

Aus der
Universitätsklinik für Urologie Tübingen

**Expression von B7-H3 (CD276) auf Blasentumorlinien, in
pathologisch verändertem
Blasengewebe und im Vergleich somatischen Urothelzellen
und zu gesundem Gewebe**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Korn, Matthias

2021

Dekan:	Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter	Professor Dr. W.K. Aicher
2. Berichterstatter	Professor Dr. A. Hartkopf

Tag der Disputatio: 09.10.2019

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VI
1.1 Klinischer Hintergrund und Pathologie des Blasenkrebs.....	7
1.2 Die Rolle von CD276 alias B7-H3 in der Physiologie und Pathologie.....	8
1.3 ALDH-1, ein Marker für Tumorstammzellen	12
1.4 MMP2 und MMP9 und Tumoren	14
1.5 Diskussion der Methodenauswahl	15
2 Zielsetzung	16
3 Material und Methoden	17
3.1 Gewebeaufarbeitung aus humanem Harnleiter.....	22
3.2 Zellkultur und Medien.....	23
3.3 Zellzahlbestimmung.....	24
3.4 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Biorad Protein Assay.....	26
3.5 Effektivitätsbestimmung der ALDH1-Primer	27
3.6 Populationsverdopplungsgeschwindigkeit.....	28
3.7 Immunfluoreszenzfärbung.....	28
3.8 Analyse von CD276 auf Proteinebene mittels Western Blot.....	30
3.8.1 Vorbereitung der Zellen für den Western Blot.....	31
3.8.2 Proteintrennung im Gel und Übertragen der Proteine	31
3.8.3 Strippen der Membran.....	32
3.9 Bestimmung des Transkriptionslevels mittels RT-PCR.....	35
3.9.1 RNA Extraktion	35
3.9.2 RNA Konzentration	36
3.9.3 cDNA Synthese	36
3.9.4 Quantitative RT-PCR	36
3.10 Bestimmung von CD276 mittels Protein-Microarray von Gewebeschnitten	40
3.11 Durchflusszytometrie FACS	41
4 Versuche zur Etablierung der Methoden	43
4.1 Kulturbedingung der Tumorlinien	43
4.2 Immunfluoreszenz.....	45

4.3	Etablierung neuer Kulturflaschen.....	45
4.4	Bestimmung der Effektivität der ALDH1 Primer.....	47
4.5	Bestimmung der Effektivität der MMP2 und MMP9 Primer.....	47
5	Ergebnisse.....	48
5.1	Proliferationsrate.....	48
5.2	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	49
5.3	Immunfluoreszenzfärbung.....	50
5.4	Zellmorphologie der Tumorklinien.....	53
5.5	Western Blot.....	54
5.6	RT-PCR Ergebnisse für CD276.....	60
5.7	RT-PCR Ergebnisse für ALDH1-A1,-A2 und -A3.....	67
5.8	RT-PCR Ergebnisse von MMP-2 und MMP-9.....	70
5.9	Durchflusszytometrie Expression von CD276 auf der Zelloberfläche.....	73
5.10	RT-PCR von T24 Zellen nach Expansion in McCoy's 5A Medium.....	76
5.11	CD276 Nachweis mittels histologischem Microarray.....	77
5.11.1	Statistische Auswertung der Daten der histologischen Microarray's.....	80
6	Diskussion.....	83
6.1	CD276 Expression und Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors.....	83
6.2	Immunfluoreszenz.....	84
6.3	Morphologie der Zellen.....	85
6.4	Vergleich CD276 auf Proteinebene mit Transkriptionslevel.....	86
6.5	Vergleich CD276 Expressionslevel mit ALDH1 und MMP.....	89
6.6	Expression von MMP2 und MMP9.....	91
6.7	FACS Analyse.....	91
6.8	Vergleich CD276 Expression mittels histologischem Microarray.....	92
7	Zusammenfassung.....	94
8	Danksagung.....	96
9	Literaturverzeichnis.....	97

Abbildungsverzeichnis

Abb.1:aus https://de.wikipedia.org/wiki/Blasenkrebs#/media/File:TNM_Blasenkrebs.svg g 05.01.2018	8
Abb.2:aus http://www.cell.com/cancer-cell/abstract/S1535-6108(17)30101-0	11
Abb.3:aus http://clincancerres.aacrjournals.org/content/clincanres/22/14/3425/F1.large.jpg	11
Abbildung 4: Yun Su et al. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2010; 19:327-337	13
Abbildung 5: Zusammenhang der Expression von MMP2 und MMP9 bei der Metastasierung von Tumoren.	14
Abbildung 6: Layout der Effektivitätsbestimmung von ALDH1A1, ALDH1A2 und ALDH1A3	27
Abbildung 7: A) HT1197 in KC-Standard nach 3 Tagen B) HT1197 in KC-Standard nach 11 Tagen C) HT1197 in MEM nach 14 Tagen	43
Abbildung 8: A) Cal29 mit Antigen Retrieval B) Cal29 ohne Antigen Retrieval	45
Abbildung 9: Duplikationsraten der Tumorzellen. Die Zellen wurden in MEM Earle's Medium kultiviert.	48
Abbildung 10: Standardkurve des Bradford Assays für die Proteinkonzentration von CD276	49
Abbildung 11:A) Cal29 CD276 mit dem 1. + 2. Antikörper B) Cal29 CD276 nur mit dem 2. Antikörper.....	50
Abbildung 12:A) HT1197 CD276 mit dem 1. + 2. Antikörper B) HT1197 CD276 nur mit dem 2. Antikörper	51
Abbildung 13:A) T24 CD276 mit dem 1. + 2. Antikörper B) T24 CD276 nur mit dem 2. Antikörper.....	51
Abbildung 14: Kontrolle mit Harnleiter HL 17/17 mit dem 1. + 2. Antikörper gegen CD276.....	51
Abbildung 15: A) Zellmorphologie der Tumورlinie 5637 B) Zellmorphologie der Tumорlinie Cal29 C) Zellmorphologie der Tumорlinie RT4.....	53
Abbildung 16: Exemplarische Darstellung der genauen Auswertung A) der Intensitäten von CD276 B) zum anderen die Intensität von β -Aktin. Die schwarzen Pixel innerhalb der Boxen, wurden dabei mithilfe des Programmes Image Studio™ Lite ausgewertet.	55
Abbildung 17: Western Blot Membranen von Zelllysaten von Tumorzellen und Urothelzellen als Kontrolllinien. A) Membran für die Detektion von CD276 B) Zeigt im Vergleich die Menge von β -Aktin das in den jeweiligen Proben enthalten ist.....	55
Abbildung 18: Normalisierte Proteinexpression von CD276 nach Western Blot in den Tumorzellen T24, Cal29 und HT1197, sowie der somatischen Urothelzelle HL17/5 und der Tumorzelle HL17/21aus eigener Isolation gegenüber β -Aktin.	56
Abbildung 19: Western Blot Membranen von Zelllysaten von Tumorzellen und Urothelzellen als Kontrolllinien. A) Membran für die Detektion von CD276 B) Zeigt im Vergleich die Menge von β -Aktin das in den jeweiligen Proben enthalten ist.....	57

Abbildung 20: Normalisierte Proteinexpression von CD276 mittels Western Blot in den Tumorzellen UC1, 5637, 253BJV, J82 und RT112, sowie den somatischen Urothelzellen HL17/7 und HL17/10 im Vergleich zu β -Aktin.....	57
Abbildung 21: Western Blot Membranen von Zelllysaten von Tumorzellen und Urothelzellen als Kontrolllinien. A) Membran für die Detektion von CD276 B) Zeigt im Vergleich die Menge von β -Aktin das in den jeweiligen Proben enthalten ist.....	58
Abbildung 22: Normalisierte Proteinexpression von CD276 mittels Western Blot in den Tumorzellen UC3, SV1HUC1, T24 Kanada, 253J, RT4, TCC, RT4v6 und der somatischen Urothellinie HL17/24 im Vergleich zu β -Aktin.....	58
Abbildung 23: Übersicht über die Proteinexpression der Tumorlinien und somatischer Zellen dieser Dissertationsarbeit nach Western Blot Analyse.....	59
Abbildung 24: Gehalt der mRNA, bestimmt mittels RT-PCR von CD276 in den unterschiedlichen Zelllinien.....	60
Abbildung 25: Zeigt exemplarisch die Verläufe der RT-PCR in Bezug auf die Fluoreszenz und damit die Amplifizierung von CD276 und deren Intensität in Prozent.....	62
Abbildung 26: Zeigt die Schmelzkurven der einzelnen in Abbildung 25 dargestellten Proben während der ersten RT-PCR.....	63
Abbildung 27: Gehalt der mRNA, bestimmt mittels RT-PCR von CD276 in den unterschiedlichen Zelllinien.....	64
Abbildung 28: Gehalt der mRNA, bestimmt mittels RT-PCR von CD276 in den unterschiedlichen Zelllinien.....	64
Abbildung 29: Übersicht der m-RNA-Expression der kontrollierten Zelllinien nach RT-PCR Analyse der Abbildung 24Abbildung 28 im Vergleich zueinander.....	65
Abbildung 30: Zeigt die Konzentration von ALDH1-A1 auf mRNA-Ebene in den unterschiedlichen Zelllinien.....	67
Abbildung 31: Zeigt die Konzentration von ALDH1-A2 auf mRNA-Ebene in den unterschiedlichen Zelllinien.....	68
Abbildung 32: Zeigt die Konzentration von ALDH1-A3 auf mRNA-Ebene in den unterschiedlichen Zelllinien.....	69
Abbildung 33: Zeigt den Gehalt von MMP2 in den einzelnen, untersuchten Zelllinien mittels RT-PCR im LightCycler®.....	70
Abbildung 34: Zeigt den Gehalt von MMP9 in den einzelnen, untersuchten Zelllinien mittels RT-PCR im LightCycler®.....	71
Abbildung 35: Vergleich der Expression von CD276 auf mRNA-Ebene zwischen T24 in MEM-Medium und T24 in Mc Coy's 5A Medium.....	76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.....	17
Tabelle 2: Geräte.....	18
Tabelle 3: Reagenzien.....	19
Tabelle 4: Gefäße.....	20
Tabelle 5: Antikörper.....	20
Tabelle 6: Tumorlinien.....	21
Tabelle 7: Verdünnungsreihe Proteinbestimmung.....	26

Tabelle 8: Antikörper die für den Western Blot verwendet wurden	34
Tabelle 9: Primär-, und Sekundärantikörper und deren Verdünnung für den Western Blot	34
Tabelle 10: Parameter der qRT-PCR	37
Tabelle 11: Reagenzien in den einzelnen Wells.....	38
Tabelle: 12 Primer mit Sequenz und Hersteller.....	38
Tabelle 13: Schmelztemperatur und Effektivität der für die qRT-PCR benutzten Primer	39
Tabelle 14: Primer für RT-PCR	39
Tabelle 15: Effektivität der ALDH1 Primer.....	47
Tabelle 16: Effektivität der MMP2 und MMP9 Primer.....	47
Tabelle 17: Konzentrationsbestimmung von CD276 mittels Bradford Assay	49

Abkürzungsverzeichnis

TNM-Klassifikation	Tumor, Nodus, Metastasen-Klassifikation
TUR-B	Transurethrale Blasenresektion
NBI	Narrow-Band-Imaging
Ig	Immunglobulin
CD	Cluster of Differentiation
ADC's	Antibody-Drug-Conjugater
MMAE	Monomethyl Auristatin E
PBD	Pyrrlobenzodiazepine
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
qPCR	Real-time quantitative Polymerase-Kettenreaktion
MEM	Minimum Essential Medium
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
FCS	Fetal Calf Serum
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HEPES	Hydroxyethyl Piperazineethanesulfonsäure
KC-Std.	Keratinocyten Standardmedium
HL	Somatische Harnleiterzellen
EGF	Epidermal growth Factor
Pen./Strep.	Penicillin/Streptomycin
NEA	Nicht Essentielle Aminosäuren
DMSO	Dimethylsulfoxid
PBS	Phosphate-buffered Saline
HRP	Horse Redish Peroxidase
BSA	Bovines Serum Albumin
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay
JC-1	5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'- Tetraethylbenzimidazolcarbocyanin Iodid
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
SDS-PAGE	Sodium Dodecylsulphate Polyacrylamid Gel Electrophoresis
PMSF	Phenylmetysulfonyl Fluoride
TEMED	Tetra Methylene Diamine
cDNA	Complementary DNA
Depc. Wasser	Diethylcarbonat Wasser
dNTP	Desoxyribonukleosid-triphosphat
Taq	Thermus Aquaticus
GAPDH	Glycerinaldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
PPIA	Peptidylprolyl Isomerase A
mAbs	Monoklonale Antikörper
CSC	Cancer Stem Cells
ALDH-1	Aldehyd-Dehydrogenasen-1
PTM	Posttranslationale Modifikation
EZM	Extrazelluläre-Matrix

1.1 Klinischer Hintergrund und Pathologie des Blasenkrebs

Bei dem Harnblasenkarzinom handelt es sich um eine der häufigsten malignen Tumorerkrankungen weltweit. In Deutschland erkranken jährlich über 25.000 Menschen an Harnblasenkrebs, wobei Männer mehr als doppelt so häufig betroffen sind wie Frauen (Parkin, Bray et al. 2001). Das Harnblasenkarzinom ist eher eine Erkrankung des hohen Alters. So liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 69 Jahren für Männer und 73,4 Jahre für Frauen (Micheli, Mariotto et al. 1998, Coleman, Babb et al. 2001).

Etwa 95 % der Blasentumore gehen vom Urothel aus. Hierbei wird zwischen einem papillären und einem soliden Tumorwachstum unterschieden (Vogelzang and Raghaven 1990, Riede and Adler 1995). Eine weitere Variante des Blasenkarzinoms stellen die Plattenepithelkarzinome da, die eine Tumorentität von 3-6% aufweisen (Sen, Malek et al. 1985). Die letzte Form der Harnblasenkarzinome stellen die Adenokarzinome mit einer Häufigkeit von 0,2-2% dar (Jakse, Jacobi et al. 1979, Anderstrom, Johansson et al. 1983). Zur Klassifikation der Harnblasentumore wird sowohl die Tumor-Nodus-Metastasen-Klassifikation (TNM-Klassifikation), als auch ein histopathologisches Grading herangezogen. Hierzu dient das histopathologische Grading der Einteilung der Tumore in sog. Low-grade und High-grade-Tumoren. Um eine frühzeitige Diagnose zu stellen, ist eine vorherige und ausführliche Anamnese von großer Bedeutung. Diese dient dazu, mögliche Risikofaktoren und Exposition mit kanzerogenen Stoffen, z.B. Rauchen oder berufliche Exposition von festzustellen.

Zu den standardmäßigen diagnostischen Verfahren gehört eine Zystoskopie, die mit einer Sensitivität von >90% Tumoren der Harnblase detektiert (Sharma, Zippe et al. 1999). Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist neben der Tumordetektion auch, dass die Diagnose histopathologisch gesichert wird. Eine weniger invasive Methode zur Diagnose eines Blasenkarzinoms stellt die Urinzytologie dar. Diese kann sowohl mit Spontanurin, als auch mit einer Spülzytologie durchgeführt werden. Die Sensitivität dieses diagnostisches Mittels beträgt weniger als 40% bei Urotheltumoren des Grades G1- (Wiener, Vooijs et al. 1993, Murphy, Rynard et al. 1994), 75–80% für den G2- und 85–95% für den G3-Tumor (Rubben, Lutzeyer et al. 1979, Koss, Deitch et al. 1985, Gregoire, Fradet et al. 1997). Das Therapieziel ist immer ein tumorfreies Überleben, mit zusätzlichem Erhalt einer funktionsfähigen Harnblase. Bei der Wahl der Therapie unterscheidet man zwischen nicht-muskelinvasiven Tumoren und muskelinvasiven Tumoren. Die Therapie der Wahl bei nicht-

muskelinvasiven Tumoren ist hierbei eine transurethrale Resektion (TUR-B) des Tumors. Um im Anschluss an diese Operation einem erneuten Tumorwachstum zuvor zukommen, wird nach zwei bis sechs Wochen eine Nachresektion durchgeführt.

Neuere Operationstechniken die mit Fluoreszenzzystoskopie oder dem Narrow-Band Imaging (NBI) arbeiten, erlauben es, Tumore in der Harnblase besser vom gesunden Gewebe zu differenzieren und somit zuverlässiger zu resezieren. Dem folgend kann eine lokale Chemotherapie oder eine Therapie mit dem abgeschwächten Lebendimpfstoff Bacillus Calmette-Guérin durchgeführt werden. Handelt es sich jedoch um muskelinvasiven Tumor reicht eine TUR-B nicht aus. Die Therapie der Wahl ist nun eine radikale Zystektomie mit einer Entfernung der Beckenlymphknoten. Bei Männern wird zusätzlich die Prostata sowie

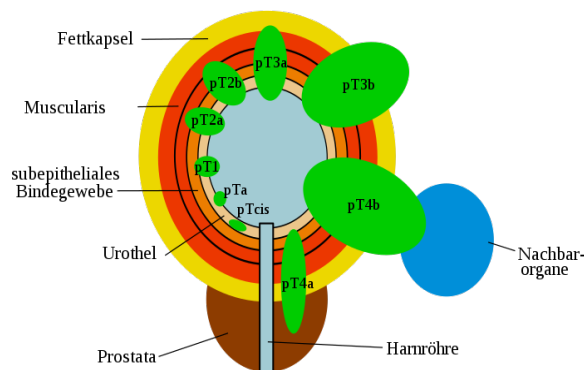


Abb.1:aus

https://de.wikipedia.org/wiki/Blasenkrebs#/media/File:TNM_Blasenkrebs.svg 05.01.2018

die Samenblasen entfernt. Bei Frauen werden die Gebärmutter, die Eierstöcke, die Eileiter und ein Teil der Scheidenwand entfernt. Handelt es sich um einen fortgeschrittenen Tumor (Stadien pT3 und 4) kann eine Chemotherapie vor und nach der Operation ins Therapieschema mit aufgenommen werden, um den Behandlungserfolg zu verbessern und einer möglichen Bildung von Metastasen entgegenzuwirken. Die 5-Jahres-Überlebensrate für Patienten mit muskelinvasivem Harnblasenkarzinom pT2 beträgt im Rahmen bisheriger Studien über 89% (Kulkarni and Miller 2003, Taylor 3rd and Kuchel 2009, Fukuta, Masumori et al. 2011, Stenzl, Penkoff et al. 2011) bei Patienten mit einem pT3a nahezu 79% ohne Befall von Lymphknoten und dem Fehlen von Fernmetastasen.

1.2 Die Rolle von CD276 alias B7-H3 in der Physiologie und Pathologie

CD 276 gehört zur Superfamilie der Immunglobuline. Man findet B7 Proteine auf antigenpräsentierenden Zellen, wo sie wichtig für die Costimulation von T-Zellen sind und eine wichtige Rolle für die Proliferation, Toleranz und Aktivierung von T-Zellen spielen. B7-H3 gehört zu einer Unterfamilie die sowohl

an der Costimulation, als auch an der Inhibition von T-Zellen beteiligt sind (Zang and Allison 2007).

B7-H3 ist ein Typ-I Transmembranprotein, bei welchem 20-27% der Aminosäuren mit anderen Vertretern der B7 Familie übereinstimmen (Chapoval, Ni et al. 2001). Das B7-H3 der Maus besteht aus einer einzelnen, extrazellulären, variablen IgV-IgC Domain und einer intrazellulären Domain (2 Ig B7-H3). Das menschliche B7-H3 besitzt eine zusätzliche Isoform, 4Ig B7-H3, welche eine nahezu exakte Tandemduplikation der IgV-IgC Domain beinhaltet (Steinberger, Majdic et al. 2004). Der Rezeptor von B7-H3 ist beim Menschen bis jetzt jedoch noch unbekannt, weshalb die Rolle von B7-H3 im adaptiven Immunsystem immer noch nicht umfassend aufgeklärt ist (Loos, Hedderich et al. 2010).

