

**Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. Süleyman Ergün**

**Etablierung eines in-situ-Immunfluoreszenzfärbefahrens zur
dreidimensionalen Darstellung und Quantifizierung der Immunzellinfiltration in
experimentellen Tumoren**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Leah Sophia Schuhmair
aus Altenbaindt**

Würzburg, Dezember 2023

Referent: PD Dr. Erik Henke

Korreferentin: Prof. Dr. Alma Zerneck-Madsen

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Juli 2024

Die Promovendin ist Zahnärztin

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Brustkrebs.....	1
1.1.1	Epidemiologie.....	1
1.1.2	Klassifikation von Brusttumoren	1
1.1.3	Aufbau.....	2
1.1.4	Prognose.....	2
1.1.5	Standardtherapie bei Brustkrebs	3
1.2	Immuntherapie	3
1.2.1	Immuncheckpoints	4
1.2.2	Immuncheckpoint-Inhibitoren.....	4
1.3	Ursachen für geringe Immunzellinfiltration.....	5
1.3.1	Geringe Tumorimmunogenität	6
1.3.2	Immunsuppressives TME	6
1.3.3	Physikalische Diffusionsbarriere	7
1.4	Therapeutischer Ansatz zur Verbesserung der Immunzellinfiltration	9
1.4.1	Verbesserung der Immunogenität	9
1.4.2	Antifibrotische Therapie.....	10
1.4.3	Aufhebung der Immunsuppression.....	11
1.5	Möglichkeiten zur Darstellung und Quantifizierung der Immunzellinfiltration in Brusttumoren.....	11
1.5.1	Durchflusszytometrie	11
1.5.2	Immunfluoreszenz an Paraffinschnitten.....	12
1.5.3	Rekonstruktion von 2D-Schnitten zu 3D-Volumina	12
1.5.4	3D-Bildgebung von Gewebestücken.....	13
1.6	Ziel der Arbeit: Methode zur in vitro 3D-Färbung von Immunzellen in Brusttumoren	14
2	Material und Methoden	16
2.1	Ethik- und Tierversuchsvotum	16
2.2	Verwendete Materialien.....	16
2.2.1	Antikörper.....	16
2.2.2	Reagenzien	18
2.2.3	Lösungen	19
2.2.4	Geräte	20
2.2.5	Softwareprogramme.....	21

2.3	Versuchsaufbau	21
2.3.1	Versuchstiere	21
2.3.2	Behandlungsgruppen	21
2.3.3	Tumorentnahme und Fixierung des Tumorgewebes.....	22
2.3.4	Färbeprinzip 3D-Immunhistochemie	22
2.3.5	Modifikationen am Protokoll	23
2.3.5.1	Versuch 1	23
2.3.5.2	Versuch 2	24
2.3.5.3	Versuch 3	24
2.3.5.4	Versuch 4	24
2.3.5.5	Versuch 5	24
2.3.5.6	Versuch 6	25
2.3.5.7	Versuch 7	25
2.3.5.8	Versuch 8	25
2.3.5.9	Versuch 9	25
2.3.5.10	Versuch 10	26
2.3.6	Erarbeitetes Endprotokoll	26
2.4	Mikroskopie.....	30
2.4.1	Konfokales Mikroskop	30
2.4.2	Lichtblattfluoreszenzmikroskop.....	30
2.5	Elektronische Bildverarbeitung	31
2.5.1	ImageJ	31
2.5.2	Imaris	31
2.6	Statistische Auswertung	33
3	Ergebnisse.....	34
3.1	Entwicklung einer Immunfluoreszenzfärbung zur 3D-Darstellung von Immunkzellen in Brusttumoren.....	34
3.1.1	Modifikation der Inkubationszeiten	35
3.1.1.1	Versuch 1: Übertragung des Basisprotokolls auf Gewebeproben ...	35
3.1.1.2	Versuch 2: Verlängerung der Antikörperinkubationszeiten.....	39
3.1.2	Modifikation der Puffer.....	41
3.1.2.1	Versuch 3: Einsatz des Puffers CUBIC 1	41
3.1.2.2	Versuch 4: Verwendung des niedriger konzentrieren CUBIC 1A	42
3.1.2.3	Versuch 5: Vorbehandlung der Proben mit H ₂ O ₂ -haltigen Entfärbungsreagenz	45
3.1.2.4	Zwischenfazit.....	50

3.1.3	Modifikationen der Antikörper	51
3.1.3.1	Versuch 6: Versuch einer Dreifachfärbung von Gefäßen, CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen.....	51
3.1.3.2	Versuch 7: Änderung der Sekundärantikörperverdünnung	52
3.1.3.3	Versuch 8: Suche geeigneter Primärantikörper.....	53
3.1.3.4	Versuch 9: Test Sekundärantikörper-Kombinationen für Doppelfärbung CD4/CD8.....	58
3.1.3.5	Versuch 10: Doppelfärbung CD4/CD8 an Proben der verschiedenen Behandlungsgruppen.....	62
3.2	Mikroskopieren am LSM 65	65
3.3	Entwicklung eines geeigneten Bildbearbeitungsverfahrens	65
3.3.1	Gefäßdarstellung.....	65
3.3.2	Immunzelldarstellung	70
4	Diskussion	76
4.1	Überlegungen zu den Modifikationen am Färbeprotokoll.....	76
4.1.1	Inkubationszeiten	76
4.1.2	Puffer und Lösungen	78
4.1.3	Antikörper.....	81
4.2	Schwierigkeiten bei der Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit	84
4.2.1	Färbung.....	84
4.2.2	Mikroskopieren.....	85
4.2.3	Bildprozessierung.....	86
5	Zusammenfassung	88
6	Literaturverzeichnis.....	90

Appendix

- I Abkürzungsverzeichnis
- II Abbildungsverzeichnis
- III Tabellenverzeichnis
- IV Danksagung
- V Lebenslauf

1 Einleitung

1.1 Brustkrebs

1.1.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist sowohl in Deutschland als auch weltweit die am häufigsten diagnostizierte Krebserkrankung. Dabei macht es knapp 25% aller Krebserkrankungen bei Frauen aus und ist mit rund 11% auch auf Platz eins im geschlechterunabhängigen Vergleich. Allein im Jahr 2020 wurden in Deutschland knapp 70.000 und weltweit rund 2,26 Millionen neue Brustkrebsfälle diagnostiziert (Sung et al., 2021; The Global Cancer Observatory, 2021). Dabei sind nur 1% der Betroffenen Männer (Robert Koch-Institut, 2016). Das mittlere Lebenszeitrisko beträgt 12,4%, was bedeutet, dass im Schnitt jede achte Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs erkrankt. Generell steigt das Risiko einer Erkrankung mit zunehmendem Alter, wobei das durchschnittliche Erkrankungsalter bei Frauen aktuell bei 64 Jahren liegt (Robert Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V, 2021).

1.1.2 Klassifikation von Brusttumoren

Der Großteil der Brusttumore sind entweder duktale Karzinome, welche aus dem Epithel der Milchgänge hervorgehen, oder lobuläre Karzinome, welche sich aus dem Epithel der Drüsenläppchen entwickeln (Robert Koch-Institut, 2016). Weitere Kriterien für die Klassifizierung von Brusttumoren sind die Hormonempfindlichkeit durch Bestimmung des Hormonrezeptor-(HR-)Status, die Empfindlichkeit für Wachstumsfaktoren durch Bestimmung des *human epidermal growth factor receptor 2*-(HER2-)Status sowie die Zellteilungsrate Ki-67 (S3-Leitlinie Mammakarzinom, 2021). Anhand dieser Faktoren lassen sich Brusttumore in vier große Subtypen unterteilen: Luminal A (HR⁺, HER2⁻, Ki-67 <14%), Luminal B (HR⁺, HER2⁻, Ki-67 >14% oder HR⁺, HER2⁺, unabhängig vom Ki-67-Status), HER2⁺ nicht-Luminal (HR⁻, Her2⁺), triple-negativ (HR⁻, HER2⁻) (Goldhirsch et al., 2011; Park et al., 2012). Dabei tritt der Luminal-A-Subtyp mit knapp 73% am häufigsten und der HER2⁺ nicht-Luminale-Subtyp mit rund 4% am seltensten auf. Die anderen beiden Subtypen weisen eine ähnlich hohe Inzidenz auf (American Cancer Society, 2019). Zusätzlich werden Brusttumore wie alle Malignitäten in Stadien und Grade eingeteilt. Insgesamt sind Mammakarzinome sehr heterogene Tumore, die sich zum Teil massiv in ihrer Tumorbilogie und Entität voneinander unterscheiden.

1.1.3 Aufbau

Der grobe Aufbau ist bei allen Brusttumoren ähnlich: Sie bestehen nicht nur aus Ansammlungen entarteter Zellen, sondern zudem aus Tumorstroma, welches auch als Tumormikroumgebung (engl. *tumor microenvironment*, TME) bezeichnet wird (Abbildung 1). Die TME umgibt die Tumorzellnester und enthält eine Vielzahl nicht-maligner Zellen, darunter Endothelzellen und Perizyten, tumor-assoziierte Fibroblasten (engl. *cancer-associated fibroblasts*, CAFs), Adipozyten und Immunzellen. Zwischen diesen Zellen befindet sich ein komplexes molekulares Netzwerk, die extrazelluläre Matrix. Sie dient der Stabilisierung der Zellen und enthält zudem eine Vielzahl löslicher Faktoren, die für die interzelluläre Kommunikation verantwortlich sind (Balkwill et al., 2012; Christoph Wagener, 2010, p. 327f).

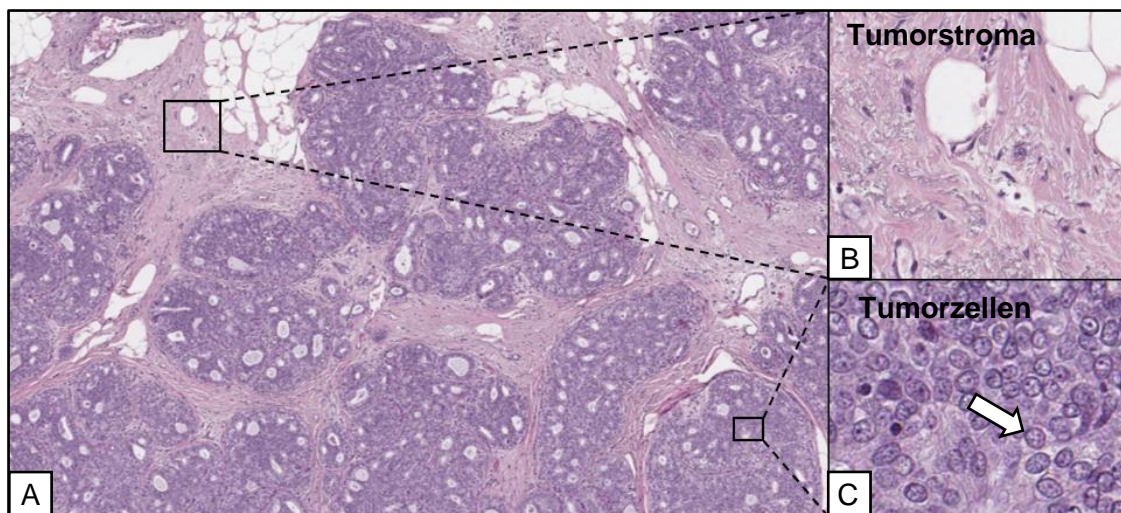


Abbildung 1: Aufbau eines duktales Mammakarzinoms
A Übersichtsaufnahme des Tumorgewebes. Zu erkennen sind einzelne Tumorzellnester in violett, die vom rosa gefärbten Tumorstroma umgeben sind. **B** Ausschnitt aus dem Tumorstroma. **C** Tumorzellen. Der weiße Pfeil markiert eine einzelne Tumorzelle. Lichtmikroskopische Aufnahme aus dem Proteinatlas (The Human Protein Atlas, 2022a).

1.1.4 Prognose

Durch die immer besser werdende Vorsorge und die Entwicklung neuer Therapiekonzepte geht die Mortalität bei Brustkrebs seit 1970 leicht zurück (Robert Koch-Institut, 2016). Trotz dieser positiven Entwicklung lag Brustkrebs im Jahr 2020 hinter Lungenkrebs und nur knapp hinter dem Pankreaskarzinom auf Platz drei der häufigsten krebsbedingten Todesfälle in Deutschland (The Global Cancer Observatory, 2021). 2017 betrug die Anzahl der Sterbefälle in Deutschland 18.396 bei 67.297 Neuerkrankungen. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate lag bei 87%. Generell variieren die Daten erheblich je nach Subtyp, Grad und Stadium des Tumors (Zentrum für

Krebsregisterdaten (RKI), 2017). Beispielsweise haben triple-negative und HER2⁺ Tumore im Schnitt eine deutlich schlechtere Prognose als die luminalen Subtypen (X. Li et al., 2017; reviewed in Moo et al., 2018).

1.1.5 Standardtherapie bei Brustkrebs

Zu den drei großen Säulen der Brustkrebstherapie gehören die Operation, die Bestrahlung und die systemische Therapie (Kwok-Leung Cheung, 2020, p. 1). Unter den Begriff der systemischen Therapie fallen die Chemo-, die endokrine bzw. Antihormontherapie und die zielgerichtete Therapie. Während die Chemotherapie vor allem bei den aggressiveren Formen eingesetzt wird, kann die Antihormontherapie nur bei Hormonrezeptor-positiven Tumoren angewendet werden (S3-Leitlinie Mammakarzinom, 2021). HER2⁺ Tumore erhalten eine zielgerichtete Therapie zur Blockierung dieser Rezeptoren bzw. der nachgeschalteten Signalkaskade (Loibl & Gianni, 2017; Pernas & Tolaney, 2019). Um den größtmöglichen Behandlungserfolg zu erzielen, werden meist mehrere Therapieansätze miteinander kombiniert (S3-Leitlinie Mammakarzinom, 2021). Trotz der vielfältigen Behandlungsmöglichkeiten endet die Diagnose Brustkrebs in vielen Fällen noch immer tödlich. Daher ist die Entwicklung neuer Therapieansätze auch heute noch von großer Bedeutung.

1.2 Immuntherapie

In den letzten zehn Jahren hat sich die Immuntherapie als weiterer vielversprechender Ansatz zur Krebsbehandlung etabliert (Borghaei et al., 2015; Darvin et al., 2018; Herbel, 2021; Herzberg et al., 2017; Jelinek et al., 2017; Larkin et al., 2015; Motzer et al., 2015; Robert et al., 2011). Sie basiert auf der grundsätzlichen Fähigkeit des Immunsystems körpereigen von körperfremd unterscheiden zu können und dadurch entartete Zellen zu erkennen und abzutöten (Burnet, 1957; Schreiber et al., 2011; Thomas, 1959). Hier spielen neben den Killerzellen, die zur angeborenen Immunität gehören, vor allem die CD4⁺ T1-Helferzellen und die CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen als Vertreter der spezifischen Immunantwort eine wichtige Rolle (Rolles et al., 2021). CD4⁺ T1-Helferzellen sind immunregulatorische Zellen. Ihre wichtigste antitumorale Funktion ist die Stimulierung CD8⁺ zytotoxischer T-Lymphozyten (engl. *cytotoxic T lymphocytes*, CTLs) durch die Sekretion aktivierender Zytokine (Kennedy & Celis, 2008; Topalian et al., 2016). Die CTLs sind daraufhin in der Lage, in veränderten Zellen die Apoptose einzuleiten. Dies geschieht durch die Ausschüttung von Perforinen, Granzymen und Fas-Liganden

(Bröker et al., 2019, pp. 174-177). Insgesamt sind an der Antitumorantwort noch eine Vielzahl weiterer Zellen und Faktoren beteiligt (Rolles et al., 2021).

Im Normalfall gelingt es dem Immunsystem transformierte Zellen rechtzeitig zu erkennen und zu eliminieren. Diese Immunüberwachung überleben nur Zellen, die durch zufällig erworbene Mutationen Mechanismen entwickelt haben, mit denen sie sich vor dem Immunsystem verstecken oder dieses sogar aktiv unterdrücken können. Diese Mechanismen werden auch „Immun-Escape-Mechanismen“ genannt (Dunn et al., 2002; Schreiber et al., 2011). Hier setzt die Immunonkologie an. Ihr Ziel ist es diese Mechanismen zu überwinden, damit das Immunsystem den Tumor wieder als körperfremd erkennt und ihn dadurch selbst bekämpfen kann (Pardoll, 2015). Immuntherapeutika wirken demnach nicht direkt auf die Tumorzellen, sondern initiieren bzw. verstärken die Antitumor-Immunantwort des eigenen Körpers (Seidel et al., 2018).

1.2.1 Immuncheckpoints

Ein Escape-Mechanismus mit dem sich Tumorzellen vor dem Angriff von T-Zellen schützen, ist die Überexpression inhibitorischer Immuncheckpoint-Moleküle (Ai et al., 2020; Jiang et al., 2020). Kommt es zur Interaktion dieser Moleküle mit den entsprechenden Rezeptoren auf der T-Zelloberfläche, den sogenannten Immuncheckpoints, so wird die T-Zelle gehemmt (Basu et al., 2019). Diese inhibitorischen Co-Rezeptoren werden nach der initialen T-Zell-Aktivierung exprimiert und dienen normalerweise der Aufrechterhaltung der immunologischen Eigentoleranz des Körpers. Sie hindern Immunzellen daran, gesunde körpereigene Zellen anzugreifen, wodurch Autoimmunkrankheiten und überschießende Entzündungsreaktionen verhindert werden (Fang et al., 2020; Latchman et al., 2001; Pardoll, 2012). Die beiden bekanntesten inhibitorischen Immuncheckpoints sind der *programmed cell death receptor 1*-(PD-1-)/ *programmed death ligand 1*-(PD-L1-)Signalweg und der *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*-(CTLA-4-)Signalweg (Muenst et al., 2015). CTLA-4 reguliert die Aktivierung und Proliferation naiver T-Zellen in den sekundär lymphatischen Organen während der Primingphase, wohingegen PD-1 die Immunreaktion der T-Effektorzellen im peripheren Gewebe in der Effektorphase moduliert (Keilholz U., 2016; reviewed in Rowshanravan et al., 2018).

1.2.2 Immuncheckpoint-Inhibitoren

Einer der vielversprechendsten Ansätze der Immuntherapie ist die Blockierung dieser Immuncheckpoints. Dadurch soll deren inhibitorische Wirkung auf das Immunsystem

aufgehoben werden. Hierfür werden monoklonale Antikörper verwendet, die entweder gegen den Liganden oder gegen den Rezeptor gerichtet sind (Pardoll, 2012). Bei einigen Tumorentitäten kommen sie bereits regelmäßig zum Einsatz. Besonders bei malignen Melanomen, aber auch bei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen, Nierenzellkarzinomen, Hodgkin Lymphomen und anderen Malignitäten konnten damit bereits Erfolge verzeichnet werden (Borghaei et al., 2015; Darvin et al., 2018; Herbel, 2021; Herzberg et al., 2017; Jelinek et al., 2017; Larkin et al., 2015; Motzer et al., 2015). Im Gegensatz dazu zählen Brusttumore zu den Krebsarten, die bisher eher schlecht bis gar nicht auf die Behandlung mit Immuncheckpoint-Inhibitoren (ICI) ansprechen (Adams et al., 2019; Emens et al., 2019; Nanda et al., 2016). Dabei variiert die Wirksamkeit je nach Subtyp des Tumors. In einer klinischen Studie von Dirix et al. erhielten Patientinnen mit unterschiedlichen Subtypen von metastasierendem Brustkrebs eine Monotherapie mit dem Anti-PD-L1 Antikörper Avelumab. Dabei betrug die objektive Ansprechrate bei triple-negativen Brusttumoren 5,2%, während sie bei HR⁺ HER2⁻ Tumoren bei 2,8% lag. HER2⁺ Tumore sprachen überhaupt nicht auf die Therapie an (Dirix et al., 2018).

1.3 Ursachen für geringe Immunzellinfiltration

Voraussetzung für eine ICI-vermittelte Antitumorantwort ist das Vorhandensein ausreichend vieler Immunzellen im Tumor (Chan et al., 2015). Tumore unterscheiden sich jedoch stark in der Menge und Lokalisation der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (engl. *tumor-infiltrating lymphocytes*, TILs) und können in drei Immunphänotypen eingeteilt werden. Unterschieden werden der immun-verlassene, der immun-ausgeschlossene und der entzündete Phänotyp. Von immun-verlassen wird gesprochen, wenn gar keine Immunzellen im Tumor vorzufinden sind. Im Gegensatz dazu lassen sich beim entzündeten Typ große Mengen im gesamten Tumor lokalisieren. Beim immun-ausgeschlossenen Typ befinden sich die TILs überwiegend im Stroma und nur wenige bis gar keine stehen in direktem Kontakt mit den Tumorzellen (Chen & Mellman, 2017). Die Mehrheit der Brusttumore gehört zum immun-ausgeschlossenen Immunphänotyp (Ali et al., 2014; Mahmoud et al., 2011; Stanton et al., 2016; Thomas et al., 2018). Von allen Subtypen weisen die HR⁺ Tumore die geringste Anzahl von TILs bzw. CD8⁺ T-Zellen auf (Stanton et al., 2016). Die niedrige Ansprechrate von Brustkrebs auf ICI lässt sich also damit erklären, dass sich kaum Immuneffektorzellen in direktem Kontakt mit den Tumorzellen befinden (Ledys et al., 2021). Hierfür sind weitere Immun-Escape-Mechanismen verantwortlich, welche im Folgenden genauer erläutert werden.

1.3.1 Geringe Tumorimmunogenität

Vorab ein kurzer Überblick über den Ablauf der Aktivierung einer CD8⁺ T-Zelle. Naive CD8⁺ T-Zellen differenzieren sich zu zytotoxischen T-Zellen, wenn es zur Interaktion ihres T-Zell-Rezeptors (engl. *t-cell receptor*, TCR) mit einem passenden Antigen kommt. Die Antigenpräsentation erfolgt mittels *major histocompatibility complex* (MHC). Zur vollständigen Aktivierung benötigen sie zusätzlich ein kostimulierendes Signal. Dies erhalten sie über die Bindung der Moleküle CD80 oder CD86 an einen CD28-Co-Rezeptor auf ihrer Oberfläche (Bröker et al., 2019, pp. 174-176). Wie bereits erwähnt, entwickeln Tumorzellen im Verlauf des sogenannten *Immunoeditings* Fähigkeiten, um der Kontrolle des Immunsystems zu entgehen. Hierzu zählt, dass die meisten Tumorzellen keine kostimulierenden Moleküle exprimieren, wodurch die T-Zellen nicht adäquat aktiviert werden (Becker et al., 1993; Staveley-O'Carroll et al., 1998). Außerdem nutzen viele Tumore eine herunterregulierte Antigenprozessierung bzw. -präsentation, was die Wahrscheinlichkeit, von den T-Zellen erkannt zu werden, verringert (Schreiber et al., 2011; Seliger et al., 2000). Häufig wird dies durch eine reduzierte oder fehlende Expression von MHC-I-Molekülen auf der Tumorzelloberfläche erreicht (Cabrera et al., 1996; Esteban et al., 1990; Ferrone & Marincola, 1995). Doch selbst wenn die Antigenpräsentation unverändert ist, kann es sein, dass die präsentierten Antigene den körpereigenen zu sehr ähneln. Dadurch können sie nicht als körperfremd erkannt werden. Ursache dafür ist eine zu geringe Tumormutationslast (engl. *tumor mutational burden*, TMB). Sie beschreibt die Anzahl an Mutationen in den Tumorzellen. Je höher die TMB ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass Neoantigene entstehen. Diese können von den T-Zellen als körperfremd erkannt werden und eine Immunreaktion auslösen (Chalmers et al., 2017). Maligne Melanome und nichtkleinzellige Lungenkarzinome haben beispielsweise eine sehr hohe TMB (Samstein et al., 2019), während Brusttumore, vor allem die vom Luminal-A-Typ, eine eher geringere TMB aufweisen (Thomas et al., 2018). Dies ist eine Ursache dafür, weshalb Brusttumore wenig immunogen und damit kaum sichtbar für die körpereigene Immunabwehr sind.

1.3.2 Immunsuppressives TME

Durch eine geringe Immunogenität können sich Tumore vor dem Immunsystem verstecken. Alternativ können sie die Anti-Tumorantwort auch durch die Etablierung einer immunsuppressiven Tumormikroumgebung unterdrücken (Radoja et al., 2000). Tumorzellen fördern die Ausbildung eines solchen Milieus, indem sie einen Teil der immunsuppressiven Mediatoren selbst exprimieren und inhibitorische Zellen in ihre Umgebung rekrutieren (DeNardo & Coussens, 2007; Vesely et al., 2011). Zu den

häufigsten suppressiven Immunzellen in Brusttumoren gehören regulatorische T-Zellen (Treg) und Myeloide Suppressorzellen (MDSC) (Schreiber et al., 2011). Treg zählen neben den Typ-1-T-Helferzellen (Th1), Typ-2-T-Helferzellen (Th2), Typ-17-T-Helferzellen (Th17) und den folliculären T-Helferzellen (Tfh), welche alle zu den Effektorzellen gehören, zu den wichtigsten Subpopulationen der CD4⁺ T-Zellen. Sie besitzen jedoch eine gegensätzliche Wirkung (Zhu & Zhu, 2020). Ihre suppressive Wirkung entfalten die Treg zum einen direkt über Zell-Zell-Kontakte und zum andern über die Expression hemmender Faktoren (Gabrilovich & Nagaraj, 2009; Sakaguchi et al., 2010). Zu den wichtigsten immunsuppressiven Faktoren in der TME gehören Interleukin-10 (IL-10) und *transforming growth factor* β (TGF- β). IL-10 sorgt unter anderem für eine verminderte Expression von MHC- und kostimulierenden Molekülen auf Antigen-präsentierenden Zellen (engl. *antigen-presenting cells*, APCs) und hemmt darüber die Aktivierung der Immuneffektorzellen (Sato et al., 2011). TGF- β hemmt aktiv T-Effektorzellen und Natürliche Killerzellen in ihrer Funktion (Wrzesinski et al., 2007), ist an der Umwandlung ruhender CD4⁺ T-Zellen zu Treg beteiligt (Olkhanud et al., 2011) und sorgt für die Rekrutierung und Aktivierung von CAFs (Shi et al., 2020; Tang et al., 2019). Diese produzieren wiederum eine Vielzahl inhibitorischer Zytokine und locken weitere regulatorische Immunzellen an (Jung et al., 2016; Luque et al., 2021; Monteran & Erez, 2019). Daneben spielen die bereits beschriebenen Immun-Checkpoints und das Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung einer immunsuppressiven TME. IDO wird von Tumorzellen und anderen stromalen Zellen produziert und wirkt hemmend auf CD8⁺ T-Zellen, indem es das für deren Proliferation notwendige Tryptophan abbaut (Uyttenhove et al., 2003; Ye et al., 2018). Insgesamt sind an der Ausbildung einer immunsuppressiven TME eine Vielzahl an löslichen Faktoren und Zellen beteiligt, die durch ein komplexes Zusammenspiel für die Unterdrückung der Immunantwort sorgen (Vesely et al., 2011).

1.3.3 Physikalische Diffusionsbarriere

Ein weiterer Grund für die geringe Anzahl von Immunzellen im Bereich der Tumorzellen ist die dichte extrazelluläre Matrix (EZM) (Jiang et al., 2016; Lindblad et al., 2021; Salmon et al., 2012; Vonderheide & Bear, 2020). Sie ist der azelluläre Bestandteil des Tumorstromas, welches die Tumorzellverbände umgibt. Die EZM setzt sich aus der Basalmembran und der interstitiellen Matrix zusammen. Die interstitielle Matrix wird aus einem Netzwerk von Strukturproteinen gebildet, in welches eine gelartige Grundsubstanz eingelagert ist (Roy & Walsh, 2014). Neben Elastin und Fibrillin besteht das Fasernetz vor allem aus fibrillärem Kollagen. Die hydrophile Grundsubstanz wird

hauptsächlich von Hyaluronsäure und Proteoglykanen, aber auch von den Glykoproteinen Fibronectin und Laminin gebildet (reviewed in Barry-Hamilton et al., 2010; Christoph Wagener, 2010, p. 327; Jain, 1987; Oskarsson, 2013; Shirley Ayad, 1998, pp. 11-17).

Charakteristisch für Brustkrebs ist eine starke Fibrotisierung der Matrix, die auch Desmoplasie genannt wird. Zu den desmoplastischen Tumoren gehören auch das Prostatakarzinom, das Pankreaskarzinom, das Ovarialkarzinom und das Magenkarzinom (Christoph Wagener, 2010, p. 327; Neesse et al., 2011). Dabei agiert die EZM als eine Art Diffusionsbarriere und hindert die Immunzellen daran zu den Tumorzellen zu gelangen (Kuczek et al., 2019; Mariathasan et al., 2018). Dadurch sind die Immunzellen vorwiegend im Tumorstroma, kaum aber im Bereich der Tumorzellnester zu finden (Abbildung 2).

Durch eine gesteigerte Ablagerung und Vernetzung der Matrix-Komponenten, insbesondere des Kollagens, kommt es zur Versteifung des Gewebes (Cirri & Chiarugi, 2012; Kaupila et al., 1998). Auslöser für die erhöhte Matrixsynthese und -vernetzung ist ein chronischer Entzündungsprozess in der TME (Mantovani et al., 2008). Dadurch exprimieren die Immunzellen und zum Teil die Tumorzellen selbst vermehrt Wachstumsfaktoren wie TGF- β , *platelet-derived growth factor* (PDGF) oder *fibroblast growth factor 2* (FGF2). Diese Wachstumsfaktoren führen zur Rekrutierung und Aktivierung von CAFs. Sie sind die Hauptquelle der EZM-Bestandteile und im Gegensatz zu gewöhnlichen Fibroblasten kontinuierlich synthetisch aktiv (Kalluri, 2016). Neben der vermehrten Matrixproduktion sorgen sie außerdem für eine gesteigerte Vernetzung des Kollagens durch die Überexpression gewisser Enzyme wie Lysyloxidasen (LOX) und Lysylhydroxylasen (LH) (Gilkes et al., 2013; Kirschmann et al., 2002; Peyrol et al., 1997). Auslöser dafür ist ein erhöhter Spiegel von TGF- β und des Hypoxie-induzierten Faktors 1 α (HIF-1 α) in der TME (Egeblad et al., 2010; van der Slot et al., 2005). Sowohl LOX wie auch LH spielen eine entscheidende Rolle bei der Quervernetzung des Kollagens (Gilkes et al., 2013; Lucero & Kagan, 2006; Pinnell & Martin, 1968; Siegel, 1979; van der Slot et al., 2003; Yamauchi et al., 2019).

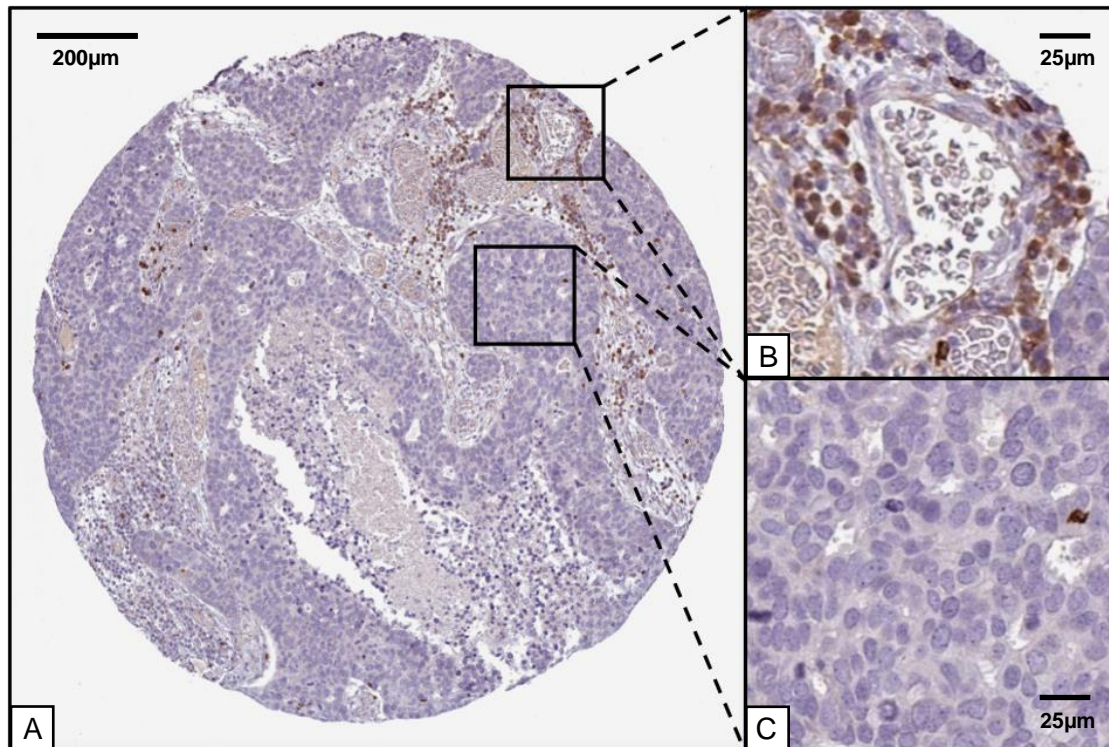


Abbildung 2: Verteilung CD8⁺ T-Zellen im Mammakarzinom
A Querschnitt eines Brusttumors. Die violetten Bereiche zeigen Ansammlungen von Tumorzellen. Die helleren Bereiche zwischen den Tumorzellnestern stellen die EZM dar. Die braun angefärbten Zellen sind CD8⁺ T-Zellen. **B** Ausschnitt aus der EZM. Im Zentrum ist ein Gefäß erkennbar. Um das Gefäß herum befindet sich eine Vielzahl von CD8⁺ T-Zellen. **C** Ausschnitt aus einem Tumorzellnest. Zwischen den Tumorzellen ist lediglich eine einzelne CD8⁺ T-Zelle vorhanden. Lichtmikroskopische Aufnahme aus dem Proteinatlas (The Human Protein Atlas, 2022b).
 Durchmesser des Tumorschnitts: ca. 1400µm

1.4 Therapeutischer Ansatz zur Verbesserung der Immunzellinfiltration

In Brusttumoren, wie auch in vielen anderen Tumoren, ist die Immunzellinfiltration auf unterschiedliche Weise gestört (Joyce & Fearon, 2015; Thomas et al., 2018). Die geringe Anzahl intratumoraler Immuneffektorzellen limitiert dabei den Erfolg von ICI. Für diese Tumore besteht daher die dringende Notwendigkeit der Entwicklung neuer Medikamente zur Steigerung der Immunzellinfiltration. Diese Medikamente könnten als Kombinationstherapie mit ICI eingesetzt werden und deren Wirkung verstärken. Da die Mechanismen des Tumors, die die Immunzellen am Eindringen hindern, vielfältig sind, gibt es auch zahlreiche Ansatzpunkte für neue Therapeutika.

1.4.1 Verbesserung der Immunogenität

Ein möglicher Ansatzpunkt zur Steigerung der Anti-Tumorimmunantwort und damit der Immunzellinfiltration ist die Verstärkung der Immunogenität des Tumors. Dies kann durch gezieltes Induzieren eines immunogenen Zelltods (engl. *immunogenic cell death*,

ICD) erreicht werden (Bröker et al., 2019, pp. 174-176). ICD ist eine Form des Zelltods, die eine Immunantwort auslöst. Verantwortlich hierfür sind bestimmte endogene Moleküle, sogenannte *damage-associated molecular patterns* (DAMPs), die aus dem Zellinneren freigesetzt werden (Galluzzi et al., 2020; Garg et al., 2015; Hodge et al., 2013; Kenneth Murphy, 2018, p. 96; Zhu et al., 2021). Zur Exposition der DAMPs kommt es, wenn die Zelle bestimmten Stressfaktoren ausgesetzt ist, die zur Ruptur der Zellmembran und dadurch zur Freisetzung des gesamten Zellinhalts führen (Murao et al., 2021). Solche Stressreize können beispielsweise die Bestrahlung des Tumors oder der Einsatz von Chemotherapeutika sein (Kepp et al., 2014; Tesniere et al., 2008; Vanneman & Dranoff, 2012; Y. Wang et al., 2018). Deshalb kamen ICI bereits mehrfach in Kombination mit diesen beiden Therapien zum Einsatz (Herrera et al., 2019; Judd & Borghaei, 2020; Keam et al., 2020; Weinberg & Gadgeel, 2019).

1.4.2 Antifibrotische Therapie

Eine weitere Möglichkeit zur Erleichterung der Immunzellinfiltration ist die Auflockerung der EZM. Dies kann durch den Abbau bereits bestehender Matrix erfolgen. Da für die Fibrose vor allem das dicht vernetzte Kollagen verantwortlich ist, können für die Degradierung der Matrix Kollagenasen eingesetzt werden. Sie gehören zur Gruppe der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und katalysieren die hydrolytische Spaltung von Kollagenmolekülen (Chung et al., 2004; Levine, 2011, p. 127f). Neben Kollagen ist Hyaluron eines der wichtigsten Bestandteile der EZM. Für dessen Abbau werden Hyaluronidasen eingesetzt. In präklinischen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass sich die Medikamentenaufnahme einiger Tumore durch den Einsatz dieser beiden Enzyme verbesserte (Choi et al., 2006; Eikenes et al., 2004; Erikson et al., 2008; Guan et al., 2018; Jacobetz et al., 2013; X. Wang et al., 2018). Guan und seine Forschungsgruppe konnten beim Einsatz von Hyaluronidasen eine gesteigerte Infiltration von zytotoxischen CD8⁺ T-Lymphozyten in Melanomen beobachten (Guan et al., 2018). Statt den Abbau der vorhandenen Matrix zu fördern, kann auch die Produktion neuer Bestandteile gehemmt werden. Angriffspunkte hierfür sind entweder die CAFs selbst oder die Signalwege, die zu einer gesteigerten Expression führen (Takai et al., 2016). Nicht nur die Synthese selbst, sondern auch die nachfolgende Vernetzung der EZM kann gestört werden. Dies kann durch die Inhibition der in 1.3.3 erwähnten vernetzenden Enzyme LOX oder LH erreicht werden (Barry-Hamilton et al., 2010; Rossow et al., 2018; Santhanam et al., 2010; Zuurmond et al., 2005). Für die Hemmung von LOX kann beispielsweise 3-Aminopropionitril genutzt werden (Rossow et al., 2018). LH, für die das Gen Prokollagen-Lysin-2-Oxoglutarat-5-Dioxygenase 2 (PLOD2) kodiert,

können durch einen PLOD2-Hemmer wie Minoxidil gehemmt werden (Du et al., 2017; van der Slot et al., 2003; Zuurmond et al., 2005). Der Faktor, der sowohl die Kollagen- und Hyaluronsynthese, als auch die Expression der Lysyloxidasen steigert, ist TGF- β (Voloshenyuk et al., 2011; Xie et al., 2013). Durch dessen Hemmung in Kombination mit einem PD-L1-Inhibitor konnte bereits in einer präklinischen Studie in Mamma- und Kolonkarzinomen eine Steigerung der CD8⁺ Immunzellinfiltration beobachtet werden (Mariathasan et al., 2018).

1.4.3 Aufhebung der Immunsuppression

TGF- β fördert neben der Synthese und der Vernetzung der EZM auch die Ausbildung einer immunsuppressiven TME (Batlle & Massagué, 2019; Larson et al., 2020; Van der Jeught et al., 2015). Das Wegfallen der immunsuppressiven Wirkung durch die Hemmung von TGF- β könnte bei der Studie von Mariathasan et al. auch Ursache für die gesteigerte Immunzellinfiltration gewesen sein (Mariathasan et al., 2018). Die Blockierung immunsuppressiver Zytokine stellt damit einen weiteren Ansatz zur Verbesserung der Immunzellinfiltration dar. Eine Alternative ist die Verabreichung immunstimulierender Zytokine in die TME. Zu diesen gehören Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-12 (IL-12) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (Van der Jeught et al., 2015). Bei einer Phase 1 Studie von Diab et al. wurden solide Tumore mit einer Kombination aus einem IL-2-Signalweg-Agonisten und einem PD-1-Inhibitor behandelt. Dabei konnte eine gesteigerte Infiltration und Aktivität der CD8⁺ T-Zellen beobachtet werden (Diab et al., 2020).

1.5 Möglichkeiten zur Darstellung und Quantifizierung der Immunzellinfiltration in Brusttumoren

Bevor neue medikamentöse Ansätze zur Steigerung der Immunzellinfiltration in der Krebstherapie zum Einsatz kommen, muss deren Wirkung in präklinischen Studien getestet werden. Um zu evaluieren, inwiefern sich die Anzahl bzw. die räumliche Verteilung der Immunzellen durch die Gabe der einzelnen Medikamente verändert, ist eine zuverlässige Methode zur Darstellung und Quantifizierung der Immunzellen in den Tumoren notwendig.

1.5.1 Durchflusszytometrie

Eine Möglichkeit zur quantitativen Analyse der Immunzellen in der Tumormikroumgebung ist die Durchflusszytometrie. Grundlage dafür ist die Unterscheidung der Zellpopulationen mithilfe unterschiedlicher Fluorophor-gekoppelter

Antikörper (Kenneth Murphy, 2018, p. 1002). Die Durchflusszytometrie kann allerdings ausschließlich an Einzelzellsuspensionen angewendet werden, weshalb solide Tumore dafür vorher dissoziiert werden müssen (Rothe, 2007, p. 60). Sie wird deshalb auch als destruktive Methode bezeichnet (Chen et al., 2019). Dadurch gehen sämtliche Informationen über die räumlichen Beziehungen und die Verteilung der Zellen verloren. Die so ermittelten Daten geben lediglich Auskunft über die Anzahl bzw. das Verhältnis der einzelnen Zelltypen (Young et al., 2016). Für die Entwicklung der Gesamtzahl CD8⁺ T-Zellen durch eine Behandlung ist dieses Verfahren geeignet (Diab et al., 2020; Mariathasan et al., 2018). Um zu sehen, wie sich die Position der Zellen innerhalb des Tumors verändert, werden dagegen andere Verfahren benötigt. Es macht einen großen Unterschied, ob sich die Immunzellen am Rand, im Tumorstroma oder in unmittelbarer Nähe der Tumorzellen befinden.

