

**Untersuchungen zum Immuneckpoint-Molekül VISTA in
Urothelkarzinom-Zelllinien und zu zirkulierenden Tumorzellen im Blut
von Patient:innen mit Urothelkarzinom der Harnblase**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades einer
Doktorin der Medizin (Dr. med.)
an der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von
Enikő Fuchs
aus
Sopron

2025

Betreuerin/Gutachterin der Dissertation: Prof. Dr. Sabine Riethdorf

Gutachter der Dissertation: PD Dr. Armin Soave

Vorsitz der Prüfungskommission: PD Dr. Armin Soave

Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Sabine Riethdorf

Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Christoffer Gebhardt

Datum der mündlichen Prüfung: 18.12.2025

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Arbeitshypothese und Fragestellung	1
2 Einleitung	3
2.1 Epidemiologie, Prognose, Ätiologie, Symptome, Diagnostik, Klassifizierung und Standardtherapie des Urothelzellkarzinoms der Harnblase (UCB)	4
2.2 Immuntherapie und ihre Bedeutung beim UCB	8
2.3 Das Immuncheckpointprotein VISTA	11
2.4 Bedeutung von zirkulierenden Tumorzellen (circulating tumor cells – CTCs) bei UCB-Patient:innen	17
2.5 Anreicherung und Detektion von CTCs	20
3 Material und Methoden	27
3.1 Material	27
3.1.1 Laborgeräte	27
3.1.2 Chemikalien und Reagenzien	30
3.1.3 Oligonukleotide	34
3.1.4 Kits	35
3.1.5 Antikörper	36
3.1.6 Rekombinante Zytokine	38
3.1.7 Zelllinien	39
3.1.8 Analysesoftware und Datenbanken	40
3.1.9 Patient:innen-Proben	40
3.2 Methoden	41
3.2.1 Zellkultur-Methoden	41
3.2.1.1 Standardkultivierung von humanen Zelllinien	41
3.2.1.2 Lagerung der Zelllinien durch Kryokonservierung	41
3.2.1.3 Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen	42
3.2.1.4 Stimulation der Tumorzelllinien mit rekombinanten Zytokinen	42
3.2.2 Molekularbiologische Methoden	43
3.2.2.1 RNA-Isolation aus Zellkulturzellen	43

3.2.2.2	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren	43
3.2.2.3	Synthese von komplementären Desoxyribonukleinsäure („complementary“ DNA – cDNA) durch reverse Transkription der isolierten RNA.....	43
3.2.2.4	Quantitative Real-Time PCR	44
3.2.3	Proteinbiochemische Methoden	45
3.2.3.1	Herstellung von Zelllysaten	45
3.2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten mit BCA-Test.....	46
3.2.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	46
3.2.3.4	Western-Blot-Analyse.....	48
3.2.4	Anreicherung und Detektion von CTCs aus peripherem Blut.....	49
3.2.4.1	Isolierung von PBMCs mit Hilfe der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation.....	49
3.2.4.2	Anreicherung von zirkulierenden Tumorzellen aus peripherem Blut mit dem Parsortix®-System	51
3.2.4.3	Detektion von zirkulierenden Tumorzellen aus peripherem Blut mit dem CellSearch®-System	51
3.2.4.4	Herstellung von Zytospins	52
3.2.4.5	IF-Färbungen	53
3.2.4.6	Isolation von Einzelzellen	63
3.2.4.7	Amplifikation genomischer Einzelzell-DNA durch WGA.....	63
3.2.4.8	Qualitätskontrolle des WGA-Produkts	64
3.2.4.9	Agarose-Gelelektrophorese	64
3.2.4.10	Genomsequenzierung	65
4	Ergebnisse	66
4.1	Analyse der VISTA-Expression in UCB-Zelllinien.....	66
4.2	Analyse der VISTA-Expression in UCB-Zelllinien im unstimulierten Zustand.....	67
4.3	Expression des VS/R-Gens in UCB-Zelllinien im unstimulierten Zustand.....	68

4.3.1	Regulation der <i>VS/R</i> -Expression in UCB-Zelllinien durch IFN- γ	69
4.3.2	Regulation der VISTA-Expression in UCB-Zelllinien durch TGF β	73
4.4	Etablierung der Immunfärbung für die CTC-Detektion	75
4.4.1	Immunfärbung zum Nachweis von VISTA.....	75
4.4.2	CD44-Immunfärbung.....	76
4.4.3	TROP-2-Immunfärbung.....	77
4.4.4	Immunfärbung mit TROP-2, PD-L1 und CD41	79
4.5	Zusammenfassung der CTC-Detektionsverfahren.....	82
4.6	Gesamtgenom-Amplifikation und Sequenzierung – Untersuchungen zum Nachweis des Tumorsprungs der Zellen nach Anreicherung durch Parsortix® und Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation	84
4.7	CTC-Detektion und klinische Bedeutung	93
4.7.1	CTC-Anreicherung mittels CellSearch®.....	93
4.7.2	CTC-Anreicherung mittels Parsortix®	94
4.7.3	CTC-Anreicherung mittels Ficoll- Dichtegradientenzentrifugation.....	95
4.8	Prognostische Bedeutung.....	98
5	Diskussion	99
5.1	VISTA/ <i>VS/R</i> -Expression in UCB-Zelllinien.....	99
5.2	Regulation der Expression von VISTA/ <i>VS/R</i> in UCB-Zelllinien.....	102
5.3	Optimierung der Detektion und Charakterisierung von CTCs	106
5.4	Vergleich der verschiedenen CTC-Detektionsverfahren	111
5.5	Ergebnisse der NGS und Vergleich mit der Literatur	115
5.6	Prognostische Bedeutung.....	118
5.7	Schlussfolgerungen	118
6	Zusammenfassung/Summary	121
7	Literaturverzeichnis	123
8	Abkürzungsverzeichnis	161
9	Abbildungsverzeichnis	168
10	Tabellenverzeichnis	170
11	Anhang	171

11.1 Relevante Auszüge aus der Studienarbeit „Struktur, Expression und Funktion des Immun-Checkpoint-Proteins VISTA (V domain immunoglobulin suppressor of T cell activation)“	171
11.2 Tabelle 23: Isolierte CTC-Kandidaten-Zellen.....	179
12 Erklärung des Eigenanteils	182
13 Eidesstattliche Versicherung	183
14 Danksagung	184

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Für eine personalisierte zielgerichtete Immuntherapie des Urothelkarzinoms der Harnblase (UCB) ist es wichtig, prädiktive und prognostisch relevante Biomarker zu identifizieren. Bisher wird vor allem das Tumorgewebe eingesetzt, um die Expression von für die Immuntherapie wichtigen Genen und Proteinen zu untersuchen. So wird vor allem die Expression von PD-L1 (Programmed cell death-ligand 1) als Grundlage für die Verabreichung einer modernen Immuncheckpoint-Inhibitor (ICI)-Therapie in den Primärtumoren analysiert. Jedoch gibt es sowohl Patient:innen, die bei hoher PD-L1-Expression im Primärtumor nicht mit einer gewünschten Antwort auf diese Therapien reagieren, als auch Patient:innen ohne oder mit nur geringer PD-L1-Expression im Tumorgewebe, die von einer ICI-Therapie profitieren. Das zeigt, dass weitere Biomarker erforderlich sind, um optimale Therapieerfolge zu erzielen. Auch kann die Expression von z. B. PD-L1 im Primärtumor und in Rezidiven/Metastasen unterschiedlich sein. Biopsiegewebe von Metastasen steht jedoch nicht in ausreichendem Maße zur Verfügung. Deswegen sind in den letzten Jahren zunehmend Flüssigbiopsie (*liquid biopsy*)-Verfahren in den Fokus des Interesses geraten, mit denen z. B. Proben aus dem peripheren Blut einfach und nicht-invasiv mit modernen Technologien auf das Vorliegen von zirkulierenden Tumorzellen (circulating tumor cells – CTCs) und die Expression von beispielsweise PD-L1 untersucht werden können. Diese CTCs können dann zum Zeitpunkt der Untersuchung der Patient:innen phänotypisch und molekular untersucht werden, um Auskunft über die Expression weiterer potenzieller Biomarker zu liefern.

Deshalb sollten in der vorliegenden Dissertation folgende Fragen beantwortet werden:

- Als Grundlage für die Analyse von CTCs sollte zunächst an einem Set von UCB-Zelllinien auf RNA- (Ribonucleic acid – Ribonukleinsäure) und Protein-Ebene untersucht werden, ob und in welchen Zelllinien das Immuncheckpoint-Molekül VISTA (Gen: *VSIR*) exprimiert wird.
- Im nächsten Schritt sollte getestet werden, ob die Expression von VISTA (V-set immunoregulatory receptor) ähnlich wie die von PD-L1 über bestimmte Zytokine reguliert wird.
- Im zweiten Teil der Arbeit sollten als Grundlage für die weitere Optimierung der Detektion und Charakterisierung von CTCs Ergebnisse der CTC-Detektion aus Blutproben von UCB-Patient:innen vor radikaler Zystektomie mit dem Parsortix®-

System und aus der Ficoll-basierten Dichtegradientenzentrifugation mit CTC-Ergebnissen nach CellSearch®-Prozessierung verglichen werden.

- Darüber hinaus sollte eine Immunfärbung der CTCs etabliert werden, mit deren Hilfe auch Keratin-negative CTCs gefunden sowie die Expression von Immuncheckpoint-Molekülen auf den CTCs bestimmt werden kann.
- Die Bestimmung von Kopiezahlveränderungen (*copy number variations* - CNVs) aus WGA (*whole genome amplification* - Gesamtgenomamplifikations)-Produkten aus einzelnen CTCs sollte zur Bestätigung des Tumorzell-Ursprungs der CTCs eingesetzt werden.
- Im letzten Schritt sollten die Ergebnisse der CTC-Bestimmungen mit klinischen Daten verglichen werden.

2 Einleitung

Das UCB ist besonders im muskelinvasiven Stadium mit einem aggressiven Verhalten und trotz multimodaler Therapieoptionen, wie der operativen Entfernung, der adjuvanten und/oder neoadjuvanten Radio- und Chemotherapie, häufig mit einer schlechten Prognose assoziiert (Schmidt and Gschwend, 2020). Aktuell kommen auch Therapien mit modernen ICIs beim UCB zur Anwendung (Leitlinienprogramm Onkologie, 2025). Wichtige Immuncheckpoint-Moleküle sind u. a. PD-L1, PD-1 (Programmed cell death protein 1), CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated Antigen 4) und VISTA. Es fehlen jedoch zuverlässige Biomarker, die das Therapieansprechen oder die minimale residuale Erkrankung vorhersagen und prognostische Aussagekraft besitzen sowie zur Stratifizierung der Patient:innen herangezogen werden können (Leitlinienprogramm Onkologie, 2025, Rink et al., 2012a, Soave et al., 2015). Des Weiteren kann es während der Tumorprogression zu geno- und phänotypischen Veränderungen in den Tumorzellen kommen, sodass sich Primärtumor und Metastasen unterscheiden können und neue Biomarker für die fortgeschrittenen Tumorstadien benötigt werden. In vielen Fällen stehen jedoch keine Metastasenbiopsien für erneute Analysen zur Verfügung. Deshalb wird gegenwärtig vermehrt Augenmerk auf die Etablierung von nicht-invasiven Biomarkern gelegt, die vor allem aus Flüssigbiopsien (*liquid biopsies*) detektiert werden können. Neben Urinuntersuchungen rücken Untersuchungen des Blutes auf CTCs, zirkulierende zellfreie Nukleinsäuren und sekretierte Proteine mehr und mehr in den Mittelpunkt des Interesses (Alkassis et al., 2021, Alva et al., 2015, Crupi et al., 2024, Liu et al., 2020). Erste Analysen zum UCB zeigen prognostische Aussagekraft von CTCs sowohl bei Patient:innen mit muskelinvasiven UCB als auch bei Patient:innen mit „high grade“ nicht muskelinvasiven Tumoren (Gazzaniga et al., 2012, Gazzaniga et al., 2014, Rink et al., 2011, Rink et al., 2012b, Soave et al., 2017). Darüber hinaus sind bereits Methoden zur Charakterisierung von UCB-CTCs im Hinblick auf die Detektion therapeutisch relevanter Zielmoleküle etabliert worden, etwa zur Expression des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) (Nanou et al., 2020, Niu et al., 2024, Rink et al., 2012b) oder PD-L1 (Anantharaman et al., 2016, Bergmann et al., 2020, Jin et al., 2023, Morelli et al., 2021). CTCs werden gegenwärtig vor allem über epitheliale Markerproteine detektiert (Ferreira et al., 2016, Habli et al., 2020, Pantel and Alix-Panabieres, 2019, Yap et al., 2019), da epitheliale Zellen normalerweise im Blut nicht nachzuweisen sind.

Kommt es jedoch während der Tumorzell dissemination und -progression zur EMT (epitheliale-mesenchymale Transition) und damit einhergehend zur Herabregulation der epithelialen Eigenschaften, wird die CTC-Detektionsrate verringert (Sieuwerts et al., 2009), und alternative Tumorzellmarker, die auch sogenannte Hybrid-Tumorzellen (epitheliale und mesenchymale Eigenschaften) erkennbar machen, sind dringend erforderlich.

2.1 Epidemiologie, Prognose, Ätiologie, Symptome, Diagnostik, Klassifizierung und Standardtherapie des Urothelzellkarzinoms der Harnblase (UCB)

Harnblasenkarzinome gehören weltweit zu den häufigsten Krebserkrankungen (Antoni et al., 2017, Bray et al., 2018), wobei das UCB mit 90% aller Harnblasenkarzinome den häufigsten Tumortyp darstellt (Erben et al., 2015, Manski, 2020b, Schmidt and Gschwend, 2020). In Industriestaaten, wie in Deutschland (15,3 pro 100.000) und den USA (11,0 pro 100.000), manifestiert sich typischerweise eine höhere Inzidenz an Harnblasenkarzinomen, wogegen in ärmeren Regionen wie Afrika und Südamerika niedrigere Inzidenzraten zu verzeichnen sind (Cancer, 2020, van Hoogstraten et al., 2023).

Das UCB ist nach dem Prostatakarzinom der zweithäufigste Urogenitaltumor und der vierthäufigste Tumor bei Männern in Deutschland. Bei Frauen ist es seltener und steht auf Platz 12 der Krebserkrankungen (Robert-Koch-Institut, 2021). In Deutschland versterben jährlich etwa 5600 Menschen an einem UCB (Schmidt and Gschwend, 2020).

Das UCB ist primär eine Erkrankung im höheren Alter, wobei das durchschnittliche Alter bei der Erstdiagnose bei 73-75 Jahren liegt. Die Prognose ist abhängig vom Tumorstadium. Während die 5-Jahres-Überlebensrate in Deutschland in 2020 von Patient:innen mit nicht-invasiven Tumoren (UICC-Stadium I = T1N0M0) bei 75-79% lag, betrug sie für das muskelinvasive UICC-Stadium II (=T2N0M0) 41-51%, für das UICC-Stadium III (=T3a-4aN0M0 und T1-4aN1M0) 36-38% und für das Stadium IV (T4b oder fernmetastasiert) lediglich 12-14% (Robert Koch-Institut, 2023).

Der wichtigste Risikofaktor für die Entstehung des UCB ist der Nikotinabusus (Antoni et al., 2017, Manski, 2020b, Schmidt and Gschwend, 2020). Je nach Anzahl der gerauchten Zigaretten und der Dauer des Rauchens kann sich das relative

Risiko sogar um das zwei- bis sechsfache erhöhen (Al-Zalabani et al., 2016, Manski, 2020b). Daneben spielen auch andere ätiologische Faktoren eine wichtige Rolle, wie z. B. die Einnahme von Medikamenten (Cyclophosphamid, Pioglitazon) und Exposition mit aromatischen Aminen (Al-Zalabani et al., 2016, Antoni et al., 2017, Cumberbatch et al., 2018, Erben et al., 2015, Manski, 2020b, Schmidt and Gschwend, 2020). Letztere ist auch der Grund dafür, dass das UCB eine anerkannte Berufskrankheit sein kann. Die berufliche Exposition verursacht ungefähr 10% der UCBs in Europa (Al-Zalabani et al., 2016, Manski, 2020b, Schmidt and Gschwend, 2020). Obwohl das Erkrankungsrisiko bei Männern deutlich höher ist, erhalten Frauen häufig die Diagnose eines UCBs häufig erst in einem fortgeschrittenen Stadium und haben zudem eine schlechtere Prognose (Dobruch et al., 2016, Manski, 2020b, Schmidt and Gschwend, 2020).

Das häufigste Erstsymptom ist eine schmerzlose Makrohämaturie. Jedoch können auch andere Beschwerden auftreten, wie z. B.: Harndrang, Mikrohämaturie, Pollakisurie, rezidivierende Harnwegsinfekte, Dysurie, Flankenschmerzen, Gewichtsverlust oder Nachtschweiß (Manski, 2020b, Schmidt and Gschwend, 2020).

Gegenwärtig wird keine allgemeine Früherkennungsuntersuchung für das UCB empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2025, Schmidt and Gschwend, 2020). Die Standarddiagnostik erfolgt mit folgenden Methoden: körperliche Untersuchung, Laboruntersuchung, Urin-Teststreifen, Urinzytologie, bildgebende Untersuchungsverfahren (Sonographie der Harnblase und der Nieren, Schnittbildverfahren), Urethrozystoskopie/Ureterorenoskopie, evtl. photodynamische Diagnostik oder Narrow-Band-Imaging und diagnostische transurethrale Elektroresektion der Harnblase (transurethrale Blasenresektion - TURB) (Manski, 2020b, Schmidt and Gschwend, 2020). Letztere ist gleichzeitig ein diagnostisches Verfahren (Gewebergewinnung für pathologische sowie histologische Begutachtung) und eine therapeutische Methode, da eine vollständige Tumorentfernung angestrebt wird (Schmidt and Gschwend, 2020).

Die Klassifizierung des UCB erfolgt mithilfe der TNM-Klassifikation anhand der Infiltrationstiefe in der Harnblasenwand. Das Stadium Ta beschreibt ein nicht-invasives papilläres Karzinom und das Stadium Tis ein „Carcinoma in situ“ („flacher Tumor“), welches für ein flaches anaplastisches Epithel mit geringgradiger Differenzierung ohne Polarität und mit intakter Basalmembran steht, und

tumorbiologisch gesehen eine aggressive Neoplasie ist. Ab Stadium T1 ist die Infiltration durch die Lamina propria bis in das subepitheliale Bindegewebe (Lamina submucosa) erfolgt. Ab Stadium T2 ist die Muskelschicht Lamina muscularis mitbetroffen, ab Stadium T3 ist die Infiltration ins perivesikale Fettgewebe erfolgt, und ab Stadium T4 sind Nachbarorgane mitbetroffen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2025, Manski, 2020b, Schmidt and Gschwend, 2020).

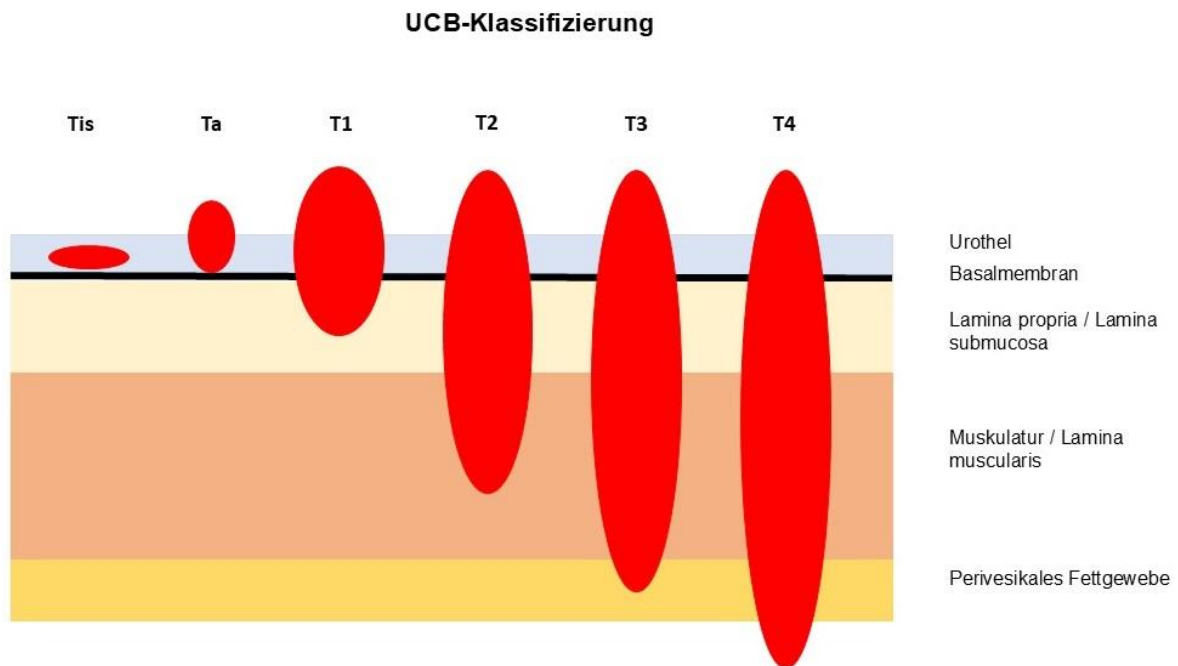


Abbildung 1: UCB-Klassifizierung anhand der Infiltrationstiefe in der Harnblasenwand.

Die Harnblaseninnenwand befindet sich auf der Seite des Urothels. Das Stadium Ta bedeutet ein nicht-invasives papilläres Karzinom, das Stadium Tis ist ein Carcinoma in situ („flache Neoplasie“). Ab Stadium T1 dringt der Tumor in subepitheliales Bindegewebe ein. Ab Stadium T2 liegt ein muskelinvasiver Tumor vor, der weiter unterteilt werden kann in: 2a: Tumor dringt in oberflächliche Muskularis propria ein (innere Hälfte), 2b: Tumor dringt tief in die Muskularis propria ein (äußere Hälfte). Ab Stadium T3 dringt das Karzinom in perivesikales Gewebe ein und kann weiter unterteilt werden in: T3a: mikroskopischer Befall und T3b: makroskopischer Befall. Im Stadium T4 sind Nachbarorgane infiltriert. Anhand der T-Kategorie kann das Harnblasenkarzinom in folgende klinische Stadien eingeteilt werden: 1. Nicht-muskelinvasives UCB: pTis, pTa, pT1 und 2. Muskelinvasives UCB: T2, T3, T4. Die Abbildung wurde anhand folgender Literatur erstellt: (Leitlinienprogramm Onkologie, 2025, Schmidt and Gschwend, 2020).

Diese Klassifizierung hat direkte therapeutische Konsequenzen, da die nicht-muskelinvasiv wachsenden Tumoren (Tis, Ta, T1), die ungefähr 80% aller neudiagnostizierten Tumoren ausmachen, eine weniger invasive Behandlung benötigen als die muskelinfiltrierenden Tumoren (ab Stadium T2) (Schmidt and Gschwend, 2020).

Die früheren Stadien ermöglichen ein minimal-invasives Vorgehen, wohingegen fortgeschrittene Tumorstadien eine radikale Behandlung mit Entfernung der Harnblase erfordern.

Bei einem lokal begrenzten Tumor ist die Standardtherapie eine transurethrale Resektion des Tumorgewebes mittels Elektroschlinge und eventueller Nachresektion nach 2-6 Wochen. Dieser Therapie folgt je nach Risikoprofil eine adjuvante intravesikale Chemotherapie mit Mitomycin-Instillationen (in seltenen Fällen durch Epirubicin oder Doxorubicin ersetzbar) oder eine adjuvante intravesikale Immunmodulation durch Installation von attenuierten Tuberkulose-Erregern (Bacillus Calmette-Guérin (BCG)). Obwohl die intravesikale Behandlung mit BCG effektiver ist, ist sie auch nebenwirkungsreicher (Pollakisurie, Dysurie, Hämaturie, Fieber usw.), weshalb sie Fällen mit höherem Progressionsrisiko vorbehalten bleibt. (Im Stadium Tis, sowie bei anderen hochrisiko nicht-muskelinvasiven UCBs kann eine radikale Zystektomie ebenfalls als Therapieoption in Betracht gezogen werden.) Nach diesen minimalinvasiven Eingriffen ist wegen der hohen Rezidivrate (Leitlinienprogramm Onkologie, 2025, Manski, 2020b, Prout et al., 1992, Redelman-Sidi et al., 2014, Schmidt and Gschwend, 2020) eine regelmäßige Überwachung unabdingbar.

Bei den muskelinvasiven Tumoren (ab TNM-Stadium T2) ist die radikale Zystektomie mit bilateraler pelviner Lymphadenektomie in Verbindung mit oder ohne perioperative Chemotherapie (Gemcitabin und Cisplatin oder nach MVAC- (Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin=Doxorubicin und Cisplatin-) Schema) die Therapie der Wahl. (Es sollten jedem/r Patient:in mit muskelinvasiven UCB (T2-T4, N0) eine neoadjuvante Systemtherapie mit einer Cisplatin-basierten Polychemotherapie angeboten werden. Bei alleiniger Zystektomie und postoperativem Nachweis eines lokal fortgeschrittenen Status (\geq T3, Lymphknotenbefall) ist die adjuvante Chemotherapie indiziert). Bei fernmetastasierten Patient:innen bleibt jedoch die Cisplatin-haltige Chemotherapie verbunden mit Schmerztherapie (evtl. begleitet von Radiotherapie) die Therapie der Wahl (Manski, 2020b, Schmidt and Gschwend, 2020).

In speziellen Fällen können aber auch andere Behandlungsmöglichkeiten, wie z. B. partielle Zystektomie oder Radiochemotherapie mit Harnblasenerhalt, neben den hier dargestellten Standardtherapien in Frage kommen (Manski, 2020b).

In den letzten Jahren wurden auch neuere vielversprechende Therapiestrategien entwickelt, wie der Einsatz von Immun-Checkpoint-Inhibitoren, die die Krebs-

behandlung revolutioniert haben und bereits in die Leitlinienbehandlung des UCB eingegangen sind (Leitlinienprogramm Onkologie, 2025).

2.2 Immuntherapie und ihre Bedeutung beim UCB

Der folgende Absatz basiert auf einer vorangegangenen Studienarbeit der Autorin E. Fuchs (Fuchs, 2020) und beleuchtet die historischen Wurzeln und den Verlauf der Immuntherapie (siehe Anhang). Die Ursprünge der Immuntherapie reichen bis ins 19. Jahrhundert zurück, als William Coley erste Erfolge bei der Behandlung von Krebspatient:innen durch Vakzinierung verzeichnete (Coley, 1910). Mit dem Aufkommen neuer, vielversprechender Therapieansätze wie der Chemotherapie und Bestrahlung geriet die Immuntherapie jedoch zunehmend in den Hintergrund (Hoption Cann et al., 2003). Erst die Entwicklung und klinische Anwendung von ICI leitete eine Renaissance dieser Behandlungsform ein und markierte zugleich ihren wissenschaftlichen Durchbruch. Immuncheckpoint-Rezeptoren wie CTLA-4 und PD-1 spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation der T-Zell-Aktivität, indem sie das Immunsystem durch Hemmung der Immunantwort unterdrücken (Bellmunt et al., 2017b, Bidnur et al., 2016, Ceeraz et al., 2013, Freeman et al., 2000, Hodi et al., 2016, Thompson and Allison, 1997). Wird diese hemmende Wirkung durch spezifische Antikörper blockiert, kann eine verstärkte anti-tumorale Immunantwort erzielt werden (Bidnur et al., 2016). Die Bedeutung dieser therapeutischen Innovation wurde 2018 durch die Verleihung des Nobelpreises für Physiologie oder Medizin an James P. Allison und Tasuku Honjo gewürdigt, die maßgeblich zur Entdeckung der Immuncheckpoint-Proteine (ICPs) CTLA-4 (Hodi et al., 2003, Kwon et al., 1997, Leach et al., 1996) und PD-1 (Ceeraz et al., 2013, Freeman et al., 2000, Hodi et al., 2016, Thompson and Allison, 1997) beigetragen haben (NobelPrize.org, 2018). Heute sind ICIs bereits fester Bestandteil in der Behandlung verschiedener Tumorarten, darunter des Melanoms (Callahan et al., 2013, Leitlinienprogramm Onkologie, 2020, Robert et al., 2011, Robert et al., 2015, Weber et al., 2015), des UCBs (Aggen and Drake, 2017, Bellmunt et al., 2017b, Leitlinienprogramm Onkologie, 2025, Powles et al., 2018, Rosenberg et al., 2016, Sharma et al., 2017) sowie des Lungenkarzinoms (Antonia et al., 2018, Faivre-Finn et al., 2021, Felip et al., 2021, Leitlinienprogramm Onkologie, 2022, Vansteenkiste et al., 2019, West et al., 2019).

Mit der Zulassung von BCG im Jahr 1990 wurde das nicht-muskelinvasive UCB zu einem der ersten soliden Tumoren, die mit einem immunologischen Ansatz behandelt wurden. Der Erfolg der BCG-Therapie verdeutlicht die Immunsensitivität von bestimmten Karzinomen und macht das UCB gleichzeitig zu einem Kandidaten für die Testung der Immuncheckpointtherapie (Bellmunt et al., 2017b, Donin et al., 2017). Der avirulente Stamm von *Mycobacterium bovis* führt in der Harnblase zu einer lokalen inflammatorischen Reaktion. Die bakterielle Zystitis führt zu einer Granulombildung und Immunzellen wie Granulozyten und Lymphozyten werden aktiviert. Diese Immunantwort führt indirekt zu einer Tumorzellzerstörung, einer Immunisierung gegen die Tumorzellen und übt dadurch eine antikanzerogene Wirkung aus (Böhle and Brandau, 2003, Manski, 2020b, Manski, 2020a, Redelman-Sidi et al., 2014, Schmidt and Gschwend, 2020). Des Weiteren reduziert die Behandlung mit BCG das Rezidivrisiko im Vergleich zu einer alleinigen TURB um ungefähr 50% (Manski, 2020a, Manski, 2020b, Shelley et al., 2001, Schmidt and Gschwend, 2020).

Für die Zweitlinientherapie des metastasierten UCB in Europa sind folgende ICIs zugelassen: Atezolizumab (monoklonaler Antikörper gegen PD-L1; Roche), Nivolumab (monoklonaler Antikörper gegen PD-1; Bristol-Meyers Squibb) und Pembrolizumab (monoklonaler Antikörper gegen PD-1; Merck-Sharp and Dome). Atezolizumab und Pembrolizumab sind sogar für die Erstlinientherapie im Falle von Cisplatin-ungeeigneten fernmetastasierten Patient:innen mit positivem PD-L1-Status (Pembrolizumab: CPS (combined positive score) ≥ 10 ; Atezolizumab PD-L1-Expression auf tumorinfiltrierenden Tumorzellen im Tumormaterial: $\geq 5\%$) zugelassen. CPS ist die Anzahl PD-L1 positiver Tumor- und Immunzellen dividiert durch die Gesamtanzahl aller vitalen Tumorzellen im Tumormaterial, multipliziert mit 100. Für die Anwendung dieser Antikörper sprechen die bessere Verträglichkeit einer Zweitlinienchemotherapie und eine relativ hohe Rate an partieller und kompletter Remission (Aggen and Drake, 2017, Bidnur et al., 2016, Leitlinienprogramm Onkologie, 2025, Manski, 2020b, Manski, 2020a, Schmidt and Gschwend, 2020). Alle zugelassenen Antikörper weisen eine ähnliche objektive Ansprechrate von 15-23% auf (Aggen and Drake, 2017). Des Weiteren zeigte Atezolizumab unter Progress nach Cisplatin-Chemotherapie eine komplette Remission in 5% der Fälle (Rosenberg et al., 2016), und Pembrolizumab zeigte im Vergleich zur Zweitlinientherapie eine höhere Ansprechrate (21% vs. 11%) und ein verlängertes Überleben (10 vs. 7 Monate) (Bellmunt et al., 2017a).

Des Weiteren ist Avelumab (Anti-PD-L1-Antikörper) in der Erstlinien-Erhaltungstherapie bei fortgeschrittenen und/oder metastasierten UCB-Patient:innen zugelassen, die nach einer platinbasierten Chemotherapie progressionsfrei sind (Wörmann et al., 2021).

Beim lokalisierten muskelinvasiven UCB sollte als adjuvante Therapie Nivolumab angeboten werden, wenn die Tumorzellen eine PD-L1-Expression $\geq 1\%$ (TPS) aufweisen und entweder ein mit neoadjuvanter Cisplatin-basierter Chemotherapie vorbehandelter UCB im Tumorstadium T2-T4 und/oder mit Lymphknotenmetastasierung vorliegt oder bei Stadium T3-T4 mit/ohne Lymphknotenmetastasierung bei Cisplatin-ungeeigneten (oder Cisplatin-basierende Chemotherapie ablehnenden) Patient:innen ohne neoadjuvante Chemotherapie (Leitlinienprogramm Onkologie, 2025). Die Zulassung für dieses Setting beruht auf der Phase-III-Studie CheckMate 274 (NCT02632409), die eine signifikante Verbesserung des krankheitsfreien Überlebens mit Nivolumab im Vergleich zu Placebo zeigte (Bajorin et al., 2021, Galsky et al., 2025). Interessant ist zu erwähnen, dass die FDA hingegen eine Zulassung für alle UCB-Patient:innen unabhängig vom PD-L1-Status erteilt hat (Leitlinienprogramm Onkologie, 2025). Ähnlich gute Ergebnisse bezüglich des krankheitsfreien Überlebens zeigte eine aktuelle Veröffentlichung mit Pembrolizumab in ähnlichem Setting (Studie AMBASSADOR, NCT03244384) (Apolo et al., 2025).

Der Stellenwert von ICIs als neoadjuvante Immuntherapie bei lokalisierten muskelinvasiven UCB ist aktuell noch nicht vollständig geklärt und aktuell (noch) nicht zugelassen. Daten für den Einsatz von ICIs in diesem Setting liegen aus mehreren Phase-II und Phase-III Studien (wie z. B. ABACUS (NCT02662309, Phase-II) (Powles et al., 2019, Szabados et al., 2021), PURE-01 (NCT02736266, Phase-II, (Basile et al., 2022, Necchi et al., 2018, Necchi et al., 2020), und NIAGARA (Phase-III (Powles et al., 2024) vor. Letztere, in *The New England Journal of Medicine* publizierte Arbeit zeigte, dass perioperative ICI-Therapien mit Durvalumab gemeinsam mit neoadjuvanter Chemotherapie zu einer signifikanten Verbesserung des ereignisfreien und des Gesamtüberlebens im Vergleich zur alleinigen neoadjuvanten Chemotherapie führte (Powles et al., 2024). Bei den zwei genannten Phase-II-Studien wurde bei ICI-Monotherapie pathologische Remission beobachtet (Necchi et al., 2020, Necchi et al., 2018, Powles et al., 2019). In einem kürzlich veröffentlichten Update zur PURE-01-Studie nach einer medianen Nachbeobachtungszeit von drei Jahren wurde die nachhaltige Wirksamkeit von neoadjuvanter ICI-

Therapie bestätigt (Basile et al., 2022). Sollten sich diese Daten in weiteren klinischen Studien (größeren Phase-II- und Phase-III-Studien) bestätigen, wären ICIs auch eine Option für neoadjuvante Behandlungen als Ergänzung zur Chemotherapie oder für Cisplatin-ungeeignete Patient:innen bei lokalisierten muskelinvasiven UCBs. Jedoch können neoadjuvante Monotherapien mit ICIs vor radikaler Zystektomie bei unzureichender Effektivität nicht als neuer Therapiestandard gelten (Leitlinienprogramm Onkologie, 2025, Lewerich et al., 2023).

Trotz der vielversprechenden Ergebnisse der ICI-Therapien gibt es noch eine Reihe von Problemen. So können im Laufe der Therapien Resistenzen entstehen. Darüber hinaus fehlen verlässliche Biomarker, die bei der Vorhersage des Ansprechens auf diese Therapien helfen (Aggen and Drake, 2017, Bidnur et al., 2016). Zudem liegt die durchschnittliche Ansprechrate unter 30% (Brahmer et al., 2010, Brahmer et al., 2012, Callahan et al., 2014, Hodi et al., 2010, Postow et al., 2015b, Postow et al., 2015a, Topalian et al., 2012, Xu et al., 2018). Aus diesem Grund wird intensiv daran gearbeitet, eine weitere Entwicklung und Verbesserung der Behandlungsmöglichkeiten zu erzielen. Eine der möglichen Überlegungen besteht darin, die Aufmerksamkeit auf andere, weniger erforschte ICPs zu richten, wie z. B. auf VISTA.

2.3 Das Immuncheckpointprotein VISTA

Das folgende Kapitel basiert auf der Zusammenfassung einer vorangegangenen Studienarbeit zu Struktur, Expression und Funktion des Immun-Checkpoint-Proteins VISTA der Autorin E. Fuchs (siehe Anhang) und bietet einen Überblick über dieses Protein, ergänzt durch aktuelle wissenschaftliche Erkenntnisse (Fuchs, 2020). VISTA ist ein Typ-I-Membranprotein, das auch unter den Bezeichnungen B7H5, C10orf54, DD1 α , Dies1, Gi24, PD-1H oder dem Gensymbol 4632428N05Rik bekannt ist (Ren et al., 2013). Es wurde erstmals im Jahr 2011 in Mausmodellen als negativer Regulator der T-Zell-Antwort beschrieben (Wang et al., 2011, Flies et al., 2011). VISTA gehört zur B7/CD28-Liganden-Rezeptor-Familie (EITanbouly et al., 2020b, Flies et al., 2011, Ni and Dong, 2017, Wang et al., 2011).

Humanes und murines VISTA zeigen eine hohe Sequenzhomologie von über 80%. Innerhalb der B7-Proteinfamilie weist VISTA die größte Ähnlichkeit zu PD-L1 auf (Mehta et al., 2019, Wang et al., 2011, Xu et al., 2018). Dennoch besitzt VISTA eine einzigartige Struktur, die es von anderen Familienmitgliedern unterscheidet: So enthält es beispielsweise drei spezifische Cystein-Reste in seiner extrazellulären Domäne –

ein Merkmal, das in der B7-Familie sonst nicht beobachtet wird (ElTanbouly et al., 2020b, Flies et al., 2011, Ni and Dong, 2017, Wang et al., 2011), sowie keine zweite Immunglobulin-Domäne, die für diese Proteinfamilie eigentlich charakteristisch ist (ElTanbouly et al., 2020b, Flies et al., 2011, Ni and Dong, 2017, Wang et al., 2011). Obwohl VISTA keine klassischen Immunrezeptor-Tyrosin-basierten Aktivierungs- oder Inhibitions motive (ITAM/ITIM - immunoreceptor tyrosine-based activation/inhibitory motif) enthält, verfügt es über mehrere Phosphorylierungsstellen für Caseinkinase 2 und Proteinkinase C, über die es intrazelluläre Signalwege aktivieren kann (Flies et al., 2011, Mehta et al., 2019). Dadurch kann VISTA sowohl als Rezeptor als auch als Ligand fungieren – eine Eigenschaft, die unter dem Begriff des Rezeptor-Ligand-Paradigmas beschrieben wird (Gao et al., 2024, Mehta et al., 2019, Nowak et al., 2017).

Diese doppelte Funktion wurde durch verschiedene Studien belegt: Einige deuten auf eine Liganden-Rolle auf antigenpräsentierenden Zellen hin (Flies et al., 2011, Lines et al., 2014a, Wang et al., 2011), andere beschreiben VISTA als Rezeptor auf T-Zellen (Flies et al., 2014, Flies et al., 2015), und wiederum andere zeigen beide Aktivitäten parallel (Flies et al., 2014, Yasinska et al., 2020). Die genauen Signalwege und Bindungspartner von VISTA sind jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Lange Zeit galten diese als unbekannt (Xu et al., 2018), inzwischen existieren mehrere Hypothesen. Eine Theorie besagt, dass VISTA zur Dimerisierung fähig ist (Yoon et al., 2015). Darüber hinaus wurden mehrere mögliche Bindungspartner identifiziert, darunter IGSF11 (Immunoglobulin superfamily member 11), auch bekannt als VSIG-3 (V-Set and Immunoglobulin domain containig 3) (Mehta et al., 2019, Tang et al., 2022, Wang et al., 2019, Yang et al., 2017), PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) (ElTanbouly et al., 2020a, Johnston et al., 2019), Galectin-9 (Yasinska et al., 2020) oder MMP-13 (Matrix metalloproteinase-13) (Fu et al., 2023). Einige Studien bringen VISTA zudem mit dem BMP4-Signalweg (Bone Morphogenetic Protein 4) in Verbindung, der eine Rolle in der Zelldifferenzierung spielt (Oliveira et al., 2016, Parisi et al., 2012).

VISTA besitzt vielfältige immunologische und nicht immunologische Funktionen (siehe *Abbildung 2*). Des Weiteren übt VISTA einen die Anti-Tumor-Immunität behindernden Effekt aus und erleichtert dadurch die Tumoremmunevasion (Deng et al., 2019, Flies et al., 2014, Kondo et al., 2016, Le Mercier et al., 2014, Mulati et al., 2019, Wang et al., 2011, Wang et al., 2014, Wang et al., 2018a). Jedoch ist die prognostische Bedeutung des ICPs unklar (Gao et al., 2024, Shekari et al., 2023).

Zum Beispiel wurde über eine positive prognostische Bedeutung beim Pankreaskarzinom (Hou et al., 2021), beim Mammakarzinom (Cao et al., 2020, Zong et al., 2020a), beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom NSCLC (Villarroel-Espindola et al., 2018), beim Ösophagus-Adenokarzinom (Loeser et al., 2019), beim hepatozellulären Karzinom (Zhang et al., 2018), beim Ovarialkarzinom (Zong et al., 2020b) und beim Kolonkarzinom (Wu et al., 2021, Zong et al., 2021) berichtet, jedoch zeigten sich negative prognostische Effekte bei akuter myeloischer Leukämie (AML) (Mo et al., 2023, Pagliuca et al., 2022), beim oralen Plattenepithelkarzinom (Wu et al., 2017), beim Melanom (Kuklinski et al., 2018) beim Nierenzellkarzinom (Zapala et al., 2023), beim Adenokarzinom der Lunge (Long et al., 2022), beim NSCLC (Ma et al., 2022), beim Kolonkarzinom (Deng et al., 2019), beim Ovarialkarzinom (Liao et al., 2018) und beim Magenkarzinom (Hu et al., 2020). Sogar bei den gleichen Tumorentitäten (NSCLC, Ovarialkarzinom, Kolonkarzinom) wurden widersprüchliche Ergebnisse veröffentlicht.

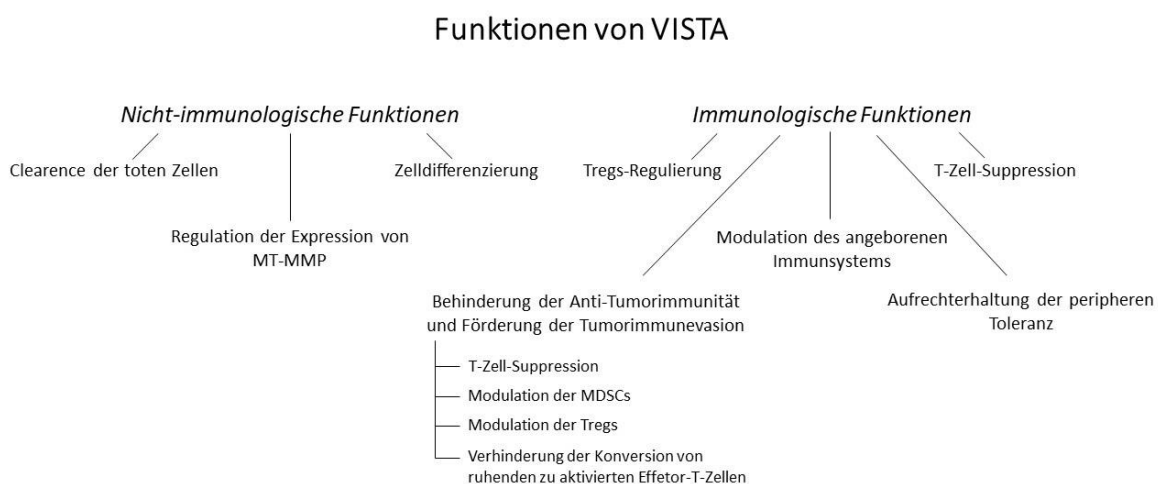


Abbildung 2: Bisher bekannte Funktionen von VISTA.

VISTA übt vielfältige immunologische Funktionen aus, wie die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz (Ceeraz et al., 2017, ElTanbouly et al., 2020b, Flies et al., 2014, Le Mercier et al., 2014, Liu et al., 2015, Sergent et al., 2018, Wang et al., 2011, Wang et al., 2014), die Regulierung der Tregs (Regulatorische T-Zellen) (Le Mercier et al., 2014, Lines et al., 2014a), Modulationen des angeborenen Immunsystems (Bharaj et al., 2014, Broughton et al., 2019, Ceeraz et al., 2017, Li et al., 2017, Sergent et al., 2018, Wang et al., 2014, Xu et al., 2018) T-Zell-Suppression (Flies et al., 2014, Li et al., 2017, Lines et al., 2014a) und nicht immunologische Funktionen, wie die Beeinflussung der Zelldifferenzierung (Aloia et al., 2010, Oliveira et al., 2016, Ren et al., 2013), die Beteiligung an der Phagozytose als eine Methode für die Clearance von abgestorbenen Zellen (Yoon et al., 2015) sowie eine fördernde Wirkung auf das invasive Wachstum von Tumoren durch Heraufregulierung der Expression vom MT1-MMP (Membrane type 1-matrix metalloproteinase) (Sakr et al., 2010). Aus der

Sowohl in der Maus als auch beim Menschen ist VISTA in erster Linie in hämatopoetischen myeloischen und lymphatischen Zellen und Geweben mit starker Leukozyteninfiltration exprimiert (Bharaj et al., 2014, Flies et al., 2011, Gao et al., 2024, Lines et al., 2014a, Lines et al., 2014b, Wang et al., 2011, Xu et al., 2018). VISTA ist sogar signifikant auf Plasmazellen nachweisbar (ElTanbouly et al., 2020a), obwohl ruhende CD19⁺-B-Zellen eher VISTA-negativ sind (Bharaj et al., 2014). Eine Besonderheit von VISTA im Gegensatz zu den anderen ICPs besteht darin, dass es konstitutiv auf den meisten Immunzellen exprimiert wird.

Die VISTA-Expression wurde außer beim gesunden Gewebe auch bei verschiedenen Tumorerkrankungen untersucht. Das ICP VISTA ist in Tumorgeweben, meistens in der Tumormikroumgebung (über)exprimiert. Zunächst wurde die VISTA-Expression ausschließlich in tumorinfiltrierenden Lymphozyten nachgewiesen (Le Mercier et al., 2014, Le Mercier et al., 2015, Lines et al., 2014a, Lines et al., 2014b, Gao et al., 2017, Kakavand et al., 2017, Kuklinski et al., 2018, Wu et al., 2017). Später gelang es, die Expression von VISTA auch auf den Tumorzellen von verschiedenen malignen Tumorentitäten zu detektieren: z. B. bei der AML (Wang et al., 2018a), beim Magenkarzinom (Boger et al., 2017), beim Kolorektalkarzinom (Xie et al., 2018), beim Ovarialkarzinom (Liao et al., 2018), beim NSCLC (Villarroel-Espindola et al., 2018), beim Melanom (Edwards et al., 2019), beim Mammakarzinom (Zong et al., 2020a) und beim hepatozellulären Karzinom (Zhang et al., 2018). Jedoch war die Expression auf den Tumorzellen außer in der Studie von Zhang und Mitarbeitern zum hepatozellulären Karzinom, in der über eine ähnliche Expressionsrate in Immun- (16,9%) und Tumorzellen (16,4%) berichtet wurde (Zhang et al., 2018), geringer als auf den Immunzellen.

Interessanterweise wurde eine VISTA-Expression auf Tumorzellen bei Magenkarzinomen (Boger et al., 2017) beschrieben, die früher als VISTA-negativ galten (Oliveira et al., 2016). Diese Unterschiede könnten durch die geringe Positivitätsrate von VISTA begründet sein, sodass ausreichend große Patientenkohorten erforderlich sind, um auch VISTA-positive Fälle zu erfassen.

Eine ähnliche Begründung wurde auch von Xie und seinen Mitarbeitern formuliert, die beschrieben, dass nur bestimmte Subtypen von Tumorzellen VISTA exprimieren (Xie et al., 2018).

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass bisher als VISTA-negativ geltende Tumorentitäten, wie z. B. das UCB (LeMercier et al., 2014), durch Untersuchung einer größeren Patient:innen-Kohorte/Tumoranzahl und Einschluss verschiedener Tumorsubtypen bzw. neuer Antikörper und Detektionssysteme auch VISTA-Positivität aufweisen könnten. Daher ist die erneute Untersuchung einer möglichen VISTA-Expression von UCB-Tumorzelllinien sinnvoll.

Neben den Proteinmustern wurde auch die Regulation der Expression von *VSIR* untersucht. Die *VSIR* -Expression wird durch inflammatorische Reaktionen (Bharaj et al., 2014, ElTanbouly et al., 2020b, Li et al., 2017, Wang et al., 2011, Xu et al., 2018), durch Promotorhypermethylierung (Oliveira et al., 2016) (Mulati et al., 2019), durch das Tumorsuppressorprotein TP53 (Tumor Protein 53) (Yoon et al., 2015, Oliveira et al., 2016, Xu et al., 2018), durch Hypoxie (Deng et al., 2019), durch Überexpression verschiedener Mikro-RNAs (Micro Ribonucleic acid – Mikro-Ribonukleinsäure (mRNA)(Battista et al., 2013, Oliveira et al., 2016, Parisi et al., 2012) und im Melanom durch den über BRAF (V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B) regulierten Stammzellofaktor FOXD3 (Forkhead box D3) (Rosenbaum et al. 2020) beeinflusst.

Im Gegensatz zu anderen ICPs übten inflammatorische Zytokine, wie IFN- γ (Interferon-gamma) und TGF β (Transforming Growth Factor- β), in mehreren Studien keinen signifikanten Effekt auf die *VSIR*-Expression aus (Mulati et al., 2019, Rosenbaum et al., 2020), wohingegen jedoch in einem EMT-Modell, in dem die Zellen durch TGF β -Behandlung einen mesenchymalen Charakter erlangt haben, über eine *VSIR*-Herabregulation berichtet wurde (Oliveira et al., 2016). Des Weiteren wurde in einer kürzlich publizierten Arbeit ebenso von einer *VSIR*-Expressionskontrolle durch TGF β berichtet. In dieser Arbeit zeigte sich abhängig von der zytotoxischen Aktivität der untersuchten Zellen ein herauf- oder herabregulierender Effekt auf die VISTA-Expression in den T-Zellen. Zudem wurde auch über eine Expressionskontrolle durch TGF β in einer humanen Wilms-Tumorzelllinie und in benignen, schnell-proliferierenden menschlichen Keratinozyten berichtet. Jedoch

zeigte eine humane Brusttumorzelllinie, die negativ für VISTA-Expression ist, keinen Effekt auf die VISTA-Expression durch TGF β (Schlichtner et al., 2022).

Aufgrund dieser unterschiedlichen Ergebnisse ist es sinnvoll, die Regulation der Expression von VISTA/VS/R bei verschiedenen UCB-Zelllinien durch die Zytokine IFN- γ und TGF β zu untersuchen.

Eine therapeutische Bedeutung des Proteins wird aktuell untersucht. Studien in Tiermodellen haben gezeigt, dass die gleichzeitige Hemmung von VISTA und PD-L1 zu einer signifikanten Unterdrückung des Tumorwachstums führte, während die Behandlung mit einem einzelnen monoklonalen Antikörper weitgehend unwirksam war. Des Weiteren wurde gezeigt, dass VISTA bei der Regulation der T-Zell-Aktivierung eine nicht redundante Rolle einnimmt, die sich vom PD-1/PD-L1-Signalweg unterscheidet (Liu et al., 2015). Es wurde beispielsweise erhöhte VISTA-Expression in Melanom- und Prostata Tumoren von Patienten festgestellt, die sich einer Anti-PD-1- und Anti-CTLA-4-Therapie unterzogen, was darauf hinweist, dass VISTA-Expression einen erworbenen Resistenzmechanismus darstellt (Gao et al., 2017, Kakavand et al., 2017). Des Weiteren zeigte sich in einem murinen Mammakarzinom-Modell Bestrahlung verbunden mit Cyclophosphamid, sowie VISTA- und P-1-Blockade effektiv (Pilonis et al., 2020). Diese Ergebnisse unterstreichen das Potenzial für die Entwicklung von VISTA-gerichteten Therapien und Kombinationsbehandlungsstrategien.

Derzeit finden zahlreiche klinische Studien zu VISTA statt, in denen mehrere monoklonale Antikörper gegen VISTA und ein niedermolekularer Hemmstoff geprüft werden (Gao et al., 2024). JNJ-61610588, auch als VSTB112 oder CI-8993 bezeichnet, ist der erste vollständig humane anti-VISTA monoklonale Antikörper, der in präklinischen Studien vielversprechende Ergebnisse zeigte. Eine Phase-I-Studie zur Bewertung der Sicherheit und Verträglichkeit von JNJ-61610588 bei Teilnehmern mit fortgeschrittener Krebserkrankung wurde 2016 begonnen, aber 2018 aufgrund einer Geschäftsentscheidung abgebrochen (NCT02671955). Trotz des vorzeitigen Abbruchs konnte die Wirksamkeit bei einzelnen Patient:innen nachgewiesen werden. Die erzielten Ergebnisse bestätigten die Sicherheit des Medikaments, das bei den meisten Patienten keine nennenswerten Nebenwirkungen aufwies. Zu einer erneuten Phase-I-Studie (NCT04475523) sind bis jetzt keine Ergebnisse veröffentlicht

worden (Chmiel et al., 2023, Gao et al., 2024, Tagliamento et al., 2021, Tang et al., 2022, Shekari et al., 2023)

CA-170 (NCT02812875) ist ein erster oral verabreichter, niedermolekularer Antagonist, der selektiv auf PD-L1 und VISTA abzielt, was zu einer Aktivierung der T-Zellen und der Produktion von Zytokinen führt, und in mehreren präklinischen Modellen eine Anti-Tumor-Aktivität gezeigt hat (Li and Tian, 2019, Powderly et al., 2017, Sasikumar et al., 2021). Eine Phase-I-Studie wurde bereits durchgeführt (NCT02812875)(Yung Jue Bang and Hamilton, 2018). Die Phase-II-Studie zu CA-170 wurde unter der Kenn-Nr. CTRI/2017/12/011026 in Indien durchgeführt und umfasste Patient:innen mit fortgeschrittenen soliden Tumoren und klassischem Hodgkin-Lymphom. Veröffentlichte Ergebnisse dieser Studie sind begrenzt, zwei Abstracts berichteten über einen guten klinischen Nutzen (clinical benefit rate)(Chmiel et al., 2023, Gao et al., 2024, Radhakrishnan et al., 2019, Shekari et al., 2023, Tagliamento et al., 2021, Tang et al., 2022, Vivek S. Radhakrishnan, 2019).

W0180, auch als K0401-020 bezeichnet, ist ein anderer VISTA-Antikörper, der die Interaktion zwischen PSGL-1 und VISTA unterbricht und aktuell in einer Phase-I-Studie (NCT04564417) als Monotherapie oder als Kombinationstherapie mit Pembrolizumab untersucht wird (Chmiel et al., 2023, Gao et al., 2024, Loukili et al., 2019, National Institutes of Health, 2020, Shekari et al., 2023).

Derzeit befinden sich drei weitere VISTA-Antikörper in klinischen Studien in der Rekrutierungsphase: HMBD-002 (NCT05082610), KVA12123 (NCT05708950) und SNS-101 (NCT05864144) (Chmiel et al., 2023, Gao et al., 2024).

2.4 Bedeutung von zirkulierenden Tumorzellen (circulating tumor cells – CTCs) bei UCB-Patient:innen

Während die radikale Zystektomie bei der Mehrheit der Patient:innen mit organbegrenzten Tumoren eine langfristige Tumorkontrolle und Langzeitüberleben ermöglicht, haben mehr als die Hälfte der Patient:innen mit fortgeschrittenen und lymphatisch-metastasierten Tumoren eine schlechtere Prognose (Stein et al., 2001). Die Mehrheit der UCB-Patient:innen, die Metastasen entwickeln, erleidet das Rezidiv innerhalb von ein bis zwei Jahren nach der Operation. Laut Rink und Mitarbeitern beträgt der mediane Abstand zwischen radikaler Zystektomie und Rezidiv 10

Monate (Rink et al., 2013). Dieses relativ kurze Zeitintervall weist darauf hin, dass diese Tumorerkrankten wahrscheinlich schon zum Zeitpunkt der radikalen Zystektomie Mikrometastasen aufwiesen, die durch die Standard-Screeningmethoden (wie z. B. Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT)) nicht nachweisbar waren (Soave et al., 2015).

Derzeit ist für das UCB kein Tumor- oder Biomarker bekannt, der die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Rezidivs und so den Bedarf für ein multimodales Therapiekonzept begleitend zur radikalen Zystektomie vorhersagen könnte (Leitlinienprogramm Onkologie, 2025, Rink et al., 2012a, Soave et al., 2015). Aus diesem Grund wäre ein prädiktiver Biomarker dringend erforderlich, um Patient:innen zu identifizieren, bei denen ein Tumorrezidiv durch eine multimodale Behandlung verhindert werden könnte. Andererseits könnte die andere Hälfte der Patientenpopulation, die wahrscheinlich nicht von einer zusätzlichen Therapie profitieren würde, vor einer Überbehandlung bewahrt werden.

Mehrere Studien weisen darauf hin, dass CTCs geeignete Kandidaten für diese Zielsetzung sein könnten. Zum Beispiel ist die Anwesenheit von CTCs bei mehreren Tumorentitäten, wie beim Kolorektalkarzinom, Mammakarzinom, Prostatakarzinom oder beim NSCLC, mit schlechterer Prognose assoziiert (Cohen et al., 2009, Cristofanilli et al., 2004, de Bono et al., 2008, Krebs et al., 2011). Auch beim UCB ist dieser Effekt nachweisbar. CTC-positive UCB-Patient:innen zeigten schlechteres Gesamt-, rezidivfreies- und krankheitsspezifisches Überleben (Gazzaniga et al., 2012, Gazzaniga et al., 2014, Rink et al., 2011, Rink et al., 2012b, Soave et al., 2017). Eine Studie von Soave und Mitarbeitern hat sogar gezeigt, dass der CTC-Status von UCB-Patient:innen bei der Entscheidung über eine adjuvante Chemotherapie nach radikaler Zystektomie hilfreich sein könnte.

In dieser Studie wurden alle Patient:innen auf das Vorhandensein von CTCs geprüft, dann operiert und anschließend hat ein Teil der Patient:innen Chemotherapie erhalten. Bei den Patient:innen, die keine adjuvante Chemotherapie erhalten haben, war das Vorhandensein von CTCs mit der Tumorrezidivrate sowie mit verringertem tumorspezifischen- und Gesamtüberleben assoziiert. Währenddessen gab es bei den Patient:innen, die Chemotherapie erhalten haben, hinsichtlich des CTC-Status keinen Unterschied in den genannten Endpunkten (Soave et al., 2017). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit zahlreichen Studien bei anderen Tumorentitäten,

die CTCs als einen hilfreichen Marker für die Entscheidung über eine nötige ergänzende Chemotherapie betrachten (de Bono et al., 2008, Gazzaniga et al., 2013, Giuliano et al., 2011).

