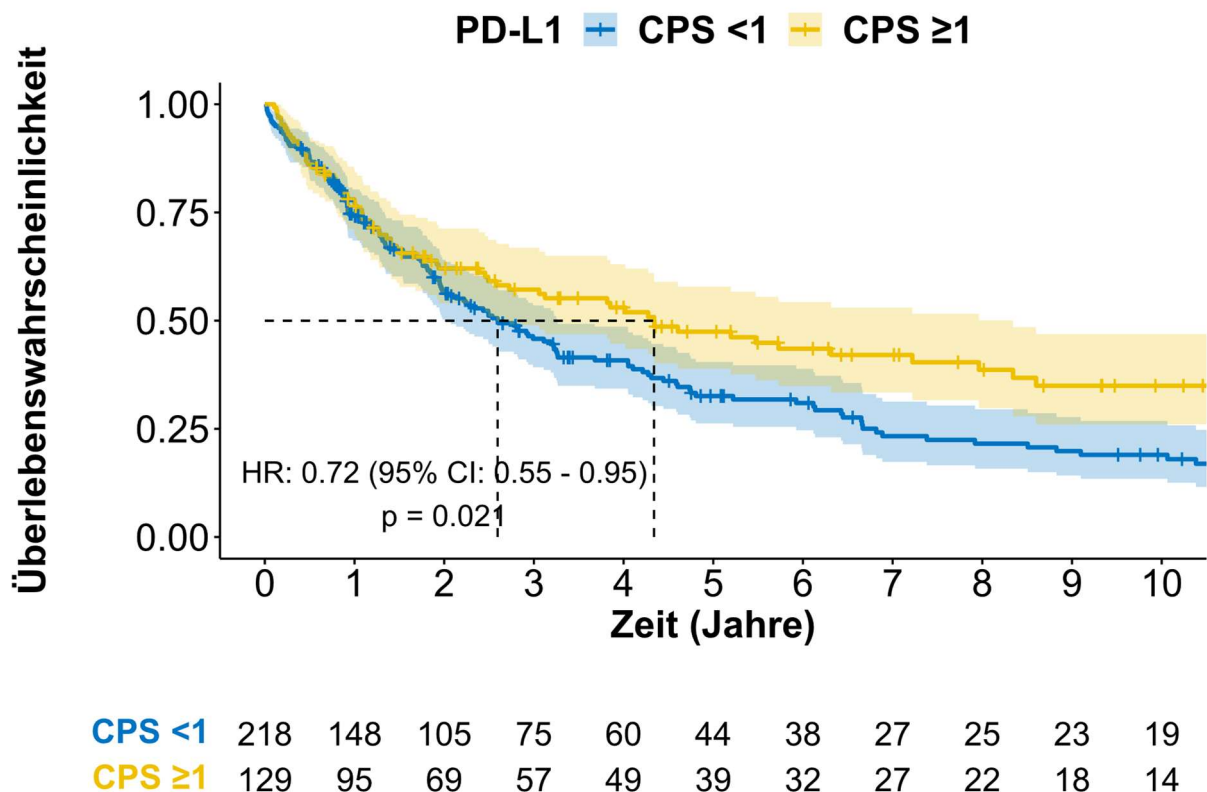


Abbildung 12: Überlebenszeit der PD-L1-positiven Patienten (gelbe Kurve) und PD-L1-negativen Patienten (blaue Kurve) bei einem Grenzwert von CPS = 1. Number at risk: (n = 347) Anzahl jährlich teilnehmender Patienten, gestrichelte Linie: medianes Überleben. Statistischer Test: Log-Rank-Test.

Bei einem höheren Grenzwert von $\text{CPS} \geq 10$ überlebten PD-L1-positive Patienten im Median 4,2 Jahre, während PD-L1-negative Patienten 2,9 Jahre überlebten (95%-KI [0,62–1,30]). Die Analyse ist jedoch nicht statistisch signifikant und könnte zufallsbedingt sein. Es besteht also kein relevanter Überlebensvorteil zwischen den beiden Gruppen (siehe Abbildung 13).

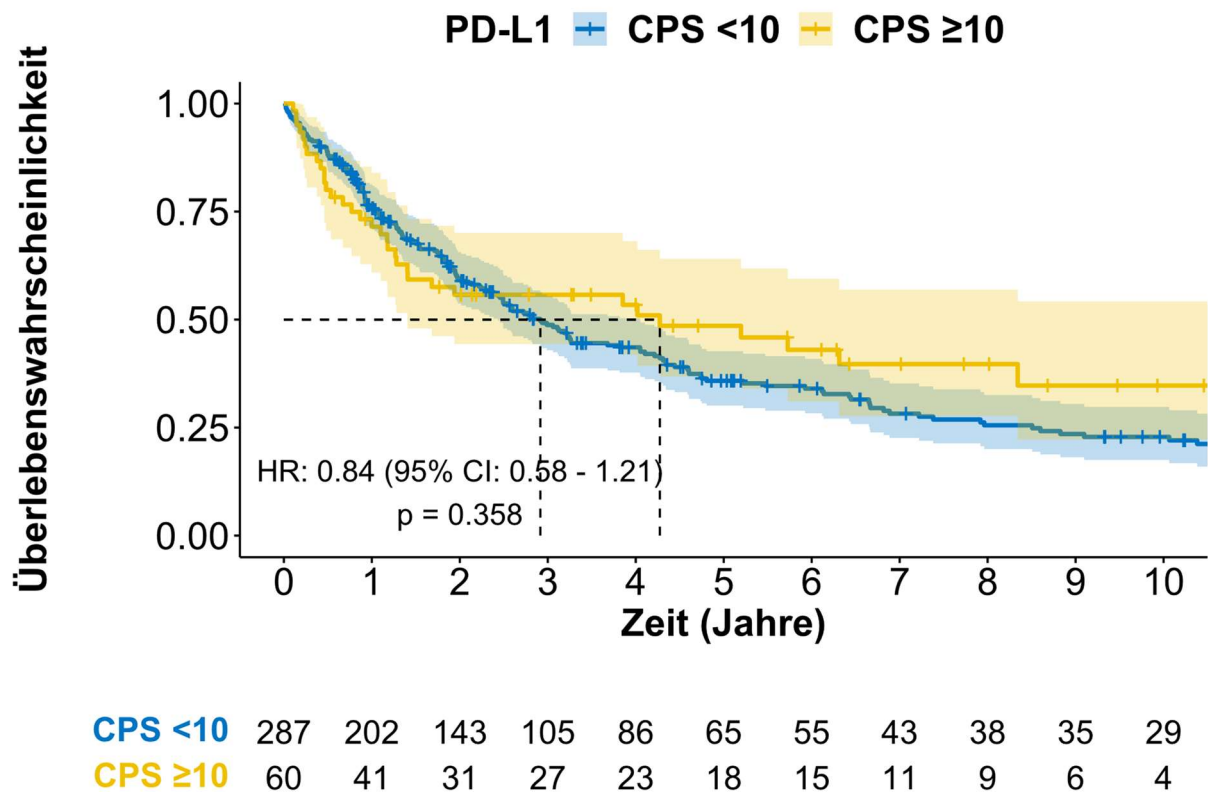


Abbildung 13: Überlebenszeit der PD-L1-positiven Patienten (gelbe Kurve) und PD-L1-negativen Patienten (blaue Kurve) bei einem Grenzwert von $\text{CPS} = 10$. Number at risk: (n = 347) Anzahl jährlich teilnehmender Patienten, gestrichelte Linie: medianes Überleben. Statistischer Test: Log-Rank-Test.

Anschließend haben wir überprüft, ob die ICAM-1-Expression das Gesamtüberleben beeinflusst (Abbildung 14), und beobachtet, dass die mediane Überlebenszeit der ICAM-1-positiven Patienten 0,7 Jahre länger ist als die der ICAM-1-negativen (95%-KI [0,52 – 1,14], $p = 0,196$), wobei auch in dieser Analyse die statistische Signifikanz verloren geht. Die ICAM-1-Expression hat somit keinen prognostischen Einfluss auf unsere Patientenkohorte.

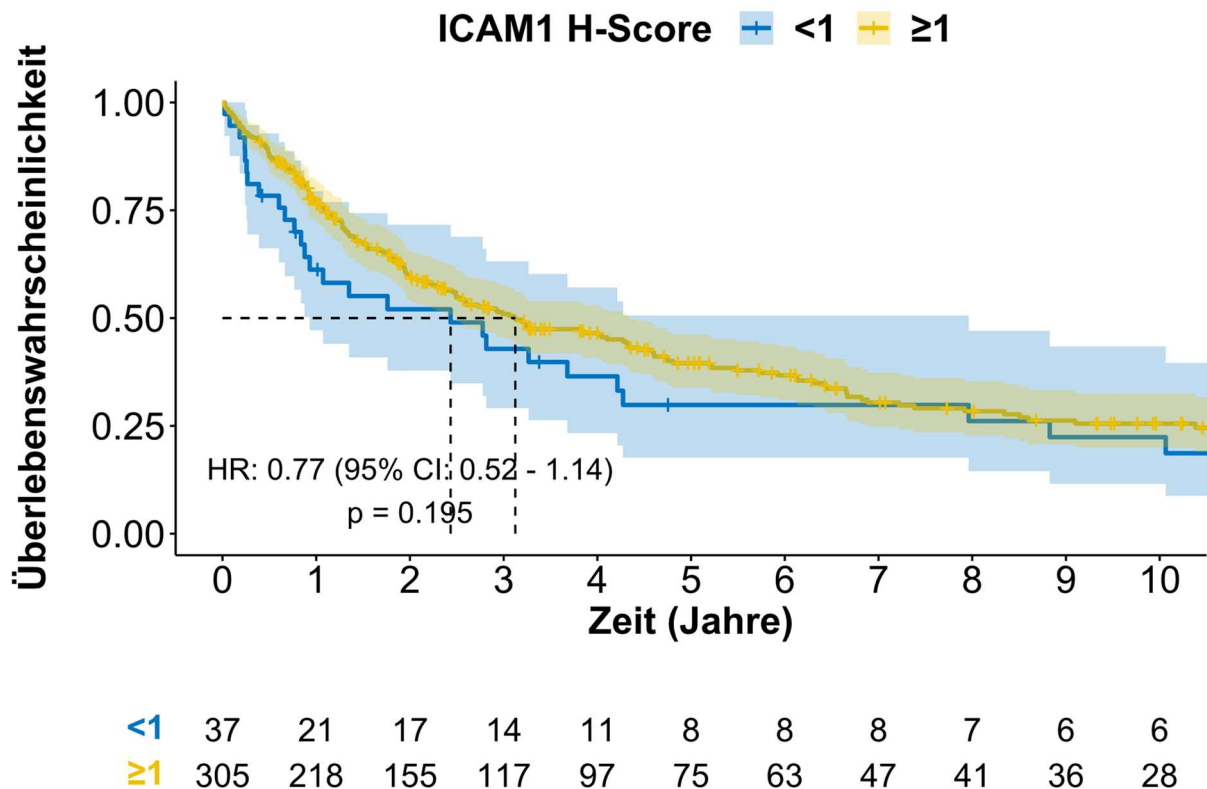
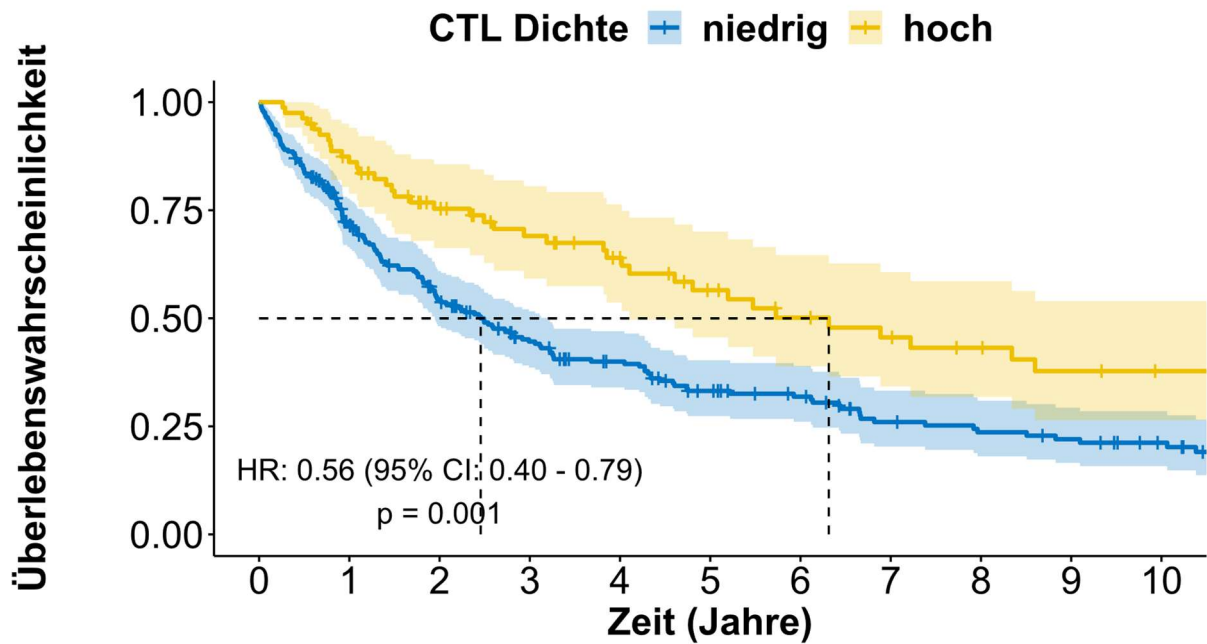


Abbildung 14: Überlebenszeit der ICAM-1-positiven Patienten (gelbe Kurve) und PD-L1-negativen Patienten (blaue Kurve) bei einem Grenzwert von $TPS \geq 1$. Number at risk: ($n = 342$) Anzahl jährlich teilnehmender Patienten, gestrichelte Linie: medianes Überleben. Statistischer Test: Log-Rank-Test.