1.5.2 Immunfluoreszenz an Paraffinschnitten

Eine grobe Übersicht über die Position und die Verteilung der Immunzellen kann durch die Anfärbung histologischer Paraffinschnitte mittels Immunfluoreszenz gewonnen werden. Die Schnitte sind aber in der Regel nur einige wenige Mikrometer dünn und zeigen damit nur kleine Ausschnitte aus dem Gewebe. Da Brusttumore sehr heterogen in ihrer Struktur sind, sind einzelne Schnitte nicht repräsentativ für den gesamten Tumor. Wird zufällig ein Schnitt gewählt, der eine aufgelockerte nekrotische Struktur aufweist, wird sich das Ergebnis deutlich von einem Schnitt desselben Tumors mit dichtem Tumorgewebe unterscheiden. Bei unglücklicher Wahl der Schnitte kann schnell ein falscher Eindruck entstehen, der zu Fehlschlüssen führen kann. Neben diesem Aspekt ist die Tatsache, dass sich die Informationen lediglich auf den zweidimensionalen Bereich beziehen, der größte Nachteil, da mögliche Lagebeziehungen nicht in vollem Umfang ausgewertet werden können. Für ein umfassendes Verständnis dafür, wie sich ein Medikament auf die Anzahl bzw. die räumliche Verteilung der Immunzellen im Tumor auswirkt, ist eine dreidimensionale (3D) Darstellung der Zellen im Gewebe zwingend notwendig (Hofmann et al., 2020; Pichat et al., 2018).

1.5.3 Rekonstruktion von 2D-Schnitten zu 3D-Volumina

Eine 3D-Darstellung der Zellen im Gewebe ist durch die digitale Rekonstruktion serieller Dünnschnitte möglich. Dabei wird das Gewebe in dünne Schnitte sequenziert, welche einzeln gefärbt und anschließend aufgenommen werden. Die digitalen 2D-Bilder werden dann im Nachhinein wieder Schicht für Schicht zusammengefügt, wodurch erneut ein 3D-Volumen entsteht (Grothausmann et al., 2017). Die 3D-Rekonstruktion der einzelnen

Schichten bringt jedoch mehrere Nachteile mit sich. So wird die Morphologie des Gewebes durch die histologischen Schritte wie Schneiden, Fixieren oder Färben zum Teil stark verändert. Dabei entstandene Artefakte wie Verzerrungen, Schrumpfungen, inhomogene Intensitäten, Falten, Risse und Löcher erschweren die Rekonstruktion und Auswertung (Pichat et al., 2018). Darüber hinaus ist es eine sehr aufwendige Methode, da immens viele Schnitte zur Darstellung eines Gewebestücks benötigt werden. Ein 1mm dickes Stück müsste beispielsweise aus 500 2µm dicken Schnitten rekonstruiert werden (Parfitt, 2019). Insgesamt ist diese Methode nicht nur äußerst zeit- und arbeitsintensiv, sondern zudem sehr fehleranfällig.

1.5.4 3D-Bildgebung von Gewebestücken

Nach einem ähnlichen Prinzip aber mit viel geringerem Aufwand funktioniert die optische Sektionierung eines Gewebestücks am Lichtblattmikroskop (engl. *light sheet fluorescence microscope*, LSFM). Auch hier werden 2D-Bilder im Nachhinein zu einem 3D-Konstrukt rekonstruiert. Allerdings wird die Probe in diesem Fall nicht mechanisch, sondern optisch geschnitten, indem sie schichtweise mit einem Lichtblatt durchleuchtet wird. Dadurch werden selektiv Fluorophore der jeweiligen Schicht angeregt. Das dabei ausgelöste Fluoreszenzsignal wird dann von der Kamera des LSFM detektiert. So wird die Probe Schicht für Schicht aufgenommen. Je nach Dicke des Lichtblatts kann eine 1mm dicke Probe in bis zu 1000 Einzelbilder zerlegt werden. Dieser Bilderstapel, auch *z-stack* genannt, kann im Anschluss wieder zu einem 3D-Volumen rekonstruiert werden (Gopi Shah, 2017, p. 244 f; Selchow & Huiskens, 2013). Voraussetzung für die 3D-Bildgebung ist, dass das Gewebe zuvor geklärt, also durchsichtig gemacht wird. Dafür wurden bereits unterschiedliche Ansätze entwickelt (Chung et al., 2013; Ertürk et al., 2012; Ke et al., 2013; Klingberg et al., 2017; Renier et al., 2014; Susaki et al., 2014). Die Herausforderung besteht darin, dass die Antikörper die dicken Gewebestücke vollständig penetrieren müssen. Bei einigen Geweben, wie beispielsweise bei Brusttumoren, ist die Antikörperpenetration mittels Diffusion durch die steife und dicht vernetzte EZM eingeschränkt (Beyer et al., 2011; Henke et al., 2019; Lloyd-Lewis et al., 2016; Xu et al., 2023).

Um die Diffusion zu umgehen, wurden in einigen Studien transgene Mäuse verwendet. Diese wurden genetisch so modifiziert, dass sie in den jeweiligen Zielzellen fluoreszierende Proteine exprimieren (Chalfie et al., 1994; Chung et al., 2013; Ertürk et al., 2011; Puelles et al., 2019). Eine weitere Methode, die eine homogene Färbung im 3D-Gewebe ermöglicht, ist die intravenöse Injektion der fluoreszierenden Antikörper

(Klingberg et al., 2017; Merz et al., 2019; Pan et al., 2019). Allerdings sind dafür große Antikörpermengen und eine Tierlizenz erforderlich (Hofmann et al., 2020). Wesentlich weniger Aufwand und Antikörperverbrauch erfordert das nachträgliche Anfärben von fixiertem Gewebe mittels Diffusion. Die fixierten Proben können zudem bis zur Färbung gelagert werden, wodurch zeitlich flexibel geplant werden kann. Außerdem ermöglicht das nachträgliche Anfärben, dass Stücke desselben Tumors mit unterschiedlichen Antikörpern gefärbt werden können.

Es gab bereits vereinzelte Versuche, dicke Stücke von Brusttumoren mittels Immunhistochemie anzufärben und 3D abzubilden. Lloyd-Lewis und sein Team testeten 2016 beispielsweise unterschiedliche Clearing- und Immunfluoreszenzmethoden zur Abbildung von Brustdrüsen und Brusttumoren in 3D. Dabei stellte sich die Färbung der Tumore viel schwieriger heraus als die der Brustdrüse. Während 1,5mm dicke Stücke der gesunden Brust vollständig angefärbt und aufgenommen werden konnten, gelang es bei den Tumoren gerade einmal eine 100µm dicke Schicht zufriedenstellend abzubilden. Hier wurden allerdings keine Immunzellen, sondern HER2-Rezeptoren, Zellkerne und Cytokeratin-8 angefärbt (Lloyd-Lewis et al., 2016).

Eine Studie bei der Immunzellen dargestellt wurden, ist die von Chen et al. Hier wurden 500µm dicke Schnitte menschlicher Brusttumore unter anderem mittels CD3 Antikörper angefärbt und aufgenommen. Da die Antikörper hier von beiden Seiten diffundieren konnten, kann davon ausgegangen werden, dass sie jeweils 250µm tief in die Probe kamen (Chen et al., 2019).

1.6 Ziel der Arbeit: Methode zur in vitro 3D-Färbung von Immunzellen in Brusttumoren

Brusttumore gehören zu den Tumortypen, die bisher kaum auf die Behandlung mit ICI ansprechen. Ausschlaggebend hierfür sind verschiedene Mechanismen des Tumors, die die Immunzellen am Eindringen in die Tumorzellnester hindern. Für diese Tumore ist die Entwicklung von Kombinationstherapien sehr wichtig. Dabei sollen Immuntherapeutika gleichzeitig mit Medikamenten eingesetzt werden, welche die Immunzellinfiltration verbessern. Möglichkeiten, den Behandlungserfolg dieser Medikamente in präklinischen Studien zu evaluieren, sind bisher begrenzt. Für ein umfassendes Verständnis der Auswirkungen der Behandlung bedarf es der 3D-Visualisierung und Quantifizierung der Immunzellen im Tumorgewebe. Da CD4⁺ T-Helferzellen und CD8⁺ T-Lymphozyten die wichtigsten Immunzellen bei der Tumorbekämpfung und deshalb beliebtes Ziel in der

Immuntherapie sind, ist die Darstellung dieser beiden Zellpopulationen sinnvoll. Eine zuverlässige Methode zur Anfärbung und Darstellung von T-Zellen in größeren Tumorstücken mittels Fluoreszenzmikroskopie gibt es aktuell noch nicht. Deshalb ist das Ziel dieser Arbeit die Etablierung eines Immunfluoreszenzfärbeverfahrens zur 3D-Darstellung und Quantifizierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in Brusttumoren. Dies soll durch schrittweises Austesten unterschiedlicher Inkubationszeiten, Puffer und Antikörper erreicht werden. Angestrebt wird eine tiefreichende homogene Färbung des Gewebes. Die Ergebnisse der einzelnen Versuche werden jeweils am Lichtblatmikroskop dokumentiert und anschließend mithilfe einer speziellen Bildanalyse-Software optimiert und ausgewertet. Bei der Bildprozessierung werden ebenfalls unterschiedliche Einstellungen und Modifikationen getestet, um schließlich das bestmögliche Ergebnis zu erhalten.

Die dichte EZM behindert sowohl die Infiltration der T-Zellen in die TME, als auch die der für die Detektion verwendeten Antikörper. Die Schwierigkeit besteht nun darin zu unterscheiden, ob sich in bestimmten Bereichen tatsächlich keine Immunzellen befinden oder ob eine ungenügende Antikörperpenetration der Grund für ein fehlendes Signal ist. Eine Aussage darüber, ob die Färbung das ganze Gewebe durchdrungen hat oder nicht, lässt sich hier kaum treffen. Leichter fällt dies durch das Anfärben der Tumorgefäße. Da diese in der Regel nicht abrupt enden, kann die Kontinuität der Färbung hier besser nachvollzogen werden. Zunächst wird deshalb versucht schrittweise eine Methodik zur durchgängigen Färbung der Blutgefäße zu etablieren. Gelingt dies, so kann davon ausgegangen werden, dass die Antikörper mithilfe des erarbeiteten Protokolls das Gewebe vollständig durchdringen können. Im nächsten Schritt sollen dann im Zuge einer Dreifachfärbung zusätzlich die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mit angefärbt werden. Final soll die Methode dafür verwendet werden, um die Immunzellinfiltration unterschiedlich behandelte Tumore miteinander zu vergleichen. Eines der beiden zu testenden Medikamente ist ein PLOD2-Inhibitor. Der erhoffte Effekt dieser Behandlung ist eine Verringerung der Kollagenquervernetzungen und damit eine Verstärkung der T-Lymphozyten-Infiltration in die Tumorzellnester. Das zweite Medikament ist ein PD-L1-Inhibitor. Es sollte die Aktivität der eingedrungenen T-Zellen steigern, indem es deren Hemmung verhindert. Beide Medikamente werden jeweils einzeln und als Kombinationstherapie getestet.

2 Material und Methoden

2.1 Ethik- und Tierversuchsvotum

Für die Arbeit wurde archiviertes Material aus einem früheren Tierversuchsvorhaben verwendet (Regierung von Unterfranken AZ: 55.2-2531.01-74/12).

2.2 Verwendete Materialien

2.2.1 Antikörper

Tabelle 1: Liste der verwendeten Primärantikörper

Zielstruktur	Ursprung	Verdünnung	Markierung	Firma
CD31	Kaninchen	1:50	PECAM-1 (Endothelzellen)	Abcam (ab28364)
CD34	Maus	1:50	Endothelzellen	DAKO (M7164)
CD8a	Ratte	1:50	CD8 ⁺ -T- Lymphozyten	Invitrogen (14- 0808-82)
CD4	Ratte	1:50	CD4 ⁺ -T- Lymphozyten	Abcam (ab25475)
CD4	Meer- schweinchen	1:50	CD4 ⁺ -T- Lymphozyten	SySy (HS-360 004)
CD4	Ratte	1:50	CD4 ⁺ -T- Lymphozyten	Invitrogen (14- 0041-82)
CD4	Kaninchen	1:50	CD4 ⁺ -T- Lymphozyten	Sino Biological (50134-R766)

Tabelle 2: Liste der verwendeten Sekundärantikörper

Konjugat	Ursprung	Verdünnung	Firma
Cy5	Ziege (Anti-Kaninchen)	1:200	Jackson ImmunoResearch (JIR) (111-175-144)
Cy5	Ziege (Anti-Ratte)	1:200	JIR (112-175-143)
Alexa 750	Ziege (Anti-Kaninchen)	1:100/ 1:200	Invitrogen (A-21039)
Alexa 647	Ziege (Anti-Meerschweinchen)	1:100/ 1:200	Invitrogen (A-21450)
Cy3	Ziege (Anti-Ratte)	1:100/ 1:200	Abcam (ab98416)
Alexa 647	Ziege (Anti-Ratte)	1:200	JIR (112-605-143)
Alexa 647	Ziege (Anti-Kaninchen)	1:200	Invitrogen (A-21246)
Cy3	Ziege (Anti-Kaninchen)	1:200	JIR (111-165-003)

2.2.2 Reagenzien

Tabelle 3: Liste der verwendeten Reagenzien

Reagenz	Hersteller	Artikelnummer
Ethyl-Cinnamate/ Zimtsäureethylester	Sigma-Aldrich	W243000-1KG-K
N,N,N,N'-Tetrakis (2-hydroxypropyl) ethylendiamin	Sigma-Aldrich	122262-1L
Harnstoff	AppliChem	A1049
Triton X-100	Sigma-Aldrich	T9284
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich	A9647
Tween-20	Roth	9127.1
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth	4720.2
Ziegen Serum	Sigma-Aldrich	G9023
Paraformaldehyd (PFA)	Roth	0335.4
Methyl- β -Cyclodextrin	Sigma-Aldrich	C4555-1G
trans-1-Acetyl-4-hydroxy-L-prolin	Sigma-Aldrich	441562-10G
Natriumazid	Roth	K305.1
Ethanol (EtOH) absolute	Sigma-Aldrich	32205-2.5L-M
Natriumchlorid	Roth	P031.2/ 3957.2
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 35%	Roth	9683.1
Glycin	Roth	3908.3
EtOH 99%, vergällt mit 1% Methylethylketon (MEK)	Nordbrand	Sorte 642

2.2.3 Lösungen

Tabelle 4: Liste der verwendeten Puffer und Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i> , PBS)	137mM Natriumchlorid 2,68mM Kaliumchlorid 9,58mM di-Natriumhydrogenphosphat 1,47mM Kaliumdihydrogenphosphat
CUBIC 1	2,5g N,N,N',N'-Tetrakis(2-hydroxypropyl)ethylendiamin 2,5g Harnstoff 1,5ml Triton X-100 3,5ml PBS
CUBIC 1A	253mg N,N,N',N'-Tetrakis(2-hydroxypropyl)ethylendiamin 500mg Harnstoff 500µl Triton X-100 7,3mg Natriumchlorid 3,75ml destilliertes Wasser
Waschpuffer	200µl Tween-20 99,8ml PBS
Blockpuffer 1	200µl 10%iges Triton X-100 600mg BSA 1ml DMSO 8,2ml PBS
Blockpuffer 2	250µl 10% Triton X-100 500µl Ziegenserum 4,25ml PBS
Immunfärbungslösung	1ml 10%iges Triton X-100 13,1mg Methyl-β-Cyclodextrin 40mg trans-1-Acetyl-4-hydroxy-L-prolin 10mg Natriumazid 1,5% Ziegenserum

Lösung	Zusammensetzung
Antikörperpuffer	40µl Tween-20 18,36ml PBS 600mg BSA 1ml DMSO
H ₂ O ₂ -haltige Entfärbungsreagenz	1ml 35%iges H ₂ O ₂ 1ml DMSO 3ml EtOH
Penetrationspuffer	2ml Triton X-100 200ml 1.5M Glycin 598ml PBS

2.2.4 Geräte

Tabelle 5: Verwendete Geräte

Gerät	Name	Hersteller
Konfokales Mikroskop	Nikon Eclipse Ti-A1	Nikon
Lichtblattfluoreszenzmikroskop	20x Lichtblattfluoreszenz-mikroskop	Universität Würzburg
Präzisionswaage	Kern PLJ-G	Kern
Schüttler	DUOMAX1030	Heidolph
Inkubations-Schüttler	Certomat IS	B. Braun Biotech International
Mischer	Mini-3D-Mischer	SLG
Vortex	Genie 2	Scientific Industries

2.2.5 Softwareprogramme

Tabelle 6: Verwendete Softwareprogramme

Software	Hersteller
ImageJ 1.53c	Wayne Rasband, National Institutes of Health
Imaris File Converter 9.8.0	Oxford Instruments
Imaris 9.8.0	Oxford Instruments
Excel, Microsoft 365	Microsoft
Word, Microsoft 365	Microsoft
Power Point, Microsoft 365	Microsoft
R 4.3.1	R Core Team

2.3 Versuchsaufbau

2.3.1 Versuchstiere

Für die vorliegenden Versuche wurden Mäuse des C57BL/6J-Substamms verwendet. Alle Tiere waren weiblich und gleich alt. Sie wurden in kleinen Gruppen von zwei bis drei Tieren in einem 12h/12h Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Im Alter von acht Wochen wurden ihnen AT3-Tumorzellen in das Brustfettpolster des inguinalen Zitzenpaares implantiert. 13 Tage nach der Implantation, nachdem die Tumore ein durchschnittliches Volumen von 50mm³ erreicht hatten, wurde mit der Behandlung begonnen.

2.3.2 Behandlungsgruppen

Die Behandlung erfolgte über sieben Tage. Die Kohorte wurde dabei in drei Behandlungsgruppen und eine Kontrollgruppe unterteilt. Gruppe 1 erhielt täglich 15mg/kg des PLOD2-Inhibitors Minoxidil. Gruppe 2 bekam alle zwei Tage 20mg/kg Bristol-Myers Squibb (BMS)-1166, einen niedermolekularen PD-L1-Inhibitor (Skalniak et al., 2017). Dieser wurde bisher nur für Forschungszwecke zugelassen (biomol, 2021; MedChemExpress, 2021), hat jedoch gegenüber den monoklonalen Antikörpern unter anderem die Vorteile, dass er kostengünstiger, stabiler und kleiner ist (Guzik et al., 2017; Skalniak et al., 2017). Die Tiere der dritten Gruppe erhielten eine Kombinationstherapie beider Medikamente. Die Verabreichung der Medikamente erfolgte intraperitoneal. Dazu wurden 20mg/ml Minoxidil in EtOH gelöst und vor der Injektion zehnfach mit PBS

verdünnt. Bei BMS-1166 wurden 50 mg/ml in DMSO gelöst. Die fertige Injektionslösung enthielt 10% der BMS-1166/DMSO-Lösung, 30% Polyethylenglycol-300 und 60% Wasser. Tiere einer Gruppe erhielten jeweils die Trägerlösung der anderen Gruppe als Kontrollsubstanz. Den Mäusen der Kontrollgruppe wurden beide Lösungen ohne Wirkstoff injiziert. Die Tumorentnahme fand drei Tage nach Ende der Behandlung statt.

2.3.3 Tumorentnahme und Fixierung des Tumorgewebes

Zur Tumorentnahme wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und in Rückenlage fixiert. Daraufhin wurden die Brusttumore mittels Schere und Pinzette freipräpariert und entnommen. Im Anschluss folgte die Fixierung der gewonnenen Proben. Sie dient dazu, die enzymatische Autolyse des Gewebes zu verhindern und gleichzeitig die Morphologie der darzustellenden Antigene zu erhalten (Lang, 2013, p. 49). Als Fixiermittel wurde 4% PFA in PBS verwendet, welches die Stabilisierung des Gewebes durch eine reversible Quervernetzung der Proteine bewirkt (Melan, 1999). Die Tumore wurden darin 24 Stunden lang bei 4°C eingelegt. Während dieses Zeitraums wurde die Fixierlösung mehrmals ausgetauscht. Anschließend wurden die Proben für 45 Minuten in PBS gewaschen und über Nacht in 70% EtOH gelegt. Daraufhin kamen sie für 4 Stunden in 96% EtOH. Bis zur Weiterverwendung wurden sie in 100% EtOH gelagert.

2.3.4 Färbeprinzip 3D-Immunhistochemie

Die Immunhistochemie basiert auf der spezifischen Bindung eines Antikörpers an sein zugehöriges Zielepitop. Sie ermöglicht es, spezifische Strukturen im Gewebe nachzuweisen und zu visualisieren (Im et al., 2019; Lang, 2013, p. 270). Dabei besitzt jede Zellpopulation für sich charakteristische Oberflächenmerkmale. Zellen des Immunsystems können beispielweise anhand sogenannter *cluster of differentiation* (CD)-Moleküle voneinander unterschieden werden (Julius M. Cruse, 2004, p. 47). Für die Markierung dieser Moleküle werden Antikörper verwendet. Zuerst binden unkonjugierte Primärantikörper an das zugehörige Epitop. Im nächsten Schritt werden dann Fluorochrom-gekoppelte Sekundärantikörper, die gegen den Primärantikörper gerichtet sind, dazugegeben. Das Fluorochrom emittiert bei Anregung durch Strahlung einer bestimmten Wellenlänge Licht einer etwas höheren Wellenlänge (Im et al., 2019; Oliver & Jamur, 2010). Vor der eigentlichen Färbung muss das Gewebe permeabilisiert werden. Ziel hiervon ist es, das Gewebe durchlässiger für die Antikörper zu machen. Dabei muss gleichzeitig auf den Erhalt der Antigene geachtet werden. Antikörper binden nicht nur spezifisch an ihr jeweiliges Antigen, sondern können auch unspezifisch an

Strukturen binden, die nicht dargestellt werden sollen (Kalyuzhny, 2016, p. 30). Die unspezifischen Bindungsstellen müssen deshalb vor der Antikörperinkubation blockiert werden, um eine möglichst spezifische Färbung der gewünschten Strukturen ohne unerwünschte Hintergrundfärbung zu erlangen. Die Absättigung dieser irrelevanten Bereiche erfolgt häufig mit BSA oder mit Serum, welches aus derselben Spezies wie die Sekundärantikörper stammt (Kalyuzhny, 2016, p. 30f). Als nächstes erfolgt die Markierung der gewünschten Strukturen mithilfe der Primär- und Sekundärantikörper. Damit im Anschluss an die Färbung tiefreichende 3D-Aufnahmen der Gewebestücke möglich sind, müssen diese vorher optisch geklärt, also transparent gemacht werden. Dadurch werden Streuung und Absorption in der Probe reduziert. Dies ermöglicht dem Laser sowie der durch ihn angeregten Fluoreszenz trotz zunehmender Tiefe einen weitestgehend ungestörten Durchtritt durch das Gewebe. Dies spiegelt sich in einer gesteigerten Signalintensität und damit verbesserten Bildqualität wider. Der Prozess des Transparent-Machens wird optische Klärung oder Clearing genannt. Er basiert auf der Entfernung lichtabsorbierender Pigmente wie Häm und stark lichtstreuender Moleküle wie Lipide und auf der Homogenisierung des Brechungsindex (engl. *refractive index*, RI) innerhalb der Probe (Huang et al., 2019; Masselink et al., 2019; Muntifering et al., 2018).

2.3.5 Modifikationen am Protokoll

Tabelle 7 und Tabelle 8 geben einen Überblick über die inkrementellen Modifikationen der Inkubationszeiten, Puffer und Antikörper. Ausgangspunkt für die Entwicklung des Protokolls war das Tumor-Organoid-Basisprotokoll. Parameter, die sich zum vorausgehenden Versuch verändert haben, sind in den Tabellen rot hervorgehoben.

2.3.5.1 Versuch 1

Für den ersten Versuch wurden die Inkubationszeiten des Basisprotokolls verlängert. Die Färbung wurde einmal an einem 5mm³ großen Tumorstück und einmal an einer 500µm dicken Tumorscheibe durchgeführt. Nach erfolgter Rehydrierung kamen die Proben zur Permeabilisierung statt bisher einer Stunde für insgesamt 24 Stunden bei 4°C in den Penetrationspuffer und anschließend für weitere vier Stunden bei 4°C in den Blockpuffer 1. Nach dem Auswaschen des Blockpuffers wurden die CD31-Primärantikörper aus dem Kaninchen von Abcam (ab28364) zur Markierung der Gefäße 1:50 in Antikörperpuffer verdünnt auf die Stücke gegeben. Die Inkubation erfolgte mehr als doppelt so lang wie bei den Organoiden für insgesamt zwei Tage bei 4°C auf dem Kippbrett. Anschließend wurden ungebundene Antikörper mittels Waschpuffer über 24

Stunden hinweg aus der Probe herausgespült. Analog zu den Primärantikörpern erfolgte die Inkubation mit Cy5-konjugierten Sekundärantikörpern Anti-Kaninchen von Jackson ImmunoResearch (111-175-144). Diese wurden 1:200 verdünnt. Daraufhin folgte die optische Klärung der Proben. Als Klärreagenz wurde Zimtsäureethylester verwendet, welche nach 24 Stunden einmal ausgetauscht und bis zum Mikroskopieren auf den Proben belassen wurde.

2.3.5.2 Versuch 2

Im zweiten Versuch wurden die Inkubationszeiten noch einmal weiter gesteigert. Die Permeabilisierung erfolgte über 48h, das Blockieren über Nacht und die Antikörper inkubierten jeweils für vier Tage. Entsprechend wurden auch die Waschvorgänge von 24 auf 48 Stunden verlängert. Zusätzlich zu den Inkubationszeiten wurde die Probenform etwas modifiziert. Für die Färbung wurde eine 5mm² große und 1,5-2mm dicke Scheibe vom Tumor geschnitten.

2.3.5.3 Versuch 3

Beim nächsten Versuch wurde CUBIC 1 zur Permeabilisierung statt dem bisher genutzten Penetrationspuffer verwendet. Zudem wurde der Antikörperpuffer durch eine bereits in Kombination mit CUBIC 1 eingesetzte Immunfärbungslösung ersetzt (Pan et al., 2019). Nach der Rehydrierung kamen die Proben ca. 48 Stunden lang bei Raumtemperatur (RT) in CUBIC 1. Hier musste ein zusätzlicher Waschschrift eingefügt werden, bei dem CUBIC 1 über einen Zeitraum von 48 Stunden gründlich ausgespült wurde. Anschließend folgten das Blockieren und die Antikörperinkubation in der Immunfärbungslösung. Es wurden dieselben Antikörper wie in den beiden vorherigen Versuchen verwendet.

2.3.5.4 Versuch 4

In Versuch 4 wurde CUBIC 1 durch das geringer konzentrierte CUBIC 1A ersetzt. Zudem wurde der Blockpuffer 2 statt der zuvor verwendeten Immunfärbungslösung eingesetzt (Lloyd-Lewis et al., 2016). Das Tumorstück kam diesmal bei 37°C unter leichtem Schütteln für 48 Stunden in CUBIC 1A.

2.3.5.5 Versuch 5

Im nächsten Schritt wurde die Probe vor der Rehydrierung über Nacht mit einem H₂O₂-haltigen Entfärbungsreagenz behandelt. Die nachfolgenden Schritte wurden analog zu Versuch 4 durchgeführt.

2.3.5.6 Versuch 6

Im weiteren Vorgehen wurde eine Dreifachfärbung von Gefäßen, CD4⁺ und CD8⁺ Zellen angestrebt. Das Protokoll wurde von Versuch 4 übernommen. Zur Markierung der Gefäße wurde der bereits bewährte CD31-Primärantikörper aus dem Kaninchen von Abcam (ab28364) zusammen mit dem Alexa 750-Sekundärantikörper Anti-Kaninchen von Invitrogen (A-21039) verwendet. Für die Immunzellen kamen der CD4-Primärantikörper aus dem Meerschweinchen von SySy (HS-360 004) mit dem Alexa 647-Sekundärantikörper Anti-Meerschweinchen von Invitrogen (A-21450) und der CD8-Primärantikörper aus der Ratte von ThermoFisher (14-0808-82) mit dem Cy3-Sekundärantikörper Anti-Ratte von Abcam (ab98416) zum Einsatz.

2.3.5.7 Versuch 7

Dieser Versuch wurde fast identisch zum Vorherigen durchgeführt. Einzige Änderung war die Verdünnung der Sekundärantikörper auf 1:100.

2.3.5.8 Versuch 8

Im achten Versuch wurden geeignete Primärantikörper gesucht. Dafür wurden der CD4-Antikörper aus der Ratte von Invitrogen (14-0041-82), der CD4-Antikörper aus dem Kaninchen von SinoBiological (50134-R766) und ein anderer CD4-Antikörper aus der Ratte von Abcam (ab25475) verwendet. Um auszuschließen, dass sich in den beiden vorherigen Versuchen die Antikörper gegenseitig negativ beeinflusst haben, wurden der CD4-Antikörper aus dem Meerschweinchen von SySy (HS-360 004) und der CD8-Antikörper aus der Ratte von Invitrogen (20-8080-82) nochmal als Einzelfärbung getestet. Alle Primärantikörper wurden mit Alexa 647-Sekundärantikörpern kombiniert. Diese waren Anti-Ratte Alexa 647 von Jackson ImmunoResearch (112-605-143), Anti-Kaninchen Alexa 647 von Invitrogen (A-21246) und Anti-Meerschweinchen Alexa 647 von Invitrogen (A-21450).

2.3.5.9 Versuch 9

In diesem Schritt wurden parallel zwei Doppelfärbungen mit CD4 und CD8 durchgeführt. Der CD8-Primärantikörper aus der Ratte von Invitrogen (20-8080-82) wurde bei beiden Färbungen mit dem Alexa 647-Sekundärantikörper Anti-Ratte von Jackson ImmunoResearch (112-605-143) kombiniert, da sich diese Kombination bereits bewährt hatte. Der CD4-Primärantikörper aus dem Kaninchen von SinoBiological (50134-R766) wurde einmal in Kombination mit dem Anti-Kaninchen Cy3-konjugierten

Sekundärantikörper von Jackson ImmunoResearch (111-165-003) und einmal mit dem Anti-Kaninchen Alexa 750-Sekundärantikörper von Invitrogen (A-21039) getestet.

2.3.5.10 Versuch 10

Für den letzten Versuch wurde je eine Probe aus jeder Behandlungs- bzw. aus der Kontrollgruppe genommen. Verwendete Antikörper waren der CD8-Primärantikörper aus der Ratte von Invitrogen (20-8080-82) zusammen mit dem Alexa 647-Sekundärantikörper Anti-Ratte von Jackson ImmunoResearch (112-605-143) und der CD4-Antikörper aus dem Kaninchen von SinoBiological (50134-R766) in Kombination mit dem Cy3-Sekundärantikörper Anti-Kaninchen von Jackson ImmunoResearch (111-165-0039).

2.3.6 Erarbeitetes Endprotokoll

Das vollständige Protokoll, das letztendlich erarbeitet wurde, wird im Folgenden ausführlich erläutert.

Die Tumore wurden in ca. 1,5-2mm dicke Scheiben geschnitten und rehydriert. Dafür kamen die Tumorscheiben zuerst für vier Stunden und dann über Nacht in 20% DMSO/EtOH. Danach wurden sie in absteigender Reihenfolge in 90% EtOH, 70% EtOH und 50% EtOH gelegt, wobei die Proben bei jedem Schritt für mindestens vier Stunden in der jeweiligen Lösung verweilten. Alle Rehydrierungsschritte erfolgten in 15ml Zentrifugenröhrchen bei 4°C auf dem Kippbrett. Anschließend mussten sie für 24 Stunden in PBS und weitere 24 Stunden in 0,2% Triton X-100/PBS inkubieren. Die Permeabilisierung der Tumorstücke erfolgte drei Tage lang mithilfe von CUBIC 1A bei 37°C und 50 Umdrehungen im Inkubations-Schüttler. Damit die einzelnen Bestandteile bei Benutzung vollständig ineinander gelöst sind, wurde CUBIC 1A bereits zwei Tage vor Verwendung angesetzt und bei 37°C im Inkubations-Schüttler gelagert.

Bevor die Antikörper auf die Proben gegeben wurden, musste CUBIC 1A gründlich ausgewaschen werden. Dazu wurden die Gewebestücke für 48 Stunden im Waschpuffer gewaschen. Zu Beginn wurde der Waschpuffer alle 20 Minuten, danach nochmal nach 24 Stunden ausgetauscht. Anschließend kam jeweils eine Tumorscheibe in ein 2ml Eppendorf-Gefäß und wurde mit 1ml Blockpuffer 2 bedeckt, welcher über Nacht bei 4°C auf den Proben belassen wurde. Daraufhin erfolgte die Primärantikörperinkubation mit dem CD8-Primärantikörper aus der Ratte von Invitrogen (20-8080-82) und dem CD4-Antikörper aus dem Kaninchen von SinoBiological (50134-R766). Diese kamen in einer

Verdünnung von 1:50 in den Blockpuffer 2. Damit die Proben vollständig bedeckt waren und der Antikörperverbrauch dabei gleichzeitig möglichst geringgehalten wurde, wurden 8µl Antikörper in 400µl Blockpuffer 2 verdünnt und auf die Stücke gegeben. Die Primärantikörper inkubierten dann für vier Tage bei 4°C, bevor die Stücke erneut für 48 Stunden mit Waschpuffer gewaschen wurden. Dazu wurde der Puffer anfangs vier bis fünf Mal und nach 24 Stunden ein weiteres Mal gewechselt. Daraufhin erfolgte die Sekundärantikörperinkubation mit dem Alexa 647-Sekundärantikörper Anti-Ratte von Jackson ImmunoResearch (112-605-143) und dem Cy3-Sekundärantikörper Anti-Kaninchen von Jackson ImmunoResearch (111-165-0039). Ab diesem Schritt mussten die Proben stets dunkel gelagert werden, um die Fluoreszenz bestmöglich zu erhalten. Die Sekundärantikörper wurden in einem Verhältnis von 1:200 in Blockpuffer 2 verdünnt und ebenfalls für vier Tage bei 4°C auf den Proben belassen. Sie wurden analog zu den Primärantikörpern über 48 Stunden ausgewaschen.

Vor der abschließenden Klärung des Tumorgewebes wurden die Stücke vollständig dehydriert. Die Dehydrierung erfolgte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (50% EtOH, 70% EtOH, 96% EtOH). Pro Schritt mussten die Stücke für mindestens vier Stunden inkubieren. Zur vollständigen Entfernung des Wassers kamen die Proben danach noch für weitere 24 Stunden in 100% EtOH, welcher alle acht Stunden ausgetauscht wurde. Im letzten Schritt des Protokolls kamen die Proben bis zur Aufnahme in Zimtsäureethylester. Dieses wurde nach 24 Stunden einmal ausgewechselt.

2 Material und Methoden

Tabelle 7: Übersicht der vorgenommenen Modifikationen von Versuch 1 bis Versuch 5
Veränderungen im Vergleich zum Vorversuch in Rot dargestellt

	Ausgangs- Protokoll	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5
Probenform	Organoide	Kubisch (5mm ³) / Scheibe (500µm dick)	Scheibe (1,5-2mm dick)	Scheibe (1,5-2mm dick)	Scheibe (1,5-2mm dick)	Scheibe (1,5-2mm dick)
Entfärbung	x	x	x	x	x	Entfärbungs- reagenz (ON)
Permeabili- sierung	Penetrations- puffer (1h)	Penetrations- puffer (24h)	Penetrations- puffer (48h)	CUBIC 1 (48h)	CUBIC 1A (48h)	CUBIC 1A (3d)
Blockieren	Blockpuffer 1 (1h)	Blockpuffer 1 (4h)	Blockpuffer 1 (ON)	Immunfär- bungslösung (ON)	Blockpuffer 2 (ON)	Blockpuffer 2 (ON)
Antikörper- puffer	Antikörper- puffer (ON)	Antikörper- puffer (2d)	Antikörper- puffer (4d)	Immunfär- bungslösung (4d)	Blockpuffer 2 (4d)	Blockpuffer 2 (4d)
Primär- antikörper	CD31 rb Abcam (ab28364) (1:50)	CD31 rb Abcam (ab28364) (1:50)	CD31 rb Abcam (ab28364) (1:50)	CD31 rb Abcam (ab28364) (1:50)	CD31 rb Abcam (ab28364) (1:50)	CD31 rb Abcam (ab28364) (1:50)
Sekundär- antikörper	Anti-rb Cy5 JIR (111-175-144) (1:200)	Anti-rb Cy5 JIR (111-175-144) (1:200)	Anti-rb Cy5 JIR (111-175-144) (1:200)	Anti-rb Cy5 JIR (111-175-144) (1:200)	Anti-rb Cy5 JIR (111-175-144) (1:200)	Anti-rb Cy5 JIR (111-175-144) (1:200)
Klärung	Zimtsäure- ethylester (2x 24h)	Zimtsäure- ethylester (2x 24h)	Zimtsäure- ethylester (2x 24h)	Zimtsäure- ethylester (2x 24h)	Zimtsäure- ethylester (2x 24h)	Zimtsäure- ethylester (2x 24h)

rb: rabbit/ Känninchen
ON: over night/ über Nacht

rt: rat/ Ratte
d: day/ Tag

gp: guinea pig/ Meerschweinchen
JIR: Jackson ImmunoResearch

h: hour/ Stunde

2 Material und Methoden

Tabelle 8: Übersicht der vorgenommenen Modifikationen von Versuch 6 bis Versuch 10
Veränderungen im Vergleich zum Vorversuch in Rot dargestellt

	Versuch 6	Versuch 7	Versuch 8	Versuch 9	Versuch 10
Probenform	Scheibe (1,5-2mm dick)	Scheibe (1,5-2mm dick)	Scheibe (1,5-2mm dick)	Scheibe (1,5-2mm dick)	Scheibe (1,5-2mm dick)
Entfärbung	x	x	x	x	x
Permeabilisierung	CUBIC 1A (3d)	CUBIC 1A (3d)	CUBIC 1A (3d)	CUBIC 1 (3d)	CUBIC 1A (3d)
Blockieren	Blockpuffer 2 (ON)	Blockpuffer 2 (ON)	Blockpuffer 2 (ON)	Blockpuffer 2 (ON)	Blockpuffer 2 (ON)
Antikörperpuffer	Blockpuffer2 (4d)	Blockpuffer2 (4d)	Blockpuffer2 (4d)	Blockpuffer2 (4d)	Blockpuffer2 (4d)
Primärantikörper	a. CD31 rb Abcam (ab28364) b. CD4 gp SySy (HS-360 004) c. CD8 rt Invitrogen (14-0808-82) (1:50)	a. CD31 rb Abcam (ab28364) b. CD4 gp SySy (HS-360 004) c. CD8 rt Invitrogen (14- 0808-82) (1:50)	a. CD4 gp SySy (HS-360 004) b. CD4 rt Abcam (ab25475) c. CD4 rt Invitrogen (14- 0041-82) d. CD4 rb SinoBiological (50134-R766) e. CD8 rt Invitrogen (14-0808-82) (1:50)	a. CD4 rb SinoBiological (50134-R766) b. CD8 rt Invitrogen (14-0808-82) (1:50)	a. CD4 rb SinoBiological (50134-R766) b. CD8 rt Invitrogen (14-0808-82) (1:50)
Sekundärantikörper	a. Anti-rb A750 Invitrogen (A-21039) b. Anti-gp A647 Invitrogen (A-21450) c. Anti-rt Cy3 Abcam (ab98416) (1:200)	a. Anti-rb A750 Invitrogen (A-21039) b. Anti-gp A647 Invitrogen (A-21450) c. Anti-rt Cy3 Abcam (ab98416) (1:100)	a. Anti-gp A647 Invitrogen (A-21450) b. Anti-rt A647 JIR (112- 605-143) c. Anti-rt A647 JIR (112- 605-143) d. Anti-rb A647 Invitrogen (A-21246) e. Anti-rt A647 JIR (112-605-143) (1:200)	a. Anti-rb A750 Invitrogen (A-21039) a. Anti-rb Cy3 JIR (111-165-003) b. Anti-rt A647 JIR (112-605-143) (1:200)	a. Anti-rb Cy3 JIR (111-165-003) b. Anti-rt A647 JIR (112-605-143) (1:200)
Klärung	Zimtsäure- ethylester (2x 24h)	Zimtsäure- ethylester (2x 24h)	Zimtsäure- ethylester (2x 24h)	Zimtsäure- ethylester (2x 24h)	Zimtsäure- ethylester (2x 24h)

rb: rabbit/ Känninchen
ON: over night/ über Nacht

rt: rat/ Ratte
d: day/ Tag

gp: guinea pig/ Meerschweinchen
JIR: Jackson ImmunoResearch

h: hour/Stunde
A: Alexa

2.4 Mikroskopie

2.4.1 Konfokales Mikroskop

Zur Überprüfung des Färbeerfolgs wurde das konfokale Mikroskop *Nikon Eclipse Ti-AI* verwendet. Damit konnte ein grober Eindruck davon gewonnen werden, ob eine Färbung an sich funktioniert hat oder nicht. Dies vermied eine überflüssige Verwendung des LSM, welches im nächsten Abschnitt genauer beschrieben wird. Aufnahmen wurden mit dem konfokalen Mikroskop nicht angefertigt. Zum Mikroskopieren wurden verschiedene Laser genutzt. Je nachdem welche Fluorophore angeregt werden sollten, wurden Laser mit einer Wellenlänge von 488nm, 561nm und 647nm verwendet. Alexa 750-Fluorophore konnten mit diesem Mikroskop nicht dargestellt werden, da das Konfokalmikroskop keinen entsprechenden Laser besitzt.

2.4.2 Lichtblattfluoreszenzmikroskop

Zur Anfertigung der hochauflösenden 3D-Aufnahmen wurde das *20x LSM* der Universität Würzburg verwendet. Es handelt sich hierbei nicht um ein kommerzielles Mikroskop, da es von Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Universität Würzburg selbst konstruiert wurde. Das LSM überzeugt durch eine geringe Phototoxizität, eine hohe Eindringtiefe und eine sehr gute Auflösung (Selchow & Huisken, 2013). Außerdem benötigt es, im Vergleich zum konfokalen Mikroskop, viel weniger Zeit um eine 3D-Aufnahme zu erstellen. Insgesamt eignet es sich damit besser zur 3D-Darstellung dicker Gewebestücke. Allerdings ist die Nutzung des LSM sehr kostspielig.