CTCs sind maligne Tumorzellen verschiedener Tumorentitäten, die im peripheren Blut zirkulieren und fähig sein können, Metastasen zu bilden (Allard et al., 2004, Pantel and Speicher, 2016). Metastasen sind Tochtergeschwülste von Primärtumoren, die für die Mehrheit der krebsbedingten Todesfälle (90%) verantwortlich sind (Chaffer and Weinberg, 2011, Gupta and Massague, 2006, Pantel et al., 2009, Pantel and Alix-Panabieres, 2010, Wagener, 2010). Die Metastasierung ist ein komplexer biologischer Prozess, bei dem sich maligne Zellen von der Primärläsion auf andere Stellen im Körper ausbreiten können, und der in folgende Schritte unterteilt werden kann: Tumorzelldissoziation vom Primärtumor, Zellmigration, lokale Invasion, Intravasation, Überleben in der Zirkulation und Dissemination, Extravasation und anschließende Kolonisierung an der sekundären Stelle und Etablierung von Metastasen. Stattdessen können sich die disseminierten Tumorzellen nach der Extravasation auch in einer Art Ruhephase (Tumordormanz, tumor dormancy) befinden. Die Tumordormanz kann bis zu Jahrzehnten andauern, in denen keine Zellproliferation stattfindet (Pantel and Speicher, 2016).

Mehrere Studien haben gezeigt, dass bei aggressiven Krebsarten täglich bis zu mehreren tausend Tumorzellen in die Blutbahn gelangen (Pantel and Speicher, 2016), jedoch gelingt es nur einem Bruchteil (etwa 0,01% (Tjensvoll et al., 2014) der Zellen, im Kreislauf zu überleben und an einem anderen Ort Metastasen zu induzieren (Kang and Pantel, 2013).

Wie genau der Prozess der Tumorzelldissoziation abläuft, ist noch nicht vollständig geklärt. Umfangreiche Studien belegen, dass die EMT beteiligt ist (Pantel and Speicher, 2016). EMT ist ein Prozess, der sowohl bei physiologischen Abläufen, wie z. B. der embryonalen Entwicklung oder Wundheilung, als auch bei pathologischen Prozessen, wie der Organfibrose und der Metastasen-Bildung, stattfindet. Bei diesem Prozess verlieren die Zellen ihre epithelialen Eigenschaften und nehmen mesenchymale Zelleigenschaften an. Die Zellen verlieren ihre epithelialen zelltypspezifischen engen Zell-Zell-Verbindungen, wie *tight junctions* und Desmosomen. Begleitend verlieren sie ihre apikobasale Polarisation und ihre basale Lamina. Im Gegensatz dazu haben mesenchymale Zellen eine fibroblastenähnliche

Morphologie, nur lockere Zell-Zell-Kontakte, verbesserte migratorische und invasive Kapazitäten sowie einen erhöhten Widerstand gegen Apoptose. Durch diese Veränderungen können sich die Tumorzellen besser im menschlichen Blutkreislauf bewegen und an sekundären Orten durch den gegensätzlichen Prozess, die sogenannte mesenchymale-epitheliale Transition (MET), wieder ihre ursprünglichen epithelialen Eigenschaften annehmen und Metastasen bilden. Diese Veränderungen können auch anhand von an der Zelloberfläche lokalisierten Proteinen beobachtet werden. Typische epitheliale Marker sind beispielsweise EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule), E-Cadherin, Claudine, Occludine, Desmopaktin, Mucin-1 und verschiedene Zytokeratine. Spezifisch für das mesenchymale Stadium sind beispielsweise Vimentin, Fibronectin, Vitronectin oder β -Catenin. Während der EMT verlieren die Zellen die epithelialen Markerproteine und exprimieren vermehrt die Proteine, die für das mesenchymale Stadium typisch sind. Die EMT/MET ist ein komplizierter und hoch koordinierter Prozess, der von verschiedenen Signalwegen und von Faktoren beeinflusst wird, wie z. B. den Transkriptionsfaktoren SNAI1 und 2, Hypoxie, TGF β sowie dem Wnt- und dem Notch-Signalweg (Kalluri and Weinberg, 2009, Thiery, 2002, Thiery and Sleeman, 2006, Thiery et al., 2009).

Alternative Theorien besagen, dass sich die Zellen in Gruppen oder Clustern vom primären Ort absiedeln (Pantel and Speicher, 2016), durch passive Prozesse, wie Einschwämmen und Abschilfern in den Blutkreislauf gelangen (Tjensvoll et al., 2014) oder durch Zentrosomen-Amplifikation eine erhöhte Motilität erlangen (Joosse et al., 2015). Bei diesen Prozessen bleiben die epithelialen Eigenschaften der Tumorzellen erhalten.

2.5 Anreicherung und Detektion von CTCs

CTCs können im peripheren Blut von Krebspatient:innen nachgewiesen werden und bieten dadurch im Vergleich zu aufwendigeren und schmerzhaften Methoden, wie Gewebe- und Knochenmarksentnahme, eine einfache und weniger invasive Möglichkeit, wertvolle Informationen zum Staging, zur Genetik und Biologie der individuellen Krebserkrankung zu erlangen. Des Weiteren können genetische Merkmale zwischen Primärtumor und Metastasen unterschiedlich sein. So können z. B. bei HER2-negativen UCB- oder Mammakarzinom-Primärtumoren die CTCs HER2-Positivität aufweisen (Fehm et al., 2024, Jordan et al., 2016, Riethdorf et al., 2010, Rink et al., 2012b). Roßwag und Mitarbeiter beschäftigten sich mit metastasierten Östrogen-

Rezeptor-positiven Brustkrebs-Patient:innen, die im Verlauf eine Resistenz gegen Hormontherapie entwickelt haben. Es wurde gezeigt, dass CTCs von diesen Patient:innen für funktionelle Untersuchungen der Mechanismen der erworbenen endokrinen Resistenz nützlich sind und die Erprobung potenzieller medikamentöser Therapien zur Bekämpfung dieser Mechanismen ermöglichen (Rosswag et al., 2021). Durch CTC-Charakterisierung könnte eine an Metastasen-angepasste Therapie angewendet werden oder eine Therapieüberwachung ermöglicht werden (Ferreira et al., 2016, Nikanjam et al., 2022, Pantel and Alix-Panabieres, 2010). Ein anderer Vorteil besteht darin, dass eine solche Flüssigbiopsie („liquid biopsy“) wiederholt verfügbar ist, da Blutproben nichtinvasiv, z. B. auch in der Nachbeobachtung der Patient:innen, gewonnen werden können. Infolgedessen hat das Interesse an der Erforschung von CTCs in den letzten Jahren zugenommen.

Die größte Herausforderung für den diagnostischen Einsatz von CTCs ist ihre geringe Inzidenz, da im Durchschnitt nur eine oder wenige CTCs aus dem Hintergrund von 10^{6-8} hämatologischen Zellen nachgewiesen werden (Agashe and Kurzrock, 2020, Alix-Panabieres and Pantel, 2013, Ferreira et al., 2016, Koch et al., 2020, Nagrath et al., 2007, Rushton et al., 2021, Yap et al., 2019). Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit in „*Nature*“ weist sogar einen Zusammenhang zwischen dem zirkadianen Tags-Nacht-Rhythmus (ausgelöst durch Hormone, wie Glukokortikoide, Melatonin und Testosteron) und der CTC-Freisetzung vom Primärtumor mit tageszeitabhängiger CTC-Konzentration im Blut nach, die eine verlässliche Detektion zusätzlich erschweren könnte (Diamantopoulou et al., 2022). Aus diesem Grund wird eine außerordentlich sensitive und spezifische CTC-Anreicherungs-methode benötigt.

Heutzutage existieren zahlreiche mögliche CTC-Anreicherungs-methoden, die prinzipiell in zwei große Gruppen unterteilt werden können: die markerabhängigen und die markerunabhängigen Verfahren. Markerabhängige Methoden basieren auf der Anreicherung über Oberflächenproteine wie z. B. EpCAM (Ferreira et al., 2016, Habli et al., 2020, Pantel and Alix-Panabieres, 2019, Yap et al., 2019). Im Folgenden wird nur auf die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Technologien näher eingegangen.

Der Goldstandard der Anreicherung und Detektion von CTCs ist die durch die US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel (U.S. Food and Drug Administration - FDA)

zugelassene markerabhängige CellSearch®-Methode (Cristofanilli et al., 2004, FDA, 2004). Die Methode basiert auf einer immunomagnetischen Anreicherung von EpCAM-positiven Zellen (Cristofanilli et al., 2004). Dieses epitheliale Zelladhäsionsmolekül wird von einem Großteil der Tumorzellen in Primärtumoren und Metastasen exprimiert (Baeuerle and Gires, 2007, Gires et al., 2020, Winter et al., 2003).

Es wurde in zahlreichen Studien bei verschiedenen Tumorentitäten gezeigt, dass die durch CellSearch® erzielte CTC-Anzahl prognostische Relevanz besitzt (Aggarwal et al., 2017, Bidard et al., 2014, Bidard et al., 2018, Cohen et al., 2009, Cristofanilli et al., 2004, de Bono et al., 2008, Hayes et al., 2006, Janni et al., 2016, Krebs et al., 2011, Lindsay et al., 2017, Riethdorf et al., 2007, Trapp et al., 2019, van Dalum et al., 2015). In den oben erwähnten Studien zur prognostischen Bedeutung der CTC-Anzahl bei UCB-Patient:innen wurde diese Methodik ebenfalls angewendet. (Gazzaniga et al., 2012, Gazzaniga et al., 2014, Rink et al., 2011, Rink et al., 2012b, Soave et al., 2017). Wichtige Vorteile dieses Verfahrens sind die Standardisierung sowie die gute Reproduzierbarkeit (Allard et al., 2004, Rink et al., 2014), sodass vergleichbare Ergebnisse über mehrere Labore erzielt werden können. Aus diesen Gründen gilt es als Referenzsystem für alle weiteren CTC-Anreicherungsverfahren.

Nachteile dieser Methodik sind, dass Tumorzellen, die durch EMT ihren epithelialen Charakter (EpCAM- und/oder Keratinexpression) verloren haben, nicht detektiert werden können, sowie das untersuchte geringe Blutvolumen (7,5ml) (Armstrong et al., 2011, Cristofanilli et al., 2004, Ferreira et al., 2016, Lawrence et al., 2023, Rink et al., 2014). Zum Beispiel konnten Sieuwerts und Mitarbeiter bei einem EpCAM-negativen Mammakarzinom-Subtyp keine signifikante CTC-Detektion durch das CellSearch®-System erzielen (Sieuwerts et al., 2009). Des Weiteren wurde bis heute kein allgemeingültiges Tumorantigen für die universelle CTC-Anreicherung identifiziert (Agashe and Kurzrock, 2020, Ferreira et al., 2016).

Ein anderer Nachteil ist, dass während der Prozedur die Zellen fixiert werden, sodass keine nachgeschalteten Verfahren mit lebensfähigen CTCs möglich sind. Des Weiteren erfordert das System erfahrenes Personal zur Durchführung und Auswertung der Ergebnisse. Jedoch bestehen auch unter erfahrenen Auswertern des CellSearch®-Systems Meinungsverschiedenheiten über die korrekte Identifizierung einzelner CTCs (Kraan et al., 2011).

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass CTCs mesenchymale Charakteristika aufweisen können (Armstrong et al., 2011, Gorges et al., 2012, Kasimir-Bauer et al., 2012), sodass andere Verfahren als das CellSearch®-System eingesetzt werden müssen, um mesenchymale CTCs zu detektieren. Des Weiteren wurden auch EpCAM-negative epitheliale CTCs beschrieben, die durch Anreicherung mit EpCAM-basierten Methoden auch verloren gehen würden (Chudziak et al., 2016). Markerunabhängige Methoden basieren auf physikalischen Eigenschaften (Ferreira et al., 2016, Pantel and Alix-Panabieres, 2019), wie z. B. Anreicherung durch Zellgröße (Hao et al., 2018, Ma et al., 2013, Phillips et al., 2012a, Phillips et al., 2012b), Verformbarkeit der Zellen (Hou et al., 2009) oder Dichte (Rosenberg et al., 2002), und sind dadurch in der Lage, auch mesenchymale EpCAM- und/oder Keratin-negative CTCs zu detektieren.

Ein markerunabhängiges Verfahren ist Parsortix®. Das Parsortix®-System ist eine patentierte Methode mit limitierter Zulassung (seit Mai 2022) (FDA, 2022), mit der es möglich ist, CTCs aus peripherem Blut anzureichern. Dieses System basiert auf einer Mikrofluidik-Technologie. Die Selektion im Parsortix®-System ist abhängig von der Zellgröße und von der Verformbarkeit der Zellen und ermöglicht die Anreicherung von epithelialen und mesenchymalen CTCs (Ferreira et al., 2016, Hvichia et al., 2016, Miller et al., 2018, Xu et al., 2015b). Die limitierte FDA-Zulassung basiert auf einer Studie von Cohen und Mitarbeitern, die gezeigt haben, dass das Parsortix®-System CTCs effektiv aus dem peripheren Blut von metastasierten Mammakarzinom-Patient:innen gewinnen kann, und dass die gewonnenen Zellen mit ergänzenden, nachgeschalteten Methoden, wie z. B. Untersuchungen der Genexpression und/oder Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH), ausgewertet werden können (Cohen et al., 2022, Templeman et al., 2023).

Zu den Vorteilen dieses Systems zählt, dass die Anreicherung markerunabhängig erfolgt, wodurch auch mesenchymale, Keratin- und/oder EpCAM-negative CTCs detektiert werden können, und dass im Vergleich zu anderen Systemen weniger Leukozyten mitangereichert werden. Des Weiteren bleiben angereicherte CTCs unmodifiziert und lebensfähig, wodurch eine Vielzahl weiterer Analysen zur weiteren Charakterisierung der CTCs ermöglicht wird. (Hao et al., 2018, Hvichia et al., 2016, Xu et al., 2015b).

Hvichia und Mitarbeiter haben gezeigt, dass bei der Verarbeitung von 26 klinischen Proben kein statistisch signifikanter Unterschied in der Gesamtzellgewinnung zwischen Parsortix® und CellSearch® bestand (Hao et al., 2018, Hvichia et al., 2016). Des Weiteren wurden in 4 der 26 Blutproben nur durch Parsortix® (und nicht durch CellSearch®) CTCs nachgewiesen (Hvichia et al., 2016). Ähnliche Ergebnisse wurden auch in einer Studie mit NSCLC-Zelllinien und Patient:innen-Proben erzielt (Chudziak et al., 2016), und in Analysen mit klarzelligen Nierenzellkarzinom-Zelllinien zeigte sich sogar eine signifikant bessere Anreicherung durch die Verwendung des Parsortix®-Systems gegenüber dem CellSearch®-System (Maertens et al., 2017). In Studien mit Brustkrebs-Zelllinien, Prostatakarzinom-Zelllinien und -Patienten wurde mit Parsortix® eine höhere Anreicherungsrate als mit CellSearch® erzielt, und es wurden auch mesenchymale CTCs (CD45-/Keratin-/Vimentin⁺-Zellen) nachgewiesen. Des Weiteren zeigte sich eine negative prognostische Auswirkung durch Parsortix®-angereicherte CTCs, insbesondere durch mesenchymale-CTCs bei dieser untersuchten kleinen Kohorte von Prostatakarzinom-Patienten (Xu et al., 2015b, Xu et al., 2017).

Ein Nachteil der Parsortix®-Methode besteht darin, dass für die quantitative und qualitative Auswertung weitere nachgeschaltete Verfahren (wie z. B. Immunfluoreszenz (IF)) benötigt werden. Diese manuelle Probenauswertung ist zeitaufwändig und schränkt die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Laborstandorten und klinischen Zentren ein (Koch et al., 2020). Des Weiteren können durch die Verarbeitung der Proben (wie z. B. Zytospin-Herstellung oder Waschvorgänge bei der Färbung) CTCs verloren gehen (Cohen et al., 2022, Hvichia et al., 2016, Xu et al., 2015b). Außerdem gibt es besonders im Vergleich zur Studienlage mit CellSearch® bisher noch wenige Daten zur prognostischen Bedeutung von durch Parsortix® angereicherten CTCs in großen Kohorten. Darüber hinaus werden kleinere CTCs häufig nicht detektiert.

Eine andere markerunabhängige physikalische Methode ist die Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation. Durch diese Methode werden verschiedene Zellpopulationen anhand ihrer Bewegungsgeschwindigkeit aufgrund ihrer Dichte (Sedimentationsgeschwindigkeit) unter Zentrifugation sortiert.

Vorteile dieser Methodik sind die einfache Anwendbarkeit und die niedrigen Kosten. Des Weiteren ist das Verfahren auch markerunabhängig und ist dadurch in der

Lage, verschiedene CTC-Subpopulationen (epithelial und mesenchymal) anzureichern. Die angereicherten CTCs bleiben auch unmodifiziert und lebensfähig für weitere Analysen (Banko et al., 2019, Ferreira et al., 2016, Obermayr et al., 2018, Varillas et al., 2022).

Die Methode der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation ist jedoch auch mit einigen Nachteilen verbunden, vor allem mit einem möglichen CTC-Verlust. Die CTCs wandern bei Zentrifugation teilweise durch Aggregat-Bildung entweder in die Plasmafraktion oder zu den Gefäßböden. Des Weiteren wurde über einen Zellverlust durch die Zytotoxizität des Dichtemediums berichtet (Habli et al., 2020). Ähnlich wie beim Parsortix®-System ist bei diesem Verfahren ebenfalls eine weitere nachgeschaltete Methode (wie z. B. Immunfluoreszenz) zur quantitativen und qualitativen Auswertung erforderlich, die einen weiteren CTC-Verlust (z. B. durch Zytospin-Herstellung) verursachen kann. Diese manuelle Probenauswertung ist zeitaufwändig und schränkt die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Laborstandorten und klinischen Zentren ein. Des Weiteren ist man mit der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation nur begrenzt in der Lage, Leukozytenkontaminationen zu beseitigen, was zu geringer Reinheit führt. Aus diesem Grund wird die Methodik häufig nur als erster Anreicherungsschritt vor einer weiteren Verarbeitung mit anderen Strategien verwendet (Ferreira et al., 2016, Habli et al., 2020, Obermayr et al., 2018, Varillas et al., 2022). Deshalb gibt es auch nur wenig aktuelle (Vergleichs-)Studien zur prognostischen Signifikanz der allein durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation angereicherten CTCs.

Riebensahm und Mitarbeiter haben CellSearch® und Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation bei Brustkrebspatient:innen mit Hirnmetastasen verglichen. Mit beiden Techniken wurden im ähnlichen Anteil der Patient:innen CTCs nachgewiesen (Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation: 33%, CellSearch®: 48% (21%, wenn ≥ 5 CTCs/7,5 ml Blut als Kriterium verwendet wurde). Es konnte jedoch keine Korrelation zwischen der Anzahl der nach CellSearch®-Anreicherung und der nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation-Anreicherung detektierten CTCs gefunden werden, was darauf hindeutet, dass durch die verschiedenen Anreicherungstechniken unterschiedliche CTC-Populationen detektiert werden. Ein positiver CTC-Status nach Anreicherung mit einer der beiden Methoden war signifikant mit einer verkürzten Gesamtüberlebenszeit verbunden (Riebensahm et al., 2019). Ähnliche Ergebnisse wurden auch in einer Studie zu testikulären Keimzelltumoren erzielt (Nastaly et al., 2014).

Bisher gibt es keine Studie, die die oben erwähnten Methoden bei UCB-Patient:innen vergleichend untersucht hat. Deshalb sollte diese Fragestellung als ein Schwerpunkt in der vorliegenden Arbeit bearbeitet werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Laborgeräte

Tabelle 1: Mikroskope

Mikroskope	Hersteller
Durchlichtmikroskop Axiostar Plus	Carl Zeiss; Jena, DE
Fluoreszenzmikroskop Axio Observer mit Colibri 7 Lichtquelle	Carl Zeiss; Jena, DE
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 imaging mit AxioCam MRm mit Lichtquelle HXP 120 V	Carl Zeiss; Jena, DE
Zeiss Primovert Mikroskop mit Zeiss AxioCam 105 Color	Carl Zeiss; Jena, DE

Tabelle 2: Zentrifugen

Zentrifugen	Hersteller
Heraus Megafuge 8	Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, US
Heraus Megafuge 40R	Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, US
Heraus Multifuge 3S-R	Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, US
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf; Hamburg, DE
Tischzentrifuge Biozym Sprout	Heathrow Scientific; Vernon Hills, IL, US
Tischzentrifuge Labnet (C1301)	Labnet International; Edison, NJ, US
Zentrifuge Rotofix 32	Hettich; Villingen-Schwenningen, DE

Tabelle 3: Andere allgemeine Laborgeräte

Laborgeräte	Hersteller
Analoger Rollenmischer RS-TR 05	Phoenix Instrument; Garbsen, DE
Analysenwaage BP610	Sartorius; Göttingen, DE
BD Vacutainer® EDTA Tubes	BD; Plymouth, UK
BioPhotometer mit Thermal Printer DPU-414	Eppendorf; Hamburg, DE
CellSave Preservative Tube	Menarini Silicon Biosystems; Bologna, IT
CellSearch Celltracks Analyzer II	Menarini Silicon Biosystems; Bologna, IT
CellSearch Celltracks™ Autoprep System	Menarini Silicon Biosystems; Bologna, IT
Consort E143 Stromversorgungseinheit	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, US
DNA Engine PTC-200	MJ Research; Waltham, MA, US
EasyPhor Gelkammer	Biozym Scientific; Hessisch Oldendorf, DE
Filmentwickler Curix 60	AGFA HealthCare; Bonn, DE
Geldokumentationssystem Gene Genius 2	Syngene; Cambridge, UK
Heracell™ 150 CO ₂ Inkubator	Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, US
Heracell™ 150i CO ₂ Inkubator	Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, US
Leucosep™ Tube 50 ml	Greiner Bio-One International; Kremsmünster; AU
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Instruments; Schwabach, DE

Laborgeräte	Hersteller
Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories; Hercules, Ca, US
Mini-Protean System Casting Stand	Bio-Rad Laboratories; Hercules, Ca, US
Mini-Protean Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories; Hercules, Ca, US
Neubauer Zählkammer	Brand; Wertheim, DE
Neubauer Zählkammer	Assistent; Glaswerkfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG; Sondheim vor der Rhön, DE
Nanodrop ND1000 Spectrometer	PeqLab; Erlangen, DE
Parsortix™ Cell Separation SCasette	Angle; Surrey, UK
Parsortix™ PR1 Cell Separation System	Angle; Surrey, UK
Power Pac Basic	Bio-Rad Laboratories; Hercules, Ca, US
Power Pac HC	Bio-Rad Laboratories; Hercules, Ca, US
Rollenmischer mit fünf Rollen (R5)	Ingenieurbüro CAT, M. Zipperer GmbH; Ballrechten-Dottingen, DE
Rollenmischer SRT1	Stuart Equipment, Staffordshire, UK
Röntgenfilme Super RX-N	Fujifilm; Tokio, JP
Thermocycler C1000 Touch CFX96	Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, US
Thermocycler peqSTAR 96 Universal Gradient	PeqLab; Erlangen, DE

Laborgeräte	Hersteller
TransferMan® 4M - Mikromanipulator mit DualSpeed™-Joystick für direkte und dynamische Bewegungskontrolle	Eppendorf; Hamburg, DE
TransFix® Preservative Tube	Cytomark; Buckingham, UK
Vortex-Genie® 2	Scientific Industries; New York, NY, US
Wasserbad GFL-1002	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH; Burgwedel, DE
Wasserbad GFL-1003	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH; Burgwedel, DE

3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller
AB-Serum	Bio-Rad Medical Diagnostics; Dreieich, DE
Acrylamid (30%)	National Diagnostics; Atlanta, GA, US
Agarose LE	Genaxxon Bioscience; Ulm, DE
APS (Ammoniumpersulfat)	AppliChem; Darmstadt, DE
Biozid mit Breidbrandwirkung (Tetenal Algenex Plus)	Tetenal Europe GmbH; Norderstedt DE
Bromphenolblau	Merck; Darmstadt, DE
BSA Fraction V (Bovines Serum Albumin)	Biomol; Hamburg, DE
Dako Antibody Diluent with Background Reducing Component	Dako; Glostrup, DK
Dako Pen	Dako; Glostrup, DK

DAPI (4'6'-Diamidin-2-phenylindol)	PanReac AppliChem, ITW Reagents; Darmstadt, DE
Dekon® decomatic	Decon Laboratories; Hove, UK
DMEM High Glucose-Medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	PAN Biotech; Aidenbach, DE
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Serva; Heidelberg, DE
DNA-Marker Quick-Load® Purple 100 bp	New England BioLabs; Ipswich; MA, US
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Life Technologies Limited; Paisley, UK
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, US
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, US
EMEM (Minimum Essential Media)	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, US
Erylysepuffer (Flow Cytometry Human Lyse Buffer (10X))	R&D Systems®; Minneapolis, MN, US
Essigsäure	J.T. Baker; Deventer, NL
Ethanol absolut	Chemsolute/TH Geyer; Renningen, DE
Ethanol vergällt	Chemsolute/TH Geyer; Renningen, DE
FCS (Fetal Calf Serum)	PAA Laboratories; Pasching, A
Ficoll-Paque™ PLUS	Cytiva/GE Healthcare Bio-Sciences AB; Marlborough, MA, US
Fixierungslösung B	Micromet; Rockville, Maryland, US
Fluoromount-G Mounting Medium	Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, US
Glycerol	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, US
Glycin Pufferan®	Carl Roth; Karlsruhe, DE
Incidin® Plus	Ecolab; Saint Paul, MN, US
Isopropanol	Carl Roth; Karlsruhe, DE

L-Glutamin	Gibco - Life Technologies Corporation; Grand Island, NY, USA
Luminol	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, US
Methanol	J.T. Baker; Deventer, NL
Milchpulver	Carl Roth; Karlsruhe, DE
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth; Karlsruhe, DE
Natrium-Desoxychlorat	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, US
Natriumhypochloritlösung	Carl Roth; Karlsruhe, DE
Normales Eselserum (Normal donkey-serum - NDS)	Abcam; Cambridge, UK
Normales Ziegenserum (Normal goat-serum - NGS)	Dako; Glostrup, DK
NP40 (Nonidet P-40)	Roche Diagnostics; Mannheim, DE
Nukleasefreies Wasser	Quiagen; Hilden, DE
p-Cumarinsäure	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, US
Pen Strep (Penicillin Streptomycin)	Gibco - Life Technologies Corporation; Grand Island, NY, USA
PFA (Paraformaldehyd)	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, US
Protease-/Phosphatase-Inhibitor Cock- tail (100x)	CST; Danvers, MA, US
Proteinmarker Page Ruler Prestained Protein Ladder 10-180 kDa	Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, US
Röntgenentwickler für Rollenmaschi- nen	Tetenal Europe GmbH; Norderstedt DE
Röntgen-Fixierer für Rollenmaschinen	Tetenal Europe GmbH; Norderstedt DE
RPMI 1640 Medium (Rosewell Park Memorial Institute)	PAN Biotech; Aidenbach, DE

Salzsäure 1 N (HCl)	Carl Roth; Karlsruhe; DE
SDS-Lösung 20% (Natriumdodecylsulfat)	AppliChem; Darmstadt, DE
SignalFire™ Plus ECL Reagent	CST; Danvers, MA, US
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Merck; Darmstadt, DE
Tris-EDTA (TE) Puffer; pH 8,0	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, US
Triton® X-100 (T-x)	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, US
Trizma® base	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, US
Trypanblau	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, US
Trypsin-EDTA-Lösung 0,25% (w/v)	Gibco - Life Technologies Corporation; Grand Island, NY, USA
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, US
Vectashield Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories; Burlingame, CA, US
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck; Darmstadt, DE
β-Mercaptoethanol	Merck; Darmstadt, DE
6-fache Gelladepuffer mit lila Farbstoff	New England BioLabs; Ipswich; MA, US

3.1.3 Oligonukleotide

Tabelle 5: Oligonukleotide für die quantitative „Real Time“-PCR

Bezeichnung	Zielgen	Sequenz (5'-3')	Hersteller
PD-L1 for	PD-L1 v1+2	AAGAAAAGGGAGAATGATGGATGTG	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO US
PD-L1 rev	PD-L1 v1+2	GCTGGATTACGTCTCCTCCAA	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO US
VISTA for	VISTA	GGTGCCTGCATCGTAGGAAT	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO US
VISTA rev	VISTA	CCCTTGAATGTTGCTGTCCA	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO US
β -Actin for	β -Actin	CCAACCGCGAGAAGATGA	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO US
β -Actin rev	β -Actin	CCAGAGGCGTACAGGGATAG	Sigma-Aldrich; St. Louis, MO US

3.1.4 Kits

Tabelle 6: Tabelle 6: Kommerziell erhältliche Kits

Kit	Verwendung	Hersteller
Ampli WGA® Kit	WGA	Menarini Silicon Biosystems; Bologna, IT
Ampli1 QC® Kit	Qualitätskontrolle	Menarini Silicon Biosystems; Bologna, IT
CellSearch®-CTC-Kit	Detektion von CTCs	Menarini Silicon Biosystems; Bologna, IT
CellSearch®-CXC-Kit	Detektion von CTCs	Menarini Silicon Biosystems; Bologna, IT
First Strand cDNA Synthesis Kit	cDNA-Synthese	Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, US
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix	q-RealTime-PCR	Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, US
Nucleospin®RNA	RNA-Isolierung	Macherey-Nagel; Düren, DE
Pierce BCA Protein Assay Kit	Bestimmung der Proteinkonzentration	Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, US

3.1.5 Antikörper

Tabelle 7: Fluoreszenz-konjugierte Antikörper

Antigen	Klon	Spezies	Konjugat	Hersteller
CD41	HIP8	Maus	APC	Biolegend; San Diego, CA, US
CD45	HI30	Maus	PerCP	BD Pharmingen/B D Biosciences; San Diego, CA, US
CD45	REA747	Humane Zelllinie	APC	MACS Miltenyi Biotect; Bergisch Gladbach, DE
Pan-Keratin	C11	Maus	AlexaFluor®488	CST; Danvers, MA, US
Pan-Zytokeratin	AE1/AE3	Maus	AlexaFluor®488	Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, US
Pan-Zytokeratin	AE1/AE3	Maus	eFluor570	Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, US
PD-L1	E1L3N	Kaninchen	PE	CST; Danvers, MA, US
Von-Willebrand-Faktor	Polyklonal	Schaf	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	GeneTex; Irvine, CA, US
Zytokeratin 20	E-9	Maus	AlexaFluor®488	Santa Cruz Biotechnology; Dallas, Tx, US

Tabelle 8: Unkonjugierte Antikörper

Antigen	Klon	Spezies	Hersteller
CD44	G44-26	Maus	BD Pharmingen/BD Biosciences; San Diego; CA, US
CD142/Tissue Factor/TF	VD8	Maus	Sekisuri Diagnostics GmbH; Pfungstadt; DE
Hsc70	B-6	Maus	Santa Cruz Biotechnology; Dallas, MA, US
PD-L1	E1L3N (XP)	Kaninchen	CST; Danvers, MA, US
TROP-2	Polyklonal	Ziege	R&D Systems; Minneapolis, MN, US
VISTA	D1L2G (XP)	Kaninchen	CST; Danvers, MA, US

Tabelle 9: Sekundäre Antikörper

Antigen	Klon	Spezies	Konjugat	Hersteller
Kaninchen-IgG	Polyklonal	Ziege	AlexaFluor®488	Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, US
Kaninchen-IgG	Polyklonal	Ziege	AlexaFluor®546	Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, US
Kaninchen-IgG	Polyklonal	Ziege	HRP	CST; Danvers; MA, US
Maus-IgG	Polyklonal	Ziege	AlexaFluor®546	Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, US

Antigen	Klon	Spezies	Konjugat	Hersteller
Maus-IgG	Polyklonal	Ziege	AlexaF-luor®555	Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, US
Maus-IgG	Polyklonal	Kaninchen	HRP	Dako; Glostrup, DK
Ziege-IgG	Polyklonal	Esel	AlexaF-luor®488	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, US
Ziege-IgG	Polyklonal	Esel	AlexaF-luor®546	Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, US
Ziege-IgG	Polyklonal	Kaninchen	HRP	Dako; Glostrup, DK

3.1.6 Rekombinante Zytokine

Tabelle 10: Für die Zellkultur verwendete humane Zytokine

Zytokine	Spezifikation	Hersteller
IFN- γ	Aus E. coli	R&D Systems; Minneapolis, MN, US
TGF β 1	Aus CHO-Zellen	PerroTech

3.1.7 Zelllinien

Tabelle 11: Humane UCB-Zelllinien

Bezeichnung	Kulturmedium	Bezugsquelle
5637	RPMI	Klinik für Urologie, UKE
647V	DMEM	Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, UKD
HT-1376	EMEM	Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, UKD
RT-4	DMEM	Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, UKD
T24	DMEM	Klinik für Urologie, UKE
TCC-SUP	DMEM	Klinik für Urologie, UKE
UM-UC-3	DMEM	Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, UKD

UKD: Universitätsklinikum Düsseldorf

UKE: Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Die Kulturbedingungen und die angewendeten Zellkultur-Basismedien sind unter Methoden (3.2.1.1) beschrieben.

3.1.8 Analysesoftware und Datenbanken

Tabelle 12: Analysesoftware und Datenbanken

Datenbak/Software	Verwendungszweck	Bezugsquelle
Bio-Rad CFX Manager (3.1)	Auswertung von qRT-PCR	Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, US
CellTracks Analyzer II (2.7)	Fluoreszenzmikroskopische Analyse von CTCs	Menarini Silicon Biosystems; Bologna, IT
NCBI	Datenbank für Literatur (PubMed), Proteine, DNA, RNA	www.ncbi.nlm.nih.gov
NCBI Primer Blast	Design von Primern	www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast

3.1.9 Patient:innen-Proben

Im Zeitraum vom 01.04.2019 bis 10.05.2021 wurden von Patient:innen, bei denen eine radikale Zystektomie im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt wurde, Blutproben gesammelt. Die Blutgewinnung erfolgte vor der Operation, und es wurden von jedem/r Patient:in je drei periphere-Blutproben gesammelt (ein EDTA-, ein CellSave®- und ein Transfix®-Röhrchen).

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Hamburger Ärztekammer genehmigt (PV 5392). Von allen teilnehmenden Patient:innen liegt eine schriftliche Einwilligungserklärung vor.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur-Methoden

3.2.1.1 Standardkultivierung von humanen Zelllinien

Die für die experimentellen Untersuchungen eingesetzten Zelllinien stammen aus der Zellkultursammlung des Institutes für Tumorbilogie. Sie wurden regelmäßig auf Mycoplasmenfreiheit getestet und über STR-(*short tandem repeat*-)Analyse authentifiziert.

Die Standardkultivierung von humanen Zelllinien erfolgte unter sterilen Bedingungen bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre in den folgenden Basis-Kulturmedien mit den hier aufgeführten Zusätzen:

- DMEM mit 10% FCS, 2 mM L-Glutamin und 1% Penicillin-Streptomycin-Mix
(Zelllinien: 647V, RT-4, T24, TCC-SUP, UM-UC-3)
- EMEM mit 10% FCS, 2 mM L-Glutamin und 1% Penicillin-Streptomycin-Mix und 1% „Non-Essential Acids“ (NEAA)
(Zelllinien: HT1376)
- RPMI mit 10% FCS, 2 mM L-Glutamin und 1% Penicillin-Streptomycin-Mix
(Zelllinie: 5637)

Die Kultivierung erfolgte bei einem CO₂-Gehalt von 5% in RPMI- und EMEM-Kulturmedium oder bei einem CO₂-Gehalt von 10% in DMEM-Medium. Abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Zellen regelmäßig passagiert. Hierfür wurden die Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung (Phosphate-buffered saline - PBS) (37°C) gewaschen und mit Trypsin-EDTA von der Kulturflasche abgelöst. Anschließend wurde die enzymatische Verdauungsreaktion durch die Zugabe von Kulturmedium abgestoppt, und die Zellsuspension wurde für 3 min mit 1200 x rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit frischem Zellmedium resuspendiert und die Zellen wurden in eine neue Zellkulturflasche mit entsprechender Verdünnung ausgesät.

3.2.1.2 Lagerung der Zelllinien durch Kryokonservierung

Zur Langzeitlagerung von Zelllinien wurden die Zellen, wie in 3.2.1 beschrieben, vom Gefäßboden abgelöst und zentrifugiert. Von der entstandenen Zellsuspension wurde 1 ml mit 100 µl DMSO als Gefrierschutz gemischt, und 1 ml von der entstandenen Mischung (90% Zellmedium, 10% DMSO) wurde in ein Kryoröhrchen überführt und bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff gelagert.

Um die Zellen erneut zu kultivieren, wurden sie bei 37°C aufgetaut, in 5 ml Kulturmedium aufgenommen und für 3 min bei 1200 x rpm abzentrifugiert. Im Anschluss daran wurde das entstandene Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert, und die Zellen wurden in eine neue Kulturflasche ausgesät.

3.2.1.3 Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen

Die Anzahl der Tumorzelllinien-Zellen oder der isolierten mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (Peripheral blood mononuclear cells – PBMCs) (3.2.4.1) wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dafür wurden 10 µl Zellsuspension und 10 µl Trypanblaulösung in einer Färbekammer gemischt. Trypanblau ist ein anionischer Azorfarbstoff, der an nicht-membranständige Zellproteine bindet, jedoch von lebenden Zellen nicht aufgenommen wird. Durch diese Eigenschaft färbt Trypanblau apoptotische Zellen blau an, wohingegen vitale Zellen ungefärbt bleiben. Anschließend wurden 10 µl der entstandenen Mischung an den oberen Rand des Deckglases auf der Neubauer-Zählkammer (Tiefe: 0,100 mm, Fläche: 0,0025mm², Firma: Brand und Firma Assistent; Glaswerkfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG) pipettiert. Das Auszählen der Zellen erfolgte unter dem Mikroskop mit einer 200-fachen Vergrößerung.

Die vitalen Zellen wurden in mindestens zwei der vier Kammern unter dem Mikroskop visuell mit Hilfe eines Handstückzählers ausgezählt. Anschließend wurde mit folgender Formel die Zellzahl pro Milliliter berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \left(\frac{x}{y}\right) \times 2 \times 10^4$$

(x=Zellzahl, y=Anzahl ausgezählter Kammern, 2=Verdünnungsfaktor, 10⁴=Kammerfaktor)

3.2.1.4 Stimulation der Tumorzelllinien mit rekombinanten Zytokinen

Für die Untersuchung des Einflusses rekombinanter Zytokine auf die Expression von ausgewählten Proteinen (VISTA) wurden rekombinantes humanes IFN-γ (200 IU/ml) und TGFβ1 (10 ng/ml) zu den ausgewählten Tumorzelllinien gegeben. Nach entsprechender Inkubationszeit (72h, 24h, 30 Min) wurde aus den Zellen RNA isoliert (3.2.2.1) oder es wurden Proteinlysate hergestellt (3.2.3.1), die für weitere Analysen wie qRT-PCR (quantitative Real-Time PCR – quantitative Echtzeit PCR) (3.2.2.4) bzw. Western-Blot-Analysen (3.2.3.4) verwendet wurden.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 RNA-Isolation aus Zellkulturzellen

Die Gesamt-RNA aus den verschiedenen kultivierten humanen Tumorzellen wurde mit dem Kit „*NucleosSpin RNA Plus*®“ nach Anleitung des Herstellers isoliert. Die extrahierte RNA wurde bei -80°C gelagert.

3.2.2.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und die Reinheit der gewonnenen RNA (3.2.2.1) wurden mit dem Gerät „*Nanodrop ND100 Spectrometer*®“ photometrisch bestimmt. Für die Messung der RNA-Konzentration wurden 1,5 µl RNA eingesetzt. Durch den Quotienten der Absorptionen bei 280 und bei 260 nm wurde die Reinheit der Probe bestimmt. Der Quotient sollte im Falle der RNA idealerweise bei 2,0 liegen.

3.2.2.3 Synthese von komplementären Desoxyribonukleinsäuren („complementary“ DNA – cDNA) durch reverse Transkription der isolierten RNA

Die isolierte Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen wurde durch reverse Transkription für weitere Experimente, wie qRT-PCR (3.2.2.4), in cDNA umgeschrieben. Dafür wurde das Kit „*First Strand cDNA Synthesis*®“ nach Angaben des Herstellers verwendet.

Für die Reaktion wurden 0,5 µg isolierte Gesamt-RNA, 1 µl „Random Hexamer Primer“, 2 µl M-MuLV Reverser Transkriptase, 10,5 H₂O, 5 µl Reaktionspuffer, 0,5 µl Riboblock und 2 µl 10mM dNTPs Mix eingesetzt. Die Transkription erfolgte im „*DNA Engine PTC-200 Thermocycler*®“ unter folgenden Bedingungen:

Reaktion	Temperatur	Zeit
Annealing	25°C	5 Min
Reverse Transkription	37°C	60 Min
Inaktivierung der Transkriptase	70°C	5 Min

Anschließend wurde die gewonnene cDNA mit nukleasefreiem Wasser 1:10 verdünnt und bei -20°C gelagert.

3.2.2.4 Quantitative Real-Time PCR

Die qRT-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode von Nukleinsäuren, die eine relative Quantifizierung der Genexpression bestimmter Zielgene ermöglicht (Arnemann, 2019b: S. 1842). Die Methode beruht auf den Prinzipien der herkömmlichen PCR (Polymerase chain reaction – quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion). Diese Reaktion ist eine sich zyklisch wiederholende Replikation, bestehend aus den folgenden Schritten: Denaturierung, „Annealing“ (Hybridisierung) und Elongation (Verlängerung) (Arnemann, 2019a: S. 1841-1842).

Als Ausgangssubstanz dient die cDNA, die von der aus Zelllinien gewonnenen Gesamt-RNA (3.2.2.1) hergestellt wurde (3.2.2.3). Die genspezifischen Primer, die für die Genamplifikation benutzt wurden, wurden die Exon-Exon-Grenze überspannend geplant. Durch dieses Design konnte der Amplifikation der genomischen DNA vorgebeugt werden.

Die Zunahme der Menge an DNA wurde mit Hilfe des in die doppelsträngige Helixstruktur der DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green bestimmt.

Die Experimente mit dem Kit „*Maxima SYBR Green*®“ erfolgten entsprechend der Anleitung des Herstellers in einer 96-Well-Mikrotiterplatte. Das Volumen der Proben wurde im Vergleich zu den Angaben des Herstellers halbiert (10 µl). Es wurden 5 µl Mastermix (bestehend aus: Reaktionspuffer, dNTPS, dUTPs, Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green, Referenzfarbstoff (ROX) und Maxima „Hot Start Taq“-DNA Polymerase) mit 1:10 verdünnter cDNA (3.2.2.3) und je 0,3 µl genspezifischen Primern angesetzt. Die Messungen erfolgten stets in Triplikaten.

Die PCR-Reaktion erfolgte im „Thermocycler C1000 Touch CFX96®“ unter Anwendung des folgenden Programms:

Reaktion	Temperatur	Zeit	Fluoreszenzmessung
Initiale Denaturierung	95°C	10 Min	-
Denaturierung	95°C	15 Sec	-
Annealing	60°C	30 Sec	-
Elongation	72°C	30 Sec	Ist erfolgt

Es wurden 41 PCR-Zyklen durchgeführt.

Am Ende des Programms erfolgte eine automatische Schmelzkurvenanalyse für die Überprüfung der Primerspezifität.

Reaktion	Temperatur	Zeit	Fluoreszenzmes- sung
Schmelzkur- venanalyse	65-95 °C Intervalle 0,5°C	Je 5 Sec	Ist erfolgt

Die Dateien wurden mit Hilfe des Programms „Bio-Rad CFX Manager®“ analysiert.

3.2.3 Proteinbiochemische Methoden

3.2.3.1 Herstellung von Zelllysaten

Die kultivierten Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen. Nach dem Waschen wurden abhängig von der Anzahl der Zellen 60 bis 500 µl des vorgekühlten (4°C) RIPA-Lysispuffers zugegeben und verteilt. Danach wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Zellkulturflasche gelöst, zentrifugiert (3 min mit 600 x g bei 4°C) und für eine weitere halbe Stunde mit dem RIPA-Puffer auf Eis inkubiert. Während der Inkubation wurden die Zellen des Öfteren durch Vortexen gemischt. Anschließend wurde das Pellet bei 13 000 x rpm für 20 min bei 4°C zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu entfernen.

Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem BCA-Test (3.2.3.2) wurde zu jeder Probe im Verhältnis von 1:3 3x-SDS-Probenpuffer gegeben, und das Lysat wurde entweder bei -20°C gelagert oder direkt für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (3.2.3.3) und für die Western-Blot-Analyse (3.2.3.4) eingesetzt.

RIPA-Lysispuffer
50 mM Tris-HCL
150 mM NaCl
5 mM EDTA
1% (w/v) NP40
0,1% SDS
0,1% (w/v) Triton X-100
0,5% Natrium-Desoxycholat pH 8,0
Protease-/Phosphatase-Inhibitor
3x-SDS-Probenpuffer
180 mM Tris-HCl pH6,8
30% (w/v) Glycerol
3% (w/v) SDS
0,01% (w/v) Bromphenolblau

3.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten mit BCA-Test

Mit dem „Pierce BCA Protein Assay[®]“-Kit wurde die Proteinkonzentration der Gesamtzellextrakte (3.2.3.1) bestimmt. Je 2,5 µl Lysat wurden mit 22,5 µl Wasser verdünnt. Außerdem wurde für die Bestimmung einer Standardkurve eine Standardreihe mit den folgenden Konzentrationen: 0, 100, 200, 400, 600, 1000 µg/ml in je 25 µl erstellt. Zu den Proben der Standardreihe wurden je 2,5 µl RIPA-Puffer gegeben. Je 500 µl des Reaktionsansatzes (Reagenzien A und B in einem Verhältnis von 1:50) wurden zu jeder Probe gegeben. Anschließend wurden die Proben für 2 min bei 55°C inkubiert, dann zum Stoppen der Reaktion auf Eis gestellt, bevor die Absorption bei 562 nm photometrisch gemessen wurde.

3.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine in den Zelllysaten (3.2.3.1) erfolgte aufgrund ihres Molekulargewichtes durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)-

Verfahren nach Laemmli (Laemmli, 1970). Sammel- und Trenngel wurden mit Hilfe der „Mini-Protean System Casting Stand®“-Vorrichtung manuell gegossen. Im Sammelgel, das eine geringere Polyacrylamid-Konzentration als das Trenngel aufweist, werden die aufzutrennenden Proben zunächst konzentriert, bevor sie im Trenngel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Vor der Reaktion wurden die Proteinlysate für 5 min bei 95°C inkubiert. Die Taschen der Gele wurden jeweils mit 20-30 µg Protein bzw. mit 6 µl Proteinmarker (Proteinmarker Page Ruler Prestained Protein Ladder 10-180 kDa Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, US) gefüllt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte im Laufpuffer bei 20 mA pro Gel.

Für den Nachweis bestimmter Proteine (wie beispielweise CD44) wurden reduzierende Bedingungen hergestellt. Dazu wurden die Proben vor dem Aufkochen mit Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) (im Verhältnis von DDT zu Lysat 1:10) versetzt.

Trenngel (5 ml) 10%	
H₂O	2,0 ml
30% Acrylamid	1,7 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	1,3 ml
10% SDS	0,05 ml
10% APS	0,05 ml
TEMED	0,002 ml

Sammelgel (2 ml)	
H₂O	1,4 ml
30% Acrylamid	0,33 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	0,25 ml
10% SDS	0,02 ml
10% APS	0,02 ml
TEMED	0,002 ml

Laemmli-Laufpuffer
25 mM Tris-HCl
192 mM Glycin
0,1% (w/v) SDS

3.2.3.4 Western-Blot-Analyse

Bei der Western-Blot-Technik werden Proteine, die durch SDS-PAGE (3.2.3.3) aufgetrennt wurden, mit Hilfe z. B. eines Tank-Blot-Systems auf eine PSQ-Membran mit der Porengröße von 0,2 µm übertragen und anschließend durch Inkubation mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Für die Reaktion wurden die nötigen Komponenten im Transferpuffer äquilibriert und anschließend in folgender Reihenfolge übereinandergeschichtet: ein Schwamm, drei zugeschnittene Filterpapiere, das Acrylamid-Gel, die aktivierte Membran, drei zugeschnittene Filterpapiere und ein weiterer Schwamm. Die Membran wurde vorab für 5 min in Methanol aktiviert.

Der erhaltene Stapel wurde in die mit Transferpuffer gefüllte „*Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell*®“-Kammer transferiert. Anschließend erfolgte der Elektrotransfer unter konstanter Spannung von 100V und einer Stromstärke von maximal 175mA für eine Stunde unter Kühlung, wodurch die negativ geladenen Proteine vom SDS-Gel auf die PSQ-Membran in Richtung der positiv geladenen Elektrode der Blotting-Kammer wandern.

Um eine unspezifische Antikörperbindung während der folgenden Inkubationsschritte zu verhindern, wurden die Membranen mit den übertragenen Proteinen zunächst mit TBS-T gewaschen und für eine Stunde in einer Blockierungslösung (5% (w/v) Milchpulver in TBS-T) auf dem Rollmischer inkubiert sowie blockiert.

Nach der Blockierung erfolgte die Inkubation mit dem spezifischen Primär-Antikörper. Diese erfolgte in einer festgelegten Verdünnung, entweder in 5% (w/v) Magermilchpulver oder in 5% (w/v) BSA in TBS-T unter ständigem Rollen bei 4°C über Nacht.

Am Folgetag wurde die Membran dreimal mit TBS-T für jeweils 10 min gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde die Membran mit dem entsprechenden HRP-(Horseradish Peroxidase – Meerrettichperoxidase-)konjugierten Sekundärantikörper für eine Stunde in 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS-T in entsprechender Verdünnung bei Raumtemperatur auf dem Rollmischer inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran erneut dreimal für jeweils 10 min in TBS-T gewaschen.

Alle verwendeten Sekundärantikörper sind an das Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt, das unter Anwesenheit von H₂O₂ die Umsetzung des Substrates Luminol katalysiert, durch welches messbares Licht emittiert wird. Hierfür wurden die ECL

(Elektrochemilumineszenz)-Lösungen 1 und 2 frisch hergestellt und zu gleichen Teilen vereint. In der entstandenen Lösung wurde die Membran für 5 min geschwenkt. In einem Dunkelraum wurden die Chemilumineszenzsignale sofort auf einem Röntgenfilm mit Expositionszeiten zwischen 1 sec und 15 min detektiert. Das erhaltene Signal ist in einem bestimmten Bereich proportional zur Menge des gebundenen Proteins und kann daher als Maß für die Proteinmenge verwendet werden. Die Röntgenfilm-Entwicklung erfolgte mit Hilfe des Filmentwicklers „Curix 60®“.

Transferpuffer	TBS-T
48 mM Tris-HCL	20 mM Tris-HCl
39 mM Glycin	150 mM NaCl
0,015% (w/v) SDS	0,05% (v/v) Tween-20
10% (v/v) Ethanol (99%)	pH 7,6

ECL-Lösung 1	ECL-Lösung 2
100µl Luminol-stock	6µl 30% H ₂ O ₂
44µl p-Cumaric acid stock	1ml 1 M Tris/HCl (pH 8,5)
1 ml 1 M Tris/HCl (pH 8,5)	9ml H ₂ O bidest
8,85 ml H ₂ O bidest	

3.2.4 Anreicherung und Detektion von CTCs aus peripherem Blut

3.2.4.1 Isolierung von PBMCs mit Hilfe der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

Die Dichtegradientenzentrifugation ist eine physikalische Methode zur Gewinnung von PBMCs aus humanem peripherem Blut. Durch diese Methode werden verschiedene Zellpopulationen anhand ihrer Bewegungsgeschwindigkeit (Sedimentationsgeschwindigkeit), die von der Schwebedichte der verschiedenen Zellpopulationen abhängt, unter Zentrifugation sortiert. Durch die spezifischen Dichteunterschiede zwischen Blutbestandteilen und Ficoll-Lösung (Dichte 1,077 g/ml) entsteht nach der Zentrifugation folgende Schichtung: oben befindet sich eine trübe Serum-Schicht,

am Boden ein Zellpellet aus Erythrozyten und Granulozyten, und zwischen den beiden Schichten befindet sich die Interphase, die die PBMCs enthält (Abb. 3).

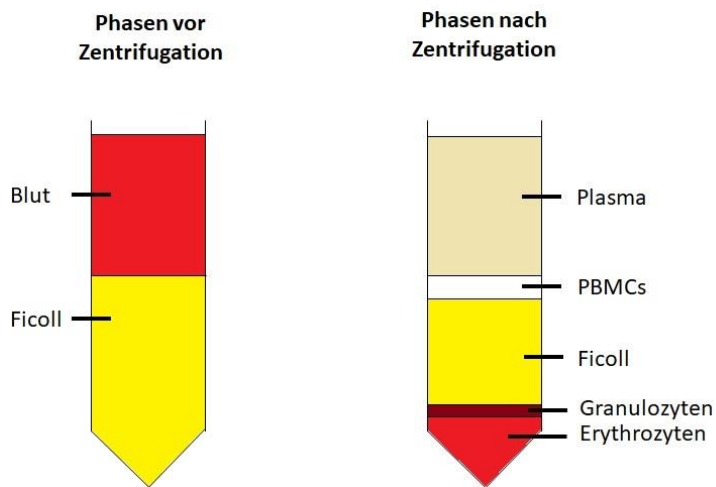


Abbildung 3: Phasen vor und nach der Zentrifugation

Dafür wurden 9 bis 27 ml Blut in 1 bis 3 9-ml-EDTA-Monovetten von Tumorpatient:innen oder von gesunden Spendern abgenommen und innerhalb einer Stunde weiterverarbeitet. Sogenannte Leucosep®-Röhrchen wurden mit 15,5 bis 16 ml Ficoll-Lösung befüllt und bei 1000 x g für 1 Minute zentrifugiert.

Aus der ersten Monovette wurde die entstandene obere Plasmaschicht abgenommen und bei -80°C eingefroren gelagert. Die aus der ersten Zentrifugation entstandene untere Schicht wurde auf das zuvor vorbereitete Falcon-Röhrchen mit Ficoll-Paque übertragen und zentrifugiert (800 x g für 15 min). Dann wurde der PBMC-enhaltende Überstand in ein neues 50-ml-Falcon-Röhrchen überführt und erneut zentrifugiert (400 x g für 10 min). Der entstandene Überstand wurde vorsichtig abgegossen, und es erfolgte gegebenenfalls in Abhängigkeit vom Erythrozytenanteil eine Erythrozyten-Lyse nach Angaben des Herstellers (Flow Cytometry Human Lyse Buffer (10X)).

Nach Erythrozytenlyse wurde die Probe erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 5-10 ml PBS resuspendiert, und die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt (3.2.1.3). Für die weitere IF-Analyse wurden Zytospins mit je 700.000 Zellen pro Objektträger hergestellt (siehe 3.2.4.4).

3.2.4.2 Anreicherung von zirkulierenden Tumorzellen aus peripherem Blut mit dem Parsortix®-System

Das Parsortix®-System ist eine patentierte Methode mit limitierter Zulassung (FDA, 2022), mit deren Hilfe zirkulierende Tumorzellen aus peripherem Blut angereichert werden können. Dieses System basiert auf einer Mikrofluidik-Technologie, die einen kontrollierten Fluss während der Bluttrennung ermöglicht, und Leukozyten sowie Tumorzellen in einer Kassette anreichert. Diese Selektion ist abhängig von der Zellgröße (6,5 µm) und von der Verformbarkeit der Zellen. Bei diesem Prozess werden die Tumorzellen, die weniger deformierbar und größer sind, in der Kassette „stecken bleiben“. Nach diesem Prozess können die Zellen automatisch innerhalb der Kassette gefärbt werden. Alternativ kann man die Zellen auch aus der Kassette eluieren und für molekulare oder IF-Folgeanalysen verwenden (Angle, 2023, Hvichia et al., 2016).

Für diese Untersuchung wurden 7,5 ml Blut von Patient:innen in ein *TransFix® Röhrchen* abgenommen und innerhalb von 72 Stunden verarbeitet.

Das Gerät wurde vor jeder Anreicherung mit Hilfe eines Waschprogrammes (Programm PX2_CT) gereinigt, und die Kassette wurde direkt vor der Probenverarbeitung „betriebsfertig gemacht“ („*primed*“) (Programm PX2_PF). Anschließend wurde die Probe in ein „BD Vacutainer EDTA“-Röhrchen transferiert und durch das Separierungsprogramm PX2_S99F (im Falle einer Patient:innen-Probe – in einem *TransFix®-Röhrchen*) oder durch PX2_S507 (im Falle einer Mischung aus Donorblut und Zellkulturzellen – in EDTA-Monovetten) prozessiert.

Im Anschluss an die Separierung wurden die angereicherten Zellen mit dem Programm PX2_H eluiert, und es wurden Zytospins hergestellt (3.2.4.4).

3.2.4.3 Detektion von zirkulierenden Tumorzellen aus peripherem Blut mit dem CellSearch®-System

Die Anreicherung und Detektion von zirkulierenden Tumorzellen mit Hilfe des *CellSearch®*-Systems ist ein von der FDA anerkanntes und zugelassenes Verfahren (Cristofanilli et al., 2004, FDA, 2004, Sieuwerts et al., 2009). Es besteht aus einer automatisierten Analyseplattform und speziellen Kits, die Antikörper für die Anreicherung und die Detektion von CTCs enthalten. Für diesen Prozess wurden 7,5 ml Blut von den Patient:innen in ein „*CellSave® Presevative*“-Röhrchen abgenommen

und innerhalb von 96 Stunden im „*CellSearch Autoprep System*®“ semi-automatisch analysiert.

Die Blutproben wurden gemäß den Protokollen des „*CellSearch*®-CTC-“ und „*CellSearch*®-CXC-Kits“ mit Verdünnungspuffer versetzt und für zehn Minuten bei 800 x g und abgeschalteter Bremse zentrifugiert. Bei der Verwendung des „CTC-Kits“ konnte zusätzlich ein AlexaFluor488-konjugierter Antikörper und beim „CXC-Kit“ ein Phycoerythrin (PE)-konjugierter Antikörper, z. B. gegen PD-L1, eingesetzt werden, um eine erweiterte Charakterisierung von CTCs zu ermöglichen.

Die Tumorzellen wurden mit Hilfe von anti-EpCAM Antikörpern, die an Ferrofluide gekoppelt wurden, immunomagnetisch angereichert. Danach wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. Der Antikörper-Cocktail enthält anti-Keratin-Antikörper (gegen Keratine-8, -18, -19 u. a. Keratine) gekoppelt mit Phycoerythrin (im Falle von „*CellSearch*®-CTC-Kit“) oder mit AlexaFluor488 (im Falle von „*CellSearch*®-CXC-Kit“) und anti-CD45-Antikörper, konjugiert mit Allophycocyanin (APC). Letzterer dient der Darstellung des hämatopoetischen Oberflächenmarkers CD45 und ermöglicht damit eine Unterscheidung zwischen zirkulierenden Tumorzellen und Blutzellen. Die Zellkerne wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI sichtbar gemacht.

Anschließend erfolgte eine automatische mikroskopische Analyse im „*CellTracks Analyzer II*®“, und auffällige Zellen wurden in einer Bildgalerie präsentiert und nach vorgegebenen Kriterien (Keratin-Positivität, DAPI-Positivität, CD-45-Negativität und Zellform und -größe) differenziert.

3.2.4.4 Herstellung von Zytospins

Für IF-Analysen wurden von den zu charakterisierenden Tumorzelllinien Zytospins hergestellt. Dazu wurden die Zellen, wie im Kapitel 3.2.1.1 beschrieben, vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst und zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in PBS resuspendiert, und die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt (3.2.1.3).

Die Zellen wurden mit einer definierten Zellzahl in einen Trichter, der auf einem Objektträger befestigt wurde, gegeben und für 3 min (Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation) bzw. 7 min (Parsortix®) bei 1200 x rpm zentrifugiert.

Die Zytospins wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden sie bis zur Färbung bei -80°C gelagert.

Alternativ wurden die in PBS resuspendierten Tumorzellen zur Simulation von Patienten:innen-Proben auch zum Donorblut gegeben („spiking“). Die entstandene Blutprobe wurde durch *Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation* (3.2.4.1) oder durch *Parsortix*® (3.2.4.2) bearbeitet, und die angereicherten PBMCs wurden durch Zytozentrifugation auf Objektträger aufgebracht (Zytospins).

3.2.4.5 IF-Färbungen

Es wurden Zelllinienzellen in Spenderblut eingebracht („spiking“) oder Blutproben von Tumorpatient:innen untersucht. Die Blutproben wurden durch *Parsortix*® (3.2.4.2) oder durch *Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation* (3.2.4.1) bearbeitet. In den folgenden Tabellen sind für die verschiedenen nachzuweisenden Proteine Protokolle für die IF-Färbungen beschrieben.