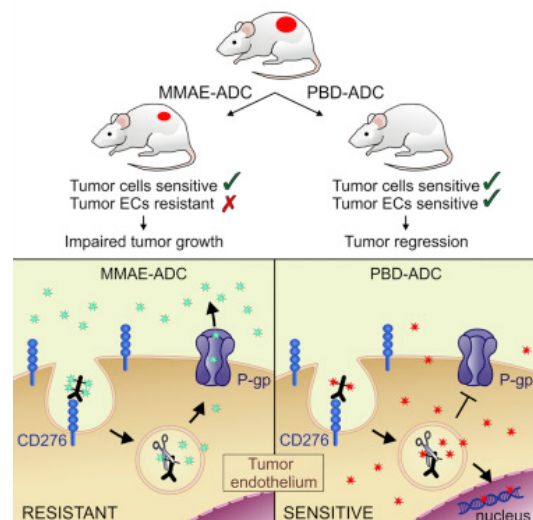
Dagegen wurde auf myeloiden Zellen der Maus der TLT-2 genannte Rezeptor als B7-H3 Rezeptor diskutiert wurde (Hashiguchi, Kobori et al. 2008). Um jedoch die Rolle von B7-H3 und seinen Pathway in der Immunantwort besser zu verstehen, ist es wichtig den Rezeptor im humanen System zu identifizieren.

Auch der genaue Signalweg der Regulation von B7-H3 ist noch nicht bekannt, jedoch wurde beobachtet, dass die 3'UTR dieser Transkription eine Zielstelle für die microRNA, miR29 beinhaltet. In vielen Zellen wurde auch eine umgekehrte Korrelation zwischen dem Level der Expression von B7-H3 und dem Level von miR29 beschrieben. Dies legt nahe, dass die Proteinexpression von B7-H3 durch miR29 reguliert wird (Xu, Cheung et al. 2009).

B7-H3 wird auf einer Vielzahl von Tumorarten exprimiert, so auch bei Urothelkarzinomen (Boorjian, Sheinin et al. 2008), jedoch nicht oder nur sehr gering in den meisten gesunden Zellen und Geweben (Nygren, Tekle et al. 2011). Nicht nur das Tumorgewebe selber zeigt eine erhöhte Expression von CD276 auf seiner Oberfläche, sondern auch die während des Tumorwachstums entstehenden Blutgefäße. Hingegen zeigt sich während der physiologischen Angiogenese keine erhöhte Expression von CD276 (Picarda, Ohaegbulam et al. 2016). Auch auf Blutgefäßen des normalen Ovars ist die Expression nicht erhöht (Seaman, Zhu et al. 2017). Die exakte Funktion von B7-H3 bleibt jedoch noch ungewiss, obwohl sowohl stimulierende als inhibierende Effekte auf die T-Zellimmunität beobachtet wurden (Chen, Mo et al. 2017). Es wird vermutet, dass die Expression von B7-H3 auf den Tumorzellen im Zusammenhang mit der Migration, Invasion, der Metastasierung der Tumorzellen und schließlich mit der Prognose des Krankheitsverlaufes in Zusammenhang steht (Roth, Sheinin et al. 2007, T. Roth 2007, Stephen A. Boorjian 2008, H. Yuan 2011). In darauf aufbauende Studien wurde jedoch mit Hilfe von Knockout-Mäusen bewiesen,

dass die erhöhte Expression nicht unbedingt im Zusammenhang mit der Entstehung von Tumoren und deren Wachstum steht. (Seaman, Zhu et al. 2017). Es wurde hingegen beobachtet, dass die Überexpression von B7-H3 in einigen Tumoren mit einem schlechteren klinischen Heilungsverlauf korreliert (T. Roth 2007, S. Boorjian 2008). Eine Studie aus dem Jahr 2017 versuchte aus der erhöhten Expression von CD276 einen therapeutischen Nutzen zu ziehen und mit Hilfe von zwei verschiedenen antibody-drug conjugates (ADC's) gezielt sowohl den Tumor selbst, als auch die Blutgefäße des Tumors anzugreifen. Die Untersuchungen hierzu wurden an Mäusen durchgeführt. In dieser Studie wurden 14 verschiedene Arten von soliden menschlichen Tumoren untersucht und mindestens 50% jeder Tumorart waren dabei positiv auf die Expression von CD276. Was einen potentiell hohen Nutzen für eine Vielzahl von verschiedenen Tumorpatienten darstellen könnte.

Bei diesen ADC's handelte es sich zum einen um MMAE-linked-anti-CD276 ADC und m276-PBD-Anti-CD276 ADC. Bei MMAE handelt es sich um Monomethyl Auristatin E, welches ein antineoplastisches Medikament ist, das seine Wirkung erst zusammen mit einem Antikörper entwickelt. PBD steht für Pyrrolobenzodiazepine und ist eine natürliche Substanz die in der Lage ist,



DNA zu alkylieren und damit das Wachstum der Tumorzellen zu

Abb.2:aus [http://www.cell.com/cancer-cell/abstract/S1535-6108\(17\)30101-0](http://www.cell.com/cancer-cell/abstract/S1535-6108(17)30101-0)

unterbinden. Diese Studie zeigte, dass der MMAE ADC in der Lage ist die Tumorzellen direkt zu töten, dass jedoch das Tumorendothel intrinsisch resistent gegen diesen ADC ist. Ein therapeutisches höheres Potential zeigte hingegen der PBD ADC (siehe Abb.2). Dieser war in der Lage nicht nur die Tumorzellen an sich zu töten, sondern darüber hinaus auch die Blutgefäße des Tumors (Seaman, Zhu et al. 2017). Ein Problem an diesem Therapieansatz ist jedoch, dass auch gesundes Gewebe eine Expression von CD276 zeigte und so eine mögliche toxische Wirkung entstehen könnte (Modak, Kramer et al. 2001, Seaman, Stevens et al. 2007, Loo, Alderson et al. 2012).

Ein weiteres therapeutisches Mittel würde auch die Entwicklung von monoklonalen Antikörpern (mAb's) darstellen. Diese würden dann z.B. die Bindungsstelle, mit der B7-H3 an den Rezeptor auf anderen Zellen bindet blockieren und so eine Weiterleitung des Signals blockieren (siehe Abb.3). Hierfür wäre es jedoch nötig den Rezeptor von B7-H3 zu identifizieren.

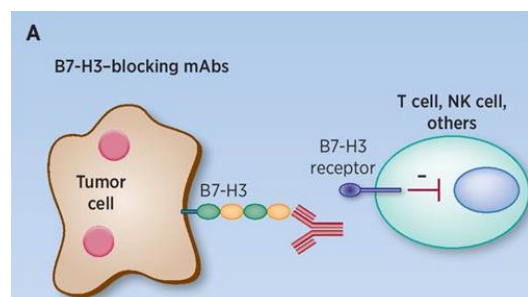


Abb.3:aus <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/clincanres/22/14/3425/F1.large.jpg>

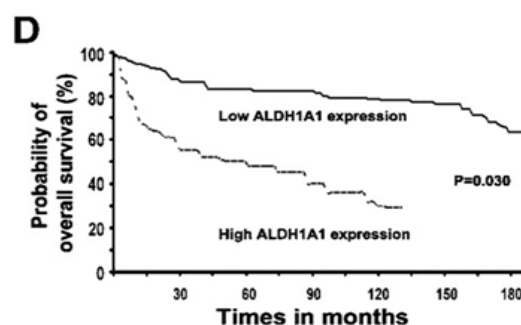
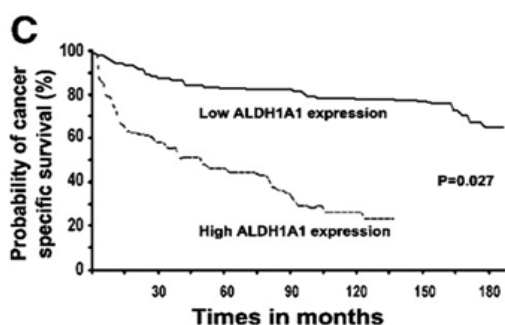
1.3 ALDH-1, ein Marker für Tumorstammzellen

Übereinstimmende Ergebnisse haben gezeigt, dass es innerhalb eines Tumors eine Population von tumorpromotenden Zellen oder Tumor-Stammzellen (CSC) gibt, die für die Entwicklung und für ein mögliches Rezidiv verantwortlich sind (Jordan, Guzman et al. 2006). Wenngleich sie nur in einer kleinen Population im Tumor vorhanden sind, können sich die CSC's selbsterneuern und sie modifizieren die Tumorzellen so, dass sie mit dem Phänotyp des Ursprunggewebes übereinstimmen und fördern die ständige Proliferation und Expansion von neuen malignen Zellen (Jordan, Guzman et al. 2006).

Auch das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren könnte durch die CSC's begünstigt werden, womit sie auch für die Aggressivität des Tumors verantwortlich wären (Chan, Espinosa et al. 2009).

Die Erforschung der molekularen Veränderungen der CSC's, würde das Verständnis der Biologie und Entstehung von urothelialen Tumoren deutlich verbessern. Des Weiteren könnten diese molekularen Veränderungen zum Einen dazu dienen, neue diagnostische Mittel zur Überwachung der Entwicklung des Tumors zu etablieren und gleichzeitig ein Rezidiv zu vermeiden und unter Umständen sogar den Auslöser für die Entstehung des Tumors zu heilen (She, Zhang et al. 2008).

Hierbei spielt die Aldehyd-Dehydrogenasen-1 eine wichtige Rolle. ALDH-1 ist dabei wichtig für die Biosynthese von Retinsäure (Yanagawa, Chen et al. 1995). Der alternative Metabolismus von Retinal zu Retinsäure scheint eine wichtige Rolle in der Biologie von Stammzellen zu spielen (Elizondo, Corchero et al. 2000, Chute, Muramoto et al. 2006). ALDH-1 ist ein Marker für menschliche Brustdrüsenstammzellen und gleichzeitig ein Vorhersagewert für einen schlechten klinischen Verlauf (Abbildung 4) von Patienten mit Brustkrebs (Ginestier, Hur et al. 2007).



Eine Studie aus dem Jahr 2010 zeigt, dass ALDH-1A1⁺ Blasenkrebszellen gehäuft in CSC's und stammzellähnlichen Tumorzellen der Blase vorkommen. Darüber hinaus zeigten die ALDH1A1⁺ Tumorzellen, nachdem die Expression von ALDH1A1 minimiert wurde, ein geringeres tumoröses Potenzial im Vergleich zu ALDH1A1⁻ Tumorzellen (Su, Qiu et al. 2010).

Abbildung 4: Yun Su et al. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2010; 19:327-337

Was darauf schließen lässt, dass dieses Molekül direkt für das Zellwachstum von Tumorzellen und deren kanzerogene Wirkung verantwortlich ist (Su, Qiu et al. 2010).

1.4 MMP2 und MMP9 und Tumoren

MMP2 und MMP9 sind Enzyme, die zu der Familie der Matrix-Metalloproteasen gehören. Hierbei ist MMP2 auch unter dem Namen Gelatinase-A und MMP9 unter dem Namen Gelatinase-B bekannt.

Die Aufgaben dieser Matrix-Metalloproteasen unter physiologischen Bedingungen bestehen darin, die extrazelluläre Matrix abzubauen. Dies geschieht zum Beispiel bei der embryonalen Entwicklung, bei Angiogenese, Zellmigration und Wundheilung. Darüber hinaus spielen sie eine wichtige Rolle unter pathologischen Veränderungen. Dazu gehören beispielsweise Arthritis, intrazerebrale Blutungen und auch die Metastasierung von Tumoren (Visse and Nagase 2003).

Für diese Studie ist die Beziehung von MMP2 und MMP9 und der Metastasierung von Tumoren wichtig und darüber hinaus die Korrelation der Expression der Gelatinasen und der von CD276 (Kumar, Koul et al. 2010). Dabei ist möglicherweise ihre Rolle bei der Auflösung der extrazellulären Matrix (EZM) ein entscheidender Schritt bei der fortschreitenden Entwicklung des Tumors. Der Abbau der EZM erlaubt es den Tumorzellen, aus dem Primärtumor zu migrieren und Metastasen zu bilden. Die Tumorzellen profitieren hier von der Fähigkeit von MMP2 und MMP9, Kollagen Typ IV abzubauen, welches der Hauptbestandteil der Basalmembran ist. Die Basalmembran ist für die Organisation des Gewebes von entscheidender Rolle, da sie den Zellen strukturellen Zusammenhalt bietet und bei der Übertragung von Signalen zum Tragen kommt. Die Degeneration dieser Membran ist ein entscheidender Schritt bei der Metastasierung einer Vielzahl von Tumoren (Mook, Frederiks et al. 2004). Erst durch die Auflösung der EZM sind sie in der Lage effektiv Metastasen zu bilden und sich im Körper an neuen Orten anzusiedeln.

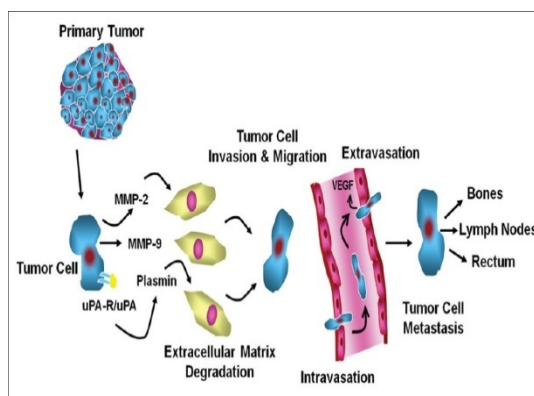


Abbildung 5: Zusammenhang der Expression von MMP2 und MMP9 bei der Metastasierung von Tumoren.

<http://www.carcinogenesis.com/article.asp?issn=1477-3163;year=2012;volume=11;issue=1;spage=4;epage=4;aulast=Dasgupta>

1.5 Diskussion der Methodenauswahl

Bei der Auswahl der Methoden sind wir so vorgegangen, dass wir unterschiedliche Aspekte der Expression von CD276 in Tumorzellen und in Urothelzellen aus *prima vista* nicht pathologisch veränderten Regionen untersucht haben.

Die erste Ebene der Genexpression findet dabei auf mRNA-Ebene statt, wobei die DNA in die entsprechende mRNA umgeschrieben wird und anschließend hieraus ein Protein gebildet werden kann. Diesen ersten Schritt untersuchten wir mit der Hilfe der RT-PCR, die uns Auskunft über die mRNA Menge des zu untersuchenden Faktors lieferte.

Der nächste Schritt war nun die Expression von CD276 auf Proteinebene zu bestimmen. Dafür führten wir für die Tumorklinien und die somatischen Zellen Western Blots durch, die zusammen mit der Bestimmung von β -Aktin einen prozentuellen Anteil von CD276 in den Zellen lieferten.

Der letzte und für die Klinik sicherlich interessanteste Abschnitt war die Durchführung von histologischen Microarrays mit einer großen Anzahl von Patientenproben. Damit konnte man zum einen nachweisen, ob die Tumoren CD276 exprimierten und zum anderen, ob eine hohe oder niedrige Expression von CD276 Auswirkungen auf den klinischen Verlauf und die 5-Jahresüberlebenszeit haben.

2 Zielsetzung

Die pathologische Regulation von CD276 alias B7-H3 wurde schon in unterschiedlichen Formen von humanen Krebstypen nachgewiesen. Bei den in dieser Studie untersuchten Blasenkrebstypen wurde das Level der mRNA Expression von CD276, mithilfe von qRT-PCR bestimmt. Hierbei wurden Übergangsepitheltumoren mit physiologischem Übergangsepithel verglichen. Des Weiteren wurden immunhistochemische Analysen durchgeführt, um die Proteinexpression von CD276 in Übergangsepithel Tumoren und physiologischem Übergangsepithel zu vergleichen (Li and Harris 2007).

Diese Studie deutete darauf hin, dass das Level der CD276 mRNA Expression Übergangsepithel Tumoren im Vergleich zu physiologischem Übergangsepithel deutlich erhöht war. Darüber hinaus deuteten immunhistochemische Analysen darauf hin, dass die CD276 Protein Expression von Übergangsepithel Tumoren verglichen zu physiologischem Übergangsepithel signifikant hochreguliert war.

Daraus kann man ableiten, dass eine falsche Regulation von CD276 unter Umständen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Blasenkrebs darstellt (Wu, 2015).

In dieser Arbeit wollten wir nun überprüfen, ob die in den vorherigen Studien erbrachten Ergebnisse auf eine breite Masse von unterschiedlichen Arten von Urothelkarzinomen anzuwenden sind. Um dies zu überprüfen, testeten wir die verschiedenen Tumorlinien zum einen auf die Proteinexpression von CD276 im direkten Vergleich zu somatischen Zellen, die wir direkt aus der Universitätsklinik für Urologie Tübingen erhielten.

Des Weiteren versuchten wir mit Hilfe von qRT-PCR das Expressionsniveau der CD276 mRNA der Tumorzellen mit dem Expressionsniveau der CD276 mRNA in somatischen Zellen vergleich, um mögliche Unterschiede in der Expression nachzuweisen. Abschließend sollte eine Immunfluoreszenzfärbung als weiterer Nachweis von CD276 auf Urothelzellen dienen.