Die Aufnahmen wurden mit dem *Leica HCX APO L20x/0.95 IMM Objektiv* mit 20-facher Vergrößerung angefertigt. Dafür wurden die Proben an einen Metallstab befestigt in Zimtsäureethylester gehangen. Die aufzunehmende Region wurde manuell ausgewählt, wobei die XY-Fläche stets 512x512µm betrug. Alle Aufnahmen haben eine Auflösung von 2048x2048 Pixeln. Die Schnittbilder wurden in 1µm Schritten aufgenommen. Die Menge der Schnittbilder und damit die Tiefe der Aufnahme variierte von Aufnahme zu Aufnahme. Zur Anregung der Autofluoreszenz des Hintergrunds wurde ein Laser mit einer Wellenlänge von 500-550nm verwendet. Laser mit den Wellenlängen 550-614nm und 572-642nm ließen Cy3 fluoreszieren. Cy5 bzw. Alexa 647 wurden mit einer Wellenlänge von 668-726nm und Alexa 750 mit einer Wellenlänge von 751-813nm angeregt. Die entsprechenden Belichtungszeiten und Laserintensitäten wurden je nach Stärke des Fluoreszenzsignals individuell festgelegt.

2.5 Elektronische Bildverarbeitung

Für die elektronische Bildbearbeitung wurden die Bildverarbeitungsprogramme *ImageJ 1.53c* und *Imaris 9.8.0* verwendet.

2.5.1 ImageJ

ImageJ 1.53c ist ein gemeinfreies Bildbearbeitungsprogramm. In der vorliegenden Arbeit wurde es verwendet, um die separat gespeicherten Schnittbilder eines Kanals zu einem Bilderstapel zu vereinen. Zusätzlich wurden die Bildproportionen angepasst und mithilfe des *3D Median Filters* das Rauschen des Bildes reduziert. Die zuvor separat bearbeiteten Kanäle wurden schließlich zu einer TIFF-Datei zusammengefügt und dabei unterschiedlichen Farben zugeteilt.

2.5.2 Imaris

Die TIFF-Dateien wurden mithilfe des *Imaris File Converters 9.8.0* in ein IMS-Dateiformat konvertiert, damit sie in der 3D-Bildvisualisierungs- und Analysesoftware *Imaris 9.8.0* weiterbearbeitet werden konnten. Bei der Bearbeitung wurden die Fluoreszenzsignale zu 3D-Objekten umgewandelt. Die Rekonstruktion der Gefäßoberflächen wurde über das Tool *Add New Surface* vorgenommen. Für die Immunzelldarstellung wurde die Option *Add New Spots* verwendet. Der Intensitätsbereich der zu erkennenden Signale wurde bei jeder Aufnahme individuell festgelegt.

Im Allgemeinen gibt es einige Einstellungen, die für alle Aufnahmen in gleicher Weise vorgenommen werden sollten, während andere für jede Aufnahme individuell gewählt werden müssen. In Tabelle 9 sind sowohl die konstanten als auch die variablen Parameter für die Oberflächenkreation der Gefäße aufgelistet. Tabelle 10 zeigt die Einstellungsparameter bei der Rekonstruktion der Immunzellen.

2 Material und Methoden

Tabelle 9: Einstellungen in Imaris bei der Surface Creation (Oberflächenerstellung)
x: nicht auswählen, ✓: auswählen

Algorithm	
Enable Region Of Interest	x
Enable Region Growing	x
Enable Tracking	x
Enable Classify	Wenn Klassifizierung gewünscht
Enable Shortest Distance	x
Source Channel	
Source Channel Index	1
Enable Smooth	✓
Enable Grain Size	1,00µm
Enable Eliminate Background	✓
Diameter of Largest Sphere	3,75
Threshold	
Enable Automatic Threshold	x
Manual Threshold Value	Individuell einzustellen
Active Threshold	✓
Enable Automatic Threshold B	x
Manual Threshold Value B	Ergibt sich aus Manual Threshold Value
Active Threshold B	x
Filter Surfaces	
Number of Voxels Img=1	Individuell einzustellen

Tabelle 10: Einstellungen in Imaris bei der Rekonstruktion der Immunzellen
 x: nicht auswählen, ✓: auswählen

Algorithm	
Enable Region Of Interest	x
Enable Region Growing	x
Enable Tracking	x
Enable Classify	Wenn Klassifizierung gewünscht
Enable Shortest Distance	x
Source Channel	
Source Channel Index	1
Enable Smooth	✓
Enable Grain Size	1,00µm
Enable Eliminate Background	✓
Diameter of Largest Sphere	10µm
Threshold	
Enable Automatic Threshold	x
Manual Threshold Value	Individuell einzustellen
Active Threshold	✓
Enable Automatic Threshold B	x
Manual Threshold Value B	Ergibt sich aus Manual Threshold Value
Active Threshold B	x
Filter Surfaces	
Number of Voxels Img=1	Individuell einzustellen

2.6 Statistische Auswertung

Für die quantitative Auswertung der Aufnahmen wurden die Daten von *Imaris 9.8.0* in *Microsoft Excel 365* exportiert. Dieses wurde auch zur Erstellung der Diagramme von Abbildung 17 verwendet. Die beiden Grafiken von Abbildung 12 wurde mithilfe der Software *R Version 4.3.1* erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung einer Immunfluoreszenzfärbung zur 3D-Darstellung von Immunzellen in Brusttumoren

Ausgangspunkt für die Entwicklung des Färbeprotokolls zur 3D-Darstellung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten in Brusttumoren war das Protokoll zur Immunfluoreszenzfärbung von Tumor-Organoiden, welches bereits in der Arbeitsgruppe etabliert war. Organotide sind „dreidimensionale, organähnliche Zellverbände“, die im Labor gezüchtet werden (Sina Bartfeld, 2020, p. 13). Da die Färbung der Tumor-Organotide unter Anwendung des Protokolls bereits erfolgreich war und diese im Wesentlichen aus den gleichen Zellen wie die Brusttumore bestehen, wurde das Protokoll an den Tumoren getestet. Aufgrund der geringeren Größe und der durchlässigeren Struktur der Organotide sind diese jedoch einfacher zu färben als die dichten und strukturell sehr inhomogenen Tumorstücke.

Angestrebt wurde eine tiefe gleichmäßige Färbung des Tumorgewebes. Faktoren, die modifiziert wurden, um das Protokoll zu optimieren, sind Puffer und Lösungen, mit denen die Gewebestücke behandelt wurden, die Inkubationszeiten sowie die Antikörper bzw. Antikörperkombinationen.

Es folgt ein kurzer Überblick über den Ablauf des Organoid-Basisprotokolls: Die Rehydrierung des PFA-fixierten und in EtOH konservierten Gewebes wurde in Fünf-Minuten-Schritten in der absteigenden Alkoholreihe durchgeführt. Die Permeabilisierung und Blockierung erfolgten für je eine Stunde im Penetrationspuffer bzw. im Blockpuffer 1. Die Primär- und Sekundärantikörper inkubierten jeweils über Nacht im Antikörperpuffer. Für das Mikroskopieren am LSM wurden die gefärbten Organotide in einen Agaroseblock eingebettet und daraufhin mit Zimtsäureethylester geklärt. Insgesamt nahm die Färbung der Organotide drei Tage in Anspruch.

Um, wie bereits beschrieben, eine bessere Kontrolle über den Färbeerfolg zu erhalten, wurden die ersten Versuche mit dem Ziel durchgeführt, eine vollständige Darstellung der Tumorgefäße zu erlangen. Im Weiteren sollten dann die CD4⁺ und CD8⁺ Immunzellen mitangefärbt werden.

3.1.1 Modifikation der Inkubationszeiten

3.1.1.1 Versuch 1: Übertragung des Basisprotokolls auf Gewebeproben

Im ersten Versuch wurde das an Tumor-Organoiden etablierte Basisprotokoll mit den darin verwendeten Puffern an den Tumorstücken getestet. Die einzige Änderung bestand in der Verlängerung der Inkubationszeiten.

Die Färbung wurde an einem ca. 5mm³ großen Stück PFA-fixiertem Tumorgewebe getestet, welches mittels eines Skalpells von der eingelagerten Nekropsie ab- und kubisch zurechtgeschnitten wurde. Als zweite Option wurde eine 500µm dicke Scheibe am Kryotom vom Tumorgewebe abgeschnitten. Diese erwies sich jedoch als ungeeignet, da sie sich nach dem Auftauen zusammenrollte und dadurch keine sinnvolle Aufnahme zuließ. Für die Befestigung des kubischen Tumorstücks am Probenhalter des LSMF, wurde die Probe nach der Färbung in Agarose eingebettet.

Nachdem unter dem konfokalen Mikroskop einige Gefäßstrukturen an den Randbereichen der Probe zu erkennen waren, wurde eine Aufnahme mit dem LSMF angefertigt (Abbildung 3A). Die Aufnahme hat ein Gesamtvolumen von knapp 0,3mm³ und ist vom Probenrand ausgehend aufgenommen. Der Probenrand befindet sich am linken unteren Bildrand. In diesem Bereich sind stark fluoreszierende Gefäßstrukturen sichtbar. Zum rechten oberen Rand, also zur Probenmitte hin, wird das Signal schwächer und ist teilweise nicht mehr sichtbar. Die Aufnahme zeigt, dass das Anfärben der Gefäße in Brusttumoren mit den verwendeten Antikörpern und dem leicht modifizierten Basisprotokoll generell möglich ist. Es wird allerdings auch deutlich, dass die Antikörper nicht ausreichend tief in die Probe eindringen konnten.

Mithilfe der beiden Bildverarbeitungsprogramme *ImageJ* und *Imaris* wurden die Gefäßoberflächen rekonstruiert. Die Rekonstruktion der Gefäße basiert auf der Berücksichtigung lokaler Kontraste. Dadurch können auch schwache Signale verarbeitet werden, wenn sie sich vom lokalen Hintergrund abheben. Aus diesem Grund sind in der Rekonstruktion in Abbildung 3B mehr Gefäße dargestellt, als auf den ersten Blick in der unbearbeiteten Version in Abbildung 3A zu erkennen sind. Dennoch wird auch hier ersichtlich, dass die Eindringtiefe der Antikörper unzureichend war. Eine suffiziente Anfärbung der Gefäße ist nur bis zu einer Tiefe von ca. 200µm gewährleistet.

Durch das gleichzeitige Darstellen von Erythrozyten, die durch ihre Autofluoreszenz detektierbar sind, und CD31⁺-Gefäßen wird dieser Eindruck nochmal bestätigt

(Abbildung 4). Besonders deutlich wird es, wenn beide Strukturen rekonstruiert werden (Abbildung 4B). Die linienförmigen grünen Strukturen stellen längs hintereinanderliegende Erythrozyten dar (Abbildung 4C). Diese Anordnung ist dadurch zu erklären, dass sich diese Erythrozyten in Gefäßen befinden. Teilweise überlagern sich die rekonstruierten Gefäße mit den Erythrozyten (weißer Pfeil in Abbildung 4C). Hier konnten die Gefäße mittels CD31-Antikörper detektiert werden. An anderen Stellen ist nur eine grüne Linie autofluoreszierender Erythrozyten zu sehen (gelber Pfeil in Abbildung 4C). Die hier verlaufenden Gefäße konnten nicht angefärbt werden. Ziel war es nun die Penetrationstiefe der Antikörper in den nachfolgenden Versuchen weiter zu steigern.

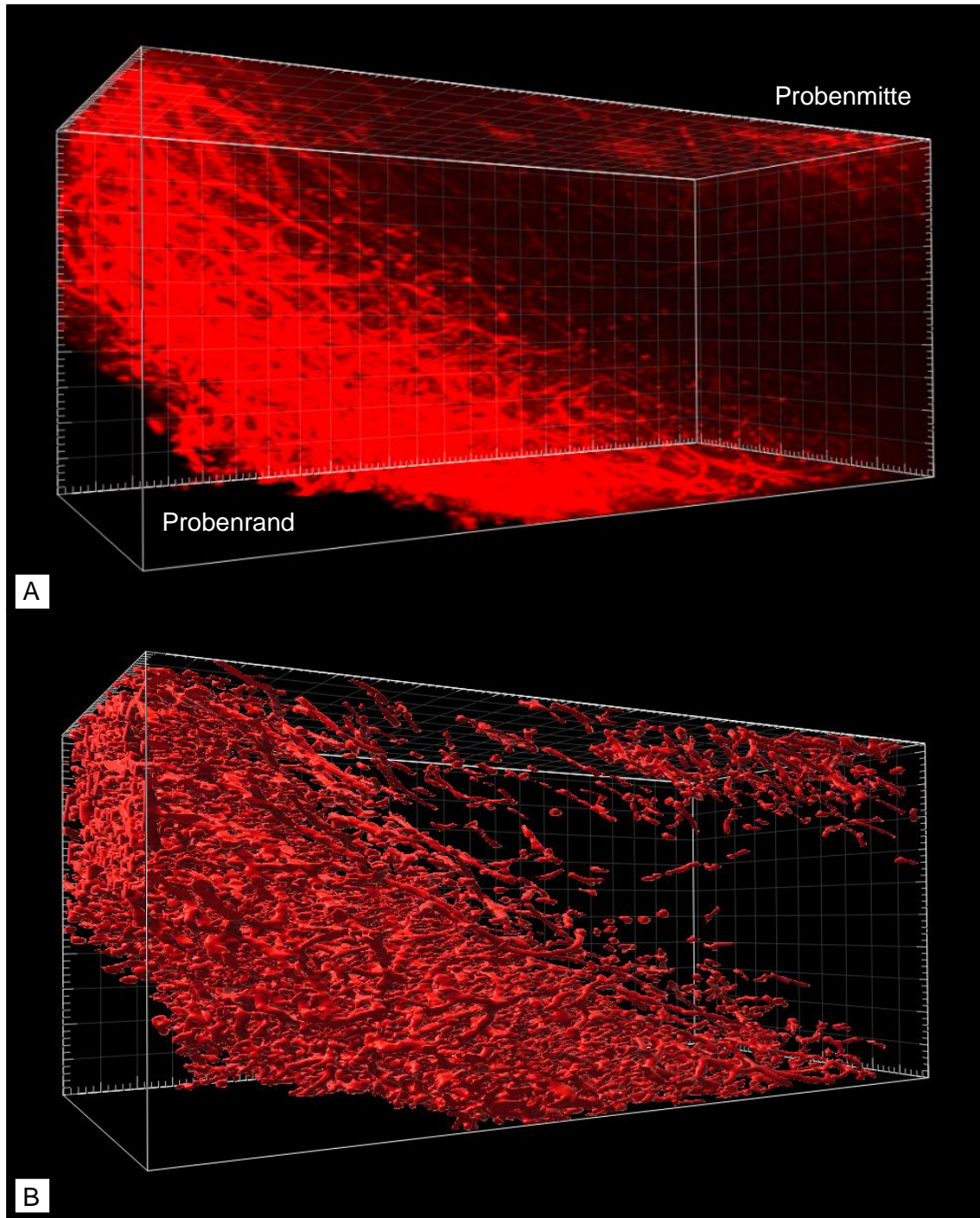


Abbildung 3: 3D-Immunfluoreszenzaufnahme eines AT3-Brusttumorstücks mit CD31-Gefäßmarkierung bei zweitägiger Antikörperinkubation
Für die Färbung wurde das Basisprotokoll mit verlängerten Inkubationszeiten verwendet. Die Antikörper inkubierten für je zwei Tage auf den Tumorproben. **A** Unbearbeitete Aufnahme. Die Gefäße am Probenrand sind kräftig angefärbt, während die Intensität zur Probenmitte hin abnimmt. **B** Bearbeitete Version von **A** nach Gefäßrekonstruktion. Lichtmikroskopische Aufnahme am LSM.
Größe der Aufnahmen: $512\mu\text{m} \times 512\mu\text{m} \times 1242\mu\text{m}$ (Rasterweite: $50\mu\text{m}$)

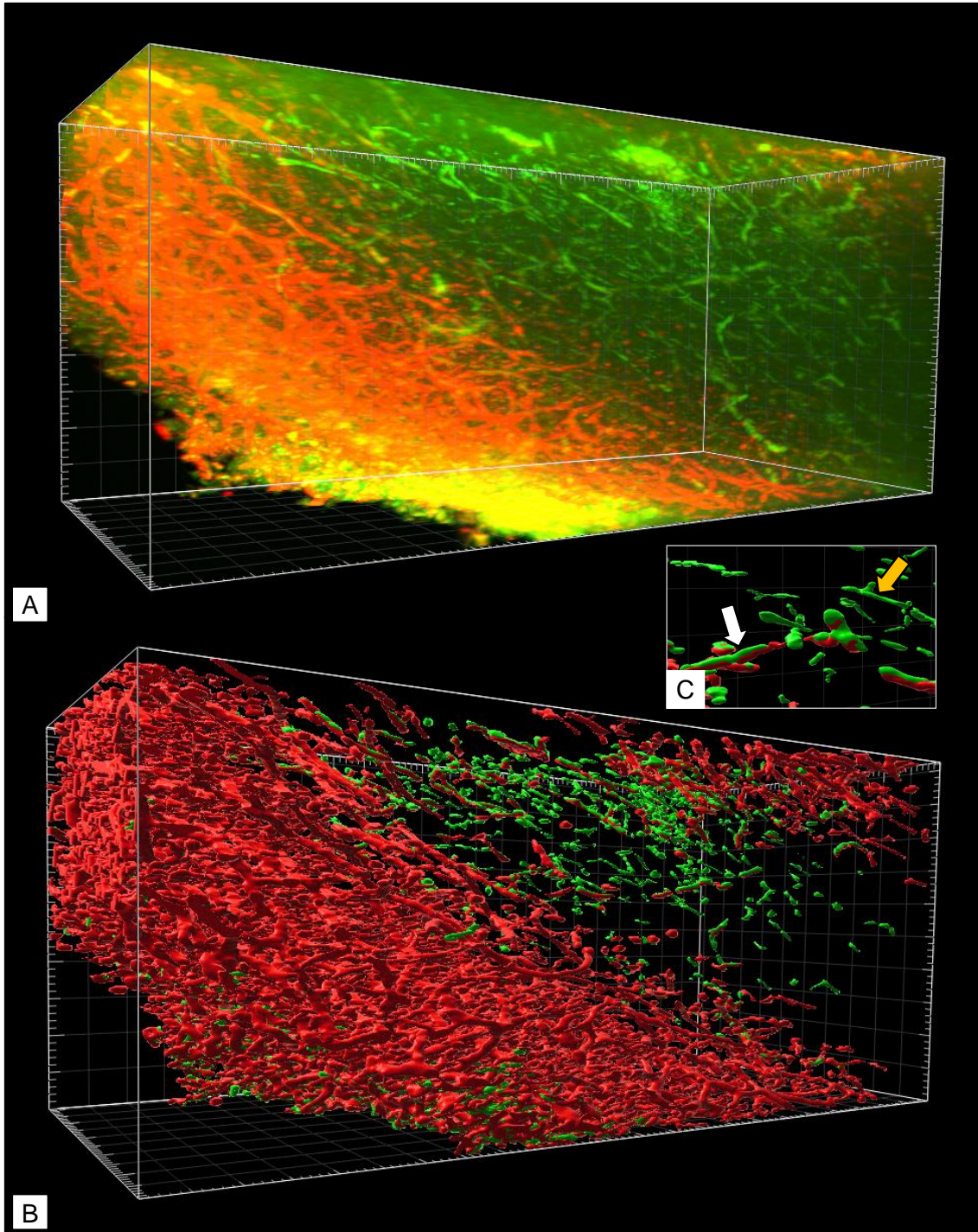


Abbildung 4: 3D-Immunfluoreszenzaufnahme eines AT3-Brusttumorstücks mit CD31-Gefäßmarkierung (rot) und Autofluoreszenz des Gewebes mit Erythrozyten (grün)

A Unbearbeitete Aufnahme mit den detektierten Gefäßen in rot und der Autofluoreszenz des Gewebes und der Erythrozyten in grün. **B** Rekonstruierte Version von **A**. **C** Ausschnitt aus **B**. Der weiße Pfeil zeigt die Überlagerung von Erythrozyten mit einem markierten Gefäß als Zeichen einer erfolgreichen Gefäßfärbung, während der gelbe Pfeil Erythrozyten ohne erfolgreiche Gefäßmarkierung kennzeichnet. Lichtmikroskopische Aufnahme am LSM.

Größe der Aufnahmen: $512\mu\text{m} \times 512\mu\text{m} \times 1242\mu\text{m}$ (Rasterweite: $50\mu\text{m}$)

3.1.1.2 Versuch 2: Verlängerung der Antikörperinkubationszeiten

Eine mögliche Ursache für die geringe Penetrationstiefe der Antikörper könnten zu kurze Inkubationszeiten sein. Deshalb wurden die Antikörperinkubationszeiten in diesem Versuch von zwei auf vier Tage erhöht. Zusätzlich wurde eine 1,5-2mm dicke Tumorscheibe als Probenform getestet, wodurch auf die Agaroseeinbettung verzichtet werden konnte.

Von der Schnittfläche der Tumorscheibe aus konnte eine 1242 μ m tiefe Fluoreszenzaufnahme angefertigt werden (Abbildung 5A). Eine vollständige Aufnahme einmal quer durch die Scheibe war mit diesem LSM nicht möglich. Der aufgenommene Ausschnitt reicht, um zu sehen, dass hier eine tiefere Gefäßfärbung als im vorherigen Versuch erzielt werden konnte. Die Färbung ist jedoch weiterhin ziemlich inhomogen. Während das linke Drittel intensiv fluoresziert, nimmt die Intensität der Strahlen im mittleren und rechten Drittel der Aufnahme stark ab. Dort scheinen nicht alle Gefäße angefärbt worden zu sein. Durch Rekonstruktion der Gefäße zeigt sich, dass das Gefäßnetz Richtung Probenmitte weniger dicht ist, als am linken Probenrand (Abbildung 5B). Da man davon ausgehen kann, dass die meisten Gefäße im Tumor miteinander vernetzt sind, müssten die Gefäße bis auf wenige Ausnahmen ein großes zusammenhängendes Netzwerk darstellen. Durch Markieren des größten zusammenhängenden Volumens wird ersichtlich, dass die Färbung nicht so kontinuierlich ist wie es auf den ersten Blick scheint (Abbildung 6).

Das abfallende Signal könnte weiterhin auf eine ungenügende Antikörperpenetration zurückzuführen sein. Da die Antikörper dieses Mal aufgrund der Scheibenform von beiden Seiten in die Probe penetrieren konnten, müsste die Intensität zum rechten Rand hin wieder zunehmen. Das ist im Vorliegenden nicht der Fall. Ursächlich hierfür könnte eine zu starke Abschwächung der Fluoreszenz beim Durchtritt durch das Gewebe hin zur Kamera des LSM sein. Dies könnte an einer unvollständigen Klärung bzw. Entfärbung des Gewebes liegen.

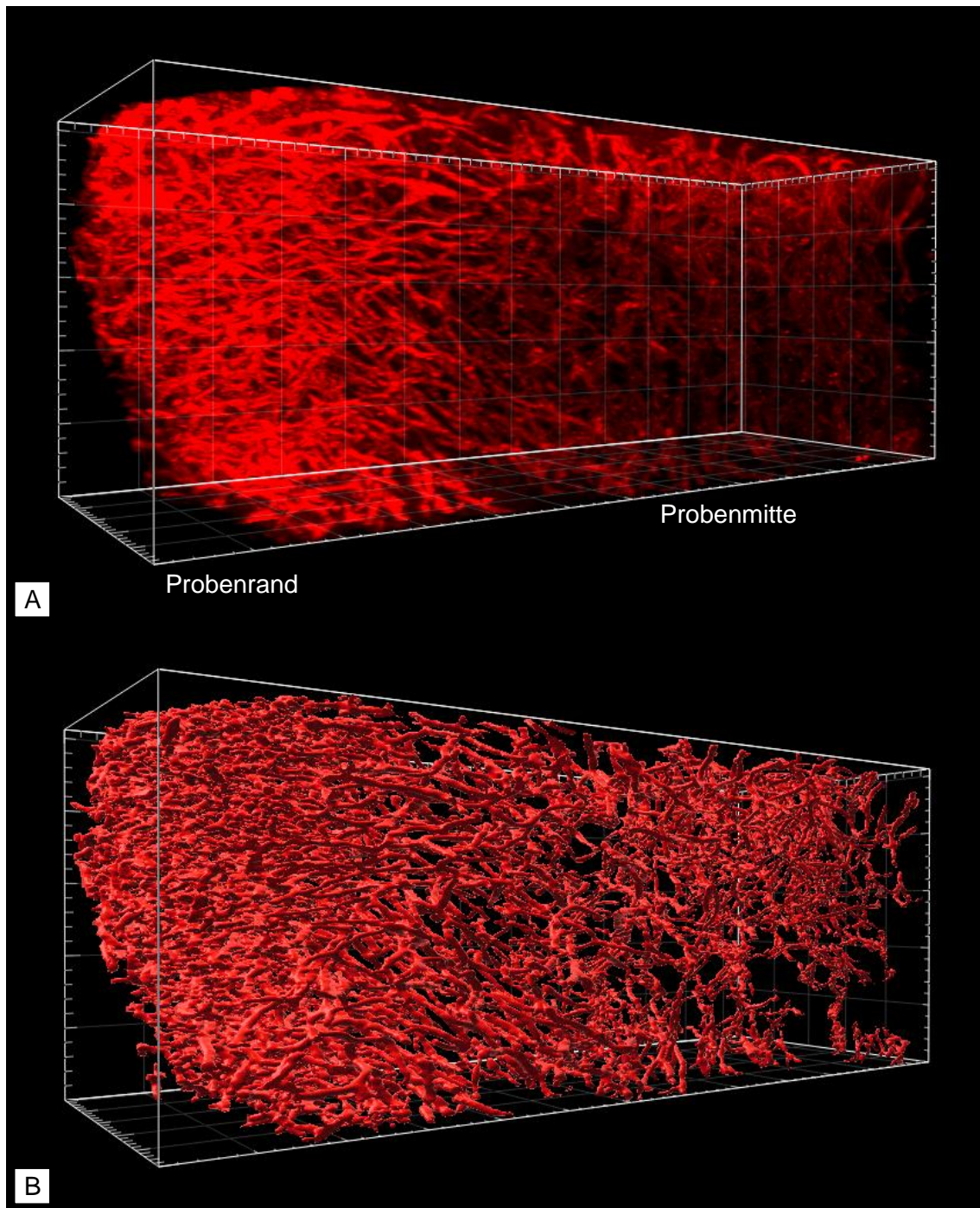


Abbildung 5: 3D-Immunfluoreszenzaufnahme eines AT3-Brusttumorsstücks mit CD31-Gefäßmarkierung bei viertägiger Antikörperinkubation

Für die Färbung wurden die Antikörperinkubationszeiten von zwei auf vier Tage erhöht.

A Unbearbeitete Aufnahme. **B** Bearbeitete Version von **A** nach Gefäßrekonstruktion. **A** Intensiv gefärbter Randbereich (links) und abnehmende Intensität in Richtung Probeninneres (rechtes Drittel). Bei der Gefäßrekonstruktion in **B** sind innerhalb der gesamten Aufnahme Gefäße dargestellt. In der rechten Hälfte der Aufnahme ist das Gefäßnetz lockerer als in der linken Hälfte. Lichtmikroskopische Aufnahme am LSM. Größe der Aufnahmen: $512\mu\text{m} \times 5\mu\text{m} \times 1242\mu\text{m}$ (Rasterweite: $100\mu\text{m}$)

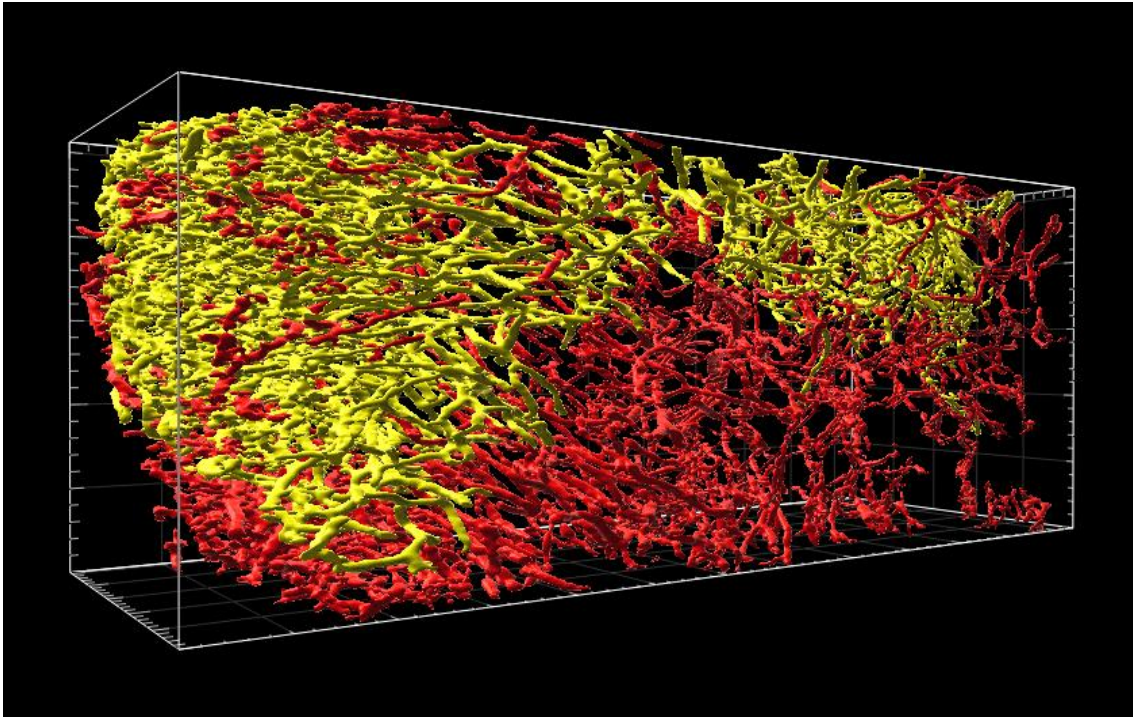


Abbildung 6: 3D-Rekonstruktion der Gefäße und Markierung des größten zusammenhängenden Gefäßnetzes in einem AT3-Brusttumorsstück mit CD31-Gefäßmarkierung bei viertägiger Antikörperinkubation

Die Abbildung zeigt eine 3D Immunfluoreszenzaufnahme am LSM mit nachträglicher Rekonstruktion der Gefäße. Alle rot gefärbten Gefäße sind einzelne Gefäßstränge oder kleinere Gefäßnetzwerke. Das gelb markierte Gefäßnetz ist das größte zusammenhängende Gefäßnetzwerk und macht 52% des Gesamtgefäßvolumens aus. Lichtmikroskopische Aufnahme am LSM.

Größe der Aufnahme: 512µm x 512µm x 1241µm (Rasterweite: 100µm)

3.1.2 Modifikation der Puffer

3.1.2.1 Versuch 3: Einsatz des Puffers CUBIC 1

Ein Ansatz, der sowohl die Antikörperpenetration verbessern, als auch die Streuung im Gewebe reduzieren sollte, war der Einsatz von CUBIC 1 (Susaki et al., 2014). Die erhoffte Wirkung sollte durch die Delipidierung, die Homogenisierung des RI sowie durch die Entfärbung des Gewebes erreicht werden. CUBIC 1 ersetzte den bisher verwendeten Penetrationspuffer und wurde zusammen mit der Immunfärbungslösung getestet. Die Scheibenform der Probe wurde beibehalten.

Beim Mikroskopieren am konfokalen Mikroskop waren weder in der Tumormitte noch am Probenrand Gefäßstrukturen zu sehen. Lediglich eine unspezifische Hintergrundfärbung war erkennbar. Da bereits hier ersichtlich war, dass die Färbung nicht funktioniert hat, wurde keine Aufnahme am LSM angefertigt.

3.1.2.2 Versuch 4: Verwendung des niedriger konzentrieren CUBIC 1A

Im nächsten Versuch wurde CUBIC 1 durch CUBIC 1A ersetzt. Dieses besitzt eine ähnliche Zusammensetzung, ist aber niedriger konzentriert. Zusätzlich wurde der Blockpuffer 2 verwendet. Im Gegensatz zum Blockpuffer 1 nutzt dieser Ziegenserum statt BSA zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen und hat sich bereits in Kombination mit CUBIC 1A bewährt (Lloyd-Lewis et al., 2016).

Die Anfärbung der Gefäße erscheint innerhalb der gesamten Aufnahme recht homogen (Abbildung 7A). Die Intensitätsunterschiede innerhalb der Probe sind geringer als im vorherigen Versuch. Dennoch ist das Signal im rechten Viertel, welches während der Aufnahme weiter von der Kamera entfernt war, schwächer als im Rest der Aufnahme. Verantwortlich für die Abschwächung des Fluoreszenzsignals könnte die starke Einblutung am linken Rand der Färbung sein (Abbildung 8A). Das Hämoglobin in den Erythrozyten führt zu Streuungen und Absorptionen des Fluoreszenzsignals. Die Strahlen, die einen weiteren Weg durch das Gewebe hin zur Kamera zurücklegen müssen, werden dabei stärker abgeschwächt. Dennoch ist das Ergebnis dieses Versuches das bisher Beste.

In der bearbeiteten Version ist ein gleichmäßiges Gefäßnetz sichtbar (Abbildung 7B). Durch Markieren des größten zusammenhängenden Volumens bestätigt sich dieser Eindruck (Abbildung 9). Lediglich am Rand befinden sich vereinzelt kleine Gefäßabschnitte, die nicht mit dem restlichen Netzwerk in Verbindung stehen. Vergleicht man Abbildung 9 mit Abbildung 6 wird klar, dass die beiden neuen Puffer zu einer Verbesserung der Färbequalität geführt haben.

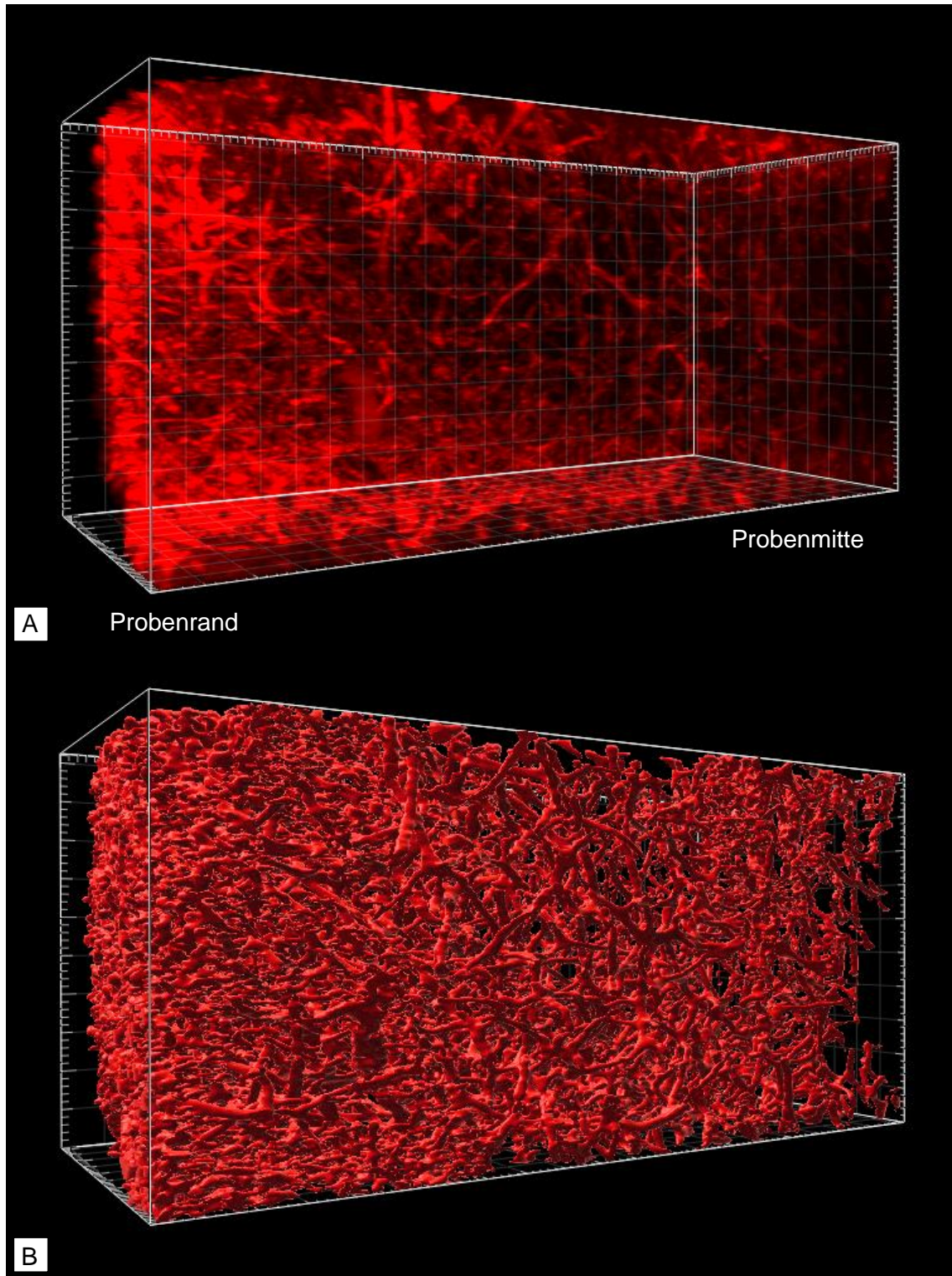


Abbildung 7: 3D-Immunfluoreszenzaufnahme eines AT3-Brusttumorsstücks mit CD31-Gefäßmarkierung unter Verwendung von CUBIC 1A

Für diese Aufnahme wurde die Tumorprobe mit CUBIC 1A permeabilisiert. **A** Unbearbeitete Aufnahme und **B** die rekonstruierte Version von **A**. Der linke Rand der Aufnahme zeigt den Probenrand, von wo aus die Antikörper in das Gewebe penetriert sind. Die Gefäßmarkierung in **A** ist weitestgehend homogen. Die Gefäßrekonstruktion in **B** zeigt ein stark verzweigtes gleichmäßiges Gefäßnetz. Lichtmikroskopische Aufnahme am LSM.