Die immungefärbten Zytospinpräparate wurden anschließend mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes nach folgenden morphologischen und immunophänotypischen Kriterien ausgewertet: Positivität/Negativität für die folgenden Proteine: Keratin oder TROP-2 (Trophoblast antigen 2), CD45, CD41, PD-L1, Form und Größe der Zellen und Zellkerne.

Tabelle 13: IF-Protokoll – „Direktfärbung“

Arbeitsschritt	AE1/AE3//488 + C11//488 + CD45//APC + DAPI (“Direktfärbung”)
Fixierung	Fixierungslösung B 10 Min
Waschen mit PBS	1 x 3 Min
Permeabilisierung	-
Waschen mit PBS	-
Blockieren	AB-Serum 10% 20 Min
Primär-Antikörper	AE1/AE3//488 - 1:500 C11//488 - 1:200 CD45//APC - 1:200 DAPI - 1:500 In PBS 45 Min
Waschen mit PBS	3 x 3 Min
Kernfärbung	-
Eindecken	

Tabelle 14: IF-Protokoll – „CD44“

Arbeitsschritt	CD44
Fixierung	PFA 4% 15 Min.
Waschen mit PBS	1 x 3 Min
Blockieren	AB-Serum 10% 20 Min
Primär-Antikörper	1:1000 in AB-Serum (10%) 45 Min
Waschen mit PBS	3 x 3 Min
Sekundär-Antikörper	1:500 in PBS 45 Min AlexaFluor® 555/546 Ziege anti-Maus
Waschen mit PBS	3 x 3 Min
Direkt-Färbung	AE1/AE3//488 - 1:500 C11//488 - 1:200 CD45//APC - 1:200 DAPI - 1:1000 In PBS 45 Min
Waschen mit PBS	3 x 3 Min
Eindecken	

Tabelle 15: IF-Protokoll – „PD-L1“

	Tabelle 15A	Tabelle 15B
Arbeitsschritt	PD-L1+AlexaFluor® 488	PD-L1+AlexaFluor® 546
Fixierung	PFA 4% 15 Min.	PFA 4% 15 min
Waschen mit PBS	1 x 3 Min	1 x 3 min
Permeabilisie- ung+Blockieren	Tween (0,1%) in PBS + Normal Goat Serum (3%) 60 Min	Tween (0,1%) in PBS + Normal Goat Serum (3%) 60 min
Waschen mit PBS	1 x 1 Min	1 x 1 min
Blockieren	AB-Serum 10% 20 Min	AB-Serum 10% 20 min
Primär-Antikörper	1:100 in AB-Serum (10%) über Nacht Bei +4°C	1:100 in AB-Serum (10%) über Nacht Bei +4°C
Waschen mit PBS	3 x 5 Min	3 x 3 min
Sekundär-Antikörper	1:200 in PBS 45 Min AlexaFluor® 488 Ziege anti-Kaninchen	1:400 in PBS 45 min AlexaFluor® 546 Ziege anti-Kaninchen
Waschen mit PBS	3 x 5 Min	3 x 3 min
Direkt-Färbung	CD45//APC - 1:200 DAPI - 1:500 In PBS 45 Min	AE1/AE3//488 - 1:500 C11//488 - 1:200 CD45//APC - 1:200 DAPI - 1:500

	Tabelle 15A	Tabelle 15B
		In PBS 45 min
Waschen mit PBS	3 x 3 Min	3 x 3 min
Eindecken		

Tabelle 16: IF-Protokoll – „TROP-2“ und „VISTA“

	Tabelle 16A	Tabelle 16B
Arbeitsschritt	TROP-2	VISTA
Fixierung	Fixierungslösung B 10 Min	Fixierungslösung B 10 min
Waschen mit PBS	1 x 3 Min	1 x 3 min
Blockieren	Normal Donkey Serum (5%) in PBS 30 Min	-
Permeabilisierung	-	-
Waschen mit PBS	1 x 1 Min	-
Blockieren	AB-Serum 10% 20 Min	AB-Serum 10% 20 min
Primär-Antikörper	1:100 in AB-Serum (10%) 45 Min	1:50 in AB-Serum (10%) 60 min
Waschen mit PBS	3 x 3 Min	3 x 3 min
Sekundär-Antikörper	1:200 in PBS 45 Min AlexaFluor® 546 Esel anti-Ziege	1:200 in PBS 45 min AlexaFluor® 546 Ziege anti-Kaninchen
Waschen mit PBS	3 x 3 Min	3 x 3 min

	Tabelle 16A	Tabelle 16B
Direkt-Färbung	AE1/AE3//488 - 1:500 C11//488 - 1:200 CD45//APC - 1:200 DAPI - 1:500 In PBS 45 Min	AE1/AE3//488 - 1:500 C11//488 - 1:200 CD45//APC - 1:200 DAPI - 1:500 In PBS 45 min
Waschen mit PBS	3 x 3 Min	3 x 3 min
Eindecken		

Tabelle 17: IF-Protokoll – „PD-L1 + TROP-2 Version 1“

Arbeitsschritt	PD-L1 + TROP-2 Version 1
Fixierung	PFA 4% 15 min.
Waschen mit PBS	1 x 3 min
Blockieren + Permeabilisierung	Tween (0,1%) in PBS + Normal Donkey Serum (5%) 1 Stunde
Waschen mit PBS	1 x 1 min
Blockieren	AB-Serum 10% 20 min
Primär-Antikörper (TROP-2)	1:100 in AB-Serum (10%) 45 min
Waschen mit PBS	3 x 3 min
Sekundär-Antikörper	1:200 in PBS 45 min AlexaFluor® 546 Esel

Arbeitsschritt	PD-L1 + TROP-2 Version 1
	anti-Ziege
Waschen mit PBS	3 x 3 min
Primär-Antikörper (PD-L1)	1:100 in AB-Serum (10%) über Nacht Bei +4°C
Waschen mit PBS	3 x 3 min
Sekundär-Antikörper	1:400 in AB-Serum 45 min AlexaFluor® 546 Ziege anti-Kaninchen
Waschen mit PBS	3 x 3 min
Direkt-Färbung	AE1/AE3//488 - 1:500 C11//488 - 1:200 CD45//APC - 1:200 DAPI - 1:500 In PBS 45 min
Waschen mit PBS	3 x 3 min
Eindecken	

**verwendet bei: Patient:in 001 und 009 (Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation)*

Tabelle 18: IF-Protokoll – „PD-L1 + TROP-2 Version 2“

Arbeitsschritt	PD-L1 + TROP-2 Version 2
Fixierung	PFA 4% 15 min.
Waschen mit PBS	1 x 3 min
Blockieren + Permeabilisierung	Tween (0,1%) in PBS 1 Stunde
Waschen mit PBS	1 x 1 min
Blockieren	AB-Serum 10% 20 min
Primär-Antikörper (PD-L1)	1:100 in AB-Serum (10%) über Nacht Bei +4°C
Waschen mit PBS	3 x 3 min
Sekundär-Antikörper	1:400 in Dako Antibody Diluent with Background Reducing Component 45 min AlexaFluor® 546 Ziege anti-Kaninchen
Waschen mit PBS	3 x 3 min
Blockieren	Normal Donkey Serum (5%) in PBs 15 min
Primär-Antikörper (TROP-2)	1:100 in AB-Serum (10%) 45 min
Waschen mit PBS	3 x 3 min

Arbeitsschritt	PD-L1 + TROP-2 Version 2
Sekundär-Antikörper	1:200 in Dako Antibody Diluent with Background Reducing Component 45 min AlexaFluor® 488 Esel anti-Ziege
Waschen mit PBS	3 x 3 min
Direkt-Färbung	AE1/AE3//488 - 1:500 C11//488 - 1:200 CD45//APC - 1:200 DAPI - 1:500 In PBS 45 min
Waschen mit PBS	3 x 3 min
Eindecken	

**verwendet bei Patient:in 031, 032, 033 (Parsortix® und Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation)*

Tabelle 19: IF-Protokoll – „PD-L1 + TROP-2 + CD41“

Arbeitsschritt	PD-L1 + TROP-2 + CD41
Fixierung	PFA 4% 15 min
Waschen mit PBS	1 x 3 min
Permeabilisierung	Tween (0,1%) in PBS 1 Stunde
Waschen mit PBS	1 x 1 min
Blockieren	AB-Serum 10% 20 min

Arbeitsschritt	PD-L1 + TROP-2 + CD41
Primär-Antikörper (PD-L1)	1:100 in AB-Serum (10%) über Nacht Bei +4°C
Waschen mit PBS	3 x 3 min
Sekundär-Antikörper	1:400 in Dako Antibody Diluent with Background Reducing Component 45 min AlexaFluor® 555 Ziege anti-Kanninchen
Waschen mit PBS	3 x 3 min
Blockieren	NDS 5% in PBS 15 min
Waschen mit PBS	1 x 30 sec
Primär-Antikörper (TROP-2)	1:100 in AB-Serum (10%) 45 min
Waschen mit PBS	3 x 3 min
Sekundär-Antikörper	1:200 in Dako Antibody Diluent with Background Reducing Component 45 min AlexaFluor® 488 Esel anti-Ziege
Waschen mit PBS	3 x 3 Min
Direkt-Färbung	AE1/AE3//488 - 1:500 C11//488 - 1:200 CD45//PerCP - 1:200 CD41//APC – 1:100

Arbeitsschritt	PD-L1 + TROP-2 + CD41
	DAPI - 1:1000 In PBS 45 min
Waschen mit PBS	3 x 3 min
Eindecken	

3.2.4.6 Isolation von Einzelzellen

Als Kriterien für CTC-verdächtige Zellen zählten starke Fluoreszenzsignale der jeweiligen Markerproteine, fehlende CD45- und CD41-Fluoreszenzsignale, Zellform und -größe sowie Kernform und -größe. Die Positionen der so als potenzielle CTC identifizierten Zellen wurden mit Hilfe eines „England Finders“ (*Pyser – SGI Limited; Edenbridge, UK*) lokalisiert.

Anschließend wurde das Deckgläschen vorsichtig vom Objektträger entfernt. Für die Vermeidung der Austrocknung mussten die Objektträger während der Zellisolation durch PBS bedeckt sein.

Mit Hilfe der Koordinaten wurden die potenziellen CTCs im inversen Fluoreszenzmikroskop relokalisiert. Die identifizierten Zellen wurden anschließend mit einer speziellen Kapillare (*ES-Blastocyst-Injection-Pipettes, special size ID: 40µm, beveled 45°, straight, L:~54 mm, shortened + firepolished ends; BioMedical Instruments, Clinton Twp, MI, US*) mit der Steuereinheit „*TransferMan® 4M*“ (Eppendorf; Hamburg, DE) isoliert, in ein 0,2 ml-PCR-Gefäß überführt und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

3.2.4.7 Amplifikation genomischer Einzelzell-DNA durch WGA

Die WGA ist eine biochemische Methode zur Vervielfältigung (Amplifikation) von DNA-Molekülen, die bis auf die Einzelzellebene angewendet werden kann (Arnemann, 2019c: S. 2508-2509). Mit diesem Verfahren sollte die DNA der durch Mikromanipulation isolierten potenziellen CTCs (3.2.4.6) amplifiziert werden, um weitere Untersuchungen (wie z. B. Sanger-Sequenzierung, „Next-Generation“-Sequenzierung – Gesamtgenomsequenzierung - NGS) zu ermöglichen.

Die WGA erfolgte entsprechend den Herstellervorgaben mit dem „*Ampli 1-WGA Kit®*“ (Menarini Silicon Biosystems, Bologna, Italien). Der WGA-Prozess mit Hilfe des Kits „*Ampli 1 WGA Kit®*“ läuft in den folgenden Schritten ab: Zelllyse, DNA-Verdauung, Adaptor-Ligation und schließlich die PCR-Amplifikation mit einem hochspezifischen Primer. Bei den Prozessen von Zelllyse und Ligation wurde die Inkubation über Nacht durchgeführt, bei DNA-Verdau wurde die Inkubationszeit bei 37°C von 5 min auf 3 Stunden verlängert. Als positive Kontrolle wurde genomische DNA (10ng/µl) verwendet.

Danach wurde eine Qualitätskontrolle mit dem „*Ampli1 QC Kit®*“ (Menarini) durchgeführt.

3.2.4.8 Qualitätskontrolle des WGA-Produkts

Die in der WGA (3.2.4.7) entstandenen Endprodukte (positive (humane genomische DNA) und die negative (nukleinsäurefreies Wasser) Kontrolle sowie die zu untersuchenden Proben (DNA von den potenziellen CTCs)) wurden auf ihre Qualität mit dem „*Ampli1 QC Kit®*“ überprüft. Der Prozess erfolgte entsprechend den Herstellerangaben unter Verwendung eines 1,2% Agarosegels (3.2.4.9).

3.2.4.9 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode, die die Auftrennung von fragmentierter DNA nach ihrer Größe ermöglicht. Das Laufverhalten des DNA-Fragments ist umgekehrt proportional zu seinem Molekulargewicht. Das bedeutet, dass die kleineren Fragmente schneller durch die Agarosegel-Poren als die größeren wandern (Westermeyer, 2019: S. 38-40).

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 1,2%igen (w/v) TAE-Agarosegel (1,8 g Agarose und 150 ml 1 x TAE-Puffer). Als Elektrophoresepuffer wurde 1 x TAE verwendet.

Die Auftrennung der durch Ethidiumbromid, das zum Agarosegel gegeben wurde, gefärbten PCR-Produkte erfolgte bei 110-130V für ungefähr 35-50 min. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mit Hilfe eines Transilluminators visualisiert und mit Hilfe einer Videokamera fotografiert (Geldokumentationssystem Gene Genius 2; Syngene).

1 x TAE-Lösung
40 mM Tris-Acetat
1 mM EDTA
1% (v/v) Essigsäure
pH 8,3

3.2.4.10 Genomsequenzierung

WGA-Produkte mit ausreichender Qualität (2-4 PCR-Banden in der Qualitätskontrolle) wurden auf der DNBseq™-Plattform (BGI Genomics, Warschau, Polen) einer vollständigen Genomsequenzierung unterzogen.

Die weitere Analyse der Daten erfolgte durch PD Dr. Simon Joosse (Institut für Tumorbilogie, UKE). Veränderungen der Kopienanzahl wurden mit Hilfe des „Control-Freec“-Analysetools detektiert. Danach wurden die Daten mit Hilfe von R weiter analysiert und visualisiert (Riebensahm et al., 2019).

4 Ergebnisse

4.1 Analyse der VISTA-Expression in UCB-Zelllinien

Zunächst sollte der Frage nachgegangen werden, ob UCB-Zelllinien VISTA-Protein bilden. Für diese Fragestellung wurde eine Kohorte von verschiedenen UCB-Zelllinien untersucht, um die Detektionswahrscheinlichkeit zu erhöhen und Heterogenität unter den UCB-Zelllinien feststellen zu können.

Für dieses Experiment wurden 7 unterschiedliche UCB-Zelllinien ausgewählt und kultiviert. Wenn die Tumorzellen in der Kulturflasche eine bestimmte Dichte erreicht hatten, wurden Zelllysate hergestellt, und es wurde die Proteinkonzentration in den Lysaten gemessen. Anhand der bestimmten Konzentration wurden jeweils gleiche Proteinmengen für die SDS-PAGE und Western-Blot-Analysen eingesetzt. Anschließend wurde die entstandene Membran mit dem entsprechenden primären Antikörper und nachfolgend mit einem sekundären Antikörper inkubiert, und die durch die ECL-Lösung entstandenen Signale wurden detektiert.

UCB-Zelllinien können nach ihren Oberflächenmarkern in eher epitheliale und eher mesenchymale Zelllinien unterteilt werden. Des Weiteren ist eine Einteilung der UCB in verschiedene molekulare Subtypen, wie z. B. luminal und basal möglich. UCBs innerhalb der molekularen Subtypen weisen ähnliche Gen-Expressionsmuster und Mutationsprofile auf, und die Unterscheidung der Subtypen hat prognostische Bedeutung. Der "luminale" Subtyp umfasst die Mehrheit der (nicht-invasiven) UCBs im Frühstadium sowie einen erheblichen Anteil der muskelinvasiven Erkrankungen. Dieser Subtyp ist durch eine papilläre Histomorphologie gekennzeichnet. Der "basale" Subtyp weist häufig eine Plattenepithel-Differenzierung auf, ist biologisch aggressiver und tritt fast ausschließlich bei invasiven Erkrankungen auf (Choi et al., 2014, McConkey et al., 2016, Warrick et al., 2016).

Wie *Abbildung 4* veranschaulicht, beinhaltet die ausgewählte UCB-Zelllinienkohorte epitheliale, mesenchymale, basale und auch luminale Zelllinien. Die Zelllinien 5637, 647V, HT1376 und RT4 sind positiv für EpCAM und TROP-2 und gehören dadurch zu den epithelialen Zelllinien. Interessanterweise kommt TROP-2 auch in der mesenchymalen Zelllinie TCC-SUP vor, jedoch in geringerer Menge als in den epithelialen Zelllinien. Die anderen Zelllinien (T24, TCC-SUP und UMUC-3) sind positiv für CD44. CD44 ist ein Marker für Krebsstammzellen, dessen Expression mit

der EMT in Korrelation gebracht wurde (Primeaux et al., 2022, Xu et al., 2015a). Des Weiteren wurde in einer früheren Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe die CD44-Expression in mesenchymalen, nicht aber in epithelialen UCB-Zelllinien nachgewiesen (Bergmann, 2019).

Darüber hinaus ist bekannt, dass PD-L1 nur in basalen (5637, 647V, HT1376), nicht aber in der luminalen Zelllinie RT4 (Bergmann, 2019, Goutas et al., 2022, Kim et al., 2020) vorkommt, wie es auch durch die in dieser Arbeit erhaltenen Western-Blot-Ergebnisse bestätigt wurde.

Die Ergebnisse der Western-Blot-Analysen bestätigen die in der Dissertation von Sonja Bergmann dargestellten Ergebnisse (Bergmann, 2019) der Einteilung der Zelllinien in die folgenden Gruppen: epithelial (5637, 647V, HT1376, RT4), mesenchymal (T24, TCC-SUP, UMUC-3), luminal (RT4) und basal (5637, 647V, HT1376, T24, TCC-SUP).

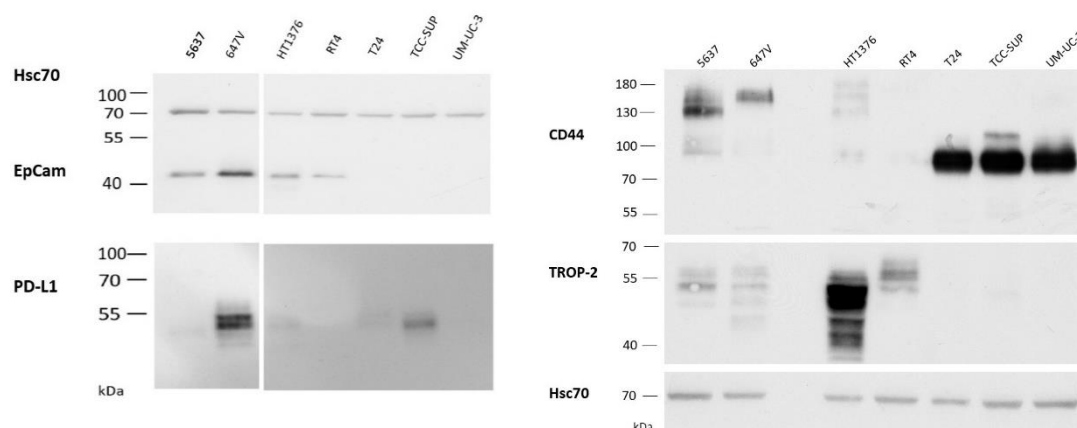


Abbildung 4: Nachweis verschiedener Proteine in der UCB-Zelllinienkohorte

Die Abbildung zeigt die Western-Blot-Analyse ausgewählter UCB-Zelllinien. Detektion von: CD44, EpCAM, PD-L1, TROP-2, Hsc70 (Heat shock cognate 71-kDa protein). Hsc70 diente als Kontrolle für die Proteinladung. Anzahl der Versuche: 1.

4.2 Analyse der VISTA-Expression in UCB-Zelllinien im unstimulierten Zustand

Nachdem eine Zelllinienkohorte ausgewählt wurde, wurden, wie im Punkt 3.2.3.1 beschrieben, Proteinlysate hergestellt, um Western-Blot-Analysen mit dem primären anti-VISTA-Antikörper durchführen zu können. VISTA hat ein berechnetes Molekulargewicht von ca. 33 Kilodalton (kDa), jedoch kann durch N-Glykolisierung das Laufverhalten im Western-Blot deutlich verändert werden, sodass das Protein

in einem Bereich von ca. 45-70 kDa erwartet wird (GeneCards®: The Human Gene Database, www.genecards.org) (Yoon et al., 2015).

Wie in *Abbildung 5* veranschaulicht, wird VISTA in signifikanter Menge in verschiedenen UCB-Zelllinien gebildet, unabhängig von deren Einordnung in die oben genannten Gruppen. Auch epitheliale (5637, 647V, HT1376, RT4), mesenchymale (T24, TCC-SUP, UMUC-3) sowie basale (5637, 647V, HT1376) und luminale (RT4) Zelllinien weisen eine VISTA-Expression auf.

Die Zelllinien HT1376 und TCC-SUP zeigten die höchste VISTA-Proteinmenge, T24 und UMUC-3 die geringste und 5637, 647V, RT4 wiesen eine intermediäre VISTA-Expression auf.

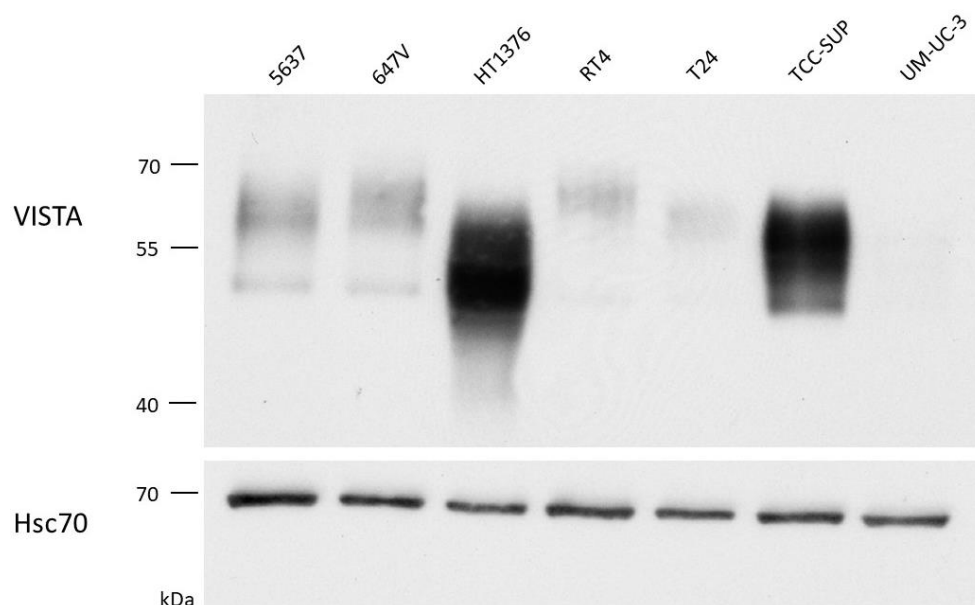


Abbildung 5: VISTA-Protein-Expression in verschiedenen UCB-Zelllinien

Detektion von VISTA in UCB-Zelllinien durch Western-Blot-Analyse. Der Nachweis von Hsc70 diente als Protein-Ladekontrolle. Anzahl der technischen Replikate: 7. Anzahl der biologischen Replikate: 2.

4.3 Expression des *VSIR*-Gens in UCB-Zelllinien im unstimulierten Zustand

Für den Nachweis der mRNA (Messenger RNA - Boten-Ribonukleinsäure) aus den in 3.2.2.1 und 3.2.2.1 beschriebenen UCB-Zelllinien wurde RNA nach Standard-Kultivierung isoliert und ihre Konzentration bestimmt. Anschließend wurde von den gewonnenen RNA-Proben cDNA hergestellt und für die qRT-PCR verwendet.

Abbildung 6 zeigt die normalisierte *VSIR*-Expression in den untersuchten UCB-Zelllinien. Dieses Ergebnis ist im Wesentlichen konsistent mit den Ergebnissen der

Western-Blot-Analyse. Es bestätigt das Vorhandensein von nachweisbaren Mengen an *VSIR*-mRNA in allen 7 hier untersuchten UCB-Zelllinien. Die ermittelten relativen Expressionsmuster wiesen ähnliche Relationen zueinander auf, wie in den Western-Blot-Analysen für das VISTA-Protein bereits gezeigt wurde. So konnten z. B. eine hohe *VSIR*-Expression in den Zelllinien HT1376 und TCC-SUP und eine geringe Expression in der Zelllinie UMUC-3 nachgewiesen werden. Jedoch zeigte in der qRT-PCR die Zelllinie T24 eine geringere *VSIR*-Expression als UMUC-3, wohingegen die *VSIR*-Expression der T24-Zellen in Western-Blot-Analysen stärker als die der UMUC-3-Zellen war.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass HT1376, eine epitheliale, und TCC-SUP, eine eher mesenchymale Zelllinie, insgesamt die stärkste und UMUC-3 die geringste *VSIR*-Expression aufweisen.

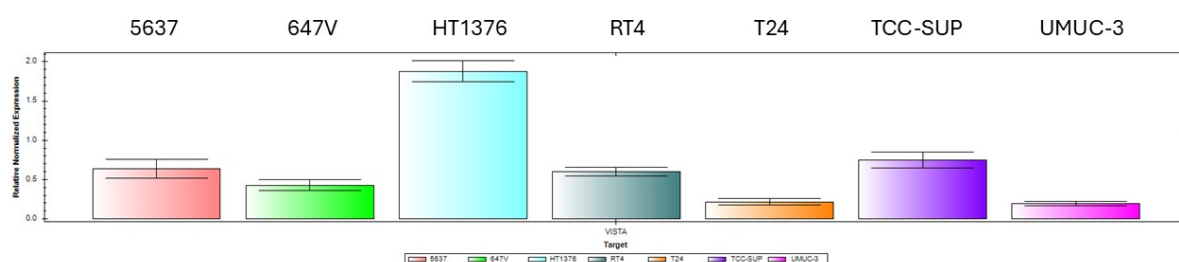


Abbildung 6: Analyse der *VSIR*-Expression mit qRT-PCR in verschiedenen UCB-Zelllinien
Die Abbildung zeigt die jeweilige relative normalisierte Expression. Anzahl der technischen Replikate: 2, Anzahl der biologischen Versuche: 1.

4.3.1 Regulation der *VSIR*-Expression in UCB-Zelllinien durch IFN- γ

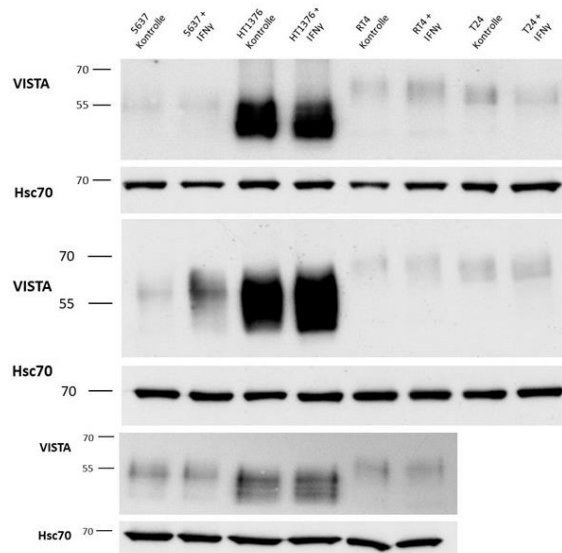
Im nächsten Experiment sollte die Frage beantwortet werden, ob die VISTA-Expression ähnlich wie die Expression von PD-L1 durch das Zytokin IFN- γ reguliert werden kann (Abiko et al., 2015, Chen et al., 2019, Imai et al., 2020, Mandai et al., 2016, Mimura et al., 2018, Qian et al., 2018). Für das Protein VISTA wurde bisher kein Einfluss von IFN- γ nachgewiesen, jedoch wurde diese Fragestellung in UCB-Zelllinien auch bisher noch nicht untersucht.

Als nächstes wurde IFN- γ zu den ausgewählten UCB-Zelllinien in einer Konzentration von 200 IU/ml gegeben. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet. Abschließend wurden für Western-Blot- und qRT-PCR-Analysen Lysate und mRNA, wie im Kapitel *Material und Methoden* beschrieben, hergestellt bzw. isoliert.

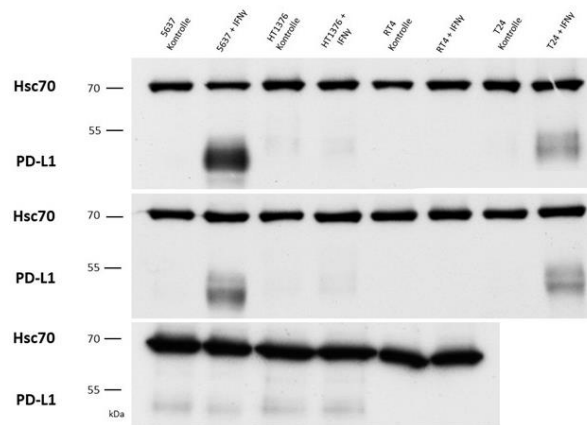
Für die ersten Untersuchungen wurden die Zelllinien, die eine signifikante VISTA-Expression gezeigt haben, wie 5637, HT1376, RT4 und T24, ausgewählt. Um den Erfolg der Inkubation zu überprüfen, wurde bei der Western-Blot-Analyse auch die Expression von PD-L1 analysiert.

Abbildung 7 veranschaulicht die Ergebnisse dieser Untersuchungen. Das Zytokin IFN- γ zeigt einen positiven Effekt auf die Expression von PD-L1 bei den Zelllinien 5637, HT1376 und T24. Bei der Zelllinie RT4 handelt es sich um eine luminale UCB-Zelllinie, in der sich erwartungsgemäß keine PD-L1-Expression nachweisen ließ. Diese Ergebnisse entsprechen den Literatur-Daten (Bergmann, 2019, Goutas et al., 2022, Kim et al., 2020).

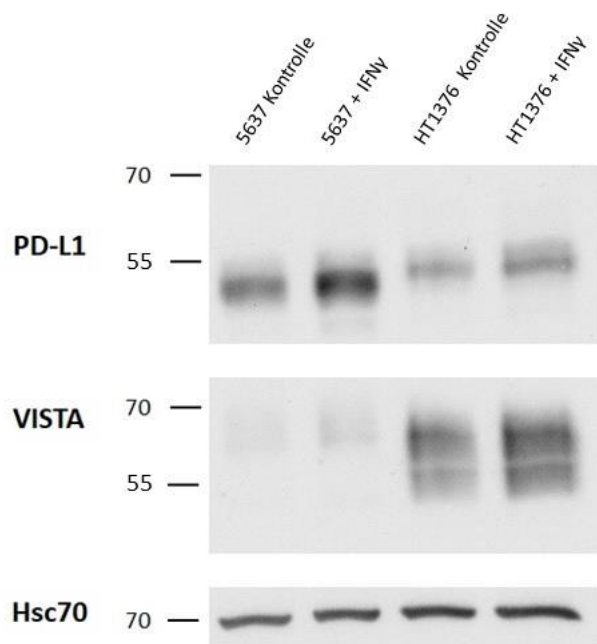
Aus den Ergebnissen der folgenden drei bis vier Experimente ist bei HT1376, RT4 und T24 kein signifikanter Unterschied in der VISTA-Expression zwischen den IFN- γ -inkubierten und den Kontroll-Zelllinien zu erkennen. In Bezug auf die Zelllinie 5637 gestalteten sich die Ergebnisse weniger eindeutig. In wiederholten Experimenten wurde entweder kein Effekt oder lediglich eine geringfügige Heraufregulation der VISTA-Expression durch IFN- γ beobachtet. Somit bleibt eine definitive Aussage bezüglich des Einflusses von IFN- γ auf die Zelllinie 5637 vorerst ausstehend. Es bedarf weiterer Untersuchungen, um ein umfassendes Verständnis der Regulation der VISTA-Expression in der Zelllinie 5637 zu erlangen.



7A



7B



7C

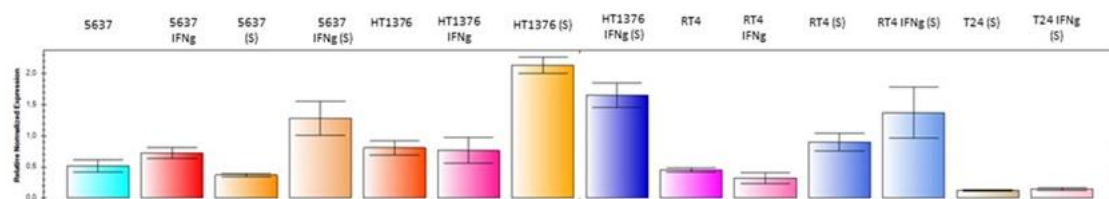
Abbildung 7: Western-Blot zur Darstellung des Einflusses von IFN- γ auf die Expression von VISTA und PD-L1

Die Inkubationszeit bei 200IU/ml betrug 48 Stunden. Der Nachweis von Hsc70 diente als Protein-Ladekontrolle. Die Abbildung 7A zeigt die Expression des VISTA-Proteins, auf 7B ist die zugehörige Expression von PD-L1 zu sehen. 7C veranschaulicht eine Wiederholung der Untersuchung mit den Zelllinien HT1376 und 5637. Anzahl der biologischen Replikate: 5.

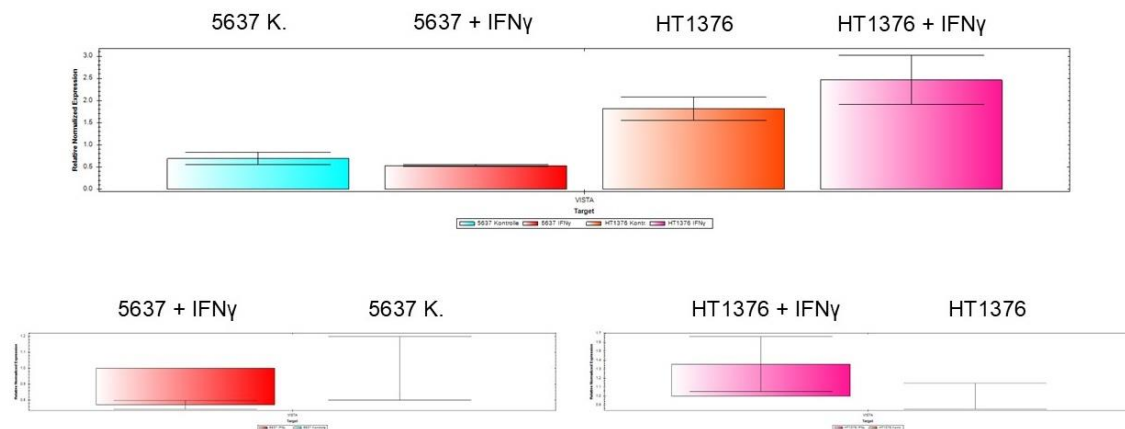
Nach der Analyse des Protein-Niveaus wurden die genannten Zelllinien in jeweils zwei verschiedenen Proben auf das RNA-Niveau untersucht. Die Ergebnisse ähneln denen der Western-Blot-Analyse. *Abbildung 8A* zeigt in Balken die jeweilige

relative normalisierte Expression ohne oder nach 48 Stunden INF- γ -Inkubation. Die Zelllinien RT4 und T24 zeigten keinen signifikanten Einfluss von INF- γ auf die *VSIR*-Expression. Jedoch waren die Ergebnisse für die Zelllinien 5637 und HT1376 nicht eindeutig, sodass die Experimente zur Regulation mit diesen zwei Zelllinien wiederholt wurden (*Abbildung 8B*).

Es konnte kein signifikanter Unterschied bei der erneuten qRT-PCR zwischen der Kontrollgruppe und den mit dem Zytokin behandelten Zelllinien gezeigt werden. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in den hier untersuchten UCB-Zelllinien keine eindeutig reproduzierbare Regulation der *VSIR*-RNA-Expression durch INF- γ nachgewiesen werden konnte.



8A



8B

Abbildung 8: Untersuchungen zur Regulation der Expression von *VSIR* durch IFN- γ mittels qRT-PCR.

Die Inkubationszeit mit einer Konzentration von 200 IU/ml IFN- γ betrug 48 Stunden. Die Abbildung zeigt in Balken die jeweilige relative normalisierte Expression. K.: Kontrolle. Anzahl der biologischen Replikate: 3.

Abbildung 8A veranschaulicht die Ergebnisse für die Zelllinien 5637, HT1376, RT3 und T24.

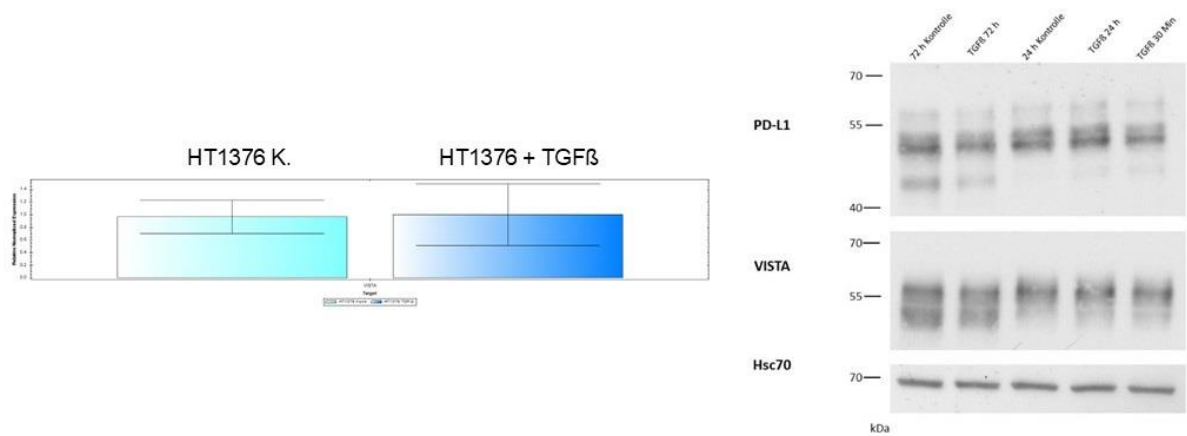
Abbildung 8B zeigt die Ergebnisse eines Versuches für die Zelllinien 5637 und HT1376.

4.3.2 Regulation der VISTA-Expression in UCB-Zelllinien durch TGFβ

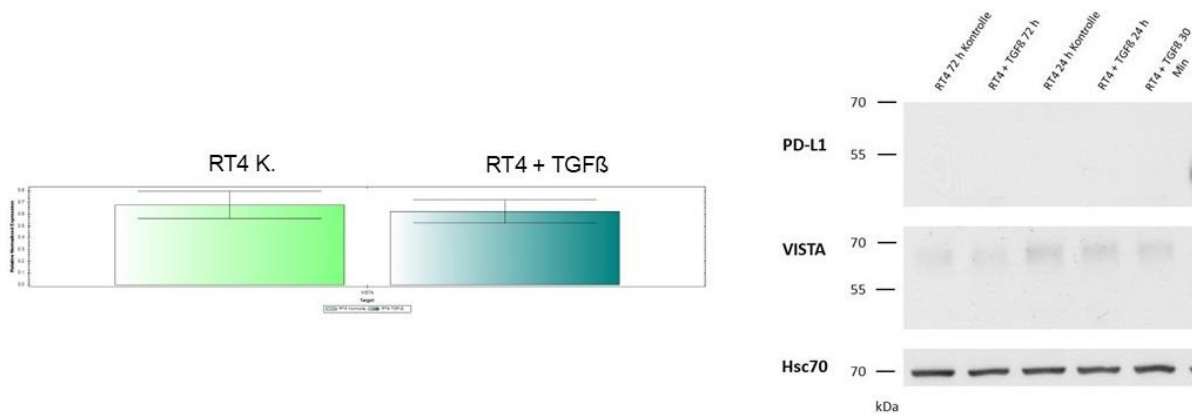
Wie einleitend beschrieben wurde, ist ein Einfluss von TGFβ auf die *VSIR*-Expression bisher nicht eindeutig belegt.

Deshalb wurde zu den ausgewählten UCB-Zelllinien mit signifikanter VISTA-Expression (5637, HT1376, RT4) unter normalen Kultivierungsbedingungen TGFβ in einer Konzentration von 10 ng/ml zugegeben. Nach 30 Minuten, 24 Stunden und 72 Stunden wurden die Zellen geerntet. Abschließend wurden für Western-Blot- und qRT-PCR-Analysen Lysate und mRNA nach dem in Punkten 3.2.2 und 3.2.3 beschriebenen Protokollen hergestellt.

Abbildung 9 veranschaulicht die Ergebnisse der Experimente mit den Zelllinien HT1376 und RT4. Es ist weder auf Protein- noch auf mRNA-Niveau ein signifikanter Unterschied in der VISTA/*VSIR*- und PD-L1-Expression zwischen den mit TGFβ-inkubierten und den unbehandelten Kontrollen erkennbar. In der Arbeit von Bergmann wurde ebenfalls kein Einfluss von TGFβ auf die PD-L1-Expression in den Zelllinien HT1376 und RT4 nachgewiesen (Bergmann, 2019).



9A



9B

Abbildung 9: Nachweis von VSIR/VISTA- und PD-L1-mRNA/Protein nach TGFβ-Behandlung in den Zelllinien HT1376 und RT4

Die Inkubationszeit mit TGFβ betrug für die mRNA-Analysen 72 Stunden und für die Protein-Analyse 30 Minuten, 24 Stunden und 72 Stunden bei einer Konzentration von 10 ng/ml TGFβ. (K.: Kontrolle, h: Stunde, und Min: Minuten). Die Balken stellen die jeweilige relative normalisierte Expression dar. Hsc70 dient als Proteinladekontrolle. Anzahl der biologischen Replikate: 2 (jeweils für WesternBlot und für PCR). Die Abbildungen 9A und 9B veranschaulichen die Ergebnisse für die Zelllinien HT1376 und RT4.

In den Western-Blot-Experimenten der Zelllinie 5637 zeigte sich eine leichte Herabregulation der VISTA-Expression durch TGFβ (*Abbildung 10*). Die Signale sind aber zu schwach, um einen signifikanten Unterschied messen zu können. Jedoch wurde der früher beschriebene heraufregulierende Effekt auf die PD-L1-Expression durch TGFβ in der Zelllinie 5637 (Bergmann, 2019) hiermit erneut bestätigt.

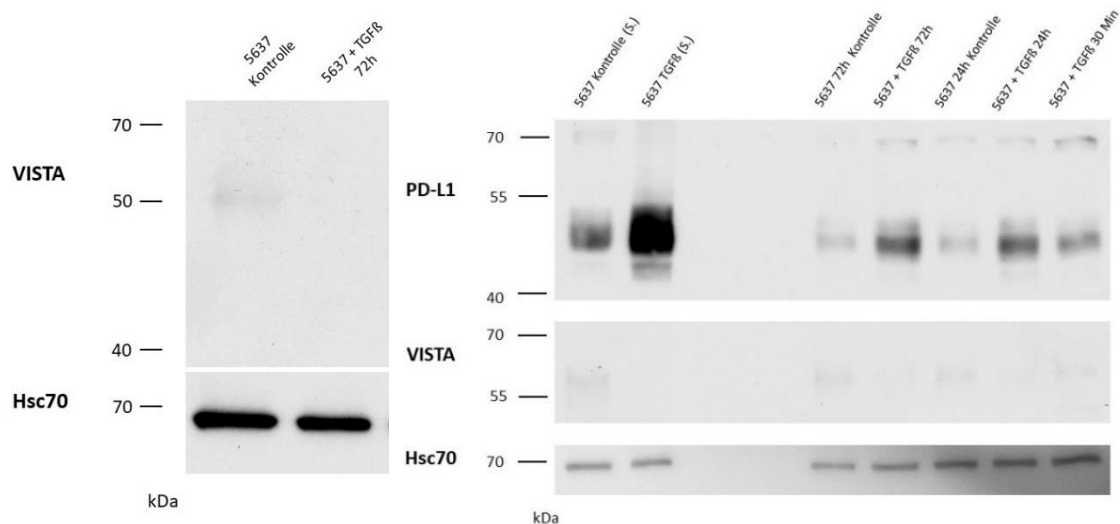


Abbildung 10: Einfluss von TGF β auf die VISTA- und PD-L1-Proteinmengen in der Zelllinie 5637. TGF β wurde in einer Konzentration von 10 ng/ml zu den Zelllinien gegeben. (h: Stunden, Min: Minuten.) Der Nachweis von Hsc70 diente als Protein-Ladekontrolle. Anzahl der biologischen Replikate: 3.

Durch TGF β -Behandlung zeigte sich eine Heraufregulierung der PD-L1-, nicht jedoch der VISTA-Proteinmenge.

Zusammenfassend führt TGF β nicht zur Induktion der VISTA-Expression in der Zelllinie 5637. Jedoch zeigt TGF β in der Zelllinie 5637 im Gegensatz zu RT4 und HT1376 einen starken Effekt auf die PD-L1-Expression.

4.4 Etablierung der Immunfärbung für die CTC-Detektion

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Etablierung einer IF-Färbung zur Detektion von CTCs, mit deren Hilfe auch Keratin-negative (mesenchymale) CTCs gefunden werden können, sowie die Expression von Immuncheckpoint-Molekülen, wie VISTA und PD-L1, auf den CTCs bestimmt werden kann. Zuerst erfolgten die Färbungen an kultivierten UCB-Zelllinien, im Verlauf an kultivierten UCB-Zelllinienzellen, die in Donor-Blut gegeben wurden, und anschließend an prozessierten Blut-Proben von UCB-Patient:innen.

4.4.1 Immunfärbung zum Nachweis von VISTA

Zunächst erfolgte hierfür die Etablierung eines IF-Färbeprotokolls zum Nachweis von VISTA. *Abbildung 11* veranschaulicht die angewendete Färbung für VISTA-positive HT1376-Zellen, die in Donorblut gegeben wurden. (Siehe Punkt 3.2.4.5, Tabelle 16B). Die untersuchten Zellen waren stark positiv für VISTA (orange auf der

Abbildung), jedoch zeigten auch viele Blutzellen eine VISTA-Expression, sodass ein zu starker, für die Erkennung der CTCs unvorteilhafter Hintergrund entstanden ist. Der starke Hintergrund erklärt sich durch die Expressionsmuster des Proteins, da VISTA von den meisten myeloischen und lymphatischen Zellen/Geweben expri-
miert wird (Bharaj et al., 2014, Flies et al., 2011, Lines et al., 2014a, Lines et al., 2014b, Wang et al., 2011, Xu et al., 2018).

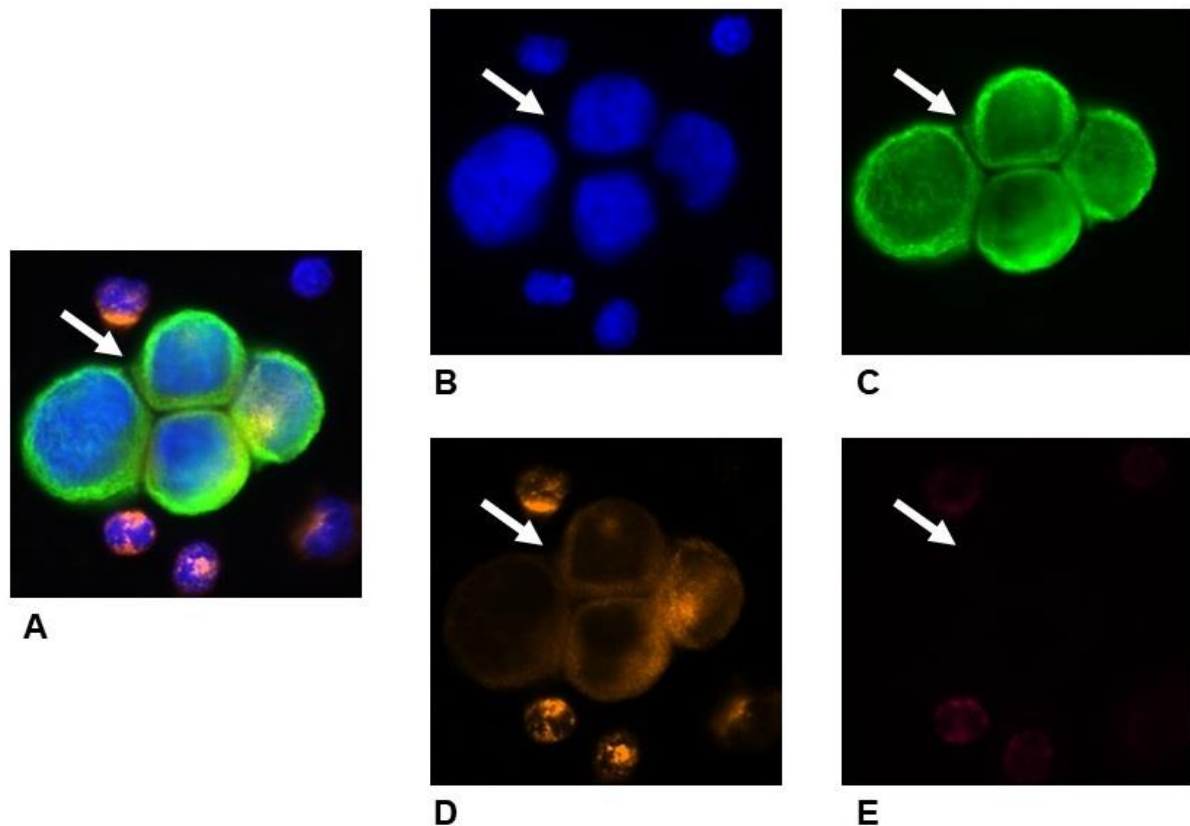


Abbildung 11: VISTA-IF-Färbung von HT1376 Zellen in Donorblut

11A: alle Kanäle; 11B blau: DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole (Zellkerne); 11C grün: pan-Keratin (AlexaFluor® 488-konjugierter Primär-Antikörper, Klon: AE1/AE3 und C11), 11D orange: VISTA (Klon: D1L2G (XP), AlexaFluor® 546-konjugierter Sekundär-Antikörper); 11E rot: CD45 (APC-konjugierter Primär-Antikörper, Klon: REA747) (Leukozytenmarker). Der Pfeil zeigt VISTA-positive HT1376-Tumorzellen.

4.4.2 CD44-Immunfärbung

CD44 ist ein Marker für Krebsstammzellen, dessen Expression von der EMT abhängig sein kann (Primeaux et al., 2022, Xu et al., 2015a). Des Weiteren wurde die CD44-Expression in mesenchymalen, nicht aber in epithelialen UCB-Zelllinien bereits nachgewiesen (Bergmann, 2019). Aufgrund dieser Eigenschaften erwies sich CD44 als ein erfolgversprechender Kandidat für die CTC-Erkennung von

Tumorzellen mit mesenchymalen Eigenschaften. Dafür wurden 647V- und TCC-SUP-UCB-Zelllinien-Zellen, die in Donorblut gegeben wurden, mit dem CD-44-Färbeprotokoll analysiert (siehe Punkt 3.2.4.5, Tabelle 14). *Abbildung 12* veranschaulicht die IF-Färbung von TCC-SUP-Zellen (mesenchymale Zelllinie) in Donorblut. Obwohl die untersuchten Zelllinien-Tumorzellen eine starke CD44-Positivität aufwiesen, war der Hintergrund zu stark, um die Färbung für die Patient:innen-Proben zu verwenden. Die 647V-Zellen waren negativ für CD44.

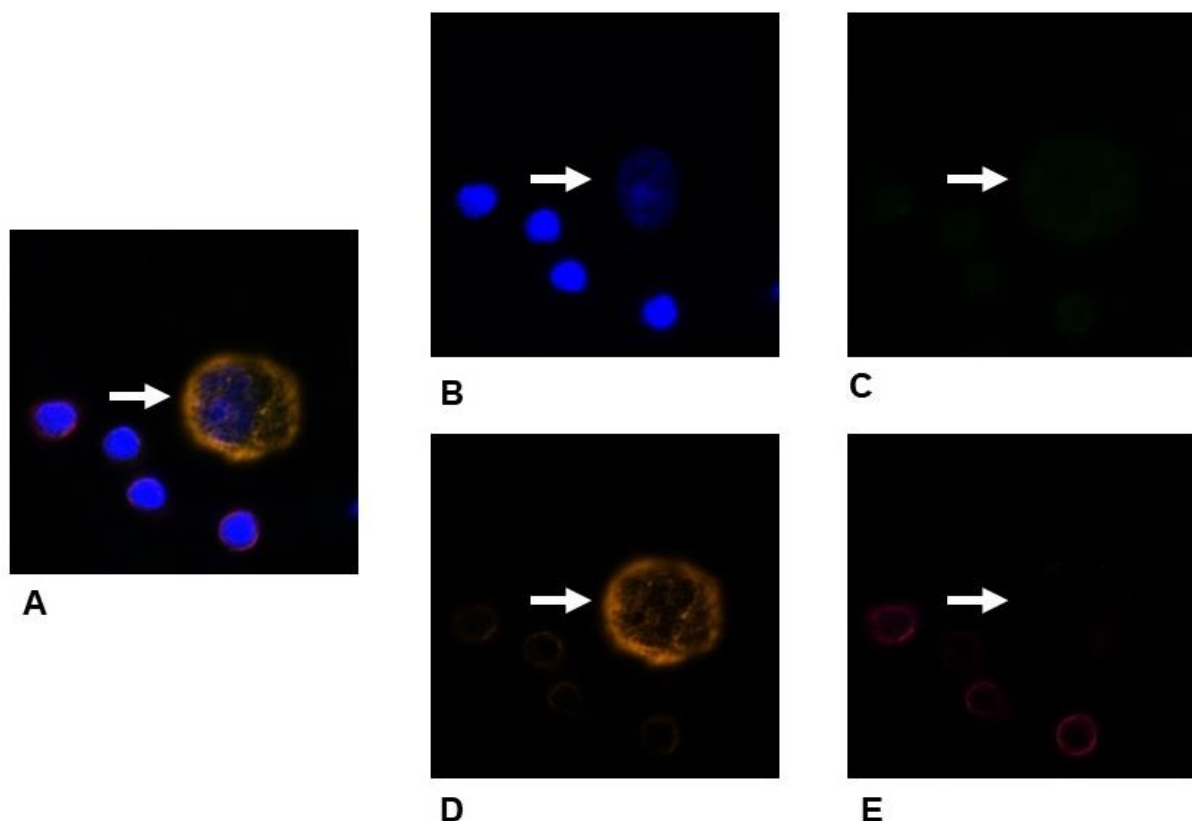


Abbildung 12: CD44-IF-Färbung von TCC-SUP Zellen in Donorblut

12A: alle Kanäle; 12B blau: DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole (Zellkerne); 12C grün: pan-Keratin (AlexaFluor® 488-konjugierter Primär-Antikörper, Klon: AE1/AE3 und C11), 12D orange: CD44 (Klon: G44-26, AlexaFluor® 555-konjugierter Sekundär-Antikörper); 12E rot: CD45 (APC-konjugierter Primär-Antikörper, Klon: REA747) (Leukozytenmarker). Der Pfeil zeigt CD44-positive TCC-SUP-Tumorzelle.

4.4.3 TROP-2-Immunfärbung

Da TROP-2 häufig in UCB nachweisbar ist, kann es auch als therapeutisches Ziel für diese Tumorentität dienen (Bednova and Leyton, 2020, Chou et al., 2022, Faltas et al., 2016, Fontes et al., 2022, Goldenberg and Sharkey, 2019, Hanna et al., 2022).

TROP-2 weist im UCB ähnliche Expressionsmuster wie EpCAM auf. Jedoch konnte in einer vorangegangenen Doktorarbeit gezeigt werden, dass TROP-2 zusätzlich in zwei EpCAM-negativen UCB-Zelllinien (J82 und T24) nachgewiesen werden kann (Bergmann, 2019). Deshalb sollte in der vorliegenden Doktorarbeit die Frage beantwortet werden, ob mit Hilfe von anti-TROP-2-Antikörpern im Vergleich zu anti-EpCAM-Antikörpern möglicherweise mehr CTCs nachgewiesen werden können. Darüber hinaus wollten wir mit dieser Färbung auch die TROP-2-positiven, aber Keratin-negativen Zellen nachweisen.

Das entwickelte Färbeprotokoll mit TROP-2 (siehe Punkt 3.2.4.5, Tabelle 16A) zeigte den geringsten Hintergrund von den verschiedenen Färbeexperimenten. Die Positivkontrollen (647V, HT1376, RT4) waren stark positiv, und die TROP-2-negativen bzw. schwach positiven Zelllinien (TCC-SUP, UMUC-3, T24) zeigten in der IF keine oder nur eine sehr schwache TROP-2-Positivität. *Abbildung 13 zeigt 2 HT1376-Zellen, die starke TROP-2-Positivität aufweisen, und Abbildung 14 veranschaulicht die TROP-2-schwach exprimierende Zelllinie TCC-SUP.*

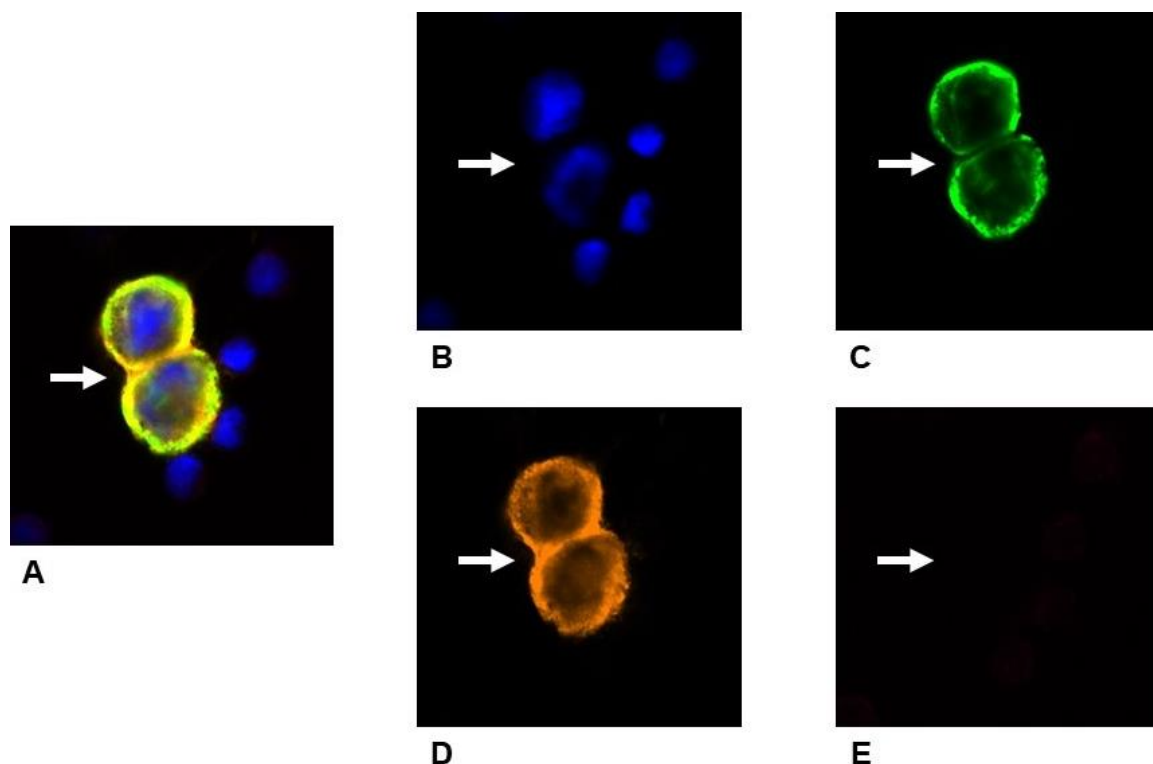


Abbildung 13: TROP-2-IF-Färbung von HT1376 Zellen in Donorblut

13A: alle Kanäle; 13B blau: DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole (Zellkerne); 13C grün: pan-Keratin (AlexaFluor® 488-konjugierter Primär-Antikörper, Klon: AE1/AE3 und C11); 13D orange: TROP-2 (Klon: polyklonal, AlexaFluor® 546-konjugierter Sekundär-Antikörper); 13E rot: CD45 (APC-konjugierter Primär-Antikörper, Klon: REA747) (Leukozytenmarker). Der Pfeil zeigt TROP-2-positive HT1376-Tumorzellen.