Weiterhin haben wir herausgefunden, dass die intratumorale CTL-Dichte ein prognostisch günstiger Faktor ist (Abbildung 15). So überlebten Patienten mit einer hohen CTL-Dichte mehr als doppelt so lang wie Patienten mit einer niedrigen Dichte (high: 6,3 Jahre, low: 2,5 Jahre). Auch die Hazard Ratio ($HR = 0,56$) zeigt, dass das Sterberisiko der Patienten mit hoher CTL-Dichte um 44 % geringer ist als bei Patienten mit wenigen intratumoralen CTLs.



niedrig	254	168	120	88	72	55	47	34	30	27	21
hoch	80	67	52	43	36	28	23	20	17	14	12

Abbildung 15: Kaplan-Meier, CD8 Density. Überlebenszeit bei hoher (gelbe Kurve) und bei niedriger CTL-Dichte im Tumorgewebe (blaue Kurve). Number at risk: (n = 334) Anzahl jährlich teilnehmender Patienten, gestrichelte Linie: medianes Überleben. Statistischer Test: Log-Rank-Test.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die PD-L1-Expression bei einem niedrigem Grenzwert ($\text{CPS} \geq 1$) und die Dichte der tumorinfiltrierenden cytotoxischen T-Lymphozyten prognostisch günstige Faktoren sind, während die ICAM-1-Expression und PD-L1 bei einem $\text{CPS} \geq 10$ keine statistische Signifikanz aufweisen.

4.4 CTL-Infiltration und Verteilung in Abhängigkeit von der PD-L1 und ICAM1-Expression

Im nächsten Schritt haben wir untersucht, ob sich die Anzahl der intratumoralen zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) mit der Expression von ICAM-1 bzw. PD-L1 ändert. Dafür wurden die CTLs pro Quadratmillimeter Tumorgewebe für die exprimierende und nicht-exprimierende Gruppe gezählt. Es zeigt sich, dass sowohl bei den Harnblasentumoren, die positiv für ICAM-1 sind, als auch bei denen, die positiv für PD-L1 sind, signifikant mehr T-Zellen pro Quadratmillimeter vorhanden sind (ICAM-1: $p = 7.171e-12$, CPS ≥ 1 : $p = 1.895e-13$, CPS ≥ 10 : $p = 7.8e-07$). Die ICAM-1-positiven Patienten weisen im Median viermal so viele CTLs/mm² auf wie die ICAM-1-negativen (404 im Vergleich zu 92 CTLs/mm², siehe Abbildung 16 links). Ebenso verhält es sich bei den PD-L1-positiven Patienten. Sowohl bei einem CPS ≥ 1 als auch bei einem CPS ≥ 10 befindet sich die drei- bis vierfache Anzahl an CTLs auf einem Quadratmillimeter Tumorgewebe (CPS ≥ 1 : 742 und 164 CTLs/mm²; CPS ≥ 10 : 937 und 248 CTLs/mm²; vergleiche Abbildung 16 mittig und rechts). Die Anwesenheit von Immunzellen (speziell CTLs) ist eine essentielle Voraussetzung für die antitumorale Immunantwort, insbesondere wenn zukünftig eine Anwendung mit Immuncheckpoint-Inhibitoren erfolgen soll.

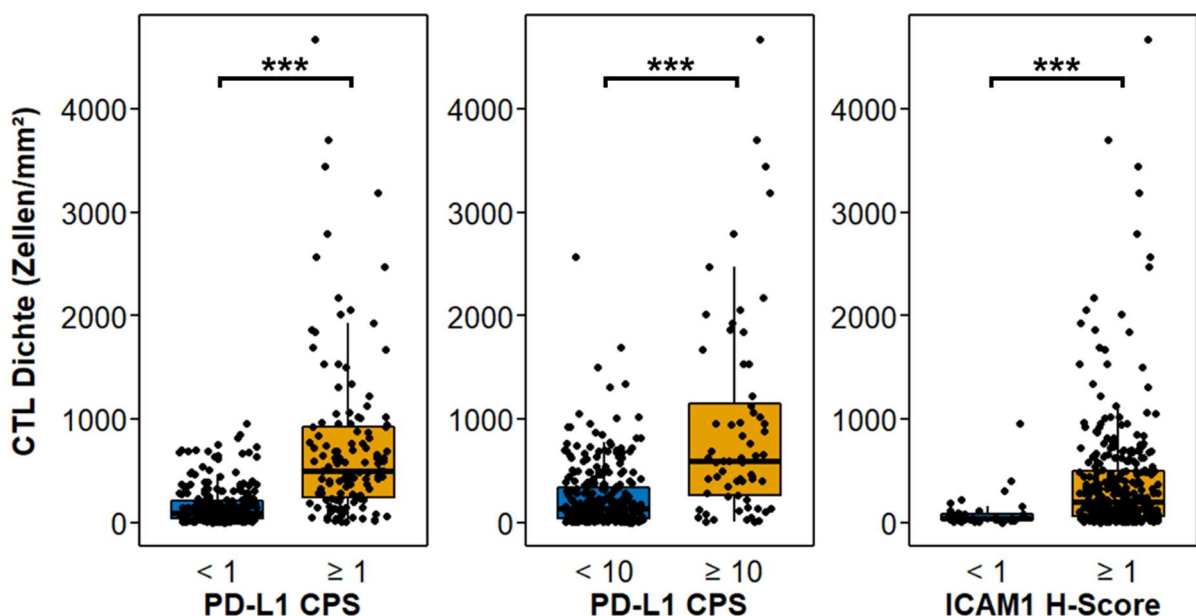


Abbildung 16: Vergleich der Anzahl tumorinfiltrierender CD8-positiver zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL-Dichte) in Abhängigkeit von der PD-L1-Expression (CPS 1: $n = 249/131$; CPS 10: $n=316/64$) bzw. von der ICAM1-Expression ($n=41/332$). *** $p < 0.001$ mittels Mann-Whitney-U-Test.

Für eine effektive antitumorale Immunantwort ist der direkte Kontakt zwischen Tumor- und Immunzellen entscheidend. Daher haben wir im folgenden Schritt die mittlere Distanz zwischen CTLs und Tumorzellen untersucht. In Abbildung 17 wird die räumliche Bildanalyse exemplarisch dargestellt. Dafür wurden die Umrisse von verschiedenen Zellarten (Tumor-, Immun- und Stromazelle) erfasst sowie die Abstände der jeweiligen Zellzentren zueinander aufgeführt. Dies ermöglicht es Abstand, Zelldichte und benachbarte Zellen zu analysieren.

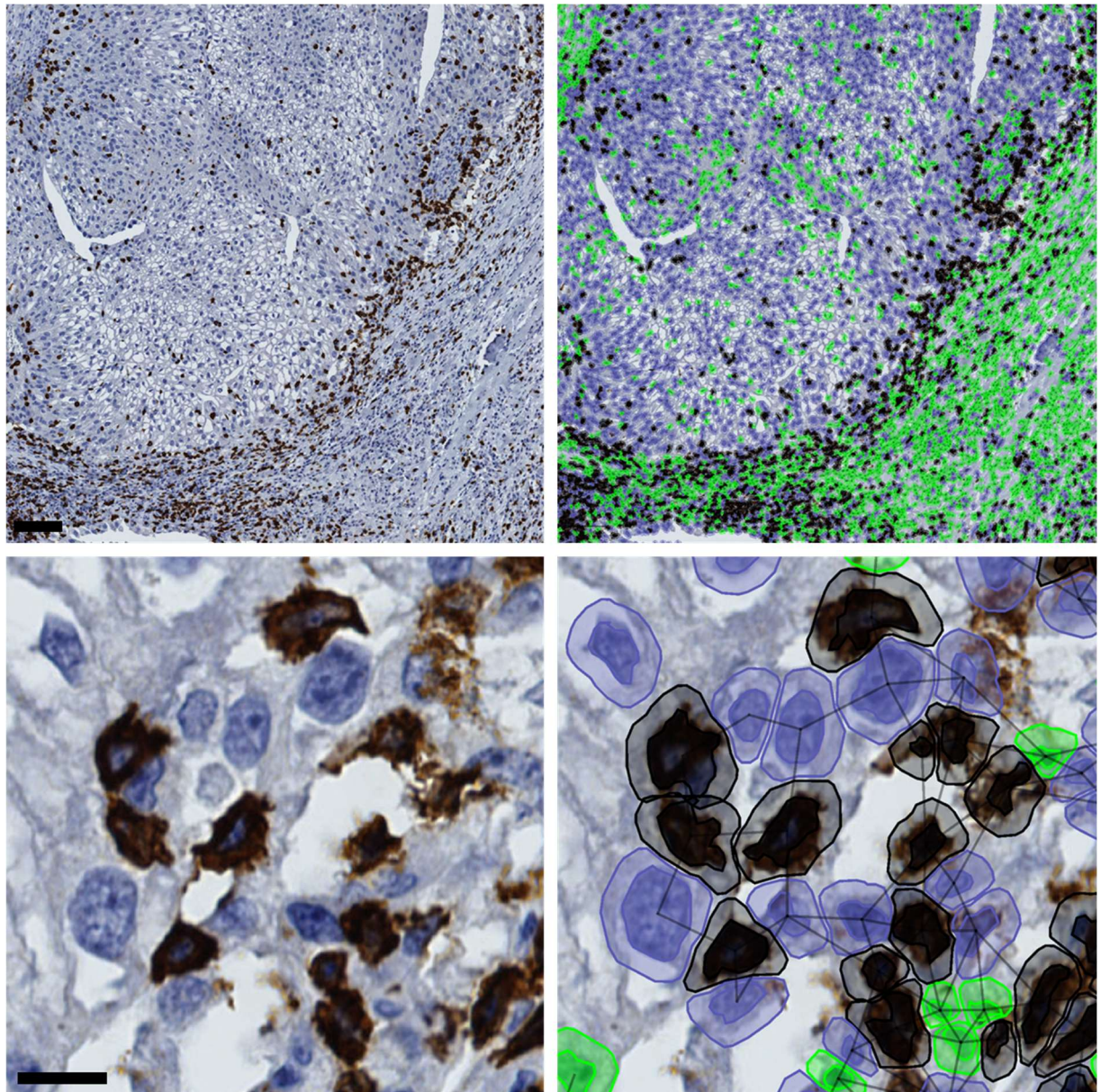


Abbildung 17: Beispielhafte Darstellung der räumlichen Analyse tumorinfiltrierender CTL (links Originalbild Immunhistochemie, braun CD8, blau Kernfärbung; rechts Überlagerung, blau Tumorzellen, grün Stromazellen, schwarz CTL). Die Abstände zwischen den Mittelpunkten der Zellen sind durch Linien dargestellt. Maßstab: 100 μm (oben) und 10 μm (unten).

Obwohl die CTLs der ICAM-1-positiven Patienten minimal näher an den Tumorzellen liegen als die der negativen Patienten (medianer Abstand 4,3 μm und 4,7 μm), ist dieser Unterschied statistisch nicht signifikant ($p = 0,57$, siehe Abbildung 18 rechts). In der PD-L1-positiven Gruppe war die Distanz zwischen CTL und Tumorzelle ebenfalls verringert, mit Abständen von 3,4 μm (CPS 1) und 3,6 μm (CPS 10), wobei die statistische Signifikanz bei beiden Grenzwerten erreicht wurde (siehe Abbildung 18 links und mittig).

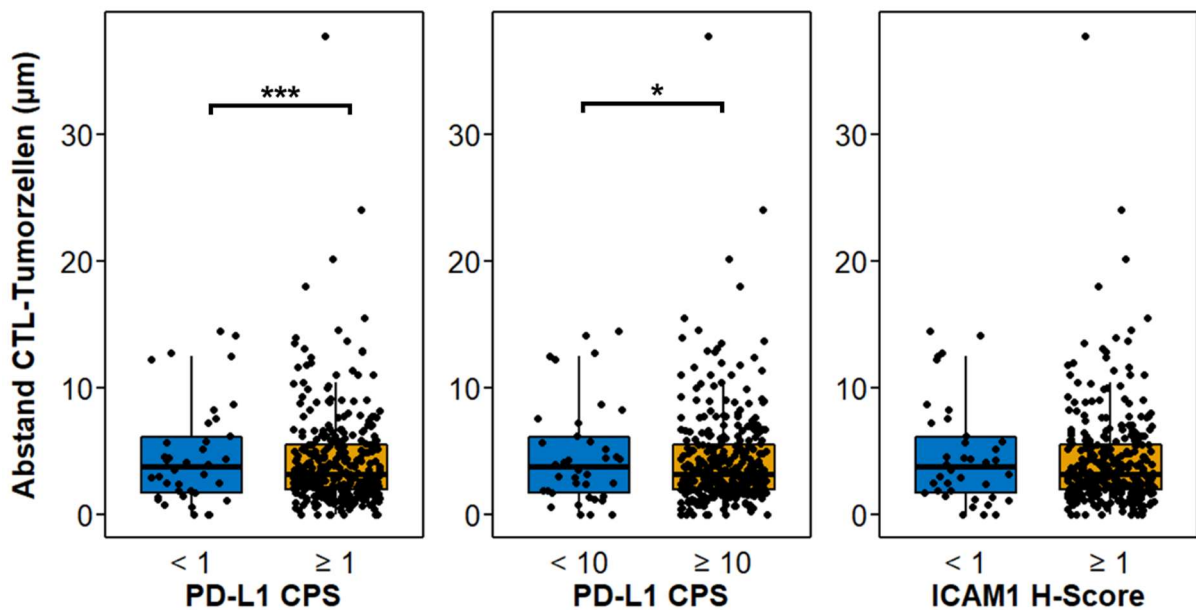


Abbildung 18: Durchschnittlicher Abstand zwischen tumorinfiltrierenden CD8-positiven zytotoxischen T-Lymphozyten und Tumorzellen in Abhängigkeit von der PD-L1-Expression (CPS 1: $n = 249/131$; CPS 10: $n = 316/64$) bzw. von der ICAM1-Expression ($n = 41/332$). *** $p < 0,001$ und * $p < 0,05$ mittels Mann-Whitney-U-Test.

Im nächsten Schritt haben wir uns angeschaut, wie viele benachbarte CTLs im Tumorgewebe, sogenannte CTL-Cluster, in Abhängigkeit von der PD-L1- bzw. ICAM-1-Expression liegen. Die Ergebnisse der statistischen Tests zeigen, dass alle untersuchten Parameter nicht normalverteilt sind, wie der Kolmogorov-Smirnov-Test für alle Vergleiche signifikant belegt. Daher wurde der Mann-Whitney-U-Test zur Analyse der Unterschiede zwischen den Gruppen verwendet.

Die Analyse der Anzahl benachbarter CTLs zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen CPS 1, CPS 10 und ICAM-1 ($p = 0,00000$, $p = 0,00321$ und $p = 0,00040$, siehe Abbildung 19). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Anzahl der CTL-Cluster in allen drei Gruppen unterschiedlich verteilt ist. Besonders auffällig ist die hohe Anzahl an CTL-Cluster in der CPS-1-Gruppe, was auf eine mögliche stärkere Immunantwort in dieser Gruppe hinweisen könnte. Auch in der CPS-10-Gruppe sowie bei ICAM-1 wurden Unterschiede beobachtet, was auf variierende Immunreaktionen oder Tumormikroumgebungen in diesen Gruppen hinweist.