3 Material und Methoden

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Hersteller
HERAEUS Multifuge 3SR+	Thermo Scientific
Primovert	Carl Zeiss Microscopy GmbH
HERACELL 240i CO2 Incubator	Thermo Scientific
Vortexer Heidolph REAX top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Multipette M4	Eppendorf
Eppendorf Research plus 0.1 – 2.5 µL	Eppendorf
Eppendorf Research plus 0.5 – 10 µL	Eppendorf
Eppendorf Research plus 2 – 20 µL	Eppendorf
Eppendorf Research plus 10 – 100 µL	Eppendorf
Eppendorf Research plus 20 – 200 µL	Eppendorf
Eppendorf Research plus 100 – 1000 µL	Eppendorf
Eppendorf Research plus 1000 µL	Eppendorf
MS1 Minishaker	IKA
Powerpack P25	Biometra
Thermomixer comfort	Eppendorf
Mini Protean Tetra Cell	Bio Rad
MSC Advantage	Thermo Scientific
Sigma 3-30KS	Sigma
Light Cycler 480II	Roche
Centrifuge 5804	Eppendorf
Li-COR	C-Digit
LSM 800	Carl Zeiss Microscopy GmbH

Tabelle 2: Geräte

Gerät	Hersteller
Kern 770	Kern & Sohn GmbH
Centrifuge 5424	Eppendorf
Milenia Kinetic Analyzer	DPC
Axiophot	Zeis Microscopy GmbH
Neubauer Zählkammer, 0,100 mm Tiefe, 0,0025 mm ² , Neubauer Improved, Bright- Line	Assistent
-80°C-Tiefkühlschrank	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH
-20°C-Tiefkühlschrank	Liebherr Premium
Wasserbad W 12	Preiss Daimler
Axionvert 200M	Zeis Microscopy GmbH
Nano Photometer	Implen
Uno II	Biometra
RNeasy Mini Kit	Qiagen
BenchMark Ultra	Roche

Tabelle 3: Reagenzien

Reagenzien	Hersteller	
MEM Earle's Medium	Biochrom GmbH	
DMEM high glucose	Thermo Fisher Scientific	
MEM Non-Essential Amino Acid Solution	Sigma-Aldrich	
Keratinocyten Standardmedium	Gibco	
Fetal Bovine Serum	Gibco	
Supplements for Keratinocyte-SFM	Thermo Fisher Scientific	
Penicillin (1000 U/mL)/Streptomycin (1000 µg/mL)	Gibco	
Phosphate-buffered saline; -CaCl ₂ , - MgCl ₂	Gibco	
EDTA (1%); in PBS, -Ca ²⁺ , -Mg ²⁺	Biochrom AG	
TrypLE Express	Gibco	
Trypanblau (0,4%)	Lonza	
Transportmedium:	500ml Hank's Balanced Salt solution (0,35g/l NaHCO ₃ -; ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	Biochrom
	5ml HEPES (10mM)	Gibco
	1,3ml Aprotinin (20KIU/ml)	Calbiochem
	5ml Penicillin/Streptomycin (1%)	Gibco
Stripping-Lösung:	500ml Hank's Balanced Salt solution (0,35g/l NaHCO ₃ -; ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	Biochrom
	5ml HEPES (10mM)	Gibco
	1,3ml Aprotinin (20KIU/ml)	Calbiochem
	50ml EDTA (1%,w/v; ohne	Biochrom

Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	
Ampuwa	Fresenius
Phosphate-buffered saline; +CaCl ₂ , + MgCl ₂	Gibco
Phosphate-buffered saline;+ 0,1% Tween20	Gibco
4% Paraformaldehyd	Sigma
0,1% Triton X-100 solution	Sigma
Mounting-Medium	Sigma
Cell Conditioning 1 Reagenz	Roche
OptiView DAB IHC Detection Kit	Roche
Gamunex	Talecris Biotherapeutics

Tabelle 4: Gefäße

Gefäß	Hersteller
CellBind Surface 75 cm ² Cell Culture Flask	Corning
CellBind Surface Flat Bottom Multiple 96-Well Plate	Corning
CellBind Surface Flat Bottom Multiple 24-Well Plate	Corning
Falcon T75 Zellkulturflaschen	Corning
Lab-Tek II Chamber Slide RS Glass	Nalge Nunc International
TC Flask 175 cm ²	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 5: Antikörper

Antikörper	Klonnummer	Hersteller
Monoklonaler Maus anti-CD276 Antikörper	6A1 (ab105922)	Abcam
Polyklonaler Hasen Antikörper gegen β-Aktin	Ab8227	Abcam

Polyklonaler Antikörper/HRP	Ziegen	anti-Hasen	20034870	Dako
Polyklonaler Hasen anti-Maus Antikörper/HRP			P0260	Dako
Polyklonaler Hasen anti-CD276 Antikörper			Ab226256	Abcam
Polyklonaler Antikörper/CY™3	Ziegen	anti-Hasen	111-165-045	Jackson-Immuno-Research
PE anti-human CD276 Antikörper			MIH42	Bio Legend
PE Mouse IgG1			345816	Becton Dickinson

Tabelle 6: Tumorklinien

Tumorklinie	Tumorkart	Kultureigenschaften	Referenz
T24	Harnblasenkarzinom	adhärent	(O'Toole, Perlmann et al. 1972)
HT1197	Harnblasenkarzinom	adhärent	(Rasheed, Gardner et al. 1977)
Cal29	Harnblasenkarzinom	adhärent	(Cattan, Rochet et al. 2001)
253J	Harnblasenkarzinom	adhärent	(Park, Han et al. 2013)
RT4	Harnblasenkarzinom	adhärent	(O'Toole, Perlmann et al. 1972)

RT112	Harnblasenkarzinom	adhärent	(Marshall, Franks et al. 1977)
5637	Harnblasenkarzinom	adhärent	(Fogh 1978)
J82	Harnblasenkarzinom	adhärent	(O'Toole, Price et al. 1978)
253BJV	Harnblasenkarzinom	adhärent	(Tharakan, Inamoto et al. 2010)
RT4v6	Harnblasenkarzinom	adhärent	(Jinesh, Chunduru et al. 2012)
SV1HUC1	Harnblasenkarzinom	adhärent	SV40-IT Urothellinie
TCC SUP	Harnblasenkarzinom	adhärent	(Fogh 1978)
UC1	Harnblasenkarzinom	adhärent	(Lee, Ham et al. 2015)
UC3	Harnblasenkarzinom	adhärent	(Bellet, Lazar et al. 1997)
T24 Canada	Harnblasenkarzinom	adhärent	(O'Toole, Perlmann et al. 1972)

3.1 Gewebeaufarbeitung aus humanem Harnleiter

Die zur Aufarbeitung von somatischen Zellen benötigten Gewebestücke wurden steril und auf Eis in Transportmedium transportiert und gelagert. Zu Beginn der Präparation wurde das Gewebe in 5ml KC-Standard Medium in einer Petrischale aufgenommen.

Eventuelle Fettreste oder Gefäße wurden entfernt und das Material in ungefähr 2cm² große Stücke zerlegt. Die vorbereiteten Stücke wurden in 15 ml Strippinglösung gegeben und bei 37°C für 3 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Anschließend wurde das Gewebematerial mit 3 ml KC-Standard Medium in eine Petrischale überführt und mit Hilfe eines Zellschabers abgeschabt.

Nach erneutem spülen mit Medium wurde das gewonnene Zellmaterial in einem 15ml Gefäß ab zentrifugiert (200g, 5min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2,5ml Medium resuspendiert. Nach der Aussaat in T25 CellBIND Kultufaschen wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

3.2 Zellkultur und Medien

Medienherstellung

Zur Kultivierung der verschiedenen Zelltypen wurden verschiedene Medien verwendet. Die somatischen Zellen (HL) wurden in KC-Standard kultiviert. Die Herstellung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Dem Basismedium wurden die zwei Supplemente 2,5µg EGF Human Recombinant und 25mg Bovine Pituitary Extract hinzugefügt. Um die lichtsensitiven Bestandteile zu schützen wurde die Flasche mit Alufolie abgedeckt. Die Tumorzelllinie HT1197 wurde mittels supplementiertem MEM Medium kultiviert. Zu MEM mit Earle's Salzen wurden 10% FCS, 1% Pen./Strep. und 1% NEA hinzugefügt. Für die Tumorzelllinien T-24 und Cal-29 wurde DMEM mit 10% FCS, 1% Pen./Strep. und 1% NEA verwendet.

Alle Medien wurden im Kühlschrank bei 2-8 °C gelagert und vor Benutzung im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Zellen auftauen

Zum Auftauen von Zellen wurden diese aus dem Flüssigstickstofftank entnommen und auf Eis transportiert. Nachdem die Zellen bei 37°C im Wasserbad soweit aufgetaut waren, dass sie sich lösten, aber zum Großteil noch gefroren sind, wurden sie in zuvor vorbereitete 20 ml Medium überführt. Die Zellsuspension wurde nun für 5 Minuten bei 1200 rpm (keine Bremse) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet leicht aufgelockert und in 20 ml Medium resuspendiert.

Die Zellsuspension wurde in eine T75 CellBIND Zellkulturflasche gegeben und bei 37°C, 5% CO₂ in einem feuchten Klima gelagert. Am Folgetag wurden die Zellen mikroskopisch betrachtet. Abhängig von der Zahl der toten Zellen wurde entweder das komplette Medium gewechselt oder die Zellen wurden am Folgetag passagiert.

Das Arbeiten musste zügig erfolgen, um den toxischen Effekt des zum Einfrieren verwendeten DMSO's zu minimieren. Für die somatischen Zellen (HL) wurde KC-Standard als Medium verwendet. Die Tumorzelllinien Cal-29 und T-24 wurden in DMEM (10% FCS, Pen./Strep., NEA) kultiviert. Die Tumorzelllinie HT1197 wuchs in MEM Earle's Medium (10% FCS, Pen./Strep., NEA). Später stellten wir dann alle Tumorzelllinien auf das MEM Medium um, damit die Ergebnisse nicht durch das verwendete Medium beeinflusst wurden.

Der beim Absaugen entstandene Überstand, wurde in einer 3L Absaugflasche gesammelt und so mit Kohrsolin versetzt, dass eine 0.1% Lösung entstand.

Diese Lösung wurde für 24 h stehen gelassen, damit das Kohrsolin ausreichend Zeit hatte um einzuwirken.

Passagieren

Um ein optimales Umsetzen der Zellen zu ermöglichen sollten die Zellmonolayer ca. 70-80% konfluent sein. Um Urothelzellen zu passagieren wurde zunächst das Medium abgesaugt und 4 ml 0,1% EDTA in PBS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺) Lösung zugegeben. Nach einer Inkubation von 5-10 Minuten bei 37°C wurden die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet. Sobald sich die Zellen abrunden und voneinander lösen, konnte die EDTA/PBS Lösung abgesaugt und 1 ml TrypLE Express zugegeben werden. Durch leichtes Klopfen konnten die Zellen nach 1-2 Minuten Inkubation bei 37°C abgelöst werden. Nach der Zugabe von 7 ml Medium wurden die Tumorzelllinien (HT1197, Cal-29, T-24) und die somatischen Zellen für 5 Minuten bei 1200rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 20 ml Medium resuspendiert. Die Lagerung erfolgt in einer T75 Zellkulturflasche bei 37°C, 5% CO₂ und einem feuchten Klima. Am Folgetag wurden die Zellen mikroskopisch betrachtet um festzustellen ob sie gut angewachsen sind.

Zellen einfrieren

Die Zellen wurden wie zuvor beim Passagieren beschrieben abgelöst und in das für sie entsprechende Medium aufgenommen. Danach wurden sie zentrifugiert: 5 Min, 1200 rpm und Bremse 1-2. Währenddessen wurde das benötigte Einfriermedium hergestellt (50% Medium, 40% FCS und 10% DMSO) und auf Eis gestellt.

Pro einzufrierender Ampulle wurde 1 ml Einfriermedium benötigt. Nachdem die Ampullen beschriftet waren, wurden die Zellen in das Einfriermedium aufgenommen und in einer Einfrierbox (Isopropanol) bei – 70°C zwischengelagert. Am Folgetag wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt

3.3 Zellzahlbestimmung

Die adhärenen Urothelzellen wurden wie zuvor beschrieben abgelöst.

Die Zellsuspension wurde 1:2 mit Trypanblaulösung gemischt. 20 µl der Mischung wurden in eine Neubauer improved Zählkammer gegeben. Die Zählkammer wurde vor und nach der Benutzung nach Angaben des Herstellers gereinigt und vorbereitet. Am Mikroskop wurden anschließend alle hellen Zellen in 100-facher Vergrößerung ausgezählt. Da vitale Zellen den blauen Farbstoff aktiv aus dem Zellinneren transportieren, erscheinen lebende Zellen hell und tote Zellen dunkel. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die hellen Zellen in den vier äußeren Eckquadranten ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Zur Berechnung der Zellzahl ergibt sich die Formel:

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

Da das Gesamtvolumen bekannt ist kann so auch die Gesamtzellzahl ermittelt werden.

3.4 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Biorad Protein Assay

Der Protein Assay dient der Bestimmung der Proteinkonzentration in Proben.

Sowohl die Proben als auch die Standardverdünnungsreihen wurden auf Eis gelagert. Aus der Stammlösung BSA wird eine Verdünnungsreihe hergestellt. Dabei musste darauf geachtet werden, dass diese vollständig aufgetaut ist und nach jedem Verdünnungsschritt gevortext und zentrifugiert wird um eine gleichmäßige Konzentration des BSA zu erhalten. Die Proben wurden je nach Bedarf 1:3 oder 1:5 verdünnt. Der Assay misst Proteinkonzentrationen in einem Bereich von 50- 500µg/ml. Die Bradfordfärbereagenz wurde bei Raumtemperatur verwendet. Die Färbereagenz wurde 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt. Es wurde 10 µl der Proben, der BSA Standardreihe und Wasser in dreifach Bestimmung in eine 96-Well Flachboden Platte pipettiert. In jedes Well wurden 200 µl Färbereagenz gegeben. Nach 15 Minuten Inkubation im Dunklen wurde die Platte bei einer Wellenlänge von 650nm im ELISA-Reader ausgelesen.

Tabelle 7: Verdünnungsreihe Proteinbestimmung

Standard	Konzentration in mg/ml	Verdünnung
S1	2,94 mg/ml	
S2	1,47 mg/ml	1:2
S3	0,735 mg/ml	1:4
S4	0,3677 mg/ml	1:8
S5	0,18375 mg/ml	1:16

3.5 Effektivitätsbestimmung der ALDH1-Primer

Um eine aussagekräftige RT-PCR von ALDH1-A1, ALDH1-A2 und ALDH1A3 durchführen zu können, musste in einem ersten Schritt die Effektivität der Amplifikationsreaktion der jeweiligen Primerpaare bestimmt werden. Dazu wurden zunächst eine Reihe von cDNA's der Tumorzellen ausgewählt. Daraus bildete man einen Pool von cDNA der jeweiligen Zellen, um im Anschluss eine Verdünnungsreihe herzustellen. Diese Verdünnungsreihe war wie folgt aufgebaut, unverdünnt, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 und 1:64 verdünnt. Von diesen Verdünnungen wurden jeweils 2 µl in die einzelnen Wells gegeben. Danach gab man in jedes Well 18 µl des Mastermixes (10 µl Sybrgreen, 6 µl NTW und 2 µl des jeweiligen ALDH1 Primers). Im Anschluss führte man hiermit eine herkömmliche RT-PCR, mit einer speziellen Programmierung des Gerätes, zur Bestimmung der Effektivität der Primer durch. Diesen Vorgang wiederholte man an zwei darauffolgenden Tagen erneut und bestimmte dann im Anschluss am Computer die genaue Effektivität der jeweiligen Primer. Die Analyse wurde mit der LightCycler® 480 Software durchgeführt.

SS cycle
LC 480
Sybrgreen

ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3

60°

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ALDH1A1	A	unverd.	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64				
	B											
ALDH1A2	C											
	D											
ALDH1A3	E											LTC ALDH1A1
	F											LTC ALDH1A2
	G											LTC ALDH1A3
	H											+pos. bio SHC Tag

Sybrgreen 10 µl * 18 = 180 µl
 Primer 2 µl * 18 = 36 µl
 NTW 6 µl * 18 = 108 µl

10 µl Sybrgreen
 2 µl Tag
 6 µl NTW

Abbildung 6: Layout der Effektivitätsbestimmung von ALDH1A1, ALDH1A2 und ALDH1A3

3.6 Populationsverdopplungsgeschwindigkeit

Die Messung der Zellteilungsrate diente der Dokumentation der Wachstumsgeschwindigkeit der Tumorkulturen im Vergleich *in vitro* und zur Untersuchung, ob ein Zusammenhang zwischen der Wachstumsgeschwindigkeit und der Expression von CD276 bei den Tumoren besteht. Für diesen Versuch benutzten wir die drei Tumorkulturen T24, Cal29 und HT1197. Dazu wurden bei einer Passage die jeweilige Anzahl von Zellen pro Flasche gezählt und anschließend dann jeweils genau 50.000 Zellen von jeder Linie in einer neuen Kulturflasche ausgesät. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz inkubiert, ausgezählt und erneut wurden 50.000 Zellen ausgesät und wartete erneut solange, bis die Flaschen wieder konfluent waren um den vorherigen Schritt zu wiederholen. Zur Berechnung der Duplikationsrate wurde nun folgende Formel benutzt:

$$\text{Duplikationsrate} = \frac{\log_{10} \left(\frac{N1}{N2} \right)}{\frac{\log_{10} (2)}{d}}$$

N1: Zellzahl bei Aussaat

N2: Zellzahl bei Ernte

d: Tage zwischen Aussaat und Passage

3.7 Immunfluoreszenzfärbung

Der erste Schritt der Immunfluoreszenzfärbung ist die Aussaat der Zellen auf ein Lab-Tek II Chamber Slide. Hierfür wurden die Zellen wie bei der Passage beschrieben von der Kulturflasche abgelöst. Pro Kammer der Chamber Slides wurden 4×10^4 Zellen in 500 μ l des entsprechenden Mediums ausgesät. Diese ausgesäten Zellen mussten nun über Nacht auf dem Kammerboden festwachsen.

Am Folgetag erfolgte nun als erstes die Fixierung der Zellen in den Chamber Slides mit einer Paraformaldehyd-Fixierung. Zu Beginn goss man das in den Chambers enthaltene Medium ab und spülte sie zweimal mit 500 μ l PBS (+/+). Darauf folgte die Fixierung mit 200 μ l 4% Paraformaldehyd pro Well, welche 15 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Mit diesem Schritt endete die Fixierung. Nach der Inkubation wurden die Chambers erneut zweimal mit 500 μ l PBS (+/+) gewaschen.

Nun erfolgte der sog. „Antigen Retrieval“ Schritt, der dazu diente die durch die Fixation der Probe reduzierte Immunreaktivität des Gewebes zu verbessern. Dazu stellte man ein Antigen Retrieval Puffer her (100 mM Tris, 5% [w/v] Urea, pH 9.5). Dieser Puffer wurde nun in die Kammern gegossen und die Chamber Slides wurden für 10 min in ein 95°C heißes Wasserbad gelegt. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass kein Wasser in die Kammern kommt.

Im Anschluss wurden nun 200 µl 0,1% Triton X-100 pro Well hinzugegeben und bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Wells erneut zweimal mit 500 µl PBS (+/+) gewaschen. Nun wurden die Wells dreimal für jeweils 4 min mit 500 µl PBS/0,1% Tween20 gewaschen, um sie im Anschluss mit 5% Milchpulver-PBS/0,1% Tween20 für 30 min bei Raumtemperatur zu blocken. Darauf folgte eine weitere Waschung, dreimal für jeweils 4 min mit 500 µl PBS/0,1% Tween20. Um im folgenden Schritt die Antikörper aufzutragen wurden sie alle in 0,1% BSA/PBS verdünnt.

Für den 1. Antikörper wurde eine Verdünnung von 1:100 benötigt. Von dem so verdünnten 1. Antikörper kamen 100 µl in jedes Well und wurden für 90 min bei 37°C im Inkubator inkubiert. Es folgte eine weitere Waschung, dreimal für jeweils 4 min mit 500 µl PBS/0,1% Tween20, um die Proben auf das Aufbringen des 2. Antikörpers vorzubereiten. Der 2. Antikörper musste in einer Verdünnung von 1:300 auf die nun gewaschenen Proben aufgebracht werden. Hierfür benötigte man je 100 µl des 2. Antikörpers, der nun auch für 45 min bei 37°C inkubiert werden musste. Darauf folgte nun der letzte Waschdurchgang mit dreimal 500 µl PBS/0,1% Tween20 für 4 min. Die noch auf dem Objektträger haftenden Kammern wurden im folgenden Schritt von dem Objektträger abgelöst. Auf die Objektträger wurde nun das Mounting-Medium mit DAPI gegeben, so dass die Zellen, nachdem sie mit einem Deckglas bedeckt wurden vollständig von dem Mounting-Medium benetzt waren.

Hierauf folgte nun die Analyse der entstandenen Fluoreszenz im Laser Scanning-Mikroskop.

3.8 Analyse von CD276 auf Proteinebene mittels Western Blot

Um die Expression von CD276 auf Proteinebene zu quantifizieren, wurde ein Western Blot durchgeführt. Der Western Blot ist eine Methode zur Bestimmung der Proteinexpression, basierend auf der Gelelektrophorese, dem anschließenden Transfer der Proteine auf eine Membran und dem Nachweis der Zielproteine durch Antikörper auf der Membran. Er liefert zum einen Informationen über die Veränderung der Expression, die molekulare Größe der Proteine, über die Reinheit des zu analysierenden Proteins und die Menge, wenn ein weiteres Protein als Standard dargestellt werden kann.