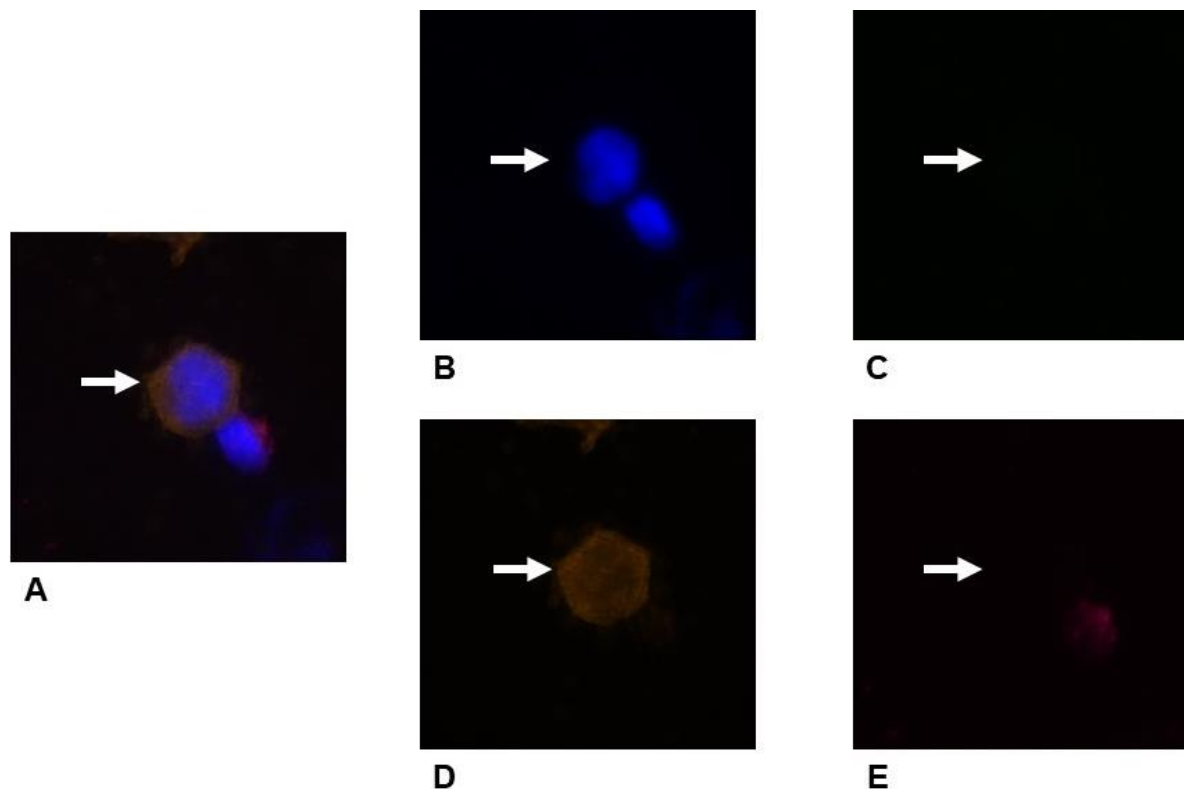


Abbildung 14: TROP-2-IF-Färbung von TCC-SUP Zellen in Donorblut

14A: alle Kanäle; 14B blau: DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole (Zellkerne); 14C grün: pan-Keratin (AlexaFluor® 488-konjugierter Primär-Antikörper, Klon: AE1/AE3 und C11); 14D orange: TROP-2 (Klon: polyklonal, AlexaFluor® 546-konjugierter Sekundär-Antikörper); 14E rot: CD45 (APC-konjugierter Primär-Antikörper, Klon: REA747) (Leukozytenmarker). Der Pfeil zeigt eine schwach TROP-2-positive TCC-SUP-Tumorzelle.

Diese IF-Färbung wurde bei jeweils drei Zytospins (Anreicherung durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation) von jeweils 24 verschiedenen UCB-Patient:innen angewendet. Obwohl die Positivkontrollen durchgehend positiv für pan-Keratin/TROP-2 waren, konnte mit dieser Färbung keine CTC-verdächtige Zelle gefunden werden, sodass ein zusätzlicher Marker angewendet wurde.

4.4.4 Immunfärbung mit TROP-2, PD-L1 und CD41

Um die CTC-Detektionsrate weiter zu erhöhen, wurde der anti-PD-L1-Antikörper hinzugefügt. PD-L1 wird von vielen Blasenkrebszellen exprimiert und spielt eine wichtige Rolle in der Therapie von UCBs, wie einleitend erörtert wurde. Des Weiteren wurde ein IF-Protokoll für PD-L1 in unserer Arbeitsgruppe bereits etabliert (siehe Punkt 3.2.4.5, Tabelle 15B) und erwies sich als geeignet, da sich positive Kontrollzellen als stark positiv erwiesen und die schwache Hintergrundfärbung tolerierbar ist (Bilder nicht gezeigt). Nach der Etablierung der Immunfärbung mit PD-L1-, TROP-2-

und pan-Keratin-Antikörpern (siehe Punkt 3.2.4.5, Tabelle 17) als positive Marker wurden mit diesem neuen Protokoll erneut Zytospins (Anreicherung durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation) von 2 Patient:innen (Patient:in 001 und 009) untersucht. Aufgrund der begrenzten Anzahl von IF-Kanälen war es in diesem Protokoll nicht möglich, zwischen PD-L1- und TROP-2-positiven Zellen zu unterscheiden. Des Weiteren wurden mit einer anderen Version (siehe Punkt 3.2.4.5, Tabelle 18) Zytospins von drei Patient:innen (031, 032 und 033 – jeweils Anreicherung durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation und durch Parsortix®) untersucht. Aufgrund der begrenzten Anzahl von IF-Kanälen war es in diesem Protokoll nicht möglich, zwischen pan-Keratin- und TROP-2-positiven Zellen zu unterscheiden.

Es zeigten sich mehrere verdächtige Zellen, die negativ für CD45 waren und eine geringe oder moderate Positivität für pan-Keratin, TROP-2 und PD-L1 aufwiesen. *Abbildung 15* zeigt eine dieser Zellen.

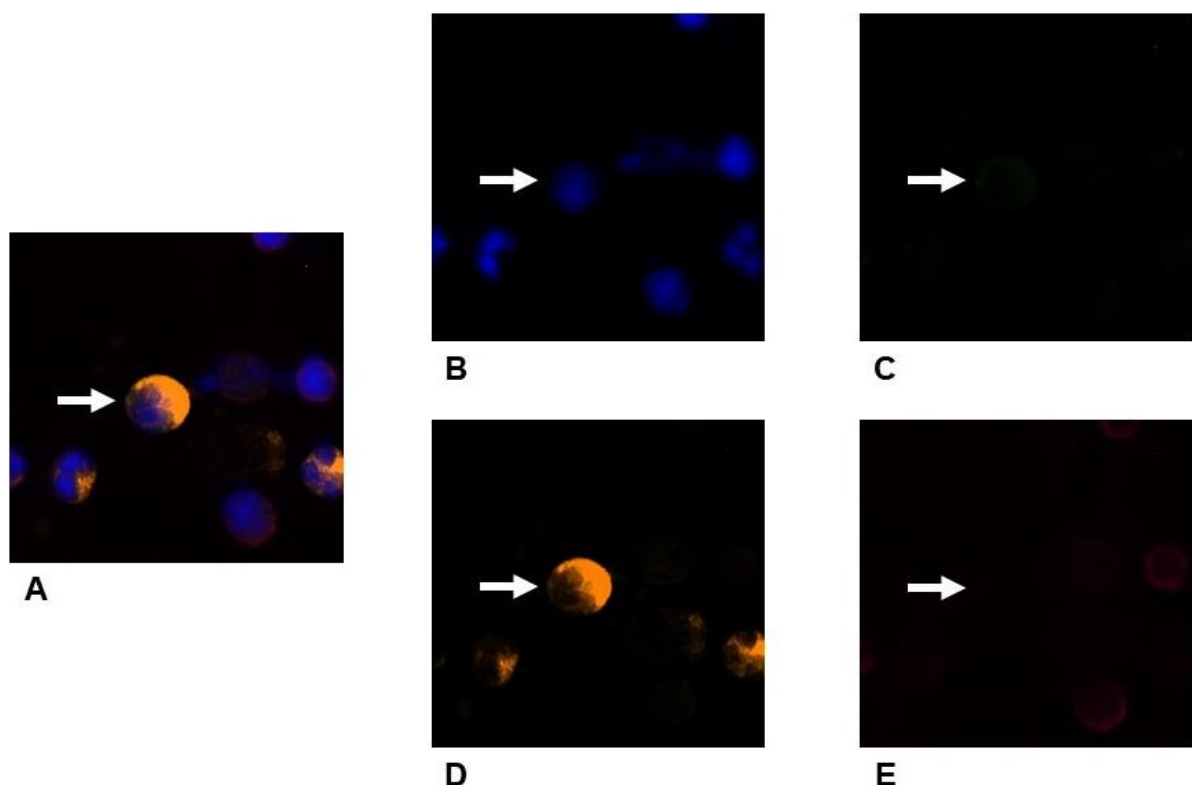


Abbildung 15: IF-Färbung von Patient:in Nummer 9

15A: alle Kanäle; 15B blau: DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole (Zellkerne); 15C grün: pan-Keratin (AlexaFluor® 488-konjugierter Primär-Antikörper, Klon: AE1/AE3 und C11); 15D orange: TROP-2 (Klon: polyklonal, AlexaFluor® 546-konjugierter Sekundär-Antikörper) und PD-L1 (Klon: E1L3N (XP), AlexaFluor® 546-konjugierter Sekundär-Antikörper); 15E rot: CD45 (APC-konjugierter Primär-Antikörper, Klon: REA747) (Leukozytenmarker). Der Pfeil zeigt eine TROP-2/PD-L1-positive und Keratin- und CD45-negative Zelle.

Jedoch zeigten sich bei den untersuchten 2 Patient:innen diese CD45-negativen Zellen in einer unerwartet hohen Anzahl und wiesen starke morphologische Ähnlichkeiten auf. Daher wurde vermutet, dass es sich bei diesen Zellen um CD45-negative Blutzellen, und aufgrund der Zellmorphologie u. a. auch um Megakaryozyten handeln könnte. Um diese These zu prüfen, wurde zusätzlich zur bereits beschriebenen Färbung ein CD41-Antikörper als negativer Marker hinzugefügt (Siehe Punkt 3.2.4.5, Tabelle 19). Damit konnten diese morphologisch ähnlichen großen CD45-negativen Zellen als CD41-positive Zellen identifiziert werden (siehe *Abbildung 16*). Das Protokoll wurde um die Zugabe des anti-CD41-Antikörpers erweitert und für die weitere Analyse von Patient:innen-Proben verwendet. *Abbildung 17* veranschaulicht das endgültige IF-Färbeprotokoll bei einer positiven Kontrolle (Blut+647V-Tumorzellen). Dieses Protokoll wurde anschließend auf alle weiteren Patient:innen-Proben angewendet.

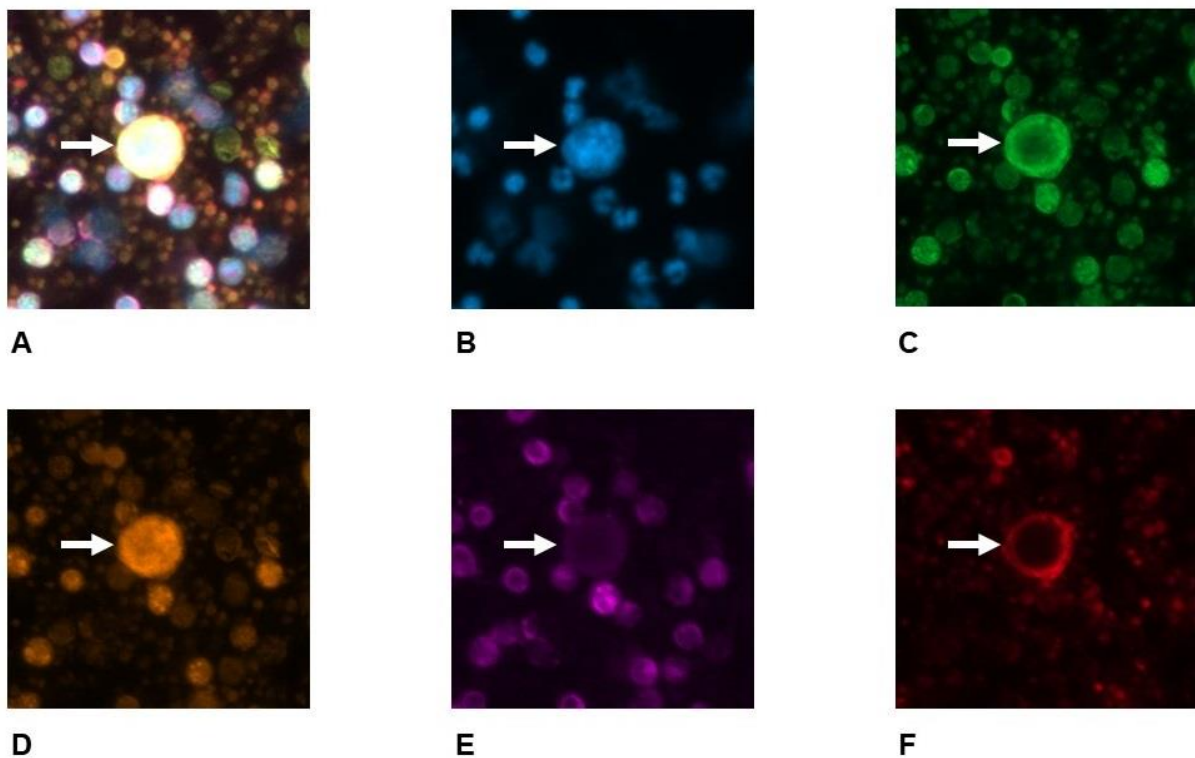


Abbildung 16: IF-Färbung von Patient:in Nummer 23

16A: alle Kanäle; 16B blau: DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole (Zellkerne); 16C grün: pan-Keratin (AlexaFluor® 488-konjugierter Primär-Antikörper, Klon: AE1/AE3 und C11) und TROP-2 (Klon: polyclonal, AlexaFluor® 488-konjugierter Sekundär-Antikörper); 16D orange: PD-L1 (Klon: E1L3N (XP), AlexaFluor® 555-konjugierter Sekundär-Antikörper); 16E rosa: CD45 (PerCP-konjugierter Primär-Antikörper, Klon: HI30) (Leukozytenmarker); 16F rot: CD41 (APC-konjugierter Primär-Antikörper, Klon: HIP8). Der Pfeil zeigt eine CD41-positive Zelle und CD41-positive Thrombozyten.

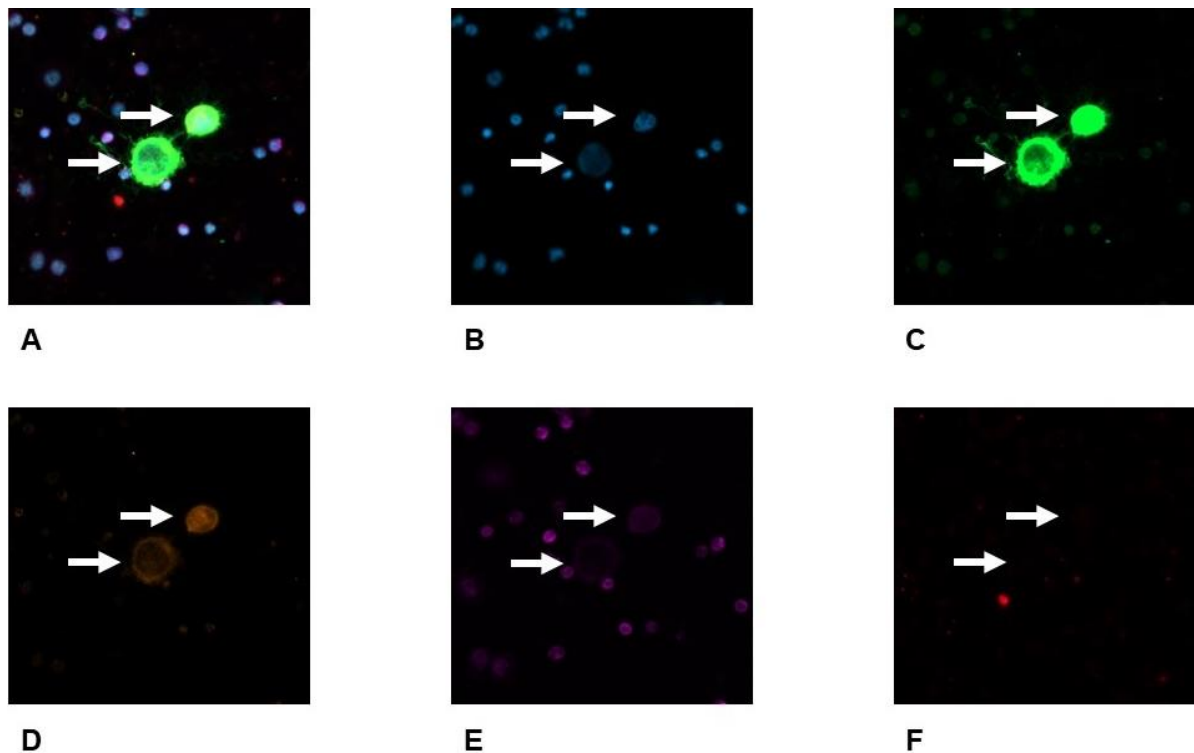


Abbildung 17: IF-Färbung von 647V Zellen in Donorblut

17A: alle Kanäle; 17B blau: DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole (Zellkerne); 17C grün: pan-Keratin (AlexaFluor® 488-konjugierter Primär-Antikörper, Klon: AE1/AE3 und C11) und TROP-2 (Klon: polyklonal, AlexaFluor® 488-konjugierter Sekundär-Antikörper); 17D orange: PD-L1 (Klon: E1L3N (XP), AlexaFluor® 555-konjugierter Sekundär-Antikörper); 17E rosa: CD45 (PerCP-konjugierter Primär-Antikörper, Klon: HI30) (Leukozytenmarker); 17F rot: CD41 (APC-konjugierter Primär-Antikörper, Klon: HIP8). Die Pfeile zeigen 647V-Tumorzellen.

Die 647V-Zellen erwiesen sich als Keratin-, PD-L1- oder TROP-2-positiv und CD45-, CD41-negativ.

4.5 Zusammenfassung der CTC-Detektionsverfahren

Von 76 UCB-Patient:innen, bei denen eine radikale Zystektomie im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt wurde, wurden Blutproben gesammelt. Die Blutgewinnung erfolgte vor der Operation, und es wurden von jedem/r Patient:in je drei periphere-Blutproben gesammelt (ein EDTA-, ein CellSave®- und ein Transfix®-Röhrchen) und analysiert.

Die CellSave®- und die Transfix®-Proben wurden innerhalb von 72 Stunden nach Blutentnahme verarbeitet, wie im Punkt 3.2.4.2 und 3.2.4.3 beschrieben. Die EDTA-Röhrchen wurden ohne Verzögerung nach der Blutentnahme, wie im Punkt 3.2.4.1 beschrieben, prozessiert. Nach Anreicherung mit Parsortix® und Ficoll-

Dichtegradientenzentrifugation wurden Zytospins hergestellt und anschließend einer IF-Färbung unterzogen. Nach der mikroskopischen Begutachtung wurden die auffälligen (tumorverdächtigen) Zellen gepickt und es erfolgte eine Amplifikation genomischer Einzelzell-DNA durch Gesamtgenomamplifikation (3.2.4.7). Nach Qualitätskontrolle wurden die ausgewählten Zellen durch NGS sequenziert. *Abbildung 18* veranschaulicht die erwähnte Vorgehensweise in einem Flowchart.

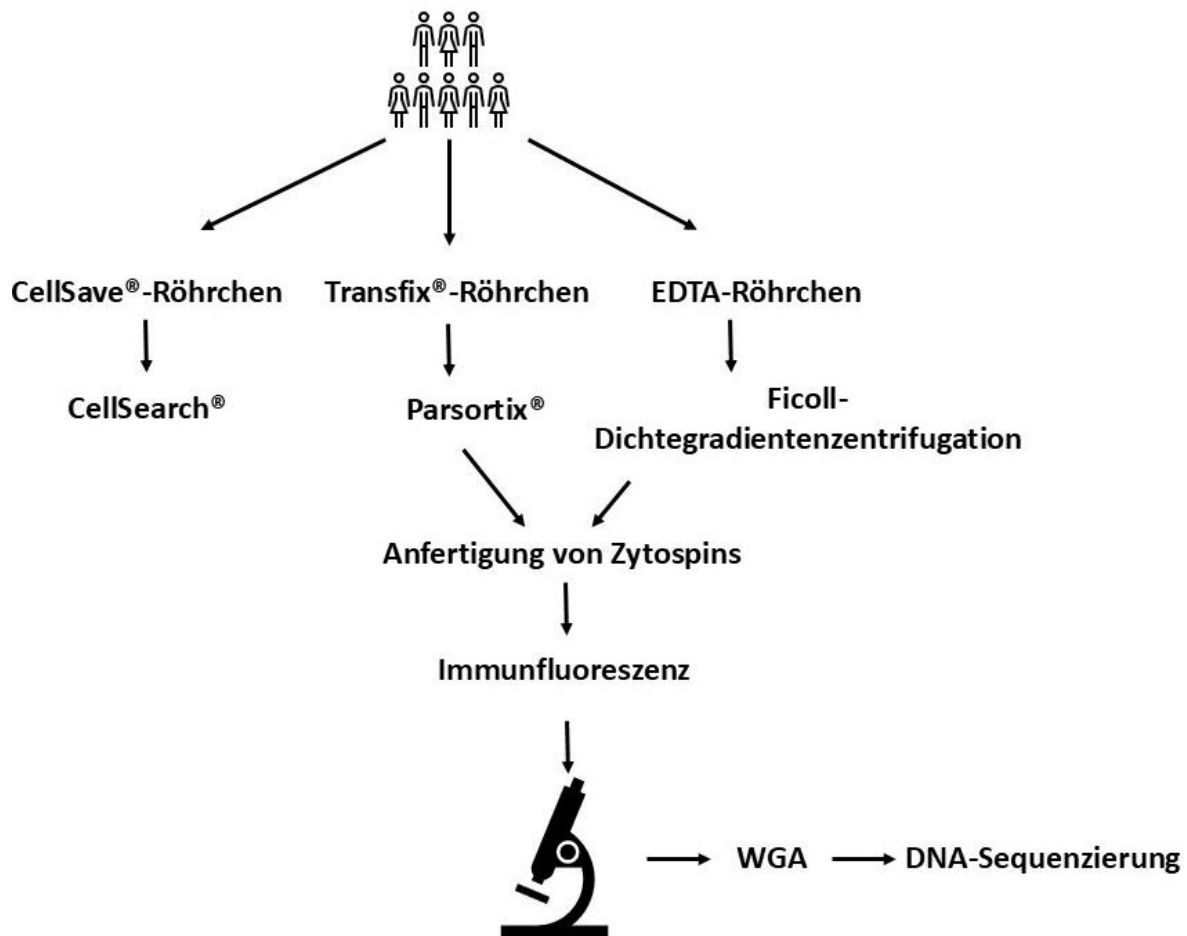


Abbildung 18: Flowchart zu den angewendeten CTC-Detektionsverfahren

Von allen in die Studie eingeschlossenen UCB-Patient:innen wurden Blutproben vor der radikalen Zystektomie entnommen und mittels CellSearch®, Parsortix® und Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation untersucht. Nach der Anreicherung mit Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation und Parsortix® wurden alle Proben über IF analysiert und ausgewählte Zellen über WGA und NGS weiter charakterisiert.

4.6 Gesamtgenom-Amplifikation und Sequenzierung – Untersuchungen zum Nachweis des Tumorausprungs der Zellen nach Anreicherung durch Parsortix® und Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

Nach Identifizierung durch IF wurden die CTC-verdächtigen Zellen durch Mikromanipulation isoliert. Von den 163 auffälligen Zellen (129 nach Parsortix®-Anreicherung und 34 nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation) erfolgte die Isolation von 53 Zellen (6/34 nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation und 47/129 nach Parsortix®-Anreicherung). Anschließend erfolgte die Gesamtgenomamplifikation von 29 der isolierten Zellen.

Der geringen Rate der erfolgreichen Einzelzellisolation können mehrere Ursachen zugrunde liegen. Einerseits waren einige Zellen nach Entfernen der Deckgläser nicht mehr nachweisbar. Eine mögliche Begründung dafür ist, dass die Objektträger vor der Entfernung der Deckgläser in PBS zur Ablösung der Deckgläser inkubiert wurden, wodurch einige Zellen verloren gingen.

In anderen Fällen lagen zwischen der Immunfärbung der Zellen und der Einzelzellisolation längere Zeitspannen, sodass die Zellen während des Prozesses der Einzelzellisolierung beschädigt oder zusammen mit anderen benachbarten Zellen (Leukozyten) isoliert wurden. Im Anhang in *Tabelle 23* sind die Charakteristika der erfolgreich isolierten CTC-Kandidaten-Zellen aufgelistet.

Anschließend erfolgten die Amplifikation genomischer Einzelzell-DNA durch WGA und die nachgeschaltete Qualitätskontrolle über PCR und Agarose-Gelelektrophorese (*Abbildung 19*). Bei ausreichend guter DNA-Qualität (Bandenanzahl ≥ 2) wurde das genetische Material der unten genannten Zellen zur NGS ausgewählt. Idealerweise sollten die Zellen nach WGA 4 Banden aufweisen, jedoch wurden auch Zellen mit einer Bandenanzahl ≥ 2 für die Untersuchung durch NGS ausgewählt.

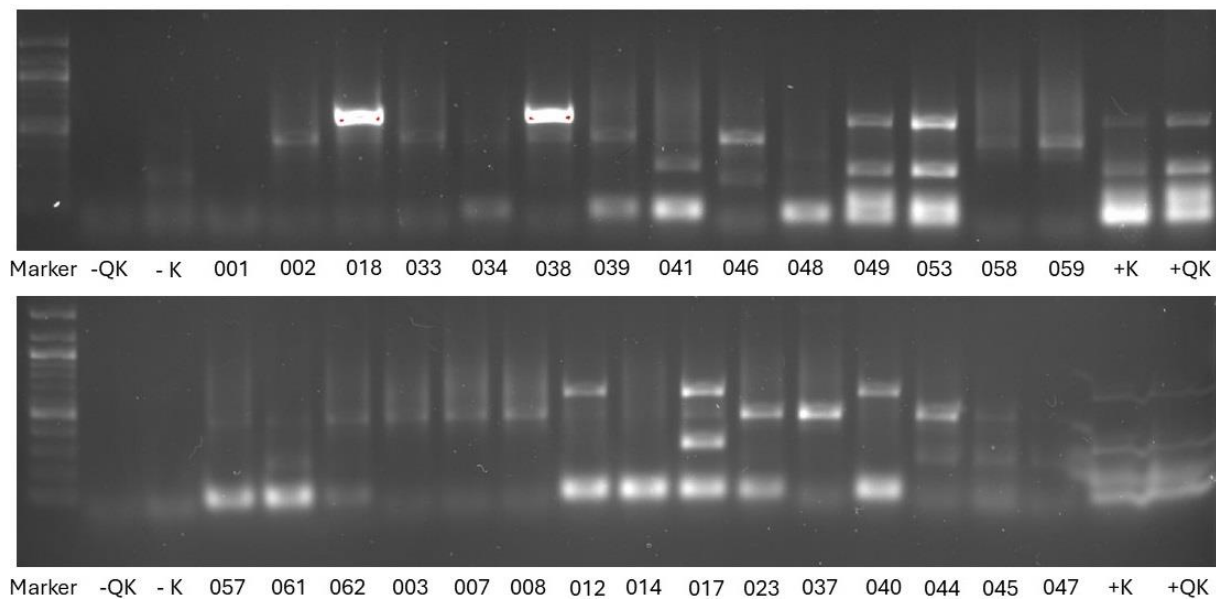


Abbildung 19: Agarosegelelektrophorese zum Nachweis des WGA-Endproduktes

-QK und +QK: negative und positive Qualitätskontrolle. -K und +K: negative und positive Kontrolle. Für die positive Kontrolle wurde 1 µl DNA mit einer Konzentration von 1 ng/µl (MCF7-DNA) verwendet, um die Funktionalität der Amplifikation im *Ampli1*-Kit zu überprüfen. Dies diente dazu, sicherzustellen, dass die Reagenzien und die PCR-Bedingungen wie vorgesehen arbeiteten. Die positive Qualitätskontrolle wurde mit der gleichen humanen genomischen DNA mit einer standardisierten Konzentration von 100 ng/µl (MCF7-DNA) im Rahmen des *Ampli1* QC-Kits durchgeführt. Ziel war es, die Integrität und Zuverlässigkeit des gesamten Prozesses, einschließlich der Zellisolierung, Amplifikation und Vorbereitung für die Sequenzierung, zu validieren. Für die negative Kontrolle wurde nukleinsäurefreies Wasser aus dem Kit als Vorlage verwendet, um sicherzustellen, dass keine unspezifische Amplifikation oder Kontamination in den Reagenzien, Geräten oder dem Protokoll auftritt. Das Fehlen eines Amplifikationssignals bestätigte die Abwesenheit von Kontamination. Die negative Qualitätskontrolle wurde ebenfalls mit Wasser aus dem Kit durchgeführt, um zu überprüfen, dass der gesamte Workflow – von der Zellisolierung über die Amplifikation bis zur Analyse – ohne systematische Fehler oder unspezifische Amplifikationen durchgeführt wurde. Ein positiver Amplifikationsnachweis in dieser Kontrolle hätte auf Fehler oder Kontaminationen im System hingewiesen. Die Zellen 053 (4 Banden), 049 (4 Banden), 017 (4 Banden), 012 (3 Banden), 018 (3 Banden), 038 (3 Banden), 046 (3 Banden – jedoch nicht eindeutig), 041 (2 Banden), 040 (2 Banden), 023 (2 Banden) wurden für die vollständige Genomsequenzierung ausgewählt.

Die ausgewählten WGA-Produkte wurden auf der DNBseqTM-Plattform (BGI Genomics, Warschau, Polen) einer vollständigen Genomsequenzierung unterzogen. Die weitere Analyse der Daten erfolgte durch PD Dr. Simon Joosse (Institut für Tumorbilogie, UKE).

Die Gesamtgenom-NGS-Daten veranschaulichen in einigen Zellen ein breites Spektrum an CNVs, einschließlich Zugewinnen und Verlusten von verschiedenen chromosomalen Bereichen (*Abbildungen 21-26*).

Die erhaltenen CNV-Profile mit Zugewinnen und Verlusten in verschiedenen chromosomalen Regionen lassen schlussfolgern, dass es sich bei drei der isolierten Zellen (012, 049 und 053) mit großer Wahrscheinlichkeit und bei zwei der isolierten Zellen (018 und 038) wahrscheinlich um Tumorzellen handelt. Jedoch waren fünf der untersuchten Zellen wahrscheinlich keine Tumorzellen (017, 023, 040, 041, 046). Unter den bestätigten CTCs befanden sich sowohl isolierte Zellen nach Anreicherung mit dem Parsortix®-System (012, 018 und 038) als auch nach Anreicherung durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (049 und 053). Die *Abbildungen 20-24* veranschaulichen die zu den jeweiligen untersuchten Zellen gehörenden IF-Färbungen sowie die CNV-Daten der isolierten und durch NGS analysierten Zellen. *Abbildung 25* veranschaulicht zum Vergleich das Profil einer wahrscheinlich nicht als CTC einzustufenden Zelle. Es ist gut zu erkennen, dass im Vergleich zu den anderen vorgestellten Zellen (*Abbildung 20-24*) Zelle 40 (*Abbildung 25*) keine signifikanten chromosomalen Aberrationen aufweist.

Erwähnenswert ist, dass in der Gruppe der wahrscheinlichen Tumorzellen alle WGA-Endprodukte eine Banden-Anzahl von ≥ 3 und dadurch eine gute Qualität aufwiesen. Im Gegensatz dazu war die Qualität des WGA-Endproduktes bei den isolierten nicht-Tumorzellen geringer (durchschnittliche Bandenanzahl: 2,6; Median: 2).

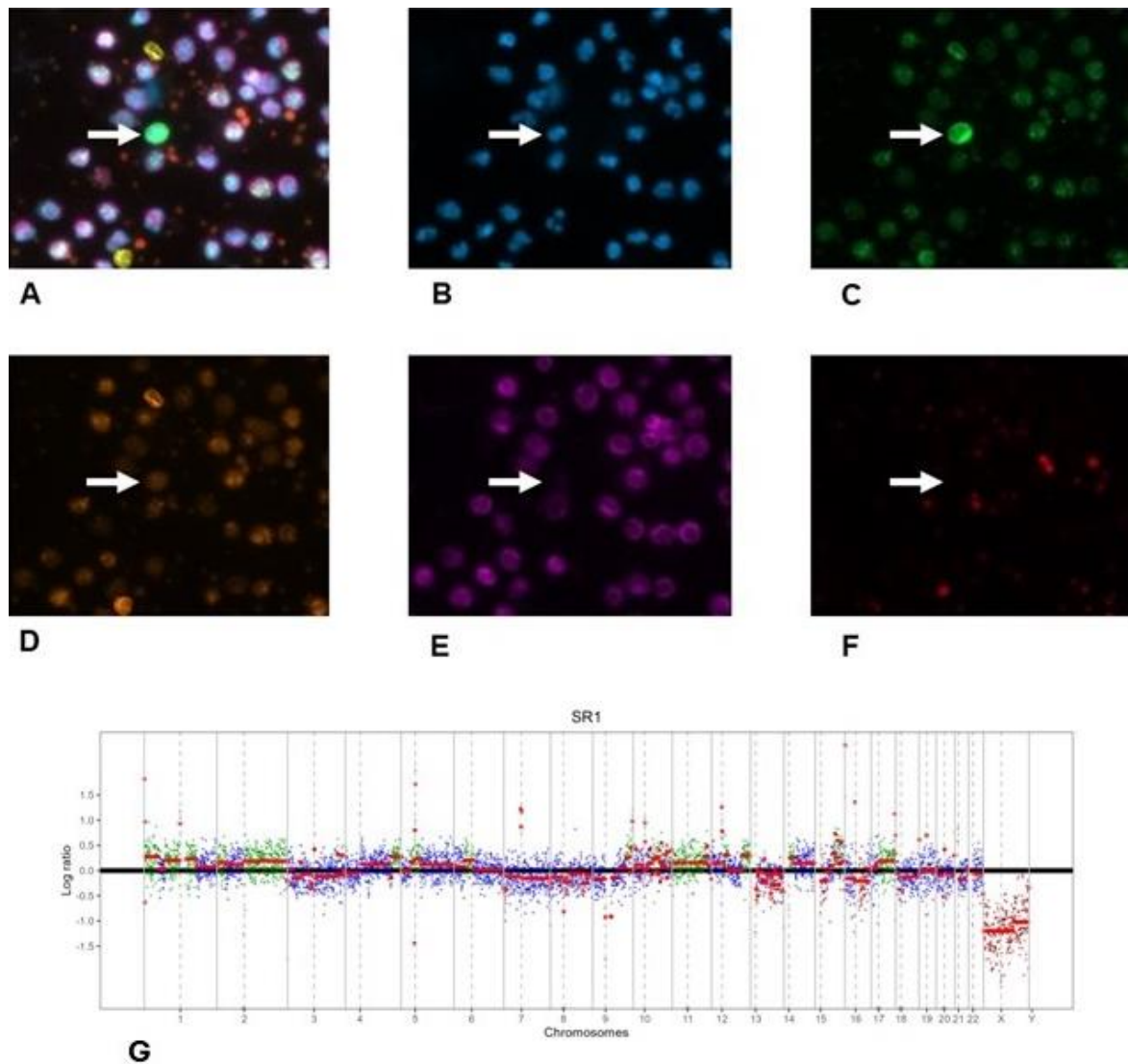


Abbildung 20: Isolierte Zelle 053

20A: alle Kanäle; 20B blau: DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole (Zellkerne); 20C grün: pan-Keratin (AlexaFluor® 488-konjugierter Primär-Antikörper, Klon: AE1/AE3 und C11) und TROP-2 (Klon: polyklonal, AlexaFluor® 488-konjugierter Sekundär-Antikörper); 20D orange: PD-L1 (Klon: E1L3N (XP), AlexaFluor® 555-konjugierter Sekundär-Antikörper); 20E rosa: CD45 (PerCP-konjugierter Primär-Antikörper, Klon: HI30) (Leukozytenmarker); 20F rot: CD41 (APC-konjugierter Primär-Antikörper, Klon: HIP8). Der Pfeil zeigt die isolierte Zelle 053. Zelle 053 ist eine Keratin-/TROP-2-positive, PD-L1-negative Zelle. 20G: Plot des CNV-Profiles entlang des gesamten Genoms der Zelle 053.

In der Zelle 053 zeigten sich u. a. Zugewinne der Kopienanzahl der Chromosomenbereiche 1p und q, 2q, 4q, 5p und q, 11p und q, 12q, 14p und 17q, sowie Verluste von 13 p und q sowie 16q.

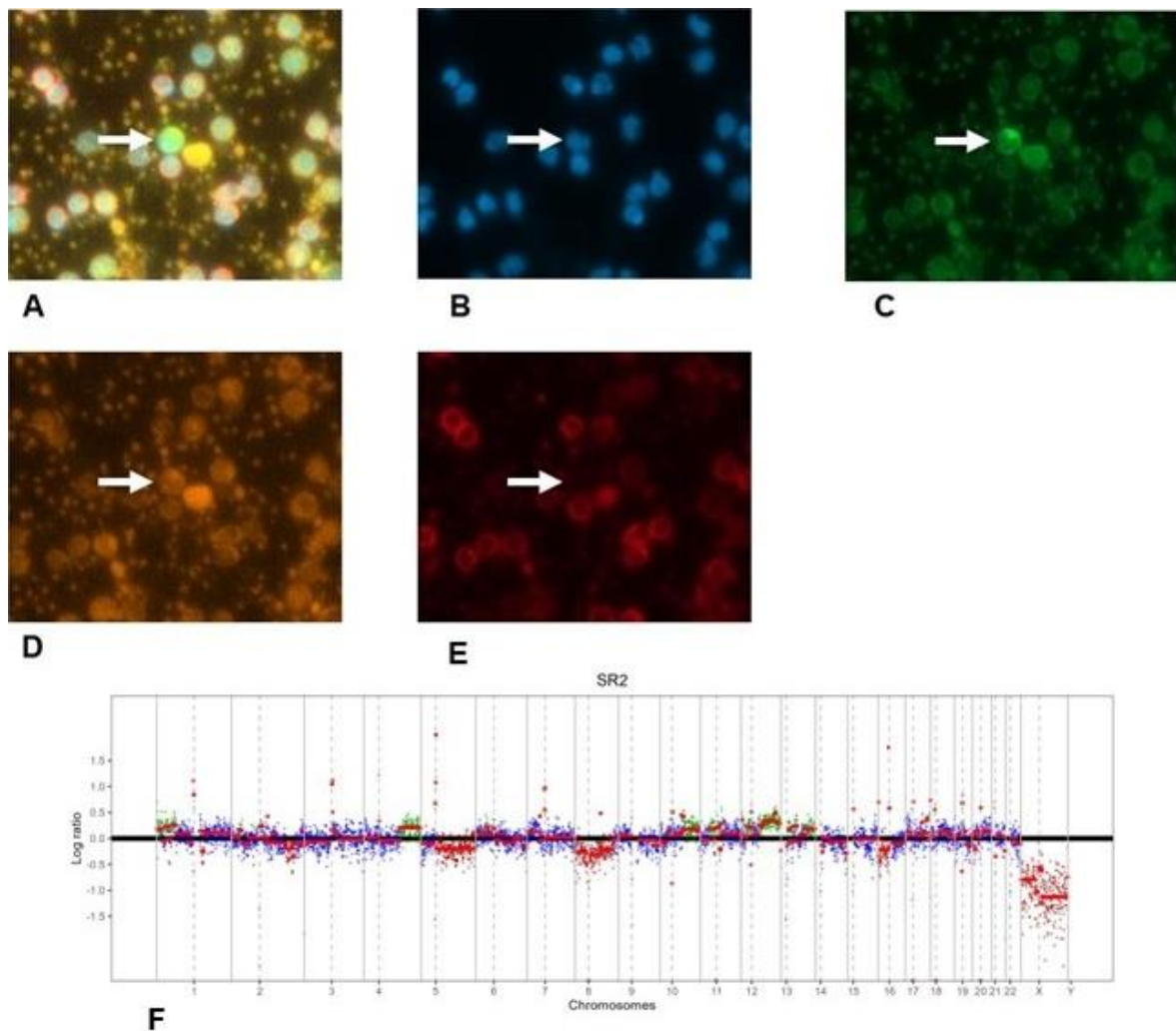


Abbildung 21: Isolierte Zelle 049

21A: alle Kanäle; 21B blau: DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole (Zellkerne); 21C grün: pan-Keratin (AlexaFluor® 488-konjugierter Primär-Antikörper, Klon: AE1/AE3 und C11) und TROP-2 (Klon: polyklonal, AlexaFluor® 488-konjugierter Sekundär-Antikörper); 21D orange: PD-L1 (Klon: E1L3N (XP), AlexaFluor® 555-konjugierter Sekundär-Antikörper); 21E rot: CD45 (APC-konjugierter Primär-Antikörper, Klon: REA747) (Leukozytenmarker) und CD41 (APC-konjugierter Primär-Antikörper, Klon: HIP8). Der Pfeil zeigt die isolierte Zelle 049. Zelle 049 ist eine Keratin-/TROP-2-positive und PD-L1-leicht positive Zelle. 21F: Plot des CNV-Profiles entlang des gesamten Genoms der Zelle 049.

In der Zelle 049 zeigten sich u. a. Zugewinne der Kopienanzahl der Chromosomenbereiche 1p, 4q, 10q, 12q und 13pq sowie Verluste auf den Chromosomen 2q, 5q, 6pq, 8pq oder 16p.

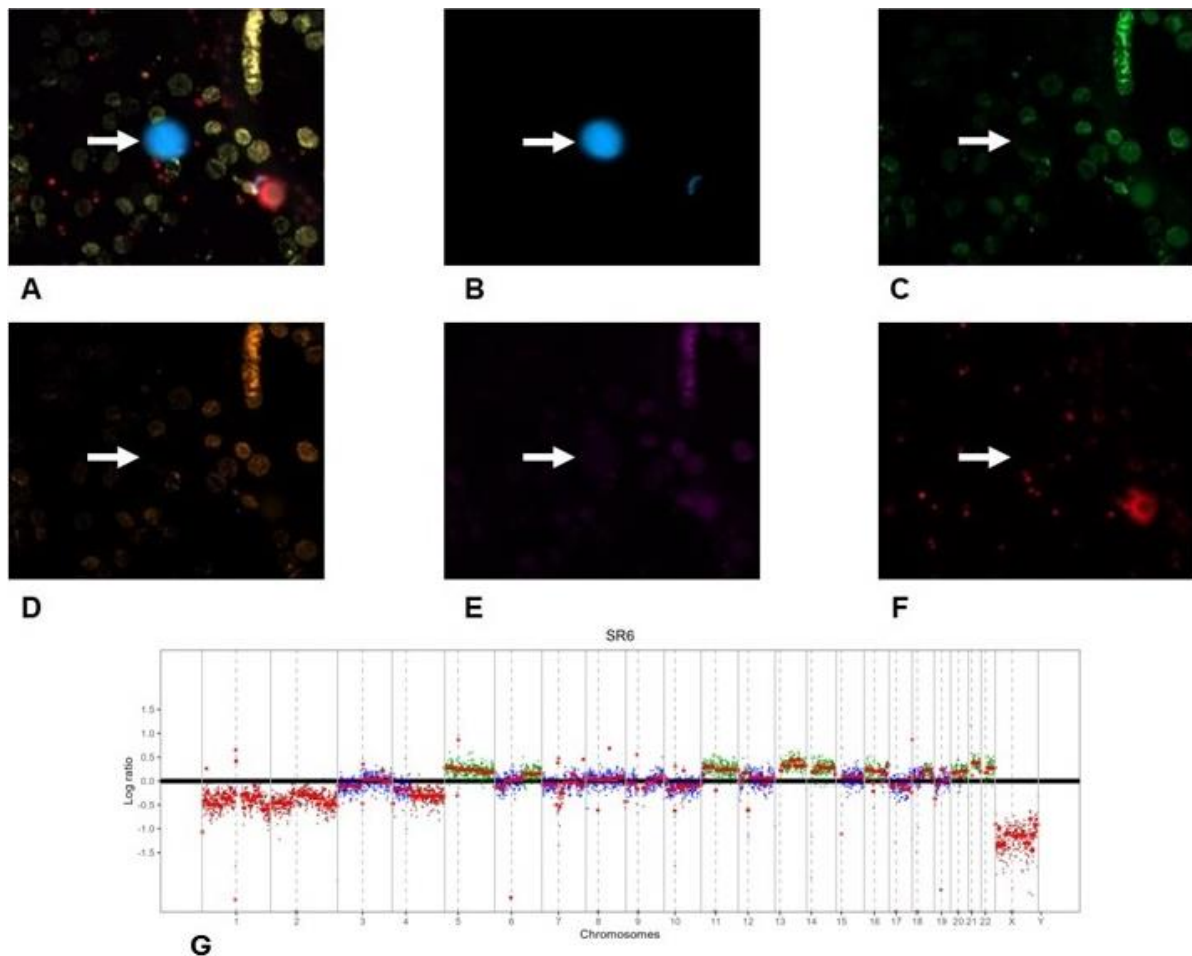


Abbildung 22: Isolierte Zelle 012

22A: alle Kanäle; 22B blau: DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole (Zellkerne); 22C grün: pan-Keratin (AlexaFluor® 488-konjugierter Primär-Antikörper, Klon: AE1/AE3 und C11) und TROP-2 (Klon: polyklonal, AlexaFluor® 488-konjugierter Sekundär-Antikörper); 22D orange: PD-L1 (Klon: E1L3N (XP), AlexaFluor® 555-konjugierter Sekundär-Antikörper); 22E rosa: CD45 (PerCP-konjugierter Primär-Antikörper, Klon: HI30) (Leukozytenmarker); 22F rot: CD41 (APC-konjugierter Primär-Antikörper, Klon: HIP8). Der Pfeil zeigt die isolierte Zelle 012. Zelle 012 ist eine Keratin-/TROP-2- und PD-L1-negative Zelle. 22G: Plot des CNV-Profiles entlang des gesamten Genoms der Zelle 012.

In der Zelle 012 zeigten sich u. a. Zugewinne der Kopienanzahl der Chromosomenbereiche 5pq, 6q, 11pq, 13pq, 14pq, 16p sowie Verluste in 2q, 5q, 6pq, 8pq oder 16p, 20, 21, 22 und Verluste der Chromosomen 1 und 2 sowie 4q.

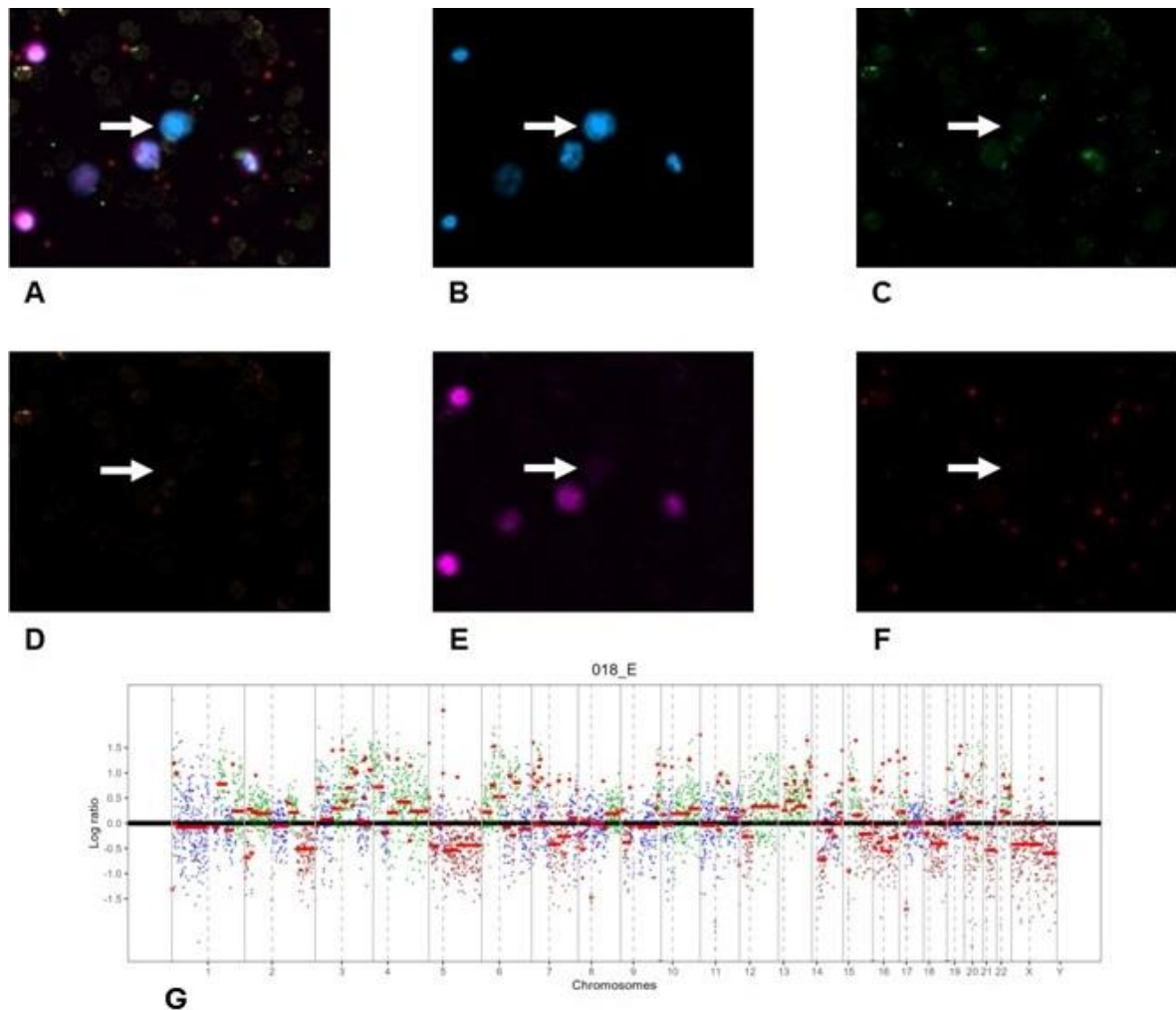


Abbildung 23: Isolierte Zelle 018

23A: alle Kanäle; 23B blau: DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole (Zellkerne); 23C grün: pan-Keratin (AlexaFluor® 488-konjugierter Primär-Antikörper, Klon: AE1/AE3 und C11) und TROP-2 (Klon: polyclonal, AlexaFluor® 488-konjugierter Sekundär-Antikörper); 23D orange: PD-L1 (Klon: E1L3N (XP), AlexaFluor® 555-konjugierter Sekundär-Antikörper); 23E rosa: CD45 (PerCP-konjugierter Primär-Antikörper, Klon: HI30) (Leukozytenmarker); 23F rot: CD41 (APC-konjugierter Primär-Antikörper, Klon: HIP8). Der Pfeil zeigt die isolierte Zelle 018. Zelle 018 ist eine Keratin-/TROP-2- und PD-L1-negative Zelle. 23G: Plot des CNV-Profiles entlang des gesamten Genoms der Zelle 018.

In der Zelle 018 zeigten sich u. a. Zugewinne der Kopienanzahl der Chromosomenbereiche 1q, 2p, 3p und q, 6p und q, 8q, 10p und q, 12q, 13p und q und 15p sowie Verluste in 2q, 5p und q, 7q, 12p, 15q, 16p und q, 20, 21.

Die Zellen 012 und 018 stammen aus einer Blutprobe. Die CNV-Profile dieser beiden Zellen unterscheiden sich jedoch stark voneinander, was auf die Heterogenität der CTCs in dieser/diesem Patient:in hinweist. Lediglich Zugewinne von 6q und 13p/q sowie Verluste von 2q und 7q ließen sich übereinstimmend in beiden Zellen nachweisen.

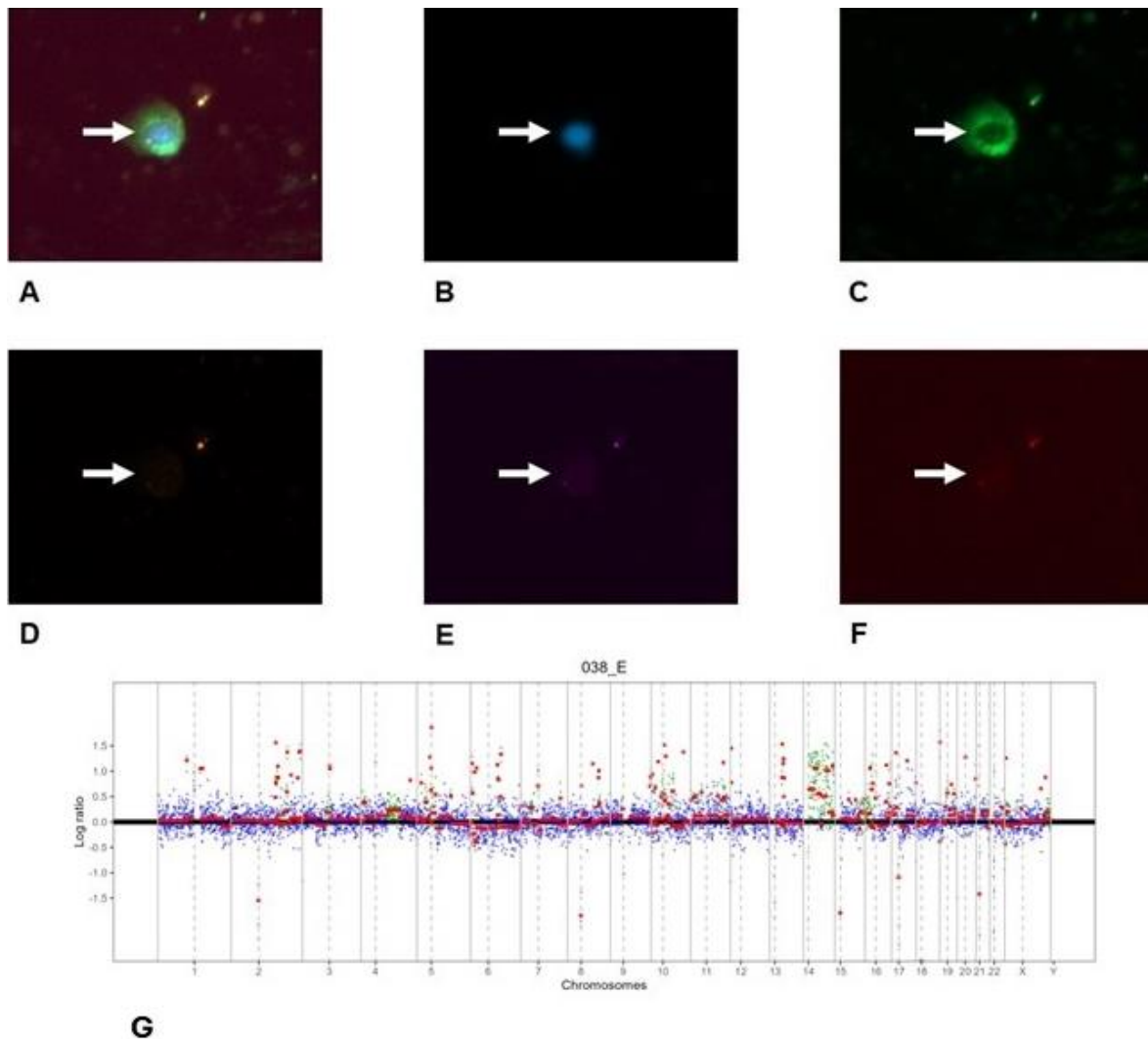


Abbildung 24: Isolierte Zelle 038

24A: alle Kanäle; 24B blau: DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole (Zellkerne); 24C grün: pan-Keratin (AlexaFluor® 488-konjugierter Primär-Antikörper, Klon: AE1/AE3 und C11) und TROP-2 (Klon: polyklonal, AlexaFluor® 488-konjugierter Sekundär-Antikörper); 24D orange: PD-L1 (Klon: E1L3N (XP), AlexaFluor® 555-konjugierter Sekundär-Antikörper); 24E rosa: CD45 (PerCP-konjugierter Primär-Antikörper, Klon: HI30) (Leukozytenmarker); 24F rot: CD41 (APC-konjugierter Primär-Antikörper, Klon: HIP8). Der Pfeil zeigt die isolierte Zelle 038. Zelle 038 ist eine Keratin-/TROP-2-positive und PD-L1-negative Zelle. 24G: Plot des CNV-Profiles entlang des gesamten Genoms der Zelle 038.

In der Zelle 038 zeigten sich Zugewinne der Kopienanzahl der Chromosomenbereiche 4q, 14p und q und 15q sowie Verluste in 5p.

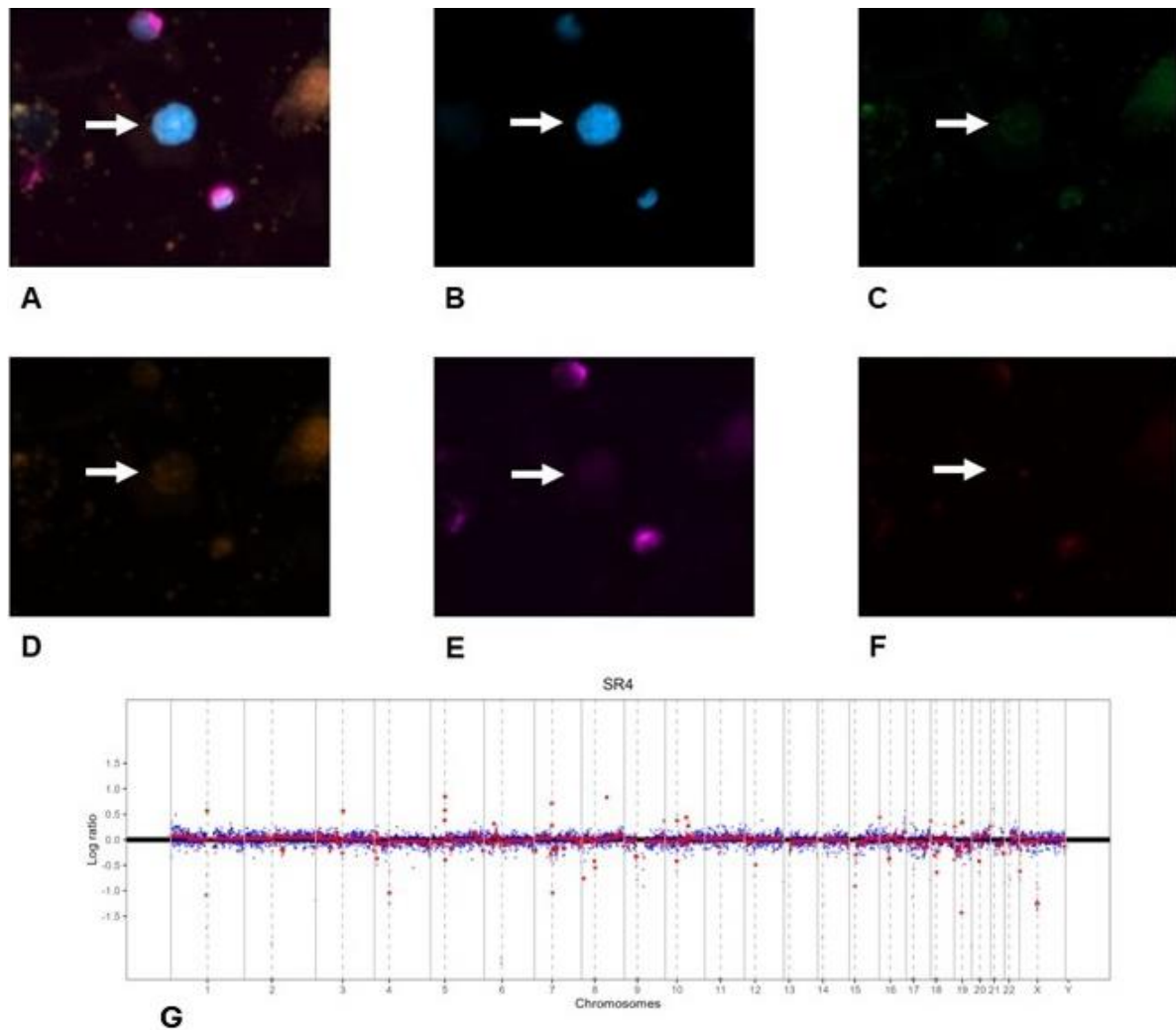


Abbildung 25: Isolierte Zelle 040

25A: alle Kanäle; 25B blau: DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole (Zellkerne); 25C grün: pan-Keratin (AlexaFluor® 488-konjugierter Primär-Antikörper, Klon: AE1/AE3 und C11) und TROP-2 (Klon: polyclonal, AlexaFluor® 488-konjugierter Sekundär-Antikörper); 25D orange: PD-L1 (Klon: E1L3N (XP), AlexaFluor® 555-konjugierter Sekundär-Antikörper); 25E rosa: CD45 (PerCP-konjugierter Primär-Antikörper, Klon: HI30) (Leukozytenmarker); 25F rot: CD41 (APC-konjugierter Primär-Antikörper, Klon: HIP8). Der Pfeil zeigt die isolierte Zelle 040. Zelle 040 ist eine Keratin-/TROP-2- und PD-L1-negative Zelle. 25G: Plot des CNV-Profiles entlang des gesamten Genoms der Zelle 040.

Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen in der Kopienanzahl der Chromosomen oder Chromosomenbereiche.

Insgesamt spiegeln die dargestellten CNV-Profile eine starke Intra- und Inter-Patient:innen-Heterogenität der genomischen Veränderungen beim UCB wider. In 4 bzw. 3 CTCs von verschiedenen Patient:innen fanden sich Zugewinne der Chromosomenbereiche 4q bzw. 13p/q und Verluste von Bereichen des Chromosoms 16 wurden in 3 CTCs detektiert.

4.7 CTC-Detektion und klinische Bedeutung

4.7.1 CTC-Anreicherung mittels CellSearch®

Nach Blutentnahme in CellSave®-Röhrchen erfolgte innerhalb von 96 Stunden die Verarbeitung der Blutproben mittels CellSearch®, wie im Punkt 3.2.4.3 beschrieben. Anschließend erfolgte die semiautomatische Auswertung der Befunde, die von Frau Prof. Dr. Sabine Riethdorf vorgenommen wurde. *Tabelle 20* veranschaulicht die ermittelten Ergebnisse. In 31% (21 von 68) der Patient:innen konnten mit dieser Methode CTCs im peripheren Blut detektiert werden. Die durchschnittliche Gesamtanzahl der CTCs betrug 4,95 (Wertebereich: 1-47; Median: 2).

Tabelle 20: CTC-Anreicherung durch CellSearch®

Patient:in	CTC-Anzahl	Patient:in	CTC-Anzahl	Patient:in	CTC-Anzahl
1	0	27	0	53	0
2	0	28	47	54	0
3*		29	0	55	0
4*		30	0	56	1
5	0	31***	1	57	0
6**	1	32	0	58	0
7	0	33	0	59****	0
8	0	34	0	60	1
9**	4	35	4	61	0
10	0	36**	1	62**	2
11***	2	37*		63**	3
12	0	38	0	64*	
13	0	39	0	65	0
14	0	40**	2	66	0
15	0	41	0	67	0

Patient:in	CTC-Anzahl	Patient:in	CTC-Anzahl	Patient:in	CTC-Anzahl
16*		42	0	68	0
17	0	43	1	69*	
18	0	44	3	70	1
19*		45	0	71***	1
20	1	46*		72	0
21	0	47	0	73	0
022	0	48	0	74	0
23	0	49	0	75	1
24	12	50	2	76	0
25	0	51	0		
26	13	52	0		

Bei den grau gefärbten Zellen war eine Anreicherung nicht möglich.

* Eine Anreicherung mittels CellSearch® erfolgte bei den mit *-gekennzeichneten Patient:innen nicht.

** Fragliche Morphologie.

*** Apoptotische Zelle.

**** In diesem Fall erfolgte die Anreicherung mittels CXC-Protokoll, das mit einer bis zu 20%-ig geringeren Detektierungsrate einhergeht.

4.7.2 CTC-Anreicherung mittels Parsortix®

Nach Blutentnahme in Transfix®-Röhrchen erfolgte innerhalb von 72 Stunden die Verarbeitung der Blutproben mittels Parsortix®, wie im Punkt 3.2.4.2 beschrieben. Anschließend erfolgte eine IF-Färbung nach dem Protokoll 3.2.4.5; Tabelle 19 bei den Proben UCB-031, -032 und -033 nach Protokoll 3.2.4.5; Tabelle 18 (ohne CD41 als negative Marker). Nachfolgend wurden die Zytospins unter dem Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet. Die auffälligen (tumorverdächtigen) Zellen wurden lokalisiert und gezählt. Für die Vergleichbarkeit der ermittelten CTC-verdächtigen Zellen wurden die Proben UCB-031, -032 und -033 (IF-Färbung ohne CD41) nicht in den Vergleich der Methoden einbezogen.

In 16 von 56 (29%) der untersuchten Blutproben konnten CTC-verdächtige Zellen mittels Parsortix® nachgewiesen werden. Die durchschnittliche Gesamtanzahl der CTCs betrug 4,25 (Wertebereich: 1-18; Median: 3).

Beim Vergleich der Parsortix®- und CellSearch®-Ergebnisse zeigten 54% (27 von 50) der Patient:innen weder mit Parsortix® noch mit CellSearch® CTCs und 14% (7 von 50) erwiesen sich mit beiden Verfahren als CTC-positiv. Des Weiteren waren 7 von 50 Patient:innen (14%) nur positiv nach Parsortix®- und 9 von 50 Patient:innen (18%) nur positiv nach CellSearch®-Prozessierung.

4.7.3 CTC-Anreicherung mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

Nach Blutentnahme in EDTA-Röhrchen erfolgte umgehend die Verarbeitung der Blutproben mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation, wie im Punkt 3.2.4.1 beschrieben. Anschließend erfolgte eine IF-Färbung nach den Protokollen 3.2.4.5; Tabelle 19, und 3.2.4.5; Tabelle 16A (ohne PD-L1 als Positiv-Marker bzw. ohne CD41 als Negativ-Marker) und 3.2.4.5; Tabelle 17 und 18 (ohne CD41 als Negativ-Marker). Nachfolgend wurden die Zytospins mikroskopisch ausgewertet. Die auffälligen (tumorverdächtigen) Zellen wurden lokalisiert und gezählt.

Mit der ersten angewendeten Färbung (Positiv-Marker: Keratine, TROP-2, Negativ-Marker: CD45) konnten in den untersuchten 25 Patient:innen-Proben keine CTC-verdächtigen Zellen festgestellt werden.

Anschließend erfolgte die Zugabe eines zusätzlichen Antikörpers (PD-L1) und nachfolgend eines zusätzlichen Negativ-Markers (CD41). Bei vier Patient:innen (009, 031, 032 und 033) erfolgte eine Immunfärbung ohne CD41 als negativer Marker. Von diesen vier Patient:innen-Proben zeigte auch nur eine (009) CTC-verdächtige Zellen. Für die bessere Vergleichbarkeit wurde Patient:in 009 nicht in die Wertung einbezogen. 16% (8 von 50) der teilnehmenden Patient:innen wiesen CTC-verdächtige Zellen nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation auf. Die durchschnittliche Gesamtzahl der CTCs betrug 1,63 (Wertebereich: 1-4; Median: 1).

Im Vergleich mit den zwei anderen angewendeten Methoden wurde durch die Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation die geringste CTC-Nachweisrate erzielt.

In 30 von 49 der Patient:innen (61%) wurden weder mit Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation noch mit CellSearch® CTCs detektiert. Drei von 49 Patient:innen (6%) erwiesen sich mit beiden Verfahren als CTC-positiv. Mit CellSearch® waren 11 von 49

Patient:innen (22%) positiv, wohingegen mit Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation lediglich 4 von 49 Patient:innen (8%) CTCs aufwiesen.

Zu erwähnen ist, dass 79% (11 von 14) der CellSearch®-positiven Patient:innen-Proben nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation CTC-negativ waren und sich 63% (5 von 8) der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation-positiven Patient:innen bei CellSearch® als CTC-negativ erwiesen.

Beim Vergleich der CTC-Detektionsraten nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation und nach Parsortix®-Anreicherung ergab sich, dass 30 der 47 Patient:innen (64%) bei beiden Verfahren CTC-negativ und 3 von 47 (6%) bei beiden Verfahren CTC-positiv waren. Ausschließlich nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation waren 5 Fälle CTC-positiv (11%). Nur mit dem Parsortix® -System erwiesen sich 9 Patient:innen (19%) CTC-positiv. In 9 von 12 (75%) der Parsortix®-positiven Proben konnten mit Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation keine CTCs nachgewiesen werden, auf der anderen Seite blieben 5 von 8 (63%) der nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation CTC-positiven Proben nach Parsortix®-Prozessierung CTC-negativ. *Tabelle 21* veranschaulicht die mit allen Untersuchungen ermittelten CTC-Zahlen, die in *Tabelle 22* zusammengefasst werden.

Tabelle 21: CTC-Anreicherung durch CellSearch®, Parsortix® und Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation – CTC-Anzahl

Patient:in	CTC-Anzahl			Patient:in	CTC-Anzahl		
	CellSearch®	Parsortix®	Ficoll		CellSearch®	Parsortix®	Ficoll
1	0	0	0	39	0	1	4
2	0	0	1	40	2	0	0
3		0		41	0	0	0
4		2		42	0	18	0
5	0	4	1	43	1	0	1
6	1	0	1	44	3	5	0
7	0	0	0	45	0	0	0
8	0	0	0	46			
9	4	0	21*	47	0	0	0
10	0	0	0	48	0	5	0
11	2	0	0	49	0	0	0

Patient:in	CTC-Anzahl			Patient:in	CTC-Anzahl		
	CellSearch®	Parsortix®	Ficoll		CellSearch®	Parsortix®	Ficoll
12	0	0	0	50	2		
13	0	0	0	51	0	0	0
14	0	0	0	52	0	3	0
15	0	0	0	53	0		
16	3**	0		54	0	0	0
17	0	0	0	55	0	2	0
18	0			56	1	0	0
19		0		57	0	0	0
20	1	0	0	58	0	0	0
21	0	0	0	59	0***	0	0
22	0	0	1	60	1	2	
23	0	0	0	61	0	0	
24	12	2	0	62	2	9	
25	0	0	0	63	3	5	0
26	13	0	0	64		2	
27	0	1	0	65	0		
28	47	3	0	66	0		
29	0	0	0	67	0		
30	0	0	0	68	0		
31	1	17*	0*	69			
32	0	17*	0*	70	1		
33	0	27*	0*	71	1		
34	0	0	0	72	0		
35	4	0	0	73	0		
36	1	4	3	74	0		
37				75	1		
38	0	0	1	76	0		

Ficoll steht für Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation. Bei den grau gefärbten Zellen war eine Anreicherung nicht möglich.

** In diesen Fällen erfolgte die Färbung nach dem Protokoll 3.2.4.5; Tabelle 17 und 18 ohne CD41 als Ausschlussmarker. Patient:in 9 wurde aus der endgültigen Auswertung herausgenommen. Von den Parsortix-Proben wurden zusätzlich die Ergebnisse der Patient:innen 031, 032 und 033 aus der endgültigen Auswertung herausgenommen.*

*** Hier kann eine Kontamination durch eine im CellSearch®-Gerät vorangegangene Probe, die eine hohe CTC-Anzahl aufwies, nicht ausgeschlossen werden.*

Tabelle 22: CTC-Anreicherung durch CellSearch®, Parsortix® und Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation - Statistische Daten

	CellSearch®	Parsortix®	Ficoll
CTC-positive Patient:innen-Proben	31%	29%	16%
durchschnittliche Gesamtzahl der CTCs	4,95	4,25	1,63
Wertebereich der CTCs-Anzahl pro Probe	1 bis 47	1 bis 18	1 bis 4
Median der CTCs	2	3	1

Ficoll steht für Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation.

Tabelle 16 veranschaulicht, dass durch CellSearch® und Parsortix® eine ähnliche CTC-Detektionsrate (31% vs. 29%) sowie eine ähnliche durchschnittliche Gesamtanzahl der CTCs (4,95 vs. 4,25) erzielt werden kann. Jedoch lassen die hier dargestellten Ergebnisse auch die Schlussfolgerung zu, dass durch die beiden Verfahren teilweise unterschiedliche CTC-Populationen angereichert werden. Des Weiteren zeigt sich die CTC-Anreicherung mit Ficoll- Dichtegradientenzentrifugation den anderen beiden Verfahren unterlegen.

4.8 Prognostische Bedeutung

Leider liegen die Überlebensdaten der Patient:innen nicht vollständig vor, sodass über den prognostischen Einfluss der CTC-Anzahl auf das Überleben keine Aussage getroffen werden kann. Die vorläufige statistische Auswertung der Ergebnisse zeigte keinen Zusammenhang zwischen dem CTC-Status und dem Tumor-, Lymphknoten- oder Fernmetastasen-Status (Daten nicht gezeigt).

5 Diskussion

5.1 VISTA/VSIR-Expression in UCB-Zelllinien

Für eine personalisierte zielgerichtete Immuntherapie des UCBs ist es wichtig, prädiktive und prognostisch relevante Biomarker zu identifizieren, um zukünftig effektivere Therapie-Entscheidungen treffen zu können.

Die Anwendung der ICIs revolutionierte die Behandlung der UCB und führte bei fortgeschrittenen Stadien gegenüber Standardtherapien zu signifikant verbesserten Ansprechraten. Jedoch gibt es weiterhin Optimierungspotential. Beispielweise können während laufender Therapien Resistenzen entstehen, sodass die durchschnittlichen Ansprechraten unter 30% liegen können (Brahmer et al., 2010, Brahmer et al., 2012, Callahan et al., 2014, Hodi et al., 2010, Postow et al., 2015a, Postow et al., 2015b, Topalian et al., 2012, Xu et al., 2018). Des Weiteren fehlen verlässliche Biomarker, die das Therapieansprechen vorhersagen können, sodass weiterhin an der Verbesserung der Diagnostik- und Therapie-Optionen gearbeitet werden muss.

Die Zystoskopie ist nach wie vor bei der Diagnostik des UCB der Goldstandard, jedoch kann die Untersuchung 10% der papillären Tumoren übersehen und hat eine Sensitivität von 85–90%. Da eine Zystoskopie mit Schmerzen verbunden sein kann und kostenintensiv ist, wurde nach alternativen Diagnosemethoden gesucht. Eine andere ergänzende Option ist die Urinzytologie. Ihr Vorteil ist die einfache Handhabung, jedoch ist die Urinzytologie eher für hochgradige Erkrankungen geeignet. Sie ist durch ihre geringe Sensitivität bei der Erkennung niedrig-gradiger Tumoren sowie ihre unterschiedliche Interpretation unter verschiedenen Untersuchern eingeschränkt. Darüber hinaus kann die Aussagekraft durch Harnwegsinfektionen, Steine oder vorherige intravesikale Therapien beeinträchtigt sein. Die Limitationen der Zystoskopie und der Urinzytologie verdeutlichen daher den Bedarf an weiteren Diagnostiktests und haben zur Entwicklung von Urin- und Blut-basierten Biomarkern beigetragen. Diese Tests besitzen teilweise bereits eine FDA-Zulassung. Die Untersuchungen umfassen z. B. die Messung löslicher Proteine im Urin, wie das Blasen-tumor-assoziierte Antigen (BTA) oder das Nuclear matrix protein 22 (NMP22), oder die Messung von Chromosomenanomalien durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (UroVysion). Des Weiteren wurde über genomische Biomarker, wie z. B. FGFR3, TP5 und Ras, und epigenetische Biomarker berichtet. Diese Untersuchungen können jedoch durch andere urologische Erkrankungen wie Harnwegsinfektionen,

Steine, eine gutartige Prostatavergrößerung und einen Dauerkatheter stark beeinträchtigt werden. Trotz der aktuellen Verfügbarkeit von Tests sind diese durch hohe Kosten und das Fehlen einer genau definierten Bedeutung im Verlauf der Diagnosestellung und des Behandlungszeitplans in ihrer diagnostischen Wertigkeit eingeschränkt. Des Weiteren werden bei einem erheblichen Anteil der UCB-Patient:innen Urinbiomarker nicht erkannt; bei anderen Patient:innen können sie falsch-positive Ergebnisse liefern. Bei Tumoren im niedrigen Stadium ist die Genauigkeit gering. Aus den genannten Gründen gibt es bisher keinen allgemein anerkannten Test, dessen Anwendung bereits in die Leitlinien zur Diagnostik und Behandlung von UCB-Patient:innen eingegangen ist. Dagegen gewinnen Tests zur Detektion von Multi-Target-Biomarkern (mit besserer diagnostischer Leistung) zunehmend an Bedeutung (Batista et al., 2020, Chou et al., 2015, Faiena et al., 2019, Leitlinienprogramm Onkologie, 2025, Maas et al., 2023, Ng et al., 2021, Tan et al., 2018).

Neben Untersuchungen von Urinproben und von Tumorgeweben gelangen *Liquid Biopsy*-Analysen aus Blutproben zum Nachweis und zur Charakterisierung von CTCs und zirkulierenden Nukleinsäuren mehr und mehr in den Mittelpunkt des Interesses (Alkassis et al., 2021, Alva et al., 2015, Crupi et al., 2024, Liu et al., 2020). Zahlreiche Analysen zum UCB zeigen prognostische Aussagekraft von CTCs (Gazzaniga et al., 2012, Gazzaniga et al., 2014, Rink et al., 2011, Rink et al., 2012b, Soave et al., 2017).

CTCs sind maligne Tumorzellen verschiedener Tumorentitäten, die im peripheren Blut zirkulieren und wahrscheinlich dafür verantwortlich sind, dass Metastasen gebildet werden können (Allard et al., 2004, Pantel and Speicher, 2016). Des Weiteren könnten CTCs genetische und phänotypische Informationen von verschiedenen Metastasen liefern. CTCs können im peripheren Blut von Krebspatient:innen nachgewiesen werden und bieten dadurch eine einfache und weniger invasive Möglichkeit, wertvolle Informationen zur Genetik und Biologie der individuellen Krebserkrankung zu bekommen.

Darüber hinaus können CTCs auch phänotypisch charakterisiert werden, um wertvolle Hinweise auf therapeutisch interessante Zielproteine zu bekommen. Hier kann beispielweise HER2 beim Mammakarzinom erwähnt werden, das Angriffspunkt für verschiedene zielgerichtete Therapie sein kann (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021, Maximiano et al., 2016). Des Weiteren sind bereits Methoden zur

Charakterisierung von UCB-CTCs im Hinblick auf die Detektion therapeutisch relevanter Zielmoleküle etabliert worden, etwa zur Expression des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors HER2 (Nanou et al., 2020, Niu et al., 2024, Rink et al., 2012b).

Des Weiteren sucht man intensiv nach Biomarkern, die bei der Vorhersage einer Therapieantwort auf ICIs helfen. So gibt es bereits eine Reihe von Arbeiten zum Nachweis von PD-L1 auf CTCs, bisher vorrangig beim Lungenkarzinom (Acheampong et al., 2022, Janning et al., 2019), aber auch beim UCB (Anantharaman et al., 2016, Bergmann et al., 2020, Jin et al., 2023, Morelli et al., 2021).

Zunehmend wird auch verstärkt Augenmerk auf andere, bisher weniger erforschte ICPs, wie z. B. VISTA gerichtet.

Zunächst wurde ein Set von UCB-Zelllinien auf Protein- und RNA-Ebene auf VISTA/VSIR-Expression untersucht.

VISTA wird in signifikanter Menge in verschiedenen UCB-Zelllinien, die in unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden können, gebildet. Sowohl epitheliale (5637, 647V, HT1376, RT4) als auch mesenchymale (T24, TCC-SUP, UMUC-3) sowie basale (5637, 647V, HT1376) und luminale (RT4) Zelllinien weisen eine VISTA-Expression auf. Zusammenfassend konnte keine Assoziation der VISTA-Proteinmenge mit dem Subtyp der Zelllinien gezeigt werden, wie es z. B. für PD-L1 (nur basale Zelllinien) oder EpCAM (nur epitheliale Zelllinien) (Gires et al., 2020) der Fall ist. Auffällig ist jedoch, dass die VISTA-Expression in verschiedenen Zelllinien deutlich unterschiedlich ausgeprägt ist. Diese Unterschiede in der VISTA-Expression könnten gegebenenfalls durch bis jetzt unbekannte Zelllinien-Eigenschaften erklärt werden, sodass weitere Zelllinien-Untersuchungen zur Aufklärung der Ursachen durchgeführt werden müssten.

Im Gegensatz zu den früher berichteten negativen Ergebnissen der VISTA-Expression in einer UCB-Zelllinie (LeMercier et al., 2014) wurde in dieser Arbeit VISTA/VSIR auf Protein- und mRNA-Ebene in verschiedenen UCB-Zelllinien nachgewiesen. LeMercier und Mitarbeiter untersuchten lediglich eine UCB-Maus-Zelllinie (MB49) im Mausmodell, wohingegen in der vorliegenden Arbeit 7 verschiedene UCB-Zelllinien analysiert wurden.

Won Ik Seo und Mitarbeiter haben in 31% der Gewebeproben von 159 UCB-Patient:innen VISTA-Expression auf den Tumorzellen nachgewiesen. Des Weiteren

haben sie bei ca. 68% der Gewebeproben VISTA auf den Tumor-infiltrierenden Immunzellen detektiert. Interessant ist zu erwähnen, dass mehr Patient:innen-Proben auf Tumor- und Tumor-infiltrierende Immunzellen VISTA- als PD-L1-Positivität aufwiesen (31% vs. 8% und 68% vs. 42%). Zu erwähnen ist weiterhin, dass während die VISTA-Expression auf Tumor-infiltrierenden Immunzellen eine Assoziation mit verschiedenen klinisch-pathologischen Merkmalen, wie z. B. hohes Tumorstadium und Tumorgroße >3cm, zeigte es keine Abhängigkeit der VISTA-Expression auf Tumorzellen von diesen Parametern gab (Seo et al., 2021). Die VISTA-Expression auf UCB-Tumor- und Tumor-infiltrierenden Immunzellen sowie die prognostische Bedeutung der VISTA-Expression auf Tumor-infiltrierenden Immunzellen wurden auch in anderen Arbeiten bestätigt (Li et al., 2023b, Shoji et al., 2024, Wang et al., 2023). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass VISTA-positive Tumor-infiltrierende Immunzellen eine unabhängige prognostische Bedeutung haben und somit als Biomarker verwendet werden könnten.

5.2 Regulation der Expression von VISTA/VSIR in UCB-Zelllinien

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die VISTA/VSIR-Expression durch Behandlung mit Zytokinen beeinflusst werden kann.

Bisher gibt es nur wenige Arbeiten zur Wirkung von IFN- γ auf die Expression von VISTA/VSIR. So wurde in Ovarial- und Endometriumkarzinomen (Mulati et al., 2019) sowie beim Melanom (Rosenbaum et al., 2020) kein Einfluss von IFN- γ auf die VISTA/VSIR-Expression nachgewiesen. Für das UCB gibt es noch keine Angaben, jedoch wurde kürzlich berichtet, dass die VISTA/VSIR-Expression in normalen (nicht malignen) Urothel-Zellen durch IFN- γ heraufreguliert werden kann (Baker et al., 2022).

Allgemein anerkannt ist dagegen, dass die Expression von PD-L1 in TME durch entzündliche Zytokine induziert werden kann, von denen INF- γ die stärkste Wirkung ausübt (Boussiotis, 2016). In zahlreichen Tumorentitäten wurde eine Heraufregulation der PD-L1 Expression durch INF- γ nachgewiesen, wie z. B. beim Ovarialkarzinom (Abiko et al., 2015, Mandai et al., 2016, Reddy et al., 2024), Magenkarzinom (Imai et al., 2020, Mimura et al., 2018), Gliom (Qian et al., 2018), Nasopharynxkarzinom (Fang et al., 2014), hepatozellulären Karzinom (Li et al., 2018), NSCLC (Hirayama et al., 2023) und Melanom (Garcia-Diaz et al., 2017, Taube et al., 2012). PD-L1 ist in normalen (nicht malignen) Urothel-Zellen nur geringfügig exprimiert,

seine Expression kann jedoch durch IFN- γ stark induziert werden (Baker et al., 2022). In zwei UCB-Zelllinien (5637 und T24) wurden sowohl die mRNA als auch die Proteinspiegel von PD-L1 durch IFN- γ induziert (Wang et al., 2018b). Über ähnliche Ergebnisse berichten auch andere Autoren. Zhang und Mitarbeiter haben beispielsweise in mehreren humanen und murinen UCB-Zelllinien gezeigt, dass die PD-L1-Expression durch IFN- γ heraufreguliert wird. Des Weiteren fanden sie heraus, dass in diesem Prozess FOXP3 (Forkhead-Box-Protein P3) eine wichtige Rolle spielt. (Zhang et al., 2024)

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bestätigen den positiven Einfluss von IFN- γ auf die Expression von PD-L1 bei den Zelllinien 5637, HT1376 und T24. Bei der Zelllinie RT4 handelt es sich um eine luminale UCB-Zelllinie, in der sich erwartungsgemäß keine PD-L1-Expression nachweisen ließ. Diese Ergebnisse entsprechen den Literatur-Daten (Bergmann, 2019, Goutas et al., 2022, Kim et al., 2020, Wang et al., 2018b, Zhang et al., 2024).

In den Zelllinien HT1376, RT4 und T24 zeigte sich keine signifikante Veränderung der VISTA-Protein-Expression zwischen den unbehandelten Kontrollen und den IFN- γ behandelten Zellen. Hingegen waren die Ergebnisse für die Zelllinie 5637 weniger klar. Wiederholte Experimente ergaben lediglich eine leichte Erhöhung der VISTA-Protein-Expression nach IFN- γ -Stimulation. Für diese Beobachtung gibt es bisher keine Erklärung, sodass dieser Effekt in weiteren Experimenten untersucht werden sollte.

Die Transkript-Untersuchungen lieferten ähnliche Ergebnisse. In den Zelllinien RT4 und T24 zeigte sich kein signifikanter Effekt auf *VSIR* durch INF- γ . Auch in den Zelllinien 5637 und HT1376 konnte kein reproduzierbarer Einfluss von IFN- γ auf die *VSIR*-mRNA-Expression gezeigt werden. Somit lässt sich zusammenfassend feststellen, dass die VISTA/*VSIR*-Expression in den hier untersuchten UCB-Zelllinien durch INF- γ nicht oder nur unwesentlich reguliert wird. Dabei muss auch erwähnt werden, dass in diesen Zelllinienexperimenten die normalweise vorliegende Mikroumgebung der Tumorzellen, z. B. im Blut, nicht modelliert und einbezogen wurde.

Wie in der Einleitung beschrieben wurde, ist die Regulation der VISTA/*VSIR*-Expression durch TGF β bisher nicht eindeutig belegt. Während einige Autoren bei anderen Tumorentitäten einen signifikanten Einfluss von TGF β auf die VISTA/*VSIR*-Expression zeigten (Oliveira et al., 2016, Schlichtner et al., 2022), konnte in

anderen Arbeiten kein Effekt nachgewiesen werden (Mulati et al., 2019, Rosenbaum et al., 2020). Jedoch wurde über die Regulation der VISTA/VSIR-Expression durch TGF β in UCB-Zelllinien bisher noch nicht berichtet.

In dieser Arbeit konnte in den untersuchten UCB-Zelllinien kein eindeutiger Effekt von TGF β auf die VISTA/VSIR-Expression nachgewiesen werden. Es ist weder auf Protein noch auf mRNA-Niveau ein signifikanter Unterschied in der VISTA/VSIR- und PD-L1-Expression zwischen den mit TGF β -inkubierten und den unbehandelten Kontrollen (Zelllinien HT1376 und RT4) erkennbar. In der Arbeit von Bergmann wurde ebenfalls kein Einfluss auf die PD-L1-Expression durch TGF β in den Zelllinien HT1376 und RT4 nachgewiesen (Bergmann, 2019).

Jedoch wurde der früher beschriebene heraufregulierende Effekt von TGF β auf PD-L1-Expression in der Zelllinie 5637 (Bergmann, 2019) in dieser Arbeit erneut bestätigt.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass TGF β nicht zur Induktion der VISTA/VSIR-Expression in der Zelllinie 5637 führt. Jedoch zeigt TGF β in der Zelllinie 5637 im Gegensatz zu RT4 und HT1376 einen starken Effekt auf die PD-L1-Expression. Auch in Melanomen (Rosenbaum et al., 2020) und in Ovarial- und Endometriumkarzinomen (Mulati et al., 2019) wurde kein signifikanter Effekt von IFN- γ auf die VISTA/VSIR-Expression nachgewiesen.

Die Regulation der VISTA-Expression bleibt somit in UCB-Zelllinien weiterhin ungeklärt. Zahlreiche verschiedene Mechanismen im Zusammenhang mit malignen Tumorerkrankungen oder Tumorzelllinienmodellen werden jedoch für die Expressionsregulation von VISTA diskutiert.

In einem EMT-Modell nach TGF β -Behandlung wurde über eine VISTA/VSIR-Herabregulation berichtet (Oliveira et al., 2016). Ähnliche Ergebnisse wurden in einer kürzlich erschienenen Studie berichtet (Schlichtner et al., 2022). In dieser Arbeit zeigte sich in Abhängigkeit von der zytotoxischen Aktivität der untersuchten Zellen ein herauf- oder herabregulierender Effekt auf die VISTA/VSIR-Expression in den T-Zellen. Des Weiteren wurde über eine Expressionskontrolle durch TGF β in einer humanen Wilms-Tumorzelllinie und in benignen, schnell-proliferierenden menschlichen Keratinozyten berichtet. Dagegen wurde in einer VISTA-negativen humanen Brusttumorzelllinie kein Effekt durch TGF β auf die VISTA/VSIR-Expression erzielt (Schlichtner et al., 2022).

Auch über andere mögliche Regulationsmechanismen wurde berichtet. Zum Beispiel scheint das Tumorsuppressorprotein TP53 die Regulation der Expression von *VSIR* auf Transkriptionsebene zu beeinflussen (Yoon et al., 2015, Oliveira et al., 2016, Xu et al., 2018).

In mehreren Karzinomzelllinien und in einem *in vitro*-EMT-Model einer immortalisierten Mammaepithelzelllinie wurde die Promotormethylierung als ein möglicher Regulationsmechanismus beschrieben. So wurde z. B. beim Magenkarzinom gezeigt, dass die Herabregulation der *VSIR*-Expression häufig durch Promotormethylierung und/oder durch Überexpression einer Mikro-RNA (miRNA-125a-5p) ausgelöst werden kann (Oliveira et al., 2016). Im Einklang mit diesem Ergebnis bestätigen Resultate anderer Studien, dass die Überexpression von Mikro-RNAs (z. B. miRNA125a und miRNA125b), die die VISTA-Proteinexpression im Zusammenhang mit der Zelldifferenzierung supprimieren können (Battista et al., 2013, Parisi et al., 2012), ebenfalls eine Rolle spielt. Jedoch hatten die Mikro-RNAs miRNA-125a und miRNA-506 keinen Einfluss auf die *VSIR*-Expression in Ovarial- und Endometriumkarzinomen. Die Methylierung des *VSIR*-Promotors hingegen ist beim Endometriumkarzinom als möglicher Mechanismus der Regulation des *VSIR*-Gens identifiziert worden (Mulati et al., 2019).

In Melanomen scheint die *VSIR*-Transkription durch den über BRAF regulierten Stammzellfaktor FOXD3 supprimiert zu werden. Diese Wirkung kann durch BRAF-Inhibition noch verstärkt werden (Rosenbaum et al. 2020). Außerdem korrelierte die VISTA/*VSIR* -Expression in einer großen Kohorte von Kolonkarzinom-Patient:innen mit der Expression und Aktivität von HIF1- α (Hypoxia-induced factor - Hypoxie induzierter Faktor 1 Untereinheit alpha). *In vitro*- und *in vivo*- Versuche zeigen, dass HIF-1 α in einer hypoxischen Tumormikroumgebung die Expression von VISTA/*VSIR* auf den myeloiden Suppressorzellen heraufregulieren kann (Deng et al., 2019). Li und Mitarbeiter fanden heraus, dass verschiedene Chemotherapien die Expression von VISTA/*VSIR* in Melanomzellen über HIF2- α (Hypoxia-induced factor - Hypoxie induzierter Faktor 2 Untereinheit alpha) induzieren können (Li et al., 2023a). In einer Arbeit zur AML wurde berichtet, dass STAT3 die Transkription von *VSIR* durch direkte Bindung an den Promotor und die Intron-Region von *VSIR* reguliert (Mo et al., 2023).

Zusammenfassend scheint die Expression von VISTA/VSIR in unterschiedlichen Tumorentitäten durch verschiedene Mechanismen reguliert zu werden. Es sind weitere Untersuchungen erforderlich, um diese Mechanismen beim UCB zu verstehen. Zum Beispiel könnte in weiterführenden Untersuchungen der Effekt von Hypoxie, miRNAs und TP53 auf die VISTA/VSIR-Expression im UCB untersucht werden.

5.3 Optimierung der Detektion und Charakterisierung von CTCs

Ein Ziel der vorliegenden Doktorarbeit bestand in der Charakterisierung der VISTA-Expression von CTCs. Um dieses Ziel zu erreichen, sollte zunächst eine für UCB optimierte CTC-Anreicherungsverfahren etabliert werden, die eine weitere phänotypische und genetische Analyse der CTCs erlaubt.

Hierfür wurden die Ergebnisse zur CTC-Detektion über das markerabhängige Verfahren CellSearch® mit Ergebnissen, die mit zwei unterschiedlichen markerunabhängigen Verfahren in Blutproben von UCB-Patient:innen vor radikaler Zystektomie erhalten wurden, verglichen.

Die prognostische Bedeutung von CTCs wurde in verschiedenen Studien für UCBs gezeigt (Gazzaniga et al., 2012, Gazzaniga et al., 2014, Rink et al., 2012b, Rink et al., 2011, Soave et al., 2017). CTCs könnten ein zukünftiges, diagnostisches Tool bilden, um zielgerichtete Therapieentscheidungen treffen zu können. Aufgrund der geringen Anzahl der CTCs (1 von 10^{6-8} hämatologischen Zellen) (Agashe and Kurzrock, 2020, Alix-Panabieres and Pantel, 2013, Ferreira et al., 2016, Koch et al., 2020, Nagrath et al., 2007, Rushton et al., 2021, Yap et al., 2019) stellt deren Detektion eine Herausforderung dar. Aus diesem Grund wird eine außerordentlich sensitive und spezifische CTC-Anreicherungsverfahren benötigt.

Die heutzutage verwendeten CTC-Anreicherungsverfahren können in zwei große Gruppen eingeteilt werden: die markerabhängigen und die markerunabhängigen Verfahren. Markerabhängige Methoden basieren auf der Anreicherung über Oberflächenproteine (wie z. B. EpCAM) (Ferreira et al., 2016, Habli et al., 2020, Pantel and Alix-Panabieres, 2019, Yap et al., 2019). Hier ist das bekannteste Verfahren die durch die FDA zugelassene markerabhängige CellSearch®-Methode (Cristofanilli et al., 2004, FDA, 2004). Der Vorteil dieser Methode ist die Standardisierung und gute Reproduzierbarkeit. Der größte Nachteil liegt jedoch in der Markerabhängigkeit. Tumorzellen, die einer vollständigen EMT unterliegen, und

dadurch ihren epithelialen Charakter inklusive der EpCAM-Expression verloren haben, werden mit diesem Verfahren nicht angereichert.

Markerunabhängige Methoden basieren beispielsweise auf physikalischen Eigenschaften (Ferreira et al., 2016, Pantel and Alix-Panabieres, 2019) und sind dadurch in der Lage, auch mesenchymale, EpCAM- und/oder Keratin-negative CTCs zu detektieren. Ein markerunabhängiges Verfahren stellt das auf Mikrofluidik-Technologie-basierte Parsortix®-System dar. Es ist eine patentierte Methode mit limitierter FDA-Zulassung (FDA, 2022), bei der die Selektion abhängig von der Zellgröße und von der Verformbarkeit der Zellen ist und somit auch die Anreicherung von mesenchymalen CTCs (Ferreira et al., 2016, Hvichia et al., 2016, Miller et al., 2018, Xu et al., 2015b) erfolgen kann. Jedoch benötigt es ergänzende, manuell durchzuführende nachgeschaltete Methoden, wie z. B. IF-Färbung oder mRNA-Analysen oder FISH. Diese manuelle Probenauswertung ist zeitaufwändig und schränkt die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Laborstandorten und klinischen Zentren ein (Koch et al., 2020). Des Weiteren können durch die Verarbeitung der Proben (wie z. B. Zytospin-Herstellung oder Waschvorgänge bei IF-Färbung) CTCs verloren gehen (Cohen et al., 2022, Hvichia et al., 2016, Xu et al., 2015b).

Eine anderes markerunabhängiges physikalisches Verfahren ist die Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation, die eine Anreicherung basierend auf der Sedimentationsgeschwindigkeit erzielt. Vorteilhaft sind die einfache Anwendbarkeit und die geringen Kosten. Die Nachteile ähneln denen des Parsortix®-Systems: Zellverlust und Notwendigkeit von nachgeschalteten Methoden für die Auswertung (Habli et al., 2020, Obermayr et al., 2018).

Für eine effektive CTC-Detektion bedarf es einer weiteren Optimierung des Detektionsverfahren. Deshalb sollten im zweiten Teil der Arbeit als Grundlage für die weitere Optimierung der Detektion und Charakterisierung von CTCs Ergebnisse der CTC-Detektion aus Blutproben von UCB-Patient:innen vor radikaler Zystektomie mit dem Parsortix®- System sowie aus der Ficoll-basierten Dichtegradientenzentrifugation mit CTC-Ergebnissen des CellSearch®-Systems verglichen werden. Darüber hinaus sollte eine IF-Färbung der CTCs etabliert werden, mit deren Hilfe auch Keratin-negative CTCs gefunden werden sowie die Expression von Immuncheckpoint-Molekülen auf den CTCs bestimmt werden kann.

Hierzu wurde im ersten Schritt eine IF-Färbung mit einem VISTA-Antikörper etabliert. Jedoch musste aufgrund des zu starken Hintergrundes auf die Anwendung der VISTA-IF-Färbung für die Charakterisierung der CTCs verzichtet werden. Der starke Hintergrund erklärt sich durch die Expressionsmuster des Proteins, da VISTA von den meisten myeloischen und lymphatischen Zellen/Geweben exprimiert wird (Bharaj et al., 2014, Flies et al., 2011, Lines et al., 2014a, Lines et al., 2014b, Wang et al., 2011, Xu et al., 2018) und dadurch auch über CD45/CD41-Negativität keine eindeutige Zuordnung der VISTA-Positivität zu den CTCs möglich war.

Es wurden weitere IF-Protokolle zur Charakterisierung verschiedener Proteine (CD44, TROP-2, PD-L1) etabliert. Die Färbung von TROP-2 erwies sich für die Charakterisierung als sehr gut geeignet. Die Positiv-Kontrollen waren stark positiv, und es zeigte sich nur ein vernachlässigbarer Hintergrund.

Aufgrund der aktuellen therapeutischen Bedeutung von TROP-2 wurde dieses Antigen in die CTC-Charakterisierung einbezogen. TROP-2 wird in meisten UCBs (außer im endokrinen Subtyp) stark exprimiert (Avellini et al., 2017, Bahlinger et al., 2024, Chou et al., 2022, Ghali et al., 2023, Stepan et al., 2011). Des Weiteren zeigte TROP-2 nach der BCG-Therapie eine erhöhte Expression im Vergleich zum Ausgangswert (Choi et al., 2022). Das Sacituzumab govitecan (SG) ist ein Antikörper-Wirkstoff-Konjugat (Antibody-drug conjugates - ADC), das SN-38, einen Topoisomerase-Inhibitor, an Tumorzellen abgibt, die TROP-2 exprimieren (Goldenberg et al., 2015, Goldenberg and Sharkey, 2019, Syed, 2020). Das SG wurde von der FDA 2021 für die Behandlung von lokal fortgeschrittenen und metastasierten UBC, die zuvor mit einer platinbasierten Chemotherapie und Checkpoint-Inhibitoren behandelt wurden, zugelassen (FDA, 2021). Die Zulassung erfolgte auf Basis der TROPY-U-01 (NCT03547973) Studie, die in der Kohorte 1 eine Gesamtansprechrate von 27% zeigte und in der Kohorte 2 (Cisplatin-ungeeignete Patient:innen) auch eine relativ hohe objektive Ansprechrates mit raschem Ansprechen vorwies (Bednova and Leyton, 2020, Petrylak et al., 2024, Tagawa et al., 2021). Des Weiteren zeigten SG und Pembrolizumab gemeinsam (TROPY-U-01 Kohorte 3) eine hohe Ansprechrates (34%) bei Patient:innen mit metastasierten UBC, die nach einer platinbasierten Chemotherapie Tumorprogress aufwiesen (Grivas et al., 2024). Jedoch führte in einer Phase-III-Studie, die zur Bestätigung der Wirksamkeit durchgeführt wurde, die SG-Monotherapie nach platinbasierter Chemotherapie und Anti-PD-(L)1-Therapie nicht zu einer statistisch signifikanten Verbesserung des

Überlebens im Vergleich zur Standardchemotherapie (Powles et al., 2025), sodass die Zulassung von SG im Jahr 2024 zurückgezogen wurde (FDA, 2021). Trotz des Fehlens eines signifikanten Überlebensvorteils wurde mit SG eine höhere Gesamtansprechrate als mit Chemotherapie beobachtet, und die Ansprechraten von SG stimmten mit früheren Ergebnissen aus der Phase-II-Studie TROPHY-U-01 überein, was bestätigt, dass SG bei UCB wirksam ist (Powles et al., 2025). Eine Phase-I-Studie mit der Kombination von SG und dem gegen NECTIN4 gerichteten ADC Entfortumab Vedotin zeigte eine vielversprechende Wirkung bei metastasierten UCB-Patient:innen mit hohen Ansprechraten (NCT04724018) (McGregor et al., 2024). Weitere Kombinationstherapien werden aktuell geprüft.

TROP-2 weist im UCB ähnliche Expressionsmuster wie EpCAM auf. Jedoch konnte in einer vorangegangenen Arbeit gezeigt werden, dass TROP-2 zusätzlich in zwei EpCAM-negativen UCB-Zelllinien nachgewiesen werden kann (Bergmann, 2019).

Das IF-Protokoll mit TROP-2 und Keratinen als positive Marker wurde bei jeweils drei Zytospins (Anreicherung durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation) von jeweils 24 verschiedenen UCB-Patient:innen angewendet. Jedoch konnte mit dieser Färbung keine CTC-verdächtige Zelle gefunden werden.

Um die Detektionswahrscheinlichkeit zu erhöhen, wurde ein zusätzlicher Marker (PD-L1) angewendet. Es existierte in der Arbeitsgruppe bereits eine etablierte Immunfärbung für PD-L1 auf CTCs. Diese zeigte eine ähnlich starke Positivität für die Positivkontrollen wie das Protokoll mit TROP-2 bei vernachlässigbarem Hintergrund.

PD-L1 wird von vielen UCBs exprimiert und spielt eine entscheidende Rolle in der Therapie von UCB. Nach der Etablierung der IF-Färbung für PD-L1, TROP-2 und pan-Keratin als positive Marker wurde dieses neue Protokoll erneut an Zytospins (Anreicherung durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation) von 2 Patient:innen angewendet.

Es zeigten sich mehrere verdächtige Zellen, die negativ für CD45 waren und keine bis geringe oder moderate Positivität für pan-Keratin, TROP-2 und PD-L1 aufwiesen. Jedoch traten bei den untersuchten 2 Patient:innen diese morphologisch stark ähnlichen (große Zellen mit großem teilweise segmentiertem/unregelmäßig geformtem Zellkern) CD45-negativen Zellen in einer unerwartet hohen Anzahl auf. Daher wurde vermutet, dass es sich bei diesen Zellen um CD45-negative Blutzellen und aufgrund der Zellmorphologie u. a. auch um Megakaryozyten handeln könnte.

Um diese These zu prüfen, wurde zusätzlich zur bereits beschriebenen Färbung ein CD41-Antikörper als negativer Marker hinzugefügt. Damit konnten diese morphologisch ähnlichen großen CD45-negativen Zellen als CD41-positive Zellen identifiziert werden, und das Protokoll wurde um die Zugabe des anti-CD41-Antikörpers erweitert.

Bisher gibt es keine Studien zum Thema CD41-positive Zellen und UCB oder CD41-positive Zellen und Parsortix®-System. In einer aktuellen Studie wurden ebenfalls Megakaryozyten im Blut vom metastasierten Brustkrebspatient:innen mittels Parsortix®-System detektiert. Grasic Kuhar und Mitarbeiter werteten CD61-positive und CD68-, sowie Keratin-negative Zellen mit typischer Morphologie als Megakaryozyten. Des Weiteren wurde erwähnt, dass zur Identifizierung der Megakaryozyten auch CD41-Antikörper angewendet werden könnten. Jedoch zeigte der CD61-Antikörper eine stärkere Positivität, sodass sich in dieser Studie für diesen Antikörper entschieden wurde. Interessanterweise wurde das Vorhandensein von Megakaryozyten mit einer Gruppe von Patient:innen in Verbindung gebracht, die sich durch eine hohe Anzahl von CTCs (≥ 5), das Vorhandensein von CTC-Clustern und ein stark immuninflammatorisches Blutmilieu auszeichnete. Grasic Kuhar und Mitarbeiter begründeten die Anreicherung von Megakaryozyten mit der Charakteristik der Anreicherung durch das Parsortix®-System. Dank der Mikrofluid-Filter können mit dieser Methode nicht nur einzelne CTCs erfasst werden, sondern auch Cluster und andere größere Zellen, wie z. B. Megakaryozyten. Das Vorhandensein von Megakaryozyten im peripheren Blut ist bemerkenswert, denn normalerweise befinden sich diese Zellen lediglich im Knochenmark (Grasic Kuhar et al., 2023).

In einer anderen Studie zum Brustkrebs und der Parsortix®-Detektion wurde auch vermutet, dass es bei den angereicherten nicht-typischen zirkulierenden Zellen (nicht CTCs) um Megakaryozyten handeln könnte (Ciccioli et al., 2024).

Diese Arbeit lieferte die ersten Hinweise dafür, dass mit Parsortix®-System auch bei UCB-Patient:innen Megakaryozyten angereichert werden könnten. Um die Bedeutung der mit Hilfe von Parsortix® angereicherte Megakaryozyten bei UCB-Patient:innen und deren prognostische Bedeutung zu bestimmen, sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich.

5.4 Vergleich der verschiedenen CTC-Detektionsverfahren

Nach der Etablierung des endgültigen IF-Protokolls, konnten die von Patient:innen gewonnenen Proben analysiert werden. Es wurden 76 UCB-Patient:innen, bei denen eine radikale Zystektomie im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt wurde, in diese Arbeit eingeschlossen.

Beim CellSearch® konnten in 31% (21 von 68) der Patient:innen CTCs im peripheren Blut detektiert werden. Die durchschnittliche Gesamtanzahl der CTCs betrug 4,95 (Wertebereich: 1-47; Median: 2). Rink und Mitarbeiter wiesen auch in 30% der nicht metastasierten UCB-Patient:innen CTCs im Blut nach (Rink et al., 2011). Interessanterweise zeigen andere Publikationen eine geringere CTC-Detektion von 18-23% (Gazzaniga et al., 2012, Gazzaniga et al., 2014, Rink et al., 2012b, Soave et al., 2015). Zwei dieser erwähnten Studien untersuchten nicht-muskelinvasive UCBs (Gazzaniga et al., 2012, Gazzaniga et al., 2014), die die geringere CTC-Detektionsrate erklären könnten, jedoch wurden in einer weiteren Veröffentlichung Patient:innen vor einer radikalen Zystektomie (Rink et al., 2012b) analysiert, sodass sich die Diskrepanz nicht alleinig durch die verschiedenen Tumorstadien begründen lässt. In einer kürzlich publizierten Studie über *in vivo*-CTC-Detektion wurde sogar von einer CTC-Nachweisrate von 62% der teilnehmenden Patient:innen in einer gemischten Kohorte von nicht-muskelinvasiven und muskelinvasiven UCBs berichtet. Die Autoren werteten eine Probe nur bei einem Nachweis >2 CTCs/Patient:in als CTC-positiv, sodass sich nach dieser Auswertung auch nur eine Detektionsrate von 23% ergab. Die positive Rate betrug bei muskelinvasiven UCBs jedoch 36%, wohingegen die Positivrate bei nicht-muskelinvasiven UCB nur bei 9% lag (Jin et al., 2023). Anhand der Ergebnisse dieser Veröffentlichungen könnte ein Zusammenhang zwischen CTC-Detektionsrate und Tumorstadium vermutet werden.

Nach Parsortix®-Anreicherung wiesen 29% (16 von 56) der untersuchten Patient:innen CTC-verdächtige Zellen in peripherem Blut auf. Die durchschnittliche Gesamtanzahl der CTCs betrug 4,25 (Wertebereich: 1-18; Median: 3).

In der vorliegenden Arbeit handelt sich um die erste Studie, die diese Technologie bei UCB-Patient:innen angewendet hat, sodass keine früheren Ergebnisse zum Vergleich vorhanden sind. Jedoch wurde in mehreren Studien über ähnliche Detektionsraten von Parsortix® und CellSearch® berichtet (Chudziak et al., 2016, Hvichia et al., 2016). Allerdings gab es in einigen spezifischen Proben deutliche

Unterschiede in der Anzahl der mit den beiden Systemen isolierten CTCs. Insgesamt waren 65% (17 von 26) der Proben bei beiden Detektionsverfahren positiv oder negativ. Bei 34% (9 von 26) der Proben war jedoch nur jeweils mit einer der Detektionstechniken CTC-Positivität oder -Negativität zu detektieren (Hvichia et al., 2016). Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass man mit den zwei verschiedenen Methoden unterschiedliche CTC-Subgruppen anreichert, nämlich entweder EpCAM-positive epitheliale CTCs oder größere CTCs, die auch mesenchymale Eigenschaften aufweisen können.

In 54% (27 von 50) der Patient:innen waren weder mit Parsortix® noch mit CellSearch® CTCs nachzuweisen, und 14% (7 von 50) erwiesen sich mit beiden Verfahren als CTC-positiv. Des Weiteren waren 14% (7 von 50) lediglich positiv mit Parsortix® und 9 von 50 Patient:innen (18%) lediglich positiv mit CellSearch®. Diese Daten weisen auf eine ähnliche Sensitivität der Verfahren hin, lassen aber auch die Schlussfolgerung zu, dass unterschiedliche CTCs nachgewiesen werden.

Wenn man die Patient:innen-Proben miteinbezieht, bei denen die Färbung ohne CD41 als negativer Marker erfolgte, konnten in 19 von 59 (32%) der untersuchten Blutproben CTC-verdächtige Zellen mittels Parsortix® nachgewiesen werden. Die durchschnittliche Gesamtanzahl der CTCs betrug 6,79 (Wertebereich: 1-27; Median: 4). Wenn man die 3 Proben ohne CD41 als negativen Marker einbezieht, sieht der Vergleich zum CellSearch® ähnlich aus. Beim Vergleich der Ergebnisse von Parsortix® und CellSearch® zeigten 51% (27 von 53) der Patient:innen weder mit Parsortix® noch mit CellSearch® CTCs, und 15% (8 von 53) erwiesen sich mit beiden Verfahren als CTC-positiv. Des Weiteren waren jeweils 17% (9 von 53) der Proben nur mit einer der Anreicherungsverfahren positiv.

Bemerkenswert ist, dass die Patient:innen mit der höchsten CTC-Anzahl nach Prozessierung mit Parsortix® im CellSearch®-System CTC-negativ waren. Jedoch wurden zwei von diesen Patient:innen ohne die Verwendung von CD41 untersucht. Passend zu dieser Beobachtung ist der Median der CTCs ohne die Verwendung von CD41 als Negativmarker größer (4) als mit CD41 (Median: 3). Des Weiteren wiesen alle drei Patient:innen-Proben, bei denen die IF-Färbung ohne CD41 erfolgte, nach Verarbeitung mittels Parsortix® CTC-verdächtige Zellen auf.

Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass es sich im Falle der CTC-verdächtigen Zellen bei IF-Färbung ohne CD41-Antikörper auch um CD41-positive

Blutzellen (ggf. um Megakaryozyten) handeln könnte. Deshalb sollte in weiteren Analysen die IF-Färbung nach Parsortix®-Anreicherungsverfahren um CD41 als Negativmarker ergänzt werden.

Bei der CTC-Anreicherung mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation erfolgte die weitere Verarbeitung mit 3 unterschiedlichen IF-Färbungen. Mit der ersten angewendeten Färbung (Positivmarker: pan-Keratin, TROP-2, Negativmarker: CD45) konnten in den untersuchten 25 Patient:innen-Proben keine CTC-verdächtigen Zellen festgestellt werden.

Anschließend erfolgte die Zugabe eines zusätzlichen positiven Markers (PD-L1) und nachfolgend eines weiteren negativen Markers (CD41). Bei vier Patient:innen erfolgte eine Immunfärbung ohne CD41-Antikörper. Von diesen vier Patient:innen-Proben zeigte nur eine CTC-verdächtige Zellen. Für die bessere Vergleichbarkeit wurde diese Probe aus der vergleichenden Auswertung genommen. 16% (8 von 50) der untersuchten Proben wurden CTC-verdächtige Zellen in peripherem Blut mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation detektiert. Die durchschnittliche Gesamtanzahl der CTCs betrug 1,63 (Wertebereich: 1-4; Median: 1).

Würde man auch die Patient:innen-Probe 009 einbeziehen, wären die Ergebnisse ähnlich. In diesem Fall würden 18% (9 von 51) der untersuchten Proben CTC-verdächtige Zellen in peripherem Blut nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aufweisen. Die durchschnittliche Gesamtanzahl der CTCs betrüge 3,8 (Wertebereich: 1-21; Median: 1).

Wenn man alle Patient:innen-Proben mit einer Färbung ohne CD41 ausschließen würde, wiesen 17% (8 von 47) der analysierten Proben CTC-verdächtige Zellen in peripherem Blut mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation auf. Die durchschnittliche Gesamtanzahl der CTCs betrüge dann 1,63 (Wertebereich: 1-4; Median: 1).

Im Vergleich zu Parsortix® und CellSearch® wurde durch die Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation insgesamt die geringste Anzahl an CTCs detektiert. Des Weiteren wurde mit diesem Verfahren die geringste CTC-Detektionsrate erhalten.

Jedoch muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass durch die PBMC-Isolierung mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation von einem(r) Patient:in 6-12 Objektträger (mit ca. 700.000 Zellen pro Objektträger) entstanden sind, aber aus Kosten- und Zeitgründen nur 3 Objektträger pro Patient:in analysiert wurden. Im Vergleich dazu wurde bei den Verfahren Parsortix® und CellSearch® die gesamte Menge der

Blutprobe analysiert. Somit könnte die geringere Detektierungsrate nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation auch durch das unterschiedliche Blutvolumen und somit durch die unterschiedliche Anzahl analysierter PBMCs bedingt sein. Ein direkter Vergleich der absoluten CTC-Zahlen ist somit nur bedingt möglich.

Beim Vergleich der Ergebnisse von Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation und CellSearch® zeigten 61% (30 von 49) der Patient:innen weder mit Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation noch mit CellSearch® CTCs, und 6% (3 von 49) waren bei beiden Verfahren CTC-positiv. Jedoch waren annähernd doppelt so viele Patient:innen nur mit CellSearch® positiv (11 von 49, 22%) als alleinig positiv nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (4 von 49, 8%). Bisher gibt es keine Literaturangaben zur CTC-Detektion bei UCB-Patient:innen mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation, sodass die ermittelten Ergebnisse nicht mit anderen Literaturdaten verglichen werden können.

Dadurch ist auch zu erklären, dass ein großer Anteil (79%, 11 von 14) der CellSearch®-positiven Patient:innen-Proben bei Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation negativ blieb. Auf der anderen Seite erwiesen sich 63% (5 von 8) der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation-positiven Patient:innen im CellSearch® als CTC-negativ. Dieses Ergebnis weist erneut darauf hin, dass durch markerunabhängige Methoden (wie Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation und Parsortix®) und markerabhängige Methoden (wie CellSearch®) unterschiedliche CTC-Subgruppen detektiert werden können.

Wie auch *Abbildung 4* im Kapitel Ergebnisse veranschaulicht hat, gibt es epitheliale UCB-Zelllinien, wie 5637, 647V, HT1376 und RT4, die wahrscheinlich mit Hilfe von markerabhängigen Methoden, wie CellSearch® detektiert werden könnten. Jedoch gibt es mesenchymale UCB-Zelllinien, die keine EpCAM-Expression aufweisen und mittels CellSearch® nicht detektiert werden könnten (wie z. B. T24, TCC-SUP und UM-UC-3). Für diese UCB-Subpopulationen sollten auch markerunabhängige Detektionsverfahren angewendet werden.

Da sowohl Parsortix® als auch die Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation EpCAM-unabhängig erfolgen, stellt sich die Frage, ob Ergebnisse dieser beiden Verfahren in der CTC-Detektionsrate besser korrelieren als die Ergebnisse aus EpCAM-basierten und markerunabhängigen Verfahren.

Vergleicht man die Ergebnisse nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation und Parsortix®, waren 30 der 47 Patient:innen (64%) mit beiden Verfahren negativ und 3 von 47 (6%) mit beiden Methoden CTC-positiv. Ausschließlich mit Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation positive Proben gab es in 5 Fällen (11%). Jedoch gab es 9 Patient:innen (19%), die nur mit Parsortix® CTC-Positivität zeigten. Neun von 12 (75%) der Parsortix®-positiven Proben waren nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation CTC-negativ, und 63% (5 von 8) der nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation CTC-positiven Proben waren nach Parsortix® CTC-negativ. Somit erzielten Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation und Parsortix® auch keine bessere Übereinstimmung als CellSearch® und Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation, wobei wie bereits erwähnt, ein direkter Vergleich dieser Methoden nur bedingt möglich ist.

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit und der Literaturrecherche wäre es empfehlenswert, bei zukünftigen CTC-Analysen gleichzeitig mehrere verschiedene Methoden, also sowohl markerabhängige (wie z. B. CellSearch®) als auch markerunabhängige (wie z. B. Parsortix®) komplementär anzuwenden, wodurch die Gesamtdetektionsrate gesteigert werden könnte. Optimal sind Verfahren, mit denen sowohl epitheliale als auch mesenchymale CTCs unterschiedlicher Größe und Plastizität angereichert werden können und die eine nachgeschaltete phäno- und/oder genotypische Charakterisierung der CTCs ermöglichen. Aussichtsreiche Kandidaten sind hierfür bereits in der Literatur als Prototypen beschrieben worden (Ebright et al., 2020, Edd et al., 2022, Guo et al., 2023, Haber and Velculescu, 2014, Hong et al., 2018, Hong et al., 2021).

5.5 Ergebnisse der NGS und Vergleich mit der Literatur

Nach Identifizierung durch IF wurden die CTC-verdächtigen Zellen durch Mikromanipulation isoliert. Insgesamt erfolgte eine erfolgreiche Einzelzellisolation von 53 (6/34 nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation und 47/129 nach Parsortix®-Anreicherung) der insgesamt 163 auffälligen Zellen (129 von Parsortix® und 34 von Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation).