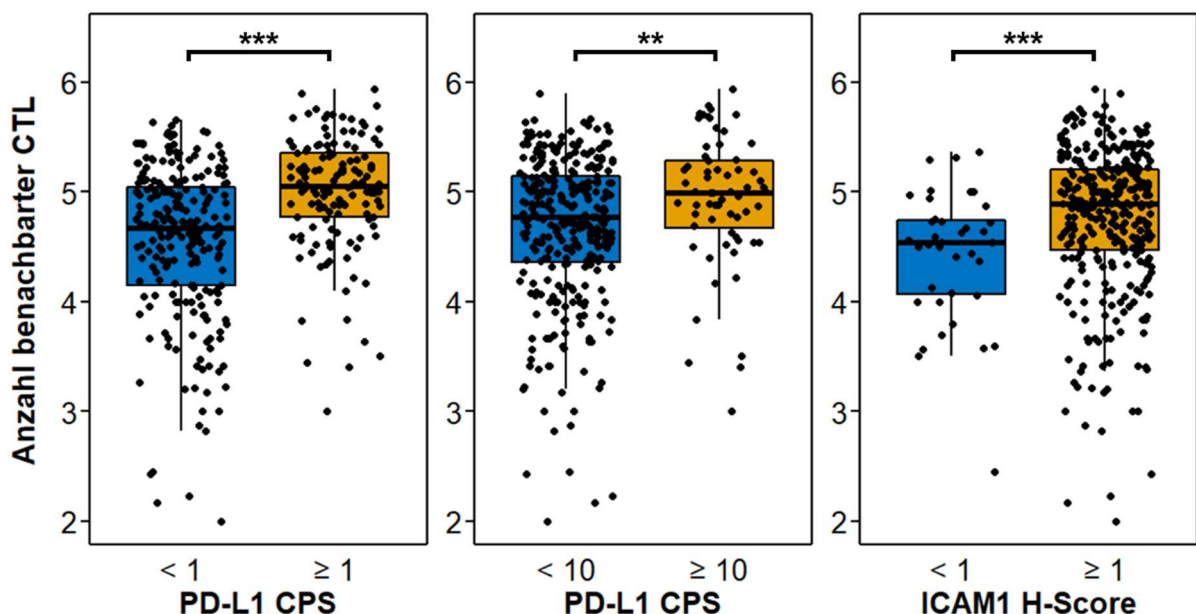


Abbildung 19: Anzahl benachbarter tumorinfiltrierender CD8-positiver zytotoxischer T-Lymphozyten (Cluster-Größe) in Abhängigkeit von der PD-L1-Expression (CPS 1: $n = 249/131$; CPS 10: $n = 316/64$) bzw. von der ICAM-1-Expression ($n = 41/332$). *** $p < 0,001$ und ** $p < 0,01$ mittels Mann-Whitney-U-Test.

4.5 Uni- und multivariate Analyse

Im Rahmen der univariaten Cox-Regression wurde der Einfluss der erfassten klinisch-pathologischen und immunhistochemischen Faktoren auf das krankheitsbezogene Überleben untersucht (siehe Tabelle 7). Dabei zeigte sich, dass ein Alter über 60 Jahre mit einer signifikant schlechteren Prognose assoziiert war (HR 1,81). Ebenso wiesen Patienten mit einem positiven Nodalstatus (pN+) im Vergleich zu pN0-Patienten eine signifikant schlechtere Prognose auf (HR 2,24). Auch ein fortgeschrittenes T-Stadium (pT3/4) war mit einem signifikant erhöhten Mortalitätsrisiko assoziiert (HR 2,08). Bezüglich der PD-L1-Expression zeigte sich, dass Patienten mit einem CPS ≥ 1 eine tendenziell günstigere Prognose aufwiesen (HR 0,72), während sich für die dichotome Trennung bei CPS ≥ 10 kein signifikanter Einfluss auf das Überleben ergab ($p = 0,3590$). Der ICAM-1-H-Score sowie das gleichzeitige Vorliegen eines Prostata-(Zweit-)Karzinoms zeigten in der univariaten Analyse keinen signifikanten Einfluss auf das krankheitsbezogene Überleben ($p = 0,1957$ bzw. $p = 0,7811$).

Tabelle 7: Ergebnisse der univariaten Cox-Regression zur Untersuchung prognostischer Faktoren im Patientenkollektiv. Gezeigt werden die Hazard Ratio (HR), die 95%-Konfidenzintervalle (KI) sowie die p-Werte für jeden untersuchten Faktor.

Faktor		HR	KI niedrig	KI hoch	p
Alter	<60 vs. >60 Jahre	1.81	1.27	2.58	0.0010
Prostat-Ca	ja vs. Nein	0.96	0.71	1.29	0.7811
Nodalstatus	pN0 vs pN+	2.24	1.69	2.95	0.0000
T-Stadium	pT 1/2 vs. pT3/4	2.08	1.52	2.84	0.0000
PD-L1 CPS	<1 vs. ≥ 1	0.72	0.55	0.95	0.0216
PD-L1 CPS	<10 vs. ≥ 10	0.84	0.58	1.21	0.3590
ICAM1 H-Score	<1 vs. ≥ 1	0.77	0.52	1.14	0.1957
CD8 Dichte	niedrig vs. hoch	0.56	0.4	0.79	0.0008
CD8 Abstand Tumor	niedrig vs. hoch	1.4	1.03	1.91	0.0331
CD8 Anzahl Nachbarzellen	niedrig vs. hoch	0.53	0.38	0.76	0.0004

Hinsichtlich der Menge und Verteilung tumorinfiltrierender CTL zeigte sich, dass eine niedrige CTL-Dichte im Tumorgewebe mit einem signifikant erhöhten Risiko für ein schlechteres Überleben einherging (HR 0,56), während eine hohe Anzahl direkt benachbarter CTLs, also eine Cluster-Bildung prognostisch günstig war (HR 0,53). Ein geringer Abstand zwischen CTL und Tumorzellen innerhalb des Tumors war ebenfalls mit einem besseren Überleben assoziiert (HR 1,4).

Tabelle 8: Ergebnisse der multivariaten Cox-Regression zur unabhängigen Analyse prognostischer Faktoren im Patientenkollektiv. In das Modell wurden alle in der univariaten Analyse signifikanten Faktoren aufgenommen. Gezeigt werden die Hazard Ratio (HR), die 95%-Konfidenzintervalle (KI) sowie die p-Werte.

Faktor		HR	KI niedrig	KI hoch	p
Alter	<60 vs. >60 Jahre	1.79	1.23	2.6	0.0022
Nodalstatus	pN0 vs pN+	1.67	1.19	2.35	0.0029
T-Stadium	pT1/2 vs. pT3/4	1.89	1.4	2.54	0.0000
PD-L1 CPS	<1 vs. ≥1	0.92	0.66	1.29	0.6310
CD8 Dichte	niedrig vs. hoch	0.78	0.52	1.17	0.2334
CD8 Abstand Tumor	niedrig vs. hoch	1.2	0.87	1.65	0.2713
CD8 Anzahl Nachbarzellen	niedrig vs. hoch	0.67	0.46	0.97	0.0350

In der multivariaten Cox-Regression (Tabelle 8), in der alle in der univariaten Analyse signifikanten Faktoren gemeinsam berücksichtigt wurden, bestätigten sich die folgenden unabhängigen Prognosefaktoren: Ein Alter über 60 Jahre blieb signifikant mit einer ungünstigeren Prognose assoziiert (HR 1,79). Auch der positive Nodalstatus und ein fortgeschrittenes T-Stadium (pT3/4) erwiesen sich als unabhängiger Risikofaktor (HR 1,67 und 1,89). Interessanterweise verlor die CTL-Dichte und der Abstand zwischen CTL und Tumorzellen im multivariaten Modell ihre Signifikanz, während die Anzahl benachbarter CTL weiterhin eine prognostisch günstige Rolle spielte (HR 0,67). Die PD-L1-Expression (CPS ≥ 1) zeigte in der multivariaten Analyse keinen signifikanten Einfluss mehr (p = 0,6310).

4.6 Beschreibung der Therapiekohorte

Das mit Immuncheckpoint-Inhibitoren behandelte Kollektiv setzt sich aus insgesamt 38 Patienten zusammen. Die wichtigsten demografischen sowie krankheits- und therapiebezogenen Merkmale sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Der Altersmedian liegt bei 66 Jahren. 28 der eingeschlossenen Patienten sind männlich und 10 weiblich. Die meisten der Patienten (25) erhielten eine Behandlung mit Pembrolizumab, 9 bekamen Nivolumab und 4 Atezolizumab. Diese Behandlung erhielten sie als Zweitlinientherapie im Median 247 Tage nach einer Operation.

Tabelle 9: Auflistung der wichtigsten Kollektivdaten (Diagnosealter, Geschlecht, Lokalisation des Tumors, Gewebeart, angewandter Immuncheckpoint-Inhibitor, Latenzzeit bis zur Anwendung und die Ansprechraten).

		n	(%)
Patienten gesamt		38	100
Alter bei OP (Jahre)	Mittelwert	67	
	Median	66	
	Min	50	
	Max	80	
Geschlecht	Männer	28	74
	Frauen	10	26
Lokalisation Tumor	Harnblase	33	87
	Niere	5	13
Gewebe Tumor	Primus	30	79
	Metastase	8	21
ICI	Pembrolizumab	25	65
	Nivolumab	9	24
	Atezolizumab	4	11
Abstand OP/ICI (Tage)	Median	247	
	Min	6	
	Max	1195	
BOR	CR	3	8
	PR	9	23
	SD	4	11
	PD	22	58
TMN	Tx	5	13
	T1	0	0
	T2	6	16
	T3	18	47
	T4	9	24
	Nx	14	36
	N0	8	21
	N1	4	11
	N2	8	21
	N3	4	11

	Mx	17	45
	M0	5	13
	M1	16	42
Differenzierung	Gx	6	16
	G1	0	0
	G2	8	21
	G3	24	63
	G4	0	0
Lymphangiosis carcinomatosa	Lx	22	57
	L0	4	11
	L1	12	32
Gefäßinvasion	Vx	21	55
	V0	12	32
	V1	5	13
Perineurale Invasion	Pnx	26	68
	Pn0	5	13
	Pn1	7	19
Resttumor	Rx	13	34
	R0	22	58
	R1	3	8
	R2	0	0

4.7 Kaplan-Meier-Analysen der Therapiekohorte

Wir führten Kaplan-Meier-Analysen durch, um das Überleben nach Beginn der Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren zu untersuchen. Die Analyse zeigte, dass die Gruppe mit Krankheitsprogression nach einem Jahr das schlechteste mediane Überleben aufwies, während Patienten mit Krankheitsstillstand ein medianes Überleben von 2,5 Jahren erreichten (HR 0,06, [95 % KI: 0,01 - 0,42], $p = 0,005$). Patienten mit komplettem oder partiellem Therapieansprechen erreichten innerhalb der fünfjährigen Beobachtungszeit kein medianes Überleben (Abbildung 20 links). Im Anschluss kategorisierten wir die Patienten in zwei Gruppen: Responder (komplettes und partielles Therapieansprechen) und Non-Responder (Krankheitsstillstand und Krankheitsprogression), um das Überleben zu vergleichen (Abbildung 20, rechts). Dabei zeigten die Responder einen signifikanten Überlebensvorteil im Vergleich zu den Non-Respondern. Das mediane Überleben der Non-Responder änderte sich jedoch im Vergleich zu den Überlebensanalysen der einzelnen Therapieansprechgruppen nicht.

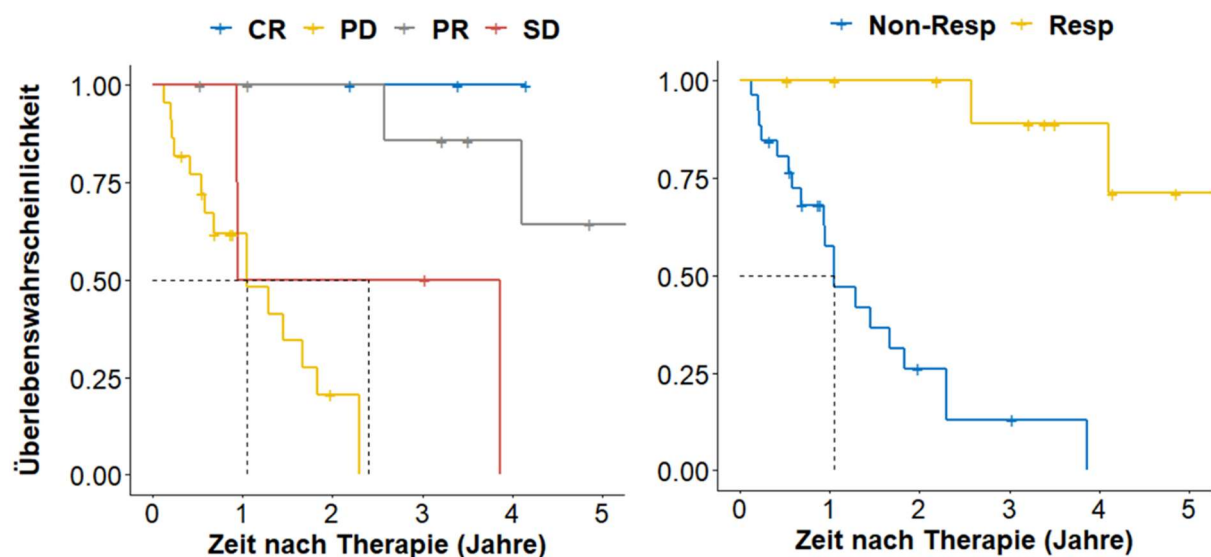


Abbildung 20: Überleben nach Beginn der Immuntherapie in Abhängigkeit von der Best Objective Response (BOR) und nach Kategorisierung in Responder (CR und PR) vs. Non-Responder (SD und PD). Das Ansprechen auf die Immuntherapie war mit einem signifikant verbesserten Überleben assoziiert (HR 0,06 (95 % CI: 0,01 – 0,42), $p = 0,005$).