Um das zu untersuchende Protein aus einem Gemisch von Proteinen zu identifizieren wurde ein Polyacrylamidgel benutzt. Die an dem Gel angelegte elektrische Spannung diente dabei dazu, dass die Proteine durch die Poren des Polyacrylamidgels in die Richtung der Anode wanderten. Die Geschwindigkeit mit der die Proteine nun in Richtung der Anode wanderten hängt beim sog. Lämmli-Gelelektrophorese (= SDS-Gelelektrophorese reduzierte Proteine) vor allem von der Größe in geringem Umfang auch Glyzingehalt und z.T. auch von posttranslationalen Modifikationen (z.B. Glykosylierung) aber weidervon der Konformation oder Disulfidbrücken, noch von anderen strukturellen Faktoren (z.B. Tertiär-, Quatärstrukturen) ab. Je kleiner das zu analysierende Protein ist, desto weiter wanderte es dabei durch das Gel.

In dieser Arbeit wurde der Western Blot nach der SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate polyacrylamid gel electrophoresis) Variante durchgeführt. Hierbei wurden sich die proteinentfaltenden Eigenschaften von SDS auf molekularer Ebene zur Trennung der Proteine zu Nutzen gemacht. Die Konzentration von Acrylamid legt die Größe der Poren in der Gelmatrix fest. Die in dem Gel aufgetrennten Proteine wurden nun in einem nächsten Schritt auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und anschließend durch einen Immunoblot analysiert.

Damit ein Western Blot auch erfolgreich durchgeführt werden konnte, musste für den Nachweis von CD276 ein entsprechender Antikörper etabliert werden, der zuverlässig an das denaturierte Molekül auf der Membran binden kann. Schon frühere Studien haben gezeigt das CD276 in Urothelkarzinomen erhöht exprimiert wird (Stephen A. Boorjian 2008).

Die für den Western Blot benötigten Tumorzellen wurden entweder in DMEM, bzw. MEM solange kultiviert bis sie etwa 80% konfluent waren. Die somatischen Zellen, wurden in KC-Standard kultiviert, bis auch sie etwa 80%

konfluent waren. Hierbei handelte es sich um Zellen, die aus Harnleitern der Urologie des Universitätsklinikums Tübingen stammten und zuvor nicht eingefroren waren. Die Verwendung von Urothelzellen für Studienzwecke wurde von der Ethikkommission unter der Nummer 279/2013BO2 bewilligt. Die somatischen Zellen dienten dazu, in der anschließenden Analyse, festzustellen ob die Tumorzellen im Vergleich zu den somatischen Zellen eine erhöhte Expression von CD276 aufweisen.

3.8.1 Vorbereitung der Zellen für den Western Blot

Um die Extraktion der Proteine vorzubereiten, wurden die Zellen gewaschen, abgelöst und sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen mithilfe des RIPA Lysepuffers, welcher 1mM PMSF als Proteasehemmer enthält, lysiert. Hierfür wurden die Zellen bei einer etwa 80%igen Konfluenz, wie bereits beschrieben mithilfe von Trypsin-EDTA Lösung (Sigma-Aldrich) aus den Kulturflaschen gelöst. Das entstandene Pellet wurde mit eiskaltem PBS (Sigma-Aldrich) gewaschen und für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Pellets in 1 ml RIPA homogenisiert und bei -80°C gelagert, bis sie zur weiteren Analyse benötigt werden.

Vor dem Blotten, wurden die Proben aufgetaut und zentrifugiert (15000, 20 min, 4°C). Die genaue Konzentration, der im Überstand enthaltenen Proteine wurde zuvor mithilfe eines colorimetrischen Assays (Bio-Rad DC Protein Assay Kit II, BSA Standard, Bio-Rad Laboratories GmbH, München Deutschland) bei 650 nm Wellenlänge bestimmt. Das entstandene Extrakt wurde mit Hilfe eines RIPA Puffers, welcher 1mM PMSF enthielt so verdünnt, dass jede Probe die gleiche Konzentration von Proteinen, (1mg/ml). Pro Spur im Gel wurde zu 25 µl Proteinextrakt 8 µl Lämmli Puffer (250mM Tris-HCL pH 6.8%, 20% Glycerin, 8% SDS, Bromophenolblau, 5% beta-Mercaptoethanol) hinzugegeben. Schließlich wurden die Proteine durch β-Mercaptoethanol reduziert und die Sekundärstruktur der Proteine durch Denaturierung bei 95°C für 10 min aufgelöst. Dadurch werden die Proteine linear und können durch SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

3.8.2 Proteintrennung im Gel und Übertragen der Proteine

Für die SDS-PAGE wurde ein 10%iges Acrylamid Trenngel, (H₂O, 30% Acrylamid/Bisacrylamid Lösung; 1.5 M Tris-Cl pH 8.8, 10% SDS, 10% Ammoniumpersulfat, TEMED) und einem 3% Acrylamid Stapelgel (H₂O, 30% Acrylamid/Bisacrylamid Lösung; 1 M Tris-Cl pH 6.8, 10% SDS, 10%

Ammoniumpersulfat, TEMED) gegossen. Die Porengröße des Trenngels bestimmt dabei den Molekulargewichtsbereich der zu analysierenden Proteine. Anschließend wurde jede Lane des SDS-Gels mit der gleichen Menge an Proteinen, in unserem Fall 25 µg beladen. Um im weiteren Verlauf des Western Blots Aussagen über das Gewicht der Proteine treffen zu können, wurden zusätzlich noch 2 Größenmarker in 2 Lanes gegeben (BenchMark und MagicMark XP, Waltham, Massachusetts, USA). Im Anschluss wurden die Proteine bei 100 Volt für 90 min durch das Gel getrennt. Für die weitere Analyse wurden die Proteinblots mithilfe von Elektrophorese auf eine Microzellulosemembran (GE Healthcare) übertragen. Darauf folgte das Blocken der Membran mit einer 5%igen Trockenmilchlösung, welche PBS-T (1x PBS, 0,1% Tween20) enthielt. Die so behandelte Membran wurde anschließend mit PBS und PBS-T gewaschen, um sie auf die anschließende Inkubation mit dem CD276 Primärantikörper vorzubereiten. Dieser wurde in einer 1:1000 Verdünnung in einer 5%igen Trockenmilchlösung mit (1x PBS, 0,1% Tween20) gelöst und mit der Membran bei 4°C über Nacht inkubiert. Bei dem Antikörper handelte es sich um einen monoklonalen Maus Antikörper gegen das humane CD276 Antigen, welche von Abcam (Cambridge, UK) bezogen wurde.

Nach der Inkubation wurde die Membran erneut mit PBS-T und PBS gewaschen. Darauf folgend wurde der Zweitantikörper, welcher mit Meerrettich Peroxidase (HRP) konjugiert ist, ebenfalls in 5%ige Milchlösung in PBS-T (1x PBS, 0,1% Tween20) gelöst. Es handelte sich um einen polyklonalen Schaf Anti-Maus Antikörper in einer 1:2000 Verdünnung, welchen von Dako stammte. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei Raumtemperatur. Der Zweitantikörper wurde entfernt und die Membran wurde mehrfach mit PBS-T und PBS gewaschen. Abschließend wurde die Membran mit einer WesternSure chemolumineszenten Lösung (Li-Cor, Lincoln, Nebraska, USA) für 5 min behandelt. Die entstandenen Proteinbanden konnten mit dem C-Digit Blot Scanner (Li-Cor) detektiert und mit Image Studio Digits analysiert werden.

3.8.3 Strippen der Membran

Um die Menge, der jeder Lane enthaltenen Proteine vergleichen zu können, wurde die Membran mit anti-β-Aktin als Referenz benetzt. Zum Strippen der Membran wurde sie mit einem speziellen Stripping-Puffer (0.2 M Glycin (Merk, Darmstadt, Deutschland); 0.1% SDS (Serva, Heidelberg, Deutschland); 1% Tween20 (Merck); 1990 ml destilliertes H₂O; pH 2.2) und PBS gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit einem polyklonalem Hasen Antikörper

gegen β -Aktin (Abcam), welcher 1:1000 mit PBS mit 5% Milchlösung verdünnt und bei 4°C über Nacht inkubiert wurde. Am folgenden Tag wurde die Membran mehrmals mit PBS-T und PBS (s. 3.8.1) gewaschen. Nachfolgend wurde sie mit dem Zweitantikörper, einem polyklonalem Ziege anti-Hase Antikörper/HRP (Dako, Agilent, Santa Clara, USA), in einer Verdünnung von 1:2000 mit PBS mit 5% Milchlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde, wie schon vorher erwähnt erneut gewaschen und mit dem C-Digit Blot Scanner (Li-Cor) analysiert und ausgewertet. Die Intensität der einzelnen Banden wurde durch das zählen der schwarzen Pixel innerhalb der der Banden bestimmt. Für diese Auswertung benutzten wir die Image Studio® Light C-Digit® Blot Scanner Software. Die Pixelintensität jeder Lane wurde mit der dazugehörigen Pixelintensität der β -Aktin Lane verglichen. Die Abbildung 16 zeigt einen solchen Messvorgang mit Hilfe des Programmes. Hierbei sind die CD276 Banden, als auch die β -Aktin Banden zu erkennen.

Tabelle 8: Antikörper die für den Western Blot verwendet wurden

Antikörper	Klonnummer/Bezeichnung	Hersteller
Monoklonaler Maus anti-CD276 Antikörper	6A1 (ab105922)	Abcam
Polyklonaler Hasen anti-Maus Antikörper/HRP	P0260	Dako
Polyklonaler Hasen Antikörper gegen β -Aktin	Ab8227	Abcam

Tabelle 9: Primär-, und Sekundärantikörper und deren Verdünnung für den Western Blot

	Antikörper	Verdünnung
Primärantikörper	Maus anti-CD276	1:600
	Hase anti- β -Aktin	1:1000
Sekundärantikörper	Hasen anti-Maus Antikörper/HRP	1:2000

3.9 Bestimmung des Transkriptionslevels mittels RT-PCR

Um die Expression von CD276 auf Transkriptionsebene festzustellen, wurde die Menge der transkribierten mRNA mittels RT-PCR (qRT-PCR) bestimmt.

3.9.1 RNA Extraktion

Zur Bestimmung der Expressionsstärke von CD276 musste zunächst die mRNA jeder Probe mittels RNeasy Kit (Qiagen, Hilde, Deutschland) extrahiert werden. Dafür wurden die Zellen wie bereits beschrieben in ihrem entsprechendem Medium kultiviert. Danach wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich) aus ihren Kulturflaschen gelöst. Das Ablösen der Zellen wurde mit 5ml des entsprechenden Mediums gestoppt, um anschließend durch die Zentrifugation (1500 rpm, 5 min) ein Pellet zu gewinnen. Anschließend wurden die Zellen in 350 µl Lysepuffe, welcher aus Qiagen RLT Puffer und 1% beta-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) bestand, resuspendiert. Die entstandene Lösung wurde über Nacht bei -80°C gelagert. Am nächsten Tag wurde die Lösung mit 350 µl 70% Ethanol (Merck) versetzt und mit Hilfe einer Spritze homogenisiert. Die Suspension wurde bei 10.000 rpm für 15 Sekunden in einer RNeasy Mini Spin-Säule (Qiagen) zentrifugiert. Der dabei anfallende Durchfluss wurde verworfen und auf die Säule wurden 350 µl RW1 Puffer (Qiagen) pipettiert und es folgte eine weitere Zentrifugation bei 10.000 rpm für 15 Sekunden. Erneut wurde der Durchfluss verworfen. Im Anschluss wurden 80 µl RNase-freie DNase (Qiagen), welche mit RDD Puffer (Qiagen) versetzt war, auf die Säule gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem nun 350 µl RW1 Puffer (Qiagen) zugefügt wurden, wurde die Säule erneut bei 10.000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert. Das Auffangröhrchen wurde danach verworfen und die Säule wurde in ein neues Auffangröhrchen gesteckt. Darauf folgten zwei Waschdurchgänge mit 500 µl RPE Puffer (Qiagen). Zuerst mit 10.000 rpm für 15 Sekunden und danach mit 10.000 rpm für 2 min. Der dabei entstandene Durchfluss wurde jedes Mal verworfen. Die Säule wurde dann bei 10.000 rpm für 15 Sekunden getrocknet und mit 40 µl RNase-freiem Wasser versetzt, in ein neues Eppendorfcup gesetzt und bei 10.000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Der bei diesem Schritt entstandene Durchfluss enthält nun die RNA der Probe, welche bei -80°C bis zum Umschreiben in cDNA gelagert wurde.

3.9.2 RNA Konzentration

Mit Hilfe des NanoPhotometers (Implen GmbH, München, Deutschland) wurde die Konzentration der in den Proben enthaltenen RNA bestimmt. Hierbei diente die spezifische Absorption von Licht mit einer Wellenlänge von 260 nm bei der RNA Bestimmung. Die Absorptionsstärke von einer Einheit entsprach 37 µl/ml RNA.

3.9.3 cDNA Synthese

Für die quantitative RT-PCR (qRT-PCR), wurde je 1 µg der vorher aus den Proben extrahierten RNA mit dem Takara Advantage RT-for-PCR Kit (Clontech, Mountain View, USA) in cDNA umgeschrieben. Die RNA wurde in einem frischen Eppendorf Cup mit Diethyldicarbonat (depc)-Wasser (Clontech) in einem Verhältnis von 1 µg RNA pro 12.5 µl Volumen und 1 µl oligo(dT)-Primer (Clontech) gemischt. Danach wurde die Probe bei 70°C für zwei Minuten inkubiert, um zu verhindern, dass RNA Haarnadelstrukturen entstehen, welche dazu führen können, dass inkomplette cDNA synthetisiert wird. Im Anschluss wurden der Probe 6.5 µl MasterMix (Clontech) hinzugefügt und bei 42°C für eine Stunde inkubiert, um die reverse Transkription an den oligo(dT)-Primern zu starten und cDNA zu synthetisieren. Der MasterMix (Clontech) besteht aus, 4 µl 5x Reaktionspuffer, 0.5 µl RNase Inhibitor, 1 µl dNTP-Mix und 1 µl Reverse Transkriptase. Nach der reversen Transkription wurden die Proben mit 80 µl DEPC-Wasser versetzt und bis zu qRT-PCR bei -20°C gelagert.

3.9.4 Quantitative RT-PCR

Die quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) wird verwendet, um die mRNA Expression von Genen zu bestimmen. Die qRT-PCR beruht auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion. Während des Prozesses der qRT-PCR, wird die Amplifikation der Ziel-cDNA mithilfe der entstehenden Fluoreszenz quantifiziert. Im ersten Schritt, wurden die doppelsträngigen cDNA-RNA-heterodimer Templates bei 95°C denaturiert und anschließend sehr schnell auf Raumtemperatur herabgekühlt. Dies erlaubte es, den entsprechenden Primern ordnungsgemäß an die Gen-spezifische Zielsequenz zu hybridisieren. Die verwendeten Primer bestehen aus kurzen Oligonukleotiden, welche als Startpunkt für die DNA-Polymerase zur Synthese von cDNA dienen. Für die Amplifikation sind zwei Primer nötig, ein

Vorwärtsprimer und ein Rückwärtsprimer, welche jeweils an einen Strang der cDNA, oder dem Gegenstrang binden. Nach der Denaturierung und des folgenden Annealing bei 62°C, folgt ein dritter Schritt, die Elongation genannte DNA-Synthese. Für die Elongation, bindet die DNA-Polymerase an die zuvor gebundenen Primer am 3`-Ende des cDNA-Strangs. Durch das Einbauen von freien Desoxyribonukleotid-Triphosphaten (dNTPs) erzeugt die DNA-Polymerase einen neuen Komplementärstrang zum Template. Dadurch dass es während dieses Prozesses zu großen Temperaturschwankungen kommt, benötigt man eine sehr hitzestabile DNA-Polymerase. Hierfür wird für gewöhnlich das Enzym Taq-Polymerase, aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* verwendet, welches extrem hitzestabil ist. Mit der Elongation ist ein kompletter Zyklus der PCR beendet. In unserer PCR führten wir 39 Zyklen durch, um aus der cDNA-Template ausreichend Kopien zu gewinnen.

Während des Prozesses der qRT-PCR, ist es möglich die genaue Menge an entstandener DNA mithilfe eines Fluoreszenzmarker, in unserem Fall SYBR Green (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland), nachzuvollziehen. SYBR Green ist ein Cyanin-Farbstoff, welcher grün mit einer Wellenlänge von $\lambda_{\max}=520$ nm emittiert. Es interkaliert in die DNA-Doppelstränge, was ein Fluoreszenzsignal erzeugt, welches mit jedem Zyklus in seiner Intensität zunimmt. Durch die Messung der Fluoreszenzintensität und Darstellung in einer Sigmoidfunktion, kann das Signal verfolgt und auf die Ausgangsmenge der DNA geschlossen werden.

Um die Zielgene quantitativ zu bestimmen, wurden die Werte mit den Housekeeping-Genen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Peptidylprolyl Isomerase A (PPIA) verglichen und normalisiert. Mit Hilfe des C_t -Wertes und dem Expressionslevels der Housekeeping-Gene, lässt sich die relative Expression von CD276 wie folgt bestimmen:

$$\Delta C_t = \Delta C_t(\text{CD276}) - \Delta C_t(\text{Housekeeping-Gene})$$

$$\text{relative Expression} = 2^{(-\Delta C_t)}$$

Tabelle 10: Parameter der qRT-PCR

Anzahl der Zyklen	39
Annealing Temperatur	60°C
Haushaltsgene	GAPDH (Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland) PPIA (Biomol GmbH)

Zielgene	CD276 MMP2 und MMP9 ALDH1-A1, ALDH1-A2 und ALDH1-A3
----------	---

Für die qRT-PCR im LightCycler 480 II (Roche Diagnostics), wurde das LightCycler 480 SYBR Green Master-Kit (Roche Diagnostics) verwendet. Die in Tabelle 8 aufgeführten Reagenzien, wurden jedem zu analysierenden Well einer 96-Well-Platte hinzugefügt.

Tabelle 11: Reagenzien in den einzelnen Wells

Lösungen	Inhalt
cDNA CD276	2 µl
Master Mix	10 µl SYBR Green (Roche Diagnostics) 6 µl depc-water (Roche Diagnostics) 2 µl Primer (1:1 forward und reverse)

Tabelle: 12 Primer mit Sequenz und Hersteller

Gene	Primerrichtung	Sequenz (5'→3')	Hersteller
CD276	Forward	TTTCCTTTCCCCTCC	Eurofins Genoics
	Reverse	TGTGACCAGCACATG	Eurofins Genoics
GAPDH	Forward	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	Biomol GmbH
	Reverse	TTGATTTTGGAGGGATCTCG	Biomol GmbH
PPIA	Forward	TTCATCTGCACTGCCAAGAC	Biomol GmbH
	Reverse	TCGAGTTGTCCACAGTCAGC	Biomol GmbH

Tabelle 13: Schelztemperatur und Effektivität der für die qRT-PCR benutzten Primer

Gene	Schelztemperatur (°C)	Primer Effektivität (2 µl 39 Zyklen)
CD276	60	1,775
GAPDH	60	1,66
PPIA	60	1,787
MMP2	60	1,981
MMP9	60	1,842
ALDH1-A1	60	1,91
ALDH1-A2	60	1,757
ALDH1-A3	60	1,85

Tabelle 14: Primer für RT-PCR

Primer	Herstellerbezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
ALDH1-A1	QuantiTect Primer Assay	Qiagen	QT00013286
ALDH1-A2	QuantiTect Primer Assay	Qiagen	QT00066045
ALDH1-A3	QuantiTect Primer Assay	Qiagen	QT00077588
MMP2	QuantiTect Primer Assay	Qiagen	QT00088396
MMP9	QuantiTect Primer Assay	Qiagen	QT00040040

3.10 Bestimmung von CD276 mittels Protein-Microarray von Gewebeschnitten

Der histologische Microarray dient dazu, ein spezielles oder verschiedene Proteine in einem Array von Gewebsschnitten zu untersuchen. Besonders effektiv sind histologische Microarrays wenn man in solchen Arrays gleichzeitig z.B. Tumor- und Kontrollgewebe der selben Spender untersuchen kann und damit experimentelle oder klinische Diagnostik standardisiert. Das Gewebe und die Arrays aus Paraffinschnitten wurde im onkologischen Labors der Klinik für Urologie hergestellt und am Institut für Pathologie wie folgt gefärbt:

Zur Vorbehandlung wurden die Proben eine Stunde lang mit der Cell Conditioning 1 Reagenz (Roche, Basel, Schweiz) behandelt. Dabei handelt es sich um einen Tris-Puffer mit einem leicht basischen pH-Wert. Bei steigenden Temperaturen ist der Cell Conditioner in der Lage die kovalenten Bindungen, die durch Formalin entstanden sind, aufzulösen. Dies erlaubt eine gewisse Renaturierung der Proteine, was die Bindung des Antikörpers verbessern kann. Anschließend wurden die Proben in einem EDTA Puffer pH 8,4 für 60 Minuten gekocht um die Bindungsfähigkeit weiter zu verbessern.