Größe der Aufnahmen: $512\mu\text{m} \times 512\mu\text{m} \times 1015\mu\text{m}$ (Rasterweite: $50\mu\text{m}$)

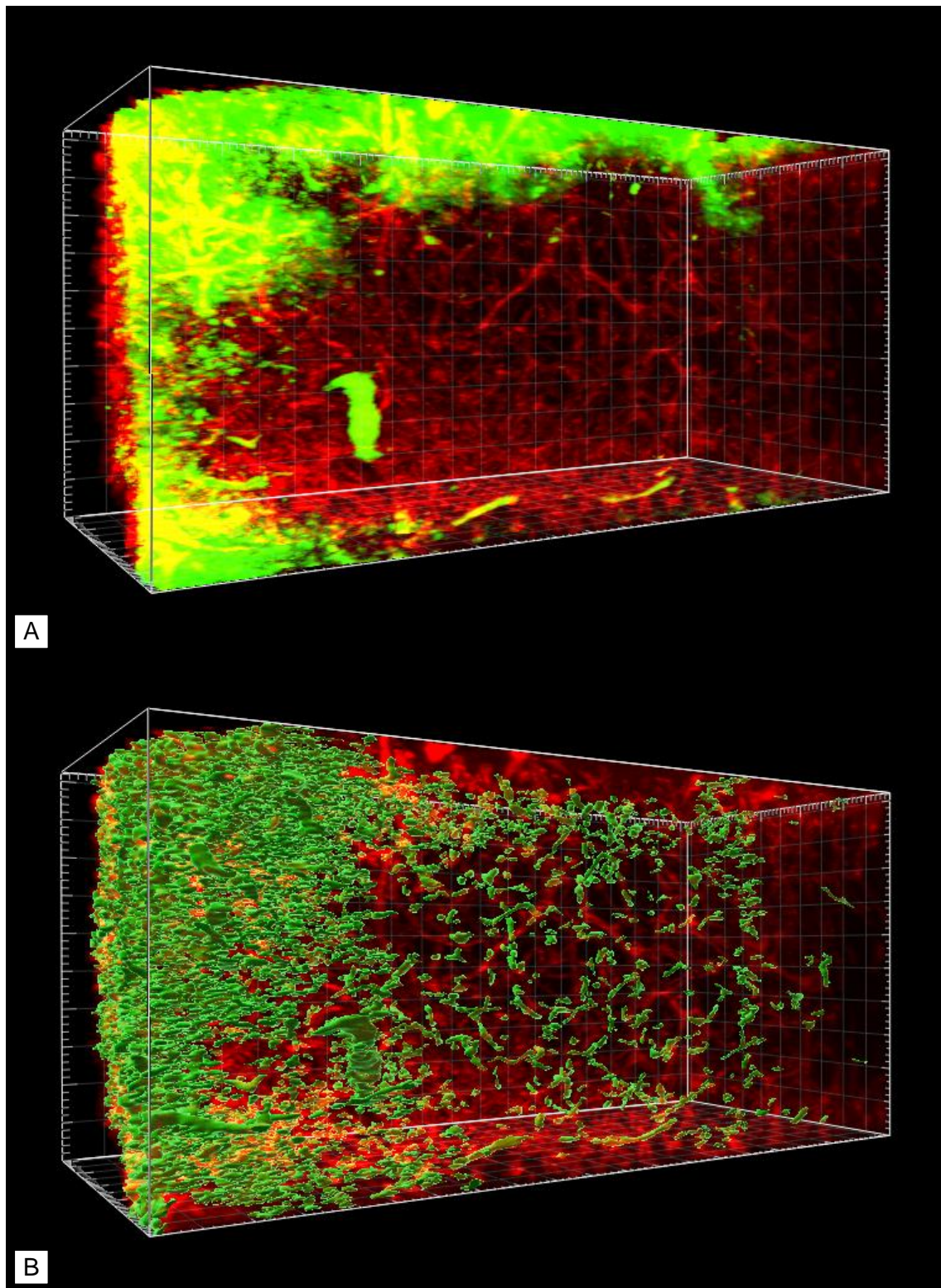


Abbildung 8: 3D-Immunfluoreszenzaufnahme eines AT3-Brusttumorsstücks mit CD31-Gefäßmarkierung und Autofluoreszenz der Erythrozyten
Die Aufnahmen zeigen eine Einblutung im Tumorgewebe mit gleichzeitiger Gefäßdarstellung.
A Unbearbeitete Aufnahme mit Gefäßmarkierung in rot und Autofluoreszenz der Erythrozyten in grün. Am linken und oberen Rand der Aufnahme befindet sich eine Ansammlung von Erythrozyten. Es handelt sich hierbei um eine Einblutung in das Tumorgewebe. **B** Gefäßmarkierung mit zusätzlicher Darstellung rekonstruierter Erythrozyten. Lichtmikroskopische Aufnahme am LSM.
Größe der Aufnahmen: $512\mu\text{m} \times 512\mu\text{m} \times 1015\mu\text{m}$ (Rasterweite: $50\mu\text{m}$)

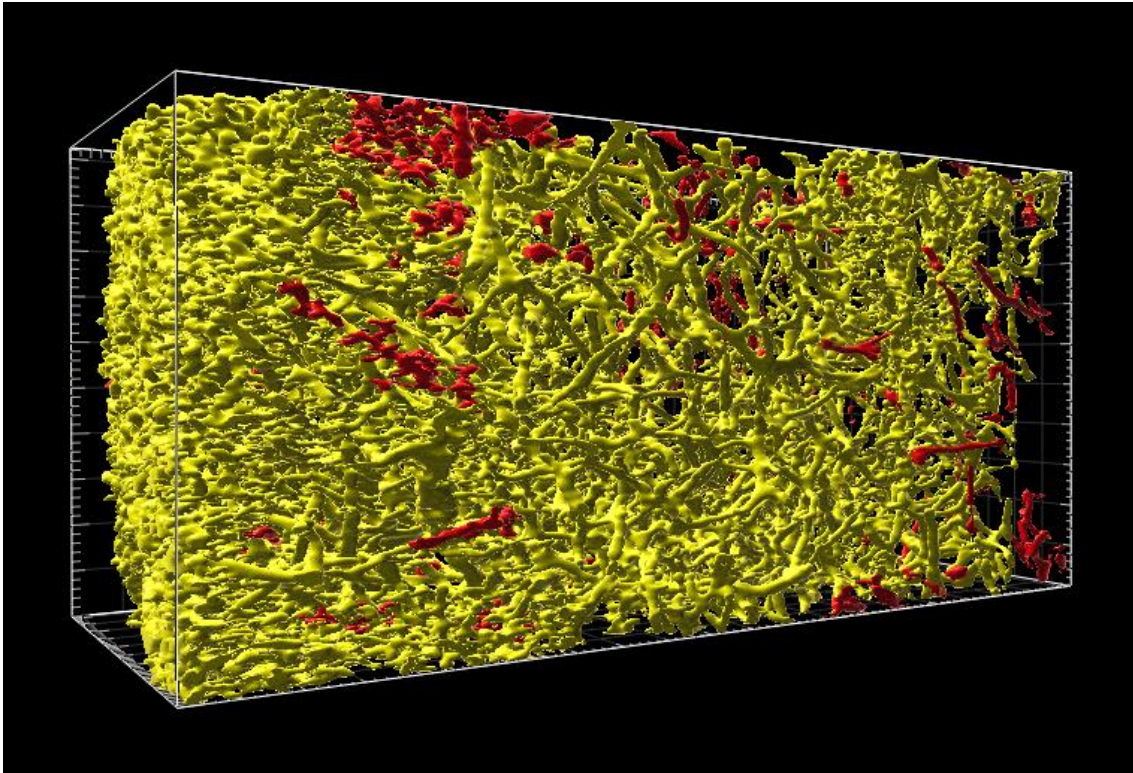


Abbildung 9: 3D-Rekonstruktion der Gefäße und Markierung des größten zusammenhängenden Gefäßnetzes in einem AT3-Brusttumorsstück mit CD31-Gefäßmarkierung unter Verwendung von CUBIC 1A. Die Abbildung zeigt eine 3D-Immunfluoreszenzaufnahme mit nachträglicher Rekonstruktion der Gefäße. Alle rot gefärbten Gefäße sind einzelne Gefäßstränge oder kleinere Gefäßnetzwerke. Das gelb markierte Gefäßnetz ist das größte zusammenhängende Gefäßnetzwerk und macht 94% des Gesamtgefäßvolumens aus. Lichtmikroskopische Aufnahme am LSM.
Größe der Aufnahme: 512µm x 512µm x 1015µm (Rasterweite: 50µm)

3.1.2.3 Versuch 5: Vorbehandlung der Proben mit H₂O₂-haltigen Entfärbungsreagenz

Aufgrund der Möglichkeit, dass das Hämoglobin der Erythrozyten das Fluoreszenzsignal aus den tieferen Bereichen abschwächte, wurde zur weiteren Optimierung der Färbung versucht, die Hämoglobinpigmente stärker zu entfärben. Hierfür wurde H₂O₂ verwendet. Es erzielt seine bleichende Wirkung durch die direkte Zersetzung der Farbpigmente (Yu et al., 2021).

Die Verwendung des H₂O₂-haltigen Entfärbungsreagenz brachte keine Verbesserung. Vielmehr war das Ergebnis schlechter als beim vorigen Versuch (Abbildung 10A). Die Rekonstruktion der Gefäße (Abbildung 10B) und die Markierung des größten zusammenhängenden Gefäßnetzes (Abbildung 11) zeigen, dass die Färbung ab der Mitte der Aufnahme nicht mehr kontinuierlich war.

Um die Kontinuität der Färbungen miteinander vergleichen zu können, wurden die Daten über die Volumina der Gefäßrekonstruktionen aus *Imaris* in *Excel* übertragen. Die

Summe aller Volumina ergibt das Gesamtvolumen aller Gefäße. Um zu sehen, welchen Anteil daran das größte zusammenhängende Gefäßnetz hat, setzt man dessen Volumen zum errechneten Gesamtvolumen in Relation. Eine Gegenüberstellung der prozentualen Anteile aller Einzelvolumina am Gesamtgefäßvolumen von Versuch 2, 4 und 5 ist in Abbildung 12 zu sehen. A zeigt den gesamten Bereich von 0-100%, B nur den Bereich zwischen 0 und 2%, da der prozentuale Anteil der Einzelvolumina am Gesamtvolumen vorwiegend in diesem Intervall liegt. Bei Versuch 4 bildet das größte zusammenhängende Stück mit 94,6% den Hauptanteil des Gefäßvolumens. Die restlichen Einzelvolumina sind deutlich kleiner. Das zweitgrößte Einzelvolumen macht gerade einmal 0,2% des Gesamtgefäßvolumens aus. Insgesamt beinhaltet die Färbung 203 Einzelvolumina, während in Versuch 2 mit 655 dreimal so viele Einzelvolumina vorhanden sind. Hier macht das größte Einzelvolumen nur 56,5% des Gesamtvolumens aus. Dafür gibt es hier mehrere mittelgroße Stücke. Die drei nächstgrößeren Stücke haben einen Anteil von 5,7%, 3,1% und 1,7% am Gesamtvolumen. Bei Versuch 5 hat das größte Stück einen Anteil von 74% am Gesamtvolumen der Gefäße. Das zweitgrößte Stück macht nur noch 1,8% des Gesamtvolumens aus. Dadurch stellt sich heraus, dass es sich bei den Gefäßen auf der rechten Seite der Aufnahme nicht um ein zweites großes Gefäßnetzwerk handelt, sondern nur um einzelne Gefäßabschnitte, die nicht durchgängig angefärbt wurden (Abbildung 11). Insgesamt sind 272 Einzelvolumina vorhanden.

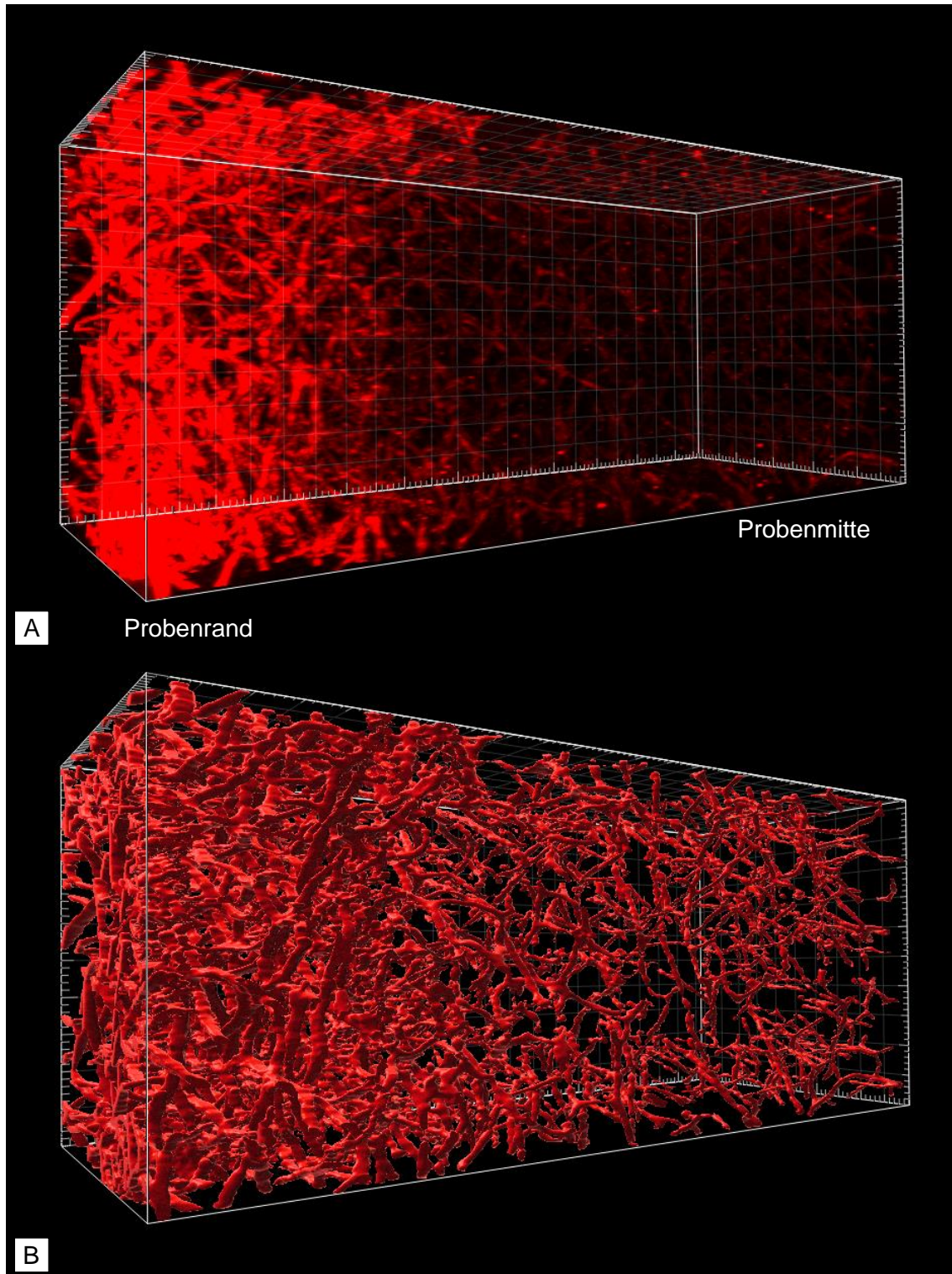


Abbildung 10: 3D-Immunfluoreszenzaufnahme eines AT3-Brusttumorstücks mit CD31-Gefäßmarkierung unter Einsatz eines Entfärbungsreagenz

Für diese Aufnahme wurde die Tumorprobe vor der Färbung mit einem H_2O_2 -haltigen Entfärbungsreagenz bearbeitet. **A** Unbearbeitete Aufnahme. **B** Rekonstruierte Version von **A**. Der linke Rand der Aufnahme ist gleichzeitig der Probenrand. Hier ist die Intensität der Fluoreszenz am stärksten. In Richtung des Probeninneres nimmt sie stark ab. Das Gefäßnetz wird, wie in **B** zu sehen ist, zum rechten Rand der Aufnahme hin immer lockerer und diskontinuierlicher. Lichtmikroskopische Aufnahme am LSM. Größe der Aufnahmen: $512\mu m \times 512\mu m \times 1165\mu m$ (Rasterweite $50\mu m$)

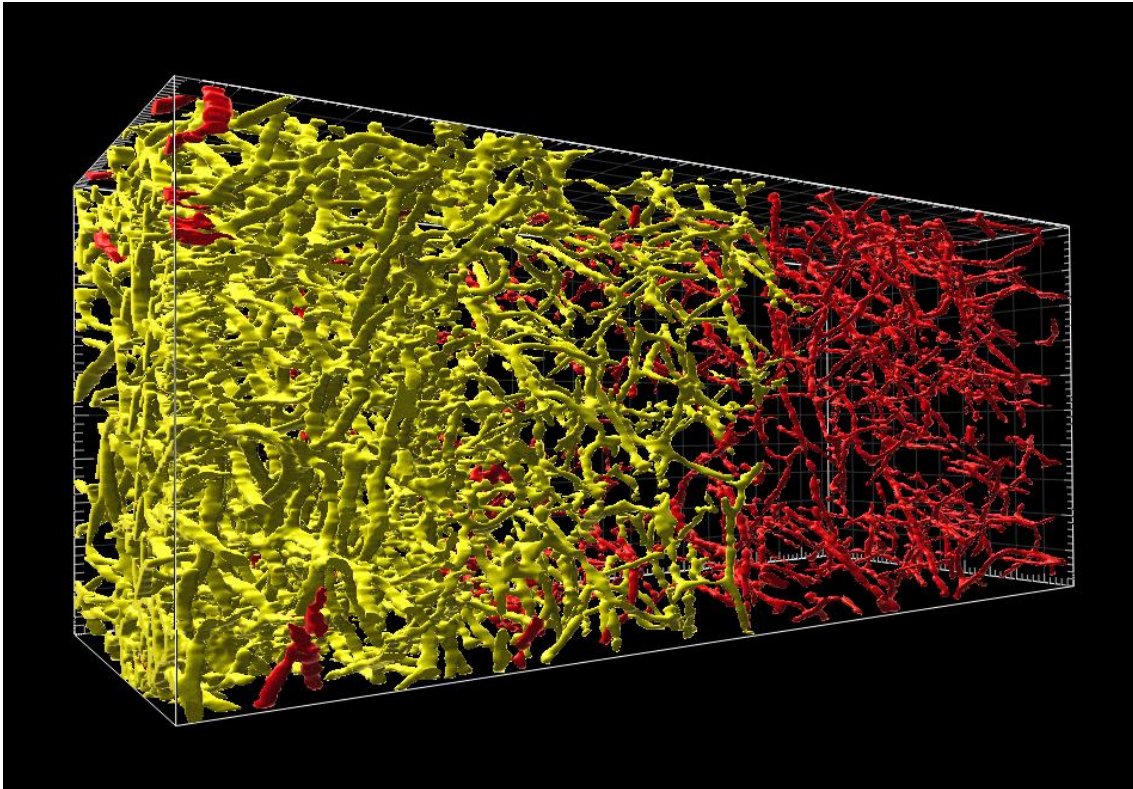


Abbildung 11: 3D-Rekonstruktion der Gefäße und Markierung des größten zusammenhängenden Gefäßnetzes in einem AT3-Brusttumorsstück mit CD31-Gefäßmarkierung unter Verwendung des Entfärbungsreagenz

Alle rot gefärbten Gefäße sind einzelne Gefäßstränge oder kleinere Gefäßnetzwerke. Das gelb markierte Gefäßnetz ist das größte zusammenhängende Gefäßnetzwerk und macht 74,6% des Gesamtgefäßvolumens aus.

Größe der Aufnahme: 512 μ m x 512 μ m x 1165 μ m (Rasterweite 50 μ m)

3 Ergebnisse

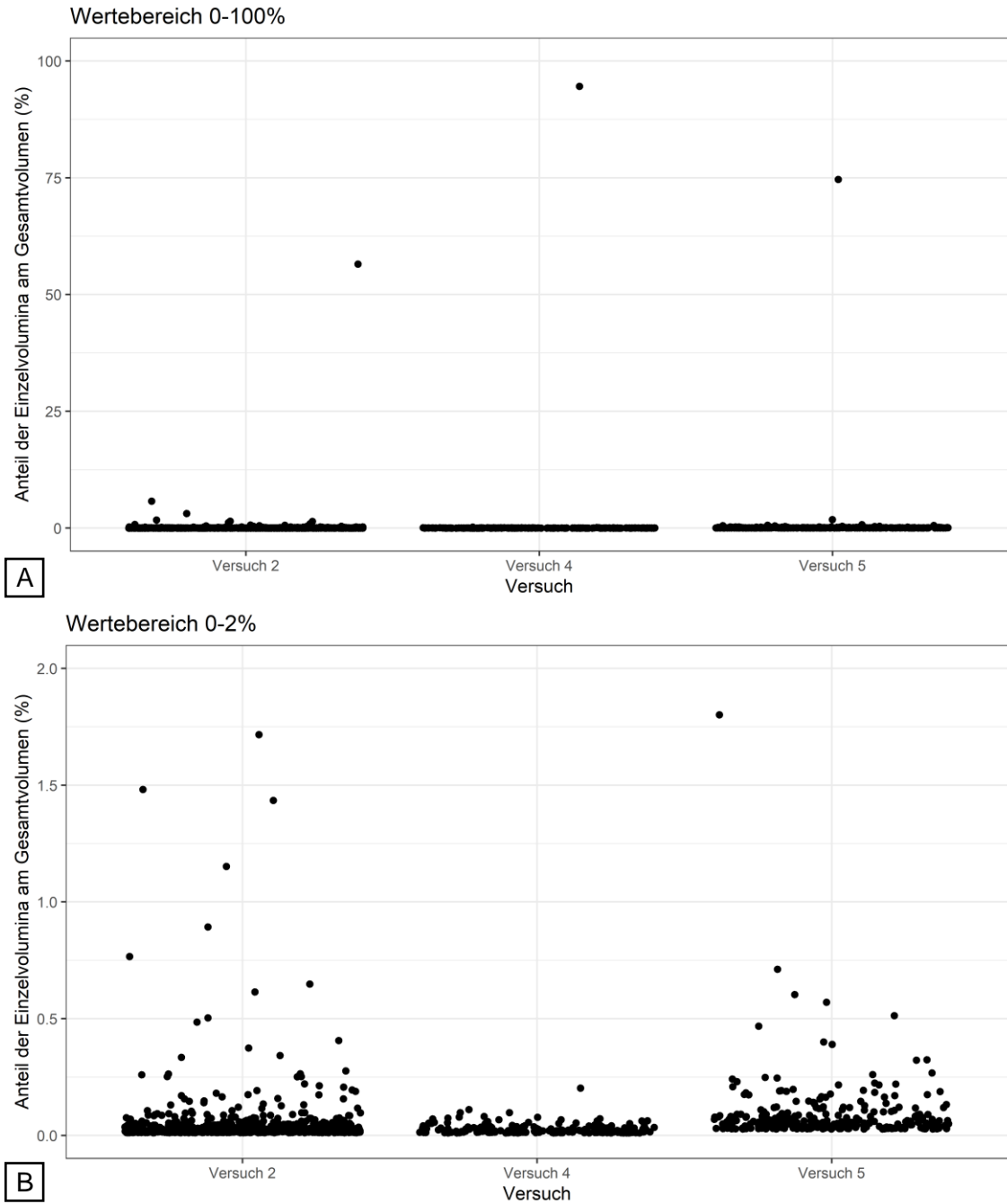


Abbildung 12: Anteil der Einzelvolumina am Gesamtgefäßvolumen (Gegenüberstellung der Versuche 2, 4 und 5)

A Wertebereich 0-100%. **B** Ausschnitt des Wertebereichs 0-2%, da Großteil der Werte in diesem Bereich liegt. Bei Versuch 2 beträgt das größte Einzelvolumen 56,5% vom Gesamtgefäßvolumen. Nächstgrößere Stücke liegen bei 5,7% und 3,1%. Vereinzelt Stücke, die sich von der Mehrheit knapp über 0% abheben. In Versuch 4 macht das größte Einzelvolumen 94,6% aus. Alle weiteren Volumina haben einen Anteil zwischen 0 und 0,25% am Gesamtgefäßvolumen. Insgesamt gibt es hier rund zwei Drittel weniger Einzelvolumina als bei Versuch 2. Bei Versuch 5 liegt der Anteil des größten Einzelvolumens bei 74%. Restliche Volumina liegen bis auf eine Ausnahme bei 1,8% unter 1%.

3.1.2.4 Zwischenfazit

In Abbildung 13 sind die Ergebnisse der Gefäßfärbungen von Versuch 1, 2, 4 und 5 unbearbeitet und nach Rekonstruktion zur besseren Übersicht noch einmal gegenübergestellt. Da von Versuch 3 keine Aufnahme angefertigt wurde, wird dieser hier nicht mit aufgeführt. Man erkennt eine deutliche Steigerung der Färbequalität von Versuch 1, über Versuch 2 zu Versuch 4. Da Versuch 5 eher wieder zu einer Verschlechterung geführt hat, wurde das Protokoll von Versuch 4 für die Färbung der Immunzellen übernommen.

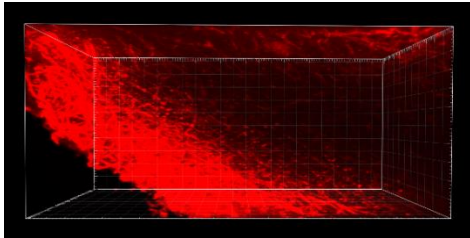
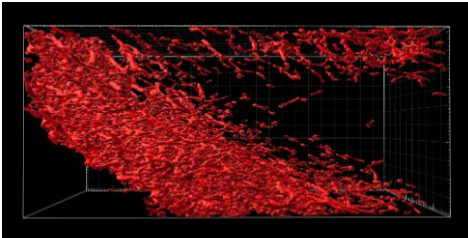
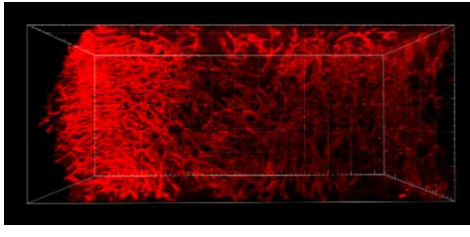
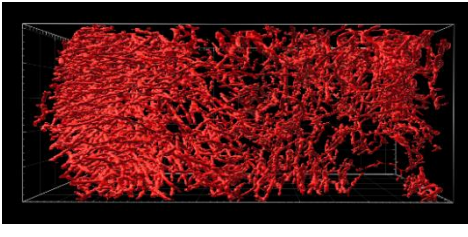
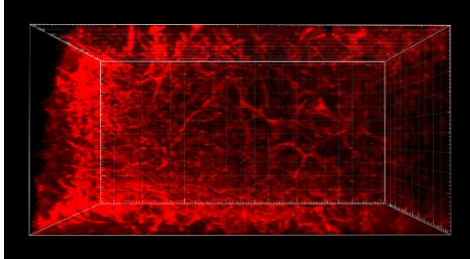
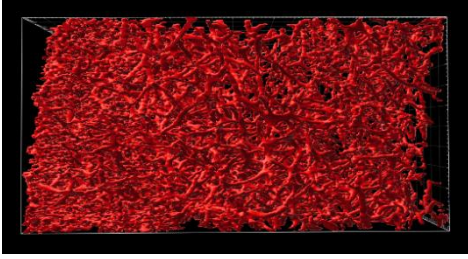
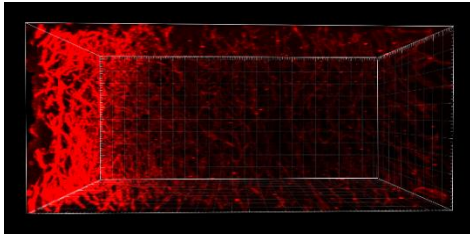
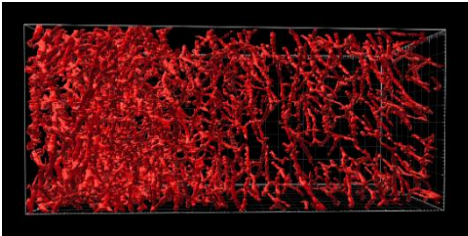
Versuch	Unbearbeitete Aufnahme	Gefäßrekonstruktion
1		
2		
4		
5		

Abbildung 13: Gegenüberstellung der Ergebnisse von Versuch 1, 2, 4 und 5
 1 Verwendung des Basisprotokolls mit gesteigerten Inkubationszeiten. Die Antikörperinkubation erfolgte jeweils für zwei Tage. 2 Erhöhung der Inkubationszeiten auf vier Tage. 4 Permeabilisierung der Probe vor Antikörperinkubation mit CUBIC 1A. 5 Ergänzung des Protokolls mit einer H₂O₂-haltigen Entfärbungsreagenz. Am meisten überzeugte das Ergebnis von Versuch 4.

3.1.3 Modifikationen der Antikörper

3.1.3.1 Versuch 6: Versuch einer Dreifachfärbung von Gefäßen, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Mit dem bisher erarbeiteten Protokoll sollten im nächsten Schritt die Immunzellen mit angefärbt werden.

Ziel war eine gleichzeitige Darstellung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zusammen mit den Tumorgefäßen. Um alle drei Strukturen parallel anfärben zu können, mussten die drei verwendeten Primärantikörper von unterschiedlichen Spezies stammen. Deshalb wurde neben dem bisher verwendeten CD31-Primärantikörper aus dem Kaninchen ein CD8-Antikörper aus der Ratte und ein CD4-Antikörper vom Meerschweinchen benutzt.

Der Übersicht halber werden die vier verschiedenen Kanäle einzeln dargestellt (Abbildung 14A-D). A zeigt nur die Gefäße, B gibt die Autofluoreszenz des Gewebes wieder, C die CD4⁺ und D die CD8⁺ Zellen. Das Anfärben der Gefäße funktionierte auch in diesem Versuch gut (Abbildung 14A). Probleme bereitete jedoch der CD4-Antikörper aus dem Meerschweinchen. So konnte mit diesem Antikörper nur ein ca. 50µm schmaler Streifen am Rand der Probe eingefärbt werden (Abbildung 14C). Im Vergleich zum CD4-Antikörper konnte der CD8-Antikörper tiefer in die Probe penetrieren (Abbildung 14D). Am Rand und in aufgelockerten nekrotischen Bereichen markierte der Antikörper recht spezifisch einzelne Zellen. Tiefer im dichten Gewebe konnten damit keine Zellen detektiert werden. Stattdessen sorgte er dort für eine unspezifische Färbung des gesamten Tumorgewebes. Dies wirft die Frage auf, ob der Antikörper diese Bereiche nicht in ausreichender Menge erreichen konnte oder ob dort keine Zellen vorhanden sind.

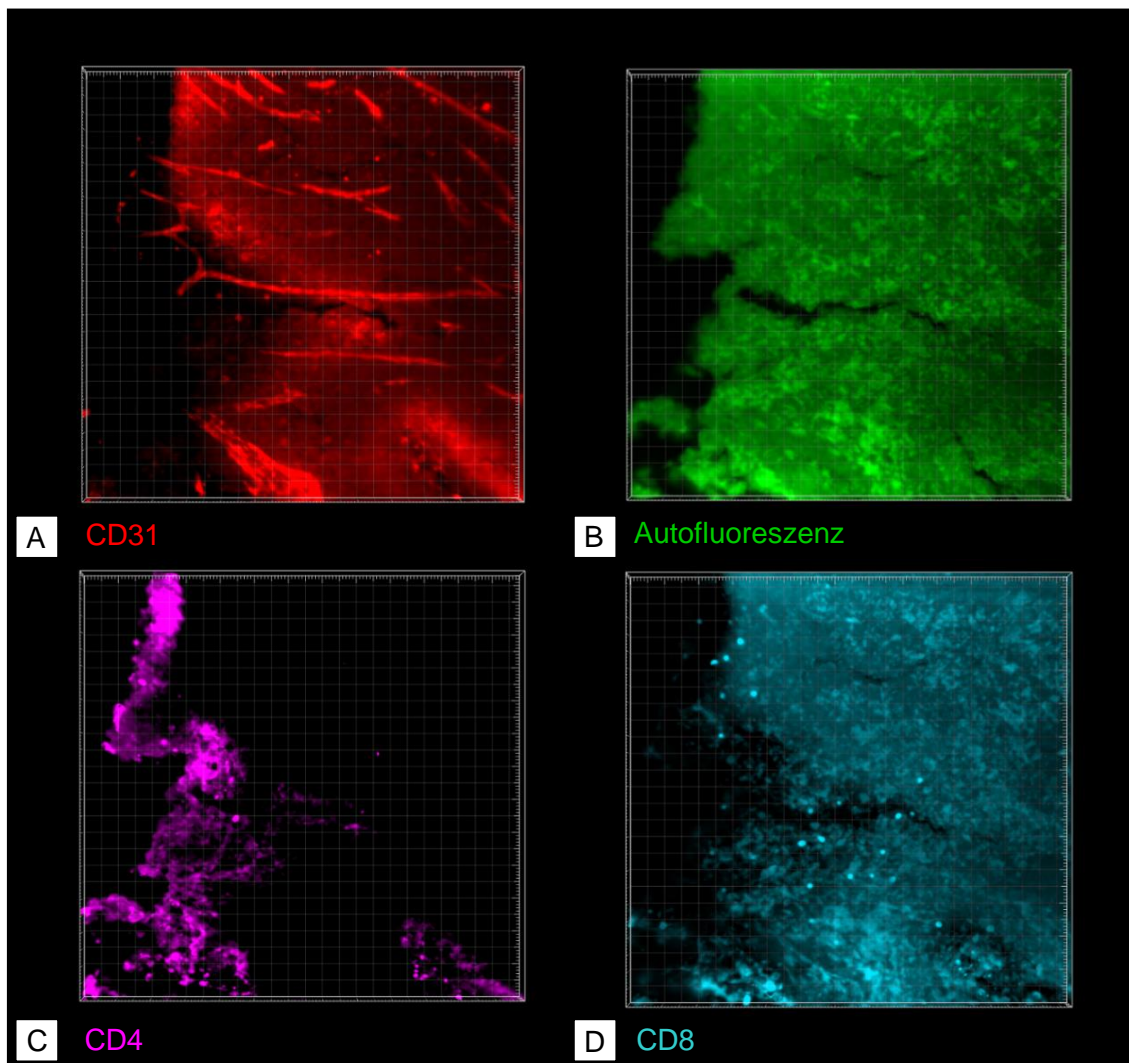


Abbildung 14: 3D-Immunfluoreszenzaufnahme eines AT3-Brusttumorsstücks mit Gefäß- und Immunzellmarkierung
 Es wurde nur eine geringe Schichtstärke aufgenommen, da diese ausreicht, um den Färbeerfolg der einzelnen Antikörper beurteilen zu können. **A** Gefäßdarstellung in rot mithilfe des CD31-Antikörpers. **B** Autofluoreszenz des Tumorgewebes in grün. **C** mittels CD4-Antikörper detektierte Strukturen in violett und **D** CD8⁺ Strukturen in türkis. Lichtmikroskopische Aufnahme am LSM. Größe der Aufnahmen: 512µm x 512µm x 19µm (Rasterweite: 20µm)

3.1.3.2 Versuch 7: Änderung der Sekundärantikörperverdünnung

Eine mögliche Ursache, weshalb sich die Färbung der Immunzellen in Versuch 6 fast ausschließlich auf den Randbereich bezogen hat, könnte eine zu geringe Konzentration der Sekundärantikörper sein. Diese wurden bisher immer in einem Verdünnungsverhältnis von 1:200 zugegeben. Im kommenden Versuch wurde das Verhältnis auf 1:100 erhöht.

Bei der Kontrolle der Färbung am konfokalen Mikroskop zeigte sich, dass die Verdopplung der Sekundärantikörper dazu geführt hat, dass innerhalb der gesamten

Probe eine unspezifische Hintergrundfluoreszenz entstanden ist. Einzelne Strukturen waren nicht mehr zu erkennen. Aus diesem Grund wurde in den nächsten Versuchen wieder das ursprüngliche Verdünnungsverhältnis verwendet.

3.1.3.3 Versuch 8: Suche geeigneter Primärantikörper

In Versuch 8 wurden in Einzelfärbungen geeignete Antikörper zur Immunzell Darstellung gesucht. Da die Färbung des CD8-Antikörpers in Versuch 6 besser war als die des CD4-Antikörpers, beschränkte sich die Suche auf einen CD4-Antikörper. Wie bereits erwähnt, müsste der CD4-Antikörper für die Dreifachfärbung aus einer anderen Spezies als der CD8- und der CD31-Primärantikörper, also nicht aus der Ratte oder dem Kaninchen, stammen. Diese sind allerdings mit Abstand die am häufigsten verwendeten Wirtstiere. Abgesehen von dem Antikörper aus dem Meerschweinchen konnte kein weiterer CD4-Antikörper aus einem anderen Tier gefunden werden. Deshalb wurde erst einmal unabhängig von der Spezies ein CD4-Antikörper gesucht, der in Verbindung mit diesem Protokoll funktioniert. Um auszuschließen, dass sich die Antikörper in Versuch 6 gegenseitig negativ beeinflusst haben, wurde der CD8-Antikörper aus der Ratte und der CD4-Antikörper aus dem Kaninchen parallel dazu auch als Einzelfärbung getestet.

Die Aufnahmen aller getesteten CD4-Antikörper sind in Abbildung 15 zu sehen. Bei allen Färbungen wurde ein Alexa 647-konjugierter Sekundärantikörper eingesetzt. Wie schon bei der Dreifachfärbung zeigte sich auch bei der Einzelfärbung mit dem Meerschweinchen-Antikörper eine starke recht unspezifische Fluoreszenz der äußeren 200-300µm (Abbildung 15A). Nur ganz am Rand waren vereinzelt zellähnliche Strukturen erkennbar. In Regionen tiefer als 300µm konnte der Antikörper überhaupt nicht eindringen. Sowohl wegen seiner geringen Spezifität als auch aufgrund der unzureichenden Eindringtiefe wurde der CD4-Antikörper aus dem Meerschweinchen für dieses Verfahren als unbrauchbar eingestuft.

Mit den beiden CD4-Antikörpern aus der Ratte (Invitrogen und Abcam) wurden ähnlich unzureichende Ergebnisse erzielt. Sie kamen beide jeweils nicht weiter als 200-300µm in die Probe. Während bei Verwendung des Antikörpers von Abcam (Abbildung 15C) vor allem der Randbereich recht unspezifisch fluoresziert, war der Antikörper von Jackson ImmunoResearch etwas besser in der Lage, spezifisch Zellen anzufärben (Abbildung 15B). Aufgrund der geringen Penetrationstiefe eignet sich dieser Antikörper jedoch auch nicht für das Anfärben von 3D-Gewebestücken.

Das beste Ergebnis der CD4-Antikörper verzeichnete der Antikörper aus dem Kaninchen von SinoBiological (Abbildung 15D). Hier konnten spezifisch Zellen bis zu einer Tiefe von mehr als 500µm markiert werden. Zur Mitte hin schwächt das Signal ab und wird erst ganz rechts am Rand wieder stärker. Es scheint, als wären nicht ausreichend viele Antikörper bis in die Mitte der Probe gelangt.

Da nur Aufnahmen in den Bereichen angefertigt wurden, in denen ein Signal zu vernehmen war, weisen die einzelnen Aufnahmen unterschiedliche Größen auf.

Das beste Ergebnis der Einzelfärbungen wurde mit dem CD8-Antikörper von Invitrogen (20-8080-82) aus der Ratte erzielt (Abbildung 16A). Abgesehen von einem schmalen Streifen am Probenrand, der intensiv fluoresziert, wurde hier eine spezifische und homogene Färbung der T-Zellen erlangt. Im gesamten Bereich sind Zellen erkennbar.

Diese Färbung war die erste, bei der in einem großen Bereich spezifisch Immunzellen detektiert werden konnten. Deshalb wurde diese Aufnahme verwendet, um exemplarisch zu zeigen, wie daran die Verteilung der Immunzellen quantitativ analysiert werden könnte. Zuerst wurde ein Ausschnitt ausgewählt, der eine homogene Färbung aufwies (Abbildung 16B). Innerhalb dieses Ausschnitts wurden die CD8⁺ T-Zellen als kugelförmige dargestellt (Abbildung 16C). Insgesamt wurden in dem knapp 0,225mm³ großen Stück 1243 CD8⁺ Zellen detektiert. Bei allen wurde der Abstand zur nächstgelegenen Nachbarzelle gemessen. Einige Zellen waren nur rund 8µm voneinander entfernt, während zwischen anderen Zellen Abstände von bis zu 218µm lagen. In Abbildung 17A sind die Häufigkeiten aller Werte in einem Histogramm dargestellt. Da der Großteil der Werte zwischen 7µm und 75µm und der Mittelwert aller Abstände bei 37,33µm lag, wurde mit Abbildung 17B ein weiteres Histogramm erstellt, welches den Bereich zwischen 7µm und 75µm detaillierter darstellt.

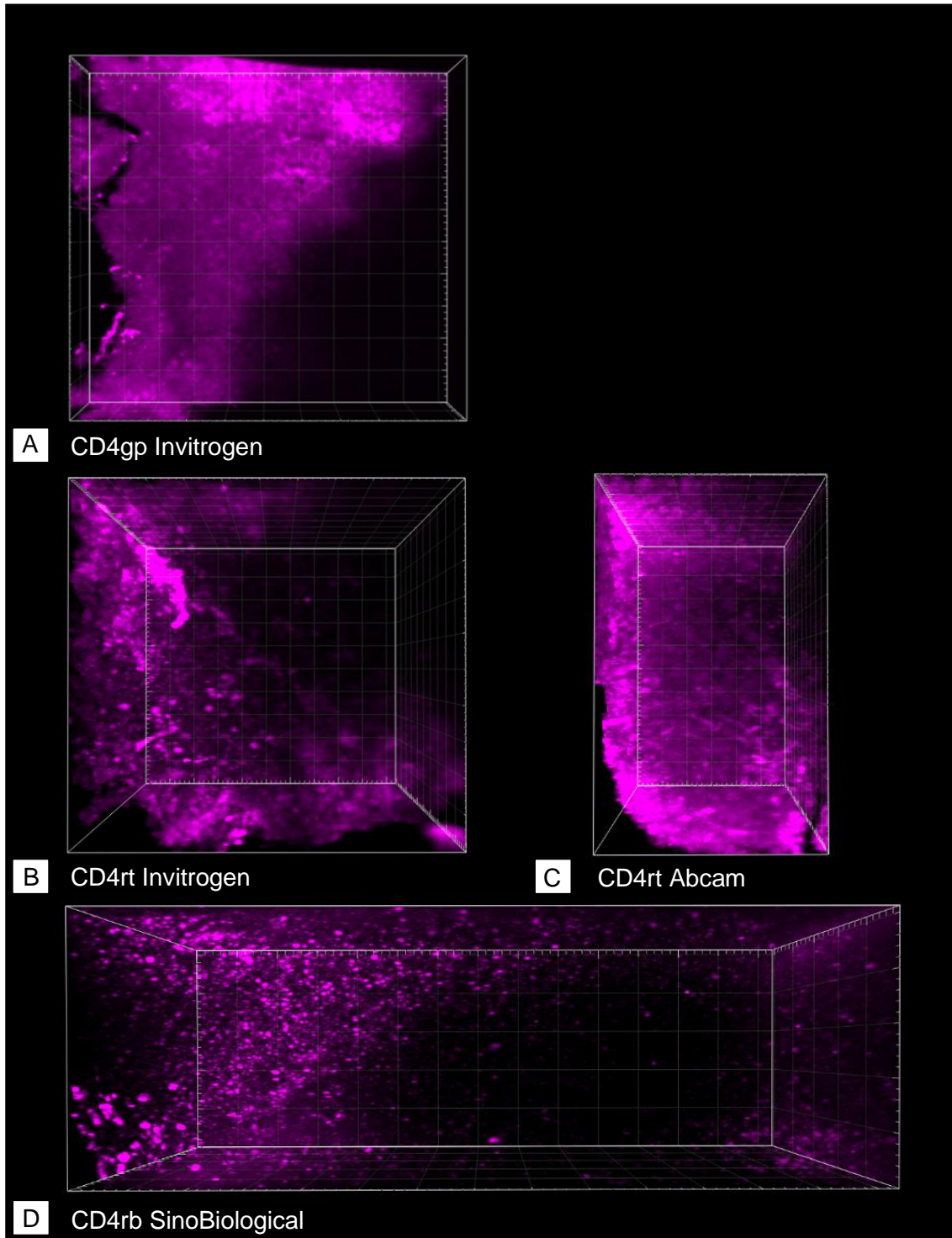


Abbildung 15: 3D-Immunfluoreszenzaufnahme von AT3-Brusttumorstücken mit Markierung $CD4^+$ T-Zellen unter Verwendung unterschiedlicher CD4-Antikörper

A Test des CD4-Antikörpers aus dem Meerschweinchen von Invitrogen. Es ist zu erkennen, dass der Antikörper nur bis zu einer Tiefe von rund $250\mu\text{m}$ eindringen konnte. **B** Einsatz des CD4-Antikörpers aus der Ratte von Invitrogen. **C** Färbung mit dem CD4-Antikörper von Abcam ebenfalls aus der Ratte. **A**, **B** und **C** weisen sehr geringe Eindringtiefen der Antikörper auf. Zudem sind die Färbungen recht unspezifisch. **D** Test des CD4-Antikörpers aus dem Kaninchen von SinoBiological. Färbung mehr als doppelt so tief wie bei den anderen CD4-Antikörpern. Es sind einzelne Zellen erkennbar. Lichtmikroskopische Aufnahmen am LSMF.