Um den Einfluss von ICAM-1 auf die ICI-Therapie zu untersuchen, haben wir Patienten aus der unbehandelten Kohorte nach Alter und ICAM-1-Expression gematcht und eine Kontrollkohorte gebildet. Wie in der univariaten Analyse bestätigt, ist das Alter ein wichtiger Prognosefaktor, der das Outcome signifikant beeinflussen und zu statistischen Verzerrungen führen kann. Daher war es entscheidend, den Einfluss des Alters in der Analyse zu neutralisieren.

Darauf aufbauend verglichen wir die ICI-behandelten Patienten mit der gematchten Kontrollgruppe, die keine ICI-Therapie erhalten hatte (vgl. Abbildung 21). In der Kontrollkohorte gab es keinen signifikanten Unterschied in der Überlebenszeit zwischen ICAM-1-positiven und -negativen Patienten (4,1 Jahre vs. 4,2 Jahre, $p = 0,62$, KI [0,31-2,04]). In der ICI-behandelten Kohorte jedoch überlebten die ICAM-1-positiven Patienten im Median 3,4 Jahre länger als die ICAM-1-negativen Patienten (5,5 Jahre vs. 2,1 Jahre, 95%-KI [0,07-0,60], $p = 0,0014$). Die Hazard Ratio von 0,2053 zeigt, dass das Letalitätsrisiko der ICAM-1-negativen Patienten unter ICI-Therapie um 20,53 % erhöht ist. Somit hat die ICAM-1-Expression während einer ICI-Therapie einen signifikanten Überlebensvorteil.

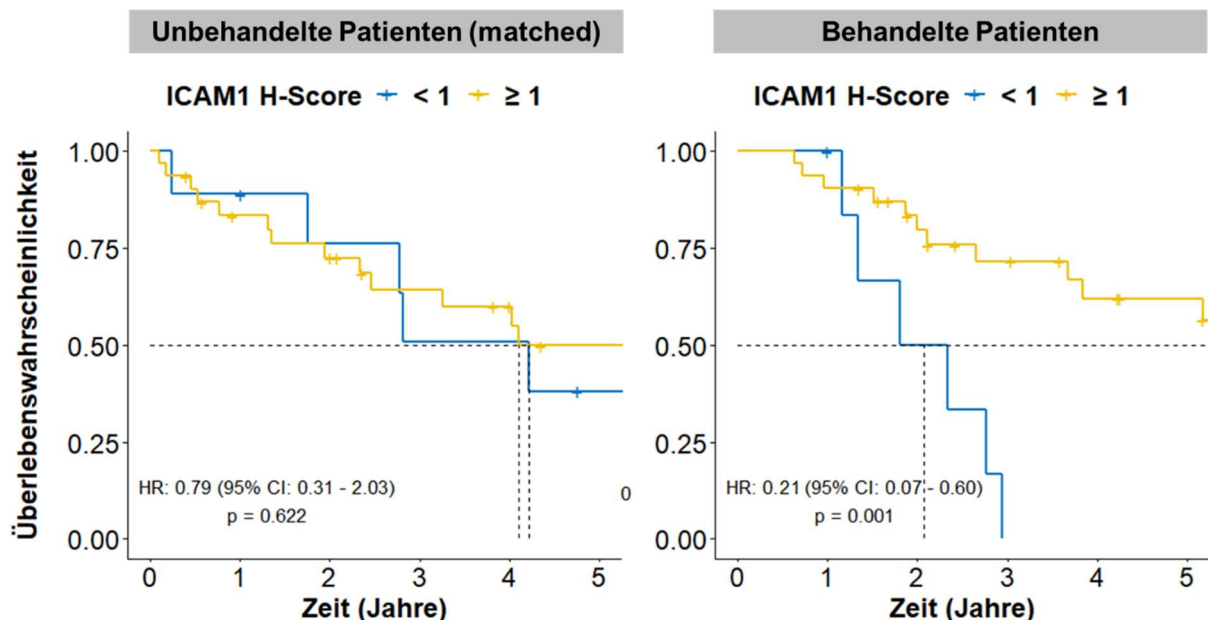


Abbildung 21: Überlebenszeit unbehandelter (matched) und behandelter Patienten in Abhängigkeit von der ICAM1 Expression. Gestrichelte Linie: medianes Überleben. Statistischer Test: Log-Rank-Test.

4.8 Vergleich der Prädiktionsmarker von ICAM-1 und PD-L1

In der untersuchten Kohorte von Patienten mit fortgeschrittenem Urothelkarzinom, die eine Behandlung mit Immuncheckpoint-Inhibitoren erhalten haben, zeigte sich eine 100%ige Sensitivität von ICAM-1 für das Ansprechen auf die Therapie (Abbildung 22). Dies bedeutet, dass alle Patienten mit Ansprechen (Responder) ICAM1-positiv waren. Allerdings fiel die Spezifität mit 27% sehr gering aus, da ein großer Anteil der Non-Responder ebenfalls ICAM1-positiv war. Der Positiv Prädiktive Wert (PPV) lag bei 39 %, was bedeutet, dass nur etwa ein Drittel der ICAM1-positiven Patienten tatsächlich ein Ansprechen zeigte. Interessanterweise betrug der negativ prädiktive Wert (NPV) 100 %, sodass kein ICAM1-negativer Patient auf die Therapie ansprach.

	Non-Responder	Responder	Summe
ICAM1 negativ	7	0	7
ICAM1 positiv	19	12	31
Summe	26	12	38

Abbildung 22: Vierfeldertafel zur Analyse des Biomarkers ICAM1 in Bezug auf das Ansprechen auf die ICI-Therapie (Responder vs. Non-Responder).

Bei einer analogen Untersuchung der Präzisionsmarker für den Biomarker PD-L1 (CPS 1) ergab sich eine Sensitivität von 75 % für das Therapieansprechen, während die Spezifität bei 50 % lag (Abbildung 23). Der PPV betrug 40,9 %, sodass etwa 41 % der PD-L1-positiven Patienten ein Ansprechen zeigten. Der NPV lag bei 81,3 %, was bedeutet, dass die Mehrheit der PD-L1-negativen Patienten nicht auf die Therapie ansprach.

	Non-Responder	Responder	Summe
PD-L1 negativ	13	3	16
PD-L1 positiv	13	9	22
Summe	26	12	38

Abbildung 23: Vierfeldertafel zur Analyse des Biomarkers PD-L1 (CPS 1) in Bezug auf das Ansprechen auf die ICI-Therapie (Responder vs. Non-Responder).

Für beide Biomarker ist der exakte Test nach Fisher nicht signifikant (ICAM-1: 0,0745, PD-L1: 0,178). Werden die beiden Biomarker direkt miteinander verglichen, so zeigt sich, dass beide Biomarker einen vergleichbar niedrigen positiven prädiktiven Wert aufweisen, was bedeutet, dass eine Biomarker-Positivität allein keine sichere Aussage über das Therapieansprechen erlaubt. Hinsichtlich des negativen prädiktiven Wertes schnitt ICAM-1 jedoch deutlich besser ab (100 % vs. 81,3 %), was darauf hindeutet, dass eine ICAM-1-Expression in dieser Kohorte als ein sehr sensibler Ausschlussmarker fungierte.

5. Diskussion

5.1 Limitationen der Patientenkollektive

Das erste Kollektiv (Entdeckungskohorte) wurde aus Archivdaten von 1994 bis 2003 initial zur Erforschung simultaner Harnblasen- und Prostatakarzinome zusammengestellt, was bedeutet, dass die Ergebnisse ausschließlich auf männlichen Patienten basieren. Ein Einschlusskriterium war das Erreichen mindestens des T-Stadiums der Muskelinvasivität ($T \geq 2a$), was darauf hinweist, dass die Untersuchungen ausschließlich auf fortgeschrittenes Harnblasenkarzinom abzielen. Es ist wichtig anzumerken, dass sowohl die Vorgeschichte von Vorerkrankungen und Komorbiditäten als auch vorangegangene Therapien für dieses Kollektiv unbekannt sind. Potenzielle Einflüsse dieser Faktoren auf die retrograden Überlebenszeitanalysen konnten daher nicht untersucht werden.

Das durchschnittliche Alter der Patienten ist mit 68,1 Jahren typisch, da Blasenkrebs häufiger bei älteren Menschen auftritt (125).

Obwohl in der Literatur der überwiegende Teil der von fortgeschrittenem Harnblasenkarzinom Betroffenen männlich ist (im Verhältnis 4:1) (2), entspricht das Kollektiv nicht vollständig dem Bevölkerungsquerschnitt. Es ist zu beachten, dass der untersuchte Zeitraum vor dem Zeitpunkt lag, zu dem Immuncheckpoint-Inhibition als Therapieoption verfügbar wurde. Daher war dieses Kollektiv primär nicht geeignet, die Fragestellung der Arbeit zu untersuchen, als vielmehr die Inzidenz, Verteilung und die prognostischen Eigenschaften der untersuchten Marker in einer größeren Stichprobengröße ($n = 385$) zu untersuchen.

Des Weiteren handelt es sich um eine retrospektive Untersuchung, ein Ansatz, der per se mit unterschiedlichen Nachteilen verbunden ist. Zum einen stehen lediglich archivalische Proben zur Verfügung, deren Qualität und Lagerungsbedingungen variieren. Zudem wurden die klinischen Daten nicht standardisiert erhoben. Dies kann prinzipiell die Vergleichbarkeit und Aussagekraft der Ergebnisse einschränken. Auch besteht das Risiko von Selektionsbias, da die Kohorte durch bereits bekannte Krankheitsverläufe beeinflusst sein kann. Insgesamt limitiert dies die Möglichkeit, belastbare prädiktive oder prognostische Aussagen abzuleiten.

Das zweite Kollektiv (Therapiekohorte) weist eine vergleichsweise kleine Stichprobe von $n = 38$ auf. Alle Patientinnen und Patienten dieser Kohorte erhielten eine leitliniengerechte Behandlung mit Immuncheckpoint-Inhibitoren (65 %

Pembrolizumab, 24 % Nivolumab und 11 % Atezolizumab), deren Therapieerfolg im Verlauf der Nachsorge bewertet wurde. Die Einschlusskriterien erlaubten eine Geschlechterunabhängigkeit, was zu einer realistischeren Geschlechterverteilung im Vergleich zum ersten Kollektiv führte. Aufgrund der begrenzten Stichprobenanzahl wurde bei der Medikamentenauswahl keine Differenzierung vorgenommen. Die erzielten Ergebnisse sollten im Anschluss an die Datenerhebung einer größeren Population zur Validierung unterzogen werden, um die Gütekriterien der statistischen Tests zu verbessern. Dieser Schritt ist von Bedeutung, um die Robustheit der Ergebnisse zu gewährleisten und eine verlässliche Beurteilung der Wirksamkeit von Immuncheckpoint-Inhibitoren bei Patienten mit fortgeschrittenem Harnblasenkarzinom zu ermöglichen.

5.2 Expressionsverteilung und Wahl der Grenzwerte von PD-L1 und ICAM-1

Die Untersuchung der Verteilung von PD-L1 und ICAM-1 hat gezeigt, dass die Expression dieser Oberflächenmarker nicht miteinander korreliert. Diese Unabhängigkeit bietet eine solide Grundlage, um die individuellen Einflüsse der Biomarker in weiteren Analysen zu prüfen. Diese Studie untersucht nach unserem Wissen zum ersten Mal den Zusammenhang dieser Biomarker im Harnblasenkarzinom.

Eine Expression von ICAM-1 auf Tumorzellen wurde mit 89 % in einem Großteil der Patienten beobachtet. Im Gegensatz dazu ist die Rate PD-L1-positiver Tumore geringer, wobei bei einem CPS (Combined Positive Score) von ≥ 1 etwa ein Drittel der Patienten (38 %) zur positiven Kohorte zählt, während 62 % negativ sind. Eine Erhöhung des CPS-Schwellenwerts auf ≥ 10 führt zu einer Zunahme der negativen Kohorte auf 82 %, während nur noch 18 % der Patienten als positiv eingestuft werden.

Die Wahl eines passenden Grenzwertes stellt immer eine Herausforderung für die Bewertung eines Biomarkers dar. Dies gilt insbesondere für neue Biomarker wie ICAM-1, für den im hier untersuchten Kontext bislang keine validierten Grenzwerte beschrieben wurden. Wir haben die Quantifizierung der ICAM-1-Expression mit zwei Ansätzen durchgeführt: (i) mit der automatisierten Bestimmung des H-Scores und (ii) mit der visuellen, semiquantitativen Bestimmung des TPS. Der Vorteil des H-Score ist, dass die Intensität der Färbung berücksichtigt wird und eine feinere Graduierung

möglich ist (Werte von 0 – 300). Dies kann zu einer besseren Diskriminierung bei schwacher Expression führen und ist nützlicher bei einem heterogenen Expressionsmuster. Ein Nachteil ist, dass die visuelle Bestimmung des H-Scores zeitaufwendiger und weniger intuitiv ist. Wir haben die ICAM-1-Expression daher zusätzlich mit dem klinisch etablierten TPS bestimmt, der nur die Anzahl positiver Zellen, aber nicht deren Intensität berücksichtigt. Dieser Ansatz könnte jedoch viel einfacher in die Arbeitsabläufe eines pathologischen Instituts integriert werden als die automatisierte Bestimmung des H-Scores. Ein wesentlicher Nachteil des TPS ist, wie bei allen visuellen Scoring-Ansätzen, die Interobservervariabilität. Interessanterweise ergab die Korrelationsanalyse eine sehr gute Übereinstimmung der beiden Verfahren (siehe Abbildung 24 im Anhang; unbehandelte Kohorte $r = 0,8$; behandelte Kohorte $r = 0,87$). In potenziellen zukünftigen Studien zur Rolle der ICAM-1-Expression kann daher auf den einfacheren TPS zurückgegriffen werden.

Für die Expression von ICAM-1 haben wir einen niedrigen Schwellenwert von H-Score ≥ 1 gewählt und auf diese Weise eine Binarisierung in negativ und positiv (unabhängig von der Anzahl positiver Zellen und von der Färbeintensität) vorgenommen. Diese Entscheidung wurde auf der Basis mehrerer Überlegungen getroffen. Zunächst ist nicht bekannt, welche Expression von ICAM-1, also im weitesten Sinne welche Anzahl von ICAM-1-Molekülen auf der Tumorzelloberfläche tatsächlich für die Ausbildung der immunologischen Synapse erforderlich ist. Bereits eine geringe Expression könnte funktionell relevant und daher prädiktiv für das Ansprechen auf ICI sein. Ein weiteres Argument für einen niedrigen Schwellenwert ist das explorative Setting der Studie: Auf diese Weise kann eine maximale Sensitivität bei noch unbekannter biologischer und klinischer Relevanz erreicht werden. Die Analyse bleibt auf diese Weise breit gefasst und kann in weiteren Studien einfacher reproduziert werden. Subgruppenanalysen können retrospektiv angewendet werden, um zu prüfen, ob höhere Schwellenwerte eine zusätzliche Differenzierung erlauben.