Nach dem Kochen wurden die Proben mit dem anti-CD276 Primärantikörper (Klon 6A1, ab105922, Abcam Cambridge, Vereinigtes Königreich) für 30 Minuten (37°C) inkubiert.

Die Proben wurden dann vollautomatisch mithilfe des BenchMark Ultra (Roche, Basel, Schweiz) gefärbt. Für die Färbung wurde das Färbekit OptiView DAB IHC Detection Kit (Roche, Basel, Schweiz) verwendet. Dabei handelt es sich um ein Biotin-freies System zum Nachweis von Maus IgG, Maus IgM und Hasen Antikörpern. Mit dieser Färbung ist es möglich, die Schnitte unter dem Lichtmikroskop im Durchlichtverfahren zu betrachten.

Zur Auswertung entschieden wir uns für die Kombination von zwei bereits etablierten Methoden. Zum einen floss das Protokoll von (Maygarden, Novotny et al. 1994) ein, bei dem man die Probe in Stücke unterteilt, denen man dann anschließend verschiedene Farbintensitäten zuordnet. Dies kombinierten wir mit dem Protokoll von (Boorjian, Sheinin et al. 2008). Bei diesem Protokoll wurden alle Proben bei denen eine Fläche von <10% gefärbt war als negativ eingestuft. Wenn mehr als 10% gefärbt war wurden in 10% Schritten gewertet. Wir unterschieden zusätzlich noch die Intensität der Färbung durch die Zahlenwerte 1, 2 und 3. Dadurch war es auch möglich, Proben bei denen nur ein Teil gefärbt

war und wo auch die Intensität der Färbung unterschiedlich war hinreichend auszuwerten.

Daraus ergibt sich folgende Formel:

gefärbte Fläche in % × *Intensität der Färbung*

Beispielhaft könnte eine Probe z.B. zu 70% gefärbt sein und innerhalb dieser 70%, 30% die Intensität 2 haben und 40% die Intensität 3. Der Score würde sich dann wie folgt errechnen: $30 \times 2 + 40 \times 3 = 180$

So würde sich für diese Probe ein Score von 180 ergeben.

Da wir hierbei mit Patientendaten gearbeitet haben, war es erforderlich eine Ethik Nr. zu haben. Für diesen Versuch war es die Nummer 279/2013B02

3.11 Durchflusszytometrie FACS

Die Expression von CD276 auf der Oberfläche der Tumorzellen wurde quantitativ mit Hilfe eines anti-CD276 Antikörpers und der Durchflusszytometrie (FACS) bestimmt. Die Durchflusszytometrie beruht auf dem Prinzip, dass mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Zellen durch Laserlicht angeregt werden und die Emission als Maß für die Signalmenge pro Partikel oder Zellen genutzt wird. Dies erlaubt die genaue Bestimmung der auf der Oberfläche einer einzelnen Tumorzelle exprimierten Oberflächenmarker.

Um den Versuch durchzuführen, benötigt man von jeder zu untersuchenden Tumorzelle zwei 70-80% konfluente Kulturflaschen. Die erste Flasche dient für die Analyse der Oberflächenproteine und die zweite Flasche wird nicht gefärbt und dient als Kontrolle.

Sind die Zellen konfluent, werden sie wie bereits oben beschrieben abgelöst, jedoch muss hier darauf geachtet werden, dass kein Trypsin zum Ablösen verwendet wird, da dies die Oberflächenproteine zerstören könnte. Die abgelösten Zellen wurden im Anschluss mit PBS gewaschen und bei 7°C und 1500 rpm für 7 min. abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen PFEA Puffer (PBS ergänzt mit 2% FCS, 0.01% Natriumazid und 2 mM EDTA) resuspendiert, so das 1,5 ml 40.000-50.000 Zellen enthielten. Pro zu untersuchendem Antikörper wurden 1,5 ml dieser Suspension in 2 ml Eppendorfcups überführt und für 4 min. bei 300g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Als nächstes wurden die Proben mit 50 µl Gamunex (Talecris Biotherapeutics, Frankfurt am Main, Deutschland) versetzt und für 20 Minuten bei 4°C inkubiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Nach der Inkubationszeit wurden

die Zellen mit 1 ml PFEA Puffer gewaschen. Zur Analyse wurden die Proben mit folgenden Antikörpern, welche in Tabelle 5 zu finden sind versetzt: PE anti-human CD276 und PE Mouse IgG1. 2,5 µl des Antikörpers wurden hierfür mit 47,5 µl PFEA Puffer verdünnt und auf die Zellen pipettiert. Die Lösung musste nun für 20 min. bei 4°C inkubieren. Für die Negativkontrolle wurden die Zellen ausschließlich mit 50 µl PFEA Puffer inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben mit 1 ml PFEA versetzt, gevortext und zentrifugiert. Auf das Pellet wurden 300 µl PFEA Puffer pipettiert und anschließend analysiert. Alle Proben wurden durch den LSR II Flowzytometer (BD Biosciences) ausgewertet. Die Ergebnisse wurden mit dem FlowJo Programm (Treestar Inc, Ashland, Vereinigte Staaten) analysiert.

4 Versuche zur Etablierung der Methoden

4.1 Kulturbedingung der Tumorlinien

Zunächst musste geprüft werden ob, nicht nur die somatischen Zellen in KC-Standard Medium, sondern auch die Tumorlinien in diesem Medium expandierbar waren.

Dies war notwendig, um einen möglichen Einfluss des Kulturmediums auf die Expression von CD276 auf den Tumorzellen auszuschließen.

Für diesen Versuch wurden die Tumorlinien T24, HT1197 und Cal29 ausgewählt. Im ersten Schritt säten wir von jeder Tumorlinie zwei Kulturflaschen in deren jeweiligen Standardmedien aus. Dies wurde durchgeführt um die Standardkulturen mit den Kulturen, welche in KC-Standard Medium wachsen, vergleichen zu können.

Bei dem ersten Mediumwechsel nach zwei Tagen, wurden zu den 10 ml Standardmedium 10 ml KC-Standard hinzugegeben um ein 50/50 Gemisch zu erhalten, damit die Zellen sich langsam an die Umstellung gewöhnen konnten. Bei dem zweiten Mediumwechsel nach weiteren zwei Tagen, wurde das Medium auf 100% KC-Standard umgestellt. Zu Beginn wirkte es so, als würden die Tumorzellen mit der Umstellung des Mediums gut zurechtkommen. Sie teilten sich ungefähr mit der gleichen Geschwindigkeit wie die Kulturen im Standardmedium und auch optisch sahen die Zellen zu Beginn nicht verändert aus. Doch 16 Tage nach der Aussaat konnte man deutliche morphologische Veränderungen der Zellen feststellen. Auch das Zellwachstum stagnierte, während die Standardkulturen bereits passagiert werden mussten, konnte man keine Vermehrung bei den KC-Zellen feststellen. Kurze Zeit später starben die Zellen im KC-Medium dann endgültig.

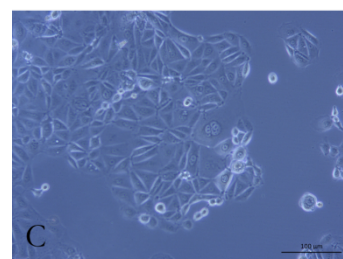
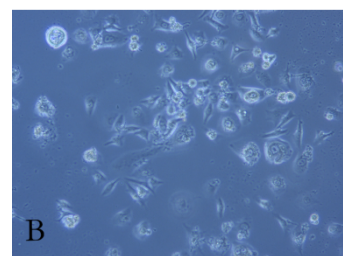
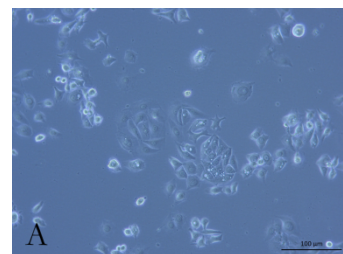


Abbildung 7: A) HT1197 in KC-Standard nach 3 Tagen B) HT1197 in KC-Standard nach 11 Tagen C) HT1197 in MEM nach 14 Tagen

Dies bedeutete für unsere weiteren Versuche, dass wir nicht in der Lage waren alle Zellen im gleichen Medium zu expandieren, da die Tumorzellen nicht im KC-Standard-Medium überlebten.

4.2 Immunfluoreszenz

Die ersten Immunfluoreszenzfärbungen wurden nach einem, wie oben beschriebenen Protokoll durchgeführt, in dessen Verlauf es jedoch zu keiner Behandlung der Zellen mit einem Antigen-Retrieval Puffer kam. Die so behandelten Zellen, zeigten später unter dem Fluoreszenzmikroskop zwar eine Fluoreszenz, jedoch war deren Intensität nicht so stark wie erwartet.

Um eine stärkere Färbeintensität zu erreichen, wurde dem Protokoll ein Antigen Retrieval Schritt zugefügt. Dieser diente dazu die „verlorengegangene“ Immunreaktivität von Paraformaldehyd-fixiertem Gewebe teilweise wiederherzustellen.

Alle folgenden Schritte wurden wie üblich durchgeführt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigt sich nun jedoch eine deutlich klarere und intensivere Fluoreszenz als ohne den Antigen Retrieval Schritt.

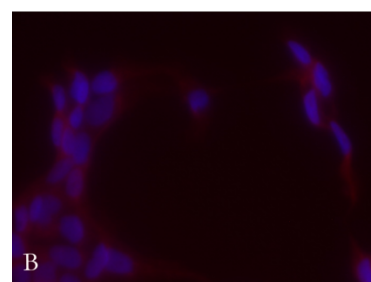
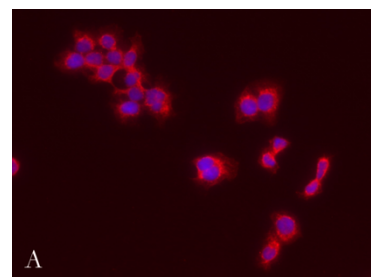


Abbildung 8: A) Cal29 mit Antigen Retrieval B) Cal29 ohne Antigen Retrieval

4.3 Etablierung neuer Kulturflaschen

Da in dieser Studie insgesamt 15 verschiedene Tumorkulturen untersucht wurden und mit jeder Tumorkultur verschiedene Experimente durchgeführt wurden, wurde eine enorm hohe Anzahl von T75 cm² Kulturflaschen benötigt. Dies hätte zum einen viel Material, als auch einen hohen zeitlichen Aufwand mit sich gebracht. Aus diesem Grund versuchten wir die Tumorkulturen auf TC Flask 175 cm² Kulturflaschen von Thermo Fisher Scientific umzustellen. Es war nicht sicher, ob die Tumorzellen diese Umstellung auf Grund des veränderten Gasaustausches überleben würden und so nahmen wir zu Beginn eine einzelne T24 Tumorkultur und überprüften, ob diese mit den veränderten Bedingungen zurecht kommen würde. In jede T175 cm² Flasche kamen 40 ml MEM Medium, um herauszufinden, ob diese Menge reicht, damit zu Zellen ausreichend Nährstoffe erhalten. Die Tumorzellen wurden an einem Montag ausgesät und am Freitag zeigte sich, dass sie die Umstellung auf die deutlich größeren

Kulturflaschen gut überstanden haben. Nach diesem erfolgreichen Test der neuen Kulturflaschen, wurden nun sämtliche Linien auf die neuen Flaschen umgestellt. Durch diese Umstellung, war der zeitliche Aufwand sowohl bei der Versorgung der Kulturen, als auch im Anschluss bei der Ernte der Zellen stark minimiert worden.

4.4 Bestimmung der Effektivität der ALDH1 Primer

Wie oben beschrieben, wurde die Effektivität der Primer mit Hilfe des LightCycler® 480II von Roche durchgeführt. Darauf folgend wurde die Effektivität der Primer am Computer bestimmt. In Tabelle 15 ist die Effektivität der einzelnen ALDH1 Primer dargestellt.

Tabelle 15: Effektivität der ALDH1 Primer

Primer	Hersteller	Melting temp. °C	Effektivität bei 39 Zyklen
ALDH1-A1	Qiagen	60	1,91
ALDH1-A2	Qiagen	60	1,757
ALDH1-A3	Qiagen	60	1,85

4.5 Bestimmung der Effektivität der MMP2 und MMP9 Primer

Wie oben beschrieben, wurde die Effektivität der Primer mit Hilfe des LightCycler® 480II von Roche durchgeführt. Darauf folgend wurde die Effektivität der Primer am Computer bestimmt. In Tabelle 16 ist die Effektivität der Primer dargestellt.

Tabelle 16: Effektivität der MMP2 und MMP9 Primer

Primer	Hersteller	Melting temp. °C	Effektivität bei 39 Zyklen
MMP2	Qiagen	60	1,981
MMP9	Qiagen	60	1,842

5 Ergebnisse

Die zu testenden Tumorklinien wurden in MEM Earle's Medium kultiviert, bis sie zu 80-100% konfluent waren. Anschließend wurden sie, wie bereits oben beschrieben, für die einzelnen Versuche vorbereitet. Mit den aus frischen Gewebeproben gewonnenen Urothelzellen wurde genau gleich verfahren, jedoch wurden diese in KC-Standard Medium kultiviert bis sie konfluent waren.

5.1 Proliferationsrate

Zu Beginn dieser Doktorarbeit wurde an 3 Linien untersucht, ob zwischen der Expression von CD276 und der Wachstumsgeschwindigkeit der Tumoren eine Korrelation bestand. Also ob der Tumor schneller wächst je höher die Expression von CD276 ist.

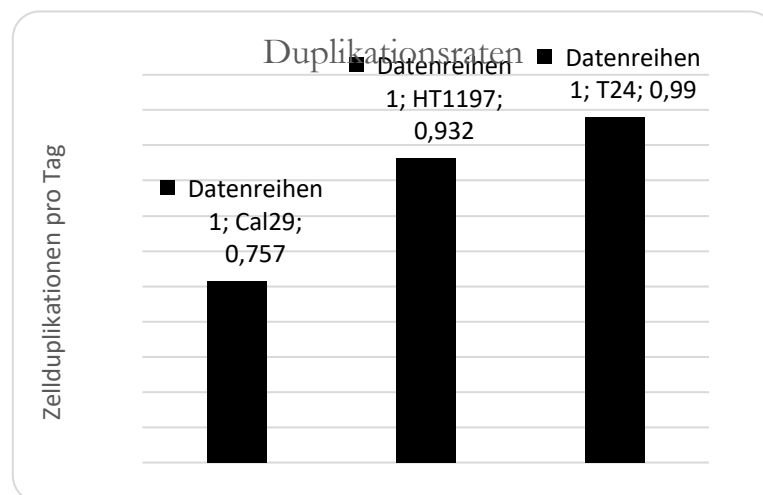


Abbildung 9: Duplikationsraten der Tumorzellen. Die Zellen wurden in MEM Earle's Medium kultiviert.

Bei dem Vergleich der Duplikationsraten zeigte sich ein negativer Zusammenhang zwischen der Duplikationsrate der Tumorzellen und dem Umfang der Expression von CD276 auf den Tumorzellen (s.u.). Jedoch ist zu beachten das nur drei Tumorklinien getestet wurden (n=3) und es sich deshalb auch um einen Zufall handeln könnte.

5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

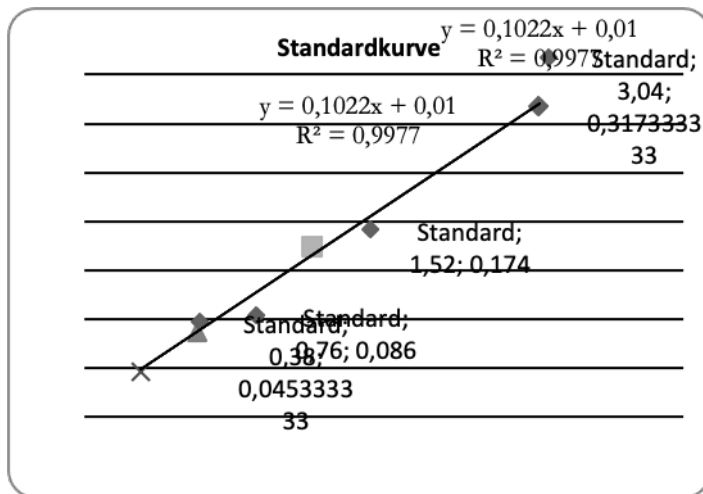


Abbildung 10: Standardkurve des Bradford Assays für die Proteinkonzentration von CD276

Die Bestimmung der Proteinausbeute aus den Zelllysaten ergab Konzentrationen zwischen 1,3 bis 10,5 mg/ml (siehe Tabelle 17). Für die weiteren Experimente wurden entsprechend unterschiedliche Volumina des Extraktes verwendet. Das Volumen des Extraktes war für jede Probe 200 μ l.

Tabelle 17: Konzentrationsbestimmung von CD276 mittels Bradford Assay

Probe	Konzentration (mg/ml)
HL17/5	1,436
HL17/7	1,312
HL17/10	1,857
HL17/17	1,03
HL17/21	2,363
HL17/24	1,14
T24	8,846
Cal29	3,36

HT1197	2,554
UC1	2,748
RT112	3,97
J82	3,89
5637	2,48
253JBV	6,42
RT4	10,49
RT4v6	6,91
TCC	1,31
UC3	6,85
T24 Kanada	2,75
SV1HUC1	4,028
253J	7,73

5.3 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenz diente zum Nachweis von CD276 auf der Oberfläche der Tumorzellen als auch auf den somatischen Zellen. Dies wurde mit den Tumorklinien Cal29, HT1197 und T24 und den Urothelzellen HL17/17 als Kontrolle durchgeführt. Der Primärantikörper war ein Kanninchen-Antikörper (Abcam, ab226256). Bei dem Sekundärantikörper handelte es sich um ein Cy3 markierten goat-anti-rabbit Antikörper (Jackson-Immuno-Research, 111-165-045).