Dem relativ geringen Erfolg der Einzelzellisolation könnten verschiedene Ursachen zu Grunde liegen. Einerseits waren einige CTC-verdächtige Zellen nach Entfernen der Deckgläser nicht mehr auffindbar. Eine mögliche Begründung dafür ist, dass die Objektträger vor der Entfernung der Deckgläser in PBS inkubiert wurden und dadurch einige Zellen verloren gegangen sein könnten. Die Zytospinherstellung und

IF-Färbung stellen auch ein Risiko für einen Zellverlust dar. Cohen und Mitarbeiter berichteten, dass 37-51% der mit dem Parsortix®-System gewonnenen Zellen während der Zytospinherstellung und/oder dem Färbeverfahren verloren gingen (Cohen et al., 2022).

In anderen Fällen lagen zwischen der IF-Färbung der Zellen und der Einzelzellisolation längere Zeitspannen, sodass die Zellen zum Zeitpunkt der Einzelzellisolation weniger gut von der Objektträgeroberflächen abzulösen waren. In wiederholten Fällen wurden die Zellen auch während des Prozesses der Einzelzellisolierung aufgrund erhöhter Fragilität zerstört oder zusammen mit anderen benachbarten Zellen (Blutzellen) isoliert.

In 29 Fällen wurde die genomische Einzelzell-DNA mittels WGA amplifiziert. War die DNA-Qualität ausreichend (Bandenanzahl ≥ 2), wurde das genetische Material für die NGS verwendet, (obwohl eine Bandenanzahl ≥ 4 ideal gewesen wäre). Die weitere Datenanalyse erfolgte mit Hilfe von PD Dr. Simon Joosse (Institut für Tumormorphologie, UKE).

Die analysierten CNV-Profile deuten darauf hin, dass drei der isolierten Zellen höchstwahrscheinlich und zwei weitere Zellen vermutlich Tumorzellen waren. Hingegen scheinen fünf der untersuchten Zellen keine Tumorzellen gewesen zu sein. Sowohl isolierte Zellen, die mit dem Parsortix®-System angereichert wurden, als auch CTCs, die durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation gewonnen wurden, gehörten zu den bestätigten Tumorzellen.

Bemerkenswert ist, dass in der Gruppe der wahrscheinlichen Tumorzellen alle WGA-Endprodukte eine Bandenanzahl von mindestens 3 aufwiesen und somit eine gute Qualität hatten. Im Gegensatz dazu war die Qualität der WGA-Endprodukte bei den isolierten nicht-Tumorzellen geringer, mit einer durchschnittlichen Bandenanzahl von 2,6 und einem Median von 2. Diese Beobachtung könnte darauf hinweisen, dass die Negativität der Ergebnisse auch durch eine schlechtere Qualität der Zellen erklärt werden könnte.

Sho und Mitarbeiter berichteten auch, dass Einzelzell-WGA-Produkte mit guter Qualität im Vergleich zu Einzelzell-WGA-Produkten von niedriger Qualität eine geringere Amplifikationsverzerrung und bessere NGS-Leistungsmetriken aufwiesen (Sho et al., 2017). Auch in anderen nachgeschalteten Methoden spielt die WGA-Qualität eine wichtige Rolle. Klinische Proben mit hoher WGA-Qualität schnitten

beim vergleichenden genomischen Hybridisierungsarray-Ganzgenomtest besser ab (Polzer et al., 2014).

Insgesamt spiegeln die in dieser Arbeit dargestellten CNV-Profile eine starke Intra- und Inter-Patient:innen-Heterogenität der genomischen Veränderungen beim UCB wider. In 4 bzw. 3 CTCs von verschiedenen Patient:innen fanden sich Zugewinne der Chromosomenbereiche 4q bzw. 13p/q und Verluste von Bereichen des Chromosoms 16 wurden in 3 CTCs detektiert. Häufige Amplifikationen der Kopienzahlen von DNA-Sequenzen auf 4q und 13q sind für das UCB bereits bekannt (Koo et al., 1999).

Chan und Mitarbeiter untersuchten 21 UCB-Gewebe und berichteten über eine hohe Häufigkeit des allelischen Ungleichgewichts im Chromosomenarm 4q (67%) und eine überdurchschnittliche Häufigkeit im Chromosomenarm 13q. Es wurde auch über minimale Deletionsregionen auf Chromosom 16q berichtet. Das allelische Ungleichgewicht in jedem Fall und der fraktionierte allelische Verlust für jedes Chromosom waren mit einem höheren Tumorgrad und -stadium assoziiert (Chan et al., 2009).

Die folgende Datenanalyse wurde unter Verwendung des cBioPortal for Cancer Genomics (cBioPortal), 2018, Cerami et al., 2012, Gao et al., 2013) basierend auf der TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) PanCancer Atlas-Kohorte durchgeführt (Hoadley et al., 2018).

Zugewinne für den Chromosombereich 4q sind in der Literatur mehrfach beschrieben worden. Zugewinne für den Chromosombereich 13p wurden bisher nicht beschrieben, jedoch für 13q. Es ist interessant zu erwähnen, dass ein Zugewinn im Chromosombereich 13q34 sehr häufig und insgesamt im Zusammenhang mit 46 verschiedenen Genen beschrieben wurde (Gao et al., 2013, Cerami et al., 2012, cBioPortal), 2018, Hoadley et al., 2018). Die Region 13q34 wurde bereits als Suszeptibilitäts-Locus für UCB beschrieben (Figueroa et al., 2016). Acht Gene, bei denen Zugewinne im Chromosombereich 13q nachgewiesen wurden, sind auch beim UCB bekannt: GAS6-AS1 (Growth Arrest Specific 6 Antisense RNA 1), GAS6 (Growth Arrest Specific 6), SOX1 (SRY-Box Transcription Factor 1), RAB20 (Ras-related protein Rab-20), MYO16-AS1 (MYO16 Antisense RNA 1), KLF5 (Krüppel-like factor 5), CUL4A (Cullin 4A), COL4A1 (collagen type IV alpha 1 chain). Über Verluste für die Chromosombereiche 16p und 16q ist auch bereits berichtet worden.

Interessant ist zu erwähnen, dass ein Verlust im Chromosombereich 16p13.3 sehr häufig und insgesamt im Zusammenhang mit 208 verschiedenen Genen berichtet wurde. Verluste im Chromosom 16 könnten auch mit drei UCB-relevanten Genen in Verbindung gebracht werden: WWOX, DNASE1 (Deoxyribonuclease I) und NLRC3 (NOD-like receptor family CARD domain containing 3) (Gao et al., 2013, Cerami et al., 2012, cBioPortal), 2018, Hoadley et al., 2018).

5.6 Prognostische Bedeutung

Die vorläufige statistische Auswertung der Ergebnisse zeigte keinen Zusammenhang zwischen dem CTC-Status und dem Tumor-, Lymphknoten- oder Fernmetastasen-Status. Diese Beobachtung liegt im Einklang mit veröffentlichten Arbeiten, die eine Assoziation zwischen dem Vorhandensein von CTCs und schlechterem Gesamt-, rezidivfreien- und krankheitsspezifischen Überleben sowieso verkürzter rezidivfreier Zeit, jedoch keinen Zusammenhang zu klinisch-pathologischen Eigenschaften zeigten (Gazzaniga et al., 2012, Gazzaniga et al., 2014, Rink et al., 2011, Rink et al., 2012b, Soave et al., 2017). Jedoch wurde in einer kürzlich veröffentlichten Studie mit *in vivo*-CTC-Detektion berichtet, dass der Nachweis von CTCs in signifikantem Zusammenhang mit verschiedenen klinisch-pathologischen Merkmalen, wie z. B. der Multiplizität des Tumors, der Tumorgroße, einem fortgeschrittenen Tumorstadium, einem höheren Tumorgrad und der PD-L1-Expression des Tumors stand (Jin et al., 2023).

In der vorliegenden Arbeit sollte auch die prognostische Bedeutung der detektierten CTCs analysiert werden. Leider liegen die Überlebensdaten der Patient:innen nicht vollständig vor, sodass über den prognostischen Einfluss der CTC-Anzahl auf das Überleben in dieser Arbeit keine Aussage getroffen werden kann.

5.7 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass VISTA/VSIR in signifikanter Menge in verschiedenen UCB-Zelllinien unabhängig vom Zelllinien-Subtyp exprimiert wird. Epitheliale (5637, 647V, HT1376, RT4), mesenchymale (T24, TCC-SUP, UMUC-3) sowie basale (5637, 647V, HT1376) und luminal (RT4) Zelllinien können eine VISTA/VSIR-Expression aufweisen. Das Zytokin IFN- γ zeigte einen positiven Effekt auf die Expression von PD-L1 bei den Zelllinien 5637, HT1376 und T24, und das Zytokin TGF β zeigte einen heraufregulierenden Effekt auf PD-L1-

Expression in der Zelllinie 5637. In den hier untersuchten UCB-Zelllinien konnte keine reproduzierbare Regulation der VISTA/VS/R-Expression durch INF- γ oder durch TGF β nachgewiesen werden. Es wurden verschiedene IF-Protokolle für verschiedene Antigene (VISTA, CD44, TROP-2, PD-L1) etabliert. Diese Arbeit lieferte die ersten Hinweise darauf, dass mit dem Parsortix[®]-System auch bei UCB-Patient:innen Megakaryozyten angereichert werden können. Diesbezüglich kann empfohlen werden, die IF-Färbung bei Verwendung von Parsortix[®] als Detektionsverfahren mit CD41 (oder mit anderem Megakaryozyten-Marker) als Negativmarker zu ergänzen.

Mit dem CellSearch[®]-System wurden CTCs im peripheren Blut bei 31% (21 von 68) der untersuchten Patient:innen nachgewiesen. Nach Parsortix[®]-Prozessierung wiesen 29% (16 von 56) der untersuchten Patient:innen CTC-verdächtige Zellen im peripheren Blut auf. Bei dieser Arbeit handelt es sich um die erste Veröffentlichung, die diese Technologie bei UCB-Patient:innen angewendet hat. Nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation wiesen 16% (8 von 50) der untersuchten Patient:innen CTC-verdächtige Zellen im peripheren Blut auf. Im Vergleich mit den zwei anderen angewendeten Methoden wurde nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation insgesamt die geringste CTC-Detektionsrate erhalten. Nach Identifizierung durch IF wurden die CTC-verdächtigen Zellen durch Mikromanipulation isoliert. Insgesamt erfolgte eine erfolgreiche Einzelzellisolation von 53 Zellen (6/34 nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation und 47/129 nach Parsortix[®]-Anreicherung) von den insgesamt 163 auffälligen Zellen (129 von Parsortix[®] und 34 von Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation). Anschließend erfolgten in 29 Fällen die Amplifikation genomischer Einzelzell-DNA durch WGA, die nachgeschaltete Qualitätskontrolle über PCR und Agarose-Gelelektrophorese und bei ausgewählten Zellen eine NGS. Die erhaltenen CNV-Profile mit Zugewinnen und Verlusten in verschiedenen chromosomalen Regionen lassen schlussfolgern, dass es sich bei 3 der isolierten Zellen mit großer Wahrscheinlichkeit und bei 2 der isolierten Zellen wahrscheinlich um Tumorzellen handelt. Unter den bestätigten CTCs befanden sich sowohl isolierte Zellen nach Anreicherung durch das Parsortix[®]-System als auch nach Anreicherung durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation.

In 4 bzw. 3 CTCs von verschiedenen Patient:innen fanden sich Zugewinne der Chromosomenbereiche 4q bzw. 13p/q, und Verluste von Bereichen des Chromosoms 16 wurden in 3 CTCs detektiert. Diese chromosomalen Bereiche,

insbesondere Zugewinne im Chromosom 13q und Verluste im Chromosom 16, stehen mit mindestens 11 Genen, die schon mit UCB in Verbindung gebracht wurden, im Zusammenhang.

Die vorläufige statistische Auswertung der Ergebnisse zeigte keinen Zusammenhang zwischen dem CTC-Status und dem Tumor-, Lymphknoten- oder Fernmetastasen-Status. Leider liegen die Überlebensdaten der Patient:innen nicht vollständig vor, sodass über den prognostischen Einfluss der CTC-Anzahl auf das Überleben in dieser Arbeit keine Aussage getroffen werden kann.

6 Zusammenfassung/Summary

Trotz fortschreitender Entwicklungen, insbesondere durch den Einsatz von ICP, stellt das UCB weiterhin eine der häufigsten Krebserkrankungen mit signifikanter Mortalität dar. Dies unterstreicht die Notwendigkeit weiterer Fortschritte auf diagnostischer wie therapeutischer Ebene.

Aktuell basiert die Therapie auf etablierten ICP-Inhibitoren. Eine zusätzliche Blockade weiterer ICP-Moleküle, wie z. B. VISTA, könnte jedoch einen therapeutischen Zugewinn darstellen. Die gezielte Inhibition von VISTA wird derzeit in klinischen Studien untersucht. Allerdings bestehen noch zahlreiche offene Fragen hinsichtlich der Regulation der Expression, der funktionellen Bedeutung sowie des prognostischen Wertes von VISTA bei malignen Erkrankungen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Expression von VISTA/*VSIR* in verschiedenen UCB-Zelllinien nachgewiesen werden. Eine Behandlung mit IFN- γ bzw. TGF β führte in den Zelllinien zu keiner relevanten Veränderung der Expression. Mehrere Studien deuten darauf hin, dass VISTA-positive Immunzellen potenziell als Biomarker geeignet sein könnten.

Neben Immunzellmarkern rücken auch CTCs zunehmend in den Fokus der Forschung. Die größte Herausforderung bleibt dabei die zuverlässige Detektion, bedingt durch die geringe CTC-Frequenz im peripheren Blut und dem Fehlen eines universellen Oberflächenmarkers. Bis heute existiert kein allgemein anerkanntes Verfahren zur CTC-Isolation. In der vorliegenden Arbeit wurden bei 76 UCB-Patient:innen CTCs mit Hilfe von CellSearch[®], Parsortix[®] und Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation angereichert. Auffällige Zellen nach IF wurden zusätzlich mittels WGA und NGS weiter analysiert. Mit allen 3 Methoden konnten CTCs erfolgreich angereichert werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Methoden unterschiedliche CTC-Subpopulationen erfassen: Während CellSearch[®] primär epitheliale CTCs mit EpCAM-Expression detektiert, ermöglichen die zwei andere Verfahren auch die Anreicherung größerer, weniger plastischer Zellen mit möglichem mesenchymalem Phänotyp. Diese Beobachtungen unterstützen die Notwendigkeit des kombinierten Einsatzes mehrerer Anreicherungsverfahren. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass mit Parsortix[®] auch CD41-positive Zellen – vermutlich Megakaryozyten – koangereichert werden. Daher sollte CD41 in künftigen Studien als negativer Marker bei der IF-basierten Analyse berücksichtigt werden.

Despite ongoing advancements, particularly through the use of ICPs, UCB remains one of the most common cancers with significant mortality. This underscores the need for further progress on both diagnostic and therapeutic levels.

Currently, therapy is based on established ICP inhibitors. However, additional blockade of other ICP molecules, such as VISTA, could offer therapeutic benefits. The targeted inhibition of VISTA is currently being investigated in clinical trials. Nevertheless, numerous open questions remain regarding the regulation of its expression, its functional significance, and its prognostic value in malignant diseases.

In the context of this study, the expression of VISTA/*VSIR* was demonstrated in various UCB cell lines. Treatment with IFN- γ or TGF β did not lead to any relevant changes in expression in these UCB cell lines. Several studies suggest that VISTA-positive immune cells could potentially serve as biomarkers.

In addition to immune cell markers, CTCs are increasingly becoming a focus of research. The greatest challenge remains their reliable detection, due to the low frequency of CTCs in peripheral blood and the absence of a universal surface marker. To date, no universally accepted method for CTC isolation exists. In the present study, CTCs from 76 UCB patients were enriched using CellSearch[®], Parsortix[®], and Ficoll density gradient centrifugation. Abnormal cells identified by immunofluorescence were further analyzed using WGA and NGS. CTCs were successfully enriched using all three methods. The results show that the methods capture different CTC subpopulations: while CellSearch[®] primarily detects epithelial CTCs expressing EpCAM, the other two methods also enable the enrichment of larger, less plastic cells with a possible mesenchymal phenotype. These observations support the necessity of combining multiple enrichment methods. Furthermore, it was shown that Parsortix[®] also co-enriches CD41-positive cells - presumably megakaryocytes. Therefore, CD41 should be considered as a negative marker in immunofluorescence-based analyses in future studies.

7 Literaturverzeichnis

- ABIKO, K., MATSUMURA, N., HAMANISHI, J., HORIKAWA, N., MURAKAMI, R., YAMAGUCHI, K., YOSHIOKA, Y., BABA, T., KONISHI, I. & MANDAI, M. 2015. IFN- γ from lymphocytes induces PD-L1 expression and promotes progression of ovarian cancer. *Br J Cancer*, 112, 1501-9.
- ACHEAMPONG, E., ABED, A., MORICI, M., SPENCER, I., BEASLEY, A. B., BOWYER, S., ASANTE, D. B., LOMMA, C., LIN, W., MILLWARD, M. & GRAY, E. S. 2022. Evaluation of PD-L1 expression on circulating tumour cells in small-cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*, 11, 440-451.
- AGASHE, R. & KURZROCK, R. 2020. Circulating Tumor Cells: From the Laboratory to the Cancer Clinic. *Cancers (Basel)*, 12.
- AGGARWAL, C., WANG, X., RANGANATHAN, A., TORIGIAN, D., TROXEL, A., EVANS, T., COHEN, R. B., VAIDYA, B., RAO, C., CONNELLY, M., VACHANI, A., LANGER, C. & ALBELDA, S. 2017. Circulating tumor cells as a predictive biomarker in patients with small cell lung cancer undergoing chemotherapy. *Lung Cancer*, 112, 118-125.
- AGGEN, D. H. & DRAKE, C. G. 2017. Biomarkers for immunotherapy in bladder cancer: a moving target. *J Immunother Cancer*, 5, 94.
- AL-ZALABANI, A. H., STEWART, K. F., WESSELIUS, A., SCHOLS, A. M. & ZEEGERS, M. P. 2016. Modifiable risk factors for the prevention of bladder cancer: a systematic review of meta-analyses. *Eur J Epidemiol*, 31, 811-51.
- ALIX-PANABIERES, C. & PANTEL, K. 2013. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem*, 59, 110-8.
- ALKASSIS, M., KOURIE, H. R., SARKIS, J. & NEMR, E. 2021. Predictive biomarkers in bladder cancer. *Biomark Med*, 15, 241-246.
- ALLARD, W. J., MATERA, J., MILLER, M. C., REPOLLET, M., CONNELLY, M. C., RAO, C., TIBBE, A. G., UHR, J. W. & TERSTAPPEN, L. W. 2004. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res*, 10, 6897-904.
- ALOIA, L., PARISI, S., FUSCO, L., PASTORE, L. & RUSSO, T. 2010. Differentiation of embryonic stem cells 1 (DIES1) is a component of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) signaling pathway required for proper differentiation of mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 285, 7776-83.
- ALVA, A., FRIEDLANDER, T., CLARK, M., HUEBNER, T., DAIGNAULT, S., HUSSAIN, M., LEE, C., HAFEZ, K., HOLLENBECK, B., WEIZER, A., PREMASEKHARAN, G., TRAN, T., FU, C., IONESCU-ZANETTI, C., SCHWARTZ, M., FAN, A. & PARIS, P. 2015. Circulating Tumor Cells as Potential Biomarkers in Bladder Cancer. *J Urol*, 194, 790-8.

- ANANTHARAMAN, A., FRIEDLANDER, T., LU, D., KRUPA, R., PREMASEKHARAN, G., HOUGH, J., EDWARDS, M., PAZ, R., LINDQUIST, K., GRAF, R., JENDRISAK, A., LOUW, J., DUGAN, L., BAIRD, S., WANG, Y., DITTAMORE, R. & PARIS, P. L. 2016. Programmed death-ligand 1 (PD-L1) characterization of circulating tumor cells (CTCs) in muscle invasive and metastatic bladder cancer patients. *BMC Cancer*, 16, 744.
- ANGLE, P. 2023. *Parsortix® technology* [Online]. Available: <https://angleplc.com/parsortix-technology/> [Accessed 07.10.2023].
- ANTONI, S., FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., ZNAOR, A., JEMAL, A. & BRAY, F. 2017. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. *Eur Urol*, 71, 96-108.
- ANTONIA, S. J., VILLEGAS, A., DANIEL, D., VICENTE, D., MURAKAMI, S., HUI, R., KURATA, T., CHIAPPORI, A., LEE, K. H., DE WIT, M., CHO, B. C., BOURHABA, M., QUANTIN, X., TOKITO, T., MEKHAIL, T., PLANCHARD, D., KIM, Y. C., KARAPETIS, C. S., HIRET, S., OSTOROS, G., KUBOTA, K., GRAY, J. E., PAZ-ARES, L., DE CASTRO CARPENO, J., FAIVRE-FINN, C., RECK, M., VANSTEENKISTE, J., SPIGEL, D. R., WADSWORTH, C., MELILLO, G., TABOADA, M., DENNIS, P. A., OZGUROGLU, M. & INVESTIGATORS, P. 2018. Overall Survival with Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III NSCLC. *N Engl J Med*, 379, 2342–2350.
- APOLO, A. B., BALLMAN, K. V., SONPAVDE, G., BERG, S., KIM, W. Y., PARIKH, R., TEO, M. Y., SWEIS, R. F., GEYNISMAN, D. M., GRIVAS, P., CHATTA, G., REICHERT, Z. R., KIM, J. W., BILEN, M. A., MCGREGOR, B., SINGH, P., TRIPATHI, A., COLE, S., SIMON, N., NIGLIO, S., LEY, L., CORDES, L., SRINIVAS, S., HUANG, J., ODEGAARD, M., WATT, C., PETRYLAK, D., HOFFMAN-CENSITS, J., WEN, Y., HAHN, O., MITCHELL, C., TAN, A., STREICHER, H., SHARON, E., MOON, H., WOODS, M., HALABI, S., PEREZ BURBANO, G., MORRIS, M. J. & ROSENBERG, J. E. 2025. Adjuvant Pembrolizumab versus Observation in Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med*, 392, 45-55.
- ARMSTRONG, A. J., MARENGO, M. S., OLTEAN, S., KEMENY, G., BITTING, R. L., TURNBULL, J. D., HEROLD, C. I., MARCOM, P. K., GEORGE, D. J. & GARCIA-BLANCO, M. A. 2011. Circulating tumor cells from patients with advanced prostate and breast cancer display both epithelial and mesenchymal markers. *Mol Cancer Res*, 9, 997-1007.
- ARNEMANN, J. 2019a. PCR. In: GRESSNER, A. M. & ARNDT, T. (eds.) *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.pp. 1841–1842.
- ARNEMANN, J. 2019b. PCR, quantitative in Echtzeit. In: GRESSNER, A. M. & ARNDT, T. (eds.) *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.pp. 1842–1842.
- ARNEMANN, J. 2019c. WGA. In: GRESSNER, A. M. & ARNDT, T. (eds.) *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.pp. 2508–2509.

- AVELLINI, C., LICINI, C., LAZZARINI, R., GESUITA, R., GUERRA, E., TOSSETTA, G., CASTELLUCCI, C., GIANNUBILO, S. R., PROCOPIO, A., ALBERTI, S., MAZZUCHELLI, R., OLIVIERI, F. & MARZIONI, D. 2017. The trophoblast cell surface antigen 2 and miR-125b axis in urothelial bladder cancer. *Oncotarget*, 8, 58642-58653.
- BAEUEERLE, P. A. & GIRES, O. 2007. EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *Br J Cancer*, 96, 417-23.
- BAHLINGER, V., BRANZ, A., STRISSEL, P. L., STRICK, R., LANGE, F., GEPPERT, C. I., KLUMPER, N., HOLZEL, M., WACH, S., TAUBERT, H., SIKIC, D., WULLICH, B., ANGELONI, M., FERRAZZI, F., DIEHL, L., KOVALENKO, M., ELBOUDWAREJ, E., JURGENSMEIER, J. M., HARTMANN, A. & ECKSTEIN, M. 2024. Associations of TACSTD2/TROP2 and NECTIN-4/NECTIN-4 with molecular subtypes, PD-L1 expression, and FGFR3 mutational status in two advanced urothelial bladder cancer cohorts. *Histopathology*, 84, 863-876.
- BAJORIN, D. F., WITJES, J. A., GSCHWEND, J. E., SCHENKER, M., VALDERRAMA, B. P., TOMITA, Y., BAMIAS, A., LEBRET, T., SHARIAT, S. F., PARK, S. H., YE, D., AGERBAEK, M., ENTING, D., MCDERMOTT, R., GAJATE, P., PEER, A., MILOWSKY, M. I., NOSOV, A., NEIF ANTONIO, J., JR., TUPIKOWSKI, K., TOMS, L., FISCHER, B. S., QURESHI, A., COLLETTE, S., UNSAL-KACMAZ, K., BROUGHTON, E., ZARDAVAS, D., KOON, H. B. & GALSKY, M. D. 2021. Adjuvant Nivolumab versus Placebo in Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med*, 384, 2102–2114.
- BAKER, S. C., MASON, A. S., SLIP, R. G., ERIKSSON, P., SJODAHL, G., TREJDOSIEWICZ, L. K. & SOUTHGATE, J. 2022. The Urothelial Transcriptomic Response to Interferon Gamma: Implications for Bladder Cancer Prognosis and Immunotherapy. *Cancers (Basel)*, 14.
- BANKO, P., LEE, S. Y., NAGYGYORGY, V., ZRINYI, M., CHAE, C. H., CHO, D. H. & TELEKES, A. 2019. Technologies for circulating tumor cell separation from whole blood. *J Hematol Oncol*, 12, 48.
- BASILE, G., BANDINI, M., GIBB, E. A., ROSS, J. S., RAGGI, D., MARANDINO, L., COSTA DE PADUA, T., CRUPI, E., COLOMBO, R., COLECCHIA, M., LUCIANO, R., NOCERA, L., MOSCHINI, M., BRIGANTI, A., MONTORSI, F. & NECCHI, A. 2022. Neoadjuvant Pembrolizumab and Radical Cystectomy in Patients with Muscle-Invasive Urothelial Bladder Cancer: 3-Year Median Follow-Up Update of PURE-01 Trial. *Clin Cancer Res*, 28, 5107–5114.
- BATISTA, R., VINAGRE, N., MEIRELES, S., VINAGRE, J., PRAZERES, H., LEO, R., MAXIMO, V. & SOARES, P. 2020. Biomarkers for Bladder Cancer Diagnosis and Surveillance: A Comprehensive Review. *Diagnostics (Basel)*, 10.
- BATTISTA, M., MUSTO, A., NAVARRA, A., MINOPOLI, G., RUSSO, T. & PARISI, S. 2013. miR-125b regulates the early steps of ESC differentiation through *cds1* in a TGF-independent manner. *Int J Mol Sci*, 14, 13482-96.

- BEDNOVA, O. & LEYTON, J. V. 2020. Targeted Molecular Therapeutics for Bladder Cancer-A New Option beyond the Mixed Fortunes of Immune Checkpoint Inhibitors? *Int J Mol Sci*, 21.
- BELLMUNT, J., DE WIT, R., VAUGHN, D. J., FRADET, Y., LEE, J. L., FONG, L., VOGELZANG, N. J., CLIMENT, M. A., PETRYLAK, D. P., CHOUEIRI, T. K., NECCHI, A., GERRITSEN, W., GURNEY, H., QUINN, D. I., CULINE, S., STERNBERG, C. N., MAI, Y., POEHLEIN, C. H., PERINI, R. F. & BAJORIN, D. F. 2017a. Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med*, 376, 1015–1026.
- BELLMUNT, J., POWLES, T. & VOGELZANG, N. J. 2017b. A review on the evolution of PD-1/PD-L1 immunotherapy for bladder cancer: The future is now. *Cancer Treat Rev*, 54, 58-67.
- BERGMANN, S. 2019. *Untersuchungen zur Expression des immunmodulatorischen Proteins PD-L1 im Urothelkarzinom der Harnblase*. Universität Hamburg.
- BERGMANN, S., COYM, A., OTT, L., SOAVE, A., RINK, M., JANNING, M., STOUPIEC, M., COITH, C., PEINE, S., VON AMSBERG, G., PANTEL, K. & RIETHDORF, S. 2020. Evaluation of PD-L1 expression on circulating tumor cells (CTCs) in patients with advanced urothelial carcinoma (UC). *Oncoimmunology*, 9, 1738798.
- BHARAJ, P., CHAHAR, H. S., ALOZIE, O. K., RODARTE, L., BANSAL, A., GOEPFERT, P. A., DWIVEDI, A., MANJUNATH, N. & SHANKAR, P. 2014. Characterization of programmed death-1 homologue-1 (PD-1H) expression and function in normal and HIV infected individuals. *PLoS One*, 9, e109103.
- BIDARD, F. C., MICHIELS, S., RIETHDORF, S., MUELLER, V., ESSERMAN, L. J., LUCCI, A., NAUME, B., HORIGUCHI, J., GISBERT-CRIADO, R., SLEIJFER, S., TOI, M., GARCIA-SAENZ, J. A., HARTKOPF, A., GENERALI, D., ROTHE, F., SMERAGE, J., MUINELO-ROMAY, L., STEBBING, J., VIENS, P., MAGBANUA, M. J. M., HALL, C. S., ENGEBRAATEN, O., TAKATA, D., VIDAL-MARTINEZ, J., ONSTENK, W., FUJISAWA, N., DIAZ-RUBIO, E., TARAN, F. A., CAPPELLETTI, M. R., IGNATIADIS, M., PROUDHON, C., WOLF, D. M., BAULDRY, J. B., BORGES, E., NAGAOKA, R., CARANANA, V., KRAAN, J., MAESTRO, M., BRUCKER, S. Y., WEBER, K., REYAL, F., AMARA, D., KARHADE, M. G., MATHIESEN, R. R., TOKINIWA, H., LLOMBART-CUSSAC, A., MEDDIS, A., BLANCHE, P., D'HOLLANDER, K., COTTU, P., PARK, J. W., LOIBL, S., LATOUCHE, A., PIERGA, J. Y. & PANTEL, K. 2018. Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients Treated by Neoadjuvant Chemotherapy: A Meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*, 110, 560-567.

- BIDARD, F. C., PEETERS, D. J., FEHM, T., NOLE, F., GISBERT-CRIADO, R., MAVROUDIS, D., GRISANTI, S., GENERALI, D., GARCIA-SAENZ, J. A., STEBBING, J., CALDAS, C., GAZZANIGA, P., MANSO, L., ZAMARCHI, R., DE LASCOITI, A. F., DE MATTOS-ARRUDA, L., IGNATIADIS, M., LEBOWSKY, R., VAN LAERE, S. J., MEIER-STIEGEN, F., SANDRI, M. T., VIDAL-MARTINEZ, J., POLITAKI, E., CONSOLI, F., BOTTINI, A., DIAZ-RUBIO, E., KRELL, J., DAWSON, S. J., RAIMONDI, C., RUTTEN, A., JANNI, W., MUNZONE, E., CARANANA, V., AGELAKI, S., ALMICI, C., DIRIX, L., SOLOMAYER, E. F., ZORZINO, L., JOHANNES, H., REIS-FILHO, J. S., PANTEL, K., PIERGA, J. Y. & MICHIELS, S. 2014. Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*, 15, 406-14.
- BIDNUR, S., SAVDIE, R. & BLACK, P. C. 2016. Inhibiting Immune Checkpoints for the Treatment of Bladder Cancer. *Bladder Cancer*, 2, 15-25.
- BOGER, C., BEHRENS, H. M., KRUGER, S. & ROCKEN, C. 2017. The novel negative checkpoint regulator VISTA is expressed in gastric carcinoma and associated with PD-L1/PD-1: A future perspective for a combined gastric cancer therapy? *Oncoimmunology*, 6, e1293215.
- BÖHLE, A. & BRANDAU, S. 2003. Immune mechanisms in bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer. *J Urol*, 170, 964-9.
- BOUSSIOTIS, V. A. 2016. Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway. *N Engl J Med*, 375, 1767–1778.
- BRAHMER, J. R., DRAKE, C. G., WOLLNER, I., POWDERLY, J. D., PICUS, J., SHARFMAN, W. H., STANKEVICH, E., PONS, A., SALAY, T. M., MCMILLER, T. L., GILSON, M. M., WANG, C., SELBY, M., TAUBE, J. M., ANDERS, R., CHEN, L., KORMAN, A. J., PARDOLL, D. M., LOWY, I. & TOPALIAN, S. L. 2010. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol*, 28, 3167-75.
- BRAHMER, J. R., TYKODI, S. S., CHOW, L. Q., HWU, W. J., TOPALIAN, S. L., HWU, P., DRAKE, C. G., CAMACHO, L. H., KAUH, J., ODUNSI, K., PITOT, H. C., HAMID, O., BHATIA, S., MARTINS, R., EATON, K., CHEN, S., SALAY, T. M., ALAPARTHY, S., GROSSO, J. F., KORMAN, A. J., PARKER, S. M., AGRAWAL, S., GOLDBERG, S. M., PARDOLL, D. M., GUPTA, A. & WIGGINTON, J. M. 2012. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med*, 366, 2455-65.
- BRAY, F., FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., SIEGEL, R. L., TORRE, L. A. & JEMAL, A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68, 394-424.

- BROUGHTON, T. W. K., ELTANBOULY, M. A., SCHAAFSMA, E., DENG, J., SARDE, A., CROTEAU, W., LI, J., NOWAK, E. C., MABAERA, R., SMITS, N. C., KUTA, A., NOELLE, R. J. & LINES, J. L. 2019. Defining the Signature of VISTA on Myeloid Cell Chemokine Responsiveness. *Front Immunol*, 10, 2641.
- CALLAHAN, M. K., POSTOW, M. A. & WOLCHOK, J. D. 2013. Immunomodulatory therapy for melanoma: ipilimumab and beyond. *Clin Dermatol*, 31, 191-9.
- CALLAHAN, M. K., POSTOW, M. A. & WOLCHOK, J. D. 2014. CTLA-4 and PD-1 Pathway Blockade: Combinations in the Clinic. *Front Oncol*, 4, 385.
- CANCER, I. A. F. R. O. 2020. *Cancer today* [Online]. Available: <https://gco.iarc.fr/today> [Accessed 03.10.2023].
- CAO, X., REN, X., ZHOU, Y., MAO, F., LIN, Y., WU, H. & SUN, Q. 2020. VISTA Expression on Immune Cells Correlates With Favorable Prognosis in Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *Front Oncol*, 10, 583966.
- CBIOPORTAL), M. S. K. C. C. F. 2018. *cBioPortal for Cancer Genomics: Study Summary for TCGA PanCancer Atlas (2018), BLCA*. [Online]. Available: https://www.cbioportal.org/study/summary?id=blca_tcga_pan_can_atlas_2018 [Accessed 25.01.2025].
- CEERAZ, S., NOWAK, E. C. & NOELLE, R. J. 2013. B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease. *Trends Immunol*, 34, 556-63.
- CEERAZ, S., SERGENT, P. A., PLUMMER, S. F., SCHNED, A. R., PECHENICK, D., BURNS, C. M. & NOELLE, R. J. 2017. VISTA Deficiency Accelerates the Development of Fatal Murine Lupus Nephritis. *Arthritis Rheumatol*, 69, 814-825.
- CERAMI, E., GAO, J., DOGRUSOZ, U., GROSS, B. E., SUMER, S. O., AKSOY, B. A., JACOBSEN, A., BYRNE, C. J., HEUER, M. L., LARSSON, E., ANTIPIN, Y., REVA, B., GOLDBERG, A. P., SANDER, C. & SCHULTZ, N. 2012. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov*, 2, 401-4.
- CHAFFER, C. L. & WEINBERG, R. A. 2011. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*, 331, 1559-64.
- CHAN, M. W., HUI, A. B., YIP, S. K., NG, C. F., LO, K. W., TONG, J. H., CHAN, A. W., CHEUNG, H. Y., WONG, W. S., CHAN, P. S., LAI, F. M. & TO, K. F. 2009. Progressive increase of genetic alteration in urinary bladder cancer by combined allelotyping analysis and comparative genomic hybridization. *Int J Oncol*, 34, 963-70.
- CHEN, S., CRABILL, G. A., PRITCHARD, T. S., MCMILLER, T. L., WEI, P., PARDOLL, D. M., PAN, F. & TOPALIAN, S. L. 2019. Mechanisms regulating PD-L1 expression on tumor and immune cells. *J Immunother Cancer*, 7, 305.

- CHMIEL, P., GECA, K., MICHALSKI, A., KLOSINSKA, M., KACZYNSKA, A., POLKOWSKI, W. P., PELC, Z. & SKORZEWSKA, M. 2023. Vista of the Future: Novel Immunotherapy Based on the Human V-Set Immunoregulatory Receptor for Digestive System Tumors. *Int J Mol Sci*, 24.
- CHOI, W., LOMBARDO, K., PATEL, S., EPSTEIN, G., FENG, M., GABRIELSON, A., HAHN, N. M., HOFFMAN-CENSITS, J., MCCONKEY, D., BIVALACQUA, T. J., MATOSO, A. & KATES, M. 2022. A Molecular Inquiry into the Role of Antibody-Drug Conjugates in Bacillus Calmette-Guerin-exposed Non-muscle-invasive Bladder Cancer. *Eur Urol*, 81, 138-142.
- CHOI, W., PORTEN, S., KIM, S., WILLIS, D., PLIMACK, E. R., HOFFMAN-CENSITS, J., ROTH, B., CHENG, T., TRAN, M., LEE, I. L., MELQUIST, J., BONDARUK, J., MAJEWSKI, T., ZHANG, S., PRETZSCH, S., BAGGERLY, K., SIEFKER-RADTKE, A., CZERNIAK, B., DINNEY, C. P. & MCCONKEY, D. J. 2014. Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer Cell*, 25, 152-65.
- CHOU, J., TREPKA, K., SJOSTROM, M., EGUSA, E. A., CHU, C. E., ZHU, J., CHAN, E., GIBB, E. A., BADURA, M. L., CONTRERAS-SANZ, A., STOHR, B. A., MENG, M. V., PRUTHI, R. S., LOTAN, Y., BLACK, P. C., PORTEN, S. P., KOSHKIN, V. S., FRIEDLANDER, T. W. & FENG, F. Y. 2022. TROP2 Expression Across Molecular Subtypes of Urothelial Carcinoma and Enfortumab Vedotin-resistant Cells. *Eur Urol Oncol*, 5, 714-718.
- CHOU, R., GORE, J. L., BUCKLEY, D., FU, R., GUSTAFSON, K., GRIFFIN, J. C., GRUSING, S. & SELPH, S. 2015. Urinary Biomarkers for Diagnosis of Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Ann Intern Med*, 163, 922-31.
- CHUDZIAK, J., BURT, D. J., MOHAN, S., ROTHWELL, D. G., MESQUITA, B., ANTONELLO, J., DALBY, S., AYUB, M., PRIEST, L., CARTER, L., KREBS, M. G., BLACKHALL, F., DIVE, C. & BRADY, G. 2016. Clinical evaluation of a novel microfluidic device for epitope-independent enrichment of circulating tumour cells in patients with small cell lung cancer. *Analyst*, 141, 669-78.
- CICCIOLI, M., KIM, K., KHAZAN, N., KHOURY, J. D., COOKE, M. J., MILLER, M. C., O'SHANNESSY, D. J., PAILHES-JIMENEZ, A. S. & MOORE, R. G. 2024. Identification of circulating tumor cells captured by the FDA-cleared Parsortix((R)) PC1 system from the peripheral blood of metastatic breast cancer patients using immunofluorescence and cytopathological evaluations. *J Exp Clin Cancer Res*, 43, 240.
- COHEN, E. N., JAYACHANDRAN, G., MOORE, R. G., CRISTOFANILLI, M., LANG, J. E., KHOURY, J. D., PRESS, M. F., KIM, K. K., KHAZAN, N., ZHANG, Q., ZHANG, Y., KAUR, P., GUZMAN, R., MILLER, M. C., REUBEN, J. M. & UENO, N. T. 2022. A Multi-Center Clinical Study to Harvest and Characterize Circulating Tumor Cells from Patients with Metastatic Breast Cancer Using the Parsortix((R)) PC1 System. *Cancers (Basel)*, 14.

- COHEN, S. J., PUNT, C. J., IANNOTTI, N., SAIDMAN, B. H., SABBATH, K. D., GABRAIL, N. Y., PICUS, J., MORSE, M. A., MITCHELL, E., MILLER, M. C., DOYLE, G. V., TISSING, H., TERSTAPPEN, L. W. & MEROPOL, N. J. 2009. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*, 20, 1223-9.
- COLEY, W. B. 1910. The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the Streptococcus erysipelas and the Bacillus prodigiosus). *Proc R Soc Med*, 3, 1-48.
- COUZIN-FRANKEL, J. 2013. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science*, 342, 1432-3.
- CRISTOFANILLI, M., BUDD, G. T., ELLIS, M. J., STOPECK, A., MATERA, J., MILLER, M. C., REUBEN, J. M., DOYLE, G. V., ALLARD, W. J., TERSTAPPEN, L. W. & HAYES, D. F. 2004. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*, 351, 781-91.
- CRUPI, E., DE PADUA, T. C., MARANDINO, L., RAGGI, D., DYRSKJOT, L., SPIESS, P. E., SONPAVDE, G. P., KAMAT, A. M. & NECCHI, A. 2024. Circulating tumor DNA as a Predictive and Prognostic Biomarker in the Perioperative Treatment of Muscle-invasive Bladder Cancer: A Systematic Review. *Eur Urol Oncol*, 7, 44-52.
- CUMBERBATCH, M. G. K., JUBBER, I., BLACK, P. C., ESPERTO, F., FIGUEROA, J. D., KAMAT, A. M., KIEMENEY, L., LOTAN, Y., PANG, K., SILVERMAN, D. T., ZNAOR, A. & CATTO, J. W. F. 2018. Epidemiology of Bladder Cancer: A Systematic Review and Contemporary Update of Risk Factors in 2018. *Eur Urol*, 74, 784-795.
- DAVARPANA, N. N., YUNO, A., TREPEL, J. B. & APOLO, A. B. 2017. Immunotherapy: a new treatment paradigm in bladder cancer. *Curr Opin Oncol*.
- DE BONO, J. S., SCHER, H. I., MONTGOMERY, R. B., PARKER, C., MILLER, M. C., TISSING, H., DOYLE, G. V., TERSTAPPEN, L. W., PIENTA, K. J. & RAGHAVAN, D. 2008. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 14, 6302-9.
- DENG, J., LI, J., SARDE, A., LINES, J. L., LEE, Y. C., QIAN, D. C., PECHENICK, D. A., MANIVANH, R., LE MERCIER, I., LOWREY, C. H., VARN, F. S., CHENG, C., LEIB, D. A., NOELLE, R. J. & MABAERA, R. 2019. Hypoxia-Induced VISTA Promotes the Suppressive Function of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Cancer Immunol Res*, 7, 1079–1090.

- DIAMANTOPOULOU, Z., CASTRO-GINER, F., SCHWAB, F. D., FOERSTER, C., SAINI, M., BUDINJAS, S., STRITTMATTER, K., KROL, I., SEIFERT, B., HEINZELMANN-SCHWARZ, V., KURZEDER, C., ROCHLITZ, C., VETTER, M., WEBER, W. P. & ACETO, N. 2022. The metastatic spread of breast cancer accelerates during sleep. *Nature*, 607, 156-162.
- DOBRUCH, J., DANESHMAND, S., FISCH, M., LOTAN, Y., NOON, A. P., RESNICK, M. J., SHARIAT, S. F., ZLOTTA, A. R. & BOORJIAN, S. A. 2016. Gender and Bladder Cancer: A Collaborative Review of Etiology, Biology, and Outcomes. *Eur Urol*, 69, 300-10.
- DONIN, N. M., LENIS, A. T., HOLDEN, S., DRAKAKI, A., PANTUCK, A., BELLDEGRUN, A. & CHAMIE, K. 2017. Immunotherapy for the Treatment of Urothelial Carcinoma. *J Urol*, 197, 14-22.
- EBRIGHT, R. Y., LEE, S., WITTNER, B. S., NIEDERHOFFER, K. L., NICHOLSON, B. T., BARDIA, A., TRUESDELL, S., WILEY, D. F., WESLEY, B., LI, S., MAI, A., ACETO, N., VINCENT-JORDAN, N., SZABOLCS, A., CHIRN, B., KREUZER, J., COMAILLS, V., KALINICH, M., HAAS, W., TING, D. T., TONER, M., VASUDEVAN, S., HABER, D. A., MAHESWARAN, S. & MICALIZZI, D. S. 2020. Deregulation of ribosomal protein expression and translation promotes breast cancer metastasis. *Science*, 367, 1468–1473.
- EDD, J. F., MISHRA, A., SMITH, K. C., KAPUR, R., MAHESWARAN, S., HABER, D. A. & TONER, M. 2022. Isolation of circulating tumor cells. *iScience*, 25, 104696.
- EDWARDS, J., TASKER, A., PIRES DA SILVA, I., QUEK, C., BATTEN, M., FERGUSON, A., ALLEN, R., ALLANSON, B., SAW, R. P. M., THOMPSON, J. F., MENZIES, A. M., PALENDIRA, U., WILMOTT, J. S., LONG, G. V. & SCOLYER, R. A. 2019. Prevalence and Cellular Distribution of Novel Immune Checkpoint Targets Across Longitudinal Specimens in Treatment-naïve Melanoma Patients: Implications for Clinical Trials. *Clin Cancer Res*, 25, 3247–3258.
- EGGERMONT, A. M., CHIARION-SILENI, V., GROB, J. J., DUMMER, R., WOLCHOK, J. D., SCHMIDT, H., HAMID, O., ROBERT, C., ASCIERTO, P. A., RICHARDS, J. M., LEBBE, C., FERRARESI, V., SMYLLIE, M., WEBER, J. S., MAIO, M., BASTHOLT, L., MORTIER, L., THOMAS, L., TAHIR, S., HAUSCHILD, A., HASSEL, J. C., HODI, F. S., TAITT, C., DE PRIL, V., DE SCHAETZEN, G., SUCIU, S. & TESTORI, A. 2016. Prolonged Survival in Stage III Melanoma with Ipilimumab Adjuvant Therapy. *N Engl J Med*, 375, 1845–1855.
- ELTANBOULY, M. A., SCHAAFSMA, E., NOELLE, R. J. & LINES, J. L. 2020a. VISTA: Coming of age as a multi-lineage immune checkpoint. *Clin Exp Immunol*.

- ELTANBOULY, M. A., ZHAO, Y., NOWAK, E., LI, J., SCHAAFSMA, E., LE MERCIER, I., CEERAZ, S., LINES, J. L., PENG, C., CARRIERE, C., HUANG, X., DAY, M., KOEHN, B., LEE, S. W., SILVA MORALES, M., HOGQUIST, K. A., JAMESON, S. C., MUELLER, D., ROTHSTEIN, J., BLAZAR, B. R., CHENG, C. & NOELLE, R. J. 2020b. VISTA is a checkpoint regulator for naive T cell quiescence and peripheral tolerance. *Science*, 367.
- ERBEN, P., HARTMANN, A. & BOLENZ, C. 2015. [Molecular Characterisation of Urothelial Bladder Cancer: Will it Improve Patient Care?]. *Aktuelle Urol*, 46, 227-35.
- FAIENA, I., ROSSER, C. J., CHAMIE, K. & FURUYA, H. 2019. Diagnostic biomarkers in non-muscle invasive bladder cancer. *World J Urol*, 37, 2009–2016.
- FAIVRE-FINN, C., VICENTE, D., KURATA, T., PLANCHARD, D., PAZ-ARES, L., VANSTEENKISTE, J. F., SPIGEL, D. R., GARASSINO, M. C., RECK, M., SENAN, S., NAIDOO, J., RIMNER, A., WU, Y. L., GRAY, J. E., OZGUROGLU, M., LEE, K. H., CHO, B. C., KATO, T., DE WIT, M., NEWTON, M., WANG, L., THIYAGARAJAH, P. & ANTONIA, S. J. 2021. Four-Year Survival With Durvalumab After Chemoradiotherapy in Stage III NSCLC-an Update From the PACIFIC Trial. *J Thorac Oncol*, 16, 860-867.
- FALTAS, B., GOLDENBERG, D. M., OCEAN, A. J., GOVINDAN, S. V., WILHELM, F., SHARKEY, R. M., HAJDENBERG, J., HODES, G., NANUS, D. M. & TAGAWA, S. T. 2016. Sacituzumab Govitecan, a Novel Antibody--Drug Conjugate, in Patients With Metastatic Platinum-Resistant Urothelial Carcinoma. *Clin Genitourin Cancer*, 14, e75-9.
- FANG, W., ZHANG, J., HONG, S., ZHAN, J., CHEN, N., QIN, T., TANG, Y., ZHANG, Y., KANG, S., ZHOU, T., WU, X., LIANG, W., HU, Z., MA, Y., ZHAO, Y., TIAN, Y., YANG, Y., XUE, C., YAN, Y., HOU, X., HUANG, P., HUANG, Y., ZHAO, H. & ZHANG, L. 2014. EBV-driven LMP1 and IFN-gamma up-regulate PD-L1 in nasopharyngeal carcinoma: Implications for oncotargeted therapy. *Oncotarget*, 5, 12189-202.
- FDA, F. A. D. A. 2004. Medical devices; immunology and microbiology devices; classification of the immunomagnetic circulating cancer cell selection and enumeration system. Final rule. *Fed Regist*, 69, 26036-8.
- FDA, F. A. D. A. 2021. *FDA Grants Accelerated Approval to Sacituzumab Govitecan for Advanced Urothelial Cancer* [Online]. Available: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-grants-accelerated-approval-sacituzumab-govitecan-advanced-urothelial-cancer> [Accessed 02.02.2025].
- FDA, F. A. D. A. 2022. *Medical device* [Online]. Available: https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf20/DEN200062.pdf [Accessed 11.05.2025].

- FEHM, T., MUELLER, V., BANYSPALUCHOWSKI, M., FASCHING, P. A., FRIEDL, T. W. P., HARTKOPF, A., HUOBER, J., LOEHLBERG, C., RACK, B., RIETHDORF, S., SCHNEEWEISS, A., WALLWIENER, D., MEIERSTIEGEN, F., KRAWCZYK, N., JAEGER, B., REINHARDT, F., HOFFMANN, O., MUELLER, L., WIMBERGER, P., RUCKHAEBERLE, E., BLOHMER, J. U., CIESLIK, J. P., FRANKEN, A., NIEDERACHER, D., NEUBAUER, H., PANTEL, K., JANNI, W. & GROUP, D. S. 2024. Efficacy of Lapatinib in Patients with HER2-Negative Metastatic Breast Cancer and HER2-Positive Circulating Tumor Cells-The DETECT III Clinical Trial. *Clin Chem*, 70, 307-318.
- FELIP, E., ALTORKI, N., ZHOU, C., CSOSZI, T., VYNNYCHENKO, I., GOLOBORODKO, O., LUFT, A., AKOPOV, A., MARTINEZ-MARTI, A., KENMOTSU, H., CHEN, Y. M., CHELLA, A., SUGAWARA, S., VOONG, D., WU, F., YI, J., DENG, Y., MCCLELAND, M., BENNETT, E., GITLITZ, B., WAKELEE, H. & INVESTIGATORS, I. M. 2021. Adjuvant atezolizumab after adjuvant chemotherapy in resected stage IB-IIIA non-small-cell lung cancer (IMpower010): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet*, 398, 1344–1357.
- FERREIRA, M. M., RAMANI, V. C. & JEFFREY, S. S. 2016. Circulating tumor cell technologies. *Mol Oncol*, 10, 374-94.
- FIGUEROA, J. D., MIDDLEBROOKS, C. D., BANDAY, A. R., YE, Y., GARCIA-CLOSAS, M., CHATTERJEE, N., KOUTROS, S., KIEMENEY, L. A., RAFNAR, T., BISHOP, T., FURBERG, H., MATULLO, G., GOLKA, K., GAGO-DOMINGUEZ, M., TAYLOR, J. A., FLETCHER, T., SIDDIQ, A., CORTESSIS, V. K., KOOPERBERG, C., CUSSENOT, O., BENHAMOU, S., PRESCOTT, J., PORRU, S., DINNEY, C. P., MALATS, N., BARIS, D., PURDUE, M. P., JACOBS, E. J., ALBANES, D., WANG, Z., CHUNG, C. C., VERMEULEN, S. H., ABEN, K. K., GALESLOOT, T. E., THORLEIFSSON, G., SULEM, P., STEFANSSON, K., KILTIE, A. E., HARLAND, M., TEO, M., OFFIT, K., VIJAI, J., BAJORIN, D., KOPP, R., FIORITO, G., GUARRERA, S., SACERDOTE, C., SELINSKI, S., HENGSTLER, J. G., GERULLIS, H., OVSIANNIKOV, D., BLASZKEWICZ, M., CASTELAO, J. E., CALAZA, M., MARTINEZ, M. E., CORDEIRO, P., XU, Z., PANDURI, V., KUMAR, R., GURZAU, E., KOPPOVA, K., BUENO-DE-MESQUITA, H. B., LJUNGBERG, B., CLAVEL-CHAPELON, F., WEIDERPASS, E., KROGH, V., DORRONSORO, M., TRAVIS, R. C., TJONNELAND, A., BRENNAN, P., CHANG-CLAUDE, J., RIBOLI, E., CONTI, D., STERN, M. C., PIKE, M. C., VAN DEN BERG, D., YUAN, J. M., HOHENSEE, C., JEPPSON, R. P., CANCEL-TASSIN, G., ROUPRET, M., COMPERAT, E., TURMAN, C., DE VIVO, I., GIOVANNUCCI, E., HUNTER, D. J., KRAFT, P., LINDSTROM, S., CARTA, A., PAVANELLO, S., ARICI, C., MASTRANGELO, G., KAMAT, A. M., ZHANG, L., GONG, Y., PU, X., HUTCHINSON, A., BURDETT, L., WHEELER, W. A., KARAGAS, M. R., et al. 2016. Identification of a novel susceptibility locus at 13q34 and refinement of the 20p12.2 region as a multi-signal locus associated with bladder cancer risk in individuals of European ancestry. *Hum Mol Genet*, 25, 1203-14.

- FLIES, D. B., HAN, X., HIGUCHI, T., ZHENG, L., SUN, J., YE, J. J. & CHEN, L. 2014. Coinhibitory receptor PD-1H preferentially suppresses CD4(+) T cell-mediated immunity. *J Clin Invest*, 124, 1966-75.
- FLIES, D. B., HIGUCHI, T. & CHEN, L. 2015. Mechanistic Assessment of PD-1H Coinhibitory Receptor-Induced T Cell Tolerance to Allogeneic Antigens. *J Immunol*, 194, 5294-304.
- FLIES, D. B., WANG, S., XU, H. & CHEN, L. 2011. Cutting edge: A monoclonal antibody specific for the programmed death-1 homolog prevents graft-versus-host disease in mouse models. *J Immunol*, 187, 1537-41.
- FONTES, M. S., VARGAS PIVATO DE ALMEIDA, D., CAVALIN, C. & TAGAWA, S. T. 2022. Targeted Therapy for Locally Advanced or Metastatic Urothelial Cancer (mUC): Therapeutic Potential of Sacituzumab Govitecan. *Oncotargets Ther*, 15, 1531–1542.
- FREEMAN, G. J., LONG, A. J., IWAI, Y., BOURQUE, K., CHERNOVA, T., NISHIMURA, H., FITZ, L. J., MALENKOVICH, N., OKAZAKI, T., BYRNE, M. C., HORTON, H. F., FOUSER, L., CARTER, L., LING, V., BOWMAN, M. R., CARRENO, B. M., COLLINS, M., WOOD, C. R. & HONJO, T. 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*, 192, 1027-34.
- FU, J., LI, S., MA, H., YANG, J., PAGNOTTI, G. M., BROWN, L. M., WEISS, S. J., MAPARA, M. Y. & LENTZSCH, S. 2023. The checkpoint inhibitor PD-1H/VISTA controls osteoclast-mediated multiple myeloma bone disease. *Nat Commun*, 14, 4271.
- FUCHS, E. 2020. *Struktur, Expression und Funktion des Immun-Checkpoint-Proteins VISTA (V domain immunoglobulin suppressor of T cell activation)*. Studienarbeit
- GALSKY, M. D., WITJES, J. A., GSCHWEND, J. E., MILOWSKY, M. I., SCHENKER, M., VALDERRAMA, B. P., TOMITA, Y., BAMIAS, A., LEBRET, T., SHARIAT, S. F., PARK, S. H., AGERBAEK, M., JHA, G., STENNER, F., YE, D., GIUDICI, F., DUTTA, S., ASKELSON, M., NASROULAH, F., ZHANG, J., BROPHY, L. & BAJORIN, D. F. 2025. Adjuvant Nivolumab in High-Risk Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma: Expanded Efficacy From CheckMate 274. *J Clin Oncol*, 43, 15-21.
- GAO, J., AKSOY, B. A., DOGRUSOZ, U., DRESDNER, G., GROSS, B., SUMER, S. O., SUN, Y., JACOBSEN, A., SINHA, R., LARSSON, E., CERAMI, E., SANDER, C. & SCHULTZ, N. 2013. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal*, 6, pl1.

- GAO, J., WARD, J. F., PETTAWAY, C. A., SHI, L. Z., SUBUDHI, S. K., VENCE, L. M., ZHAO, H., CHEN, J., CHEN, H., EFSTATHIOU, E., TRONCOSO, P., ALLISON, J. P., LOGOTHETIS, C. J., WISTUBA, II, SEPULVEDA, M. A., SUN, J., WARGO, J., BLANDO, J. & SHARMA, P. 2017. VISTA is an inhibitory immune checkpoint that is increased after ipilimumab therapy in patients with prostate cancer. *Nat Med*, 23, 551-555.
- GAO, Y., HE, Y., TANG, Y., CHEN, Z. S. & QU, M. 2024. VISTA: A Novel Checkpoint for Cancer Immunotherapy. *Drug Discov Today*, 29, 104045.
- GARCIA-DIAZ, A., SHIN, D. S., MORENO, B. H., SACO, J., ESCUIN-ORDINAS, H., RODRIGUEZ, G. A., ZARETSKY, J. M., SUN, L., HUGO, W., WANG, X., PARISI, G., SAUS, C. P., TORREJON, D. Y., GRAEBER, T. G., COMIN-ANDUIX, B., HU-LIESKOVAN, S., DAMOISEAUX, R., LO, R. S. & RIBAS, A. 2017. Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep*, 19, 1189–1201.
- GAZZANIGA, P., DE BERARDINIS, E., RAIMONDI, C., GRADILONE, A., Busetto, G. M., DE FALCO, E., NICOLAZZO, C., GIOVANNONE, R., GENTILE, V., CORTESI, E. & PANTEL, K. 2014. Circulating tumor cells detection has independent prognostic impact in high-risk non-muscle invasive bladder cancer. *Int J Cancer*, 135, 1978-82.
- GAZZANIGA, P., GIANNI, W., RAIMONDI, C., GRADILONE, A., LO RUSSO, G., LONGO, F., GANDINI, O., TOMAO, S. & FRATI, L. 2013. Circulating tumor cells in high-risk nonmetastatic colorectal cancer. *Tumour Biol*, 34, 2507-9.
- GAZZANIGA, P., GRADILONE, A., DE BERARDINIS, E., Busetto, G. M., RAIMONDI, C., GANDINI, O., NICOLAZZO, C., PETRACCA, A., VINCENZI, B., FARCOMENI, A., GENTILE, V., CORTESI, E. & FRATI, L. 2012. Prognostic value of circulating tumor cells in nonmuscle invasive bladder cancer: a CellSearch analysis. *Ann Oncol*, 23, 2352–2356.
- GHALI, F., VAKAR-LOPEZ, F., ROUDIER, M. P., GARCIA, J., ARORA, S., CHENG, H. H., SCHWEIZER, M. T., HAFFNER, M. C., LEE, J. K., YU, E. Y., GRIVAS, P., MONTGOMERY, B., HSIEH, A. C., WRIGHT, J. L. & LAM, H. M. 2023. Metastatic Bladder Cancer Expression and Subcellular Localization of Nectin-4 and Trop-2 in Variant Histology: A Rapid Autopsy Study. *Clin Genitourin Cancer*, 21, 669-678.
- GIRES, O., PAN, M., SCHINKE, H., CANIS, M. & BAEUERLE, P. A. 2020. Expression and function of epithelial cell adhesion molecule EpCAM: where are we after 40 years? *Cancer Metastasis Rev*, 39, 969-987.
- GIULIANO, M., GIORDANO, A., JACKSON, S., HESS, K. R., DE GIORGI, U., MEGO, M., HANDY, B. C., UENO, N. T., ALVAREZ, R. H., DE LAURENTIIS, M., DE PLACIDO, S., VALERO, V., HORTOBAGYI, G. N., REUBEN, J. M. & CRISTOFANILLI, M. 2011. Circulating tumor cells as prognostic and predictive markers in metastatic breast cancer patients receiving first-line systemic treatment. *Breast Cancer Res*, 13, R67.