Die Ausgangssituation für den Biomarker PD-L1 unterscheidet sich deutlich von der für ICAM-1. Für die Immuncheckpoint-Therapie des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms existieren bereits mehrere etablierte, regulatorisch verankerte PD-L1-abhängige Anwendungsszenarien. Die Scores und Grenzwerte variieren dabei je nach Medikament. In der Erstlinientherapie können Atezolizumab ab einem IC $\geq 5\%$ und Pembrolizumab ab einem CPS $\geq 10\%$ angewandt werden (61, 62). Adjuvant gibt es die Möglichkeit, Nivolumab ab einem TPS $\geq 1\%$ einzusetzen (69).

Die Wahl des Grenzwertes $\text{CPS} \geq 10$ in unserer Studie erfolgte aufgrund der Tatsache, dass die meisten der Patienten (65 %) in der Therapiekohorte mit Pembrolizumab behandelt wurden. So ließ sich eine klinisch relevante Abgrenzung zwischen positiven und negativen Fällen herstellen, die regulatorisch nachvollziehbar und mit der klinischen Praxis verknüpft ist. In unserem Kollektiv zeigte sich jedoch, dass einige Analysen mit diesem Grenzwert ihre statistische Signifikanz verloren (z. B. die Distanz der CTLs zu Tumorzellen oder Überlebenszeitanalysen der PD-L1-Expression). Mehrere Studien weisen darauf hin, dass auch Patienten mit einer niedrigeren Expression durchaus von einer ICI-Therapie profitieren können, wenn auch weniger ausgeprägt als bei hoher Expression (126, 127). Aus diesem Grund haben wir zusätzlich alle Analysen mit einem $\text{CPS} \geq 1$ durchgeführt. Interessanterweise wurden dadurch mehr signifikante Zusammenhänge sichtbar, was die Hypothese stützt, dass bereits eine geringe PD-L1-Expression prognostische und prädiktive Relevanz besitzen kann. Ein höherer Grenzwert wie $\text{CPS} \geq 10$ birgt hingegen das Risiko, Patienten fälschlicherweise als negativ einzustufen und ihnen damit eine potenziell wirksame Therapie vorzuenthalten. Unsere Ergebnisse unterstreichen somit die Bedeutung einer sorgfältigen Wahl und Validierung des Cut-offs. Am Beispiel von PD-L1 wird deutlich, dass eine niedrigere Schwelle die Sensitivität erhöhen und verhindern kann, dass relevante Patientenkollektive ausgeschlossen werden.

5.3 Überlebenszeitanalysen

PD-L1

In unseren Analysen lebten PD-L1-positive Patienten mit einem $\text{CPS} \geq 1$ im Durchschnitt 1,7 Jahre länger als PD-L1-negative Patienten. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zur aktuellen Studienlage, die eine kräftige PD-L1-Expression im Harnblasenkarzinom insgesamt mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert (128, 129). Zum Beispiel wies Nakanishi et al. ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben bei Patienten mit hohem PD-L1-Gehalt im Vergleich zu denen mit niedrigem PD-L1-Gehalt nach (5-Jahres-Überleben: 55 % vs. 100 %) (128). Diese Studie umfasste insgesamt 65 Patienten, was deutlich weniger ist als die 347 Patienten in unserer Analyse. Es ist jedoch wichtig zu beachten, dass die oben genannten Studien nicht zwischen nicht-muskelinvasivem Harnblasenkarzinom (NMIBC) und muskelinvasivem Harnblasenkarzinom (MIBC) unterscheiden. Das NMIBC macht den Großteil der Fälle aus (75 %), während nur etwa ein Viertel (25 %)

bei der Diagnose muskelinvasiv ist (3). Ein möglicher Einflussfaktor könnte sein, dass die erhöhte PD-L1-Expression auch im NMIBC als ein Mechanismus zur Immunflucht genutzt wird (130). Patienten mit einem NMIBC und PD-L1-Überexpression könnten daher anfälliger für Rezidive oder Krankheitsprogression sein.

Die in unserer Arbeit durchgeführten Analysen wurden ausschließlich für MIBC durchgeführt. Im muskelinvasiven Stadium scheint eine erhöhte PD-L1-Expression für einen CPS ≥ 1 ein prognostisch günstiger Faktor zu sein. Dieser Zusammenhang wird auch in einer umfangreichen Analyse (n = 785) des Tumor-Immun-Mikromilieus im Harnblasenkarzinom beschrieben. Die Autoren zeigen hier einen negativen prognostischen Effekt von PD-L1 im NMIBC und im Gegensatz dazu einen positiven prognostischen Effekt im MIBC (131). In unserer Studie kann der positive prognostische Wert für die PD-L1-Expression nicht mehr nachgewiesen werden, wenn der Cutoff-Wert CPS ≥ 10 angewendet wird. Die zugrundeliegenden tumorbiologischen Zusammenhänge für die unterschiedlichen prognostischen Effekte der PD-L1-Expression sind bislang unbekannt. Deren weitere Erforschung wird jedoch sicherlich durch die große Variabilität in der Bestimmung der PD-L1-Expression (z. B. unterschiedliche Antikörper, unterschiedliche Färbepattformen, Interobserver-Variabilität) erschwert.

ICAM-1

Bei Patienten mit Harnblasenkarzinom und hoher ICAM-1-Expression wurde ein um 0,7 Jahre längeres Medianüberleben beobachtet im Vergleich zu Patienten ohne Expression. Zusammenfassend zeigt die Analyse jedoch keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der ICAM-1-Expression (positiv vs. negativ) und dem Überleben nach der Operation (p-Wert 0,19; 95%-KI [0,52-1,14]).

In anderen Tumorentitäten wie dem Kolorektalkarzinom, Magenkarzinom und malignen Melanom wurde ICAM-1 sowohl als prognostisch günstiger als auch als ungünstiger Faktor beschrieben (112-118). Sogar innerhalb derselben Entität, wie dem Mammakarzinom, sind die Ergebnisse sehr variabel (119-121). Dies deutet darauf hin, dass die Funktionen und die Koordination der einzelnen Pathways von ICAM-1 noch nicht vollständig verstanden sind und weiterer wissenschaftlicher Aufklärung bedürfen.

Bisher lagen für das Harnblasenkarzinom keine Untersuchungen zum Einfluss der ICAM-1-Expression auf das Gesamtüberleben vor. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte kein Hinweis auf eine prognostische Relevanz der ICAM-1-Expression in

Tumorzellen gefunden werden. Die Aussagekraft der Ergebnisse ist jedoch durch die Limitationen des untersuchten Kollektivs mit lediglich 342 Patienten eingeschränkt. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten daher prinzipiell auf eine geringe Effektgröße oder auf andere nicht erfasste Variablen hinweisen, die das Überleben beeinflussen. Weitere Studien zum prognostischen Einfluss von ICAM-1 beim Harnblasenkarzinom sind daher erforderlich, liegen jedoch außerhalb des Rahmens dieser Untersuchung.

Zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs)

Zusammenfassend zeigen die Überlebenszeitanalysen sowohl für eine hohe Dichte der tumorinfiltrierenden CTLs als auch für einen geringen Abstand zwischen CTLs und Tumorzellen einen statistisch signifikanten Überlebensvorteil. Dies könnte das Resultat einer verbesserten antitumoralen adaptiven Immunreaktion sein und stimmt auch mit der Literatur überein. Bereits Fridmann et al. zeigten eine bessere Prognose bei Harnblasenkarzinomen und anderen Tumoren mit einer höheren CTL-Dichte im Tumorgewebe (132). Eine hohe Dichte CTLs im Harnblasenkarzinom könnte prognostisch günstig sein, da CTLs eine zentrale Rolle in der Immunüberwachung und der Tumorabwehr spielen. Diese Zellen erkennen und zerstören Tumorzellen durch die Freisetzung von Perforin und Granzyme, was zu einer direkten Tumorzelllyse führt (133). Darüber hinaus produzieren CTLs proinflammatorische Zytokine wie IFN- γ , die die Expression tumorantigener Strukturen verstärken und die Präsentation durch antigenpräsentierende Zellen verbessern (134). Eine hohe CTL-Dichte kann zudem ein Hinweis auf eine „heiße“ Tumormikroumgebung sein, die für Immuncheckpoint-Inhibitoren empfänglicher ist und mit einer besseren Ansprechrate auf immuntherapeutische Ansätze assoziiert wird.

5.4 Die CTL-Infiltration und Verteilung

Die räumliche Nähe zwischen CTL und Tumorzellen spielt eine entscheidende Rolle für die Effektivität der antitumoralen Immunantwort, da nur durch direkten Zell-Zell-Kontakt eine gezielte Zerstörung von Tumorzellen durch lytische Granula (z. B. Perforin, Granzym) erfolgen kann (135). Eine geringe Distanz zwischen CTL und Tumorzellen könnte daher als möglicher Surrogatmarker für eine funktionelle immunologische Synapse verstanden werden. Daher analysierten wir zusätzlich zur Dichte auch die räumliche Verteilung der CTL im Tumorgewebe. Sowohl für ICAM-1 als auch für PD-L1 (CPS ≥ 1 und ≥ 10) kommen in den als positiv klassifizierten

Patienten signifikant mehr intratumorale CTL als in den negativen vor. Dies ist prinzipiell eine gute Voraussetzung für die Immuncheckpoint-Therapie, da die Effektorzellen der adaptiven Immunantwort bereits im Tumorgewebe vorhanden sind und dort unter anderem durch die Immuncheckpoints PD-1/PD-L1 gehemmt werden. Die stärkere PD-L1-Expression in immunologisch „heißen“ Tumoren ist Ausdruck der immunologischen Immunresistenz. Aktivierte CTL bewirken hierbei über die Freisetzung von Interferon- γ die PD-L1-Expression auf Tumorzellen. Über einen vergleichbaren Mechanismus kommt es auch zu einer entzündungsabhängigen Hochregulation von ICAM-1 auf den Tumorzellen (136).

Die Analysen der Distanz zwischen den Effektorzellen der adaptiven Immunreaktion und den Tumorzellen ergaben in den PD-L1-positiven Tumoren (CPS ≥ 1 und ≥ 10) erwartungsgemäß einen signifikant geringeren Abstand zwischen Tumorzellen und Immunzellen, was wir als Ausdruck einer aktiven Anti-Tumorimmunität bzw. der Ausbildung einer adaptiven Immunresistenz bewerten würden. Interessanterweise konnten wir diesen Zusammenhang nicht in ICAM-1-positiven Tumoren zeigen, möglicherweise weil die ICAM-1-Expression nicht nur durch Interferon- γ , sondern prinzipiell auch durch eine Vielzahl weiterer Faktoren induziert werden kann (137).

Die Bildung von CTL-Clustern stellt einen weiteren potentiellen Marker für eine effektive Anti-Tumor-Immunität dar. Solche Cluster entstehen, wenn CTL in größerer Zahl lokal zusammenkommen, häufig an Stellen, an denen Tumorantigene exprimiert werden. Dies deutet auf eine gezielte, antigenspezifische Immunantwort hin. Innerhalb dieser Cluster können CTLs effektiver miteinander kommunizieren und höhere Konzentrationen von Zytokinen wie Interferon- γ freisetzen, was wiederum die Rekrutierung weiterer Immunzellen und die Aktivierung zusätzlicher antitumoraler Mechanismen unterstützt. Tatsächlich beobachteten wir in der dieser Arbeit eine signifikant gesteigerte CTL-Clusterbildung sowohl in PD-L1-positiven (CPS ≥ 1 und ≥ 10) als auch in ICAM-1-positiven Tumoren. Dieser Befund unterstützt weiter den Zusammenhang zwischen einer bestehenden adaptiven Anti-Tumorantwort und der Expression von PD-L1 bzw. ICAM-1 und spricht somit für einen potentiellen prädiktiven Wert dieser Marker für eine erfolgreiche Immuncheckpoint-Therapie.

Allerdings muss einschränkend erwähnt werden, dass sowohl eine geringe Distanz zwischen CTLs und Tumorzellen als auch die Bildung von CTL-Clustern allein keine Garantie für eine funktionelle antitumorale Immunantwort darstellen. CTLs können trotz räumlicher Nähe funktionell erschöpft oder durch immunsuppressive Mechanismen in ihrer Wirkung eingeschränkt sein. Zudem können Moleküle wie

ICAM-1 neben immunstimulierenden auch tumorfördernde Funktionen übernehmen, beispielsweise durch Förderung der Zellmigration oder Metastasierung.

5.5 Multivariate Analyse

Die klinisch-pathologischen und immunhistochemischen Faktoren wurden zudem in einer multivariaten Analyse berücksichtigt, um ihre unabhängige prognostische Bedeutung für das Überleben der Patienten mit muskelinvasivem Harnblasenkarzinom zu überprüfen. Hierbei bestätigten sich einige der in der univariaten Analyse identifizierten Prognosefaktoren, während andere ihre Signifikanz verloren (vgl. Kapitel 4.5).

Das Ergebnis, dass ein höheres Alter mit einer schlechteren Prognose einhergeht (HR 1,79), ist im Einklang mit früheren Studien, die gezeigt haben, dass ältere Patienten tendenziell schlechtere Überlebensraten aufweisen. Dies könnte auf altersbedingte Veränderungen des Immunsystems, eine verminderte Resilienz gegenüber Therapien oder eine kumulierte Belastung durch Komorbidität hinweisen (138). Das erhöhte Mortalitätsrisiko bei älteren Patienten unterstreicht die Notwendigkeit einer intensiveren Überwachung und möglicherweise angepasster Therapieansätze für diese Patientengruppe.

Der positive Lymphknotenstatus (pN+) war ebenfalls mit einer schlechteren Prognose assoziiert (HR 1,67). Dies entspricht den Ergebnissen zahlreicher Studien, die den Nodalstatus als einen der wichtigsten prognostischen Marker in vielen Tumorerkrankungen identifiziert haben (139, 140). Ein positiver Lymphknotenstatus deutet auf eine fortgeschrittene Ausbreitung des Tumors hin und ist daher ein wichtiger Hinweis auf eine ungünstigere Prognose. Diese Ergebnisse betonen die Bedeutung einer gründlichen Lymphknotenbeurteilung bei der Beurteilung der Prognose.