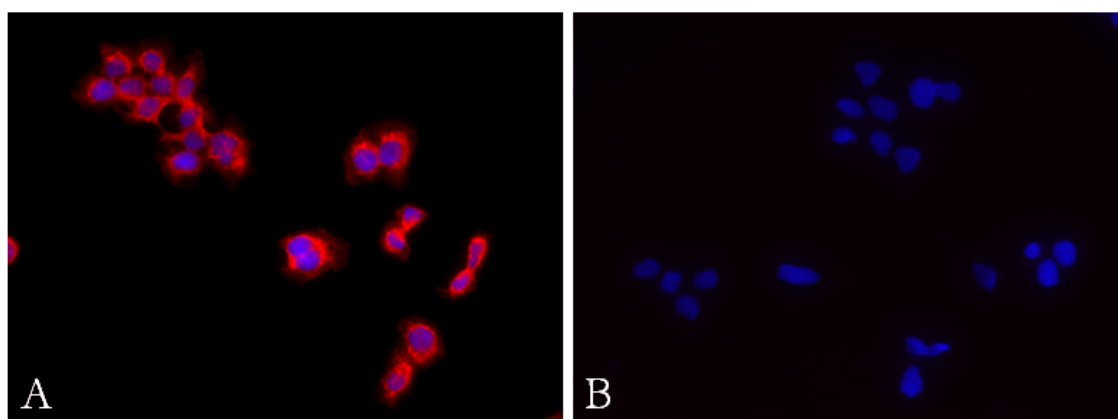


Abbildung 11:A) Cal29 CD276 mit dem 1. + 2. Antikörper B) Cal29 CD276 nur mit dem 2. Antikörper

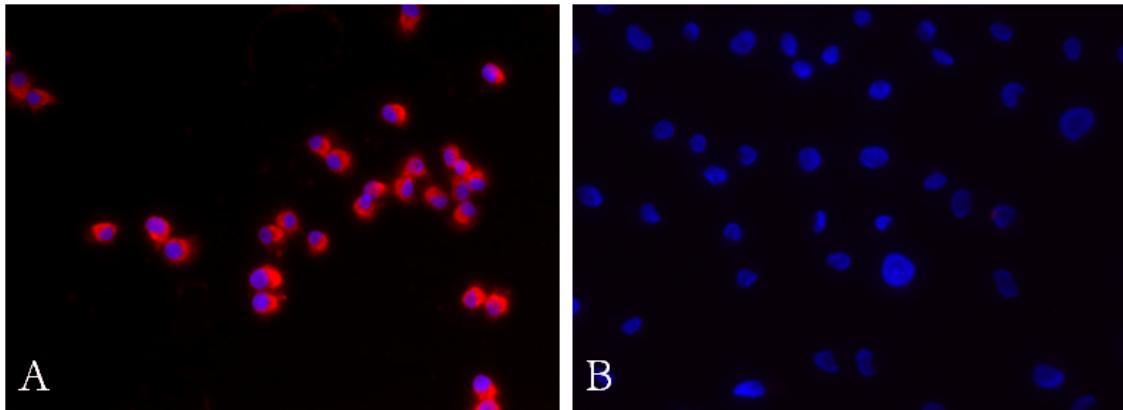


Abbildung 12:A) HT1197 CD276 mit dem 1. + 2. Antikörper B) HT1197 CD276 nur mit dem 2. Antikörper

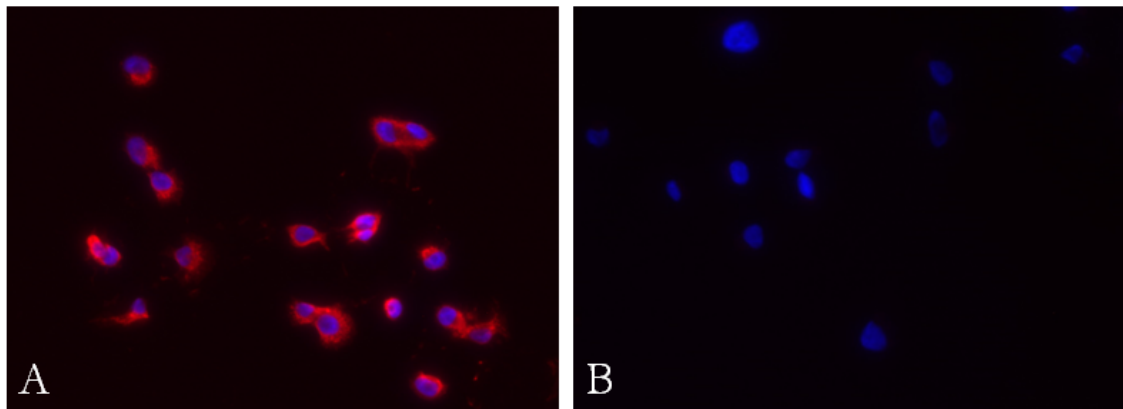


Abbildung 13:A) T24 CD276 mit dem 1. + 2. Antikörper B) T24 CD276 nur mit dem 2. Antikörper

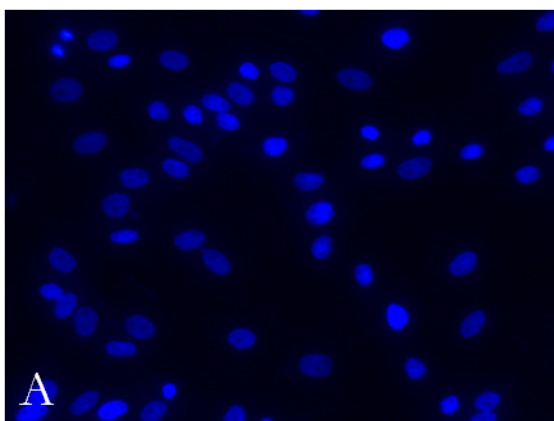


Abbildung 14: Kontrolle mit Harnleiter HL 17/17 mit dem 1. + 2. Antikörper gegen CD276

Wie die Abbildung 11 bis Abbildung 13 A zeigen, ist bei den Tumorkulturen Cal29 HT1197 und T24 ein deutliches, fluoreszierendes Signal auf der Oberfläche der einzelnen Zellen zu erkennen. Dies beweist zum einen, dass der CD276 Antikörper an die CD276 Moleküle auf der Oberfläche der Tumorzellen bindet und daher auch CD276 Moleküle auf der Oberfläche vorhanden sind. Auf den Abbildung 11 bis Abbildung 13 B hingegen, ist bis auf die Färbung der Zellkerne mit DAPI keine Fluoreszenz auf der Oberfläche zu erkennen. Dies beweist, dass es bei dem von uns verwendeten Zweitantikörper zu keiner unspezifischen Bindung mit anderen Bestandteilen der Zelle kommt.

Als Kontrolle zu den Tumorkulturen wählten wir somatische Urothelzellen aus einer Biopsie Probe aus der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen (HL17/17) aus. Wie die Abbildung 14 deutlich zeigt, kommt es nach einer Inkubation mit dem Erst- und Zweitantikörper zu keiner Färbung eines Moleküls auf der Oberfläche der Urothelzellen. Dies zeigt, dass es zumindest bei der Linie HL 17/17 zu keiner, oder nur einer sehr geringen Expression von CD276 auf den Zellen kommt.

5.4 Zellmorphologie der Tumorlinien

Die einzelnen Tumorlinien wurden jeweils unter den identischen Kulturbedingungen kultiviert. Bei dem Medium handelte es sich um MEM mit Earle's Salzen und 10% FCS, 1% Pen./Strep. und 1% NEA.

Schon während des Wachstums ließen sich innerhalb der Linien erhebliche Unterschiede feststellen. Während der Großteil der Tumorlinien so wuchs, dass sich schnell ein Zellrasen bildete und die Flaschen konfluent waren, gab es Tumorzellen, die eher in Haufen wuchsen und erst nachdem sie mehrschichtige Zellhaufen gebildet hatten in die Umgebung migrierten. Bei diesen Linien handelte es sich um die Tumorlinien RT4 und RT4v6, die wir jeweils aus Kanada erhalten hatten. Die Abbildung 15 zeigt die unterschiedlichen Zellmorphologien der Tumorlinien nach etwa gleicher Inkubationszeit in den Kulturflaschen. 15A) zeigt hierbei die Tumorlinie 5637, wobei man deutlich erkennen kann, dass die einzelnen Zellen schnell in die Breite wachsen, bevor sie sich zu Zellhäufen zusammenschließen. Ein ähnliches Bild lässt sich bei 15B) erkennen. Hierbei handelt es sich um die Tumorlinie Cal29. Ein deutlich anderes Bild zeigt 15C), hier ist klar zu erkennen, dass die Zellen der Tumorlinie RT4 in Clustern wachsen und sich erst nach und nach über den gesamten Boden der Kulturflaschen ausbreiten. In diesem Bezug ist es sehr interessant, dass bei dieser Tumorlinie der Stammzellmarker ALDH1-A1, welcher sowohl bei physiologischen Stammzellen, als auch bei Tumorstammzellen vorhanden ist, deutlich erhöht exprimiert wurde. Die Expression von ALDH1-A3 war jedoch nicht erhöht. Die genauen Ergebnisse hierzu folgen später, bei der Auswertung der RT-PCR von ALDH1.

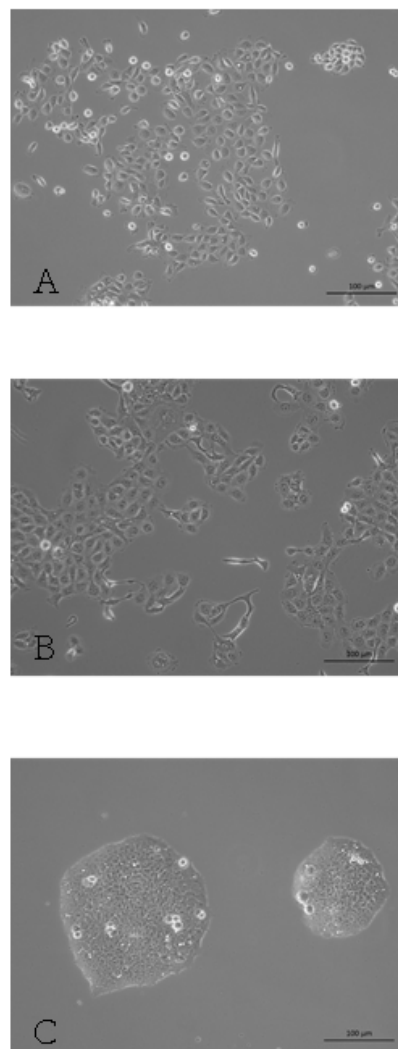


Abbildung 15: A) Zellmorphologie der Tumorlinie 5637 B) Zellmorphologie der Tumorlinie Cal29 C) Zellmorphologie der Tumorlinie RT4

5.5 Western Blot

Mithilfe der Immunfluoreszenz konnten die CD276 Moleküle auf der Oberfläche der Tumorzellen nachgewiesen werden (Abbildung 11). Da sich mit dieser Methode jedoch nur qualitative Rückschlüsse ziehen ließen, wurde mittels Immunblotting, welches gleichermaßen auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion beruht, eine quantitative Bestimmung von CD276 durchgeführt.

Der Western Blot, zur Analyse des Proteinlevels von CD276 wurde mit Tumorzellen durchgeführt, welche in MEM Earle's Medium + 10% FCS, 1% NEA, 1% NA⁺ Pyruvat und 1% Pen./Strep. kultiviert wurden. Die als Kontrolle ausgewählten Urothelzellen aus der Klinik für Urologie wurden in Keratinozyten Standardmedium mit 1% Pen./Strep. kultiviert.

Für die Auswertung der Expression von CD276 auf der Oberfläche der Zellen wurden insgesamt 16 verschiedene Tumorklinien, sowie vier verschiedene somatische Urothelzellen eingesetzt.

Dafür wurde ein Western Blot nach dem SDS-PAGE an den jeweiligen Zellen durchgeführt. Hierzu wurde das Gel mit dem Proteinextrakt der entsprechenden Zelllinien beladen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Die Abbildung 16 zeigt einen solchen Messvorgang mit Hilfe des Programmes. Hierbei sind sowohl die CD276 Banden, als auch die β -Aktin Banden zu erkennen. Schon hier wurde deutlich, dass sowohl in der Konzentration von CD276, als auch in der Konzentration von β -Aktin Unterschiede bestehen, was an der unterschiedlichen Größe und auch Intensität der einzelnen Banden erkannt werden konnte.

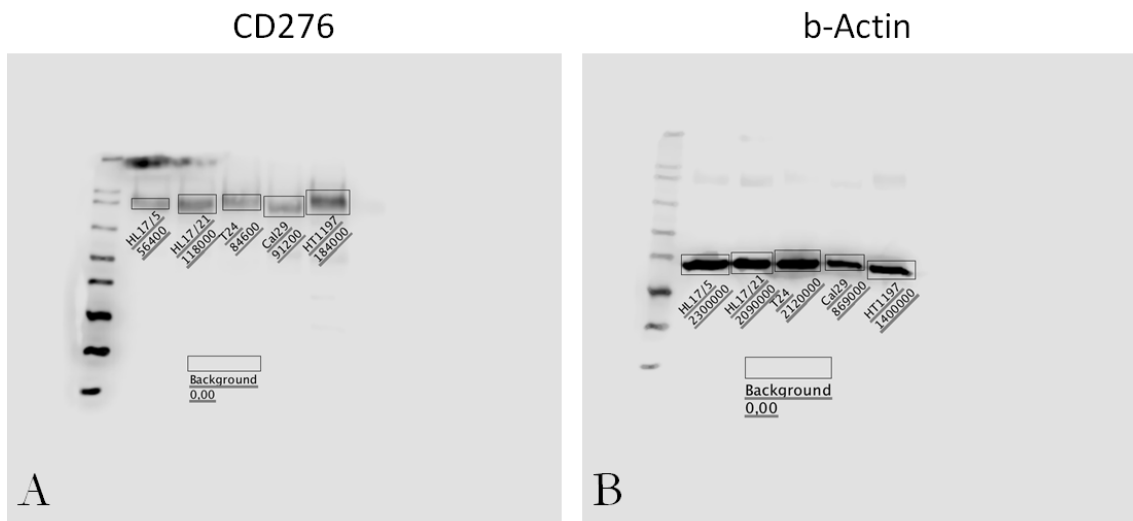


Abbildung 16: Exemplarische Darstellung der genauen Auswertung A) der Intensitäten von CD276 B) zum anderen die Intensität von β -Aktin. Die schwarzen Pixel innerhalb der Boxen, wurden dabei mithilfe des Programmes Image Studio™ Lite ausgewertet.

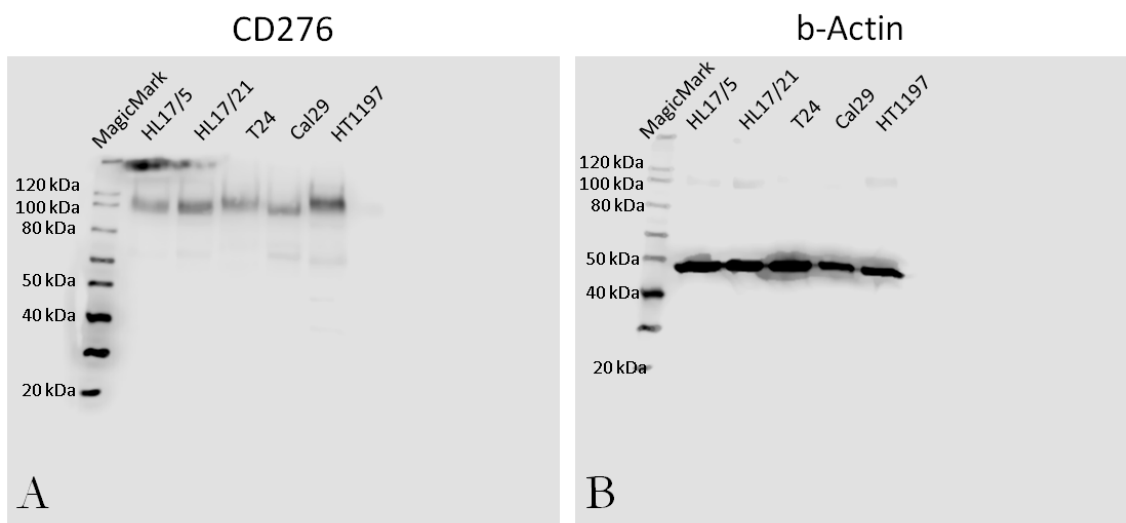


Abbildung 17: Western Blot Membranen von Zellysaten von Tumorzellen und Urothelzellen als Kontrolllinien. A) Membran für die Detektion von CD276 B) Zeigt im Vergleich die Menge von β -Aktin das in den jeweiligen Proben enthalten ist.

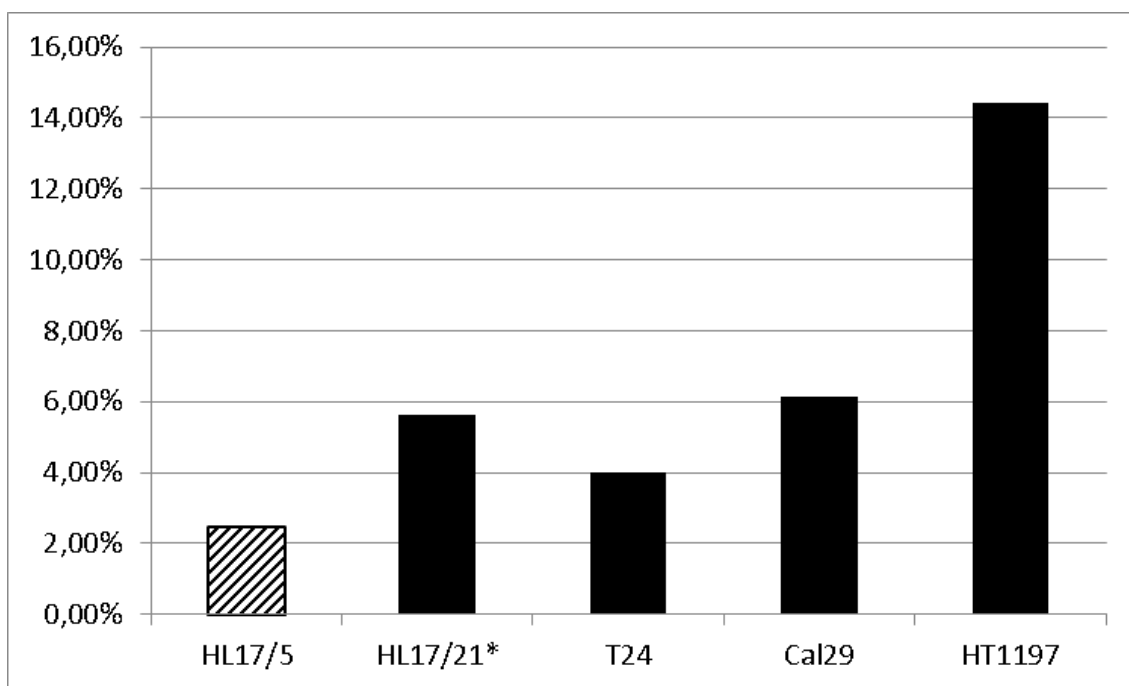


Abbildung 18: Normalisierte Proteinexpression von CD276 nach Western Blot in den Tumorzellen T24, Cal29 und HT1197, sowie der somatischen Urothelzelle HL17/5 und der Tumorzelle HL17/21 aus eigener Isolation gegenüber β -Aktin.

Wie die Abbildung 17 zeigt, erkennt man deutliche Banden von CD276 in den jeweiligen Proben. Die Banden befinden sich im Bereich zwischen 120-110 kDa. Da das eigentliche CD276 Molekül eine Größe von 57 kDa hat gehen wir davon aus, dass durch eine Posttranslationale Modifikation (PTM), vor allem Glykosylierung diese Differenz im Molekulgewicht zustande kommt.

Schon der erste Western Blot zeigt Abbildung 18 deutliche Unterschiede in der normalisierten Expression von CD276 auf den Tumorzellen, als auch auf den somatischen Urothelzellen. Hierbei lassen sich die Tumorzellen in drei Gruppen einteilen, low exprimierende Tumorzellen (z.B. T24), medium high exprimierende Tumorzellen (z.B. Cal29) und high exprimierende Tumorzellen (z.B. HT1197). Das Ergebnis von HL17/21 schien zunächst etwas ungewöhnlich, doch nach Kontrolle der dazugehörigen Patientendaten stellen wir fest, dass es sich dabei um eine Probe eines Patienten handelte, der ein Blasenkarzinom hatte und die Probe aus der entsprechenden Region stammen könnte, weshalb wir diese Linie ebenfalls als Tumorzelle einstufen. Dies erklärt unter Umständen das hohe Expressionslevel von CD276 bei dieser Zelllinie. Wie vorher von uns erwartet, wies die Probe von HL17/5 eine im Verhältnis zu den Tumorzellen erniedrigte Expression von CD276 auf.