Größe der Aufnahmen: **A** $512\mu\text{m} \times 512\mu\text{m} \times 103\mu\text{m}$ (Rasterweite: $50\mu\text{m}$), **B** $512\mu\text{m} \times 512\mu\text{m} \times 519\mu\text{m}$ (Rasterweite: $50\mu\text{m}$), **C** $512\mu\text{m} \times 512\mu\text{m} \times 398\mu\text{m}$ (Rasterweite: $50\mu\text{m}$), **D** $512\mu\text{m} \times 512\mu\text{m} \times 1435\mu\text{m}$ (Rasterweite: $100\mu\text{m}$)

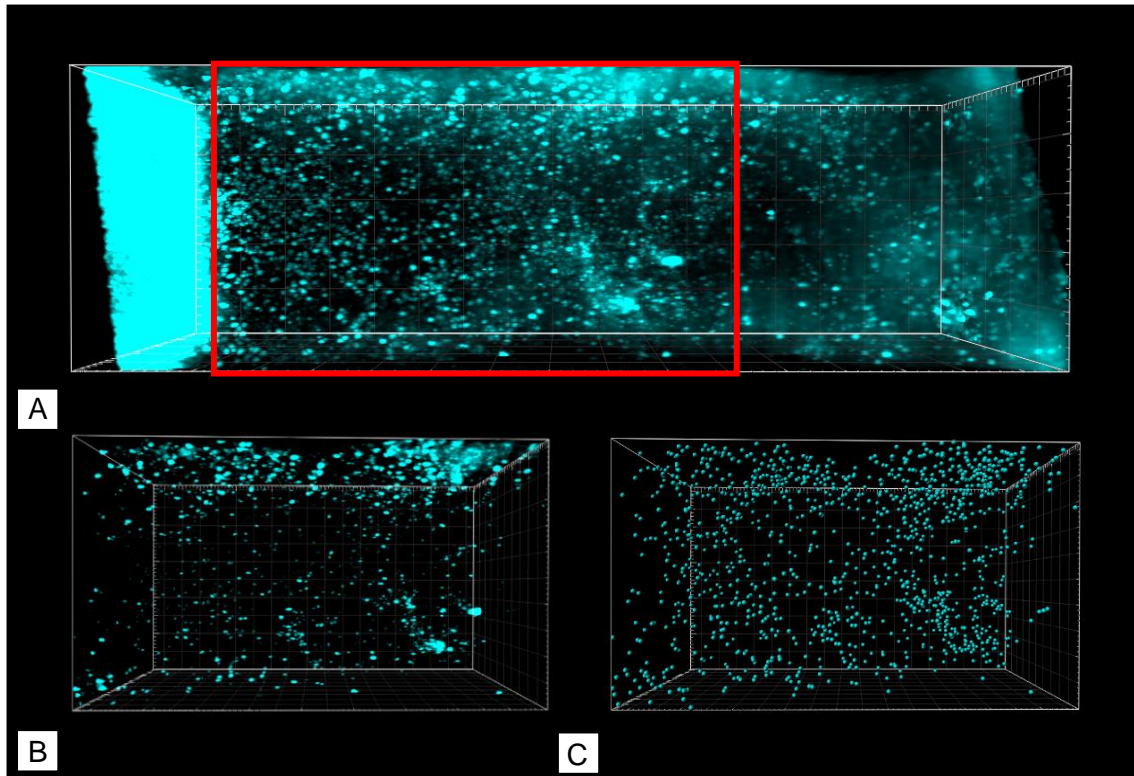


Abbildung 16: 3D-Immuno-Fluoreszenzaufnahme eines AT3-Brusttumorsstücks mit Markierung CD8⁺ T-Zellen. Für diese Färbung wurden CD8-Antikörper aus der Ratte von Invitrogen verwendet. **A** Unbearbeitete Aufnahme in Originalgröße. Da die Färbung nicht überall homogen war, wurde der intensiv fluoreszierende linke Rand sowie der schwächer gefärbte Bereich am rechten Rand abgeschnitten (**B**). Der gewählte Ausschnitt ist in **A** mit einem roten Kasten gekennzeichnet. Außerdem wurden in **B** die Anzeigeparameter so angepasst, dass nur noch die intensiv fluoreszierenden Signale übriggeblieben sind. **C** Rekonstruktion der Signale als kugelförmige Spots.
Größe der Aufnahmen: **A** 512µm x 512µm x 1672µm (Rasterweite: 100µm), **B** 512µm x 512µm x 900µm (Rasterweite: 50µm)

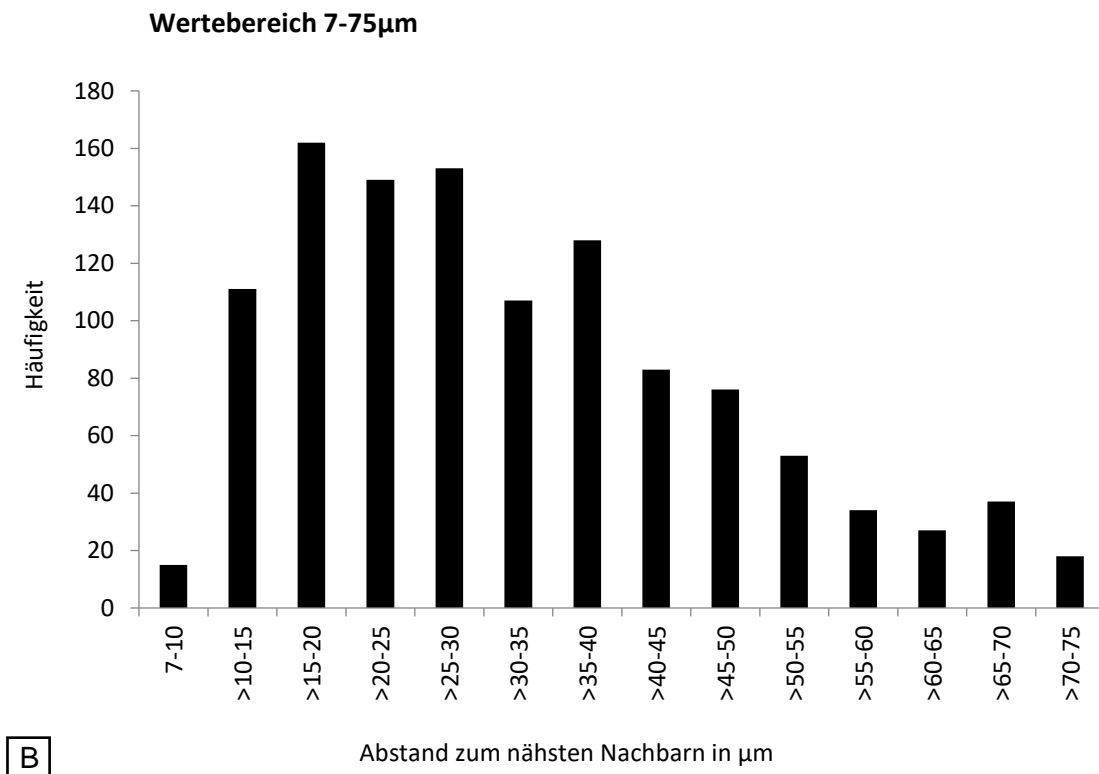
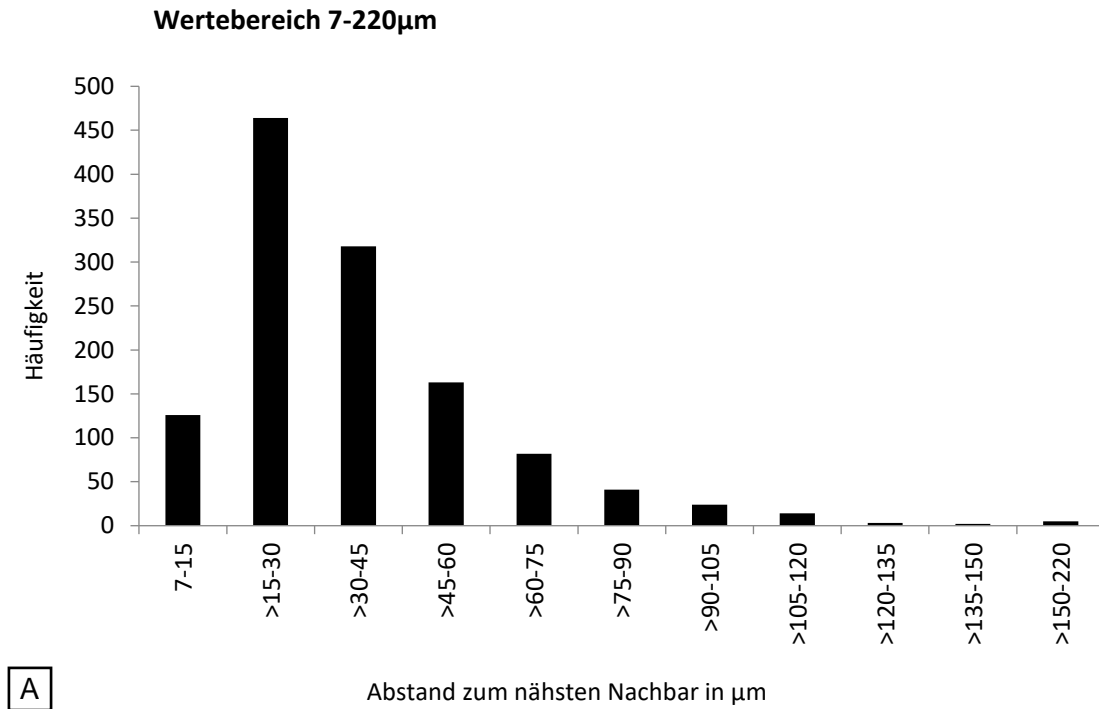


Abbildung 17: Histogramm zum Abstand der CD8⁺ T-Zellen zu ihren nahegelegenen CD8⁺ Nachbarzellen
A Gesamte Verteilung der Abstände der CD8⁺ Zellen zueinander. Der geringste Abstand zweier CD8⁺ T-Zellen lag bei 7 μ m, der weiteste bei 220 μ m. Der Großteil der Zellen befindet sich in einem Abstand zwischen 7 und 75 μ m zueinander. Dieser Bereich ist in **B** noch einmal im Detail dargestellt.

3.1.3.4 Versuch 9: Test Sekundärantikörper-Kombinationen für Doppelfärbung CD4/CD8

Nachdem nun jeweils ein CD4- und ein CD8-Primärantikörper gefunden wurde, der in Kombination mit dem erarbeiteten Färbeprotokoll funktioniert hat, wurde als nächstes eine Doppelfärbung der CD4⁺ und CD8⁺ Zellen angestrebt. Diese Doppelfärbung wurde zuvor von einer anderen Doktorandin der Arbeitsgruppe an histologischen Dünnschnitten der Brusttumore getestet. Hier hatte die Wahl des Sekundärantikörpers einen entscheidenden Einfluss auf das Färberesultat. So stellte sich heraus, dass die Färbung nur dann ein gutes Ergebnis hervorbrachte, wenn der CD8-Primärantikörper mit einem Alexa 647-Sekundärantikörper und der CD4-Antikörper mit einem Cy3-Sekundärantikörper kombiniert wurde. Andersherum fiel das Färberesultat schlechter aus. Aus diesem Grund wurde die Antikörperkombination für die Doppelfärbung der 3D-Tumorstücke übernommen. Da langwellige Strahlen Gewebe besser durchdringen können als kurzwellige, wurde eine weitere Färbung angefertigt, bei der der Cy3-Sekundärantikörper durch einen Alexa 750-gekoppelten Sekundärantikörper ersetzt wurde. Dieser konnte im zweidimensionalen Bereich nicht getestet werden, da es für dieses Fluorochrom keinen geeigneten Laser am institutseigenen Konfokalmikroskop gibt.

Bei Färbung 1 wurde der CD8-Primärantikörper mit einem Alexa 647 Sekundärantikörper und der CD4-Primärantikörper mit einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper kombiniert (Abbildung 18). Die CD8⁺ Zellen wurden türkis angefärbt, während die CD4⁺ Zellen violett dargestellt wurden. Abbildung 18A und C zeigen jeweils die unbearbeitete Version der Aufnahmen. In beiden Kanälen lassen sich sowohl Bereiche mit besonders intensiven als auch mit sehr schwachen Signalen finden. Bei den rekonstruierten Versionen verdeutlicht sich dieser Eindruck (Abbildung 18B und D). Hier sind Regionen mit einer Vielzahl nahe beieinander liegender Punkte zu sehen, während in anderen Bereichen kaum Zellen detektiert wurden. Da die Hintergrundfluoreszenz innerhalb der Aufnahme recht homogen ist, scheint die unregelmäßige Verteilung der Spots weniger dem Verfahren geschuldet zu sein, als vielmehr der realen Verteilung der Zellen zu entsprechen. Durch die gemeinsame Darstellung der rekonstruierten CD4⁺ und CD8⁺ Spots wird ersichtlich, dass sich die Bereiche in denen sich viele oder kaum Zellen befinden, in beiden Kanälen überschneiden (Abbildung 18F).

Für Färbung 2 wurde statt dem Cy3-Sekundärantikörper der Alexa 750-gekoppelte Sekundärantikörper eingesetzt (Abbildung 19). Auch hier stellen Abbildung 19A und C jeweils die unbearbeitete Version und Abbildung 19B und D die Aufnahmen nach Rekonstruktion der Spots dar. Die CD8⁺ Strukturen sind auch hier türkis und die CD4⁺ Strukturen violett dargestellt. Wie sich zeigt, hat die gleichzeitige Markierung der CD8⁺ und CD4⁺ Zellen auch bei dieser Variante recht gut funktioniert. Nicht eindeutig ist der Färbefolg jedoch in Abbildung 19A. Hier ist am linken oberen Rand ein kleiner Bereich zu sehen, bei dem kaum Zellen angefärbt wurden. Gleichzeitig ist hier auch die Hintergrundfluoreszenz schwächer als im Rest der Aufnahme ausgeprägt. Fraglich ist, ob die Verteilung der Zellen reell ist, oder ob die abgeschwächte Färbung in diesem Bereich an einer insuffizienten Färbung liegt. Da die Färbung im Normalfall erst zur Probenmitte hin und nicht direkt am Rand abschwächt, scheint es wahrscheinlicher, dass sich in diesem Fall hier kaum Zellen befinden. Bei der gleichzeitigen Darstellung beider Zellgruppen in Abbildung 19F gibt es im Gegensatz zur Färbung 1 nur teilweise Überschneidungen der CD4⁺ und CD8⁺ Spots. Die CD4⁺ Zellen verteilen sich recht gleichmäßig im Gewebe. Dagegen weisen die CD8⁺ Zellen vermehrt Ansammlungen auf und sind dafür in anderen Regionen gar nicht vorhanden.

Vergleicht man die Aufnahmen, in denen jeweils die CD4⁺ und die CD8⁺ T-Zellen markiert sind (Abbildung 18/Abbildung 19A und C) mit Abbildung 18E und Abbildung 19E, welche beide die Autofluoreszenz des Tumorgewebes zeigen, so lässt sich kein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen der T-Zellen und der Beschaffenheit des Gewebes erkennen. Im direkten Vergleich brachte die Verwendung der zwei verschiedenen Sekundärantikörper vergleichbare Ergebnisse. Da der Cy3-gekoppelte Antikörper etwas kostengünstiger und bereits in größeren Mengen vorrätig war, wurde dieser für die nächsten Färbungen gewählt.

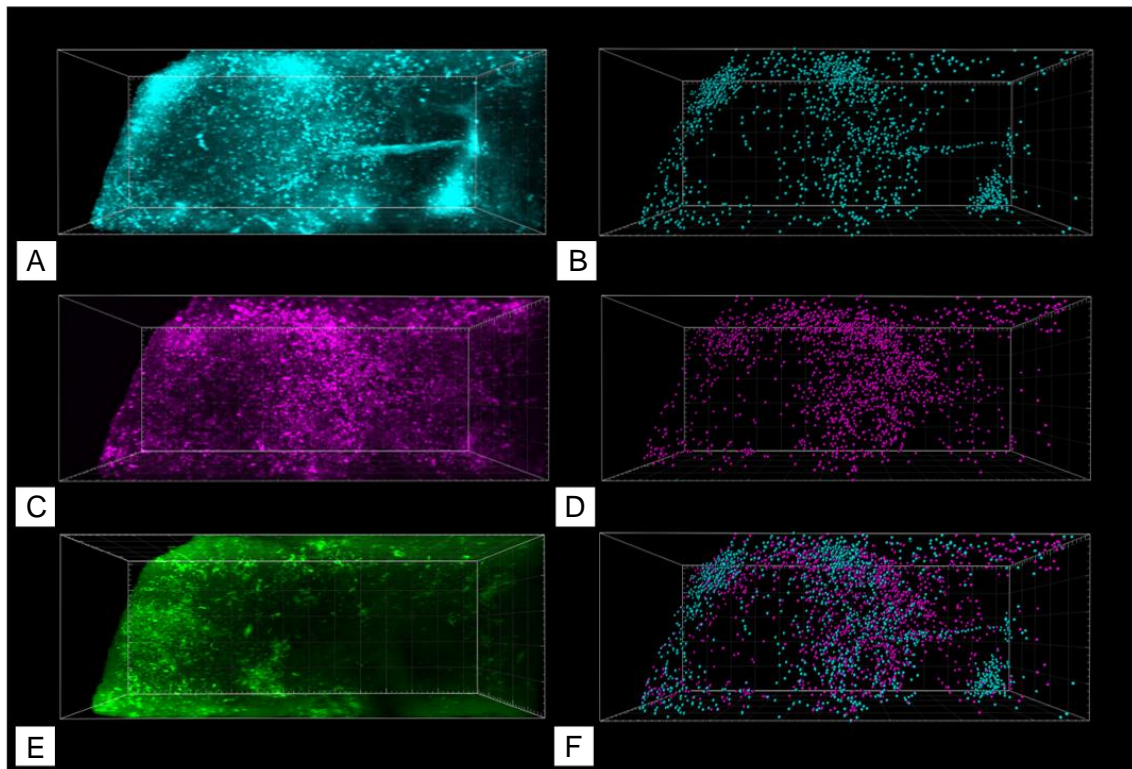


Abbildung 18: 3D-Immunfluoreszenzaufnahme eines AT3-Brusttumorsstücks mit Doppelfärbung von CD8⁺ (Alexa 647-Sekundärantikörper) und CD4⁺ T-Zellen (Cy3-Sekundärantikörper) (Färbung 1)

A Unbearbeitete Aufnahme mit Markierung der CD8⁺ Zellen (türkis). **B** Rekonstruktion der CD8⁺ Zellen als kugelförmige Spots. Links zu sehen ist der Probenrand, von welchem die Antikörper in die Probe penetrierten. Innerhalb der Aufnahme sind viele intensiv fluoreszierende Punkte erkennbar. Daneben gibt es Bereiche mit schwach gefärbten Strukturen vor einer intensiven Hintergrundfluoreszenz. **C** Unbearbeitete Aufnahme der CD4⁺-Markierung. **D** Rekonstruktion der CD4⁺ Zellen als kugelförmige Spots. Die Färbung ist recht homogen. Innerhalb der gesamten Aufnahme sind Zellen detektiert. **E** Autofluoreszenz des Tumorgewebes. In der linken Hälfte der Aufnahme lassen sich vermehrt intensive Fluoreszenzsignale erkennen. Diese stellen Erythrozyten dar. Zur Probenmitte sind weniger Erythrozyten sichtbar. **F** Gleichzeitige Darstellung der CD4⁺ und CD8⁺ Zellen. Größtenteils überschneiden sich die Bereiche mit vielen und die mit wenigen Zellen in beiden Färbungen.

Größe der Aufnahmen: 512µm x 512µm x 1354µm (Rasterweite: 100µm)

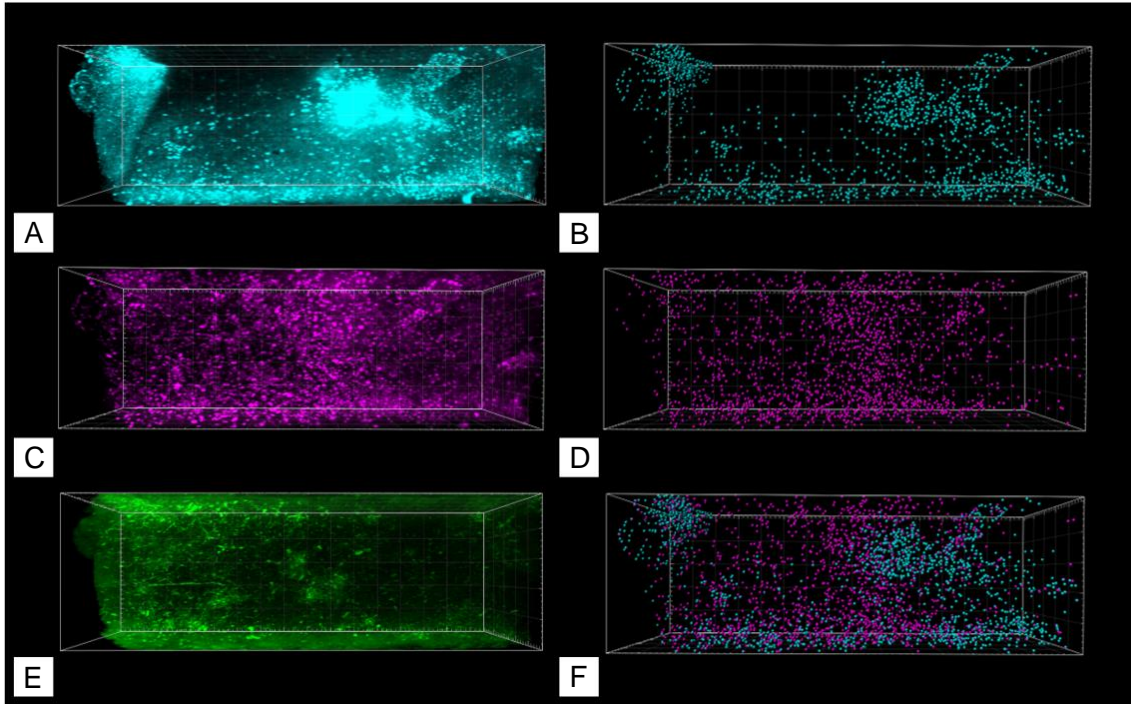


Abbildung 19: 3D-Immunfluoreszenzaufnahme eines AT3-Brusttumorsstücks mit Doppelfärbung von CD8⁺ (Alexa 647-Sekundärantikörper) und CD4⁺ T-Zellen (Alexa 750-Sekundärantikörper) (Färbung 2)

A Unbearbeitete Aufnahme mit CD8⁺ Markierung. **B** Aufnahme nach Rekonstruktion der CD8⁺ Zellen als kugelförmige Spots. Sowohl **A** als auch **B** zeigen, dass ein Bereich am oberen Rand der Aufnahme nicht suffizient gefärbt wurde. Im Rest der Aufnahme sind Zellen erkennbar. Diese sind teilweise locker im Gewebe verteilt, teilweise eng in Gruppen zusammengelagert.

C Unbearbeitete Aufnahme mit CD4⁺ Markierung und **D** Aufnahme nach Rekonstruktion der CD4⁺ Zellen als kugelförmige Spots. Die Färbung erscheint recht homogen. In der gesamten Aufnahme lassen sich gleichmäßig verteilte Zellen erkennen. **E** Autofluoreszenz des Tumorgewebes. Die intensiv fluoreszierenden Punkte stellen Erythrozyten dar. **F** Die türkisen gefärbten Punkte stellen CD8⁺ Zellen, die violetten CD4⁺ Zellen dar. Während die violetten Spots recht gleichmäßig innerhalb des Gewebes verteilt sind, gibt es bei den türkisen Spots Bereiche mit Zellansammlungen und andere Bereiche, in denen sich gar keine CD8⁺ Zellen befinden.

Größe der Aufnahmen: 512 μ m x 512 μ m x 1558 μ m (Rasterweite: 100 μ m)

3.1.3.5 Versuch 10: Doppelfärbung CD4/CD8 an Proben der verschiedenen Behandlungsgruppen

Beim abschließenden Versuch wurde anhand des erarbeiteten Protokolls an je einem Tumorstück jeder Behandlungsgruppe eine Doppelfärbung mit CD4- und CD8-Antikörpern vorgenommen. Im Anschluss sollten die Proben bezüglich ihrer Immunzellzahl und -verteilung miteinander verglichen werden. Für den Versuch wurden die Antikörper verwendet, die für die Färbung 2 im vorherigen Versuch verwendet wurden. Diese waren der CD8-Primärantikörper aus der Ratte von Invitrogen (20-8080-82) mit dem Alexa 647-Sekundärantikörper von Jackson ImmunoResearch (112-605-143) und der CD4-Primärantikörper aus dem Kaninchen von SinoBiological (50134-R766), welcher mit dem Cy3-Sekundärantikörper von Jackson ImmunoResearch (111-165-003) kombiniert wurde. Die Proben stammten im Gegensatz zu denen der vorausgehenden Probefärbungen aus einer späteren Versuchsreihe. Obwohl die Behandlung der Mäuse identisch zu der der ersten Versuchsreihe war, waren die entnommenen Tumore diesmal kleiner.

Unter dem Mikroskop war zu erkennen, dass die Tumore weniger nekrotische Areale aufwiesen und daher kompakter strukturiert waren. Dies war vermutlich der Grund für die deutlich schlechteren Färbeergebnisse. Von jeder Probe wurde eine Aufnahme von der Probenmitte gemacht und eine weitere von einem Bereich, an dem die Färbung etwas tiefer eindrang (Abbildung 20 und Abbildung 21). Dabei handelte es sich entweder um den Rand der Probe oder um einen nekrotischen Abschnitt. Allerdings fielen die Ergebnisse selbst hier immer noch wesentlich schlechter aus, als die der beiden vorausgehenden Versuche.

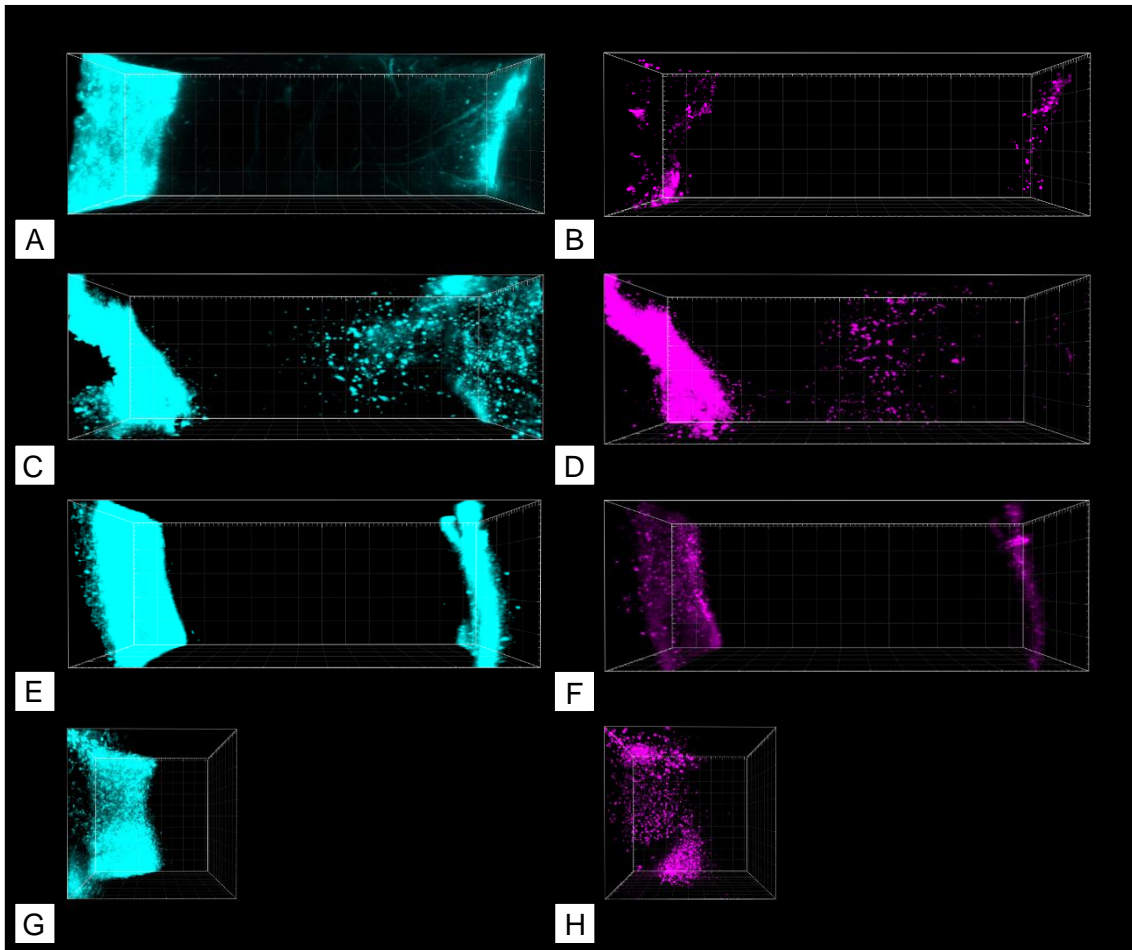


Abbildung 20: 3D-Immunfluoreszenzaufnahmen von AT3-Brusttumorstücken aus der Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppe Minoxidil mit Doppelfärbung CD8⁺ und CD4⁺ Zellen

Mithilfe des CD8-Antikörpers markierte Strukturen sind türkis dargestellt, CD4⁺ Strukturen violett. **A-D** Tumorstücke aus der Kontrollgruppe. **A+B** Aufnahmen aus der Tumormitte. **A** Auf der rechten Seite haben die CD8-Antikörper gefäßähnliche Strukturen markiert. **B** In der Probenmitte fehlt die Markierung vollständig. Weder der CD4- noch der CD8-Antikörper erzielten eine suffiziente Färbung. **C+D** Aufnahmen eines nekrotischen Bereiches. Jeweils ein intensiv gefärbter Bereich am linken Rand und vereinzelte zellähnliche Strukturen vom rechten Rand bis hin zur Probenmitte erkennbar. **E-H** Tumorstücke aus der Behandlungsgruppe Minoxidil. **E+F** Aufnahmen aus der Tumormitte. Ergebnis ähnlich wie bei **A+B**. In der Probenmitte keine Markierung. Die CD8-Markierung in **E** ist sehr intensiv, sodass kaum einzelne Zellen sichtbar sind. **F** Einzelne CD4⁺ Zellen in den Randbereichen erkennbar. **G+H** Aufnahmen vom Tumorrand. Die Färbung reicht vom Probenrand aus ca. 250µm in die Tiefe. Im Rest der Probe wurden keine CD8⁺ bzw. CD4⁺ Strukturen detektiert. Lichtmikroskopische Aufnahmen am LSM.

Größe der Aufnahmen: **A+B** 512µm x 512µm x 1534µm (Rasterweite: 100µm), **C+D** 512µm x 512µm x 1456µm (Rasterweite: 100µm), **E+F** 512µm x 512µm x 1456µm (Rasterweite: 100µm), **G+H** 512µm x 501µm (Rasterweite: 50µm)

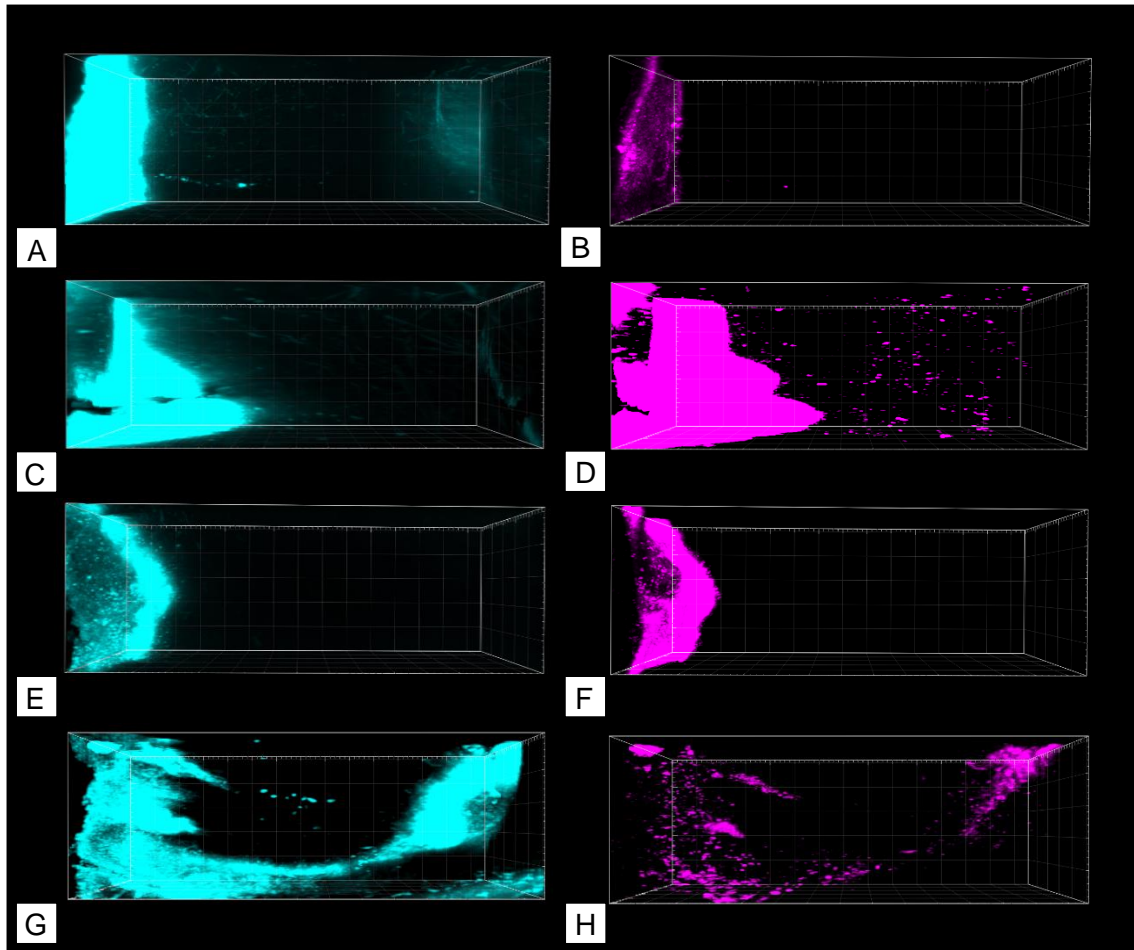


Abbildung 21: 3D-Immunfluoreszenzaufnahme von AT3-Brusttumorstücken aus der Behandlungsgruppe BMS und der Behandlungsgruppe BMS+Minoxidil mit Doppelfärbung CD8⁺ und CD4⁺ Zellen. CD8⁺ Strukturen sind türkis, CD4⁺ Strukturen violett dargestellt. **A-D** Tumorstücke aus der Behandlungsgruppe BMS. **A+B** Aufnahmen aus der Tumormitte. In beiden Aufnahmen ist der linke Probenrand angefärbt. Einzelne Zellen sind nicht zu erkennen. **A** Innerhalb der gesamten Färbung schwache Hintergrundfluoreszenz. **C-D** Aufnahmen von nekrotischem Bereich. **C** Ausschließlich überbelichteter Bereich am linken Rand der Aufnahme zu sehen. **B** Zusätzlich zu Diesem einzelne zellähnliche Strukturen im Rest der Aufnahme. **E-H** Tumorstücke aus der Behandlungsgruppe BMS+Minoxidil. **E+F** Aufnahmen aus der Tumormitte. **E+F** In beiden Aufnahmen ist nur ein schmaler Bereich am Probenrand (links) angefärbt. Im Rest der Aufnahme sind keine Fluoreszenzsignale sichtbar. **G+H** Aufnahmen vom Tumorrand. In beiden Farbkanälen zieht sich ein gefärbter Streifen quer durch die Aufnahme. **G** Kaum zellähnliche Strukturen zu erkennen. **H** Innerhalb dieses Streifens punktförmige Signale detektiert. Lichtmikroskopische Aufnahmen am LSM.
 Größe der Aufnahmen: **A+B** 512µm x 512µm x 1456µm (Rasterweite: 100µm), **C+D** 512µm x 512µm x 1456µm (Rasterweite: 100µm), **E+F** 512µm x 512µm x 1456µm (Rasterweite: 100µm), **G+H** 512µm x 512µm x 1456µm (Rasterweite: 100µm)

3.2 Mikroskopieren am LSFM

Das Blickfeld des am LSFM verwendeten 20x Objektivs beträgt in Fokalebene $512\mu\text{m} \times 512\mu\text{m}$. Dagegen variierte die Länge der Aufnahme in z-Richtung von Aufnahme zu Aufnahme. In einigen Fällen sollte nur ein kleiner Ausschnitt aufgenommen werden. Dies war z.B. erforderlich, um zu zeigen, dass ein bestimmter Antikörper nicht funktioniert hat. Bei der Mehrzahl der Proben sollte die Aufnahme so weit wie möglich in die Tiefe gehen. Dies war allerdings nicht immer realisierbar. Für das erste Experiment wurde aus dem Tumor ein Kubus mit einer Kantenlänge von ca. 5mm geschnitten. Um die Fixierung der Probe am Probenhalter des LSFM zu erleichtern, wurde das Tumorstück in Agarose eingebettet. Hierbei erwies sich die korrekte Positionierung der Probe im Agaroseblock als schwierig. Darüber hinaus erschwerte die Agarose das Mikroskopieren. Durch die gekippte Position des Tumorstücks war es nicht möglich, eine gleichmäßige Aufnahme vom Tumorrand ausgehend anzufertigen. Hinzu kam, dass das 20x LSFM-Objektiv einen relativ geringen Arbeitsabstand hat, so dass die Probe nicht vollständig aufgenommen werden konnte. Um auf die Agaroseeinbettung verzichten zu können, wurden die Tumore für die folgenden Versuche in 1,5 bis 2mm dicke Scheiben geschnitten. Dies ermöglichte eine Aufhängung der Probe ohne Agaroseeinbettung, eine Verringerung des Arbeitsabstandes der Probe zum Objektiv und zusätzlich eine Verkürzung der Diffusionsstrecke für die Reagenzien. Außerdem konnte die Probe so senkrecht vor das Objektiv gehängt werden, was eine gleichmäßige Aufnahme ermöglichte. Es konnte eine maximale Aufnahmetiefe von $2354\mu\text{m}$ erreicht werden.

3.3 Entwicklung eines geeigneten Bildbearbeitungsverfahrens

3.3.1 Gefäßdarstellung

Für die Bildverarbeitung in *Imaris* wurde die Oberflächenrekonstruktion zur 3D-Visualisierung des Gefäßnetzwerkes eingesetzt. Die Oberflächenrekonstruktion dient der quantitativen und qualitativen Erfassung der dargestellten Strukturen. Unterschiedliche Bearbeitungsparameter können das Endergebnis dabei massiv beeinflussen. Für die Gefäßdarstellung soll dies am Beispiel von Versuch 1 gezeigt werden. In Tabelle 11 sind die für die jeweilige Darstellung gewählten Parameter aufgeführt. Zur besseren Nachvollziehbarkeit der Schritte werden im Folgenden überwiegend die englischen Originalbezeichnungen aus *Imaris* verwendet. Das unbearbeitete Bild ist übersichtshalber noch einmal in Abbildung 22A dargestellt.

Den größten Einfluss auf das Endresultat hatte die Wahl des Schwellenwerts bzw. des Schwellenwertverfahrens. Sie spielen bei der Binarisierung der Aufnahmen eine entscheidende Rolle. Dabei wird jedes Voxel entweder dem Vorder- oder dem Hintergrund zugeordnet. Fluoreszenzsignale unterschiedlicher Intensitäten werden ab bzw. bis zu einem bestimmten Intensitäts-Schwellenwert einheitlich dargestellt. Bei den Schwellenwertverfahren konnte zwischen *Absolute Intensity* und *Background Subtraction (Local Contrast)* gewählt werden.

Bei *Absolute Intensity* wird ein globaler Schwellenwert für die gesamte Aufnahme festgelegt. Jedes Voxel wird unabhängig von seiner Umgebung betrachtet. Die Intensität der abzubildenden Strukturen in den tiefen Schichten ist häufig ähnlich oder geringer als die Hintergrundfluoreszenz in den stark fluoreszierenden Randpartien. Bei Wahl eines niedrigen Schwellenwertes konnten auch die schwach gefärbten Gefäße in der Mitte des Gewebes erkannt werden. Dies hatte zur Folge, dass die Hintergrundfluoreszenz am Rand zum Vordergrund gezählt wurde, wodurch der Hintergrund mit den Gefäßen zu einem einheitlichen Komplex verschmolz (Abbildung 22G). Wurde dagegen ein zu hoher Schwellenwert festgelegt, so konnten die Gefäße am Rand von der Hintergrundfluoreszenz unterschieden und einzeln dargestellt werden. Dadurch wurden die schwach gefärbten Gefäße in der Tiefe nicht mehr detektiert (Abbildung 22H). Das Schwellenwertverfahren *Absolute Intensity* ist bei homogenen Färbungen sinnvoll. Für die vorliegende Arbeit ist diese Einstellung ungeeignet, da die Färbeintensitäten innerhalb der Proben oft stark variierten.

Die Alternative zu *Absolute Intensity* ist die Einstellung *Background Subtraction*. Dabei handelt es sich nicht um ein globales, sondern um ein lokales Schwellenwertverfahren. Hier definiert der lokale Kontrast die lokalen Grenzwerte. Das bedeutet, dass in verschiedenen Regionen des Bildes unterschiedliche Schwellenwerte gelten. Dies ermöglicht eine gleichzeitige Detektion der Gefäße der Randbereiche und der Probenmitte. Durch die Verwendung unterschiedlicher Schwellenwerte innerhalb einer Aufnahme ist diese Methode besser für uneinheitlich gefärbte Proben geeignet. Für die Bearbeitung von Abbildung 22B-F wurde *Background Subtraction* gewählt.

Hier musste zusätzlich der maximale Durchmesser der darzustellenden Strukturen (*Diameter Of Largest Sphere*) festgelegt werden. Um eine realistische Größe der Gefäße zu erlangen, sollte dieser Wert nicht zu groß gewählt werden. Wie sich der Wert auf die Rekonstruktion auswirkt, zeigt der Vergleich von Abbildung 22B und D. In Abbildung 22D

lag der Wert des maximalen Durchmessers bei $3,75\mu\text{m}$, in Abbildung 22B lag er mit $7,5\mu\text{m}$ doppelt so hoch. Abgesehen davon wurden beide Aufnahmen mit denselben Einstellungen bearbeitet. Je höher der Wert gewählt wurde, desto dicker wurden die einzelnen Gefäße dargestellt. Die Rekonstruktion in Abbildung 22D entspricht eher der Realität als die in Abbildung 22B.

Wie bereits erwähnt, hat der Schwellenwert einen großen Einfluss auf das Endresultat. Er ist für jede Aufnahme individuell festzulegen und sollte so gewählt werden, dass möglichst viele Gefäße dargestellt werden, ohne dass deren Auflösung beeinträchtigt wird. Bei Abbildung 22E wurde der Schwellenwert gemäß der automatischen Erkennungsfunktion der Software auf 39,4 gesetzt. Dadurch wurden nur intensiv fluoreszierende Gefäße erkannt, schwache Signale zur Mitte hin wurden nicht wahrgenommen. In Abbildung 22D, welche ansonsten identisch bearbeitet wurde, wurde der Schwellenwert manuell auf 10 festgelegt, wodurch mehr Gefäße dargestellt wurden.