Auch ein fortgeschrittenes Tumorstadium (pT3/4) stellte sich in der multivariaten Analyse als unabhängiger Prognosefaktor dar und war mit einem erhöhten Risiko für ein schlechteres Überleben verbunden (HR 1,89). Dies entspricht der bekannten onkologischen Erkenntnis, dass ein höheres Tumorstadium in der Regel mit einer ungünstigeren Prognose einhergeht. Tumoren in fortgeschrittenen Stadien zeigen eine höhere Tendenz zur Metastasierung und sprechen häufig schlechter auf therapeutische Maßnahmen an.

Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung einer präzisen, stadiengerechten Klassifikation sowie die Notwendigkeit einer sorgfältigen und intensiven

Therapieplanung für Patienten mit fortgeschrittenem Tumorstadium oder positivem Lymphknotenstatus.

In der univariaten Analyse zeigten eine niedrige CTL-Dichte sowie ein geringer Abstand zwischen CTLs und Tumorzellen einen signifikanten Einfluss auf das Überleben. Im multivariaten Modell verloren jedoch sowohl die CTL-Dichte als auch der Abstand zwischen den CTLs und den Tumorzellen ihre Signifikanz. Diese Beobachtung legt nahe, dass die prognostische Bedeutung dieser immunologischen Parameter nicht unabhängig von anderen, stärkeren klinisch-pathologischen Faktoren ist. Insbesondere Tumorstadium und Nodalstatus stellen etablierte Prognosefaktoren dar, die sowohl das biologische Verhalten des Tumors als auch seine Zusammensetzung maßgeblich beeinflussen können. Ein möglicher Erklärungsansatz besteht darin, dass fortgeschrittene Tumoren oft ein immununterdrückendes Mikromilieu aufweisen, das die Infiltration oder Funktion von CTLs hemmt (141). Somit könnten Tumorstadium und Lymphknotenstatus indirekt auch die immunologische Situation im Tumorgewebe widerspiegeln. In multivariaten Modellen, die diese Faktoren berücksichtigen, könnten immunologische Variablen wie CTL-Dichte oder Zellabstände daher ihre eigenständige prognostische Aussagekraft verlieren, weil ihr Effekt teilweise bereits durch die stärkeren klinischen Variablen erklärt wird. Interessanterweise zeigte sich in der multivariaten Analyse, dass die Anzahl der benachbarten CTLs (CTL-Cluster) weiterhin einen prognostischen Effekt aufweist (HR 0,67). Dieser Befund deutet darauf hin, dass nicht nur die reine Präsenz oder die Nähe einzelner CTLs zu Tumorzellen, sondern vielmehr deren organisierte Anordnung ein relevanter Indikator für eine effektive antitumorale Immunantwort sein könnte. Innerhalb solcher Cluster können CTLs intensiver miteinander interagieren, was möglicherweise eine effizientere Zell-Zell-Kommunikation und eine koordinierte Tumorzellabtötung begünstigen könnte. Zudem könnten Clusterbildung und damit verbundene hohe lokale CTL-Dichten ein Zeichen für eine antigenspezifische Immunreaktion sein, die weniger stark von immununterdrückenden Mechanismen beeinflusst wird und daher auch in Tumoren mit fortgeschrittenem Stadium ihre prognostische Relevanz behält. Somit könnten CTL-Cluster als robusterer immunologischer Marker diskutiert werden, der auch unabhängig von klinisch-pathologischen Parametern prognostische Aussagekraft besitzt. Dies unterstreicht die potenzielle Bedeutung komplexerer immunologischer Metriken, die über einfache quantitative Parameter hinausgehen, für die prognostische

Einschätzung und möglicherweise auch für die Prädiktion des Ansprechens auf Immuntherapien.

5.6 Der Einfluss von ICAM-1 auf die ICI-Therapie

Die beiden Studien IMvigor130 und KEYNOTE-361 zeigten, dass eine gewisse PD-L1-Expression notwendig ist, um die Überlebenszeit von Patientinnen und Patienten mit fortgeschrittenem Urothelkarzinom unter Immuntherapie zu verlängern (59, 60). Nichtsdestotrotz variieren die Ansprechraten der Immuncheckpoint-Inhibitoren sehr stark und liegen im Durchschnitt nur bei ca. 25 % (7). Eine verbesserte Vorhersage, welche Patientinnen und Patienten tatsächlich auf eine Immuntherapie ansprechen, könnte dazu beitragen, die Behandlung gezielter einzusetzen und unnötige Nebenwirkungen sowie Kosten zu vermeiden. Die grundlegende Hypothese dieser Studie war, dass für eine effektive adaptive Anti-Tumorimmunität neben einer Infiltration von Effektorzellen in den Tumor die Expression von ICAM-1 auf Tumorzellen erforderlich ist. Nur durch die Ausbildung der ICAM-1-abhängigen immunologischen Synapse können die tumorinfiltrierenden CTLs tatsächlich Tumorzellen lysieren. Vor diesem Hintergrund könnte ICAM-1 als potenzieller, ergänzender prädiktiver Biomarker dienen, um Patientinnen und Patienten zu identifizieren, die besonders von einer Immuncheckpoint-Therapie profitieren könnten.

Tatsächlich beobachteten wir, dass Patientinnen und Patienten mit ICAM-1-positiven Tumoren unter der Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren einen Überlebensvorteil aufwiesen. Um potenzielle Confounder bei der Analyse des Überlebens zu kontrollieren, haben wir durch Propensity Score Matching aus der Entdeckungskohorte eine virtuelle Kontrollgruppe geschaffen. Auf diese Weise konnten wir den Einfluss von Alter und ICAM-1-Expression berücksichtigen und einen prädiktiven von einem rein prognostischen Effekt der ICAM-1-Expression abgrenzen (vgl. Kapitel 4.7).

Diese Ergebnisse liefern erste Hinweise, die unsere Hypothese stützen, dass ICAM-1 eine relevante Rolle für die Effektivität der adaptiven Anti-Tumorimmunität spielen könnte. Der beobachtete Überlebensvorteil bei ICAM-1-positiven Tumoren spricht dafür, dass ICAM-1 möglicherweise die Interaktion zwischen Tumorzellen und CTLs erleichtert und somit eine effektivere Tumorzell-Lyse ermöglicht. Dies wäre konsistent mit der bekannten Funktion von ICAM-1 als Adhäsionsmolekül, das die Bildung der

immunologischen Synapse zwischen T-Zellen und ihren Zielzellen stabilisiert und die Signalübertragung für die Aktivierung und Effektorfunktion der CTLs unterstützt.

Allerdings ist dieser klinische Befund kein direkter Beweis für die kausale Rolle von ICAM-1 bei der Tumorzell-Lyse. Der beobachtete Überlebensvorteil könnte auch andere Ursachen haben. Beispielsweise könnte die ICAM-1-Expression lediglich ein Surrogatmarker für eine insgesamt entzündlichere Tumormikroumgebung sein, die sowohl die Immunzellinfiltration als auch das Ansprechen auf Immuncheckpoint-Inhibitoren begünstigt. Zudem wird ICAM-1 nicht ausschließlich durch immunologische Faktoren wie Interferon- γ reguliert, sondern kann auch durch andere Einflüsse wie Hypoxie, Wachstumsfaktoren oder mechanischen Stress hochreguliert werden. Diese vielfältigen Regulationsmechanismen erschweren die Interpretation der ICAM-1-Expression als alleinigen funktionellen Marker für eine effektive antitumorale Immunantwort.

5.7 Vergleich des prädiktiven Werts von ICAM-1 und PD-L1

Der positive prädiktive Wert von PD-L1 zeigt sich in unserem untersuchten Kollektiv als signifikanter Indikator für das Ansprechen auf Immuncheckpoint-Therapien. PD-L1-positive Patientinnen und Patienten wiesen eine Ansprechrate von 41 % auf und stachen damit gegenüber den ICAM-1-positiven Fällen hervor, die lediglich eine Ansprechrate von 39 % zeigten. Diese Beobachtung legt nahe, dass PD-L1 ein zuverlässigerer Biomarker für die Vorhersage des Therapieansprechens ist als ICAM-1.

Der negative prädiktive Wert von PD-L1 lag bei 81 %, was darauf hinweist, dass trotz fehlender PD-L1-Expression etwa 19 % der Patientinnen und Patienten in unserem Kollektiv dennoch von einer Immuncheckpoint-Therapie profitierten. Dies deutet darauf hin, dass zusätzliche PD-L1-unabhängige Signalwege an der Regulation der Immunantwort beteiligt sein könnten, was die in aktuellen Leitlinien verankerte PD-L1-unabhängige Zulassung von Immuncheckpoint-Inhibitoren unterstützt (21).

Interessanterweise zeigte ICAM-1 einen negativen prädiktiven Wert von 100 %, was bedeutet, dass alle ICAM-1-negativen Patientinnen und Patienten keinen Nutzen aus der Immuncheckpoint-Inhibition gezogen haben. Allerdings war der exakte Fisher-Test für beide Biomarker aufgrund der geringen Fallzahl von nur 38 Patientinnen und Patienten statistisch nicht signifikant. Der negative prädiktive Wert von ICAM-1 sollte

daher vorläufig nur als Trend interpretiert werden, wenngleich der Befund in seiner Eindeutigkeit bemerkenswert erscheint. Eine Validierung dieser Ergebnisse in größeren Kohorten könnte ICAM-1 als potentiell effektiven Ausschlussmarker etablieren, was helfen könnte, Patientinnen und Patienten unnötige Therapien sowie damit verbundene Nebenwirkungen zu ersparen. Obwohl nur ein kleiner Prozentsatz des Gesamtkollektivs (ca. 11 %) ICAM-1-negativ war, könnte ein solcher Marker dennoch einen wichtigen Beitrag zu einer präziseren, patientenorientierten Therapiestrategie leisten und Überbehandlung vermeiden helfen.

6. Literaturverzeichnis

1. Hofstädter F, Böcker W. Ableitende Harnwege. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU, editors. Pathologie. München: Urban & Fischer; 2001. p. 809-15.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-49.
3. Burger M, Catto JWF, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, et al. Epidemiology and Risk Factors of Urothelial Bladder Cancer. *European Urology*. 2013;63(2):234-41.
4. Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association Between Smoking and Risk of Bladder Cancer Among Men and Women. *JAMA*. 2011;306(7):737-45.
5. Jiang X, Yuan J-M, Skipper PL, Tannenbaum SR, Yu MC. Environmental tobacco smoke and bladder cancer risk in never smokers of Los Angeles County. *Cancer Res*. 2007;67(15):7540-5.
6. Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, Znaor A, Jemal A, Bray F. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. *European Urology*. 2017;71(1):96-108.
7. Fernández MI, López JF, Vivaldi B, Coz F. Long-term impact of arsenic in drinking water on bladder cancer health care and mortality rates 20 years after end of exposure. *The Journal of Urology*. 2012;187(3):856-61.
8. Steinmaus CM, Ferreccio C, Romo JA, Yuan Y, Cortes S, Marshall G, et al. Drinking water arsenic in northern Chile: high cancer risks 40 years after exposure cessation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013;22(4):623-30.
9. Abern MR, Dude AM, Tsivian M, Coogan CL. The characteristics of bladder cancer after radiotherapy for prostate cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2013;31(8):1628-34.
10. Au S, Keyes M, Black P, Villamil CF, Tavassoli P. Clinical and pathological characteristics of bladder cancer in post brachytherapy patients. *Pathology - Research and Practice*. 2020;216(3).

11. MacKenzie T, Zens MS, Ferrara A, Schned A, Karagas MR. Diabetes and risk of bladder cancer: evidence from a case-control study in New England. *Cancer*. 2011;117(7):1552-6.
12. Lewis JD, Ferrara A, Peng T, Hedderson M, Bilker WB, Quesenberry Jr. CP, et al. Risk of bladder cancer among diabetic patients treated with pioglitazone: interim report of a longitudinal cohort study. *Diabetes Care*. 2011;34(4):916-22.
13. Ros MM, Bueno-de-Mesquita HB, Büchner FL, Aben KKH, Kampman E, Egevad L, et al. Fluid intake and the risk of urothelial cell carcinomas in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *International Journal of Cancer*. 2011;128(11):2695-708.
14. Donat SM, Bayuga S, Herr HW, Berwick M. Fluid intake and the risk of tumor recurrence in patients with superficial bladder cancer. *The Journal of Urology*. 2003;170(5):1777-80.
15. Villanueva CM, Silverman DT, Murta-Nascimento C, Malats N, Garcia-Closas M, Castro F, et al. Coffee consumption, genetic susceptibility and bladder cancer risk. *Cancer Causes & Control*. 2009;20(1):121-7.
16. Pelucchi C, Galeone C, Tramacere I, Bagnardi V, Negri E, Islami F, et al. Alcohol drinking and bladder cancer risk: a meta-analysis. *Annals of Oncology*. 2012;23(6):1586-93.
17. Büchner FL, Bueno-de-Mesquita HB, Ros MM, Kampman E, Egevad L, Overvad K, et al. Variety in vegetable and fruit consumption and risk of bladder cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *International Journal of Cancer*. 2011;128(12):2971-9.
18. Hotelling JM, Wright JL, Pocobelli G, Bhatti P, Porter MP, White E. Long-term use of supplemental vitamins and minerals does not reduce the risk of urothelial cell carcinoma of the bladder in the VITamins And Lifestyle study. *J Urol*. 2011;185(4):1210-5.
19. Lotan Y, Goodman PJ, Youssef RF, Svatek RS, Shariat SF, Tangen CM, et al. Evaluation of vitamin E and selenium supplementation for the prevention of bladder cancer in SWOG coordinated SELECT. *J Urol*. 2012;187(6):2005-10.
20. Wittekind C. TNM: Klassifikation maligner Tumoren. 8. ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag; 2020.