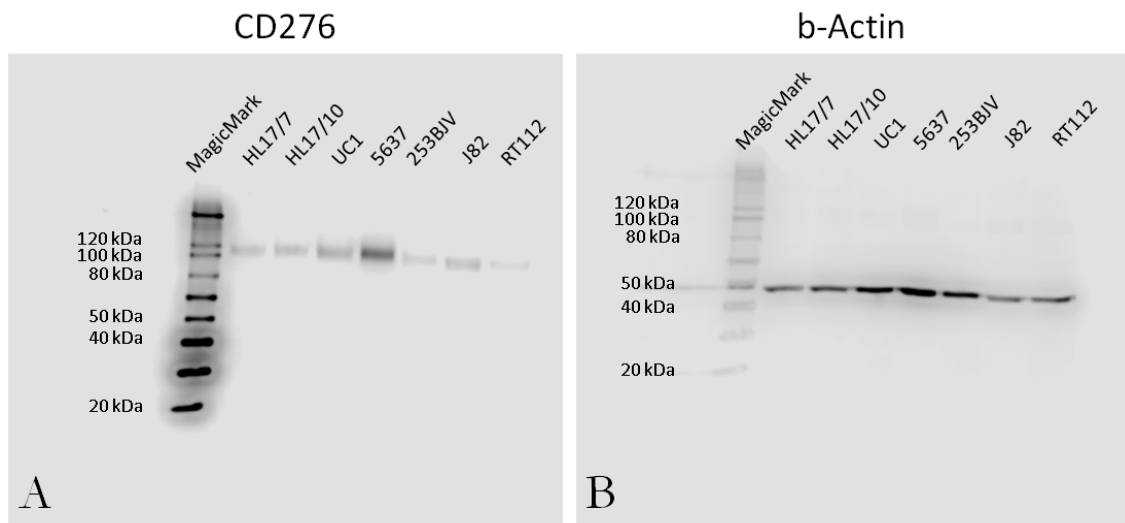


Abbildung 19: Western Blot Membranen von Zelllysaten von Tumorzellen und Urothelzellen als Kontrolllinien. A) Membran für die Detektion von CD276 B) Zeigt im Vergleich die Menge von β -Aktin das in den jeweiligen Proben enthalten ist.

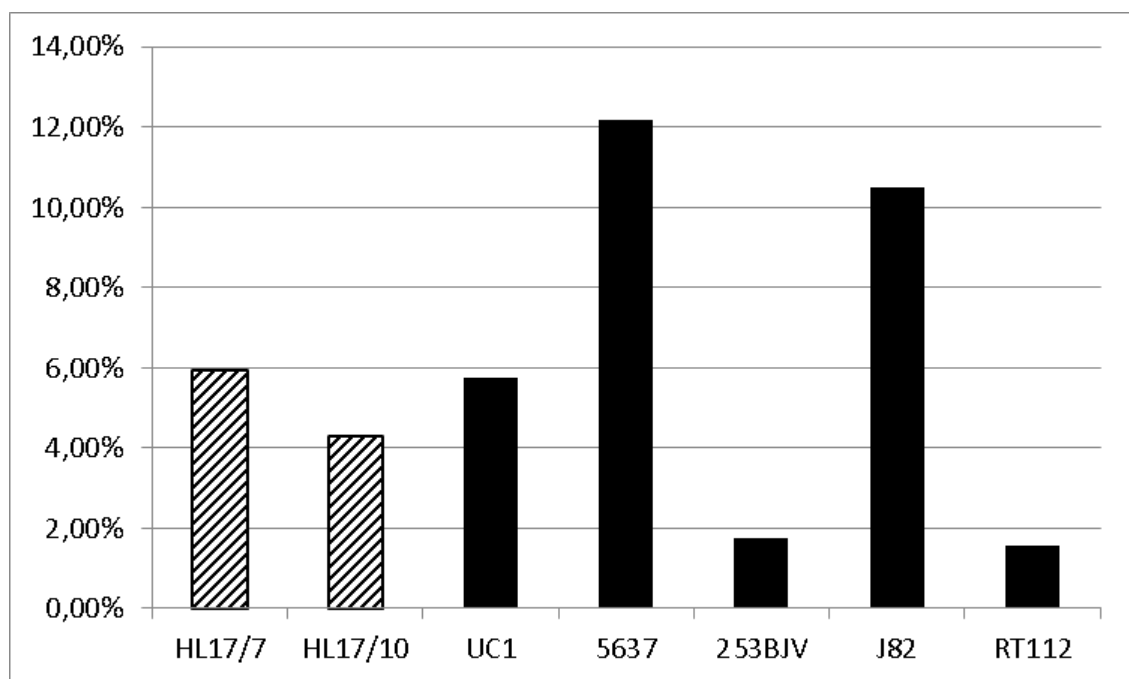


Abbildung 20: Normalisierte Proteinexpression von CD276 mittels Western Blot in den Tumorzellen UC1, 5637, 253BJV, J82 und RT112, sowie den somatischen Urothelzellen HL17/7 und HL17/10 im Vergleich zu β -Aktin.

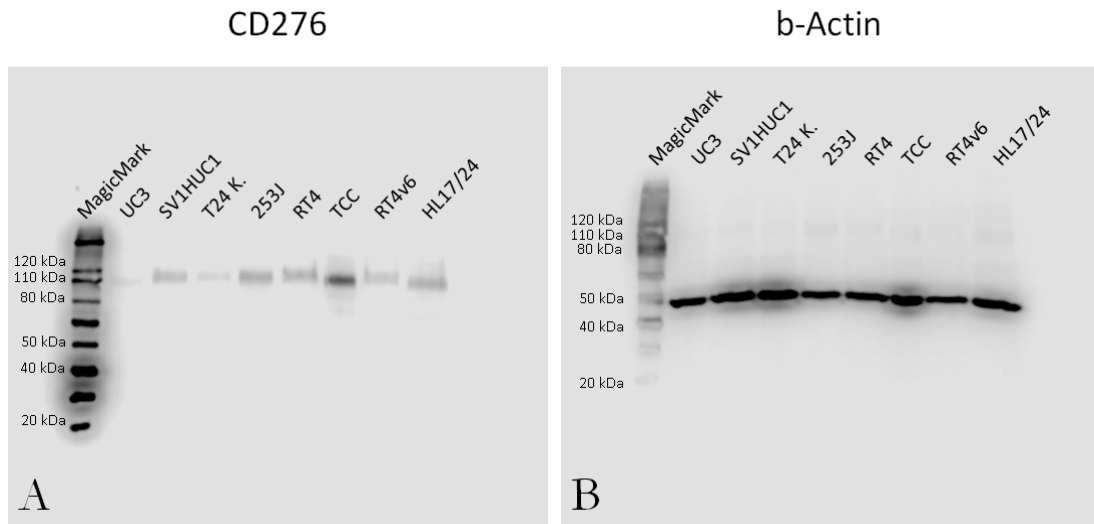


Abbildung 21: Western Blot Membranen von Zelllysaten von Tumorzellen und Urothelzellen als Kontrolllinien. A) Membran für die Detektion von CD276 B) Zeigt im Vergleich die Menge von β -Aktin das in den jeweiligen Proben enthalten ist.

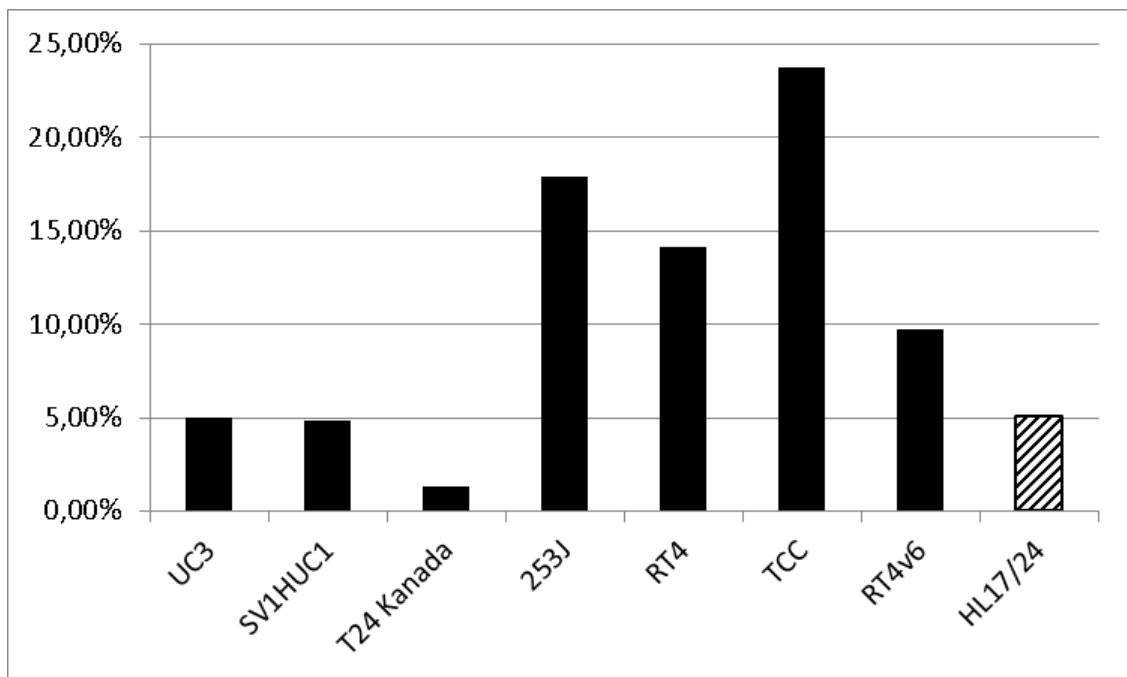


Abbildung 22: Normalisierte Proteinexpression von CD276 mittels Western Blot in den Tumorzellen UC3, SV1HUC1, T24 Kanada, 253J, RT4, TCC, RT4v6 und der somatischen Urothellinie HL17/24 im Vergleich zu β -Aktin.

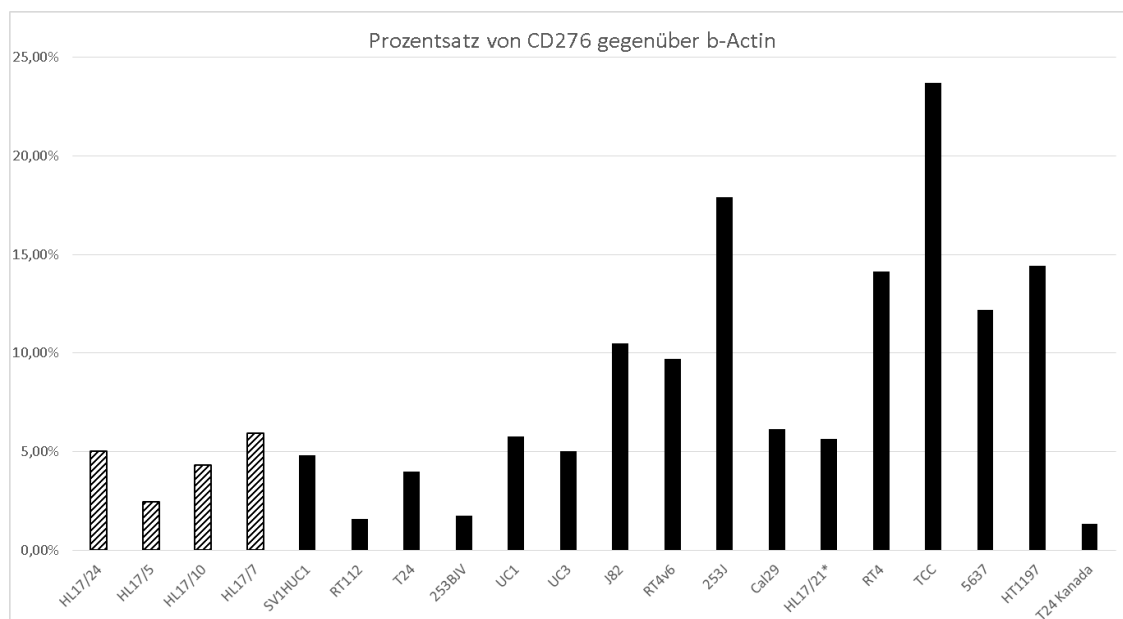


Abbildung 23: Übersicht über die Proteinexpression der Tumorzelllinien und somatischer Zellen dieser Dissertation nach Western Blot Analyse.

Wie die Ergebnisse in Abbildung 23 deutlich zeigen, gibt es erhebliche Unterschiede in der Proteinexpression von CD276 sowohl in den verschiedenen Tumorzelllinien, als auch innerhalb der somatischen Urothelzelllinien.

Innerhalb der Tumorzelllinien lassen sich mehrere Gruppen, in Bezug auf die Expression von CD276 identifizieren. Dort gibt es jene, die eine geringere Expression zeigen als die somatischen Urothelzellen, die als Vergleich dienen. Zu dieser Gruppe zählen die Tumorzelllinien RT112, 253BJV und T24 aus Kanada. Dann lässt sich eine Gruppe von Tumorzelllinien darstellen die eine geringe Expression von CD276 aufweisen. Diese Gruppe umfasst die Linien SV1HUC1, T24, UC1, UC3 und Cal29. In diese Gruppe fällt auch die bereits oben beschriebene, eigentlich somatische Zelllinie HL17/21. Als nächstes lässt sich eine Gruppe mit einer mittleren Expression von CD276 identifizieren, die die Linien J82 und RT4v6 umfasst. Zum Schluss gibt es noch eine Gruppe von Tumorzellen, mit einer deutlich erhöhten Expression von CD276 im Vergleich zu den somatischen Urothelzellen, welche die Linien 253J, RT4, TCC, 5637 und HT1197 beinhaltet.

Bei dem Vergleich der beiden T24 Linien fällt auf, dass die T24 Linie aus Kanada eine geringere Expression von CD276 im Vergleich zu der von uns im Labor etablierten Linie zeigt. Die von uns verwendete T24 Linie wurde jedoch in diesem Jahr vom Helmholtz-Zentrum in Braunschweig charakterisiert und als einwandfreie Referenzlinie eingestuft.

5.6 RT-PCR Ergebnisse für CD276

Die RT-PCR, zur Analyse des mRNA Expression von CD276 wurde mit Tumorzellen durchgeführt, welche in MEM Earle's Medium + 10% FCS, 1% NEA, 1% NA+ Pyruvat und 0,1% Pen./Strep. kultiviert wurden. Die als Kontrolle ausgewählten Urothelzellen aus der Klinik für Urologie wurden in Keratinozyten Standardmedium mit 0,1% Pen./Strep. kultiviert.

Bei etwa 80-90%iger Konfluenz wurden die Linien geerntet und als Referenzgene wurden dabei GAPDH und PPIA verwendet.

Die der Expression von CD276 auf der Transkriptebene durch RT-PCR wurde insgesamt bei 16 verschiedene Tumorklinien, sowie vier verschiedene somatische Urothelzellen durchgeführt.

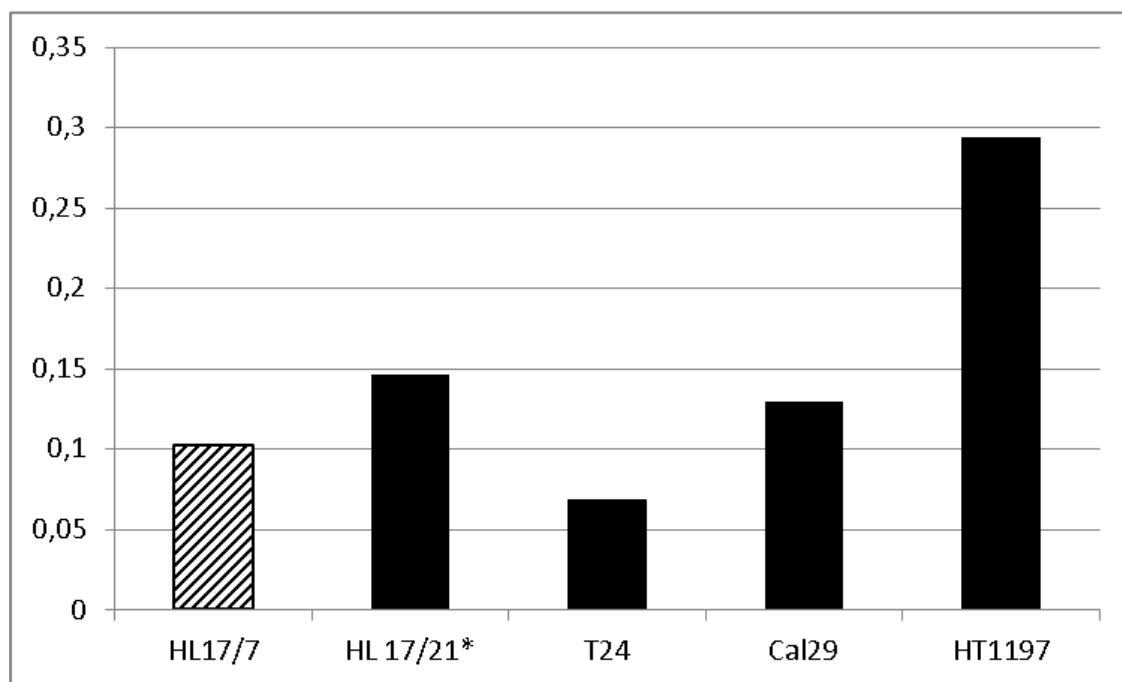


Abbildung 24: Gehalt der mRNA, bestimmt mittels RT-PCR von CD276 in den unterschiedlichen Zelllinien.

In Abbildung 24 sind die Ergebnisse der ersten RT-PCR dargestellt. Man kann deutlich erkennen, dass es auch hier, wie oben schon beim Western Blot beschrieben, auch deutliche Unterschiede des CD276 Gehalts auf mRNA Ebene existieren. Die in Abbildung 24 dargestellten Ergebnisse decken sich ausgesprochen gut mit denen des Western Blots, welche in Abbildung 18 abgebildet sind. Auch hier ist es sinnvoll die Tumorklinien in drei Gruppen

einzuteilen, zum einen T24 das eine geringe Expression von CD276 aufweist, dann Cal29 welcher eine mittel hohe Expression von CD276 zeigt und HT1197 mit einer hohen Expression von CD276. Wie bereits oben beschrieben, handelt es sich bei der Linie HL17/21* nicht mehr um eine „gesunde“ Kontrolllinie, weshalb ihr Balken, so wie die der Tumorklinien eine schwarze Füllung erhalten hat. Jedoch ist auch bei dieser Linie eine deutliche Ähnlichkeit, in Bezug auf die Expression von CD276 auf mRNA Ebene zu der Expression von CD276 auf Proteinebene im Western Blot zu erkennen.