- GOLDENBERG, D. M., CARDILLO, T. M., GOVINDAN, S. V., ROSSI, E. A. & SHARKEY, R. M. 2015. Trop-2 is a novel target for solid cancer therapy with sacituzumab govitecan (IMMU-132), an antibody-drug conjugate (ADC). *Oncotarget*, 6, 22496-512.
- GOLDENBERG, D. M. & SHARKEY, R. M. 2019. Antibody-drug conjugates targeting TROP-2 and incorporating SN-38: A case study of anti-TROP-2 sacituzumab govitecan. *MAbs*, 11, 987-995.
- GORGES, T. M., TINHOFFER, I., DROSCH, M., ROSE, L., ZOLLNER, T. M., KRAHN, T. & VON AHSEN, O. 2012. Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer*, 12, 178.
- GOUTAS, D., PALAMARIS, K., STOFAS, A., POLITAKIS, N., DESPOTIDI, A., GIANNOPOULOU, I., GOUTAS, N., VLACHODIMITROPOULOS, D., KAVANTZAS, N., LAZARIS, A. C. & GAKIOPOULOU, H. 2022. Immunohistochemical Study of Bladder Cancer Molecular Subtypes and Their Association with PD-L1 Expression. *Cancers (Basel)*, 15.
- GRASIC KUJAR, C., SILVESTER, J., MENCINGER, M., OVCHARICEK, T., CEMAZAR, M., MICESKA, S., MODIC, Z., KUJAR, A., JESENKO, T. & KLOBOVES PREVODNIK, V. 2023. Association of Circulating Tumor Cells, Megakaryocytes and a High Immune-Inflammatory Environment in Metastatic Breast Cancer. *Cancers (Basel)*, 15.
- GRAVITZ, L. 2013. Cancer immunotherapy. *Nature*, 504, S1.
- GRIVAS, P., POUESSEL, D., PARK, C. H., BARTHELEMY, P., BUPATHI, M., PETRYLAK, D. P., AGARWAL, N., GUPTA, S., FLECHON, A., RAMAMURTHY, C., DAVIS, N. B., RECIO-BOILES, A., STERNBERG, C. N., BHATIA, A., PICHARDO, C., SIERECKI, M., TONELLI, J., ZHOU, H., TAGAWA, S. T. & LORIOT, Y. 2024. Sacituzumab Govitecan in Combination With Pembrolizumab for Patients With Metastatic Urothelial Cancer That Progressed After Platinum-Based Chemotherapy: TROPY-U-01 Cohort 3. *J Clin Oncol*, 42, 1415–1425.
- GUO, H., VUILLE, J. A., WITTNER, B. S., LACHTARA, E. M., HOU, Y., LIN, M., ZHAO, T., RAMAN, A. T., RUSSELL, H. C., REEVES, B. A., PLESKOW, H. M., WU, C. L., GNIRKE, A., MEISSNER, A., EFSTATHIOU, J. A., LEE, R. J., TONER, M., ARYEE, M. J., LAWRENCE, M. S., MIYAMOTO, D. T., MAHESWARAN, S. & HABER, D. A. 2023. DNA hypomethylation silences anti-tumor immune genes in early prostate cancer and CTCs. *Cell*, 186, 2765–2782 e28.
- GUPTA, G. P. & MASSAGUE, J. 2006. Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, 127, 679-95.
- HABER, D. A. & VELCULESCU, V. E. 2014. Blood-based analyses of cancer: circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Cancer Discov*, 4, 650-61.

- HABLI, Z., ALCHAMAA, W., SAAB, R., KADARA, H. & KHRAICHE, M. L. 2020. Circulating Tumor Cell Detection Technologies and Clinical Utility: Challenges and Opportunities. *Cancers (Basel)*, 12.
- HANNA, K. S., LARSON, S., NGUYEN, J., BOUDREAU, J., BULIN, J. & ROLF, M. 2022. The role of enfortumab vedotin and sacituzumab govitecan in treatment of advanced bladder cancer. *Am J Health Syst Pharm*, 79, 629-635.
- HAO, S. J., WAN, Y., XIA, Y. Q., ZOU, X. & ZHENG, S. Y. 2018. Size-based separation methods of circulating tumor cells. *Adv Drug Deliv Rev*, 125, 3-20.
- HAYES, D. F., CRISTOFANILLI, M., BUDD, G. T., ELLIS, M. J., STOPECK, A., MILLER, M. C., MATERA, J., ALLARD, W. J., DOYLE, G. V. & TERSTAPPEN, L. W. 2006. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res*, 12, 4218-24.
- HIRAYAMA, A., TANAKA, K., TSUTSUMI, H., NAKANISHI, T., YAMASHITA, S., MIZUSAKI, S., ISHII, Y., OTA, K., YONESHIMA, Y., IWAMA, E. & OKAMOTO, I. 2023. Regulation of PD-L1 expression in non-small cell lung cancer by interleukin-1beta. *Front Immunol*, 14, 1192861.
- HOADLEY, K. A., YAU, C., HINOUE, T., WOLF, D. M., LAZAR, A. J., DRILL, E., SHEN, R., TAYLOR, A. M., CHERNIACK, A. D., THORSSON, V., AKBANI, R., BOWLBY, R., WONG, C. K., WIZNEROWICZ, M., SANCHEZ-VEGA, F., ROBERTSON, A. G., SCHNEIDER, B. G., LAWRENCE, M. S., NOUSHMEHR, H., MALTA, T. M., CANCER GENOME ATLAS, N., STUART, J. M., BENZ, C. C. & LAIRD, P. W. 2018. Cell-of-Origin Patterns Dominate the Molecular Classification of 10,000 Tumors from 33 Types of Cancer. *Cell*, 173, 291-304 e6.
- HODI, F. S., CHESNEY, J., PAVLICK, A. C., ROBERT, C., GROSSMANN, K. F., MCDERMOTT, D. F., LINETTE, G. P., MEYER, N., GIGUERE, J. K., AGARWALA, S. S., SHAHEEN, M., ERNSTOFF, M. S., MINOR, D. R., SALAMA, A. K., TAYLOR, M. H., OTT, P. A., HORAK, C., GAGNIER, P., JIANG, J., WOLCHOK, J. D. & POSTOW, M. A. 2016. Combined nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab alone in patients with advanced melanoma: 2-year overall survival outcomes in a multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*, 17, 1558–1568.
- HODI, F. S., MIHM, M. C., SOIFFER, R. J., HALUSKA, F. G., BUTLER, M., SEIDEN, M. V., DAVIS, T., HENRY-SPIRES, R., MACRAE, S., WILLMAN, A., PADERA, R., JAKLITSCH, M. T., SHANKAR, S., CHEN, T. C., KORMAN, A., ALLISON, J. P. & DRANOFF, G. 2003. Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 4712-7.

- HODI, F. S., O'DAY, S. J., MCDERMOTT, D. F., WEBER, R. W., SOSMAN, J. A., HAANEN, J. B., GONZALEZ, R., ROBERT, C., SCHADENDORF, D., HASSEL, J. C., AKERLEY, W., VAN DEN EERTWEGH, A. J., LUTZKY, J., LORIGAN, P., VAUBEL, J. M., LINETTE, G. P., HOGG, D., OTTENSMEIER, C. H., LEBBE, C., PESCHEL, C., QUIRT, I., CLARK, J. I., WOLCHOK, J. D., WEBER, J. S., TIAN, J., YELLIN, M. J., NICHOL, G. M., HOOS, A. & URBA, W. J. 2010. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 363, 711-23.
- HONG, X., ROH, W., SULLIVAN, R. J., WONG, K. H. K., WITTNER, B. S., GUO, H., DUBASH, T. D., SADE-FELDMAN, M., WESLEY, B., HORWITZ, E., BOLAND, G. M., MARVIN, D. L., BONESTEEL, T., LU, C., AGUET, F., BURR, R., FREEMAN, S. S., PARIDA, L., CALHOUN, K., JEWETT, M. K., NIEMAN, L. T., HACOEN, N., NAAR, A. M., TING, D. T., TONER, M., STOTT, S. L., GETZ, G., MAHESWARAN, S. & HABER, D. A. 2021. The Lipogenic Regulator SREBP2 Induces Transferrin in Circulating Melanoma Cells and Suppresses Ferroptosis. *Cancer Discov*, 11, 678-695.
- HONG, X., SULLIVAN, R. J., KALINICH, M., KWAN, T. T., GIOBBIE-HURDER, A., PAN, S., LICAUSI, J. A., MILNER, J. D., NIEMAN, L. T., WITTNER, B. S., HO, U., CHEN, T., KAPUR, R., LAWRENCE, D. P., FLAHERTY, K. T., SEQUIST, L. V., RAMASWAMY, S., MIYAMOTO, D. T., LAWRENCE, M., TONER, M., ISSELBACHER, K. J., MAHESWARAN, S. & HABER, D. A. 2018. Molecular signatures of circulating melanoma cells for monitoring early response to immune checkpoint therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115, 2467–2472.
- HOPTION CANN, S. A., VAN NETTEN, J. P. & VAN NETTEN, C. 2003. Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future. *Postgrad Med J*, 79, 672-80.
- HOU, H. W., LI, Q. S., LEE, G. Y., KUMAR, A. P., ONG, C. N. & LIM, C. T. 2009. Deformability study of breast cancer cells using microfluidics. *Biomed Microdevices*, 11, 557-64.
- HOU, Z., PAN, Y., FEI, Q., LIN, Y., ZHOU, Y., LIU, Y., GUAN, H., YU, X., LIN, X., LU, F. & HUANG, H. 2021. Prognostic significance and therapeutic potential of the immune checkpoint VISTA in pancreatic cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 147, 517-531.
- HU, C., XU, Z., CHEN, S., LV, H., WANG, Y., WANG, X., MO, S., SHI, C., WEI, S., HU, L., CHEN, W. & CHENG, X. 2020. Overexpression of B7H5/CD28H is associated with worse survival in human gastric cancer. *J Cell Mol Med*, 24, 1360–1369.
- HVICHIA, G. E., PARVEEN, Z., WAGNER, C., JANNING, M., QUIDDE, J., STEIN, A., MULLER, V., LOGES, S., NEVES, R. P., STOECKLEIN, N. H., WIKMAN, H., RIETHDORF, S., PANTEL, K. & GORGES, T. M. 2016. A novel microfluidic platform for size and deformability based separation and the subsequent molecular characterization of viable circulating tumor cells. *Int J Cancer*, 138, 2894-904.

- IMAI, Y., CHIBA, T., KONDO, T., KANZAKI, H., KANAYAMA, K., AO, J., KOJIMA, R., KUSAKABE, Y., NAKAMURA, M., SAITO, T., NAKAGAWA, R., SUZUKI, E., NAKAMOTO, S., MUROYAMA, R., TAWADA, A., MATSUMURA, T., NAKAGAWA, T., KATO, J., KOTANI, A., MATSUBARA, H. & KATO, N. 2020. Interferon-gamma induced PD-L1 expression and soluble PD-L1 production in gastric cancer. *Oncol Lett*, 20, 2161–2168.
- ISHIDA, Y., AGATA, Y., SHIBAHARA, K. & HONJO, T. 1992. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*, 11, 3887-95.
- IWAI, Y., TERAOKA, S. & HONJO, T. 2005. PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells. *Int Immunol*, 17, 133-44.
- JANNI, W. J., RACK, B., TERSTAPPEN, L. W., PIERGA, J. Y., TARAN, F. A., FEHM, T., HALL, C., DE GROOT, M. R., BIDARD, F. C., FRIEDL, T. W., FASCHING, P. A., BRUCKER, S. Y., PANTEL, K. & LUCCI, A. 2016. Pooled Analysis of the Prognostic Relevance of Circulating Tumor Cells in Primary Breast Cancer. *Clin Cancer Res*, 22, 2583-93.
- JANNING, M., KOBUS, F., BABAYAN, A., WIKMAN, H., VELTHAUS, J. L., BERGMANN, S., SCHATZ, S., FALK, M., BERGER, L. A., BOTTCHER, L. M., PASLER, S., GORGES, T. M., O'FLAHERTY, L., HILLE, C., JOOSSE, S. A., SIMON, R., TIEMANN, M., BOKEMEYER, C., RECK, M., RIETHDORF, S., PANTEL, K. & LOGES, S. 2019. Determination of PD-L1 Expression in Circulating Tumor Cells of NSCLC Patients and Correlation with Response to PD-1/PD-L1 Inhibitors. *Cancers (Basel)*, 11.
- JIN, D., QIAN, L., XIA, J., ZHANG, R., YANG, G., ZHANG, L., XUE, W., CAO, M., DONG, L. & CHEN, H. 2023. In vivo detection of circulating tumor cells predicts high-risk features in patients with bladder cancer. *Med Oncol*, 40, 113.
- JOHNSTON, R. J., SU, L. J., PINCKNEY, J., CRITTON, D., BOYER, E., KRISHNAKUMAR, A., CORBETT, M., RANKIN, A. L., DIBELLA, R., CAMPBELL, L., MARTIN, G. H., LEMAR, H., CAYTON, T., HUANG, R. Y., DENG, X., NAYEEM, A., CHEN, H., ERGEL, B., RIZZO, J. M., YAMNIUK, A. P., DUTTA, S., NGO, J., SHORTS, A. O., RAMAKRISHNAN, R., KOZHICH, A., HOLLOWAY, J., FANG, H., WANG, Y. K., YANG, Z., THIAM, K., RAKESTRAW, G., RAJPAL, A., SHEPPARD, P., QUIGLEY, M., BAHJAT, K. S. & KORMAN, A. J. 2019. VISTA is an acidic pH-selective ligand for PSGL-1. *Nature*, 574, 565-570.
- JOOSSE, S. A., GORGES, T. M. & PANTEL, K. 2015. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Mol Med*, 7, 1-11.

- JORDAN, N. V., BARDIA, A., WITTNER, B. S., BENES, C., LIGORIO, M., ZHENG, Y., YU, M., SUNDARESAN, T. K., LICAUSI, J. A., DESAI, R., O'KEEFE, R. M., EBRIGHT, R. Y., BOUKHALI, M., SIL, S., ONOZATO, M. L., IAFRATE, A. J., KAPUR, R., SGROI, D., TING, D. T., TONER, M., RAMASWAMY, S., HAAS, W., MAHESWARAN, S. & HABER, D. A. 2016. HER2 expression identifies dynamic functional states within circulating breast cancer cells. *Nature*, 537, 102-106.
- KAKAVAND, H., JACKETT, L. A., MENZIES, A. M., GIDE, T. N., CARLINO, M. S., SAW, R. P. M., THOMPSON, J. F., WILMOTT, J. S., LONG, G. V. & SCOLYER, R. A. 2017. Negative immune checkpoint regulation by VISTA: a mechanism of acquired resistance to anti-PD-1 therapy in metastatic melanoma patients. *Mod Pathol*, 30, 1666–1676.
- KALLURI, R. & WEINBERG, R. A. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 119, 1420-8.
- KANG, Y. & PANTEL, K. 2013. Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients. *Cancer Cell*, 23, 573-81.
- KASIMIR-BAUER, S., HOFFMANN, O., WALLWIENER, D., KIMMIG, R. & FEHM, T. 2012. Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in primary breast cancer patients with circulating tumor cells. *Breast Cancer Res*, 14, R15.
- KIM, B., LEE, C., KIM, Y. A. & MOON, K. C. 2020. PD-L1 Expression in Muscle-Invasive Urinary Bladder Urothelial Carcinoma According to Basal/Squamous-Like Phenotype. *Front Oncol*, 10, 527385.
- KOCH, C., JOOSSE, S. A., SCHNEEGANS, S., WILKEN, o. J. W., JANNING, M., LORETH, D., MULLER, V., PRIESKE, K., BANYS-PALUCHOWSKI, M., HORST, L. J., LOGES, S., PEINE, S., WIKMAN, H., GORGES, T. M. & PANTEL, K. 2020. Pre-Analytical and Analytical Variables of Label-Independent Enrichment and Automated Detection of Circulating Tumor Cells in Cancer Patients. *Cancers (Basel)*, 12.
- KONDO, Y., OHNO, T., NISHII, N., HARADA, K., YAGITA, H. & AZUMA, M. 2016. Differential contribution of three immune checkpoint (VISTA, CTLA-4, PD-1) pathways to antitumor responses against squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 57, 54-60.
- KOO, S. H., KWON, K. C., IHM, C. H., JEON, Y. M., PARK, J. W. & SUL, C. K. 1999. Detection of genetic alterations in bladder tumors by comparative genomic hybridization and cytogenetic analysis. *Cancer Genet Cytogenet*, 110, 87-93.

- KRAAN, J., SLEIJFER, S., STRIJBOS, M. H., IGNATIADIS, M., PEETERS, D., PIERGA, J. Y., FARACE, F., RIETHDORF, S., FEHM, T., ZORZINO, L., TIBBE, A. G., MAESTRO, M., GISBERT-CRIADO, R., DENTON, G., DE BONO, J. S., DIVE, C., FOEKENS, J. A. & GRATAMA, J. W. 2011. External quality assurance of circulating tumor cell enumeration using the CellSearch((R)) system: a feasibility study. *Cytometry B Clin Cytom*, 80, 112-8.
- KREBS, M. G., SLOANE, R., PRIEST, L., LANCASHIRE, L., HOU, J. M., GREYSTOKE, A., WARD, T. H., FERRALDESCHI, R., HUGHES, A., CLACK, G., RANSON, M., DIVE, C. & BLACKHALL, F. H. 2011. Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 29, 1556-63.
- KUKLINSKI, L. F., YAN, S., LI, Z., FISHER, J. L., CHENG, C., NOELLE, R. J., ANGELES, C. V., TURK, M. J. & ERNSTOFF, M. S. 2018. VISTA expression on tumor-infiltrating inflammatory cells in primary cutaneous melanoma correlates with poor disease-specific survival. *Cancer Immunol Immunother*, 67, 1113–1121.
- KWON, E. D., HURWITZ, A. A., FOSTER, B. A., MADIAS, C., FELDHAUS, A. L., GREENBERG, N. M., BURG, M. B. & ALLISON, J. P. 1997. Manipulation of T cell costimulatory and inhibitory signals for immunotherapy of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 8099-103.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LAWRENCE, R., WATTERS, M., DAVIES, C. R., PANTEL, K. & LU, Y. J. 2023. Circulating tumour cells for early detection of clinically relevant cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 20, 487-500.
- LE MERCIER, I., CHEN, W., LINES, J. L., DAY, M., LI, J., SERGENT, P., NOELLE, R. J. & WANG, L. 2014. VISTA Regulates the Development of Protective Antitumor Immunity. *Cancer Res*, 74, 1933-44.
- LE MERCIER, I., LINES, J. L. & NOELLE, R. J. 2015. Beyond CTLA-4 and PD-1, the Generation Z of Negative Checkpoint Regulators. *Front Immunol*, 6, 418.
- LEACH, D. R., KRUMMEL, M. F. & ALLISON, J. P. 1996. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*, 271, 1734-6.
- LEE, H. J., JUNG, Y. H., CHOI, G. E., KIM, J. S., CHAE, C. W. & HAN, H. J. 2019. Role of HIF1alpha Regulatory Factors in Stem Cells. *Int J Stem Cells*, 12, 8-20.
- LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE, D. K., DEUTSCHE KREBSHILFE, AWMF. 2020. *Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms, Langversion 3.3, 2020* [Online]. Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF. Available: <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/melanom/> [Accessed 07.10.2023].

- LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE, D. K., DEUTSCHE KREBSHILFE, AWMF. 2021. *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms* [Online]. Deutschland: AWMF, Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe. Available: https://register.awmf.org/assets/guidelines/032-045OLI_S3_Mammakarzinom_2021-07.pdf [Accessed 08.03.2025].
- LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE, D. K., DEUTSCHE KREBSHILFE, AWMF. 2022. *Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms, Langversion 2.1, 2022* [Online]. Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF. Available: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/lungenkarzinom/> [Accessed 07.10.2023].
- LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE, D. K., DEUTSCHE KREBSHILFE, AWMF. 2025. *S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms* [Online]. Berlin: AWMF. Available: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/harnblasenkarzinom/> [Accessed 06.04.2025].
- LEWERICH, J., SCHMID, S. C., GSCHWEND, J. E. & RETZ, M. 2023. [Value of immunotherapy in the perioperative treatment of localized muscle invasive bladder cancer]. *Urologie*, 62, 279-287.
- LI, K. & TIAN, H. 2019. Development of small-molecule immune checkpoint inhibitors of PD-1/PD-L1 as a new therapeutic strategy for tumour immunotherapy. *J Drug Target*, 27, 244-256.
- LI, N., XU, W., YUAN, Y., AYITHAN, N., IMAI, Y., WU, X., MILLER, H., OLSON, M., FENG, Y., HUANG, Y. H., JO TURK, M., HWANG, S. T., MALARKANNAN, S. & WANG, L. 2017. Immune-checkpoint protein VISTA critically regulates the IL-23/IL-17 inflammatory axis. *Sci Rep*, 7, 1485.
- LI, N., XU, W., YUAN, Y., AYITHAN, N., IMAI, Y., WU, X., MILLER, H., OLSON, M., FENG, Y., HUANG, Y. H., JO TURK, M., HWANG, S. T., MALARKANNAN, S. & WANG, L. 2018. Author Correction: Immune-checkpoint protein VISTA critically regulates the IL-23/IL-17 inflammatory axis. *Sci Rep*, 8, 4054.
- LI, N., YANG, S., REN, Y., TAI, R., LIU, H., WANG, Y., LI, J., WANG, F., XING, J., ZHANG, Y., ZHU, X., XU, S., HOU, X. & WANG, G. 2023a. Chemotherapy induces immune checkpoint VISTA expression in tumor cells via HIF-2alpha. *Biochem Pharmacol*, 210, 115492.
- LI, W., LIU, Z., JIN, K., SHAO, F., ZENG, H., WANG, Y., ZHU, Y., XU, L., WANG, Z., CHANG, Y. & ZHANG, W. 2023b. Immune inactivation by VISTA predicts clinical outcome and therapeutic benefit in muscle-invasive bladder cancer. *BMC Cancer*, 23, 661.
- LIAO, H., ZHU, H., LIU, S. & WANG, H. 2018. Expression of V-domain immunoglobulin suppressor of T cell activation is associated with the advanced stage and presence of lymph node metastasis in ovarian cancer. *Oncol Lett*, 16, 3465–3472.

- LINDSAY, C. R., FAUGEROUX, V., MICHIELS, S., PAILLER, E., FACCHINETTI, F., OU, D., BLUTHGEN, M. V., PANNET, C., NGO-CAMUS, M., BESCHER, G., CAMELLA, C., BILLIOT, F., REMON, J., PLANCHARD, D., SORIA, J. C., BESSE, B. & FARACE, F. 2017. A prospective examination of circulating tumor cell profiles in non-small-cell lung cancer molecular subgroups. *Ann Oncol*, 28, 1523–1531.
- LINES, J. L., PANTAZI, E., MAK, J., SEMPERE, L. F., WANG, L., O'CONNELL, S., CEERAZ, S., SURIAWINATA, A. A., YAN, S., ERNSTOFF, M. S. & NOELLE, R. 2014a. VISTA is an immune checkpoint molecule for human T cells. *Cancer Res*, 74, 1924-32.
- LINES, J. L., SEMPERE, L. F., BROUGHTON, T., WANG, L. & NOELLE, R. 2014b. VISTA is a novel broad-spectrum negative checkpoint regulator for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Res*, 2, 510-7.
- LIU, J., YUAN, Y., CHEN, W., PUTRA, J., SURIAWINATA, A. A., SCHENK, A. D., MILLER, H. E., GULERIA, I., BARTH, R. J., HUANG, Y. H. & WANG, L. 2015. Immune-checkpoint proteins VISTA and PD-1 nonredundantly regulate murine T-cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 6682-7.
- LIU, M. C., OXNARD, G. R., KLEIN, E. A., SWANTON, C., SEIDEN, M. V. & CONSORTIUM, C. 2020. Sensitive and specific multi-cancer detection and localization using methylation signatures in cell-free DNA. *Ann Oncol*, 31, 745-759.
- LOESER, H., KRAEMER, M., GEBAUER, F., BRUNS, C., SCHRODER, W., ZANDER, T., PERSA, O. D., ALAKUS, H., HOELSCHER, A., BUETTNER, R., LOHNEIS, P. & QUAAS, A. 2019. The expression of the immune checkpoint regulator VISTA correlates with improved overall survival in pT1/2 tumor stages in esophageal adenocarcinoma. *Oncoimmunology*, 8, e1581546.
- LONG, L., ZHANG, L., YANG, Y., ZHOU, Y. & CHEN, H. 2022. Different clinical significance of novel B7 family checkpoints VISTA and HHLA2 in human lung adenocarcinoma. *Immunotherapy*, 14, 419-431.
- LOUKILI, N., VANDENBERGHE, I., DELFOUR, O., FRABOUL, F., CHETAILLE, E., CRUZALEGUI, F., CORVAIA, N. & FERRÉ, P. J. 2019. Abstract 2400: K01401-020 is a novel anti-VISTA antibody for cancer treatment: Pharmacodynamic impact on non-human primates and human immune system. *Cancer Research*, 79, 2400–2400.
- MA, S., QIN, L., WANG, X., WANG, W., LI, J., WANG, H., LI, H., CAI, X., YANG, Y. & QU, M. 2022. The expression of VISTA on CD4+ T cells associate with poor prognosis and immune status in non-small cell lung cancer patients. *Bosn J Basic Med Sci*, 22, 707-715.
- MA, Y. C., WANG, L. & YU, F. L. 2013. Recent advances and prospects in the isolation by size of epithelial tumor cells (ISET) methodology. *Technol Cancer Res Treat*, 12, 295-309.

- MAAS, M., TODENHOFER, T. & BLACK, P. C. 2023. Urine biomarkers in bladder cancer - current status and future perspectives. *Nat Rev Urol*, 20, 597-614.
- MAERTENS, Y., HUMBERG, V., ERLMEIER, F., STEFFENS, S., STEINESTEL, J., BOGEMANN, M., SCHRADER, A. J. & BERNEMANN, C. 2017. Comparison of isolation platforms for detection of circulating renal cell carcinoma cells. *Oncotarget*, 8, 87710-87717.
- MANDAI, M., HAMANISHI, J., ABIKO, K., MATSUMURA, N., BABA, T. & KONISHI, I. 2016. Dual Faces of IFN γ in Cancer Progression: A Role of PD-L1 Induction in the Determination of Pro- and Antitumor Immunity. *Clin Cancer Res*, 22, 2329-34.
- MANSKI, D. 2020a. 4.9 Immuntherapie von Tumoren. In: MANSKI, D. (ed.) *Urologielehrbuch.de*. Stadtbergen: Manski, Dirk.pp. 210-213.
- MANSKI, D. 2020b. 7.7 Harnblasenkarzinom. In: MANSKI, D. (ed.) *Urologielehrbuch.de*. Stadtbergen: Manski, Dirk.pp. 401-416.
- MAXIMIANO, S., MAGALHAES, P., GUERREIRO, M. P. & MORGADO, M. 2016. Trastuzumab in the Treatment of Breast Cancer. *BioDrugs*, 30, 75-86.
- MCCONKEY, D. J., CHOI, W., SHEN, Y., LEE, I. L., PORTEN, S., MATIN, S. F., KAMAT, A. M., CORN, P., MILLIKAN, R. E., DINNEY, C., CZERNIAK, B. & SIEFKER-RADTKE, A. O. 2016. A Prognostic Gene Expression Signature in the Molecular Classification of Chemotherapy-naïve Urothelial Cancer is Predictive of Clinical Outcomes from Neoadjuvant Chemotherapy: A Phase 2 Trial of Dose-dense Methotrexate, Vinblastine, Doxorubicin, and Cisplatin with Bevacizumab in Urothelial Cancer. *Eur Urol*, 69, 855-62.
- MCGREGOR, B. A., SONPAVDE, G. P., KWAK, L., REGAN, M. M., GAO, X., HVIDSTEN, H., MANTIA, C. M., WEI, X. X., BERCHUCK, J. E., BERG, S. A., RAVI, P. K., MICHAELSON, M. D., CHOUEIRI, T. K. & BELLMUNT, J. 2024. The Double Antibody Drug Conjugate (DAD) phase I trial: sacituzumab govitecan plus enfortumab vedotin for metastatic urothelial carcinoma. *Ann Oncol*, 35, 91-97.
- MEHTA, N., MADDINENI, S., MATHEWS, II, ANDRES PARRA SPERBERG, R., HUANG, P. S. & COCHRAN, J. R. 2019. Structure and Functional Binding Epitope of V-domain Ig Suppressor of T Cell Activation. *Cell Rep*, 28, 2509–2516 e5.
- MILLER, M. C., ROBINSON, P. S., WAGNER, C. & O'SHANNESY, D. J. 2018. The Parsortix Cell Separation System-A versatile liquid biopsy platform. *Cytometry A*, 93, 1234–1239.
- MIMURA, K., TEH, J. L., OKAYAMA, H., SHIRAISHI, K., KUA, L. F., KOH, V., SMOOT, D. T., ASHKTORAB, H., OIKE, T., SUZUKI, Y., FAZREEN, Z., ASUNCION, B. R., SHABBIR, A., YONG, W. P., SO, J., SOONG, R. & KONO, K. 2018. PD-L1 expression is mainly regulated by interferon gamma associated with JAK-STAT pathway in gastric cancer. *Cancer Sci*, 109, 43-53.

- MO, J., DENG, L., PENG, K., OUYANG, S., DING, W., LOU, L., LIN, Z., ZHU, J., LI, J., ZHANG, Q., WANG, P., WEN, Y., CHEN, X., YUE, P., LU, J. J., ZHU, K., ZHENG, Y., WANG, Y. & ZHANG, X. 2023. Targeting STAT3-VISTA axis to suppress tumor aggression and burden in acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol*, 16, 15.
- MORELLI, M. B., AMANTINI, C., ROSSI DE VERMANDOIS, J. A., GUBBIOTTI, M., GIANNANTONI, A., MEARINI, E., MAGGI, F., NABISSI, M., MARINELLI, O., SANTONI, M., CIMADAMORE, A., MONTIRONI, R. & SANTONI, G. 2021. Correlation between High PD-L1 and EMT/Invasive Genes Expression and Reduced Recurrence-Free Survival in Blood-Circulating Tumor Cells from Patients with Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cancers (Basel)*, 13.
- MULATI, K., HAMANISHI, J., MATSUMURA, N., CHAMOTO, K., MISE, N., ABIKO, K., BABA, T., YAMAGUCHI, K., HORIKAWA, N., MURAKAMI, R., TAKI, M., BUDIMAN, K., ZENG, X., HOSOE, Y., AZUMA, M., KONISHI, I. & MANDAI, M. 2019. VISTA expressed in tumour cells regulates T cell function. *Br J Cancer*, 120, 115-127.
- NAGRATH, S., SEQUIST, L. V., MAHESWARAN, S., BELL, D. W., IRIMIA, D., ULKUS, L., SMITH, M. R., KWAK, E. L., DIGUMARTHY, S., MUZIKANSKY, A., RYAN, P., BALIS, U. J., TOMPKINS, R. G., HABER, D. A. & TONER, M. 2007. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*, 450, 1235-9.
- NANOU, A., ZEUNE, L. L., BIDARD, F. C., PIERGA, J. Y. & TERSTAPPEN, L. 2020. HER2 expression on tumor-derived extracellular vesicles and circulating tumor cells in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res*, 22, 86.
- NASTALY, P., RUF, C., BECKER, P., BEDNARZ-KNOLL, N., STOUPIEC, M., KAVSUR, R., ISBARN, H., MATTHIES, C., WAGNER, W., HOPFNER, D., FISCH, M., BOKEMEYER, C., AHYAI, S., HONECKER, F., RIETHDORF, S. & PANTEL, K. 2014. Circulating tumor cells in patients with testicular germ cell tumors. *Clin Cancer Res*, 20, 3830-41.
- NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. 2020. *NCT04564417 - First-In-Human (FIH) Study of W0180 as Single Agent and in Combination With Pembrolizumab in Adults With Locally Advanced or Metastatic Solid Tumors* [Online]. Available: <https://clinicaltrials.gov/show/NCT04564417> [Accessed 11.04.2025].
- NECCHI, A., ANICHINI, A., RAGGI, D., BRIGANTI, A., MASSA, S., LUCIANO, R., COLECCHIA, M., GIANNATEMPO, P., MORTARINI, R., BIANCHI, M., FARE, E., MONOPOLI, F., COLOMBO, R., GALLINA, A., SALONIA, A., MESSINA, A., ALI, S. M., MADISON, R., ROSS, J. S., CHUNG, J. H., SALVIONI, R., MARIANI, L. & MONTORSI, F. 2018. 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. *J Clin Oncol*, 36, 3353–3360.

- NECCHI, A., RAGGI, D., GALLINA, A., MADISON, R., COLECCHIA, M., LUCIANO, R., MONTIRONI, R., GIANNATEMPO, P., FARE, E., PEDERZOLI, F., BANDINI, M., BIANCHI, M., COLOMBO, R., GANDAGLIA, G., FOSSATI, N., MARANDINO, L., CAPITANIO, U., DEHO, F., ALI, S. M., CHUNG, J. H., ROSS, J. S., SALONIA, A., BRIGANTI, A. & MONTORSI, F. 2020. Updated Results of PURE-01 with Preliminary Activity of Neoadjuvant Pembrolizumab in Patients with Muscle-invasive Bladder Carcinoma with Variant Histologies. *Eur Urol*, 77, 439-446.
- NG, K., STENZL, A., SHARMA, A. & VASDEV, N. 2021. Urinary biomarkers in bladder cancer: A review of the current landscape and future directions. *Urol Oncol*, 39, 41-51.
- NI, L. & DONG, C. 2017. New B7 Family Checkpoints in Human Cancers. *Mol Cancer Ther*, 16, 1203–1211.
- NIKANJAM, M., KATO, S. & KURZROCK, R. 2022. Liquid biopsy: current technology and clinical applications. *J Hematol Oncol*, 15, 131.
- NISHIMURA, H., NOSE, M., HIAI, H., MINATO, N. & HONJO, T. 1999. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*, 11, 141-51.
- NIU, Z., KOZMINSKY, M., DAY, K. C., BROSES, L. J., HENDERSON, M. L., PATSALIS, C., TAGETT, R., QIN, Z., BLUMBERG, S., REICHERT, Z. R., MERAJVER, S. D., UDAGER, A. M., PALMBOS, P. L., NAGRATH, S. & DAY, M. L. 2024. Characterization of circulating tumor cells in patients with metastatic bladder cancer utilizing functionalized microfluidics. *Neoplasia*, 57, 101036.
- NOBELPRIZE.ORG. 2018. *Pressemeldung* [Online]. Available: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2018/press-release/> [Accessed 07.10.2023].
- NOWAK, E. C., LINES, J. L., VARN, F. S., DENG, J., SARDE, A., MABAERA, R., KUTA, A., LE MERCIER, I., CHENG, C. & NOELLE, R. J. 2017. Immunoregulatory functions of VISTA. *Immunol Rev*, 276, 66-79.
- OBERMAYR, E., MARITSCHNEGG, E., AGREITER, C., PECHA, N., SPEISER, P., HELMY-BADER, S., DANZINGER, S., KRAINER, M., SINGER, C. & ZEILLINGER, R. 2018. Efficient leukocyte depletion by a novel microfluidic platform enables the molecular detection and characterization of circulating tumor cells. *Oncotarget*, 9, 812-823.
- OLIVEIRA, P., CARVALHO, J., ROCHA, S., AZEVEDO, M., REIS, I., CAMILO, V., SOUSA, B., VALENTE, S., PAREDES, J., ALMEIDA, R., HUNTSMAN, D. & OLIVEIRA, C. 2016. DIES1/VISTA expression loss is a recurrent event in gastric cancer due to epigenetic regulation. *Sci Rep*, 6, 34860.

- PAGLIUCA, S., GURNARI, C., ZHANG, K., KEWAN, T., BAHAI, W., MORI, M., NAUTIYAL, I., RUBIO, M. T., FERRARO, F., MACIEJEWSKI, J. P., WANG, L. & VISCONTE, V. 2022. Comprehensive Transcriptomic Analysis of VISTA in Acute Myeloid Leukemia: Insights into Its Prognostic Value. *Int J Mol Sci*, 23.
- PANTEL, K. & ALIX-PANABIERES, C. 2010. Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends Mol Med*, 16, 398-406.
- PANTEL, K. & ALIX-PANABIERES, C. 2019. Liquid biopsy and minimal residual disease - latest advances and implications for cure. *Nat Rev Clin Oncol*, 16, 409-424.
- PANTEL, K., ALIX-PANABIERES, C. & RIETHDORF, S. 2009. Cancer micrometastases. *Nat Rev Clin Oncol*, 6, 339-51.
- PANTEL, K. & SPEICHER, M. R. 2016. The biology of circulating tumor cells. *Oncogene*, 35, 1216-24.
- PARISI, S., BATTISTA, M., MUSTO, A., NAVARRA, A., TARANTINO, C. & RUSSO, T. 2012. A regulatory loop involving *Dies1* and miR-125a controls BMP4 signaling in mouse embryonic stem cells. *FASEB J*, 26, 3957-68.
- PETRYLAK, D. P., TAGAWA, S. T., JAIN, R. K., BUPATHI, M., BALAR, A., KALEBASTY, A. R., GEORGE, S., PALMBOS, P., NORDQUIST, L., DAVIS, N., RAMAMURTHY, C., STERNBERG, C. N., LORIOT, Y., AGARWAL, N., PARK, C., TONELLI, J., VANCE, M., ZHOU, H. & GRIVAS, P. 2024. TROPHY-U-01 Cohort 2: A Phase II Study of Sacituzumab Govitecan in Cisplatin-Ineligible Patients With Metastatic Urothelial Cancer Progressing After Previous Checkpoint Inhibitor Therapy. *J Clin Oncol*, 42, 3410–3420.
- PHILLIPS, K. G., KOLATKAR, A., REES, K. J., RIGG, R., MARRINUCCI, D., LUTTGEN, M., BETHEL, K., KUHN, P. & MCCARTY, o. J. 2012a. Quantification of cellular volume and sub-cellular density fluctuations: comparison of normal peripheral blood cells and circulating tumor cells identified in a breast cancer patient. *Front Oncol*, 2, 96.
- PHILLIPS, K. G., VELASCO, C. R., LI, J., KOLATKAR, A., LUTTGEN, M., BETHEL, K., DUGGAN, B., KUHN, P. & MCCARTY, o. J. 2012b. Optical quantification of cellular mass, volume, and density of circulating tumor cells identified in an ovarian cancer patient. *Front Oncol*, 2, 72.
- PILONES, K. A., HENSLER, M., DAVIAUD, C., KRAYNAK, J., FUCIKOVA, J., GALLUZZI, L., DEMARIA, S. & FORMENTI, S. C. 2020. Converging focal radiation and immunotherapy in a preclinical model of triple negative breast cancer: contribution of VISTA blockade. *Oncoimmunology*, 9, 1830524.

- POLZER, B., MEDORO, G., PASCH, S., FONTANA, F., ZORZINO, L., PESTKA, A., ANDERGASSEN, U., MEIER-STIEGEN, F., CZYZ, Z. T., ALBERTER, B., TREITSCHKE, S., SCHAMBERGER, T., SERGIO, M., BREGOLA, G., DOFFINI, A., GIANNI, S., CALANCA, A., SIGNORINI, G., BOLOGNESI, C., HARTMANN, A., FASCHING, P. A., SANDRI, M. T., RACK, B., FEHM, T., GIORGINI, G., MANARESI, N. & KLEIN, C. A. 2014. Molecular profiling of single circulating tumor cells with diagnostic intention. *EMBO Mol Med*, 6, 1371-86.
- POSTOW, M. A., CALLAHAN, M. K. & WOLCHOK, J. D. 2015a. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J Clin Oncol*, 33, 1974-82.
- POSTOW, M. A., CHESNEY, J., PAVLICK, A. C., ROBERT, C., GROSSMANN, K., MCDERMOTT, D., LINETTE, G. P., MEYER, N., GIGUERE, J. K., AGARWALA, S. S., SHAHEEN, M., ERNSTOFF, M. S., MINOR, D., SALAMA, A. K., TAYLOR, M., OTT, P. A., ROLLIN, L. M., HORAK, C., GAGNIER, P., WOLCHOK, J. D. & HODI, F. S. 2015b. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N Engl J Med*, 372, 2006-17.
- POWDERLY, J., PATEL, M. R., LEE, J. J., BRODY, J., MERIC-BERNSTAM, F., HAMILTON, E., PONCE AIX, S., GARCIA-CORBACHO, J., BANG, Y. J., AHN, M. J., RHA, S. Y., KIM, K. P., GIL MARTIN, M., WANG, H., LAZORCHAK, A., WYANT, T., MA, A., AGARWAL, S., TUCK, D. & DAUD, A. 2017. CA-170, a first in class oral small molecule dual inhibitor of immune checkpoints PD-L1 and VISTA, demonstrates tumor growth inhibition in pre-clinical models and promotes T cell activation in Phase 1 study. *Annals of Oncology*, 28, v405-v406.
- POWLES, T., CATTO, J. W. F., GALSKY, M. D., AL-AHMADIE, H., MEEKS, J. J., NISHIYAMA, H., VU, T. Q., ANTONUZZO, L., WIECHNO, P., ATDUEV, V., KANN, A. G., KIM, T. H., SUAREZ, C., CHANG, C. H., ROGHMANN, F., OZGUROGLU, M., EIGL, B. J., OLIVEIRA, N., BUCHLER, T., GADOT, M., ZAKHARIA, Y., ARMSTRONG, J., GUPTA, A., HOIS, S., VAN DER HEIJDEN, M. S. & INVESTIGATORS, N. 2024. Perioperative Durvalumab with Neoadjuvant Chemotherapy in Operable Bladder Cancer. *N Engl J Med*, 391, 1773–1786.
- POWLES, T., DURÁN, I., VAN DER HEIJDEN, M. S., LORIOT, Y., VOGELZANG, N. J., DE GIORGI, U., OUDARD, S., RETZ, M. M., CASTELLANO, D., BAMIAS, A., FLÉCHON, A., GRAVIS, G., HUSSAIN, S., TAKANO, T., LENG, N., KADEL, E. E., BANCHEREAU, R., HEGDE, P. S., MARIATHASAN, S., CUI, N., SHEN, X., DERLETH, C. L., GREEN, M. C. & RAVAUD, A. 2018. Atezolizumab versus chemotherapy in patients with platinum-treated locally advanced or metastatic urothelial carcinoma (IMvigor211): a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *The Lancet*, 391, 748-757.

- POWLES, T., KOCKX, M., RODRIGUEZ-VIDA, A., DURAN, I., CRABB, S. J., VAN DER HEIJDEN, M. S., SZABADOS, B., POUS, A. F., GRAVIS, G., HERRANZ, U. A., PROTHEROE, A., RAVAUD, A., MAILLET, D., MENDEZ, M. J., SUAREZ, C., LINCH, M., PRENDERGAST, A., VAN DAM, P.-J., STANOEVA, D., DAELEMANS, S., MARIATHASAN, S., TEA, J. S., MOUSA, K., BANCHEREAU, R. & CASTELLANO, D. 2019. Clinical efficacy and biomarker analysis of neoadjuvant atezolizumab in operable urothelial carcinoma in the ABACUS trial. *Nature Medicine*, 25, 1706–1714.
- POWLES, T., TAGAWA, S., VULSTEKE, C., GROSS-GOUPIL, M., PARK, S. H., NECCHI, A., DE SANTIS, M., DURAN, I., MORALES-BARRERA, R., GUO, J., STERNBERG, C. N., BELLMUNT, J., GOEBELL, P. J., KOVALENKO, M., BOATENG, F., SIERECKI, M., WANG, L., SIMA, C. S., WALDES, J., LORIOT, Y. & GRIVAS, P. 2025. Sacituzumab govitecan in advanced urothelial carcinoma: TROPiCS-04, a phase III randomized trial. *Ann Oncol*.
- PRIMEAUX, M., GOWRIKUMAR, S. & DHAWAN, P. 2022. Role of CD44 isoforms in epithelial-mesenchymal plasticity and metastasis. *Clin Exp Metastasis*, 39, 391-406.
- PROUT, G. R., JR., BARTON, B. A., GRIFFIN, P. P. & FRIEDEL, G. H. 1992. Treated history of noninvasive grade 1 transitional cell carcinoma. The National Bladder Cancer Group. *J Urol*, 148, 1413-9.
- QIAN, J., WANG, C., WANG, B., YANG, J., WANG, Y., LUO, F., XU, J., ZHAO, C., LIU, R. & CHU, Y. 2018. The IFN- γ /PD-L1 axis between T cells and tumor microenvironment: hints for glioma anti-PD-1/PD-L1 therapy. *Journal of Neuroinflammation*, 15, 290.
- RADHAKRISHNAN, V., BANAVALI, S., GUPTA, S., KUMAR, A., DESHMUKH, C. D., NAG, S., BENIWAL, S. K., GOPICHAND, M., NAIK, R., LAKSHMAIAH, K. C., MANDAVIA, D., RAMCHANDRA, M. & PRABHASH, K. 2019. Excellent CBR and prolonged PFS in non-squamous NSCLC with oral CA-170, an inhibitor of VISTA and PD-L1. *Annals of Oncology*, 30.
- RECK, M., RODRÍGUEZ-ABREU, D., ROBINSON, A. G., HUI, R., CSŐSZI, T., FÜLÖP, A., GOTTFRIED, M., PELED, N., TAFRESHI, A., CUFFE, S., O'BRIEN, M., RAO, S., HOTTA, K., LEIBY, M. A., LUBINIECKI, G. M., SHENTU, Y., RANGWALA, R. & BRAHMER, J. R. 2016. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 375, 1823–1833.
- REDDY, S. U., SADIA, F. Z., VANCURA, A. & VANCUROVA, I. 2024. IFN γ -Induced Bcl3, PD-L1 and IL-8 Signaling in Ovarian Cancer: Mechanisms and Clinical Significance. *Cancers (Basel)*, 16.
- REDELMAN-SIDI, G., GLICKMAN, M. S. & BOCHNER, B. H. 2014. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer--a current perspective. *Nat Rev Urol*, 11, 153-62.

- REN, G., BEECH, C. & SMAS, C. M. 2013. The immunoglobulin superfamily protein differentiation of embryonic stem cells 1 (dies1) has a regulatory role in preadipocyte to adipocyte conversion. *PLoS One*, 8, e65531.
- RIEBENSAHM, C., JOOSSE, S. A., MOHME, M., HANSSEN, A., MATSCHKE, J., GOY, Y., WITZEL, I., LAMSZUS, K., KROPIDLOWSKI, J., PETERSEN, C., KOLB-KOKOCINSKI, A., SAUER, S., BORGMANN, K., GLATZEL, M., MULLER, V., WESTPHAL, M., RIETHDORF, S., PANTEL, K. & WIKMAN, H. 2019. Clonality of circulating tumor cells in breast cancer brain metastasis patients. *Breast Cancer Res*, 21, 101.
- RIETHDORF, S., FRITSCH, H., MULLER, V., RAU, T., SCHINDLBECK, C., RACK, B., JANNI, W., COITH, C., BECK, K., JANICKE, F., JACKSON, S., GORNET, T., CRISTOFANILLI, M. & PANTEL, K. 2007. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res*, 13, 920-8.
- RIETHDORF, S., MULLER, V., ZHANG, L., RAU, T., LOIBL, S., KOMOR, M., ROLLER, M., HUOBER, J., FEHM, T., SCHRADER, I., HILFRICH, J., HOLMS, F., TESCH, H., EIDTMANN, H., UNTCH, M., VON MINCKWITZ, G. & PANTEL, K. 2010. Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial. *Clin Cancer Res*, 16, 2634-45.
- RINK, M., CHA, E. K., GREEN, D., HANSEN, J., ROBINSON, B. D., LOTAN, Y., SAGALOWSKY, A. I., CHUN, F. K., KARAKIEWICZ, P. I., FISCH, M., SCHERR, D. S. & SHARIAT, S. F. 2012a. Biomolecular predictors of urothelial cancer behavior and treatment outcomes. *Curr Urol Rep*, 13, 122-35.
- RINK, M., CHUN, F. K., DAHLEM, R., SOAVE, A., MINNER, S., HANSEN, J., STOUPIEC, M., COITH, C., KLUTH, L. A., AHYAI, S. A., FRIEDRICH, M. G., SHARIAT, S. F., FISCH, M., PANTEL, K. & RIETHDORF, S. 2012b. Prognostic role and HER2 expression of circulating tumor cells in peripheral blood of patients prior to radical cystectomy: a prospective study. *Eur Urol*, 61, 810-7.
- RINK, M., CHUN, F. K., MINNER, S., FRIEDRICH, M., MAUERMANN, O., HEINZER, H., HULAND, H., FISCH, M., PANTEL, K. & RIETHDORF, S. 2011. Detection of circulating tumour cells in peripheral blood of patients with advanced non-metastatic bladder cancer. *BJU Int*, 107, 1668-75.
- RINK, M., LEE, D. J., KENT, M., XYLINAS, E., FRITSCH, H. M., BABJUK, M., BRISUDA, A., HANSEN, J., GREEN, D. A., AZIZ, A., CHA, E. K., NOVARA, G., CHUN, F. K., LOTAN, Y., BASTIAN, P. J., TILKI, D., GONTERO, P., PYCHA, A., BANIEL, J., MANO, R., FICARRA, V., TRINH, Q. D., TAGAWA, S. T., KARAKIEWICZ, P. I., SCHERR, D. S., SJOBERG, D. D., SHARIAT, S. F. & BLADDER CANCER RESEARCH, C. 2013. Predictors of cancer-specific mortality after disease recurrence following radical cystectomy. *BJU Int*, 111, E30-6.

- RINK, M., SOAVE, A., ENGEL, O., FISCH, M., RIETHDORF, S. & PANTEL, K. 2014. [Tumor cells in the peripheral blood of patients with urothelial carcinoma of the bladder: detection and impact of circulating]. *Urologe A*, 53, 501-8.
- ROBERT-KOCH-INSTITUT, D. G. D. E. K. I. D. E. V. U. 2021. Krebs in Deutschland für 2017/2018. 13. Ausgabe. Berlin.
- ROBERT, C., LONG, G. V., BRADY, B., DUTRIAUX, C., MAIO, M., MORTIER, L., HASSEL, J. C., RUTKOWSKI, P., MCNEIL, C., KALINKA-WARZOCHA, E., SAVAGE, K. J., HERNBERG, M. M., LEBBE, C., CHARLES, J., MIHALCIOIU, C., CHIARION-SILENI, V., MAUCH, C., COGNETTI, F., ARANCE, A., SCHMIDT, H., SCHADENDORF, D., GOGAS, H., LUNDGREN-ERIKSSON, L., HORAK, C., SHARKEY, B., WAXMAN, I. M., ATKINSON, V. & ASCIERTO, P. A. 2015. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med*, 372, 320-30.
- ROBERT, C., THOMAS, L., BONDARENKO, I., O'DAY, S., WEBER, J., GARBE, C., LEBBE, C., BAURAIN, J. F., TESTORI, A., GROB, J. J., DAVIDSON, N., RICHARDS, J., MAIO, M., HAUSCHILD, A., MILLER, W. H., JR., GASCON, P., LOTEM, M., HARMANKAYA, K., IBRAHIM, R., FRANCIS, S., CHEN, T. T., HUMPHREY, R., HOOS, A. & WOLCHOK, J. D. 2011. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 364, 2517-26.
- ROBERT KOCH-INSTITUT. 2023. *Krebs in Deutschland für 2019/2020 – 3.25 Harnblase* [Online]. Berlin. Available: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2023/kid_2023_c67_harnblase.pdf [Accessed 31.03.2025].
- ROSENBAUM, S. R., KNECHT, M., MOLLAEI, M., ZHONG, Z., ERKES, D. A., MCCUE, P. A., CHERVONEVA, I., BERGER, A. C., LO, J. A., FISHER, D. E., GERSHENWALD, J. E., DAVIES, M. A., PURWIN, T. J. & APLIN, A. E. 2020. FOXD3 Regulates VISTA Expression in Melanoma. *Cell Rep*, 30, 510-524 e6.
- ROSENBERG, J. E., HOFFMAN-CENSITS, J., POWLES, T., VAN DER HEIJDEN, M. S., BALAR, A. V., NECCHI, A., DAWSON, N., O'DONNELL, P. H., BALMANOUKIAN, A., LORIOT, Y., SRINIVAS, S., RETZ, M. M., GRIVAS, P., JOSEPH, R. W., GALSKEY, M. D., FLEMING, M. T., PETRYLAK, D. P., PEREZ-GRACIA, J. L., BURRIS, H. A., CASTELLANO, D., CANIL, C., BELLMUNT, J., BAJORIN, D., NICKLES, D., BOURGON, R., FRAMPTON, G. M., CUI, N., MARIATHASAN, S., ABIDOYE, O., FINE, G. D. & DREICER, R. 2016. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet*, 387, 1909-20.
- ROSENBERG, R., GERTLER, R., FRIEDERICH, J., FUEHRER, K., DAHM, M., PHELPS, R., THORBAN, S., NEKARDA, H. & SIEWERT, J. R. 2002. Comparison of two density gradient centrifugation systems for the enrichment of disseminated tumor cells in blood. *Cytometry*, 49, 150-8.

- ROSSWAG, S., COTARELO, C. L., PANTEL, K., RIETHDORF, S., SLEEMAN, J. P., SCHMIDT, M. & THALER, S. 2021. Functional Characterization of Circulating Tumor Cells (CTCs) from Metastatic ER+/HER2- Breast Cancer Reveals Dependence on HER2 and FOXM1 for Endocrine Therapy Resistance and Tumor Cell Survival: Implications for Treatment of ER+/HER2- Breast Cancer. *Cancers (Basel)*, 13.
- RUSHTON, A. J., NTELIOPOULOS, G., SHAW, J. A. & COOMBES, R. C. 2021. A Review of Circulating Tumour Cell Enrichment Technologies. *Cancers (Basel)*, 13.
- SAKR, M. A., TAKINO, T., DOMOTO, T., NAKANO, H., WONG, R. W., SASAKI, M., NAKANUMA, Y. & SATO, H. 2010. G124 enhances tumor invasiveness by regulating cell surface membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Cancer Sci*, 101, 2368-74.
- SASIKUMAR, P. G., SUDARSHAN, N. S., ADURTHI, S., RAMACHANDRA, R. K., SAMIULLA, D. S., LAKSHMINARASIMHAN, A., RAMANATHAN, A., CHANDRASEKHAR, T., DHUDASHIYA, A. A., TALAPATI, S. R., GOWDA, N., PALAKOLANU, S., MANI, J., SRINIVASRAO, B., JOSEPH, D., KUMAR, N., NAIR, R., ATREYA, H. S., GOWDA, N. & RAMACHANDRA, M. 2021. PD-1 derived CA-170 is an oral immune checkpoint inhibitor that exhibits preclinical anti-tumor efficacy. *Commun Biol*, 4, 699.
- SCHLICHTNER, S., YASINSKA, I. M., RUGGIERO, S., BERGER, S. M., ALIU, N., PRUNK, M., KOS, J., MEYER, N. H., GIBBS, B. F., FASLER-KAN, E. & SUMBAYEV, V. V. 2022. Expression of the Immune Checkpoint Protein VISTA Is Differentially Regulated by the TGF-beta1 - Smad3 Signaling Pathway in Rapidly Proliferating Human Cells and T Lymphocytes. *Front Med (Lausanne)*, 9, 790995.
- SCHMIDT, S. C. & GSCHWEND, J. E. 2020. 45 Maligne Tumoren der Harnblase. In: JOCHAM, D., MILLER, K., BURGER, M. & SCHRADER, M. (eds.) *Praxis der Urologie*. Georg Thieme Verlag. pp. 819-873.
- SEO, W. I., LEE, C. H., JUNG, S. J., LEE, D. S., PARK, H. Y., JEONG, D. H., KIM, W., CHUNG, J. I. & CHOI, I. 2021. Expression of VISTA on tumor-infiltrating immune cells correlated with short intravesical recurrence in non-muscle-invasive bladder cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 70, 3113–3122.
- SERAGENT, P. A., PLUMMER, S. F., PETTUS, J., MABAERA, R., DELONG, J. K., PECHENICK, D. A., BURNS, C. M., NOELLE, R. J. & CEERAZ, S. 2018. Blocking the VISTA pathway enhances disease progression in (NZB x NZW) F1 female mice. *Lupus*, 27, 210-216.
- SHARMA, P., RETZ, M., SIEFKER-RADTKE, A., BARON, A., NECCHI, A., BEDKE, J., PLIMACK, E. R., VAENA, D., GRIMM, M. O., BRACARDA, S., ARRANZ, J. A., PAL, S., OHYAMA, C., SACI, A., QU, X., LAMBERT, A., KRISHNAN, S., AZRILEVICH, A. & GALSKEY, M. D. 2017. Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (CheckMate 275): a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 18, 312-322.

- SHEKARI, N., SHANEHBANDI, D., KAZEMI, T., ZARREDAR, H., BARADARAN, B. & JALALI, S. A. 2023. VISTA and its ligands: the next generation of promising therapeutic targets in immunotherapy. *Cancer Cell Int*, 23, 265.
- SHELLEY, M. D., KYNASTON, H., COURT, J., WILT, T. J., COLES, B., BURGON, K. & MASON, M. D. 2001. A systematic review of intravesical bacillus Calmette-Guérin plus transurethral resection vs transurethral resection alone in Ta and T1 bladder cancer. *BJU Int*, 88, 209-16.
- SHO, S., COURT, C. M., WINOGRAD, P., LEE, S., HOU, S., GRAEBER, T. G., TSENG, H. R. & TOMLINSON, J. S. 2017. Precision oncology using a limited number of cells: optimization of whole genome amplification products for sequencing applications. *BMC Cancer*, 17, 457.
- SHOJO, K., TANAKA, N., MURAKAMI, T., ANNO, T., TERANISHI, Y., TAKAMATSU, K., MIKAMI, S., IMAMURA, T., MATSUMOTO, K. & OYA, M. 2024. Multiplexed Spatial Imaging at the Single-Cell Level Reveals Mutually Exclusive Expression of B7 Family Proteins. *Lab Invest*, 104, 102131.
- SIEUWERTS, A. M., KRAAN, J., BOLT, J., VAN DER SPOEL, P., ELSTRODT, F., SCHUTTE, M., MARTENS, J. W., GRATAMA, J. W., SLEIJFER, S. & FOEKENS, J. A. 2009. Anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells. *J Natl Cancer Inst*, 101, 61-6.
- SOAVE, A., RIETHDORF, S., DAHLEM, R., VON AMSBERG, G., MINNER, S., WEISBACH, L., ENGEL, O., FISCH, M., PANTEL, K. & RINK, M. 2017. A nonrandomized, prospective, clinical study on the impact of circulating tumor cells on outcomes of urothelial carcinoma of the bladder patients treated with radical cystectomy with or without adjuvant chemotherapy. *Int J Cancer*, 140, 381-389.
- SOAVE, A., RIETHDORF, S., PANTEL, K., FISCH, M. & RINK, M. 2015. Do circulating tumor cells have a role in deciding on adjuvant chemotherapy after radical cystectomy? *Curr Urol Rep*, 16, 46.
- STEIN, J. P., LIESKOVSKY, G., COTE, R., GROSHEN, S., FENG, A. C., BOYD, S., SKINNER, E., BOCHNER, B., THANGATHURAI, D., MIKHAIL, M., RAGHAVAN, D. & SKINNER, D. G. 2001. Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. *J Clin Oncol*, 19, 666-75.
- STEPAN, L. P., TRUEBLOOD, E. S., HALE, K., BABCOOK, J., BORGES, L. & SUTHERLAND, C. L. 2011. Expression of Trop2 cell surface glycoprotein in normal and tumor tissues: potential implications as a cancer therapeutic target. *J Histochem Cytochem*, 59, 701-10.
- SUNDAHL, N., ROTTEY, S., DE MAESENEER, D. & OST, P. 2018. Pembrolizumab for the treatment of bladder cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*, 18, 107-114.
- SYED, Y. Y. 2020. Sacituzumab Govitecan: First Approval. *Drugs*, 80, 1019–1025.