21. Deutsche Krebsgesellschaft e.V., Deutsche Krebshilfe, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms (Version 2.0) 2020 [Available from: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/harnblasenkarzinom/>].
22. Richterstetter M, Wullich B, Amann K, Haeberle L, Engehausen DG, Goebell PJ, et al. The value of extended transurethral resection of bladder tumour (TURBT) in the treatment of bladder cancer. *British Journal of Urology International*. 2012;110(2b):76-9.
23. Rhea LP, Mendez-Martí S, Kim D, Aragon-Ching JB. Role of immunotherapy in bladder cancer. *Cancer Treatment and Research Communications*. 2021;26(1).
24. Vianello A, Costantini E, Del Zingaro M, Bini V, Herr HW, Porena M. Repeated white light transurethral resection of the bladder in nonmuscle-invasive urothelial bladder cancers: systematic review and meta-analysis. *Journal of Endourology*. 2011;25(11):1703-12.
25. Gakis G. Instillationstherapie beim Harnblasenkarzinom. In: Merseburger AS, Kramer MW, editors. *Medikamente in der Urologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2021. p. 361-70.
26. Malmström P-U, Sylvester RJ, Crawford DE, Friedrich M, Krege S, Rintala E, et al. An individual patient data meta-analysis of the long-term outcome of randomised studies comparing intravesical mitomycin C versus bacillus Calmette-Guérin for non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol*. 2009;56(2):247-56.
27. Shelley MD, Kynaston H, Court J, Wilt TJ, Coles B, Burgon K, et al. A systematic review of intravesical bacillus Calmette-Guérin plus transurethral resection vs transurethral resection alone in Ta and T1 bladder cancer. *British Journal of Urology International*. 2001;88(3):209-16.
28. NICE NIfHaCE. Bladder cancer: diagnosis and management [Available from: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng2>].
29. van Rhijn BWG, Zuiverloon TCM, Vis AN, Radvanyi F, van Leenders GJLH, Ooms BCM, et al. Molecular grade (FGFR3/MIB-1) and EORTC risk scores are predictive in primary non-muscle-invasive bladder cancer. *European Urology*. 2010;58(3):433-41.

30. Soukup V, Čapoun O, Cohen D, Hernández V, Babjuk M, Burger M, et al. Prognostic Performance and Reproducibility of the 1973 and 2004/2016 World Health Organization Grading Classification Systems in Non-muscle-invasive Bladder Cancer: A European Association of Urology Non-muscle Invasive Bladder Cancer Guidelines Panel Systematic Review. *Eur Urol*. 2017;72(5):801-13.
31. Grabe-Heyne K, Henne C, Mariappan P, Geiges G, Pöhlmann J, Pollock RF. Intermediate and high-risk non-muscle-invasive bladder cancer: an overview of epidemiology, burden, and unmet needs. *Frontiers in Oncology*. 2023;13.
32. Onkopedia Leitlinien. Urothelkarzionm (Harnblasenkarzinom) 2024 [Available from: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/urothelkarzinom-harnblasenkarzinom/@@guideline/html/index.html#litID0EZ1DI>.
33. Zlotta AR, Ballas LK, Niemierko A, Lajkosz K, Kuk C, Miranda G, et al. Radical cystectomy versus trimodality therapy for muscle-invasive bladder cancer: a multi-institutional propensity score matched and weighted analysis. *The Lancet Oncology*. 2023;24(6):669-81.
34. Rödel C, Grabenbauer GG, Kühn R, Papadopoulos T, Dunst J, Meyer M, et al. Combined-Modality Treatment and Selective Organ Preservation in Invasive Bladder Cancer: Long-Term Results. *Journal of Clinical Oncology*. 2002;20(14):3061-71.
35. Krause FS, Walter B, Ott OJ, Häberle L, Weiss C, Rödel C, et al. 15-year survival rates after transurethral resection and radiochemotherapy or radiation in bladder cancer treatment. *Anticancer Research*. 2011;31(3):985-90.
36. Witjes JA, Bruins HM, Cathomas R, Compérat EM, Cowan NC, Gakis G, et al. European Association of Urology Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer: Summary of the 2020 Guidelines. *European Urology*. 2021;79(1):82-104.
37. Meeks JJ, Bellmunt J, Bochner BH, Clarke NW, Daneshmand S, Galsky MD, et al. A Systematic Review of Neoadjuvant and Adjuvant Chemotherapy for Muscle-invasive Bladder Cancer. *European Urology*. 2012;62(3):523-33.
38. Sherif A, Holmberg L, Rintala E, Mestad O, Nilsson J, Nilsson S, et al. Neoadjuvant Cisplatinum Based Combination Chemotherapy in

Patients with Invasive Bladder Cancer: A Combined Analysis of Two Nordic Studies. *European Urology*. 2004;45(3):297-303.

39. Pfister C, Gravis G, Fléchon A, Soulié M, Guy L, Laguerre B, et al. Randomized Phase III Trial of Dose-dense Methotrexate, Vinblastine, Doxorubicin, and Cisplatin, or Gemcitabine and Cisplatin as Perioperative Chemotherapy for Patients with Muscle-invasive Bladder Cancer. Analysis of the GETUG/AFU V05 VESPER Trial Secondary Endpoints: Chemotherapy Toxicity and Pathological Responses. *European Urology*. 2021;79(2):214-21.

40. Mertens LS, Meijer RP, Kerst JM, Bergman AM, van Tinteren H, van Rhijn BWG, et al. Carboplatin based induction chemotherapy for nonorgan confined bladder cancer - a reasonable alternative for cisplatin unfit patients? *The Journal of Urology*. 2012;188(4):1108-14.

41. von der Maase H, Hansen SW, Roberts JT, Dogliotti L, Oliver T, Moore MJ, et al. Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study. *Journal of Clinical Oncology*. 2000;18(17):3068-77.

42. Lehmann J, Retz M, Steiner G, Albers P, Jaeger E, Knuth A, et al. Gemcitabin/Cisplatin vs. MVAC: 5-Jahres-Ergebnisse der Phase-III-Studie zur Chemotherapie des fortgeschrittenen Urothelkarzinoms in Deutschland. *Der Urologe*. 2003;42:1074-86.

43. von der Maase H, Sengelov L, Roberts JT, Ricci S, Dogliotti L, Oliver T, et al. Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23(21):4602-8.

44. Carril-Ajuria L, Cruz Martin-Soberón M, de Velasco G, Agarwal N, Castellano D. Immunotherapy maintenance therapy for advanced urothelial carcinoma (aUC): a comprehensive review. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2022.

45. Houston Thompson R, Boorjian SA, Kim SP, Cheville JC, Thapa P, Tarrel R, et al. Eligibility for neoadjuvant/adjuvant cisplatin-based chemotherapy among radical cystectomy patients. *British Journal of Urology International*. 2014;113(5b):17-21.

46. Sonpavde G, Watson D, Tourtellott M, Cowey CL, Hellerstedt B, Hutson TE, et al. Administration of cisplatin-based chemotherapy for advanced urothelial carcinoma in the community. *Clinical Genitourinary Cancer*. 2012;10(1):1-5.
47. Lee CT, Madii R, Daignault S, Dunn RL, Zhang Y, Montie JE, et al. Cystectomy Delay More Than 3 Months From Initial Bladder Cancer Diagnosis Results in Decreased Disease Specific and Overall Survival. *The Journal of Urology*. 2006;175(4):1262-7.
48. Bajorin DF, Witjes JA, Gschwend JE, Schenker M, Valderrama BP, Tomita Y, et al. Adjuvant Nivolumab versus Placebo in Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 2021;384(22):2102-14.
49. Necchi A, Anichini A, Raggi D, Briganti A, Massa S, Lucianò R, et al. Pembrolizumab as Neoadjuvant Therapy Before Radical Cystectomy in Patients With Muscle-Invasive Urothelial Bladder Carcinoma (PURE-01): An Open-Label, Single-Arm, Phase II Study. *Journal of Clinical Oncology*. 2018;36(34):3353-60.
50. Rose TL, Harrison MR, Deal AM, Ramalingam S, Whang YE, Brower B, et al. Phase II Study of Gemcitabine and Split-Dose Cisplatin Plus Pembrolizumab as Neoadjuvant Therapy Before Radical Cystectomy in Patients With Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2021;39(28):3140-8.
51. Galsky MD, Daneshmand S, Izadmehr S, Gonzalez-Kozlova E, Chan KG, Lewis S, et al. Gemcitabine and cisplatin plus nivolumab as organ-sparing treatment for muscle-invasive bladder cancer: a phase 2 trial. *Nature Medicine*. 2023;29(11):2825-34.
52. Powles T, Catto JWF, Galsky MD, Al-Ahmadie H, Meeks JJ, Nishiyama H, et al. Perioperative Durvalumab with Neoadjuvant Chemotherapy in Operable Bladder Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2024;391(19):1773-86.
53. Agency EM. Padcev: enfortumab vedotin. 2022.
54. U.S. Food and Drug Administration. FDA grants accelerated approval to enfortumabvedotin- ejfv fpr metastatic urothelial cancer. 2019.
55. Powles T, Valderrama BP, Gupta S, Bedke J, Kikuchi E, Hoffman-Censits J, et al. Enfortumab Vedotin and Pembrolizumab in Untreated

Advanced Urothelial Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2024;390(10):875-88.

56. van der Heijden MS, Sonpavde G, Powles T, Necchi A, Burotto M, Schenker M, et al. Nivolumab plus Gemcitabine–Cisplatin in Advanced Urothelial Carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 2023;389(19):1778-89.

57. Maiorano BA, Di Maio M, Cerbone L, Maiello E, Procopio G, Roviello G. Significance of PD-L1 in Metastatic Urothelial Carcinoma Treated With Immune Checkpoint Inhibitors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JAMA Network Open*. 2024;7(3):e241215.

58. Guo L, Wang X, Wang S, Hua L, Song N, Hu B, et al. Efficacy of immune-checkpoint inhibitors in PD-L1 selected or unselected patients vs. control group in patients with advanced or metastatic urothelial carcinoma. *Oncolimmunology*. 2021;10(1):1887551.

59. Patel VG, Oh WK, Galsky MD. Treatment of muscle-invasive and advanced bladder cancer in 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2020;70(5):404-23.

60. Grunewald CM, Hiester A, Niegisch G. Systemtherapie beim metastasierten Urothelkarzinom:

Aktueller Stand und was kommt nach den Checkpointinhibitoren? *Aktuelle Urologie*. 2020;51(4):371-6.

61. Galsky MD, Ángel Arranz Arijia J, Bamias A, Davis ID, De Santis M, Kikuchi E, et al. Atezolizumab with or without chemotherapy in metastatic urothelial cancer (IMvigor130): a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *The Lancet*. 2020;395(10236):1547-57.

62. Powles T, Csősz T, Özgüroğlu M, Matsubara N, Géczi L, Cheng SY-S, et al. Pembrolizumab alone or combined with chemotherapy versus chemotherapy as first-line therapy for advanced urothelial carcinoma (KEYNOTE-361): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2021;22(7):931-45.

63. Suzman DL, Agrawal S, Ning Y-M, Maher VE, Fernandes LL, Karuri S, et al. FDA Approval Summary: Atezolizumab or Pembrolizumab for the Treatment of Patients with Advanced Urothelial Carcinoma Ineligible for Cisplatin-Containing Chemotherapy. *The Oncologist*. 2019;24(4):563-9.

64. Gourd E. EMA restricts use of anti-PD-1 drugs for bladder cancer. *The Lancet Oncology*. 2018;19(7):E341.
65. Balar AV, Castellano D, O'Donnell PH, Grivas PD, Vuky J, Powles T, et al. First-line pembrolizumab in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and unresectable or metastatic urothelial cancer (KEYNOTE-052): a multicentre, single-arm, phase 2 study. *The Lancet Oncology*. 2017;18(11):1483-92.
66. Balar AV, Galsky MD, Rosenberg JE, Powles T, Petrylak DP, Bellmunt J, et al. Atezolizumab as first-line treatment in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *The Lancet*. 2017;389(10064):67-76.
67. Schwamborn K, Knüchel R, Hartmann A, Baretton G, Lasitschka F, Schirmacher P, et al. Comparability of programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression on tumor-infiltrating immune cells (IC) and tumor cells (TC) in advanced urothelial bladder cancer (UBC) using clinically relevant immunohistochemistry (IHC) assays. *Annals of Oncology*. 2017;28.
68. Hoffman-Censits JH, Grivas P, Van Der Heijden MS, Dreicer R, Loriot Y, Retz M, et al. IMvigor 210, a phase II trial of atezolizumab (MPDL3280A) in platinum-treated locally advanced or metastatic urothelial carcinoma (mUC). *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(2_suppl):355-.
69. Sharma P, Retz M, Siefker-Radtke A, Baron A, Necchi A, Bedke J, et al. Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (CheckMate 275): a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. 2017;18(3):312-22.
70. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Progress in Experimental Tumor Research*. 1970;13:1-27.
71. van den Broek ME, Kägi D, Ossendorp F, Toes R, Vamvakas S, Lutz WK, et al. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *Journal of Experimental Medicine*. 1996;184(5):1781-90.
72. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*. 2002;3(11):991-8.
73. Rink L, Kruse A, Haase H. Immunologie für Einsteiger. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2012.

74. Friedl P, den Boer AT, Gunzer M. Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nature Reviews Immunology*. 2005;5(7):532-45.
75. Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res*. 2020;10(3):727-42.
76. Garcia-Diaz A, Shin DS, Moreno BH, Saco J, Escuin-Ordinas H, Rodriguez GA, et al. Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Reports*. 2017;19(6):1189-201.
77. Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME, White DE, et al. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood*. 2009;114(8):1537-44.
78. Akinleye A, Rasool Z. Immune checkpoint inhibitors of PD-L1 as cancer therapeutics. *Journal of Hematology and Oncology*. 2019;12(1).
79. Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nature Immunology*. 2007;8(3):239-45.
80. Tsai H-F, Hsu P-N. Cancer immunotherapy by targeting immune checkpoints: mechanism of T cell dysfunction in cancer immunity and new therapeutic targets. *Journal of Biomedical Science*. 2017;24(1).
81. Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nature Reviews Immunology*. 2004;4(5):336-47.
82. Nurieva R, Thomas S, Nguyen T, Martin-Orozco N, Wang Y, Kaja M-K, et al. T-cell tolerance or function is determined by combinatorial costimulatory signals. *The EMBO Journal*. 2006;25(11):2623-33.
83. Wölfel T, Becker JC, Schmitt M. Immunonkologie im Fokus. *Oncology Research and Treatment*. 2013;36(4):7-11.
84. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *Journal of Experimental Medicine*. 2000;192(7):1027-34.
85. Salmaninejad A, Khoramshahi V, Azani A, Soltaninejad E, Aslani S, Zamani MR, et al. PD-1 and cancer: molecular mechanisms and polymorphisms. *Immunogenetics*. 2018;70(2):73-86.
86. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of Lupus-like Autoimmune Diseases by Disruption of the PD-1 Gene

Encoding an ITIM Motif-Carrying Immunoreceptor. *Immunity*. 1999;11(2):141-51.

87. Trautmann A, Revy P, Donnadieu E, Bismuth G. Immunological synapses and neuronal synapses. *Médecine Sciences*. 2003;19(4):429-36.

88. Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, et al. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*. 1999;285(5425):221-7.

89. Monks CRF, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*. 1998;395:82-6.

90. Varma R, Campi G, Yokosuka T, Saito T, Dustin ML. T cell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in the central supramolecular activation cluster. *Immunity*. 2006;25(1):117-27.

91. Lee K-H, Dinner AR, Tu C, Campi G, Raychaudhuri S, Varma R, et al. The immunological synapse balances T cell receptor signaling and degradation. *Science*. 2003;302(5648):1218-22.

92. Lee K-H, Holdorf AD, Dustin ML, Chan AC, Allen PM, Shaw AS. T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science*. 2002;295(5559):1539-42.

93. Wiedemann A, Müller S, Favier B, Penna D, Guiraud M, Delmas C, et al. T-cell activation is accompanied by an ubiquitination process occurring at the immunological synapse. *Immunology Letters*. 2005;98(1):57-61.

94. Rettig J, Stevens DR. Synaptic Transmission in the Immune System. *e-Neuroforum*. 2017;23(4):223–30.

95. Stinchcombe JC, Majorovits E, Bossi G, Fuller S, Griffiths GM. Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature*. 2006;443(7110):462-5.

96. Huppa JB, Davis MM. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nature Reviews Immunology*. 2003;3(12):973-83.

97. Sims TN, Soos TJ, Xenias HS, Dubin-Thaler B, Hofman JM, Waite JC, et al. Opposing effects of PKC θ and WASp on symmetry breaking and relocation of the immunological synapse. *Cell*. 2007;129(4):773-85.

98. Rouanne M, Roumigué M, Houédé N, Masson-Lecomte A, Colin P, Pignot G, et al. Development of immunotherapy in bladder cancer: present and future on targeting PD(L)1 and CTLA-4 pathways. *World Journal of Urology*. 2018;36(11):1727-40.
99. Curtsinger JM, Mescher MF. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Current Opinion in Immunology*. 2010;22(3):333-40.
100. Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *The Journal of Immunology*. 1986;137(1):245-54.
101. Bui TM, Wiesolek HL, Sumagin R. ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. *Journal of Leukocyte Biology*. 2020;108(3):787-99.
102. Haydinger CD, Ashander LM, Tan ACR, Smith JR. Intercellular Adhesion Molecule 1: More than a Leukocyte Adhesion Molecule. *Biology*. 2023;12(5):743.
103. Aghajanian A, Wittchen ES, Allingham MJ, Garrett TA, Burridge K. Endothelial cell junctions and the regulation of vascular permeability and leukocyte transmigration. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2008;6(9):1453-60.
104. Clark PR, Manes TD, Pober JS, Kluger MS. Increased ICAM-1 Expression Causes Endothelial Cell Leakiness, Cytoskeletal Reorganization and Junctional Alterations. *Journal of Investigative Dermatology*. 2007;127(4):762-74.
105. Pober JS, Bevilacqua MP, Mendrick DL, Lapierre LA, Fiers W, Gimbrone Jr. MA. Two distinct monokines, interleukin 1 and tumor necrosis factor, each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells. *The Journal of Immunology*. 1986;136(5):1680-7.
106. Pober JS, Gimbrone Jr. MA, Lapierre LA, Mendrick DL, Fiers W, Rothlein R, et al. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *The Journal of Immunology*. 1986;137(6):1893-6.
107. Sumagin R, Brazil JC, Nava P, Nishio H, Alam A, Luissint A-C, et al. Neutrophil interactions with epithelial-expressed ICAM-1 enhances

intestinal mucosal wound healing. *Mucosal Immunology*. 2016;9(5):1151-62.

108. Gay AN, Mushin OP, Lazar DA, Naik-Mathuria BJ, Yu L, Gobin A, et al. Wound healing characteristics of ICAM-1 null mice devoid of all isoforms of ICAM-1. *Journal of Surgical Research*. 2011;171(1):1-7.

109. Nagaoka T, Kaburagi Y, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, Steeber DA, et al. Delayed wound healing in the absence of intercellular adhesion molecule-1 or L-selectin expression. *The American Journal of Pathology*. 2000;157(1):237-47.

110. Parameswaran N, Suresh R, Bal V, Rath S, George A. Lack of ICAM-1 on APCs during T Cell Priming Leads to Poor Generation of Central Memory Cells¹. *The Journal of Immunology*. 2005;175(4):2201-11.

111. Walling BL, Kim M. LFA-1 in T Cell Migration and Differentiation. *Frontiers in Immunology*. 2018;9.

112. Maeda K, Kang S-M, Sawada T, Nishiguchi Y, Yashiro M, Ogawa Y, et al. Expression of intercellular adhesion molecule-1 and prognosis in colorectal cancer. *Oncology Reports*. 2002;9(3):511-4.

113. Tachimori A, Yamada N, Sakate Y, Yashiro M, Maeda K, Ohira M, et al. Up regulation of ICAM-1 gene expression inhibits tumour growth and liver metastasis in colorectal carcinoma. *European Journal of Cancer*. 2005;41(12):1802-10.

114. Lim E-J, Kang J-H, Kim Y-J, Kim S, Lee S-J. ICAM-1 promotes cancer progression by regulating SRC activity as an adapter protein in colorectal cancer. *Cell Death & Disease*. 2022;13(4).

115. Ionescu C, Braicu C, Chiorean R, Cojocneanu Petric R, Neagoe E, Pop L, et al. TIMP-1 expression in human colorectal cancer is associated with SMAD3 gene expression levels: a pilot study. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*. 2014;23(4):413-8.

116. Fujihara T, Yashiro M, Inoue T, Sawada T, Kato Y, Ohira M, et al. Decrease in ICAM-1 expression on gastric cancer cells is correlated with lymph node metastasis. *Gastric Cancer*. 1999;2(4):221-5.

117. Jung W-C, Jang Y-J, Kim J-H, Park S-S, Park S-H, Kim S-J, et al. Expression of intercellular adhesion molecule-1 and e-selectin in gastric cancer and their clinical significance. *Journal of Gastric Cancer*. 2012;12(3):140-8.

118. Johnson JP, Stade BG, Holzmann B, Schwäble W, Riethmüller G. De novo expression of intercellular-adhesion molecule 1 in melanoma

correlates with increased risk of metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86(2):641-4.

119. Rosette C, Roth RB, Oeth P, Braun A, Kammerer S, Ekblom J, et al. Role of ICAM1 in invasion of human breast cancer cells. *Carcinogenesis*. 2005;26(5):943-50.

120. Ogawa Y, Hirakawa K, Nakata B, Fujihara T, Sawada T, Kato Y, et al. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in invasive breast cancer reflects low growth potential, negative lymph node involvement, and good prognosis. *Clinical Cancer Research*. 1998;4(1):31-6.

121. Schröder C, Witzel I, Müller V, Krenkel S, Wirtz RM, Jänicke F, et al. Prognostic value of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 expression in breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2011;137(8):1193-201.

122. Chow N-H, Cheng C-J, Chi Y-C, Liu H-S, Tzai T-S, Lin JS-N. Potential value of urinary intercellular adhesion molecule-1 determination in patients with bladder cancer. *Urology*. 1998;52(6):1015-9.

123. Kumar B, De Silva M, Venter DJ, Armes JE. Tissue microarrays: a practical guide. *Pathology*. 2004;36(4):295-300.

124. Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Scientific Reports*. 2017;7(1).

125. Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, Algaba F, Busch C, Cheng L, et al. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology*. 2005;66(6):4-34.

126. Lopez-Beltran A, Cimadamore A, Blanca A, Massari F, Vau N, Scarpelli M, et al. Immune Checkpoint Inhibitors for the Treatment of Bladder Cancer. *Cancers*. 2021;13(1):131.

127. Vaughn DJ, Bellmunt J, Fradet Y, Lee JL, Fong L, Vogelzang NJ, et al. Health-Related Quality-of-Life Analysis From KEYNOTE-045: A Phase III Study of Pembrolizumab Versus Chemotherapy for Previously Treated Advanced Urothelial Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2018;36(16):1579-87.

128. Nakanishi J, Wada Y, Matsumoto K, Azuma M, Kikuchi K, Ueda S. Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor

grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2007;56(8):1173-82.

129. Wen Y, Chen Y, Duan X, Zhu W, Cai C, Deng T, et al. The clinicopathological and prognostic value of PD-L1 in urothelial carcinoma: a meta-analysis. *Clinical and Experimental Medicine*. 2019;19(4):407-16.

130. Ohaegbulam KC, Assal A, Lazar-Molnar E, Yao Y, Zang X. Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. *Trends Mol Med*. 2015;21(1):24-33.

131. Taber A, Prip F, Lamy P, Agerbæk M, Jensen JB, Steiniche T, et al. Immune Contexture and Differentiation Features Predict Outcome in Bladder Cancer. *European Urology Oncology*. 2022;5(2):203-13.

132. Fridman WH, Zitvogel L, Sautès-Fridman C, Kroemer G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nature Reviews clinical oncology*. 2017;14(12):717-34.

133. Tuomela K, Ambrose AR, Davis DM. Escaping Death: How Cancer Cells and Infected Cells Resist Cell-Mediated Cytotoxicity. *Frontiers in Immunology*. 2022;Volume 13.

134. Zhang S, Kohli K, Black RG, Yao L, Spadinger SM, He Q, et al. Systemic Interferon- γ Increases MHC Class I Expression and T-cell Infiltration in Cold Tumors: Results of a Phase 0 Clinical Trial. *Cancer Immunology Research*. 2019;7(8):1237-43.

135. Dustin ML. The immunological synapse. *Cancer Immunology Research*. 2014;2(11):1023-33.

136. Chang Y-J, Holtzman MJ, Chen C-C. Interferon-gamma-induced epithelial ICAM-1 expression and monocyte adhesion. Involvement of protein kinase C-dependent c-Src tyrosine kinase activation pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(9):7118-26.

137. Qian W-J, Yan J-S, Gang X-Y, Xu L, Shi S, Li X, et al. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1): From molecular functions to clinical applications in cancer investigation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2024;1879(6):189187.

138. Großkopf A, Simm A. [Aging of the immune system]. *Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie*. 2022;55(7):553-7.

139. Małkiewicz B, Gurwin A, Karwacki J, Nagi K, Knecht-Gurwin K, Hober K, et al. Management of Bladder Cancer Patients with Clinical Evidence of Lymph Node Invasion (cN+). *Cancers*. 2022;14(21):5286.

140. Ikeda J, Ohe C, Yoshida T, Nakamoto T, Saito R, Tsuta K, et al. Prognostic impact of lymph node invasion levels in patients with bladder cancer undergoing radical cystectomy and pelvic lymphadenectomy. *Oncology Letters*. 2024;28(5):517.
141. Mariathasan S, Turley SJ, Nickles D, Castiglioni A, Yuen K, Wang Y, et al. TGF β attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells. *Nature*. 2018;554(7693):544-8.

7. Anhang

Korrelationsanalysen nach Pearson

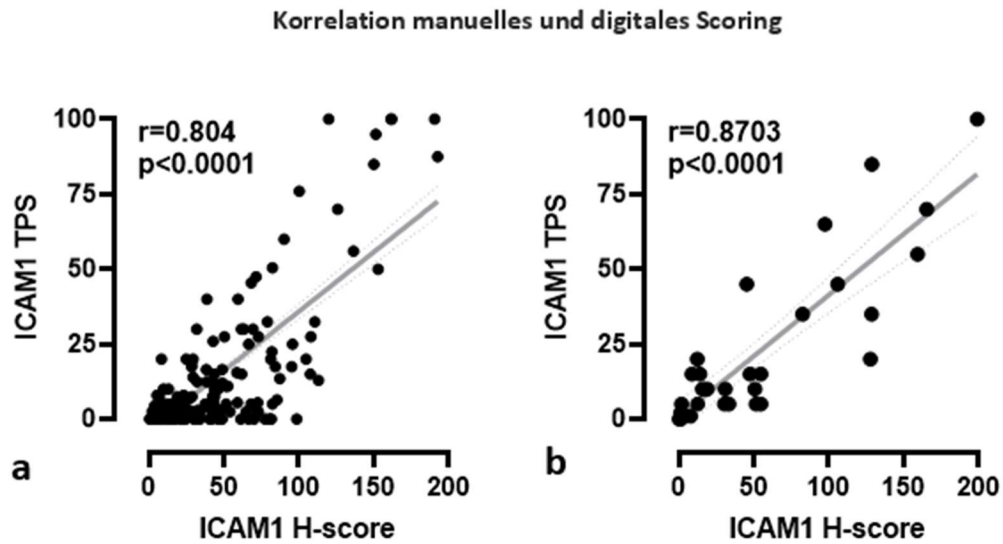


Abbildung 24: Korrelationsanalyse nach Pearson, Korrelation des manuellen und digitalen Scorings. a: das unbehandelte Kollektiv, b: das behandelte Kollektiv.

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all den Menschen danken, die mich auf dem Weg zu dieser Dissertation unterstützt und begleitet haben.

Mein Dank gilt meinem Doktorvater für die Möglichkeit, meine Promotion durchzuführen. Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, der mich während meiner gesamten Promotion mit großem Engagement, wertvollen Anregungen und konstruktiver Kritik begleitet hat. Sein Fachwissen, seine Geduld und seine Leidenschaft für die Wissenschaft haben mich inspiriert und wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Vielen Dank!

Weiterhin schätze ich besonders den Einsatz der weltbesten MTA, die mit großem Einsatz tausende Proben prozessiert und gescannt hat und so meine Arbeit bedeutend vorangebracht hat.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch den Kolleginnen und Kollegen der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie im Universitätsklinikum Mainz, welche mit Bereitstellung der klinischen Daten wesentlich zur inhaltlichen Grundlage der Arbeit beigetragen haben.

Ich danke meinem Freund, der mir mit seinen Crash-Kursen in Programmieren und Bildbearbeitung geholfen hat, Herausforderungen zu meistern. Er stand mir stets mit Rat und Unterstützung zur Seite.

Abschließend gilt mein tiefster Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mich während dieser Zeit unterstützt, motiviert und begleitet haben. Insbesondere den fachinternen und fachfremden Korrekturlesern, die geholfen haben, die literarische Qualität meiner Arbeit stetig hochzuhalten.

Diese Dissertation ist nicht nur das Ergebnis meiner Arbeit, sondern spiegelt die Unterstützung wider, die ich auf diesem Weg erfahren habe.

9. Tabellarischer Lebenslauf