Im nächsten Schritt wurden mithilfe des Filters *Number of Voxels* besonders kleine Objekte herausgefiltert, welche häufig Artefakte darstellen und das Ergebnis verfälschen könnten. Der Wert des Filters beschreibt die maximale Anzahl zusammenhängender Voxel, die entfernt werden sollen. Er muss für jede Aufnahme individuell eingestellt werden. Welchen Einfluss diese Einstellung hat, zeigt ein Vergleich zwischen Abbildung 22D und F. In D wurden Objekte bis zu einer Größe von 2000 zusammenhängender Voxel ($2000\mu\text{m}^3$) herausgefiltert. In F wurden keine Objekte herausgefiltert.

3 Ergebnisse

Tabelle 11: Übersicht der getesteten Einstellungsparameter in Bezug auf Abbildung 22
 ×: nicht auswählen, ✓: auswählen

Abbildung 22	B	C	D	E	F	G	H
Background Subtraction	✓	✓	✓	✓	✓	Absolute Intensity	Absolute Intensity
Diameter of Largest Sphere	7,5	7,5	3,75	3,75	7,5	×	×
Manual Threshold Value	10	39,4 (automatisch)	10	39,4 (automatisch)	10	45	145
Manual Threshold Value B	208	208	163	163	208	255	255
Number of Voxels	2000	2000	2000	2000	0	0	0

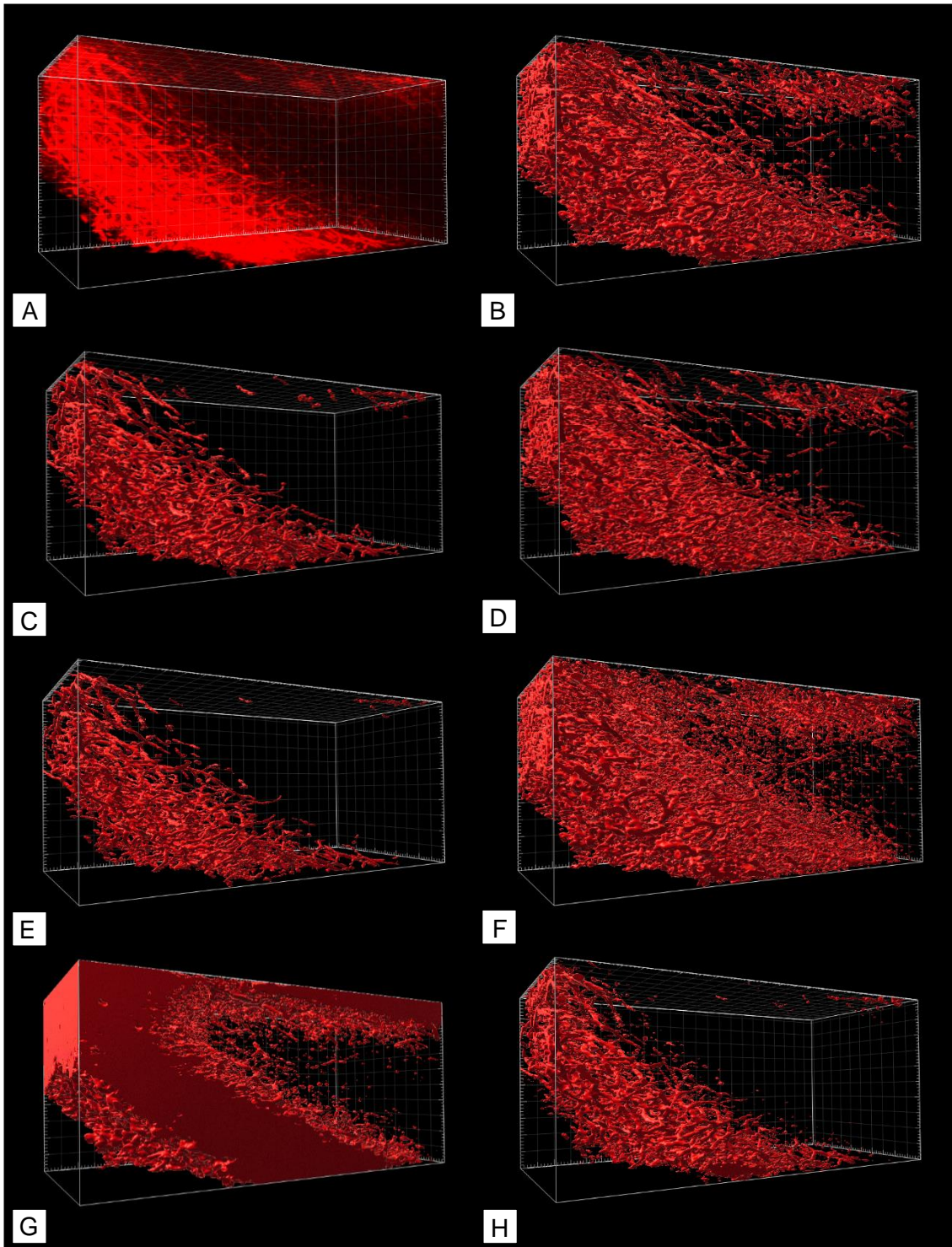


Abbildung 22: Unterschiedliche Bearbeitungen der 3D-Immunszenenaufnahme von Versuch 1
A unbearbeitete Version der Aufnahme. **B-H** Aufnahme nach Bearbeitung mit unterschiedlichen Einstellungen. Die Bearbeitungsparameter von **B-H** sind Tabelle 11 zu entnehmen. **C**, **E** und **H** ausschließlich Gefäße im stark fluoreszierenden Randbereich. Die schwach markierten Gefäße in der Tiefe wurden hier nicht erkannt. **F** Werten aller Signale als Gefäß. Dadurch wurden mehr Gefäße dargestellt als der Realität entsprechen. **G** kaum Gefäßstränge erkennbar, da hier der Hintergrund mit den detektierten Gefäßen verschwommen ist. **D** Version, die am ehesten der Realität entspricht.
 Größe der Aufnahmen: $512\mu\text{m} \times 512\mu\text{m} \times 1242\mu\text{m}$ (Rasterweite: $50\mu\text{m}$)

3.3.2 Immunzellendarstellung

Die Entwicklung eines geeigneten Bildbearbeitungsverfahrens zur Darstellung der Immunzellen fand anhand der Färbung der CD8⁺ T-Zellen von Versuch 8 statt. Abbildung 23A zeigt diese Aufnahme im unbearbeiteten Zustand. Ziel der Bildprozessierung war es, den Großteil aller Zellen zu detektieren, ohne falsch positive Signale zu erhalten. Dafür wurde die Aufnahme so zugeschnitten, dass alle Bereiche, in denen die Färbung insuffizient war, entfernt wurden. Der Ausschnitt ist mit einem roten Kasten in Abbildung 23A markiert und in Abbildung 23B dargestellt. Dabei wurde der stark überbelichtete linke Rand sowie der insuffizient angefärbte rechte Rand der Aufnahme weggeschnitten. Die zugeschnittene Aufnahme wies dennoch Inhomogenitäten auf. Die Detektionsmethode musste daher so gewählt werden, dass sie sowohl für die intensiven als auch für die schwachen Grenzbereiche funktioniert. Zuerst wurden die Anzeigeparameter so eingestellt, dass sehr schwache Signale nicht mehr dargestellt und die übrigen Signale in ihren Intensitäten angeglichen wurden. Entscheidend ist, dass dies ausschließlich über die Veränderung des Maximal- bzw. Minimalwerts geschieht, während der Gammawert stets bei 1 bleiben muss. Dadurch wird das ursprüngliche Verhältnis beibehalten. Die Aufnahme mit den angepassten Anzeigeeinstellungen ist in Abbildung 23C dargestellt.

Für die Detektion und Visualisierung der Immunzellen wurde die Funktion *Spot Creation* verwendet. Damit erkennt das Programm automatisch punktförmige Strukturen und stellt diese als Kugeln dar (Bitplane, 2018, p. 428). Wie auch bei der Gefäßdarstellung können unterschiedliche Einstellungen das Endergebnis stark beeinflussen. Analog zum *Diameter of Largest Sphere* bei der Gefäßdarstellung gibt es hier die Variable *Estimated Diameter*. Damit wird der minimale Durchmesser der Objekte festgelegt, die noch vom Programm erkannt werden sollen. Strukturen mit geringeren Durchmessern werden nicht detektiert (Bitplane, 2018, p. 431). Die Spots werden anschließend auch in dieser Größe dargestellt. Bereits eine geringe Variation des Werts hat einen großen Einfluss auf die Rekonstruktion. Da die Lymphozyten der Maus zwischen 7 und 12µm groß sein können (Hendrich, 2012, p. 338), wurden die Werte 7µm (Abbildung 24A), 10µm (Abbildung 24B) und 12µm (Abbildung 24C) getestet. Ansonsten wurden die drei Aufnahmen mit denselben Einstellungsparametern bearbeitet. Je kleiner der Durchmesser gewählt wurde, desto mehr Strukturen wurden vom Programm erkannt. Dies führte dazu, dass auch kleine punktförmige Artefakte als Zellen gewertet wurden. Wurde der Wert zu hoch gewählt, wurde ein Teil der Zellen nicht erkannt. Um die falsch

positiven Signale zu reduzieren und trotzdem den Großteil der Zellen zu erhalten, scheint der Wert 10µm am besten geeignet zu sein.

Den größten Einfluss auf das Endresultat hat das Filterkriterium, nach welchem die Spots selektiert wurden, und dessen Wert. Hierfür standen unterschiedliche Filter zur Auswahl. Einer davon ist der Filter *Intensity Center*, bei dem das Filterkriterium „the intensity of the voxel at the center of the Spot“ ist (Bitplane, 2018, p. 161). Bei *Intensity Mean* und *Intensity Median* wird nach dem Mittel- bzw. der Medianwert der Intensitäten der Voxel innerhalb eines Spots gefiltert. Als vierte Möglichkeit stand der Filter *Quality* zur Verfügung, der folgendermaßen definiert ist: „intensity at the center of the spot in the channel the spot was detected. [...] the intensity is the one of a Gaussian filtered channel from above minus the intensity of the original channel Gaussian filtered by 8/9 of spot radius“ (Bitplane, 2018, p. 432f). Abhängig vom Filter wählt das Programm unterschiedliche Spots aus. An dieser Stelle musste entschieden werden, bei welchem Filter die meisten Zellen erkannt werden, ohne dass Artefakte als Zellen gewertet wurden. Um herauszufinden, welcher Filter für die T-Zelldarstellung am besten geeignet ist, wurde die Aufnahme zum Vergleich mit unterschiedlichen Filtern bearbeitet. Bei jedem Filter musste ein oberer und ein unterer Grenzwert festgelegt werden. Objekte, die innerhalb dieses Intervalls lagen, wurden angezeigt. Die Werte der Filter wurden so gewählt, dass die Mehrheit der vom Betrachter als Zellen identifizierten Signale erkannt wurden. Gleichzeitig musste darauf geachtet werden, dass nicht zu viele Objekte erkannt wurden, welche zu falsch-positiven Ergebnissen führen würden. Das Ergebnis war allerdings bei keinem der Filter vollständig zufriedenstellend. Durch die Inhomogenitäten innerhalb der Aufnahme führten die getesteten Filter je nach Wert entweder zu zu vielen falsch-negativen oder zu falsch-positiven Signalen. In Bereichen, in denen die Zellen locker verteilt und ohne intensive Hintergrundfluoreszenz waren, brachte der Filter *Quality* das beste Resultat, auch wenn die Signale dort unterschiedliche Intensitäten aufwiesen. In Regionen mit hohen Intensitäten, einer starken Hintergrundfluoreszenz und viele Zellen dicht aufeinander, konnten damit jedoch nicht alle Zellen erkannt werden. Selbst, wenn der Wert weiter gesteigert wurde, wurden die Signale in diesen Regionen nicht erkannt. Stattdessen wurden dann sehr schwache und kleine artifizielle Signale als Spots gewertet. In diesen stark fluoreszierenden Bereichen konnte der Filter *Intensity Center* am meisten überzeugen. Diesem Filter gelang es, einzelne Zellen in den dichten Bereichen voneinander zu unterscheiden. Im Rest der Aufnahme wurden damit jedoch nicht alle Signale erkannt. Da keiner der Filter in allen Bereichen überzeugen konnte, wurde die Aufnahme zwei Mal separat bearbeitet; einmal mit *Quality*

und einmal mit *Intensity Center*. Abgesehen von den Filterwerten wurden die übrigen Parameter bei beiden Durchläufen gleich eingestellt. Beim Festlegen des Filterwerts wurde jeweils nur auf die Regionen geachtet, für die der verwendete Filter besser geeignet war. Die beiden einzelnen Bearbeitungen sind in Abbildung 25A und B zu sehen. C zeigt die Aufnahme, bei der die Spots der beiden Bearbeitungen in einer Abbildung zusammengefügt wurden. Die gelben Spots wurden nur bei *Quality* erkannt, während die Violetten nur bei *Intensity Center* detektiert wurden. Die roten Spots wurden in beiden Bearbeitungen erkannt. Das Zusammenfügen wurde über die Funktion *Colocalize Spots* vorgenommen. Mithilfe dieses Tools war es möglich, die Eigenschaften beider Filter miteinander zu kombinieren und damit das Maximum der Zellen zu erkennen und dabei möglichst wenige falsch positive Zellen mitzuzählen.

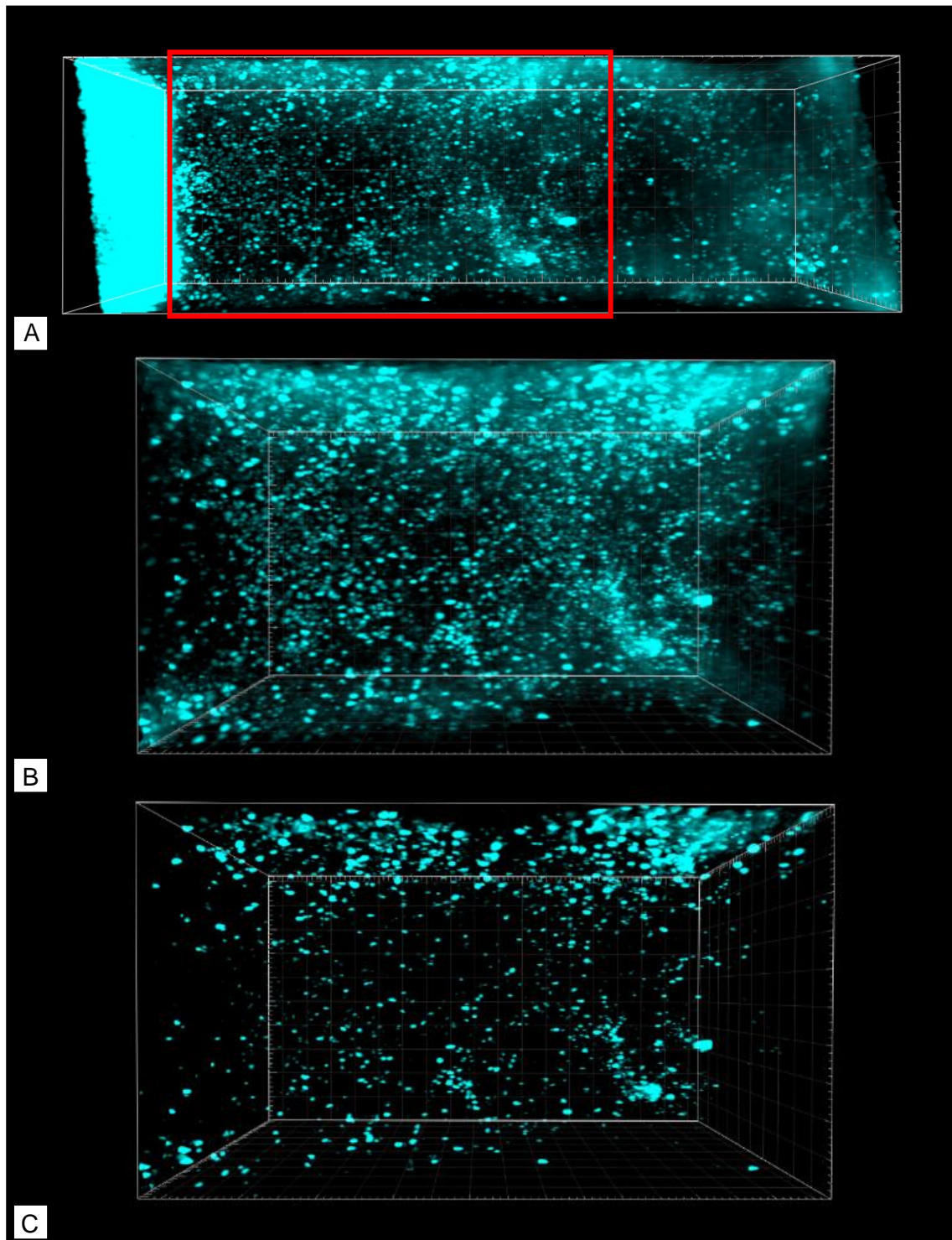


Abbildung 23: Bearbeitung einer 3D-Immunfluoreszenzaufnahme vor Spot-Rekonstruktion am Beispiel der Aufnahme mit CD8-Markierung aus Versuch 8
A Unbearbeitete Aufnahme in der ursprünglichen Größe. **B** ist der in **A** rot markierte Ausschnitt. **C** Derselbe Ausschnitt mit veränderten Anzeigeparametern. Hier werden nur noch die intensiv fluoreszierenden Punkte dargestellt.
Größe der Aufnahmen: **A** $512\mu\text{m} \times 512\mu\text{m} \times 1672\mu\text{m}$ (Rasterweite: $50\mu\text{m}$), **B** und **C** $512\mu\text{m} \times 512\mu\text{m} \times 900\mu\text{m}$ (Rasterweite: $50\mu\text{m}$)

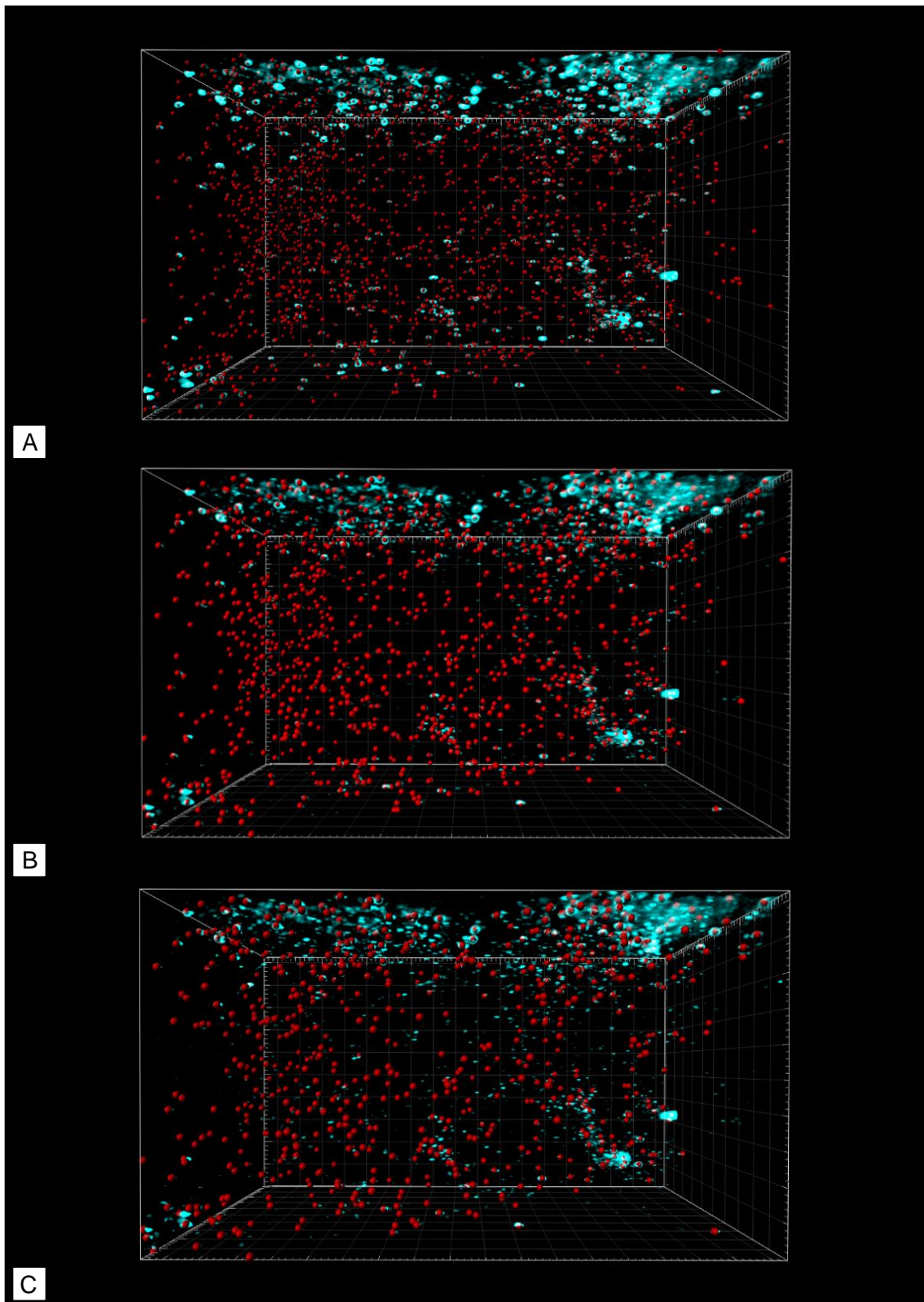


Abbildung 24: Einfluss des Diameter of Largest Sphere auf die Spot-Rekonstruktion am Beispiel der 3D-Immunfluoreszenzaufnahme mit CD8-Markierung aus Versuch 8
A Durchmesser $7\mu\text{m}$. Hier wurde jedes Fluoreszenzsignal als Spot gezählt. **B** Wert des Durchmessers $10\mu\text{m}$. Hier gibt es ein paar kleine schwache künstliche Signale, die nicht als Zellen gewertet wurden. **C** Durchmesser $12\mu\text{m}$. Dadurch wurden nur große stark fluoreszierende Signale als Spots gewertet. Hier scheinen nicht alle Zellen erkannt worden zu sein.
Größe der Aufnahmen: $512\mu\text{m} \times 512\mu\text{m} \times 900\mu\text{m}$ (Rasterweite: $50\mu\text{m}$)

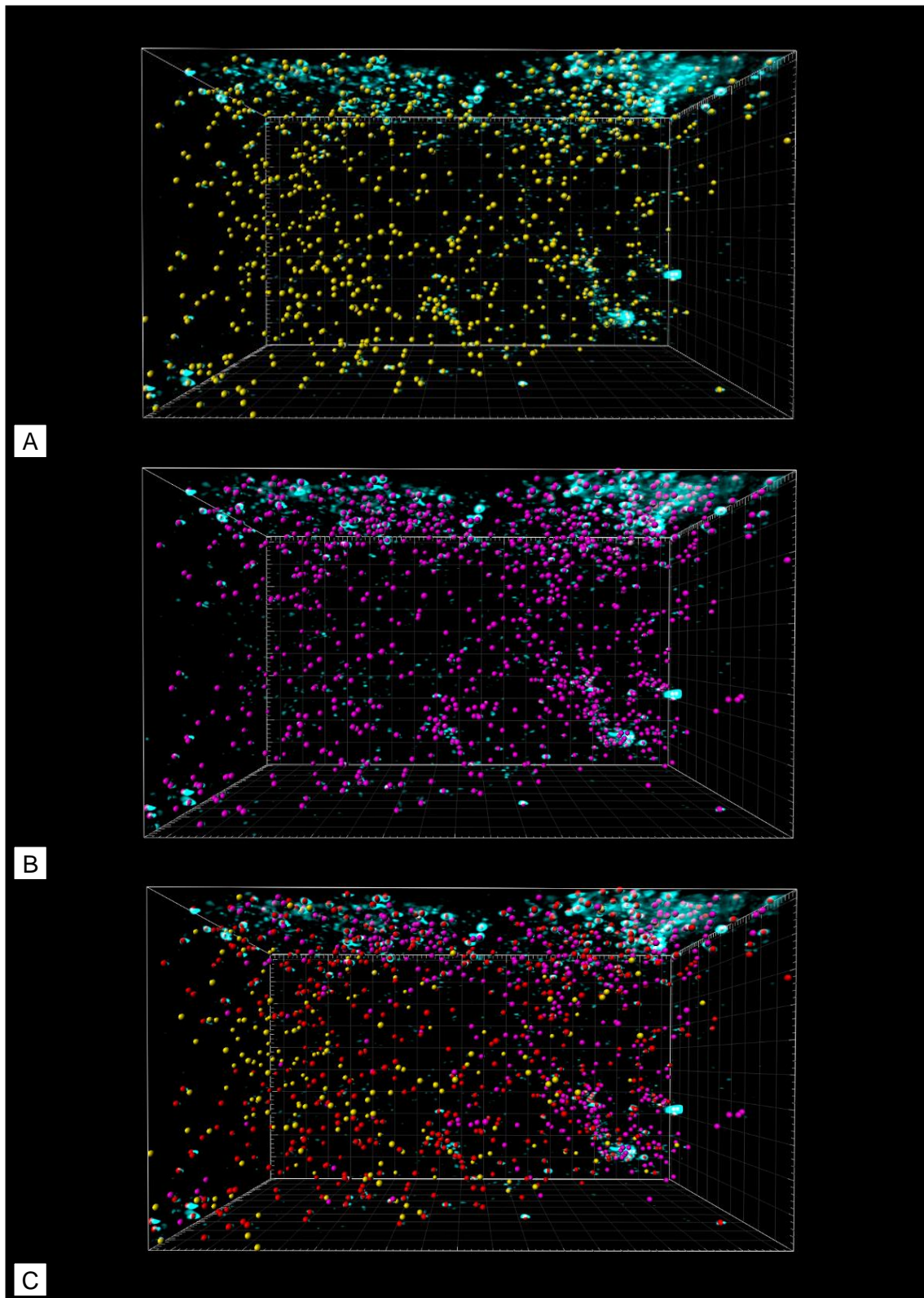


Abbildung 25: Kombination unterschiedlicher Filter zur Spot-Rekonstruktion am Beispiel der 3D-Immunfluoreszenzaufnahme mit CD8-Markierung von Versuch 8

A für die Bearbeitung wurde der Filter Quality verwendet. Damit konnten vor allem die locker verteilten Zellen innerhalb der Aufnahme erkannt werden. Bei der Zellansammlung am rechten oberen Rand wurden damit nicht alle Zellen detektiert. **B** in diesem Bereich konnte durch den Filter Intensity Center wesentlich mehr Zellen erkannt werden. **C** Kombination von **A** und **B**. Die roten Spots sind diejenigen, die in beiden Aufnahmen vorkommen.

Größe der Aufnahmen: $512\mu\text{m} \times 512\mu\text{m} \times 900\mu\text{m}$ (Rasterweite: $50\mu\text{m}$)

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Verfahrens, durch welches die Immunzellanzahl und -verteilung in experimentellen Brusttumorstücken in 3D dargestellt und analysiert werden kann. Dazu gehörte die Erarbeitung eines suffizienten Färbeverfahrens, die Erprobung verschiedener Methoden um reproduzierbar 3D-Aufnahme anzufertigen und die Entwicklung entsprechender Bildnachbearbeitungs- und Bildanalyseprozesse. Die Färbung sollte gewisse Anforderungen erfüllen. Hierzu zählten eine Mindestpenetrationstiefe von 500µm, Homogenität innerhalb der Färbung und eine spezifische Markierung der gesuchten Zellen. Außerdem sollte das Verfahren ökonomisch, verlässlich und reproduzierbar sein.

4.1 Überlegungen zu den Modifikationen am Färbeprotokoll

4.1.1 Inkubationszeiten

Ausgangspunkt für die Entwicklung des Färbeverfahrens war das Protokoll zur Immunfluoreszenzfärbung von Tumor-Organoiden. Organoide sind „dreidimensionale, organähnliche Zellverbände“ (Sina Bartfeld, 2020, p. 13), die im Labor gezüchtet werden. Innerhalb der Arbeitsgruppe war es bereits gelungen Brusttumor-Organoide mithilfe des erwähnten Basisprotokolls anzufärben. Die Organoide setzten sich aus Gefäßen bzw. Endothelzellen, Kollagen, Fibroblasten und Tumorzellen zusammen. Diese Zellen sind im Wesentlichen die Grundbausteine der Brusttumore. Aufgrund der geringen Größe und des vereinfachten Aufbaus der Organoide sind diese jedoch einfacher anzufärben als die dichten, strukturell sehr komplexen und inhomogenen Brusttumorstücke.

Aus diesem Grund wurden die Inkubationszeiten für die Anfärbung der Brusttumore deutlich erhöht. Im Gegensatz zum Ausgangsprotokoll, welches nur knapp drei Tage in Anspruch nahm, betrug die Gesamtdauer einer Färbung beim ersten Versuch bereits 19 Tage. Jeweils zwei Tage nahm davon allein die Antikörperinkubation in Anspruch. Bei Versuch 1 konnte eine zufriedenstellende Färbung der Gefäße in den äußeren 200µm erreicht werden.

Die unzureichende Färbetiefe ließ darauf schließen, dass die Antikörper noch nicht ausreichend tief in das Gewebe penetrieren konnten. Eine mögliche Ursache hierfür könnte eine immer noch zu kurz gewählte Kontaktzeit der Antikörper mit den Gewebestücken sein. Aus diesem Grund wurden sowohl die Primär- als auch die Sekundärantikörper im zweiten Versuch noch einmal doppelt so lang, also für jeweils

vier Tage, auf den Proben belassen. Dieser Zeitraum hatte sich bereits in anderen Studien für Immunfluoreszenzfärbungen von Gewebe bewährt (Boateng et al., 2021; Hofmann et al., 2020; Jiang et al., 2018). Da diesbezüglich auch die nachfolgenden Waschschriffe angepasst wurden, entwickelte sich die anfangs 3-, dann 19-tägige Färbung bereits im zweiten Versuch zu einem vierwöchigen Verfahren. Durch die erneute Steigerung der Inkubationszeiten verbesserte sich die Eindringtiefe der Antikörper erneut erheblich. So konnten in Versuch 2, wenn auch nicht sehr homogen, bereits fast alle Gefäße in einem etwa 1,2mm dicken Stück angefärbt werden. Die Dauer der einzelnen Schritte wurde deshalb in den weiteren Versuchen so beibehalten.

Mit Kontrollaufnahmen zur generellen Überprüfung von Färbergebnissen, Bildakquise am LSM und anschließender Bildbearbeitung/-auswertung mittels mehrerer Softwarepakete lag der gesamte Zeitumfang für die Durchführung und Bewertung eines Färbeversuches bei fünf Wochen. Dann erst konnten Überlegungen für weitere Änderungen am Protokoll angestellt werden. Aus diesem Grund war das Austesten unterschiedlicher Modifikationen am Färbeprotokoll zeitlich limitiert. Sobald sich ein Faktor bewährt hat, wurde er für die weiteren Versuche übernommen, wie beispielweise die Inkubationszeiten. Dabei könnte es durchaus sein, dass bei einigen Schritten auch kürzere Zeiträume ausreichend wären oder dass bestimmte Inkubationszeiten noch zu kurz gewählt wurden. Vor allem bei der Antikörperinkubation variieren die Zeiten anderer Publikationen, bei denen größere Gewebestücke für die 3D-Bildgebung gefärbt wurden, erheblich. So inkubierten die Primärantikörper bei Chandrasekharan und Neish zum Anfärben von Mäusedärmen nur über Nacht und die Sekundärantikörper gerade einmal für 1,5 Stunden. Die Proben wiesen jedoch eine wesentlich geringere Schichtstärke auf als die hier verwendeten Brusttumorstücke (Chandrasekharan & Neish, 2021). Dagegen beließ eine andere Gruppe die Antikörper jeweils für zwei Wochen auf den Proben. Dadurch gelang es ihnen Stücke einer Dicke von 5mm anzufärben. Ihre Färbungen wurden allerdings an Mäusegehirnen durchgeführt, deren Beschaffenheit nicht mit denen der Brusttumore vergleichbar ist (Chung et al., 2013). Derart lange Inkubationszeiten könnten die Penetrationstiefe der Antikörper gegebenenfalls noch einmal etwas erhöhen. Dadurch würde die Gesamtdauer des Verfahrens noch einmal verlängert werden und dieses dadurch für die regelmäßige Verwendung unbrauchbar machen.

Ein möglicher Ansatz zur Weiterentwicklung des Protokolls könnte die Verwendung höherer Reaktionstemperaturen sein. Diese könnten zu einer Beschleunigung einzelner

Reaktionsschritte führen und eine Verkürzung der Inkubationszeiten ermöglichen. Allerdings können zu hohe Temperaturen zu einer Verringerung der Antikörperstabilität führen, weshalb die Antikörperinkubationsschritte in der vorliegenden Arbeit ausschließlich bei 4°C durchgeführt wurden. Einige Publikationen zeigen jedoch, dass ein Großteil der Antikörper auch bei Raumtemperatur oder sogar bei 37°C ausreichend stabil sind und auch für mehrtägige Inkubationsschritte kein Problem darstellen (Brenna et al., 2020; Gleave et al., 2013; Henning et al., 2019; Hofmann et al., 2020; W. Li et al., 2017; Renier et al., 2014).

4.1.2 Puffer und Lösungen

Obwohl durch die Steigerung der Inkubationszeiten bereits Verbesserungen erreicht werden konnten, war das Ergebnis noch nicht zufriedenstellend. Die Intensität in den tiefer gelegenen Bereichen schwächte ab und es schienen dort nicht alle Gefäße detektiert worden zu sein. Dies könnte zum einen daran liegen, dass die dichte EZM trotz der längeren Kontaktzeit, die Antikörper am Eindringen in die Tiefe hindert. Ein abgeschwächtes oder fehlendes Signal in den tieferen Gewebsschichten kann aber nicht nur Folge einer unzureichenden Antikörperpenetration sein, sondern auch durch eine zu starke Abschwächung der Strahlenintensität beim Durchtritt durch das Gewebe bedingt sein. Ursache dafür sind Streu- und Absorptionseffekte durch eine insuffiziente Klärung.

Ein Ansatz, der sowohl das dichte Gewebe auflockern, als auch die Streuung im Gewebe reduzieren sollte, war die Verwendung von CUBIC 1. Ursprünglich wurde CUBIC 1 entwickelt, um ganze Mäusegehirne für die 3D-Darstellung zu entfärben (Susaki et al., 2014). Die Permeabilisierung sollte durch die Delipidierung des Gewebes mithilfe des in CUBIC1 in hoher Konzentration vorliegenden Triton X-100 erreicht werden (Susaki et al., 2014). Dabei werden Lipide unter Bildung von Micellen aus der Zellmembran gelöst (Jamur & Oliver, 2010). Die Delipidierung sollte aber nicht nur für die Auflockerung des Gewebes sorgen, sondern auch zur Klärung des Gewebes durch die Homogenisierung des RI beitragen. Gleichzeitig sollte der enthaltene Aminoalkohol N,N,N',N'-Tetrakis(2-hydroxypropyl)ethylendiamin der Entfärbung des Gewebes dienen, indem er die im Hämoglobin enthaltenen Häm-Gruppen herauslöst (Tainaka et al., 2014). Sowohl die Delipidierung als auch die Entfärbung des Gewebes sind für das Anfertigen von 3D-Aufnahmen von großer Bedeutung.

Die Verwendung von CUBIC 1 brachte allerdings statt einer Verbesserung eine Verschlechterung des Ergebnisses mit sich. So konnte bei dieser Färbung am

konfokalen Mikroskop überhaupt kein Signal wahrgenommen werden, weshalb hiervon keine Aufnahme am LSM angefertigt wurde. Eine Untersuchung von Chung et al. zeigte, dass hohe Triton-Konzentrationen zu einem massiven Proteinverlust führen können (Chung et al., 2013). Dies könnte die Ursache für das komplette Scheitern des dritten Versuchs sein. Auch Lloyd-Lewis et al. vermuten, dass die hohen Konzentrationen der Bestandteile von CUBIC 1 die Epitopverfügbarkeit im Gewebe verringern. Sie verweisen dabei auf CUBIC 1A. Dieses beinhaltet im Grunde dieselben Substanzen wie CUBIC 1, jedoch in viel geringeren Konzentrationen. Deshalb wurde CUBIC 1 in Versuch 4 durch das stärker verdünnte CUBIC 1A ersetzt. Zusätzlich wurde mit dem Blockpuffer 2 ein anderer Blockpuffer verwendet, der sich bereits in Kombination mit CUBIC 1A bewährt hatte (Lloyd-Lewis et al., 2016). Durch diese Veränderung konnte die Homogenität der Färbung nochmal verbessert werden. Das Signal im hinteren, weiter von der Kamera entfernten Drittel schwächte jedoch weiterhin ab. Ursache dafür könnten Einblutungen im Gewebe sein, die durch die Autofluoreszenz der Erythrozyten in der Aufnahme sichtbar waren. Da die Möglichkeit bestand, dass das Hämoglobin in den Erythrozyten zu einer Abschwächung des Fluoreszenzsignals aus den tieferen Bereichen führte, wurde zur weiteren Optimierung der Färbung versucht, die Häm-Gruppen stärker zu entfärben. Hierfür wurde H_2O_2 verwendet. Seine bleichende Wirkung erzielt es durch die direkte Oxidation der Pigmente (Yu et al., 2021). Allerdings führte der Einsatz des H_2O_2 -haltigen Entfärbungsreagenz tendenziell wieder zu einer Verschlechterung des Ergebnisses, weswegen es in den darauffolgenden Versuchen nicht mehr verwendet wurde. Mit dem soweit erarbeiteten Protokoll war die Färbung der Gefäße zufriedenstellend. Demzufolge wurde es im nächsten Schritt für die Detektion der Immunzellen übernommen.

Es gäbe noch unzählige weitere Ansätze, durch die versucht werden könnte, eine Verbesserung des Färbeprotokolls zu erlangen. Einige davon werden im Folgenden kurz beschrieben. In Punkt 1.4.2 wurden bereits die beiden Enzyme Kollagenase und Hyaluronidase angesprochen. Der enzymatische Abbau der EZM kann nicht nur in der antifibrotischen Therapie sinnvoll sein, sondern auch dafür eingesetzt werden, um die Antikörperpenetration bei immunhistologischen Färbungen zu erleichtern. Es gibt Studien, in denen die Gewebestücke vor der Antikörperinkubation mit einem der beiden Enzyme vorverdaut wurden (Akhtar et al., 2009; Hofmann et al., 2020; Yee & Pack, 2005). Eine zeigte Vorteile im Einsatz von Hyaluronidasen gegenüber Kollagenasen, da diese das strukturelle Netzwerk erhalten und nur die dazwischen eingelagerte Grundsubstanz entfernen (Hofmann et al., 2020).

Ein alternativer Ansatz wäre die Verwendung anderer Klärungsreagenzien. Im Vorliegenden wurden CUBIC 1A und Zimtsäureethylester zur Klärung der Proben verwendet. Die Funktionsweise von CUBIC 1A wurde bereits beschrieben. Beim Zimtsäureethylester wird der klärende Effekt durch die Homogenisierung des RI erreicht. Vor der Klärung mit Zimtsäureethylester werden die Proben hierfür dehydriert. Das Entfernen des Wassers, welches einen RI von 1,33 besitzt und das Zurückbleiben dehydrierter Proteine mit einem RI über 1,5 führt zu einer Erhöhung des RI. Durch das Herauslösen von Lipiden, welche einen recht geringen RI besitzen, wird der RI nochmals gesteigert. Indem sich der Zimtsäureethylester mit einem RI von über 1,5 im restlichen Gewebe verteilt, stabilisiert sich der RI der Probe nahe 1,5 (Hinsberg, 1936, p. 64; National Center for Biotechnology Information, 2021; Richardson & Lichtman, 2015).

Bei anderen Versuchen, die CUBIC 1 oder 1A zur Entfärbung benutzt haben, wurde die abschließende Klärung mit CUBIC 2 durchgeführt (Lloyd-Lewis et al., 2016; Nojima et al., 2017; Susaki et al., 2015; Xu et al., 2019). Dieses ist allerdings hoch viskös und dadurch schlecht für den Gebrauch des Würzburger LSFM geeignet. Das liegt daran, dass die Proben für die Aufnahme in das Klärungsreagenz, welches in eine Kammer gefüllt wird, gehängt werden müssen. Die Probe kann in dem hochviskösen Reagenz nicht vor der Linse fokussiert und für die gestaffelten Aufnahmen in z-Richtung bewegt werden. Darüber hinaus muss das Reagenz nach der Aufnahme wieder vollständig aus der Kammer entfernt werden. Flüssige Reagenzien können mithilfe einer Pipette entnommen werden, wohingegen die Reinigung beim Gebrauch visköser Substanzen aufwändiger ist. Bei den meisten kommerziellen LSFM werden die Proben jedoch nicht im Klärungsreagenz mikroskopiert, sondern in ein transparentes Gel eingebettet. CUBIC 2 stellt daher eine mögliche Alternative dar, sollte ein anderes Mikroskop zur Verfügung stehen (Selchow & Huisken, 2013). Hyperhydratationstechniken wie CUBIC sind für Immunfluoreszenzverfahren nur bedingt geeignet, da hohe Konzentrationen ionischer Detergenzien und denaturierender Agenzien (Harnstoff) im Gewebe verbleiben.

Bisher existieren nur wenige Arbeiten, die sich mit der 3D-immunhistologischen Färbung und Darstellung von Brusttumoren beschäftigen. Eine der wenigen vorliegenden Arbeiten befasst sich zwar nicht mit der immunhistologischen Färbung, dafür aber mit der Klärung und 3D-Bildgebung von Brusttumoren. Für die Aufnahme wurde die Autofluoreszenz des Tumorgewebes genutzt. Als Klärungsreagenz wurde Dibenzylether verwendet (Sabdyusheva Litschauer et al., 2020).