- SZABADOS, B., RODRIGUEZ-VIDA, A., DURAN, I., CRABB, S. J., VAN DER HEIJDEN, M. S., POUS, A. F., GRAVIS, G., HERRANZ, U. A., PROTHEROE, A., RAVAUD, A., MAILLET, D., MENDEZ-VIDAL, M. J., SUAREZ, C., LINCH, M., PRENDERGAST, A., TYSON, C., MOUSA, K., CASTELLANO, D. & POWLES, T. 2021. Toxicity and Surgical Complication Rates of Neoadjuvant Atezolizumab in Patients with Muscle-invasive Bladder Cancer Undergoing Radical Cystectomy: Updated Safety Results from the ABACUS Trial. *Eur Urol Oncol*, 4, 456-463.
- TAGAWA, S. T., BALAR, A. V., PETRYLAK, D. P., KALEBASTY, A. R., LORIOT, Y., FLECHON, A., JAIN, R. K., AGARWAL, N., BUPATHI, M., BARTHELEMY, P., BEUZEBEC, P., PALMBOS, P., KYRIAKOPOULOS, C. E., POUESSEL, D., STERNBERG, C. N., HONG, Q., GOSWAMI, T., ITRI, L. M. & GRIVAS, P. 2021. TROPHY-U-01: A Phase II Open-Label Study of Sacituzumab Govitecan in Patients With Metastatic Urothelial Carcinoma Progressing After Platinum-Based Chemotherapy and Checkpoint Inhibitors. *J Clin Oncol*, 39, 2474–2485.
- TAGLIAMENTO, M., AGOSTINETTO, E., BOREA, R., BRANDAO, M., POGGIO, F., ADDEO, A. & LAMBERTINI, M. 2021. VISTA: A Promising Target for Cancer Immunotherapy? *Immunotargets Ther*, 10, 185-200.
- TAN, W. S., TAN, W. P., TAN, M. Y., KHETRAPAL, P., DONG, L., DEWINTER, P., FEBER, A. & KELLY, J. D. 2018. Novel urinary biomarkers for the detection of bladder cancer: A systematic review. *Cancer Treat Rev*, 69, 39-52.
- TANG, X. Y., XIONG, Y. L., SHI, X. G., ZHAO, Y. B., SHI, A. P., ZHENG, K. F., LIU, Y. J., JIANG, T., MA, N. & ZHAO, J. B. 2022. IGSF11 and VISTA: a pair of promising immune checkpoints in tumor immunotherapy. *Biomark Res*, 10, 49.
- TAUBE, J. M., ANDERS, R. A., YOUNG, G. D., XU, H., SHARMA, R., MCMILLER, T. L., CHEN, S., KLEIN, A. P., PARDOLL, D. M., TOPALIAN, S. L. & CHEN, L. 2012. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med*, 4, 127ra37.
- TEMPLEMAN, A., MILLER, M. C., COOKE, M. J., O'SHANNESY, D. J., GURUNG, Y., PEREIRA, T., PETERS, S. G., PIANO, M., TEO, M., KHAZAN, N., KIM, K., COHEN, E., LOPEZ, H. B., ALVAREZ, F., CICCIOLO, M. & PAILHES-JIMENEZ, A. S. 2023. Analytical performance of the FDA-cleared Parsortix((R)) PC1 system. *J Circ Biomark*, 12, 26-33.
- THIERY, J. P. 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2, 442-54.
- THIERY, J. P., ACLOQUE, H., HUANG, R. Y. & NIETO, M. A. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139, 871-90.
- THIERY, J. P. & SLEEMAN, J. P. 2006. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 131-42.

- THOMPSON, C. B. & ALLISON, J. P. 1997. The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator. *Immunity*, 7, 445-50.
- TJENSVOLL, K., NORDGARD, O. & SMAALAND, R. 2014. Circulating tumor cells in pancreatic cancer patients: methods of detection and clinical implications. *Int J Cancer*, 134, 1-8.
- TOPALIAN, S. L., HODI, F. S., BRAHMER, J. R., GETTINGER, S. N., SMITH, D. C., MCDERMOTT, D. F., POWDERLY, J. D., CARVAJAL, R. D., SOSMAN, J. A., ATKINS, M. B., LEMING, P. D., SPIGEL, D. R., ANTONIA, S. J., HORN, L., DRAKE, C. G., PARDOLL, D. M., CHEN, L., SHARFMAN, W. H., ANDERS, R. A., TAUBE, J. M., MCMILLER, T. L., XU, H., KORMAN, A. J., JURE-KUNKEL, M., AGRAWAL, S., MCDONALD, D., KOLLIA, G. D., GUPTA, A., WIGGINTON, J. M. & SZNOL, M. 2012. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*, 366, 2443-54.
- TRAPP, E., JANNI, W., SCHINDLBECK, C., JUCKSTOCK, J., ANDERGASSEN, U., DE GREGORIO, A., ALUNNI-FABBRONI, M., TZSCHASCHEL, M., POLASIK, A., KOCH, J. G., FRIEDL, T. W. P., FASCHING, P. A., HAEBERLE, L., FEHM, T., SCHNEEWEISS, A., BECKMANN, M. W., PANTEL, K., MUELLER, V., RACK, B., SCHOLZ, C. & GROUP, S. S. 2019. Presence of Circulating Tumor Cells in High-Risk Early Breast Cancer During Follow-Up and Prognosis. *J Natl Cancer Inst*, 111, 380-387.
- VAN DALUM, G., STAM, G. J., SCHOLTEN, L. F., MASTBOOM, W. J., VERMES, I., TIBBE, A. G., DE GROOT, M. R. & TERSTAPPEN, L. W. 2015. Importance of circulating tumor cells in newly diagnosed colorectal cancer. *Int J Oncol*, 46, 1361-8.
- VAN HOOGSTRAATEN, L. M. C., VRIELING, A., VAN DER HEIJDEN, A. G., KOGEVINAS, M., RICHTERS, A. & KIEMENEY, L. A. 2023. Global trends in the epidemiology of bladder cancer: challenges for public health and clinical practice. *Nat Rev Clin Oncol*, 20, 287-304.
- VANSTEENKISTE, J., WAUTERS, E., REYMER, B., ACKERMANN, C. J., PETERS, S. & DE RUYSSCHER, D. 2019. Current status of immune checkpoint inhibition in early-stage NSCLC. *Ann Oncol*, 30, 1244-1253.
- VARILLAS, J. I., CHEN, K., DOPICO, P., ZHANG, J., GEORGE, T. J. & FAN, Z. H. 2022. Comparison of sample preparation methods for rare cell isolation in microfluidic devices. *Can J Chem*, 100, 512-519.
- VILLARROEL-ESPINDOLA, F., YU, X., DATAR, I., MANI, N., SANMAMED, M., VELCHETI, V., SYRIGOS, K., TOKI, M., ZHAO, H., CHEN, L., HERBST, R. S. & SCHALPER, K. A. 2018. Spatially Resolved and Quantitative Analysis of VISTA/PD-1H as a Novel Immunotherapy Target in Human Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*, 24, 1562-1573.

- VIVEK S. RADHAKRISHNAN, S. B., KUMAR PRABHASH, CHETAN DESHMUKH, SHONA NAG, KC LAKSHMAIAH, M GOPICHAND, VIKRAM MATHEWS, MURALI RAMACHANDRA, DIVYESH MANDAVIA, AKHIL KUMAR, HONGWEI WANG, SUDEEP GUPTA, SHRIPAD D. BANAVALI. 2019. *Phase 2 trial of CA-170, a novel oral small molecule dual inhibitor of immune checkpoints VISTA and PD-1, in patients with advanced solid tumor and Hodgkin lymphoma* [Online]. Available: <https://www.curis.com/wp-content/uploads/2019/10/SITC2018CA-170P714ASIAD.pdf> [Accessed 06.04.2025].
- WAGENER, C. M., O. 2010. 10.5 Metastasierung. In: WAGENER, C. M., O. (ed.) *Molekulare Onkologie - Entstehung, Progression, klinische Aspekte*. Thieme.pp. 352-366.
- WANG, B., OU, Z., ZHONG, W., HUANG, L., LIAO, W., SHENG, Y., GUO, Z., CHEN, J., YANG, W., CHEN, K., HUANG, X., YANG, T., LIN, T. & HUANG, J. 2023. Effective Antitumor Immunity Can Be Triggered by Targeting VISTA in Combination with a TLR3-Specific Adjuvant. *Cancer Immunol Res*, 11, 1656–1670.
- WANG, J., WU, G., MANICK, B., HERNANDEZ, V., RENELT, M., ERICKSON, C., GUAN, J., SINGH, R., ROLLINS, S., SOLORZ, A., BI, M., LI, J., GRABOWSKI, D., DIRKX, J., TRACY, C., STUART, T., ELLINGHUYSEN, C., DESMOND, D., FOSTER, C. & KALABOKIS, V. 2019. VSIG-3 as a ligand of VISTA inhibits human T-cell function. *Immunology*, 156, 74-85.
- WANG, L., JIA, B., CLAXTON, D. F., EHMANN, W. C., RYBKA, W. B., MINEISHI, S., NAIK, S., KHAWAJA, M. R., SIVIK, J., HAN, J., HOHL, R. J. & ZHENG, H. 2018a. VISTA is highly expressed on MDSCs and mediates an inhibition of T cell response in patients with AML. *Oncoimmunology*, 7, e1469594.
- WANG, L., LE MERCIER, I., PUTRA, J., CHEN, W., LIU, J., SCHENK, A. D., NOWAK, E. C., SURIAWINATA, A. A., LI, J. & NOELLE, R. J. 2014. Disruption of the immune-checkpoint VISTA gene imparts a proinflammatory phenotype with predisposition to the development of autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 14846-51.
- WANG, L., RUBINSTEIN, R., LINES, J. L., WASIUK, A., AHONEN, C., GUO, Y., LU, L. F., GONDEK, D., WANG, Y., FAVA, R. A., FISER, A., ALMO, S. & NOELLE, R. J. 2011. VISTA, a novel mouse Ig superfamily ligand that negatively regulates T cell responses. *J Exp Med*, 208, 577-92.
- WANG, L., YANG, X., LI, D., LIANG, Z., CHEN, Y., MA, G., WANG, Y., LI, Y., LIANG, Y. & NIU, H. 2018b. The elevated glutaminolysis of bladder cancer and T cells in a simulated tumor microenvironment contributes to the up-regulation of PD-L1 expression by interferon-gamma. *Onco Targets Ther*, 11, 7229–7243.

- WARRICK, J. I., WALTER, V., YAMASHITA, H., CHUNG, E., SHUMAN, L., AMPONSA, V. O., ZHENG, Z., CHAN, W., WHITCOMB, T. L., YUE, F., IYYANKI, T., KAWASAWA, Y. I., KAAG, M., GUO, W., RAMAN, J. D., PARK, J. S. & DEGRAFF, D. J. 2016. FOXA1, GATA3 and PPAR γ Cooperate to Drive Luminal Subtype in Bladder Cancer: A Molecular Analysis of Established Human Cell Lines. *Sci Rep*, 6, 38531.
- WEBER, J., MANDALA, M., DEL VECCHIO, M., GOGAS, H. J., ARANCE, A. M., COWEY, C. L., DALLE, S., SCHENKER, M., CHIARION-SILENI, V., MARQUEZ-RODAS, I., GROB, J. J., BUTLER, M. O., MIDDLETON, M. R., MAIO, M., ATKINSON, V., QUEIROLO, P., GONZALEZ, R., KUDCHADKAR, R. R., SMYLIE, M., MEYER, N., MORTIER, L., ATKINS, M. B., LONG, G. V., BHATIA, S., LEBBE, C., RUTKOWSKI, P., YOKOTA, K., YAMAZAKI, N., KIM, T. M., DE PRIL, V., SABATER, J., QURESHI, A., LARKIN, J., ASCIERTO, P. A. & CHECKMATE, C. 2017. Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in Resected Stage III or IV Melanoma. *N Engl J Med*, 377, 1824–1835.
- WEBER, J. S., D'ANGELO, S. P., MINOR, D., HODI, F. S., GUTZMER, R., NEYNS, B., HOELLER, C., KHUSHALANI, N. I., MILLER, W. H., JR., LAO, C. D., LINETTE, G. P., THOMAS, L., LORIGAN, P., GROSSMANN, K. F., HASSEL, J. C., MAIO, M., SZNOL, M., ASCIERTO, P. A., MOHR, P., CHMIELOWSKI, B., BRYCE, A., SVANE, I. M., GROB, J. J., KRACKHARDT, A. M., HORAK, C., LAMBERT, A., YANG, A. S. & LARKIN, J. 2015. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 16, 375-84.
- WEST, H., MCCLEOD, M., HUSSEIN, M., MORABITO, A., RITTMAYER, A., CONTER, H. J., KOPP, H. G., DANIEL, D., MCCUNE, S., MEKHAIL, T., ZER, A., REINMUTH, N., SADIQ, A., SANDLER, A., LIN, W., OCHI LOHMANN, T., ARCHER, V., WANG, L., KOWANETZ, M. & CAPPUZZO, F. 2019. Atezolizumab in combination with carboplatin plus nab-paclitaxel chemotherapy compared with chemotherapy alone as first-line treatment for metastatic non-squamous non-small-cell lung cancer (IMpower130): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 20, 924-937.
- WESTERMEISTER, R. 2019. Agarosegelelektrophorese. In: GRESSNER, A. M. & ARNDT, T. (eds.) *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. pp. 38-40.
- WINTER, M. J., NAGTEGAAL, I. D., VAN KRIEKEN, J. H. & LITVINOV, S. V. 2003. The epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology. *Am J Pathol*, 163, 2139-48.
- WÖRMANN, B., GRIMM, M.-O., NIEGISCH, G. & DE WIT, M. 2021. Gemeinsame Stellungnahme zur Nutzenbewertung gemäß § 35a SGB V Avelumab (Urothelkarzinom). [Accessed 24.09.2023].

- WU, D., HACKING, S., VITKOVSKI, T. & NASIM, M. 2021. Superpixel image segmentation of VISTA expression in colorectal cancer and its relationship to the tumoral microenvironment. *Sci Rep*, 11, 17426.
- WU, L., DENG, W. W., HUANG, C. F., BU, L. L., YU, G. T., MAO, L., ZHANG, W. F., LIU, B. & SUN, Z. J. 2017. Expression of VISTA correlated with immunosuppression and synergized with CD8 to predict survival in human oral squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*, 66, 627-636.
- XIE, S., HUANG, J., QIAO, Q., ZANG, W., HONG, S., TAN, H., DONG, C., YANG, Z. & NI, L. 2018. Expression of the inhibitory B7 family molecule VISTA in human colorectal carcinoma tumors. *Cancer Immunol Immunother*, 67, 1685–1694.
- XU, H., TIAN, Y., YUAN, X., WU, H., LIU, Q., PESTELL, R. G. & WU, K. 2015a. The role of CD44 in epithelial-mesenchymal transition and cancer development. *Onco Targets Ther*, 8, 3783-92.
- XU, L., MAO, X., GUO, T., CHAN, P. Y., SHAW, G., HINES, J., STANKIEWICZ, E., WANG, Y., OLIVER, R. T. D., AHMAD, A. S., BERNEY, D., SHAMASH, J. & LU, Y. J. 2017. The Novel Association of Circulating Tumor Cells and Circulating Megakaryocytes with Prostate Cancer Prognosis. *Clin Cancer Res*, 23, 5112–5122.
- XU, L., MAO, X., IMRALI, A., SYED, F., MUTSVANGWA, K., BERNEY, D., CATHCART, P., HINES, J., SHAMASH, J. & LU, Y. J. 2015b. Optimization and Evaluation of a Novel Size Based Circulating Tumor Cell Isolation System. *PLoS One*, 10, e0138032.
- XU, W., HIEU, T., MALARKANNAN, S. & WANG, L. 2018. The structure, expression, and multifaceted role of immune-checkpoint protein VISTA as a critical regulator of anti-tumor immunity, autoimmunity, and inflammation. *Cell Mol Immunol*, 15, 438-446.
- YANG, W., PADKJAER, S. B., WANG, J., SUN, Z., SHAN, B., YANG, L., CHEN, H., KANG, L., MADSEN, D., LI, X., SHEN, C., YU, B., ZHU, H., CHAO, T. Y., CAO, Z., LI, D., LIU, W., DU, Y., XU, J., HAO, D., XU, F., PENG, L., LI, T., WANG, L., LI, L., XING, H., LIU, D., LIU, Z., GUAN, Z., WANG, W., CHENG, H., OSTERGAARD, H., CHANG, C., YANG, Z., BOEL, E. & SU, J. 2017. Construction of a versatile expression library for all human single-pass transmembrane proteins for receptor pairings by high throughput screening. *J Biotechnol*, 260, 18-30.
- YAP, K., COHEN, E. N., REUBEN, J. M. & KHOURY, J. D. 2019. Circulating Tumor Cells: State-of-the-art Update on Technologies and Clinical Applications. *Curr Hematol Malig Rep*, 14, 353-357.

- YASINSKA, I. M., MEYER, N. H., SCHLICHTNER, S., HUSSAIN, R., SILIGARDI, G., CASELY-HAYFORD, M., FIEDLER, W., WELLBROCK, J., DESMET, C., CALZOLAI, L., VARANI, L., BERGER, S. M., RAAP, U., GIBBS, B. F., FASLER-KAN, E. & SUMBAYEV, V. V. 2020. Ligand-Receptor Interactions of Galectin-9 and VISTA Suppress Human T Lymphocyte Cytotoxic Activity. *Front Immunol*, 11, 580557.
- YOON, K. W., BYUN, S., KWON, E., HWANG, S. Y., CHU, K., HIRAKI, M., JO, S. H., WEINS, A., HAKROUSH, S., CEBULLA, A., SYKES, D. B., GREKA, A., MUNDEL, P., FISHER, D. E., MANDINOVA, A. & LEE, S. W. 2015. Control of signaling-mediated clearance of apoptotic cells by the tumor suppressor p53. *Science*, 349, 1261669.
- YUNG JUE BANG, J. S., ADIL DAUD, FUNDA MERIC-BERNSTAM, JAVIER GARCIA-CORBACHO, MANISH PATEL, JAMES LEE, KYU-PYO KIM, JOSHUA BRODY, SUN YOUNG, MARTA GIL MARTÍN, SANTIAGO PONCE AIX, ERIKA & HAMILTON, R. R., MYUNG-JU AHN, JAMES SPICER, SIMON PACEY, GERALD FALCHOOK, HONGWEI WANG, GUANGXIN XU, LISA ADAMS, ANNA WAI SEE MA, ROBERT GHARAVI, P. TAYLOR EVES, DAVID TUCK, JOHN POWDERLY. 2018. *Phase 1 study of CA-170, a first-in-class, orally available, small molecule immune checkpoint inhibitor (ICI) dually targeting VISTA and PDL1, in patients with advanced solid tumors or lymphomas* [Online]. Available: <https://www.curis.com/wp-content/uploads/2019/10/SITC2018CA-170RPD962.pdf> [Accessed 06.04.2025].
- ZAPALA, L., KUNC, M., SHARMA, S., PEKSA, R., POPEDA, M., BIERNAT, W. & RADZISZEWSKI, P. 2023. Immune checkpoint receptor VISTA on immune cells is associated with expression of T-cell exhaustion marker TOX and worse prognosis in renal cell carcinoma with venous tumor thrombus. *J Cancer Res Clin Oncol*, 149, 4131–4139.
- ZHANG, H., LY, A., CHOU, E., WANG, L., ZHANG, P., PRADO, K., GU, Y., PELLEGRINI, M. & CHIN, A. I. 2024. Role of Forkhead Box P3 in IFNgamma-Mediated PD-L1 Expression and Bladder Cancer Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Cancer Res Commun*, 4, 2228–2241.
- ZHANG, M., PANG, H. J., ZHAO, W., LI, Y. F., YAN, L. X., DONG, Z. Y. & HE, X. F. 2018. VISTA expression associated with CD8 confers a favorable immune microenvironment and better overall survival in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*, 18, 511.
- ZONG, L., MO, S., YU, S., ZHOU, Y., ZHANG, M., CHEN, J. & XIANG, Y. 2020a. Expression of the immune checkpoint VISTA in breast cancer. *Cancer Immunol Immunother*.
- ZONG, L., YU, S., MO, S., ZHOU, Y., XIANG, Y., LU, Z. & CHEN, J. 2021. High VISTA Expression Correlates With a Favorable Prognosis in Patients With Colorectal Cancer. *J Immunother*, 44, 22-28.

ZONG, L., ZHOU, Y., ZHANG, M., CHEN, J. & XIANG, Y. 2020b. VISTA expression is associated with a favorable prognosis in patients with high-grade serous ovarian cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 69, 33-42.

8 Abkürzungsverzeichnis

A

ADC	Antibody-drug conjugates - Antikörper-Wirkstoff-Konjugat
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat

B

BCA	Bicinchoninic acid assay
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BMP4	Bone morphogenetic protein 4
BRAF	V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B
BSA	Bovines Serum Albumin
BTA	Blasentumor-assoziierte Antigen

C

CD41	Cluster of Differentiation 41
CD44	Cluster of Differentiation 44
CD45	Cluster of Differentiation 45
CD61	Cluster of Differentiation 61
CD68	Cluster of Differentiation 68
CD142	Cluster of Differentiation 142
cDNA	Complementary DNA - komplementäre DNA
CNVs	Copy number variations - Kopiezahlveränderungen
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COL4A1	Collagen type IV alpha 1 chain
CPS	Combined positive score
CT	Computertomographie
CTCs	Circulating tumor cells - zirkulierende Tumorzellen

CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Antigen 4
CUL4A	Cullin 4A

D

DAPI	4'6'-Diamidin-2-phenylindol
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNASE1	Deoxyribonuclease I
DPBS	Dulbeco's Phosphate Buffered Saline
DTT	Dithiothreitol

E

ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMEM	Minimum Essential Media
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule

F

FCS	Fetal Calf Serum
FDA	U.S. Food and Drug Administration - US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FOXD3	Forkhead box D3
FOXP3	Forkhead-Box-Protein P3

G

g	Relative Zentrifugalkraft
GAS6	Growth Arrest Specific 6

GAS6-AS1 Growth Arrest Specific 6 Antisense RNA 1

H

h Stunde

HCl Salzsäure

HER2 Human epidermal growth factor receptor 2

HIF1- α Hypoxia-induced factor - Hypoxie induzierter Faktor 1 Untereinheit alpha

HIF2- α Hypoxia-induced factor - Hypoxie induzierter Faktor 2 Untereinheit alpha

HRP Horseradish Peroxidase - Meerrettichperoxidase

Hsc70 Heat shock cognate 71-kDa protein

H₂O₂ Wasserstoffperoxid

I

IF Immunfluoreszenz

IFN- γ Interferon-gamma

ICI Immuncheckpoint-Inhibitor

ICP Immuncheckpoint-Protein

IgG Immunglobulin G

IGSF11 Immunoglobulin superfamily member 11

ITAM/ITIM immunoreceptor tyrosine-based activation/inhibitory motif

IU/ml International Units per milliliter - Internationale Einheiten pro Milliliter

K

K. Kontrolle

kDa kilodalton

KLF5 Krüppel-like factor 5

M

M Molarität

mA	Milliampere
MET	Mesenchymale-epitheliale Transition
min	Minuten
miRNA	MicroRNA
mRNA	Messenger-RNA - Boten-RNA
mm	Millimeter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP-13	Matrix metalloproteinase-13
MRT	Magnetresonanztomographie
MT1-MMP	Membrane type 1-matrix metalloproteinase
MVAC	Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin=Doxorubicin und Cisplatin)- Schema
MYO16-AS1	MYO16 Antisense RNA 1

N

NaCl	Natriumchlorid
NDS	Normal donkey-serum - Normales Eselserum
NGS	Normal goat-serum - Normales Ziegenserum
NGS	Next Generation Sequenzing - Gesamtgenomsequenzierung
ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
nm	Nanometer
NMP22	Nuclear matrix protein 22
NLRC3	NOD-like receptor family CARD domain containing 3
NP40	Nonidet P-40
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom

P

PBS	Phosphate-buffered saline - Phosphatgepufferte Salzlösung
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells - mononukleäre Zellen aus peripherem Blut
PCR	Polymerase chain reaction - Polymerase Kettenreaktion
pH	pondus Hydrogenii
PD-L1	Programmed cell death-ligand 1
PD-1	Programmed cell death protein 1
Pen Strep	Penicillin Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1

R

RAB20	Ras-related protein Rab-20
RNA	Ribonucleic acid - Ribonukleinsäure
rpm	Runs per min - Umdrehungen pro Minute
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute

S

SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
sec	Sekunden
SG	Sacituzumab govitecan
SOX1	SRY-Box Transcription Factor 1
STR	Short tandem repeat

T

TCGA	The Cancer Genome Atlas
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin

TF	Tissue Factor
TGFβ	Transforming Growth Factor-β
TNM-Klassifikation	Tumor (T), Nodus (N), Metastasen (M)-Klassifikation
TP53	Tumor Protein 53
Tregs	Regulatorische T-Zellen
TROP-2	Trophoblast antigen 2
TURB	Transurethrale Blasenresektion

U

UCB	Urothelkarzinom der Harnblase
UKD	Universitätsklinikum Düsseldorf
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Q

qRT-PCR	quantitative „real-time“ (Echtzeit) Polymerasekettenreaktion (PCR)
---------	--

V

V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VISTA	V-domain immunoglobulin suppressor of T cell activation
vs	Versus
VSIG-3	V-Set and Immunoglobulin domain containig 3
VSIR	V-set immunoregulatory receptor

W

WGA	Whole genom Amplifiction - Gesamtgenomamplifikation
w/v	Gewicht pro Volumen

Z

ZBp.	Zum Beispiel
z. B.	Zum Beispiel

-/+

-QK negative Qualitätskontrolle

+QK positive Qualitätskontrolle

-K negative Kontrolle

+K positive Kontrolle

9 Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 1: UCB-Klassifizierung anhand der Infiltrationstiefe in der Harnblasenwand.	6
Abbildung 2: Bisher bekannte Funktionen von VISTA.	13
Abbildung 3: Phasen vor und nach der Zentrifugation	50
Abbildung 4: Nachweis verschiedener Proteine in der UCB-Zelllinienkohorte.....	67
Abbildung 5: VISTA-Protein-Expression in verschiedenen UCB-Zelllinien	68
Abbildung 6: Analyse der <i>VSIR</i> -Expression mit qRT-PCR in verschiedenen UCB-Zelllinien.....	69
Abbildung 7: Western-Blot zur Darstellung des Einflusses von IFN- γ auf die Expression von VISTA und PD-L1	71
Abbildung 8: Untersuchungen zur Regulation der Expression von <i>VSIR</i> durch mit IFN- γ mittels qRT-PCR.....	72
Abbildung 9: Nachweis von <i>VSIR/VISTA</i> - und PD-L1-mRNA/Protein nach TGF β -Behandlung in den Zelllinien HT1376 und RT4	74
Abbildung 10: Einfluss von TGF β auf die VISTA- und PD-L1-Proteinmengen in der Zelllinie 5637	75
Abbildung 11: VISTA-IF-Färbung von HT1376 Zellen in Donorblut	76
Abbildung 12: CD44-IF-Färbung vom TCC-SUP Zellen in Donorblut	77
Abbildung 13: TROP-2-IF-Färbung von HT1376 Zellen in Donorblut	78
Abbildung 14: TROP-2-IF-Färbung von TCC-SUP Zellen in Donorblut	79
Abbildung 15: IF-Färbung von Patient:in Nummer 9.....	80
Abbildung 16: IF-Färbung von Patient:in Nummer 23.....	81
Abbildung 17: IF-Färbung von 647V Zellen in Donorblut	82
Abbildung 18: Flowchart zu den angewendeten CTC-Detektionsverfahren.....	83
Abbildung 19: Agarosegelelektrophorese zum Nachweis des WGA-Endproduktes.....	85
Abbildung 20: Isolierte Zelle 053.....	87
Abbildung 21: Isolierte Zelle 049.....	88
Abbildung 22: Isolierte Zelle 012.....	89
Abbildung 23: Isolierte Zelle 018.....	90
Abbildung 24: Isolierte Zelle 038.....	91

Abbildung 25:	Isolierte Zelle 040.....	92
----------------------	--------------------------	----

10 Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: Mikroskope.....	27
Tabelle 2: Zentrifugen	27
Tabelle 3: Andere allgemeine Laborgeräte	28
Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien	30
Tabelle 5: Oligonukleotide für die quantitative „Real Time“-PCR.....	34
Tabelle 6: Tabelle 6: Kommerziell erhältliche Kits.....	35
Tabelle 7: Fluoreszenz-konjugierte Antikörper.....	36
Tabelle 8: Unkonjugierte Antikörper.....	37
Tabelle 9: Sekundäre Antikörper.....	37
Tabelle 10: Für die Zellkultur verwendete humane Zytokine.....	38
Tabelle 11: Humane UCB-Zelllinien.....	39
Tabelle 12: Analysesoftware und Datenbanken.....	40
Tabelle 13: IF-Protokoll – „Direktfärbung“	54
Tabelle 14: IF-Protokoll – „CD44“	55
Tabelle 15: IF-Protokoll – „PD-L1“	56
Tabelle 16: IF-Protokoll – „TROP-2“ und „VISTA“	57
Tabelle 17: IF-Protokoll – „PD-L1 + TROP-2 Version 1“	58
Tabelle 18: IF-Protokoll – „PD-L1 + TROP-2 Version 2“	60
Tabelle 19: IF-Protokoll – „PD-L1 + TROP-2 + CD41“	61
Tabelle 20: CTC-Anreicherung durch CellSearch®	93
Tabelle 21: CTC-Anreicherung durch CellSearch®, Parsortix® und Ficoll- Dichtegradientenzentrifugation – CTC-Anzahl	96
Tabelle 22: CTC-Anreicherung durch CellSearch®, Parsortix® und Ficoll- Dichtegradientenzentrifugation- Statistische Daten.....	98

11 Anhang

11.1 Relevante Auszüge aus der Studienarbeit „Struktur, Expression und Funktion des Immun-Checkpoint-Proteins VISTA (V domain immunoglobulin suppressor of T cell activation)“

Aus der Studienarbeit von Fuchs E.: Struktur, Expression und Funktion des Immun-Checkpoint-Proteins VISTA (V domain immunoglobulin suppressor of T cell activation) (Fuchs, 2020):

„Eine der möglichen individualisierten Behandlungsmöglichkeiten ist die Immuntherapie. Als Pionier der Immuntherapie wird William Coley bezeichnet, der bereits gegen Ende des 19. Jahrhunderts Tumorpatienten erfolgreich mit Vakzinierung behandelte (Coley, 1910). Durch den zunehmenden Einsatz von Chemo- und Strahlentherapie verschwand die Immunbehandlung jedoch als Standardtumorthherapie (Hoption Cann et al., 2003), obwohl in mehreren Studien ein Zusammenhang zwischen dem Immunsystem und dem Auftreten sowie der Progression von Tumorerkrankungen festgestellt werden konnte.“ (Fuchs, 2020)

„Als großer Durchbruch in der Immuntherapie der Tumorerkrankungen gilt der Einsatz von Immuncheckpoint-Therapien. Negative Checkpoint-Rezeptoren, wie PD-1 (Programmed cell death protein 1) und CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated Antigen 4) supprimieren die T-Zell-Aktivität (Thompson and Allison, 1997, Freeman et al., 2000, Ceeraz et al., 2013, Hodi et al., 2016). Die Antikörper-Blockade dieser Proteine kann die Anti-Tumorimmunität verstärken (Hodi et al., 2010, Topalian et al., 2012, Eggermont et al., 2016). Von der Zeitschrift Science wurde die Immuntherapie im Jahr 2013 deshalb auch zum „Breakthrough of the Year“ gewählt (Couzin-Frankel, 2013), und die Zeitschrift Nature widmete ihren Ausblick am Ende desselben Jahres der Immuntherapie bei Tumorerkrankungen (Gravitz, 2013).

James P. Allison und Tasuku Honjo wurden für ihre bahnbrechenden Entdeckungen auf dem Gebiet der Immuncheckpoint-Rezeptoren CTLA-4 (Leach et al., 1996, Kwon et al., 1997, Hodi et al., 2003) und PD-1 (Ishida et al., 1992, Nishimura et al., 1999, Freeman et al., 2000, Iwai et al., 2005) im Jahr 2018 mit dem Nobelpreis für Medizin und Physiologie ausgezeichnet (The Nobel Prize, 2018). Ihre Forschungsergebnisse bilden die Basis für den Einsatz Immuncheckpoint-blockierender Antikörper, die inzwischen bei einer Reihe von Tumorerkrankungen angewendet

werden und z. B. bei malignen Melanomen, bei nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom oder bei Harnblasenkarzinomen zu langandauernden Ansprechraten geführt haben (Bidnur et al., 2016, Eggermont et al., 2016, Reck et al., 2016, Aggen and Drake, 2017, Davarpanah et al., 2017, Weber et al., 2017, Sundahl et al., 2018), Leitlinienprogramm Onkologie – Lungenkarzinom, 2018, Leitlinienprogramm Onkologie – Melanom, 2019, Leitlinienprogramm Onkologie – Harnblasenkarzinom, 2019).“ (Fuchs, 2020)

„VISTA ist ein Typ I-Membran-Protein, das erstmals im Jahre 2011 beschrieben wurde und zur B7/CD28-Liganden/Rezeptor-Familie der Immuncheckpoint-Proteine (Negative Checkpoint-Regulatoren – NCR) gezählt wird (Wang et al., 2011, Flies et al., 2011, Ni and Dong, 2017, ElTanbouly et al., 2020b). Zu PD-L1 und PD-L2 (Programmed death-ligand 2) zeigt VISTA signifikante Homologien in der Proteinsequenz.

Sowohl für das VISTA-kodierende Gen als auch für das VISTA-Protein selbst existieren eine Reihe in der Literatur unterschiedlich verwendeter Bezeichnungen („Aliases“). Für das VISTA-kodierende Gen hat sich die Bezeichnung VSIR (V-Set Immunoregulatory Receptor) durchgesetzt. Das VISTA-Protein wird u. a. auch als B7-H5, PD-1H oder „Stress-induced secreted protein“ aufgeführt (GeneCards®: The Human Gene Database, www.genecards.org).

Das VSIR-Gen (alternativ auch C10orf54) ist auf dem langen Arm des Chromosoms 10 lokalisiert (10q22.1) und hat eine Größe von 26025 Basenpaaren. Für das VSIR-Transkript sind 7 Exons (alle kodierend) beschrieben, und die Transkriptgröße beläuft sich auf 4714 Nukleotide. Des Weiteren sind drei verschiedene Splice-Varianten bekannt, jedoch gibt es mit 4717 Nukleotiden Länge nur ein Protein-kodierendes Transkript; das Vorliegen anderer Isoformen ist theoretisch möglich (Ensembl; www.ensembl.org/index.html).“ (Fuchs, 2020)

„Das murine VISTA-Transkript besitzt eine Größe von 930 Basenpaaren und kodiert für ein Protein, das aus 309 Aminosäuren (AS) aufgebaut ist (Flies et al. 2011). Die Sequenzhomologie des VISTA-Proteins ist mit über 80% zwischen Maus und Mensch sehr hoch (Flies et al., 2011, Wang et al., 2011). Humanes VISTA besteht aus 311 Aminosäuren und besitzt ein Signalpeptid (32 AS), eine extrazelluläre IgV-Domäne (130 AS), eine Verankerungsregion (33 AS), eine Transmembrandomäne (20 AS) sowie eine zytoplasmatische Domäne (96 AS) (Lines et al., 2014a). Die

zytoplasmatische Domäne weist zwar keine Immunrezeptor-Tyrosin-basierten Signalmotive (ITAM/ITIM – immunoreceptor tyrosine-based activation/inhibitory motif) auf, jedoch kann die intrazelluläre Signaltransduktion z. B. auch über multiple Kinasen 2- und Phosphokinase C-Phosphorylierungsorte erfolgen, die in der zytoplasmatischen Domäne nachgewiesen werden konnten (Flies et al., 2011, Mehta et al., 2019). Darüber hinaus besitzt VISTA ein konserviertes SH2 (Src homology 2)-Bindungsmotiv und 3 C-terminale SH3 (Src homology 3)-Bindungsdomänen. Somit könnte VISTA neben seiner Funktion als Ligand auch Rezeptorfunktionen ausüben (Nowak et al., 2017, Mehta et al., 2019).

Durch Proteinsequenzanalysen konnten Ähnlichkeiten zwischen VISTA und anderen Mitgliedern der B7-Familie von Immuncheckpoint-Liganden, die alle eine konservierte IgV-ähnliche Domäne aufweisen, aufgeklärt werden. Innerhalb der B7-Liganden-Familie bestand die höchste Sequenzübereinstimmung und somit eine enge evolutionäre Assoziation mit jedoch nur 23% zu PD-L1 (Wang et al. 2011, Mehta et al. 2019). Zwei kanonische Cysteinreste (Cys54 und Cys145) sowie Tyrosin143 in der extrazellulären Domäne von VISTA sind außerordentlich wichtig für die Stabilität der IgV-Faltung und damit hoch konserviert in Proteinen mit einer IgV-Domäne, aber es gibt auch wesentliche Unterschiede. VISTA weist z. B. drei individuelle Cystein-Reste (Cys44, Cys83 und Cys144) in der extrazellulären Domäne und ein Cystein (Cys177) in der Verankerungsregion auf, die in den anderen Mitgliedern der B7-Familie nicht vorkommen (Wang et al., 2011, Xu et al., 2018, Mehta et al., 2019). Ein weiterer Unterschied zu VISTA besteht z. B. darin, dass die anderen B7-Familienmitglieder eine zweite Immunoglobulin-Domäne besitzen (Wang et al., 2011, Xu et al., 2018).“ (Fuchs, 2020)

„Unter „Steady state“-Bedingungen wird VISTA in der Milz nicht an der Oberfläche von B-Zellen exprimiert (Flies et al. 2011, Wang et al. 2011). Dagegen ist VISTA signifikant auf Plasmazellen nachweisbar (EITanbouly et al., 2020a). Innerhalb der T-Zellen findet man VISTA stärker auf naïven T-Zellen als auf CD8-T-Zellen (Xu et al. 2018). Endogenes VISTA wirkt auf Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) als Ligand sowie auf T-Zellen als Rezeptor inhibitorisch, wobei die jeweiligen Bindungspartner noch weitestgehend unbekannt sind (Lines et al., 2014a). Dieses Phänomen ist auch als das Rezeptor-Ligand-Paradigma des Proteins bekannt, und man kann es durch die folgende Untersuchung relativ einfach nachvollziehen. Die maximale T-Zell-Proliferation ist in einem in vitro-Modell erst dann erreicht, wenn sowohl

die T-Zellen als auch APZ VISTA-defizient sind. Wenn beide Zelltypen VISTA exprimieren, ist die Proliferation am geringsten, und wenn einer von beiden Zelltypen VISTA exprimiert, ist der Effekt intermediär (Flies et al., 2014). Das Paradigma wird am häufigsten im Zusammenhang mit der T-Zell-supprimierenden Wirkung des Proteins veranschaulicht. Neben dieser Untersuchung gibt es zahlreiche weitere Studien, die über eine Liganden-Rolle auf den APZ (Flies et al., 2011, Wang et al., 2011, Lines et al., 2014a) oder über eine Rezeptor-Rolle auf den T-Zellen (Flies et al., 2014, Flies et al., 2015) berichten.

Die außergewöhnliche Struktur des VISTA-Proteins mit zwei potenziellen Protein-kinase-Bindungsstellen in der zytoplasmatischen Domäne und Proteinresten, die als Andockstelle fungieren können, unterstreicht die duale Funktion als Ligand und Rezeptor (Le Mercier et al., 2015). Wie VISTA selbst als ein Rezeptor funktioniert und welche Signalwege es aktiviert, ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt worden. Während bis vor Kurzem die Bindungspartner von VISTA unbekannt waren (Xu et al., 2018), existieren gegenwärtig jedoch mehrere Theorien, mit denen diese Frage geklärt werden könnte. Zum Beispiel wird berichtet, dass VISTA zur Dimerisierung befähigt ist, was das Fehlen eines Gegenrezeptors erklären könnte (Yoon et al., 2015). Andere Arbeiten weisen jedoch darauf hin, dass IGSF11 (Immunoglobulin superfamily member 11) auch bekannt als VSIG-3 (V-Set and Immunoglobulin domain containing 3) Bindungspartner ist und selbst als ein Ligand die T-Zell-Proliferation und die Zytokinproduktion inhibieren kann (Yang et al., 2017, Mehta et al., 2019, Wang et al., 2019). Außerdem wird beschrieben, dass VISTA bei saurem pH-Wert den ko-inhibitorischen Rezeptor PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) bindet und darüber seine supprimierende Wirkung ausüben kann (Johnston et al., 2019).

Interessanterweise wurde auch im Zusammenhang mit einer immunfördernden Wirkung über eine Doppelrolle des Liganden-Rezeptors VISTA berichtet. Bei Untersuchungen mit humanen Monozyten verhält sich VISTA als ein signaltransduzierender Rezeptor, der eine Zytokinsekretion hervorzurufen kann und als ein Ligand, um eine Antigen-spezifische T-Zell-Antwort auszulösen. Bharaj und Mitarbeiter erklären diesen Widerspruch durch mögliche unterschiedliche Funktionen von VISTA in der Maus und im menschlichen Körper (Bharaj et al., 2014). Diese These verwerfen wiederum andere Forschungsgruppen, die über eine suppressive Wirkung von humanem VISTA berichteten (Lines et al., 2014a).

Auch im Menschen wird VISTA vorrangig in hämatopoetischen Zellen und in Geweben, die besonders stark von Lymphozyten infiltriert werden, exprimiert (Lines et al. 2014). Eine Reihe humaner peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMCs) exprimieren VISTA, jedoch sind ruhende CD19⁺-B-Zellen oder CD56⁺Hi-NKZ z. B. eher VISTA-negativ (Bharaj et al. 2014).

Kürzlich in „Science“ publizierten Ergebnissen zufolge kann VISTA als ein Checkpoint-Regulator, der für die Aufrechterhaltung der Quiescence und peripheren Toleranz von naiven T-Zellen verantwortlich ist, betrachtet werden (ElTanbouly et al., 2020b).

VISTA wird auf naiven T-Zellen exprimiert, ...“ (Fuchs, 2020)

„Zahlreiche Mechanismen der Regulation der VISTA-Expression werden im Zusammenhang mit malignen Tumorerkrankungen oder Tumorzelllinienmodellen diskutiert. Im Gegensatz zu anderen ICP, wie PD-L1, scheinen inflammatorische Zytokine, wie IFN- γ und TGF- β (Transforming growth factor beta1) keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von VISTA zu haben (Mulati et al., 2019, Rosenbaum et al., 2020). Interessanterweise scheint das Tumorsuppressorprotein TP53 die Regulation der Expression von VISTA auf Transkriptionsebene zu beeinflussen (Yoon et al., 2015, Oliveira et al., 2016, Xu et al., 2018).

In mehreren Karzinomzelllinien und in einem in vitro-EMT-Modell der immortalisierten Mammaepithelzelllinie EpH4 wurde die Promotormethylierung als ein möglicher Regulationsmechanismus der VISTA-Expression beschrieben. So konnte beispielsweise beim Magenkarzinom (gastric cancer, GC) gezeigt werden, dass die Herabregulation der Expression von VISTA häufig durch Promotormethylierung und/oder durch Überexpression der Mikro-RNA miRNA-125a-5p ausgelöst werden kann (Oliveira et al., 2016). Im Einklang mit diesem Ergebnis bestätigen Resultate anderer Studien, dass die Überexpression der Mikro-RNAs miRNA125a und miRNA125b die VISTA-Proteinexpression im Zusammenhang mit der Zelldifferenzierung supprimieren kann (Parisi et al., 2012, Battista et al., 2013). Jedoch hatte das Expressionsniveau der Mikro-RNAs miRNA-125a und miRNA-506 keinen Einfluss auf die VISTA-Expression in z. B. Ovarial- und Endometriumkarzinomen. Die Methylierung des VISTA-Promotors hingegen ist beim Endometriumkarzinom (in verschiedenen Zelllinien und in zahlreichen Patientenproben) als möglicher Mechanismus der Regulation des VISTA-Gens identifiziert worden (Mulati et al., 2019).

In Melanom scheint die VISTA-Transkription durch den über BRAF regulierten Stamzfaktor FOXD3 (Forkhead box D3) supprimiert werden zu können. Diese Wirkung kann durch BRAF-Inhibition noch verstärkt werden (Rosenbaum et al. 2020). Außerdem korrelierte die VISTA-Expression in einer großen Kohorte von Kolonkarzinom-Patienten (The Cancer Genome Atlas (TCGA)) mit der Expression und Aktivität von HIF1- α (Hypoxia-induced factor Hypoxie induzierter Faktor 1 Untereinheit α). HIF-1 α ist ein Mastertranskriptionsfaktor, der die Expression von Genen, die in den Metabolismus und in das Verhalten von Stammzellen involviert sind, reguliert (Lee et al., 2019). In vitro- und in vivo- Versuche zeigen, dass HIF-1 α in einer hypoxischen Tumormikroumgebung an die konservierten Hypoxie-Response-Elemente im Promotorbereich von VISTA bindet und damit die Expression von VISTA auf den MDSCs (myeloid-derived suppressor cells) herauf regulieren kann (Deng et al., 2019).

Es gibt nur wenige Berichte darüber, dass VISTA in Tumorzellen herabreguliert wird, wie oben für das GC beschrieben (Oliverira et al., 2016). Eine Heraufregulation der Expression von VISTA konnte jedoch bereits des Öfteren auch in anderen Tumorentitäten beobachtet werden.

In einem syngenem Mausmelanommodell wurde gezeigt, dass VISTA auf den tumorinfiltrierenden Leukozyten (TIL), besonders auf den myeloischen Zellen innerhalb der Tumormikroumgebung exprimiert und heraufreguliert wird, nicht jedoch auf den Melanomzellen (Le Mercier et al., 2014).

In einer Studie zum humanen oralen Plattenepithelkarzinom (OSCC) konnte eine signifikant stärkere VISTA-Expression innerhalb des Tumorgewebes und auf den TIL im Vergleich zum normalen Gewebe und zu epithelialen Dysplasien nachgewiesen werden (Wu et al., 2017). Des Weiteren bestätigt eine Studie zur VISTA-Proteinexpression bei Patienten mit humanem Prostatakarzinom vor und nach Ipilimumab-Therapie auch, dass im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen eine Heraufregulation und nicht eine Herabregulation der VISTA-Expression stattfindet. Bei den unbehandelten Patienten war die VISTA-Expression auf Makrophagen in 7% der Fälle, nicht aber auf den T-Zellen nachweisbar. Nach der Behandlung konnte VISTA in 31% der Fälle auf den Makrophagen und teilweise auch auf den T-Zellen detektiert werden. Diese Studie ist besonders interessant, weil hier erstmalig VISTA-Expression auf T-Zellen in humanen Tumoren nachgewiesen wurde (Gao et

al., 2017). Insgesamt zeigen diese Studien eine gegenüber dem Normalgewebe in malignen Tumoren erhöhte Expression von VISTA. Das steht im Widerspruch zur beobachteten Herabregulation der VISTA-Expression durch Promotorhypermethylierung im Magenkarzinom (Oliviera et al. 2016). Interessanterweise wird in diesen Studien jedoch über eine VISTA-Expression in den verschiedenen Immunzellen, nicht aber über VISTA-Expression in Tumorzellen berichtet.

Die initiale und lange Zeit vorherrschende Hypothese, dass VISTA nur von TIL, nicht aber von den Tumorzellen innerhalb der Tumormikroumgebung exprimiert wird, haben viele Studien belegt (Le Mercier et al., 2014, Lines et al., 2014a, Le Mercier et al., 2015, Kuklinski et al., 2018). Diese Hypothese wird durch Experimente an nicht hämatopoetischen humanen Tumorzelllinien gestützt, in denen keine VISTA-mRNA in Tumorzellen gefunden wurde (Human Cell Line MTC Panel; Clontech). Außerdem ist in den untersuchten humanen Kolonkarzinomen die VISTA-Proteinexpression auch auf die infiltrierenden CD11b+ Zellen begrenzt (Lines et al., 2014b).

Kuklinski und Mitarbeiter berichteten über die VISTA-Expression bei humanen malignen Melanomen und fanden heraus, dass die Expression innerhalb der Mikroumgebung des Tumors Ähnlichkeiten zu der im Normalgewebe aufweist. VISTA war auf den myeloischen Zellen, wie Monozyten, Granulozyten und Makrophagen stark exprimiert, weniger stark dagegen auf den T-Zellen, und Tumorzellen waren VISTA-negativ. Diese Beobachtung steht im Einklang mit ihrem unveröffentlichten Ergebnis, dass VISTA-Positivität nur in einer von insgesamt 27 Melanom-Zelllinien nachweisbar war (Kuklinski et al., 2018). Ähnliche Ergebnisse zum Melanom, beispielsweise die VISTA-Expression auf Lymphozyten, wurden in verschiedenen Studien erzielt. Die VISTA-Expression stieg sogar nach einer NCR-Therapie noch weiter an (Kakavand et al., 2017).

Nach diesen initialen Veröffentlichungen, in denen die Expression nur auf den Immunzellen, nicht aber auf den Tumorzellen beschrieben wurde, wurden mehr und mehr wissenschaftliche Arbeiten publiziert, die die Expression auch auf den malignen Zellen selbst zeigten. Beispielsweise konnte eine signifikante Oberflächenexpression von VISTA auf zirkulierenden Leukämiezellen im peripheren Blut von Patienten mit akuten myeloischen Leukämien (AML) detektiert werden. VISTA war dabei auf Monozyten und auf den myeloischen leukämischen Blasten stark, mit schwacher Intensität dagegen auf den CD8- und CD4-T-Zellen und auf den Tregs

exprimiert. Wang und Mitarbeiter erklären dieses Ergebnis mit der myeloischen Abstammung der AML und mit dem bekannten Ergebnis, dass VISTA stark auf myeloischen Zellen exprimiert ist (Wang et al., 2018a). Jedoch stammt die erste Beschreibung der VISTA-Expression auf menschlichen Tumorzellen von Böger und Mitarbeitern. Es ist gleichzeitig die erste Evaluation von VISTA in einer großen Kohorte von humanen Tumoren (n=464 GC-Patienten). VISTA wurde hier jedoch auch in starkem Umfang von den Immunzellen (83,6 % in primären Tumoren, 42,9 % in Lebermetastasen) exprimiert. Die VISTA-Expression in den Tumorzellen war dagegen nur in einem kleinen Teil der Tumoren nachweisbar (In 8 % der primären Tumorgewebe und in 14,3 % in den Lebermetastasen) (Boger et al., 2017). Eine mögliche Ursache dafür, warum in den früheren GC-Zelllinien-Studien keine VISTA-Expression gefunden wurde (Oliveira et al., 2016), könnte die geringe Positivitätsrate sein, so dass möglicherweise größere Patienten-Kohorten untersucht werden müssen, um Tumorzellpositivität nachweisen zu können (Boger et al., 2017).

In einer weiteren Studie konnte VISTA-Expression auf den Tumorzellen bei Kolorektalkarzinomen demonstriert werden. Xie und Mitarbeiter untersuchten 28 klinische Kolorektalkarzinom-Proben auf VISTA-Proteinexpression. Die VISTA-Expression war im Vergleich zum paratumoralen und normalen Gewebe intratumoral erhöht. Die Mehrheit der VISTA-exprimierenden Zellen war jedoch CD45-positiv. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit Ergebnissen der initialen Studien, in denen eine VISTA-Expression lediglich von TIL beschrieben wurde. Nichtsdestotrotz exprimierten auch CD45--Panzytokeratin+-Zellen VISTA. Dieses Ergebnis indiziert, dass die Kolorektalkarzinom-Tumorzellen selbst VISTA exprimieren können. Diese Studie ist die erste Demonstration einer eindeutigen VISTA-Expression in den Tumorzellen eines Teils der Patienten. Dieses Ergebnis weist gleichzeitig darauf hin, dass wahrscheinlich nur bestimmte Tumorzellen VISTA exprimieren (Xie et al., 2018). Diese Beobachtungen könnten auch mit dem Einfluss der verschiedenen Immunzellen in der Mikroumgebung der Tumorzellen oder mit z. B. hypoxischen Bedingungen in bestimmten Tumorbereichen assoziiert sein.

In den letzten Jahren wurde VISTA-Expression von Tumorzellen dann zunehmend bei verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen: z. B. beim Ovarialkarzinom (Liao et al., 2018), beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (Villarroel-Espindola et al., 2018), beim Melanom (Edwards et al., 2019), beim Mammakarzinom (Zong et al., 2020a) oder beim hepatozellulären Karzinom (Zhang et al., 2018). Letztere ist

gleichzeitig die erste Studie, die über vergleichbar hohe Expression in Immun- (16,9%) und Tumorzellen (16,4%) berichtet (Zhang et al., 2018).

Zusammenfassend ist VISTA-Expression bei Tumorerkrankungen häufig vor allem innerhalb der Tumormikroumgebung zu beobachten. Die initiale Hypothese, dass VISTA nur auf den TIL exprimiert ist, wird zwar durch mehrere Arbeiten gestützt, jedoch scheinen Immunzellen innerhalb der Tumormikroumgebung VISTA vor allem mit stärkerer Intensität zu exprimieren als Tumorzellen. Es könnte auch möglich sein, dass myeloische hämatologische Tumorzellen, aufgrund der VISTA-Expression bereits in ihren Ursprungszellen VISTA-Positivität häufiger und in stärkerer Intensität aufweisen als solide Tumoren. Des Weiteren weisen einige der vorgestellten Studien darauf hin, dass die bisher untersuchten Tumorentitäten, in denen keine VISTA-Expression der Tumorzellen selbst gezeigt wurde, (z. B. beim Harnblasenkarzinom (LeMercier et al., 2014) bei einer größeren Probenanzahl mit verschiedenen Tumorzelltypen/Tumorzelllinien eine VISTA-Expression aufweisen könnten.“ (Fuchs, 2020)

11.2 Tabelle 23: Isolierte CTC-Kandidaten-Zellen

Tabelle 23: Isolierte CTC-Kandidaten-Zellen

Gepickte Zelle	CD45	CD41	PD-L1	Keratine/TROP-2	Patient:in
001	negativ	negativ	1+	1+	24
002	negativ	negativ	1+	1+	24
003	negativ	negativ	1+	1+	28
004	negativ	negativ	1+	1+	28
005	negativ	negativ	negativ	negativ	4
006	negativ	negativ	negativ	negativ	4
007	negativ	negativ	negativ	negativ	5
008	negativ	negativ	negativ	negativ	5
009	negativ	negativ	negativ	1+	5

Gepickte Zelle	CD45	CD41	PD-L1	Keratine/TROP-2	Patient:in
010	negativ	negativ	1+	1+	5
011	negativ	negativ	1+	1+	42
012	negativ	negativ	negativ	negativ	42
013	negativ	negativ	negativ	negativ	42
014	negativ	negativ	1+	1+	42
015	negativ	negativ	1+	1+	42
016	negativ	negativ	1+	1+	42
017	negativ	negativ	1+	1+	42
018	negativ	negativ	negativ	negativ	42
019	negativ	negativ	negativ	negativ	42
020	negativ	negativ	1+	1+	42
021	negativ	negativ	1+	1+	42
022	negativ	negativ	1+	1+	36
023	negativ	negativ	1+	1+	36
024	negativ	negativ	1+	1+	64
025	negativ	negativ	1+	1+	64
026	negativ	negativ	negativ	negativ	44
027	negativ	negativ	1+	1+	44
028	negativ	negativ	1+	1+	44
029	negativ	negativ	1+	1+	44
030	negativ	negativ	1+	1+	44
031	negativ	negativ	1+	1+	60
032	negativ	negativ	negativ	1+	52
033	negativ	negativ	1+	3+	62

Gepickte Zelle	CD45	CD41	PD-L1	Keratine/TROP-2	Patient:in
034	negativ	negativ	1+	3+	62
035	negativ	negativ	1+	3+	62
036	negativ	negativ	1+	negativ	62
037	negativ	negativ	1+	negativ	62
038	negativ	negativ	negativ	3+	62
039	negativ	negativ	1+	2+	62
040	negativ	negativ	negativ	negativ	63
041	negativ	negativ	1+	1+	63
042	negativ	neg. evtl 1+	1+	1+	48
043	negativ	negativ	1+	1+	48
044	negativ	negativ	1+	1+	48
045	negativ	negativ	1+	1+	48
046	negativ	negativ	1+	1+	48
047	negativ	negativ	1+	1+	55
048*	negativ	negativ	1+	2+	36
049*	negativ	negativ	1+	2+	36
050*	negativ	negativ			38
051*	negativ	negativ			39
052*	negativ	negativ			39
053*	negativ	negativ	negativ	2+	43

**Zellen wurden durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation angereichert.
Die nicht mit *-gekennzeichneten Zellen stammen aus der Anreicherung mit Parsortix.*

12 Erklärung des Eigenanteils

Wie im Text bereits erwähnt, habe ich Hilfe zu folgenden Teilen der Arbeit erhalten:
Die semiautomatische Auswertung der CTC-Befunde nach Detektion mittels CellSearch® wurde von Frau Prof. Dr. Sabine Riethdorf (Institut für Tumorbilogie, UKE) vorgenommen. Die Analyse der CNV-Daten der verdächtigen Zellen nach WGA und NGS erfolgte durch PD Dr. Simon Joosse (Institut für Tumorbilogie, UKE).

13 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe, insbesondere ohne entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten, verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Das gilt insbesondere auch für alle Informationen aus Internetquellen.

Soweit beim Verfassen der Dissertation KI-basierte Tools („Chatbots“) verwendet wurden, versichere ich ausdrücklich, den daraus generierten Anteil deutlich kenntlich gemacht zu haben. Die „Stellungnahme des Präsidiums der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zum Einfluss generativer Modelle für die Text- und Bildherstellung auf die Wissenschaften und das Förderhandeln der DFG“ aus September 2023 wurde dabei beachtet.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Datum

Unterschrift

14 Danksagung

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

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus Pantel, dem Direktor des Instituts für Tumorbilogie, für die Möglichkeit, meine Promotion an seinem Institut durchführen zu dürfen.

Ebenso danke ich Frau Prof. Dr. Sabine Riethdorf, Leiterin der Arbeitsgruppe und meine Betreuerin, für ihre engagierte wissenschaftliche Begleitung, ihr Vertrauen, ihre stetige Unterstützung sowie die zahlreichen wertvollen fachlichen und inhaltlichen Anregungen.

Ich danke zudem Prof. Dr. Michael Rink, Dr. Armin Soave und Dr. Mara Kölker für die enge und produktive Zusammenarbeit sowie für die klinische Umsetzung der Arbeit.

Ein herzliches Dankeschön gilt außerdem Malgorzata Stoupiec, Cornelia Coith, Antje Andreas, Dr. Leonie Ott, Dr. Sonja Bergmann, PD Dr. Simon Joosse, Thomas Forster, Jolanthe Kropidlowski, Sandra Lenz und Sonja Santjer – für ihre Unterstützung im Labor, bei der Datenerhebung und -auswertung sowie für die stets freundliche und hilfsbereite Zusammenarbeit.

Besonders danken möchte ich auch meiner Familie und meinen Freunden – für ihre Geduld, ihr Verständnis und ihre beständige Ermutigung in allen Phasen dieser Arbeit. Ohne ihre emotionale Unterstützung wäre die Fertigstellung dieser Dissertation nicht möglich gewesen.

Ihnen allen gilt mein aufrichtiger und herzlicher Dank.