Darüber hinaus wurden von Lloyd-Lewis und seinem Team verschiedene Klärungs- und Immunfluoreszenzmethoden getestet, um Brustdrüsen und Brusttumore in 3D darzustellen. Dabei zeigte sich, dass Brusttumore wesentlich schwieriger anzufärben sind als Brustdrüsen. Während von der gesunden Brust Stücke mit einer Dicke von 1,5 mm vollständig angefärbt und aufgenommen werden konnten, war es bei den Tumoren nur möglich, eine Schicht mit einer Dicke von 100 μm zufriedenstellend abzubilden. Zum Einsatz kamen Tumore der TUBO-Zelllinie, die mit Her2- und K8-Antikörpern und DAPI angefärbt wurden. Die Forschungsgruppe testete drei unterschiedliche Klärungsmethoden: Die CUBIC-basierte, die SeeDB-basierte und die PACT-sRIMS-basierte Klärung; alle drei sind Hyper-Hydrationsstechniken, die sich grundsätzlich von lösungsmittelbasierten Verfahren wie der Klärung mittels Zimtsäureethylester unterscheiden. Bei allen Versuchen betrug die Inkubationszeit der Primärantikörper vier Tage und die der Sekundärantikörper zwei Tage. Beide Inkubationsschritte erfolgten bei 4°C. Unterschieden haben sich die Experimente in den jeweils verwendeten Blockpuffern. Insgesamt waren die Ergebnisse der SeeDB-basierten Klärung etwas schlechter als die der anderen beiden. In der Arbeit werden Schichtbilder aus verschiedenen Tiefen der Tumore gezeigt. Die maximal abgebildete Schichttiefe beträgt jedoch nur 35 μm . Somit kann keine Aussage über die Qualität der Färbung in tieferen Schichten gemacht werden (Lloyd-Lewis et al., 2016).

Eine etwas tiefere Färbung von Brusttumorstücken wurde in den Versuchen von Chen et al. erreicht. Hier wurde die Klärungsmethode CLARITY an humanen, durch Nadelbiopsie gewonnenen Mammatumoren in Kombination mit Fluoreszenzantikörpern getestet. Die Färbung erfolgte allerdings nur an 500 μm dünnen Tumorschnitten. Markiert wurden unter anderem CD3⁺ Zellen. Die Inkubation der Antikörper erfolgte jeweils für fünf Tage bei 37°C (Chen et al., 2019).

4.1.3 Antikörper

In Versuch 6 sollten zusätzlich zu den Gefäßen die CD4⁺ und CD8⁺ Immunzellen mitangefärbt werden. Die Schwierigkeit bestand darin, dass jeder parallel verwendete Antikörper aus einer unterschiedlichen Spezies stammen musste. Der Großteil kommerzieller Primärantikörper stammt jedoch entweder aus der Ratte oder dem Kaninchen. Andere Antikörper sind schwerer erhältlich und meist weniger erprobt. Obwohl nach intensiver Suche ein CD4-Antikörper aus dem Meerschweinchen gefunden wurde, war eine Dreifachfärbung von Gefäßen, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nicht möglich. Während die Gefäße, wie auch in den Versuchen zuvor, gut dargestellt waren, färbte der

CD4-Antikörper nur einen schmalen Streifen am Rand der Probe. Der CD8-Antikörper konnte zwar etwas weiter in die Probe penetrieren, färbte allerdings auch nur am Randbereich und in den aufgelockerten Bereichen einzelne Zellen an (Abbildung 14). Die Tatsache, dass jeder der drei verwendeten Antikörper unterschiedlich weit in das Tumorgewebe penetrieren konnte, lässt den Schluss zu, dass nicht alle Antikörperpreparationen für die 3D-Färbefahren von Brusttumoren geeignet sind. Deshalb mussten im Weiteren zuerst Antikörper gefunden werden, die für dieses Verfahren geeignet sind.

Da kein weiterer CD4-Antikörper gefunden werden konnte, der weder aus der Ratte noch aus dem Kaninchen stammt, wurde das anfängliche Ziel einer Dreifachfärbung zurückgestellt. Stattdessen wurde eine Doppelfärbung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten angestrebt. Da der CD8-Antikörper im vorherigen Versuch zumindest einigermaßen funktionierte, beschränkte sich die Suche auf einen geeigneten CD4-Antikörper. Mit dem CD4-Antikörper aus dem Kaninchen (SinoBiological 50134-R766) konnte dann im siebten Versuch ein Primärantikörper gefunden werden, der aus einer anderen Spezies als der CD8-Primärantikörper (Invitrogen 20-8080-82) stammt und spezifisch Immunzellen detektiert.

Die Doktorandin Theresa Ruf, welche ebenfalls Teil der Tumor-Arbeitsgruppe war, fertigte parallel zu dieser Arbeit ebenfalls Färbungen von CD4⁺ und CD8⁺ Immunzellen an. Diese erfolgten an histologischen Dünnschnitten der AT3-Brusttumore. Ihre Ergebnisse deckten sich überwiegend mit den hier erlangten Erkenntnissen. So kam es beim Einsatz des CD4-Antikörpers aus dem Meerschweinchen auch bei den Dünnschnitten zu keiner spezifischen Färbung einzelner Zellen. Dagegen stellten sich der CD8-Antikörper aus der Ratte (Invitrogen 20-8080-82) und der CD4-Antikörper aus dem Kaninchen (SinoBiological 50134-R766) auch im zweidimensionalen Bereich als beste Option heraus. Bei den Versuchen einer Doppelfärbung auf den Dünnschnitten hatte die Wahl des Sekundärantikörpers einen entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis. Nur wenn CD8 mit Alexa 647 und CD4 mit Cy3 gekoppelt wurde, war das Ergebnis überzeugend. Umgekehrt, also bei der Kopplung von CD8 mit Cy3 und CD4 mit Alexa 647, fiel das Ergebnis schlechter aus. Aufgrund dieser Erfahrungen wurde in Versuch 9 der CD8-Primärantikörper mit Alexa 647 gekoppelt. CD4 wurde einmal mit Cy3 und einmal mit Alexa 750 kombiniert. Die zweidimensionalen Aufnahmen der Dünnschnitte wurden am konfokalen Mikroskop angefertigt. Dieses besitzt keinen Laser, der Alexa 750-Fluorophore anregen kann. Da sich langwellige Strahlen aber leichter im

Gewebe ausbreiten können und das LSM einen entsprechenden Laser besitzt, wurde Alexa 750 zusätzlich zu Cy3 getestet. Weil die Ergebnisse beider Ansätze letztlich recht ähnlich ausfielen, wurde im letzten Versuch der Cy3-gekoppelte Sekundärantikörper verwendet, da dieser etwas kostengünstiger ist. Färbungen von Gewebestücken sind durch die hohen Antikörperkonzentrationen, die benötigt werden, sehr kostenintensiv (Tabelle 12). Aufgrund der heterogenen Struktur der Tumore wäre eine parallele Färbung mehrerer Proben für die Beurteilung der Reliabilität der Ergebnisse von Vorteil gewesen. Aus Kostengründen wurde darauf verzichtet. Dies war auch der Grund, weshalb pro Probe nur jeweils 8µl Primärantikörper in 400µl Puffer verwendet wurden. In der Regel sollte das Volumen von Puffer oder Lösungen rund zehn Mal größer sein als das der Probe. Bei einem durchschnittlichen Probenvolumen von ca. 80mm³, hätte das Volumen der umgebenden Flüssigkeiten im Idealfall rund 800µl betragen sollen. Dadurch wäre der Antikörperverbrauch und die damit verbundenen Kosten jedoch doppelt so hoch ausgefallen.

Tabelle 12: Übersicht der Preise einiger verwendeter Primärantikörper

Primärantikörper	Preis 100µl [€]	Preis einer Färbung (8µl) [€]	Quelle
CD31 Kaninchen Abcam (ab28364)	360	28,80	(abcam, 2022)
CD4 Meerschweinchen SySy (HS-360 004)	320	25,60	(SYSY Synaptic Systems, 2022)
CD8a Ratte Invitrogen (14-0808-82)	274	21,92	(ThermoFisher scientific, 2022b)
CD4 Ratte Invitrogen (14-0041-82)	83,50	6,68	(ThermoFisher scientific, 2022a)
CD4 Kaninchen Sino Biological (50134-R766)	210	16,80	(SinoBiological, 2022)

4.2 Schwierigkeiten bei der Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit

4.2.1 Färbung

Bisher wurde das Verfahren nur an Tumoren der AT3-Tumorlinie getestet. Bereits hier zeigten sich große Unterschiede in der Beschaffenheit des Gewebes. Teilweise gelang eine durchgängige Färbung des gesamten Tumorstücks. Es gab aber auch Bereiche, die gar nicht oder nur sehr schlecht angefärbt werden konnten. Größere Tumore mit vielen nekrotischen Bereichen konnten besser gefärbt werden, als kleine kompakte Tumore. Vor allem die Tatsache, dass die Färbungen in Experiment 10 an Tumoren der zweiten Versuchsreihe so viel schlechter funktionierten als in den Vorversuchen, zeigt, wie empfindlich das Verfahren derzeit noch auf Veränderungen reagiert. Denn eigentlich wurden die Mäuse in der zweiten Versuchsreihe unter den gleichen Bedingungen gehalten, erhielten die gleichen Tumorzellen und wurden identisch behandelt. Bei weiterführenden Versuchen wäre es sicherlich sinnvoll, die Tumore wieder etwas größer werden zu lassen, bevor sie entnommen werden, und das Protokoll zudem an anderen Tumorkolonien zu testen, damit das endgültige Färbeverfahren vielfältiger einsetzbar ist.

4.2.2 Mikroskopieren

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Evaluation der Modifikationen des Färbeprotokolls kleine Bereiche der Tumorproben aufgenommen. Nach weiterer Optimierung des Verfahrens soll dieses verwendet werden, um den Behandlungseffekt unterschiedlicher Medikamente zu bewerten. Da die Tumore strukturell sehr heterogen sind, reichen einzelne kleine Ausschnitte nicht aus, um eine zuverlässige Aussage über die Wirkung der Medikamente machen zu können. Hierfür müssen mehrere große Bereiche innerhalb eines Tumors evaluiert werden. Zusätzlich sollten mehrere biologische Replikate verwendet werden.

Neben der Wahl der Aufnahmebereiche haben die Einstellungen während des Mikroskopierens Einfluss auf das Endergebnis. Die Parameter mit dem stärksten Effekt sind die Belichtungszeit und die Laserintensität. Wie in Abbildung 26A und B zu sehen ist, kann eine Erhöhung der Laserintensität um nur 0,1 dazu führen, dass Signale in der Tiefe erkannt werden, die zuvor nicht detektiert werden konnten. Im Idealfall sollten die Einstellparameter für die zu vergleichenden Aufnahmen identisch gewählt werden. Dies ist jedoch nicht immer umsetzbar, da für unterschiedliche Proben unterschiedliche Einstellungen benötigt werden, um das bestmögliche Ergebnis zu erzielen.

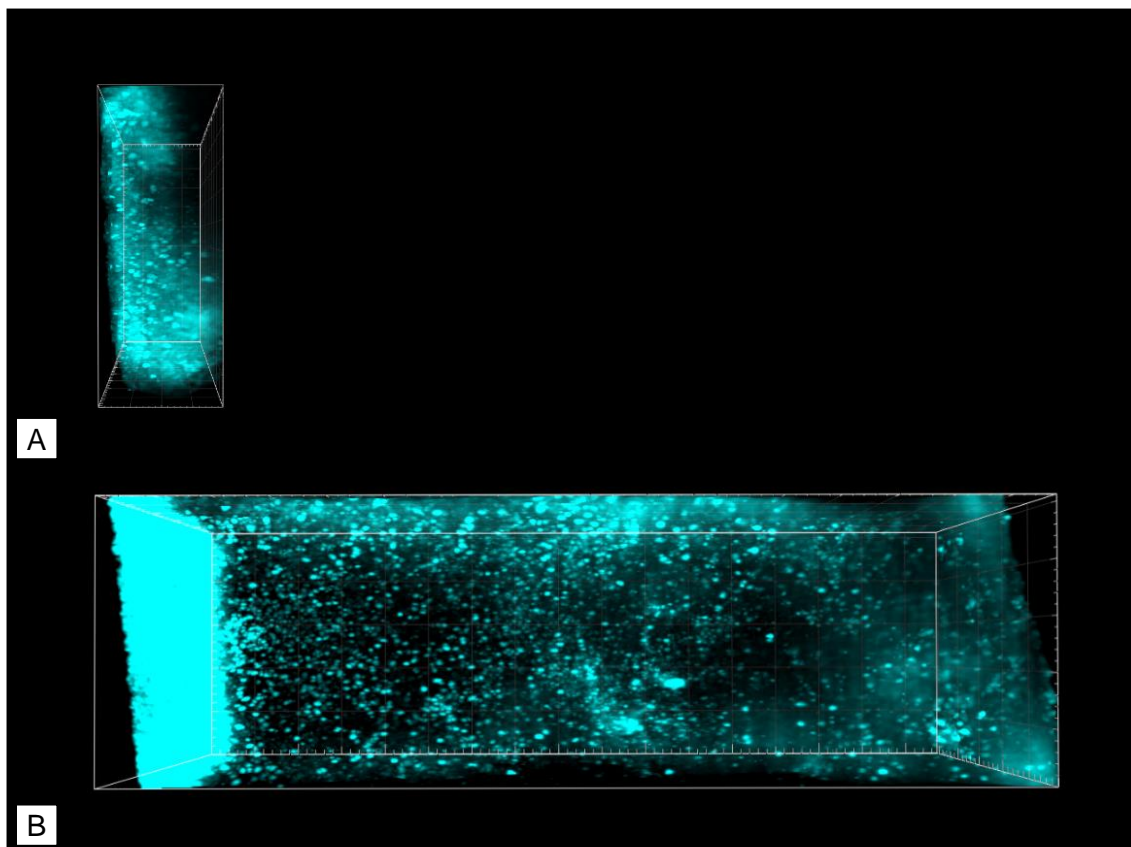


Abbildung 26: 3D-Immunfluoreszenzaufnahmen eines AT3-Brusttumorsstücks mit Markierung CD8-positiver Strukturen unter Verwendung unterschiedlicher Laserintensitäten

Beide Aufnahmen zeigen denselben Ausschnitt aus einer Tumorprobe. **A** ist in z-Richtung deutlich kürzer als **B**, da sich die Färbung nur auf den Randbereich beschränkte. Für Aufnahme **A** wurde eine Laserintensität von 3,2 gewählt. Dadurch sind am Probenrand einzelne Zellen erkennbar. Im Rest der Aufnahme konnten dagegen keine Strukturen detektiert werden. Für Aufnahme **B** wurde die Laserintensität auf 3,3 gestellt. Dadurch zeigt sich eine Überbelichtung des Probenrandes, weshalb hier keine einzelnen Zellen zu sehen sind. Dagegen konnten im Rest der Aufnahme Zellen erkannt werden. Lichtmikroskopische Aufnahme am LSM.

Größe der Aufnahmen: **A** $512\mu\text{m} \times 512\mu\text{m} \times \text{ca.} 197\mu\text{m}$ (Rasterweite: $50\mu\text{m}$), **B** $512\mu\text{m} \times 512\mu\text{m} \times 1672\mu\text{m}$ (Rasterweite: $100\mu\text{m}$)

4.2.3 Bildprozessierung

Bei der abschließenden Bildbearbeitung haben die Einstellungen einen großen Einfluss auf das Endresultat. Einige Parameter müssen für jede Versuchsreihe individuell eingestellt werden. Dabei liegt es im Ermessen des Bearbeitenden, bis zu welcher Intensität ein Signal gewertet wird. Insbesondere die Festlegung des Intensitätsschwellenwerts bei der Gefäßdarstellung sowie der Filterwert bei der Spotdetektion haben eine große Auswirkung auf das Endergebnis. Beide Werte müssen manuell festgelegt werden und sind somit von der individuellen Wahrnehmung des Bearbeiters abhängig. Innerhalb einer Reihe ist es jedoch zwingend erforderlich, identische Einstellungsparameter zu verwenden, um die Aufnahmen vergleichbar zu

machen. Dabei sollte die Parametrisierung nach festgelegten, einheitlichen Kriterien erfolgen.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde eine Färbemethode zur 3D-Darstellung von CD4⁺ und CD8⁺ Immunzellen in Brusttumoren durch schrittweise Veränderungen eines Ausgangsprotokolls entwickelt. Die Zwischenergebnisse wurden anschließend am Mikroskop aufgenommen und bewertet. Führte eine Modifikation zu einer Verbesserung, so wurde dieser Schritt beim nächsten Versuch übernommen. Daraufhin wurden weitere Änderungen vorgenommen, welche im Anschluss wiederum evaluiert wurden. Deutliche Verbesserungen ergaben sich durch die Steigerung der Inkubationszeiten. Den größten Einfluss auf das Färberesultat hatte die Erhöhung der Antikörperinkubationszeiten auf je vier Tage. Zur Permeabilisierung der Proben stellte sich CUBIC 1A als beste getestete Option heraus, da dieses die Proben gleichzeitig permeabler und transparenter machte. Bezüglich der Probenform bewährte es sich die Tumore in ca. 1,5mm dicke Scheiben zu schneiden, da diese Form zum einen die Penetration der Antikörper von beiden Seiten ermöglicht und zum andern die Befestigung der Probe im LSFM erleichtert. Die Modifikationen des Protokolls wurden unter Verwendung des CD31-Antikörpers (Abcam ab28364) vorgenommen. Durch das Anfärben der Gefäße war die Bewertung des Färbeerfolgs einfacher. Hätte man direkt bei der Protokollentwicklung Immunzellen angefärbt, hätten fehlende Zellen in der Probenmitte ein schlechtes Färbeergebnis vortäuschen können. Daher wurden die Immunzellen erst mitangefärbt, nachdem die Darstellung der Tumorgefäße mit dem optimierten Protokoll zufriedenstellend war. Es zeigte sich, dass die Färbungen mit verschiedenen Antikörpern unterschiedlich gut funktionierten. Deshalb und aufgrund der begrenzten Antikörperverfügbarkeit stellte sich die Suche nach geeigneten Antikörpern als große Hürde heraus. Letztendlich konnten mit dem CD4-Primärantikörper aus dem Kaninchen von SinoBiological (50134-R766) und dem CD8-Antikörper aus der Ratte von Invitrogen (20-8080-82) zwei Antikörper gefunden werden, die zwar etwas schlechter als der CD31-Antikörper funktionieren, jedoch für dieses Verfahren geeignet sind. Beim letzten Versuch sollten dann Tumorstücke aus den vier verschiedenen Behandlungsgruppen mithilfe des optimierten Protokolls angefärbt und anhand ihrer Immunzellinfiltration miteinander verglichen werden. Dies war allerdings nicht möglich, da ein Großteil der Proben nicht suffizient gefärbt und deshalb nicht sinnvoll ausgewertet werden konnte. Ursächlich hierfür war vermutlich, dass die Tumore des letzten Versuchs aus einer anderen Versuchsreihe stammten als die der Vorversuche. Sie waren trotz nahezu identischer Vorbehandlung kleiner und kompakter in ihrer Struktur, was wohl die Penetration der Reagenzien und

Antikörper stärker behinderte. Zusätzlich zur Protokollentwicklung sollten auch ein geeignetes Aufnahme- und Bildbearbeitungsverfahren entwickelt werden, welche eine Visualisierung und quantitative Auswertung der Aufnahmen ermöglichen. Hier konnten einige Einstellungsparameter festgelegt werden, die für jede Aufnahme identisch eingestellt werden sollten. Bei anderen Parametern stellte sich heraus, dass diese jedes Mal individuell gewählt werden müssen.

Im Großen und Ganzen konnte im Verlauf dieser Arbeit ein Verfahren entwickelt werden mit dem die 3D-Bildgebung von CD4⁺ und CD8⁺ Immunzellen in Brusttumoren möglich ist. Damit dieses Verfahren allerdings in Studien angewendet werden kann, um die Wirksamkeit neuer Medikamente zu ermitteln, bedarf es noch weiterer Optimierungen.

6 Literaturverzeichnis

- abcam. (2022). *Anti-CD31 antibody (#ab28364)*. Retrieved 10.01.2022 from <https://www.abcam.com/cd31-antibody-ab28364.html>
- Adams, S., Schmid, P., Rugo, H. S., Winer, E. P., Loirat, D., Awada, A., Cescon, D. W., Iwata, H., Campone, M., Nanda, R., Hui, R., Curigliano, G., Toppmeyer, D., O'Shaughnessy, J., Loi, S., Paluch-Shimon, S., Tan, A. R., Card, D., Zhao, J., . . . Cortés, J. (2019). Pembrolizumab monotherapy for previously treated metastatic triple-negative breast cancer: cohort A of the phase II KEYNOTE-086 study. *Ann Oncol*, *30*(3), 397-404. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy517>
- Ai, L., Xu, A., & Xu, J. (2020). Roles of PD-1/PD-L1 Pathway: Signaling, Cancer, and Beyond. *Adv Exp Med Biol*, *1248*, 33-59. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3266-5_3
- Akhtar, T., Li, J., Olden, T., & Wallace, K. N. (2009). Use of phospholipase A2 for antigen retrieval in zebrafish whole-mount immunohistochemistry. *Zebrafish*, *6*(3), 223-227. <https://doi.org/10.1089/zeb.2009.0588>
- Ali, H. R., Provenzano, E., Dawson, S. J., Blows, F. M., Liu, B., Shah, M., Earl, H. M., Poole, C. J., Hiller, L., Dunn, J. A., Bowden, S. J., Twelves, C., Bartlett, J. M., Mahmoud, S. M., Rakha, E., Ellis, I. O., Liu, S., Gao, D., Nielsen, T. O., . . . Caldas, C. (2014). Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12,439 patients. *Ann Oncol*, *25*(8), 1536-1543. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu191>
- American Cancer Society. (2019). *Breast Cancer Facts & Figures 2019-2020*. American Cancer Society Inc. Retrieved 28.01.2022 from <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/breast-cancer-facts-and-figures/breast-cancer-facts-and-figures-2019-2020.pdf>
- Balkwill, F. R., Capasso, M., & Hagemann, T. (2012). The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci*, *125*(Pt 23), 5591-5596. <https://doi.org/10.1242/jcs.116392>
- Barry-Hamilton, V., Spangler, R., Marshall, D., McCauley, S., Rodriguez, H. M., Oyasu, M., Mikels, A., Vaysberg, M., Ghermazien, H., Wai, C., Garcia, C. A., Velayo, A. C., Jorgensen, B., Biermann, D., Tsai, D., Green, J., Zaffryar-Eilot, S., Holzer, A., Ogg, S., . . . Smith, V. (2010). Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment. *Nat Med*, *16*(9), 1009-1017. <https://doi.org/10.1038/nm.2208>
- Basu, A., Ramamoorthi, G., Jia, Y., Faughn, J., Wiener, D., Awshah, S., Kodumudi, K., & Czerniecki, B. J. (2019). Immunotherapy in breast cancer: Current status and future directions. *Adv Cancer Res*, *143*, 295-349. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2019.03.006>
- Battle, E., & Massagué, J. (2019). Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity*, *50*(4), 924-940. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.024>
- Becker, J. C., Brabletz, T., Czerny, C., Termeer, C., & Bröcker, E. B. (1993). Tumor escape mechanisms from immunosurveillance: induction of unresponsiveness in a specific MHC-restricted CD4+ human T cell clone by the autologous MHC class II+ melanoma. *Int Immunol*, *5*(12), 1501-1508. <https://doi.org/10.1093/intimm/5.12.1501>

- Beyer, I., Li, Z., Persson, J., Liu, Y., van Rensburg, R., Yumul, R., Zhang, X. B., Hung, M. C., & Lieber, A. (2011). Controlled extracellular matrix degradation in breast cancer tumors improves therapy by trastuzumab. *Mol Ther*, 19(3), 479-489. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.256>
- biomol. (2021). *BMS 1166*. <https://www.biomol.com/de/produkte/chemikalien/biochemikalien/bms-1166-cay31441-1>
- Bitplane. (2018). *Imaris 9.2 Reference Manual*. Bitplane an Oxford Instruments company. Retrieved 09.05. from http://www.bitplane.com/download/manuals/ReferenceManual9_2_0.pdf
- Boateng, R., Boechat, N., Henrich, P. P., & Bolcun-Filas, E. (2021). Whole Ovary Immunofluorescence, Clearing, and Multiphoton Microscopy for Quantitative 3D Analysis of the Developing Ovarian Reserve in Mouse. *J Vis Exp*(175). <https://doi.org/10.3791/62972>
- Borghaei, H., Paz-Ares, L., Horn, L., Spigel, D. R., Steins, M., Ready, N. E., Chow, L. Q., Vokes, E. E., Felip, E., Holgado, E., Barlesi, F., Kohlhäufel, M., Arrieta, O., Burgio, M. A., Fayette, J., Lena, H., Poddubskaya, E., Gerber, D. E., Gettinger, S. N., . . . Brahmer, J. R. (2015). Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, 373(17), 1627-1639. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1507643>
- Brenna, C., Khan, A. U. M., Picascia, T., Sun, Q., Heuveline, V., & Gretz, N. (2020). New technical approaches for 3D morphological imaging and quantification of measurements. *Anat Rec (Hoboken)*, 303(10), 2702-2715. <https://doi.org/10.1002/ar.24463>
- Bröker, B., Schütt, C., & Fleischer, B. (2019). *Grundwissen Immunologie* (Vol. 4). Springer Spektrum.
- Burnet, M. (1957). Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J*, 1(5022), 779-786. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.5022.779>
- Cabrera, T., Angustias Fernandez, M., Sierra, A., Garrido, A., Herruzo, A., Escobedo, A., Fabra, A., & Garrido, F. (1996). High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive breast carcinomas. *Hum Immunol*, 50(2), 127-134. [https://doi.org/10.1016/0198-8859\(96\)00145-0](https://doi.org/10.1016/0198-8859(96)00145-0)
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., & Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263(5148), 802-805. <https://doi.org/10.1126/science.8303295>
- Chalmers, Z. R., Connelly, C. F., Fabrizio, D., Gay, L., Ali, S. M., Ennis, R., Schrock, A., Campbell, B., Shlien, A., Chmielecki, J., Huang, F., He, Y., Sun, J., Tabori, U., Kennedy, M., Lieber, D. S., Roels, S., White, J., Otto, G. A., . . . Frampton, G. M. (2017). Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med*, 9(1), 34. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0424-2>
- Chan, I. H., Wu, V., McCauley, S., Grimm, E. A., & Mumm, J. B. (2015). IL-10: Expanding the Immune Oncology Horizon. *Receptors Clin Investig*, 2(4).
- Chandrasekharan, B., & Neish, A. S. (2021). Imaging the Gut with "CLARITY". *J Vis Exp*(172). <https://doi.org/10.3791/62143>

- Chen, D. S., & Mellman, I. (2017). Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*, *541*(7637), 321-330. <https://doi.org/10.1038/nature21349>
- Chen, Y., Shen, Q., White, S. L., Gokmen-Polar, Y., Badve, S., & Goodman, L. J. (2019). Three-dimensional imaging and quantitative analysis in CLARITY processed breast cancer tissues. *Sci Rep*, *9*(1), 5624. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41957-w>
- Choi, J., Credit, K., Henderson, K., Deverkadra, R., He, Z., Wiig, H., Vanpelt, H., & Flessner, M. F. (2006). Intraperitoneal immunotherapy for metastatic ovarian carcinoma: Resistance of intratumoral collagen to antibody penetration. *Clin Cancer Res*, *12*(6), 1906-1912. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-05-2141>
- Christoph Wagener, O. M. (2010). *Molekulare Onkologie - Entstehung, Progression, klinische Aspekte* (Vol. 3). Thieme.
- Chung, K., Wallace, J., Kim, S. Y., Kalyanasundaram, S., Andalman, A. S., Davidson, T. J., Mirzabekov, J. J., Zalocusky, K. A., Mattis, J., Denisin, A. K., Pak, S., Bernstein, H., Ramakrishnan, C., Grosenick, L., Gradinaru, V., & Deisseroth, K. (2013). Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature*, *497*(7449), 332-337. <https://doi.org/10.1038/nature12107>
- Chung, L., Dinakarbandian, D., Yoshida, N., Lauer-Fields, J. L., Fields, G. B., Visse, R., & Nagase, H. (2004). Collagenase unwinds triple-helical collagen prior to peptide bond hydrolysis. *Embo j*, *23*(15), 3020-3030. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600318>
- Cirri, P., & Chiarugi, P. (2012). Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer Metastasis Rev*, *31*(1-2), 195-208. <https://doi.org/10.1007/s10555-011-9340-x>
- Darvin, P., Toor, S. M., Sasidharan Nair, V., & Elkord, E. (2018). Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. *Exp Mol Med*, *50*(12), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0191-1>
- DeNardo, D. G., & Coussens, L. M. (2007). Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Res*, *9*(4), 212. <https://doi.org/10.1186/bcr1746>
- Diab, A., Tannir, N. M., Bentebibel, S. E., Hwu, P., Papadimitrakopoulou, V., Haymaker, C., Kluger, H. M., Gettinger, S. N., Sznol, M., Tykodi, S. S., Curti, B. D., Tagliaferri, M. A., Zalevsky, J., Hannah, A. L., Hoch, U., Aung, S., Fanton, C., Rizwan, A., Iacucci, E., . . . Cho, D. C. (2020). Bempegaldesleukin (NKTR-214) plus Nivolumab in Patients with Advanced Solid Tumors: Phase I Dose-Escalation Study of Safety, Efficacy, and Immune Activation (PIVOT-02). *Cancer Discov*, *10*(8), 1158-1173. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.Cd-19-1510>
- Dirix, L. Y., Takacs, I., Jerusalem, G., Nikolinakos, P., Arkenau, H. T., Forero-Torres, A., Boccia, R., Lippman, M. E., Somer, R., Smakal, M., Emens, L. A., Hrinchenko, B., Edenfield, W., Gurtler, J., von Heydebreck, A., Grote, H. J., Chin, K., & Hamilton, E. P. (2018). Avelumab, an anti-PD-L1 antibody, in patients with locally advanced or metastatic breast cancer: a phase 1b JAVELIN Solid Tumor study. *Breast Cancer Res Treat*, *167*(3), 671-686. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4537-5>

- Du, H., Pang, M., Hou, X., Yuan, S., & Sun, L. (2017). PLOD2 in cancer research. *Biomed Pharmacother*, *90*, 670-676. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.04.023>
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*, *3*(11), 991-998. <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>
- Egeblad, M., Rasch, M. G., & Weaver, V. M. (2010). Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. *Curr Opin Cell Biol*, *22*(5), 697-706. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.08.015>
- Eikenes, L., Bruland Ø, S., Brekken, C., & Davies Cde, L. (2004). Collagenase increases the transcapillary pressure gradient and improves the uptake and distribution of monoclonal antibodies in human osteosarcoma xenografts. *Cancer Res*, *64*(14), 4768-4773. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-03-1472>
- Emens, L. A., Cruz, C., Eder, J. P., Braiteh, F., Chung, C., Tolaney, S. M., Kuter, I., Nanda, R., Cassier, P. A., Delord, J. P., Gordon, M. S., ElGabry, E., Chang, C. W., Sarkar, I., Grossman, W., O'Hear, C., Fassò, M., Molinero, L., & Schmid, P. (2019). Long-term Clinical Outcomes and Biomarker Analyses of Atezolizumab Therapy for Patients With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: A Phase 1 Study. *JAMA Oncol*, *5*(1), 74-82. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.4224>
- Erikson, A., Tufto, I., Bjønnum, A. B., Bruland Ø, S., & Davies Cde, L. (2008). The impact of enzymatic degradation on the uptake of differently sized therapeutic molecules. *Anticancer Res*, *28*(6a), 3557-3566.
- Ertürk, A., Becker, K., Jährling, N., Mauch, C. P., Hojer, C. D., Egen, J. G., Hellal, F., Bradke, F., Sheng, M., & Dodt, H. U. (2012). Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat Protoc*, *7*(11), 1983-1995. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.119>
- Ertürk, A., Mauch, C. P., Hellal, F., Förstner, F., Keck, T., Becker, K., Jährling, N., Steffens, H., Richter, M., Hübener, M., Kramer, E., Kirchhoff, F., Dodt, H. U., & Bradke, F. (2011). Three-dimensional imaging of the unsectioned adult spinal cord to assess axon regeneration and glial responses after injury. *Nat Med*, *18*(1), 166-171. <https://doi.org/10.1038/nm.2600>
- Esteban, F., Concha, A., Delgado, M., Pérez-Ayala, M., Ruiz-Cabello, F., & Garrido, F. (1990). Lack of MHC class I antigens and tumour aggressiveness of the squamous cell carcinoma of the larynx. *Br J Cancer*, *62*(6), 1047-1051. <https://doi.org/10.1038/bjc.1990.437>
- Fang, J., Chen, F., Liu, D., Gu, F., Chen, Z., & Wang, Y. (2020). Prognostic value of immune checkpoint molecules in breast cancer. *Biosci Rep*, *40*(7). <https://doi.org/10.1042/bsr20201054>
- Ferrone, S., & Marincola, F. M. (1995). Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunol Today*, *16*(10), 487-494. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(95\)80033-6](https://doi.org/10.1016/0167-5699(95)80033-6)
- Gabrilovich, D. I., & Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*, *9*(3), 162-174. <https://doi.org/10.1038/nri2506>

- Galluzzi, L., Vitale, I., Warren, S., Adjemian, S., Agostinis, P., Martinez, A. B., Chan, T. A., Coukos, G., Demaria, S., Deutsch, E., Draganov, D., Edelson, R. L., Formenti, S. C., Fucikova, J., Gabriele, L., Gaip, U. S., Gameiro, S. R., Garg, A. D., Golden, E., . . . Marincola, F. M. (2020). Consensus guidelines for the definition, detection and interpretation of immunogenic cell death. *J Immunother Cancer*, 8(1). <https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000337>
- Garg, A. D., Galluzzi, L., Apetoh, L., Baert, T., Birge, R. B., Bravo-San Pedro, J. M., Breckpot, K., Brough, D., Chaurio, R., Cirone, M., Coosemans, A., Coulie, P. G., De Ruyscher, D., Dini, L., de Witte, P., Dudek-Peric, A. M., Faggioni, A., Fucikova, J., Gaip, U. S., . . . Agostinis, P. (2015). Molecular and Translational Classifications of DAMPs in Immunogenic Cell Death. *Front Immunol*, 6, 588. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00588>
- Gilkes, D. M., Bajpai, S., Wong, C. C., Chaturvedi, P., Hubbi, M. E., Wirtz, D., & Semenza, G. L. (2013). Procollagen lysyl hydroxylase 2 is essential for hypoxia-induced breast cancer metastasis. *Mol Cancer Res*, 11(5), 456-466. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.Mcr-12-0629>
- Gleave, J. A., Lerch, J. P., Henkelman, R. M., & Nieman, B. J. (2013). A method for 3D immunostaining and optical imaging of the mouse brain demonstrated in neural progenitor cells. *PLoS One*, 8(8), e72039. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072039>
- Goldhirsch, A., Wood, W. C., Coates, A. S., Gelber, R. D., Thürlimann, B., & Senn, H. J. (2011). Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol*, 22(8), 1736-1747. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr304>
- Gopi Shah, M. W., Jan Huisken. (2017). Light Sheet Microscopy. In U. Kubitscheck (Ed.), *Fluorescence Microscopy - From Principles to Biological Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Grothausmann, R., Knudsen, L., Ochs, M., & Mühlfeld, C. (2017). Digital 3D reconstructions using histological serial sections of lung tissue including the alveolar capillary network. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 312(2), L243-L257. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00326.2016>
- Guan, X., Chen, J., Hu, Y., Lin, L., Sun, P., Tian, H., & Chen, X. (2018). Highly enhanced cancer immunotherapy by combining nanovaccine with hyaluronidase. *Biomaterials*, 171, 198-206. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.04.039>
- Guzik, K., Zak, K. M., Grudnik, P., Magiera, K., Musielak, B., Törner, R., Skalniak, L., Dömling, A., Dubin, G., & Holak, T. A. (2017). Small-Molecule Inhibitors of the Programmed Cell Death-1/Programmed Death-Ligand 1 (PD-1/PD-L1) Interaction via Transiently Induced Protein States and Dimerization of PD-L1. *J Med Chem*, 60(13), 5857-5867. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00293>
- Hendrich, H. J. (2012). *The Laboratory Mouse*.
- Henke, E., Nandigama, R., & Ergün, S. (2019). Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy. *Front Mol Biosci*, 6, 160. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00160>
- Henning, Y., Osadnik, C., & Malkemper, E. P. (2019). EyeCi: Optical clearing and imaging of immunolabeled mouse eyes using light-sheet fluorescence

- microscopy. *Exp Eye Res*, 180, 137-145.
<https://doi.org/10.1016/j.exer.2018.12.001>
- Herbel, J. N. (2021, 27.07.2021). *Checkpoint-Inhibitoren*. Gelbe Liste.
<https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffgruppen/checkpoint-inhibitoren>
- Herrera, F. G., Irving, M., Kandalaf, L. E., & Coukos, G. (2019). Rational combinations of immunotherapy with radiotherapy in ovarian cancer. *Lancet Oncol*, 20(8), e417-e433. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(19\)30401-2](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(19)30401-2)
- Herzberg, B., Campo, M. J., & Gainor, J. F. (2017). Immune Checkpoint Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncologist*, 22(1), 81-88.
<https://doi.org/10.1634/theoncologist.2016-0189>
- Hinsberg, D. K. (1936). *Medizinisch-chemische Bestimmungsmethoden: Zweiter Teil*. Springer-Verlag Berlin <https://doi.org/10.1007/978-3-642-99384-8>
- Hodge, J. W., Garnett, C. T., Farsaci, B., Palena, C., Tsang, K. Y., Ferrone, S., & Gameiro, S. R. (2013). Chemotherapy-induced immunogenic modulation of tumor cells enhances killing by cytotoxic T lymphocytes and is distinct from immunogenic cell death. *Int J Cancer*, 133(3), 624-636.
<https://doi.org/10.1002/ijc.28070>
- Hofmann, J., Gadjalova, I., Mishra, R., Ruland, J., & Keppler, S. J. (2020). Efficient Tissue Clearing and Multi-Organ Volumetric Imaging Enable Quantitative Visualization of Sparse Immune Cell Populations During Inflammation. *Front Immunol*, 11, 599495. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.599495>
- Huang, J., Brenna, C., Khan, A. U. M., Daniele, C., Rudolf, R., Heuveline, V., & Gretz, N. (2019). A cationic near infrared fluorescent agent and ethyl-cinnamate tissue clearing protocol for vascular staining and imaging. *Sci Rep*, 9(1), 521.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-36741-1>
- Im, K., Mareninov, S., Diaz, M. F. P., & Yong, W. H. (2019). An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol*, 1897, 299-311.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_26
- Jacobetz, M. A., Chan, D. S., Neesse, A., Bapiro, T. E., Cook, N., Frese, K. K., Feig, C., Nakagawa, T., Caldwell, M. E., Zecchini, H. I., Lolkema, M. P., Jiang, P., Kultti, A., Thompson, C. B., Maneval, D. C., Jodrell, D. I., Frost, G. I., Shepard, H. M., Skepper, J. N., & Tuveson, D. A. (2013). Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer. *Gut*, 62(1), 112-120. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302529>
- Jain, R. K. (1987). Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. *Cancer Res*, 47(12), 3039-3051.
- Jamur, M. C., & Oliver, C. (2010). Permeabilization of cell membranes. *Methods Mol Biol*, 588, 63-66. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0_9
- Jelinek, T., Mihalyova, J., Kascak, M., Duras, J., & Hajek, R. (2017). PD-1/PD-L1 inhibitors in haematological malignancies: update 2017. *Immunology*, 152(3), 357-371. <https://doi.org/10.1111/imm.12788>
- Jiang, H., Hegde, S., Knolhoff, B. L., Zhu, Y., Herndon, J. M., Meyer, M. A., Nywening, T. M., Hawkins, W. G., Shapiro, I. M., Weaver, D. T., Pachter, J. A., Wang-Gillam, A., & DeNardo, D. G. (2016). Targeting focal adhesion kinase renders pancreatic cancers responsive to checkpoint immunotherapy. *Nat Med*, 22(8), 851-860. <https://doi.org/10.1038/nm.4123>

- Jiang, Y., Yeung, J. L., Lee, J. H., An, J., Steadman, P. E., Kim, J. R., & Sung, H. K. (2018). Visualization of 3D White Adipose Tissue Structure Using Whole-mount Staining. *J Vis Exp*(141). <https://doi.org/10.3791/58683>
- Jiang, Z., Hsu, J. L., Li, Y., Hortobagyi, G. N., & Hung, M. C. (2020). Cancer Cell Metabolism Bolsters Immunotherapy Resistance by Promoting an Immunosuppressive Tumor Microenvironment. *Front Oncol*, *10*, 1197. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01197>
- Joyce, J. A., & Fearon, D. T. (2015). T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science*, *348*(6230), 74-80. <https://doi.org/10.1126/science.aaa6204>
- Judd, J., & Borghaei, H. (2020). Combining Immunotherapy and Chemotherapy for Non-Small Cell Lung Cancer. *Thorac Surg Clin*, *30*(2), 199-206. <https://doi.org/10.1016/j.thorsurg.2020.01.006>
- Julius M. Cruse, R. E. L., Huan Wang. (2004). Cluster of Differentiation (CD) Antigens. In *Immunology Guidebook*. Elsevier Academic Press.
- Jung, Y. Y., Kim, H. M., & Koo, J. S. (2016). The role of cancer-associated fibroblasts in breast cancer pathobiology. *Histol Histopathol*, *31*(4), 371-378. <https://doi.org/10.14670/hh-11-700>
- Kalluri, R. (2016). The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*, *16*(9), 582-598. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.73>
- Kalyuzhny, A. E. (2016). *Immunohistochemistry*. Springer.
- Kauppila, S., Stenbäck, F., Risteli, J., Jukkola, A., & Risteli, L. (1998). Aberrant type I and type III collagen gene expression in human breast cancer in vivo. *J Pathol*, *186*(3), 262-268. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9896\(1998110\)186:3<262::Aid-path191>3.0.Co;2-3](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9896(1998110)186:3<262::Aid-path191>3.0.Co;2-3)
- Ke, M. T., Fujimoto, S., & Imai, T. (2013). SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nat Neurosci*, *16*(8), 1154-1161. <https://doi.org/10.1038/nn.3447>
- Keam, S., Gill, S., Ebert, M. A., Nowak, A. K., & Cook, A. M. (2020). Enhancing the efficacy of immunotherapy using radiotherapy. *Clin Transl Immunology*, *9*(9), e1169. <https://doi.org/10.1002/cti2.1169>
- Keilholz U., S. D. (2016). Blockade von Immuncheckpoints - Eine Revolution in der Tumorimmunologie. *Forum*, *31*, 226-229. <https://doi.org/10.1007/s12312-016-0088-7>
- Kennedy, R., & Celis, E. (2008). Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses. *Immunol Rev*, *222*, 129-144. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00616.x>
- Kenneth Murphy, C. W. (2018). *Janeway Immunologie* (Vol. 9). Springer Spektrum.
- Kepp, O., Senovilla, L., Vitale, I., Vacchelli, E., Adjemian, S., Agostinis, P., Apetoh, L., Aranda, F., Barnaba, V., Bloy, N., Bracci, L., Breckpot, K., Brough, D., Buqué, A., Castro, M. G., Cirone, M., Colombo, M. I., Cremer, I., Demaria, S., . . . Galluzzi, L. (2014). Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncoimmunology*, *3*(9), e955691. <https://doi.org/10.4161/21624011.2014.955691>

- Kirschmann, D. A., Seftor, E. A., Fong, S. F., Nieva, D. R., Sullivan, C. M., Edwards, E. M., Sommer, P., Csiszar, K., & Hendrix, M. J. (2002). A molecular role for lysyl oxidase in breast cancer invasion. *Cancer Res*, *62*(15), 4478-4483.
- Klingberg, A., Hasenberg, A., Ludwig-Portugall, I., Medyukhina, A., Männ, L., Brenzel, A., Engel, D. R., Figge, M. T., Kurts, C., & Gunzer, M. (2017). Fully Automated Evaluation of Total Glomerular Number and Capillary Tuft Size in Nephritic Kidneys Using Lightsheet Microscopy. *J Am Soc Nephrol*, *28*(2), 452-459. <https://doi.org/10.1681/asn.2016020232>
- Kuczek, D. E., Larsen, A. M. H., Thorseth, M. L., Carretta, M., Kalvisa, A., Siersbæk, M. S., Simões, A. M. C., Roslind, A., Engelholm, L. H., Noessner, E., Donia, M., Svane, I. M., Straten, P. T., Grøntved, L., & Madsen, D. H. (2019). Collagen density regulates the activity of tumor-infiltrating T cells. *J Immunother Cancer*, *7*(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0556-6>
- Kwok-Leung Cheung. (2020). Editorial In K.-L. Cheung (Ed.), *Treatment Strategies and Survival Outcomes in Breast Cancer*.
- Lang, G. (2013). *Histotechnik - Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik* (2 ed.). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1190-1>
- Larkin, J., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J. J., Cowey, C. L., Lao, C. D., Schadendorf, D., Dummer, R., Smylie, M., Rutkowski, P., Ferrucci, P. F., Hill, A., Wagstaff, J., Carlino, M. S., Haanen, J. B., Maio, M., Marquez-Rodas, I., McArthur, G. A., Ascierto, P. A., . . . Wolchok, J. D. (2015). Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med*, *373*(1), 23-34. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1504030>
- Larson, C., Oronsky, B., Carter, C. A., Oronsky, A., Knox, S. J., Sher, D., & Reid, T. R. (2020). TGF-beta: a master immune regulator. *Expert Opin Ther Targets*, *24*(5), 427-438. <https://doi.org/10.1080/14728222.2020.1744568>
- Latchman, Y., Wood, C. R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A. J., Brown, J. A., Nunes, R., Greenfield, E. A., Bourque, K., Boussiotis, V. A., Carter, L. L., Carreno, B. M., Malenkovich, N., Nishimura, H., Okazaki, T., Honjo, T., . . . Freeman, G. J. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol*, *2*(3), 261-268. <https://doi.org/10.1038/85330>
- Ledys, F., Kalfeist, L., Galland, L., Limagne, E., & Ladoire, S. (2021). Therapeutic Associations Comprising Anti-PD-1/PD-L1 in Breast Cancer: Clinical Challenges and Perspectives. *Cancers (Basel)*, *13*(23). <https://doi.org/10.3390/cancers13235999>
- Levine, M. (2011). *Topics in Dental Biochemistry*. Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/9783-540-88116-2>
- Li, W., Germain, R. N., & Gerner, M. Y. (2017). Multiplex, quantitative cellular analysis in large tissue volumes with clearing-enhanced 3D microscopy (C(e)3D). *Proc Natl Acad Sci U S A*, *114*(35), E7321-e7330. <https://doi.org/10.1073/pnas.1708981114>
- Li, X., Yang, J., Peng, L., Sahin, A. A., Huo, L., Ward, K. C., O'Regan, R., Torres, M. A., & Meisel, J. L. (2017). Triple-negative breast cancer has worse overall survival and cause-specific survival than non-triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, *161*(2), 279-287. <https://doi.org/10.1007/s10549-016-4059-6>

- Lindblad, K. E., Ruiz de Galarreta, M., & Lujambio, A. (2021). Tumor-Intrinsic Mechanisms Regulating Immune Exclusion in Liver Cancers. *Front Immunol*, 12, 642958. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.642958>
- Lloyd-Lewis, B., Davis, F. M., Harris, O. B., Hitchcock, J. R., Lourenco, F. C., Pasche, M., & Watson, C. J. (2016). Imaging the mammary gland and mammary tumours in 3D: optical tissue clearing and immunofluorescence methods. *Breast Cancer Res*, 18(1), 127. <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0754-9>
- Loibl, S., & Gianni, L. (2017). HER2-positive breast cancer. *Lancet*, 389(10087), 2415-2429. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)32417-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(16)32417-5)
- Lucero, H. A., & Kagan, H. M. (2006). Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cell Mol Life Sci*, 63(19-20), 2304-2316. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6149-9>
- Luque, M., Sanz-Álvarez, M., Santamaría, A., Zazo, S., Cristóbal, I., de la Fuente, L., Mínguez, P., Eroles, P., Rovira, A., Albanell, J., Madoz-Gúrpide, J., & Rojo, F. (2021). Targeted Therapy Modulates the Secretome of Cancer-Associated Fibroblasts to Induce Resistance in HER2-Positive Breast Cancer. *Int J Mol Sci*, 22(24). <https://doi.org/10.3390/ijms222413297>
- Mahmoud, S. M., Paish, E. C., Powe, D. G., Macmillan, R. D., Grainge, M. J., Lee, A. H., Ellis, I. O., & Green, A. R. (2011). Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol*, 29(15), 1949-1955. <https://doi.org/10.1200/jco.2010.30.5037>
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., & Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, 454(7203), 436-444. <https://doi.org/10.1038/nature07205>
- Mariathasan, S., Turley, S. J., Nickles, D., Castiglioni, A., Yuen, K., Wang, Y., Kadel, E. E., III, Koeppen, H., Astarita, J. L., Cubas, R., Jhunjhunwala, S., Banchereau, R., Yang, Y., Guan, Y., Chalouni, C., Ziai, J., Şenbabaoğlu, Y., Santoro, S., Sheinson, D., . . . Powles, T. (2018). TGFβ attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells. *Nature*, 554(7693), 544-548. <https://doi.org/10.1038/nature25501>
- Masselink, W., Reumann, D., Murawala, P., Pasierbek, P., Taniguchi, Y., Bonnay, F., Meixner, K., Knoblich, J. A., & Tanaka, E. M. (2019). Broad applicability of a streamlined ethyl cinnamate-based clearing procedure. *Development*, 146(3). <https://doi.org/10.1242/dev.166884>
- MedChemExpress. (2021). BMS-1166. <https://www.medchemexpress.com/BMS-1166.html>
- Melan, M. A. (1999). Overview of Cell Fixatives and Cell Membrane Permeants. In J. L. C. (Ed.), *Immunocytochemical Methods and Protocols* (2 ed., Vol. 115). Humana Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1385/1-59259-213-9:45>
- Merz, S. F., Korste, S., Bornemann, L., Michel, L., Stock, P., Squire, A., Soun, C., Engel, D. R., Detzer, J., Lörchner, H., Hermann, D. M., Kamler, M., Klode, J., Hendgen-Cotta, U. B., Rassaf, T., Gunzer, M., & Totzeck, M. (2019). Contemporaneous 3D characterization of acute and chronic myocardial I/R injury and response. *Nat Commun*, 10(1), 2312. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10338-2>
- Monteran, L., & Erez, N. (2019). The Dark Side of Fibroblasts: Cancer-Associated Fibroblasts as Mediators of Immunosuppression in the Tumor

- Microenvironment. *Front Immunol*, 10, 1835.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01835>
- Moo, T. A., Sanford, R., Dang, C., & Morrow, M. (2018). Overview of Breast Cancer Therapy. *PET Clin*, 13(3), 339-354. <https://doi.org/10.1016/j.cpet.2018.02.006>
- Motzer, R. J., Escudier, B., McDermott, D. F., George, S., Hammers, H. J., Srinivas, S., Tykodi, S. S., Sosman, J. A., Procopio, G., Plimack, E. R., Castellano, D., Choueiri, T. K., Gurney, H., Donskov, F., Bono, P., Wagstaff, J., Gauler, T. C., Ueda, T., Tomita, Y., . . . Sharma, P. (2015). Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*, 373(19), 1803-1813.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1510665>
- Muenst, S., Soysal, S. D., Tzankov, A., & Hoeller, S. (2015). The PD-1/PD-L1 pathway: biological background and clinical relevance of an emerging treatment target in immunotherapy. *Expert Opin Ther Targets*, 19(2), 201-211.
<https://doi.org/10.1517/14728222.2014.980235>
- Muntifering, M., Castranova, D., Gibson, G. A., Meyer, E., Kofron, M., & Watson, A. M. (2018). Clearing for Deep Tissue Imaging. *Curr Protoc Cytom*, 86(1), e38.
<https://doi.org/10.1002/cpcy.38>
- Murao, A., Aziz, M., Wang, H., Brenner, M., & Wang, P. (2021). Release mechanisms of major DAMPs. *Apoptosis*, 26(3-4), 152-162. <https://doi.org/10.1007/s10495-021-01663-3>
- Nanda, R., Chow, L. Q., Dees, E. C., Berger, R., Gupta, S., Geva, R., Pusztai, L., Pathiraja, K., Aktan, G., Cheng, J. D., Karantza, V., & Buisseret, L. (2016). Pembrolizumab in Patients With Advanced Triple-Negative Breast Cancer: Phase Ib KEYNOTE-012 Study. *J Clin Oncol*, 34(21), 2460-2467.
<https://doi.org/10.1200/jco.2015.64.8931>
- National Center for Biotechnology Information. (2021). *PubChem Compound Summary for CID 637758, Ethyl cinnamate*.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethyl-cinnamate>
- Neesse, A., Michl, P., Frese, K. K., Feig, C., Cook, N., Jacobetz, M. A., Lolkema, M. P., Buchholz, M., Olive, K. P., Gress, T. M., & Tuveson, D. A. (2011). Stromal biology and therapy in pancreatic cancer. *Gut*, 60(6), 861-868.
<https://doi.org/10.1136/gut.2010.226092>
- Nojima, S., Susaki, E. A., Yoshida, K., Takemoto, H., Tsujimura, N., Iijima, S., Takachi, K., Nakahara, Y., Tahara, S., Ohshima, K., Kurashige, M., Hori, Y., Wada, N., Ikeda, J. I., Kumanogoh, A., Morii, E., & Ueda, H. R. (2017). CUBIC pathology: three-dimensional imaging for pathological diagnosis. *Sci Rep*, 7(1), 9269.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-09117-0>
- Oliver, C., & Jamur, M. C. (2010). *Immunocytochemical methods and protocols* (Humana Press (Springer protocols, Ed. Vol. 3).
- Olkhanud, P. B., Damdinsuren, B., Bodogai, M., Gress, R. E., Sen, R., Wejksza, K., Malchinkhuu, E., Wersto, R. P., & Biragyn, A. (2011). Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4⁺ T cells to T-regulatory cells. *Cancer Res*, 71(10), 3505-3515.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-10-4316>
- Oskarsson, T. (2013). Extracellular matrix components in breast cancer progression and metastasis. *Breast*, 22 Suppl 2, S66-72.
<https://doi.org/10.1016/j.breast.2013.07.012>

- Pan, C., Schoppe, O., Parra-Damas, A., Cai, R., Todorov, M. I., Gondi, G., von Neubeck, B., Böğürçü-Seidel, N., Seidel, S., Sleiman, K., Veltkamp, C., Förstera, B., Mai, H., Rong, Z., Trompak, O., Ghasemigharagoz, A., Reimer, M. A., Cuesta, A. M., Coronel, J., . . . Ertürk, A. (2019). Deep Learning Reveals Cancer Metastasis and Therapeutic Antibody Targeting in the Entire Body. *Cell*, 179(7), 1661-1676.e1619. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.11.013>
- Pardoll, D. (2015). Cancer and the Immune System: Basic Concepts and Targets for Intervention. *Semin Oncol*, 42(4), 523-538. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2015.05.003>
- Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 12(4), 252-264. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>
- Parfitt, G. J. (2019). Immunofluorescence Tomography: High-resolution 3-D reconstruction by serial-sectioning of methacrylate embedded tissues and alignment of 2-D immunofluorescence images. *Sci Rep*, 9(1), 1992. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38232-9>
- Park, S., Koo, J. S., Kim, M. S., Park, H. S., Lee, J. S., Lee, J. S., Kim, S. I., & Park, B. W. (2012). Characteristics and outcomes according to molecular subtypes of breast cancer as classified by a panel of four biomarkers using immunohistochemistry. *Breast*, 21(1), 50-57. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2011.07.008>
- Pernas, S., & Tolaney, S. M. (2019). HER2-positive breast cancer: new therapeutic frontiers and overcoming resistance. *Ther Adv Med Oncol*, 11, 1758835919833519. <https://doi.org/10.1177/1758835919833519>
- Peyrol, S., Raccurt, M., Gerard, F., Gleyzal, C., Grimaud, J. A., & Sommer, P. (1997). Lysyl oxidase gene expression in the stromal reaction to in situ and invasive ductal breast carcinoma. *Am J Pathol*, 150(2), 497-507.
- Pichat, J., Iglesias, J. E., Yousry, T., Ourselin, S., & Modat, M. (2018). A Survey of Methods for 3D Histology Reconstruction. *Med Image Anal*, 46, 73-105. <https://doi.org/10.1016/j.media.2018.02.004>
- Pinnell, S. R., & Martin, G. R. (1968). The cross-linking of collagen and elastin: enzymatic conversion of lysine in peptide linkage to alpha-amino adipic-delta-semialdehyde (allysine) by an extract from bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 61(2), 708-716. <https://doi.org/10.1073/pnas.61.2.708>
- Puelles, V. G., Fleck, D., Ortz, L., Papadouri, S., Strieder, T., Böhner, A. M. C., van der Wolde, J. W., Vogt, M., Saritas, T., Kuppe, C., Fuss, A., Menzel, S., Klinkhammer, B. M., Müller-Newen, G., Heymann, F., Decker, L., Braun, F., Kretz, O., Huber, T. B., . . . Moeller, M. J. (2019). Novel 3D analysis using optical tissue clearing documents the evolution of murine rapidly progressive glomerulonephritis. *Kidney Int*, 96(2), 505-516. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2019.02.034>
- Radoja, S., Rao, T. D., Hillman, D., & Frey, A. B. (2000). Mice bearing late-stage tumors have normal functional systemic T cell responses in vitro and in vivo. *J Immunol*, 164(5), 2619-2628. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.5.2619>
- Renier, N., Wu, Z., Simon, D. J., Yang, J., Ariel, P., & Tessier-Lavigne, M. (2014). iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell*, 159(4), 896-910. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.010>

- Richardson, D. S., & Lichtman, J. W. (2015). Clarifying Tissue Clearing. *Cell*, 162(2), 246-257. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.067>
- 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., . . . Wolchok, J. D. (2011). Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 364(26), 2517-2526. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1104621>
- Robert Koch-Institut. (2016). *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*. Robert Koch-Institut. <https://edoc.rki.de/bitstream/handle/176904/3264/28oaKVmif0wDk.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Robert Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2021, 09.11.2021). *Krebs in Deutschland für 2017/2018*. Robert Koch-Institut. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2021/krebs_in_deutschland_2021.pdf?blob=publicationFile
- Rolles, B., Uciechowski, P., & Rink, L. (2021). Grundlagen der Tumorimmunologie - Das Dilemma zwischen Abwehrmechanismen, Immuntoleranz und Immunescape. *Der Onkologe*. <https://doi.org/10.1007/s00761-021-01010-w>
- Rossow, L., Veitl, S., Vorlová, S., Wax, J. K., Kuhn, A. E., Maltzahn, V., Upcin, B., Karl, F., Hoffmann, H., Gätzner, S., Kallius, M., Nandigama, R., Scheld, D., Irmak, S., Herterich, S., Zernecke, A., Ergün, S., & Henke, E. (2018). LOX-catalyzed collagen stabilization is a proximal cause for intrinsic resistance to chemotherapy. *Oncogene*, 37(36), 4921-4940. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0320-2>
- Rothe, G. (2007). Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie. In T. A. Sack U., Rothe G. (Ed.), *Zelluläre Diagnostik - Grundlagen, Methoden und klinische Anwendung der Durchflusszytometrie*.
- Rowshanravan, B., Halliday, N., & Sansom, D. M. (2018). CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood*, 131(1), 58-67. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-06-741033>
- Roy, D. M., & Walsh, L. A. (2014). Candidate prognostic markers in breast cancer: focus on extracellular proteases and their inhibitors. *Breast Cancer (Dove Med Press)*, 6, 81-91. <https://doi.org/10.2147/bctt.S46020>
- S3-Leitlinie Mammakarzinom. (2021). *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms*. Deutsche Krebs Gesellschaft, Deutsche Krebshilfe, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften.
- Sabdyusheva Litschauer, I., Becker, K., Saghafi, S., Ballke, S., Bollwein, C., Foroughipour, M., Gaugeler, J., Foroughipour, M., Schavelová, V., László, V., Döme, B., Brostjan, C., Weichert, W., & Dodt, H. U. (2020). 3D histopathology of human tumours by fast clearing and ultramicroscopy. *Sci Rep*, 10(1), 17619. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71737-w>
- Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C. M., & Hafler, D. A. (2010). FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*, 10(7), 490-500. <https://doi.org/10.1038/nri2785>

- Salmon, H., Franciszkiwicz, K., Damotte, D., Dieu-Nosjean, M. C., Validire, P., Trautmann, A., Mami-Chouaib, F., & Donnadieu, E. (2012). Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. *J Clin Invest*, *122*(3), 899-910. <https://doi.org/10.1172/jci45817>
- Samstein, R. M., Lee, C. H., Shoushtari, A. N., Hellmann, M. D., Shen, R., Janjigian, Y. Y., Barron, D. A., Zehir, A., Jordan, E. J., Omuro, A., Kaley, T. J., Kendall, S. M., Motzer, R. J., Hakimi, A. A., Voss, M. H., Russo, P., Rosenberg, J., Iyer, G., Bochner, B. H., . . . Morris, L. G. T. (2019). Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nat Genet*, *51*(2), 202-206. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0312-8>
- Santhanam, A. N., Baker, A. R., Hegamyer, G., Kirschmann, D. A., & Colburn, N. H. (2010). Pdc4 repression of lysyl oxidase inhibits hypoxia-induced breast cancer cell invasion. *Oncogene*, *29*(27), 3921-3932. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.158>
- Sato, T., Terai, M., Tamura, Y., Alexeev, V., Mastrangelo, M. J., & Selvan, S. R. (2011). Interleukin 10 in the tumor microenvironment: a target for anticancer immunotherapy. *Immunol Res*, *51*(2-3), 170-182. <https://doi.org/10.1007/s12026-011-8262-6>
- Schreiber, R. D., Old, L. J., & Smyth, M. J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, *331*(6024), 1565-1570. <https://doi.org/10.1126/science.1203486>
- Seidel, J. A., Otsuka, A., & Kabashima, K. (2018). Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations. *Front Oncol*, *8*, 86. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00086>
- Selchow, O., & Huisken, J. (2013). Lichtblattmikroskopie: Das Beleuchtungskonzept revolutioniert die 3D-Analyse lebender Proben. *BioPhotonik* *1/2013*.
- Seliger, B., Maeurer, M. J., & Ferrone, S. (2000). Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol Today*, *21*(9), 455-464. [https://doi.org/10.1016/s0167-5699\(00\)01692-3](https://doi.org/10.1016/s0167-5699(00)01692-3)
- Shi, X., Young, C. D., Zhou, H., & Wang, X. (2020). Transforming Growth Factor- β Signaling in Fibrotic Diseases and Cancer-Associated Fibroblasts. *Biomolecules*, *10*(12). <https://doi.org/10.3390/biom10121666>
- Shirley Ayad, R. P. B.-H., Martin J. Humphries, Karl E. Kadler, C. Adrian Shuttleworth. (1998). *The extracellular matrix - Facts Book* (2 ed.). Academic Press.
- Siegel, R. C. (1979). Lysyl oxidase. *Int Rev Connect Tissue Res*, *8*, 73-118. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-363708-6.50009-6>
- Sina Bartfeld, S. C., Tobias Erb, Heiner Fangerau, Boris Fehse, Jürgen Hampel, Ferdinand Hucho, Martin Korte, Stefan Mundlos, Jens Reich, Silke Schickanz, Jochen Taupitz, Jörn Walter, Eva Winkler und Martin Zenke. (2020). Kernaussagen und Handlungsempfehlungen zu Organoiden. In H. S. Sina Bartfeld, Cantas Alev, Bon-Kyoung Koo, Anja Pichl, Angela Osterheider, Lilian Marx-Stölting (Ed.), *Organoide - Ihre Bedeutung für Forschung, Medizin und Gesellschaft* (Vol. 1). Nomos Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG. <https://doi.org/10.5771/9783748908326>

- SinoBiological. (2022). *Recombinant Anti-CD4 Antibody, Rabbit Monoclonal (#50134-R766)*. Retrieved 10.01.2022 from <https://www.sinobiological.com/antibodies/cd4-50134-r766>
- Skalniak, L., Zak, K. M., Guzik, K., Magiera, K., Musielak, B., Pachota, M., Szelazek, B., Kocik, J., Grudnik, P., Tomala, M., Krzanik, S., Pyrc, K., Dömling, A., Dubin, G., & Holak, T. A. (2017). Small-molecule inhibitors of PD-1/PD-L1 immune checkpoint alleviate the PD-L1-induced exhaustion of T-cells. *Oncotarget*, 8(42), 72167-72181. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20050>
- Stanton, S. E., Adams, S., & Disis, M. L. (2016). Variation in the Incidence and Magnitude of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer Subtypes: A Systematic Review. *JAMA Oncol*, 2(10), 1354-1360. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.1061>
- Staveley-O'Carroll, K., Sotomayor, E., Montgomery, J., Borrello, I., Hwang, L., Fein, S., Pardoll, D., & Levitsky, H. (1998). Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(3), 1178-1183. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.3.1178>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Susaki, E. A., Tainaka, K., Perrin, D., Kishino, F., Tawara, T., Watanabe, T. M., Yokoyama, C., Onoe, H., Eguchi, M., Yamaguchi, S., Abe, T., Kiyonari, H., Shimizu, Y., Miyawaki, A., Yokota, H., & Ueda, H. R. (2014). Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell*, 157(3), 726-739. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.042>
- Susaki, E. A., Tainaka, K., Perrin, D., Yukinaga, H., Kuno, A., & Ueda, H. R. (2015). Advanced CUBIC protocols for whole-brain and whole-body clearing and imaging. *Nat Protoc*, 10(11), 1709-1727. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.085>
- SYSY Synaptic Systems. (2022). *CD4 antibody (#HS-360-004)*. Retrieved 10.01.2022 from <https://sysy.com/product/HS-360004>
- Tainaka, K., Kubota, S. I., Suyama, T. Q., Susaki, E. A., Perrin, D., Ukai-Tadenuma, M., Ukai, H., & Ueda, H. R. (2014). Whole-body imaging with single-cell resolution by tissue decolorization. *Cell*, 159(4), 911-924. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.034>
- Takai, K., Le, A., Weaver, V. M., & Werb, Z. (2016). Targeting the cancer-associated fibroblasts as a treatment in triple-negative breast cancer. *Oncotarget*, 7(50), 82889-82901. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12658>
- Tang, X., Tu, G., Yang, G., Wang, X., Kang, L., Yang, L., Zeng, H., Wan, X., Qiao, Y., Cui, X., Liu, M., & Hou, Y. (2019). Autocrine TGF- β 1/miR-200s/miR-221/DNMT3B regulatory loop maintains CAF status to fuel breast cancer cell proliferation. *Cancer Lett*, 452, 79-89. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.02.044>
- Tesniere, A., Panaretakis, T., Kepp, O., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2008). Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death Differ*, 15(1), 3-12. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402269>

- The Global Cancer Observatory. (2021). *[Brustkrebsfälle in Deutschland im Jahr 2020]*. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/276-germany-factsheets.pdf>
- The Human Protein Atlas. (2022a). *Breast cancer 1 - Ductal carcinoma of the breast*. Retrieved 13.01.2022 from <https://www.proteinatlas.org/learn/dictionary/pathology/breast+cancer#Breast-cancer-1,-ductal-carcinoma>
- The Human Protein Atlas. (2022b). *Breast cancer HPA037756 Female, age 83, Breast (T-04000), Duct carcinoma (M-85003), Patient id: 2160*. Retrieved 12.01.2022 from <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000153563-CD8A/pathology/breast+cancer#img>
- ThermoFisher scientific. (2022a). *Invitrogen CD4 Monoclonal Antibody (GK1.5), eBioscience (#14-0041-82)*. Retrieved 10.01.2022 from <https://www.thermofisher.com/antibody/product/CD4-Antibody-clone-GK1-5-Monoclonal/14-0041-82>
- ThermoFisher scientific. (2022b). *Invitrogen CD8a Monoclonal Antibody (4SM15), eBioscience (#14-0808-82)*. Retrieved 10.01.2022 from <https://www.thermofisher.com/antibody/product/CD8a-Antibody-clone-4SM15-Monoclonal/14-0808-82>
- Thomas, A., Routh, E. D., Pullikuth, A., Jin, G., Su, J., Chou, J. W., Hoadley, K. A., Print, C., Knowlton, N., Black, M. A., Demaria, S., Wang, E., Bedognetti, D., Jones, W. D., Mehta, G. A., Gatz, M. L., Perou, C. M., Page, D. B., Triozzi, P., & Miller, L. D. (2018). Tumor mutational burden is a determinant of immune-mediated survival in breast cancer. *Oncoimmunology*, 7(10), e1490854. <https://doi.org/10.1080/2162402x.2018.1490854>
- Thomas, L. (1959). Discussion. In H. S. Lawrence (Ed.), *Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States: A Symposium at the New York Academy of Medicine* (pp. 529-532). Hoeber-Harper.
- Topalian, S. L., Taube, J. M., Anders, R. A., & Pardoll, D. M. (2016). Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 16(5), 275-287. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.36>
- Uyttenhove, C., Pilotte, L., Théate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T., & Van den Eynde, B. J. (2003). Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med*, 9(10), 1269-1274. <https://doi.org/10.1038/nm934>
- Van der Jeught, K., Bialkowski, L., Daszkiewicz, L., Broos, K., Goyvaerts, C., Renmans, D., Van Lint, S., Heirman, C., Thielemans, K., & Breckpot, K. (2015). Targeting the tumor microenvironment to enhance antitumor immune responses. *Oncotarget*, 6(3), 1359-1381. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3204>
- van der Slot, A. J., van Dura, E. A., de Wit, E. C., De Groot, J., Huizinga, T. W., Bank, R. A., & Zuurmond, A. M. (2005). Elevated formation of pyridinoline cross-links by profibrotic cytokines is associated with enhanced lysyl hydroxylase 2b levels. *Biochim Biophys Acta*, 1741(1-2), 95-102. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2004.09.009>
- van der Slot, A. J., Zuurmond, A. M., Bardoel, A. F., Wijmenga, C., Pruijs, H. E., Sillence, D. O., Brinckmann, J., Abraham, D. J., Black, C. M., Verzijl, N.,

- DeGroot, J., Hanemaaijer, R., TeKoppele, J. M., Huizinga, T. W., & Bank, R. A. (2003). Identification of PLOD2 as telopeptide lysyl hydroxylase, an important enzyme in fibrosis. *J Biol Chem*, *278*(42), 40967-40972. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307380200>
- Vanneman, M., & Dranoff, G. (2012). Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nat Rev Cancer*, *12*(4), 237-251. <https://doi.org/10.1038/nrc3237>
- Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2011). Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol*, *29*, 235-271. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101324>
- Voloshenyuk, T. G., Landesman, E. S., Khoutorova, E., Hart, A. D., & Gardner, J. D. (2011). Induction of cardiac fibroblast lysyl oxidase by TGF- β 1 requires PI3K/Akt, Smad3, and MAPK signaling. *Cytokine*, *55*(1), 90-97. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.03.024>
- Vonderheide, R. H., & Bear, A. S. (2020). Tumor-Derived Myeloid Cell Chemoattractants and T Cell Exclusion in Pancreatic Cancer. *Front Immunol*, *11*, 605619. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.605619>
- Wang, X., Luo, J., He, L., Cheng, X., Yan, G., Wang, J., & Tang, R. (2018). Hybrid pH-sensitive nanogels surface-functionalized with collagenase for enhanced tumor penetration. *J Colloid Interface Sci*, *525*, 269-281. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.04.084>
- Wang, Y., Deng, W., Li, N., Neri, S., Sharma, A., Jiang, W., & Lin, S. H. (2018). Combining Immunotherapy and Radiotherapy for Cancer Treatment: Current Challenges and Future Directions. *Front Pharmacol*, *9*, 185. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00185>
- Weinberg, F., & Gadgeel, S. (2019). Combination pembrolizumab plus chemotherapy: a new standard of care for patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer (Auckl)*, *10*, 47-56. <https://doi.org/10.2147/lcct.S176391>
- Wrzesinski, S. H., Wan, Y. Y., & Flavell, R. A. (2007). Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clin Cancer Res*, *13*(18 Pt 1), 5262-5270. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-07-1157>
- Xie, J., Wang, C., Huang, D. Y., Zhang, Y., Xu, J., Kolesnikov, S. S., Sung, K. L., & Zhao, H. (2013). TGF-beta1 induces the different expressions of lysyl oxidases and matrix metalloproteinases in anterior cruciate ligament and medial collateral ligament fibroblasts after mechanical injury. *J Biomech*, *46*(5), 890-898. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2012.12.019>
- Xu, Y., He, Q., Wang, M., Wu, Y., Shi, Y., Wang, W., & Zhang, J. (2023). Three-dimensional visualization of human brain tumors using the CUBIC technique. *Brain Tumor Pathol*, *40*(1), 4-14. <https://doi.org/10.1007/s10014-022-00445-2>
- Xu, Y., Li, P., Wang, M., Zhang, J., & Wang, W. (2019). Imaging the brain in 3D using a combination of CUBIC and immunofluorescence staining. *Biomed Opt Express*, *10*(4), 2141-2149. <https://doi.org/10.1364/boe.10.002141>
- Yamauchi, M., Terajima, M., & Shiiba, M. (2019). Lysine Hydroxylation and Cross-Linking of Collagen. *Methods Mol Biol*, *1934*, 309-324. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9055-9_19

- Ye, Q., Wang, C., Xian, J., Zhang, M., Cao, Y., & Cao, Y. (2018). Expression of programmed cell death protein 1 (PD-1) and indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in the tumor microenvironment and in tumor-draining lymph nodes of breast cancer. *Hum Pathol*, *75*, 81-90. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.02.004>
- Yee, N. S., & Pack, M. (2005). Zebrafish as a model for pancreatic cancer research. *Methods Mol Med*, *103*, 273-298. <https://doi.org/10.1385/1-59259-780-7:273>
- Young, Y. K., Bolt, A. M., Ahn, R., & Mann, K. K. (2016). Analyzing the Tumor Microenvironment by Flow Cytometry. *Methods Mol Biol*, *1458*, 95-110. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3801-8_8
- Yu, T., Zhu, J., Li, D., & Zhu, D. (2021). Physical and chemical mechanisms of tissue optical clearing. *iScience*, *24*(3), 102178. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102178>
- Zentrum für Krebsregisterdaten (RKI). (2017). *Epidemiologie von Krebserkrankungen* 2. Retrieved 2021, 02. September from https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs_node.html
- Zhu, M., Yang, M., Zhang, J., Yin, Y., Fan, X., Zhang, Y., Qin, S., Zhang, H., & Yu, F. (2021). Immunogenic Cell Death Induction by Ionizing Radiation. *Front Immunol*, *12*, 705361. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.705361>
- Zhu, X., & Zhu, J. (2020). CD4 T Helper Cell Subsets and Related Human Immunological Disorders. *Int J Mol Sci*, *21*(21). <https://doi.org/10.3390/ijms21218011>
- Zuurmond, A. M., van der Slot-Verhoeven, A. J., van Dura, E. A., De Groot, J., & Bank, R. A. (2005). Minoxidil exerts different inhibitory effects on gene expression of lysyl hydroxylase 1, 2, and 3: implications for collagen cross-linking and treatment of fibrosis. *Matrix Biol*, *24*(4), 261-270. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2005.04.002>

Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

A	<i>Alexa</i>
APCs	<i>antigen-presenting cells</i>
BMS	Bristol-Myers Squibb
BSA	Bovines Serumalbumin
CAFs	<i>cancer-associated fibroblasts</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4</i>
CTLs	<i>cytotoxic T lymphocytes</i>
d	<i>day</i>
DAMPs	<i>damage-associated molecular patterns</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazelluläre Matrix
FGF2	<i>fibroblast growth factor 2</i>
Gew.-%	Gewichtsprozent
gp	<i>guinea pig</i>
h	<i>hour</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HIF-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1 α
HR	Hormonrezeptor
ICI	Immuncheckpoint-Inhibitor
ICD	<i>immunogenic cell death</i>
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IL-10	Interleukin-10
IL-12	Interleukin-12
IL-2	Interleukin-2
JIR	Jackson ImmunoResearch
LH	Lysylhydroxylasen
LOX	Lysyloxidasen
LSFM	<i>light sheet fluorescence microscope</i>
MDSC	Myeloide Suppressorzellen

MEK	Methylethylketon
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MMPs	Matrix-Metalloproteinasen
ON	<i>over night</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PD-1	<i>programmed cell death receptor 1</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PD-L1	<i>programmed death ligand 1</i>
PFA	Paraformaldehyd
PLOD2	Prokollagen-Lysin-2-Oxoglutarat-5-Dioxygenase 2
rb	<i>rabbit</i>
RI	<i>refractive index</i>
RT	Raumtemperatur
rt	<i>rat</i>
TCR	<i>t-cell receptor</i>
Tfh	Follikuläre T-Helferzelle
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
Th1	Typ-1-T-Helferzelle
Th17	Typ-17-T-Helferzelle
Th2	Typ-2-T-Helferzelle
TILs	<i>tumor-infiltrating lymphocytes</i>
TMB	<i>tumor mutational burden</i>
TME	<i>tumor microenvironment</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Treg	Regulatorische T-Zellen
3D	dreidimensional

II Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Aufbau eines duktales Mammakarzinoms
- Abbildung 2: Verteilung CD8⁺ T-Zellen im Mammakarzinom
- Abbildung 3: 3D-Immunfluoreszenzaufnahme eines AT3-Brusttumorsstücks mit CD31-Gefäßmarkierung bei zweitägiger Antikörperinkubation
- Abbildung 4: 3D-Immunfluoreszenzaufnahme eines AT3-Brusttumorsstücks mit CD31-Gefäßmarkierung (rot) und Autofluoreszenz des Gewebes mit Erythrozyten (grün)
- Abbildung 5: 3D-Immunfluoreszenzaufnahme eines AT3-Brusttumorsstücks mit CD31-Gefäßmarkierung bei viertägiger Antikörperinkubation
- Abbildung 6: 3D-Rekonstruktion der Gefäße und Markierung des größten zusammenhängenden Gefäßnetzes in einem AT3-Brusttumorsstück mit CD31-Gefäßmarkierung bei viertägiger Antikörperinkubation
- Abbildung 7: 3D-Immunfluoreszenzaufnahme eines AT3-Brusttumorsstücks mit CD31-Gefäßmarkierung unter Verwendung von CUBIC 1A
- Abbildung 8: 3D-Immunfluoreszenzaufnahme eines AT3-Brusttumorsstücks mit CD31-Gefäßmarkierung und Autofluoreszenz der Erythrozyten
- Abbildung 9: 3D-Rekonstruktion der Gefäße und Markierung des größten zusammenhängenden Gefäßnetzes in einem AT3-Brusttumorsstück mit CD31-Gefäßmarkierung unter Verwendung von CUBIC 1A
- Abbildung 10: 3D-Immunfluoreszenzaufnahme eines AT3-Brusttumorsstücks mit CD31-Gefäßmarkierung unter Einsatz eines Entfärbungsreagenz
- Abbildung 11: 3D-Rekonstruktion der Gefäße und Markierung des größten zusammenhängenden Gefäßnetzes in einem AT3-Brusttumorsstück mit CD31-Gefäßmarkierung unter Verwendung des Entfärbungsreagenz
- Abbildung 12: Anteil der Einzelvolumina am Gesamtgefäßvolumen (Gegenüberstellung der Versuche 2, 4 und 5)
- Abbildung 13: Gegenüberstellung der Ergebnisse von Versuch 1, 2, 4 und 5
- Abbildung 14: 3D-Immunfluoreszenzaufnahme eines AT3-Brusttumorsstücks mit Gefäß- und Immunzellmarkierung
- Abbildung 15: 3D-Immunfluoreszenzaufnahme von AT3-Brusttumorsstücken mit Markierung CD4⁺ T-Zellen unter Verwendung unterschiedlicher CD4-Antikörper
- Abbildung 16: 3D-Immunfluoreszenzaufnahme eines AT3-Brusttumorsstücks mit Markierung CD8⁺ T-Zellen
- Abbildung 17: Histogramm zum Abstand der CD8⁺ T-Zellen zu ihren nahegelegensten CD8⁺ Nachbarzellen
- Abbildung 18: 3D-Immunfluoreszenzaufnahme eines AT3-Brusttumorsstücks mit Doppelfärbung von CD8⁺ (Alexa 647 Sekundärantikörper) und CD4⁺ T-Zellen (Cy3 Sekundärantikörper) (Färbung 1)

Abbildung 19: 3D-Immunfluoreszenzaufnahme eines AT3-Brusttumorsstücks mit Doppelfärbung von CD8⁺ (Alexa 647 Sekundärantikörper) und CD4⁺ T-Zellen (Alexa 750 Sekundärantikörper) (Färbung 2)

Abbildung 20: 3D-Immunfluoreszenzaufnahmen von AT3-Brusttumorsstücken aus der Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppe Minoxidil mit Doppelfärbung CD8⁺ und CD4⁺ Zellen

Abbildung 21: 3D-Immunfluoreszenzaufnahme von AT3-Brusttumorsstücken aus der Behandlungsgruppe BMS und der Behandlungsgruppe BMS+Minoxidil mit Doppelfärbung CD8⁺ und CD4⁺ Zellen

Abbildung 22: Unterschiedliche Bearbeitungen der 3D Immunfluoreszenzaufnahme von Versuch 1

Abbildung 23: Bearbeitung einer 3D-Immunfluoreszenzaufnahme vor Spot-Rekonstruktion am Beispiel der Aufnahme mit CD8-Markierung aus Versuch 8

Abbildung 24: Einfluss des Diameter of Largest Sphere auf die Spot-Rekonstruktion am Beispiel der 3D-Immunfluoreszenzaufnahme mit CD8-Markierung aus Versuch 8

Abbildung 25: Kombination unterschiedlicher Filter zur Spot-Rekonstruktion am Beispiel der 3D-Immunfluoreszenzaufnahme mit CD8-Markierung von Versuch 8

Abbildung 27: 3D-Immunfluoreszenzaufnahmen eines AT3-Brusttumorsstücks mit Markierung CD8-positiver Strukturen unter Verwendung unterschiedlicher Laserintensitäten

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Primärantikörper

Tabelle 2: Liste der verwendeten Sekundärantikörper

Tabelle 3: Liste der verwendeten Reagenzien

Tabelle 4: Liste der verwendeten Puffer und Lösungen

Tabelle 5: Verwendete Geräte

Tabelle 6: Verwendete Softwareprogramme

Tabelle 7: Übersicht der vorgenommenen Modifikationen von Versuch 1 bis Versuch 5

Tabelle 8: Übersicht der vorgenommenen Modifikationen von Versuch 6 bis Versuch 10

Tabelle 9: Einstellungen in Imaris bei der Surface Creation
(Oberflächenerstellung)

Tabelle 10: Einstellungen in Imaris bei der Rekonstruktion der Immunzellen

Tabelle 11: Übersicht der getesteten Einstellungsparameter in Bezug auf
Abbildung 22

Tabelle 12: Übersicht der Preise einiger verwendeter Primärantikörper

IV Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Erik Henke für die hervorragende Betreuung. Vielen Dank für die vielen hilfreichen Ratschläge und die fachliche und persönliche Unterstützung.

Ich danke Frau Prof. Dr. Alma Zerneck-Madsen für die Überlassung des Promotionsthemas und die freundliche Übernahme der Zweitkorrektur.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Herrn Prof. Dr. med. Süleyman Ergün für die Möglichkeit, in seinem Institut für Anatomie und Zellbiologie promovieren zu dürfen.

Ein großes Dankeschön geht an meine Mit-Doktoranden für das tolle Miteinander und den gegenseitigen Austausch. Besonders zu erwähnen sind an dieser Stelle David Ascheid für die geduldige Unterstützung beim Anfertigen der 3D-Aufnahmen und Theresa Ruf für die mehrfache Durchsicht dieser Arbeit und das gegenseitige Motivieren.

Besonderer Dank gilt meinem Freund, der mir den nötigen Rückhalt gab, immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatte und es schaffte, mich immer wieder neu zu motivieren.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir das Zahnmedizinstudium überhaupt erst ermöglichten und mir auch während der Anfertigung dieser Arbeit immerzu unterstützend und liebevoll zur Seite standen.

V Eigene Veröffentlichung

Helene Hoffmann, Martin Wartenberg, Sandra Vorlova, Franziska Karl-Schöller, Matthias Kallius, Oliver Reinhardt, Asli Öztürk, **Leah S Schuhmair**, Verena Burkhardt, Sabine Gätzner, Daniela Scheld, Rajender Nandigama, Alma Zernecke, Sabine Herterich, Süleyman Ergün, Andreas Rosenwald, Erik Henke. Normalization of Snai1-mediated vessel dysfunction increases drug response in cancer. *Oncogene* (2024). <https://doi.org/10.1038/s41388-024-03113-1>