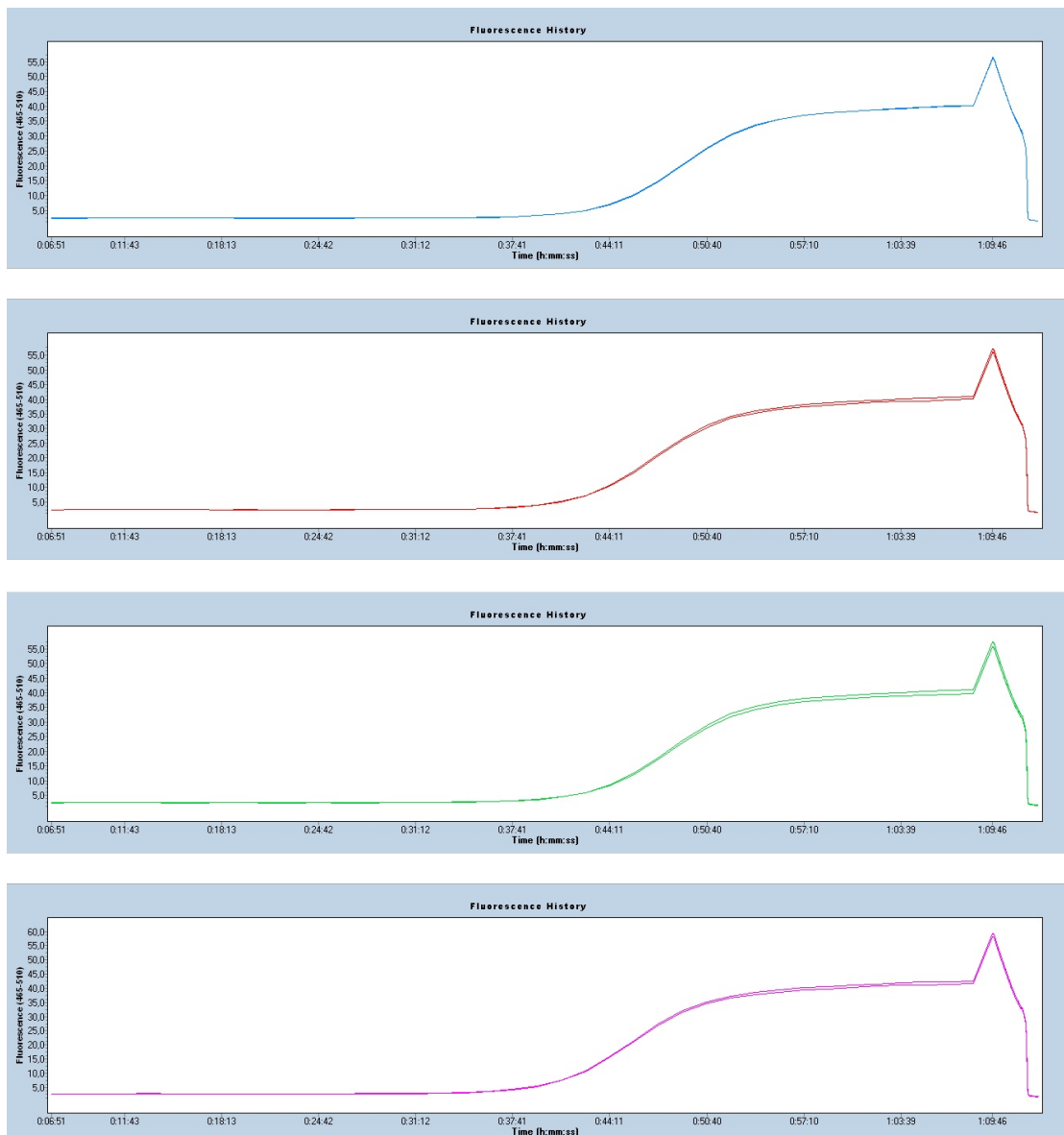


Abbildung 25: Zeigt exemplarisch die Verläufe der RT-PCR in Bezug auf die Fluoreszenz und damit die Amplifizierung von CD276 und deren Intensität in Prozent.

Neben den Ergebnissen der Expression von CD276 durch die RT-PCR, wurden noch die Amplifizierungs- bzw. Schmelzkurven und der C_P -Wert bestimmt. Unter Zuhilfenahme der Amplifizierungskurve und deren sigmoidaler Verlauf bzw. exponentielles Wachstum lässt sich erkennen, ob und wenn wie hoch das zu untersuchende Gen exprimiert wird. Hierbei sollte der C_P -Wert möglichst unter 30 liegen. Der C_P -Wert beschreibt hierbei den Zeitpunkt, nach einer gewissen Anzahl von Zyklen, bei dem die Fluoreszenzintensität der Probe das Hintergrundsignal übersteigt und zu erkennen ist das die Amplifizierungskurve ansteigt. Diese Ergebnisse sind exemplarisch für eine PCR in Abbildung 25

dargestellt. Die in Abbildung 26 dargestellten Schmelzkurven zeigen ob tatsächlich nur das gewünschte PCR-Produkt amplifiziert wurde.

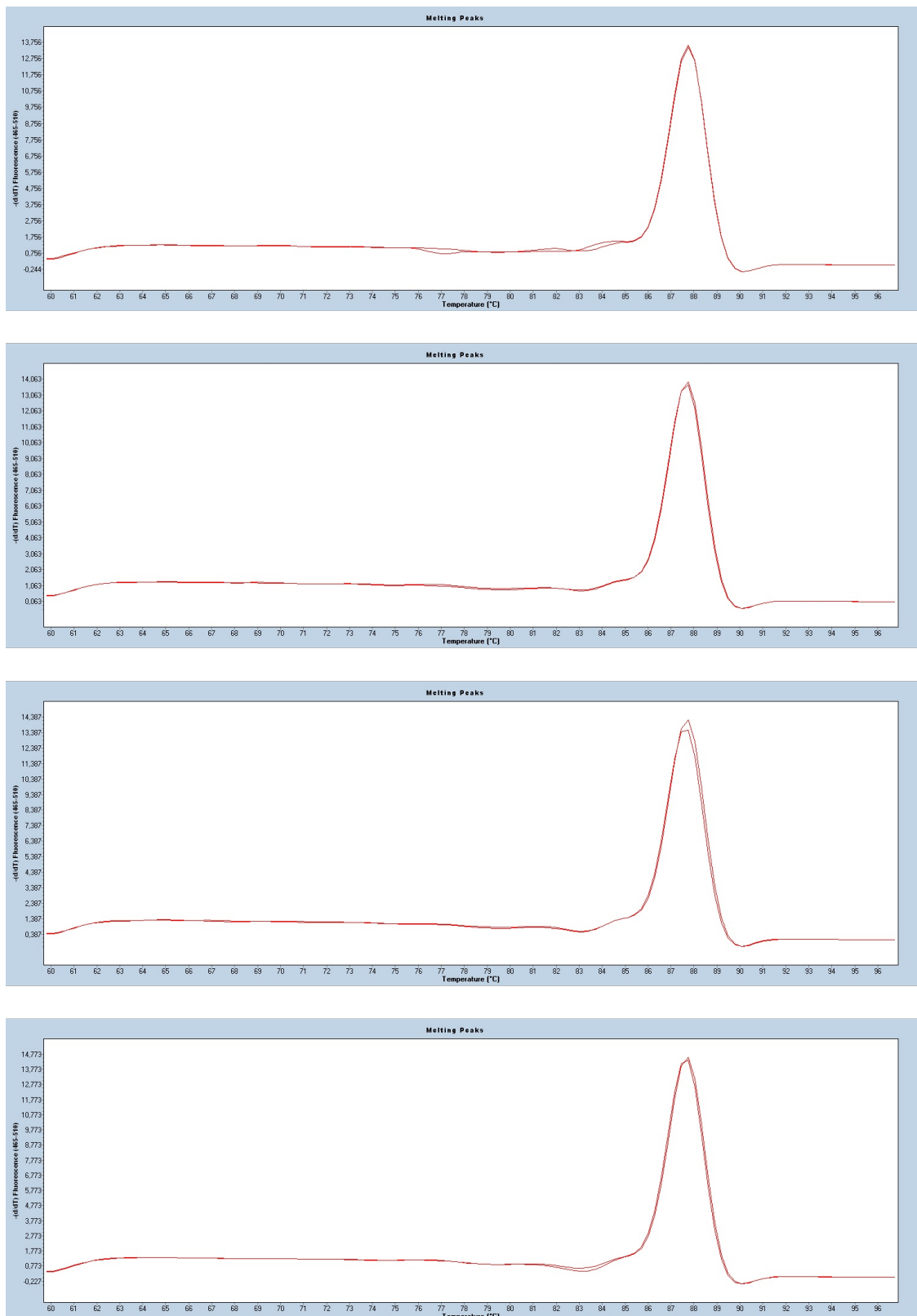


Abbildung 26: Zeigt die Schmelzkurven der einzelnen in Abbildung 25 dargestellten Proben während der ersten RT-PCR.

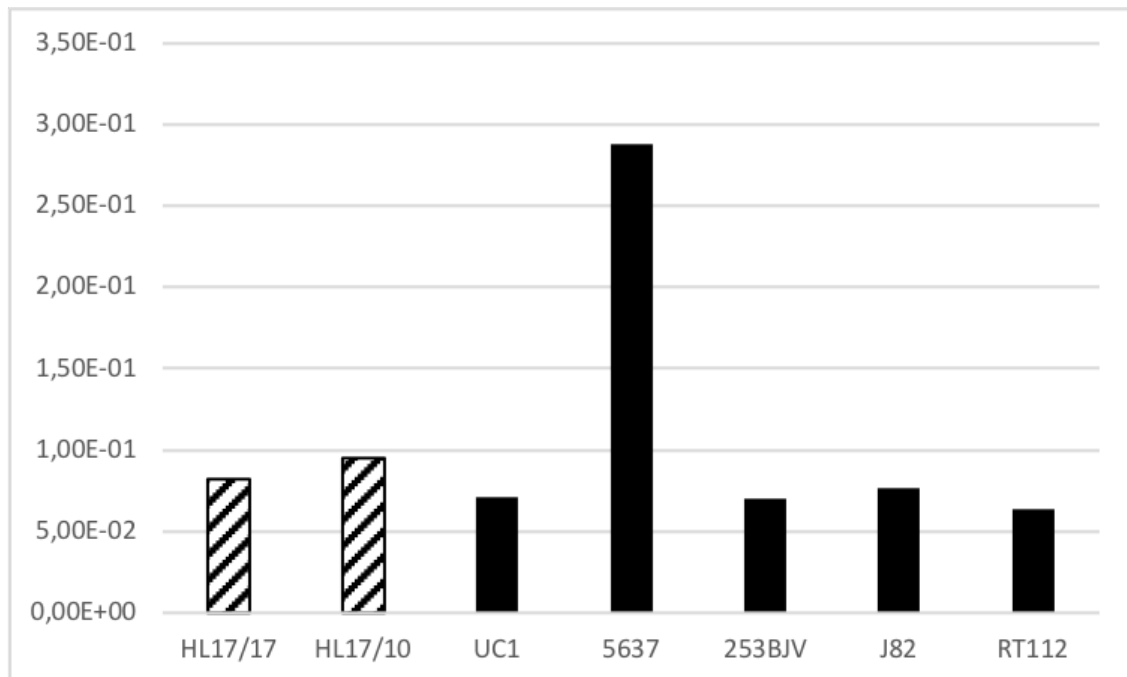


Abbildung 27: Gehalt der mRNA, bestimmt mittels RT-PCR von CD276 in den unterschiedlichen Zelllinien.

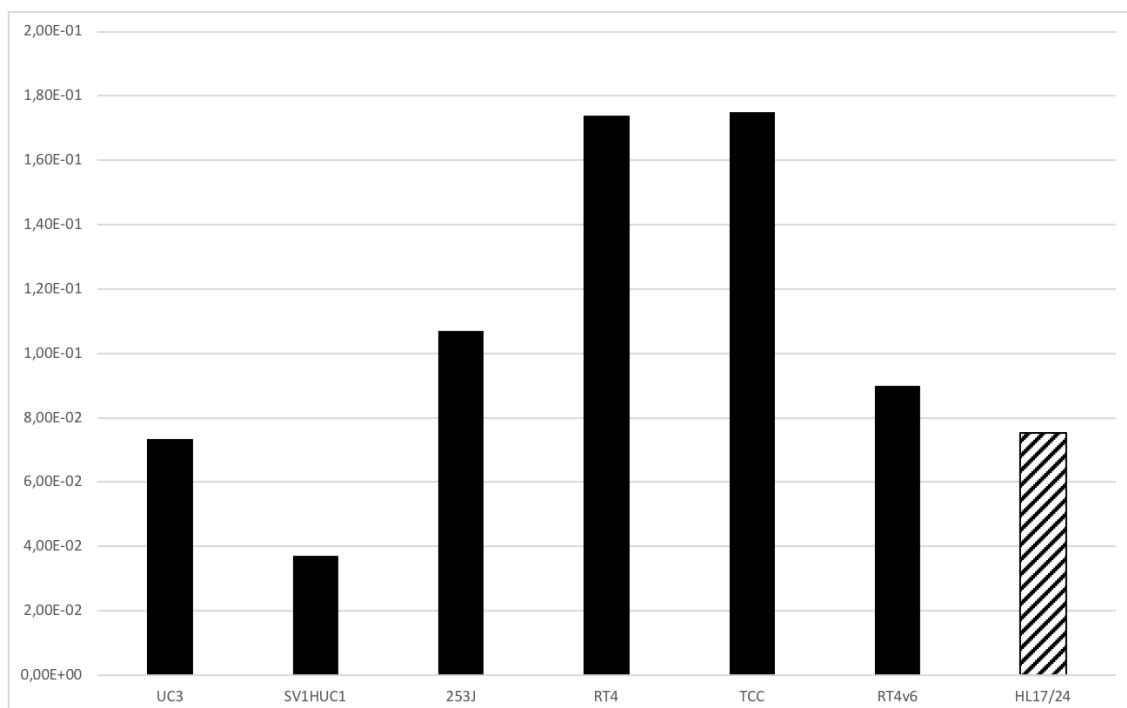


Abbildung 28: Gehalt der mRNA, bestimmt mittels RT-PCR von CD276 in den unterschiedlichen Zelllinien.

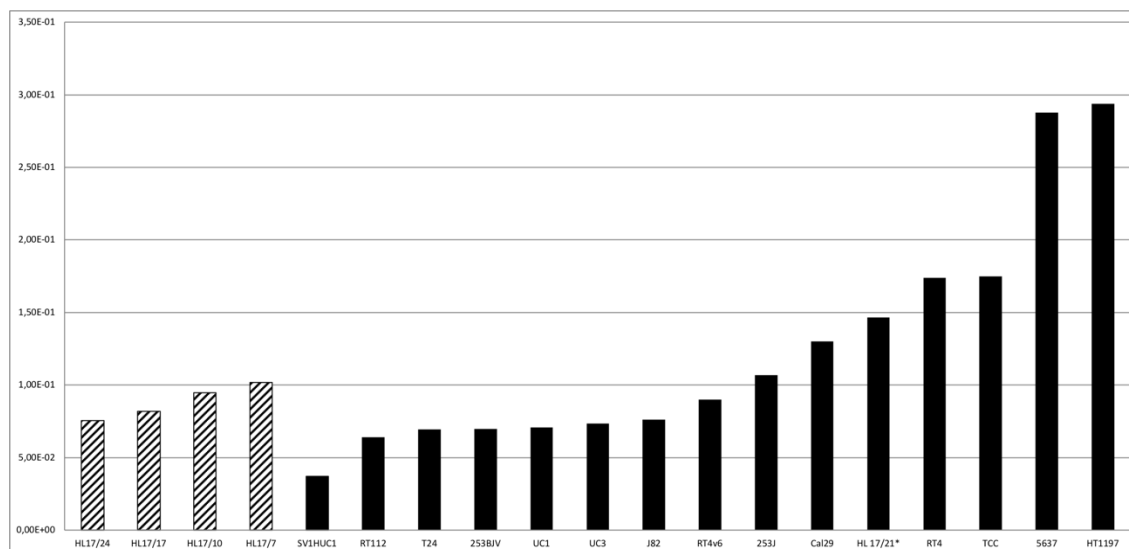


Abbildung 29: Übersicht der m-RNA-Expression der kontrollierten Zelllinien nach RT-PCR Analyse der Abbildung 24 Abbildung 28 im Vergleich zueinander.

Wie die Ergebnisse in Abbildung 29 deutlich zeigen, gibt es erhebliche Unterschiede in der Expression von CD276 in den verschiedenen Tumorzelllinien, geringere dagegen innerhalb der somatischen Urothelzelllinien auf mRNA-Ebene.

Auch hier lassen sich die Tumorzelllinien, wie oben schon bei dem Western Blot beschrieben in mehrere Gruppen einteilen. Man sieht, dass die Tumorzelllinie SV1HUC1 eine deutlich geringe Expression von CD276 aufweist als die übrigen Tumorzelllinien und auch als die, zur Kontrolle verwendeten somatischen Zellen. Es folgt eine Gruppe von Tumorzelllinien bei denen die Expression von CD276 auf nahezu zum gleichen Level liegt und immer noch unterhalb des Levels der somatischen Zellen. Zu dieser Gruppe zählen RT112, T24, 253BJV, UC1, UC3 und J82. Die nächste Gruppe bilden jene Tumorzelllinien, die im Vergleich zu den somatischen Linien eine leicht erhöhte Expression von CD276 aufweisen. Sie umfasst die Linien RT4v6, 253J, Cal29 und die von uns isolierte Blasenkrebslinie HL17/21. Die Gruppe der Tumorzelllinien welche eine mittelhohe Expression aufweist besteht aus der Linie RT4 und TCC. Zum Schluss zeigen sich noch zwei Tumorzelllinien, die sowohl im Vergleich zu den restlichen Tumorzelllinien, als auch im Vergleich zu den somatischen Zellen eine deutlich erhöhte Expression von CD276 auf mRNA-Ebene ausweisen. Dies sind die Tumorzelllinien 5637 und HT1197.

Während die Ergebnisse der RT-PCR in Abbildung 24 sehr deutlich mit den Ergebnissen, des ersten Laufes des Western Blots übereinstimmten, zeigten

sich in den Abbildung 27/Abbildung 28 doch erhebliche Unterschiede. Es zeigte sich, dass nicht bei allen Tumorklinen das Expressionslevel auf mRNA-Ebene mit dem Expressionslevel auf Proteinebene übereinstimmt. Man konnte sowohl Tumorklinen erkennen, bei denen es auf mRNA Ebene zu einer hohen Expression von CD276 kommt, es jedoch auf Proteinebene nur zu einer geringen Expression von CD276 kommt und umgekehrt. Gut zu erkennen ist dies z.B. bei den Tumorklinen TCC und 253J, diese weisen beim Western Blot eine sehr hohe Expression von CD276 auf Proteinebene auf, welche höher ist als die von 5637 und HT1197. Auf mRNA-Ebene liegen diese Linien jedoch nur bei einer mittleren Expression von CD276. Jedoch fällt deutlich auf, dass es sich bei den Tumorzellen so verhält, dass es eher zu einem höheren Level auf Proteinebene kommt und dafür eine geringe Expression auf mRNA- Ebene. Andersherum ist es nicht zu erkennen das eine hohe Expression auf mRNA-Ebene eine geringe Expression auf Proteinebene zur Folge hat.

5.7 RT-PCR Ergebnisse für ALDH1-A1,-A2 und -A3

Die RT-PCR, zur Analyse des mRNA Expression von ALDH1-A1, -A2 und -A3 wurde mit Tumorzellen durchgeführt, welche in MEM Earle's Medium + 10% FCS, 1% NEA, 1% NA+ Pyruvat und 0,1% Pen./Strep. kultiviert wurden. Für diesen Versuch wurde lediglich nur eine somatische Urothelzelllinie verwendet, welche in Keratinozyten Standardmedium mit 0,1% Pen./Strep. kultiviert wurde.

Diesen Versuch führten wir nicht mit allen, zuvor oben beschriebenen Tumorzelllinien durch, sondern wählten von jeder Gruppe von Tumorzelllinien Referenzzellen aus. Wir entschieden uns für sieben Zelllinien je nach Expressionslevel von CD276 auf mRNA-Ebene. Bei den ausgewählten Zellen handelte es sich um die Linien 5637, HT1197 (CD276 hoch), TCC, RT4 (CD276 mittel), RT112 (CD276 niedrig), und die Urothelzellen HL17/24 und HL17/21 als Kontrollen. Dies waren Linien die alle Spektren der CD276 Expression abdeckten, also hoch, mittel und niedrig exprimierende Tumorzelllinien.

Die Proben wurden dann durch qRT-PCR auf die Expression der ALDH1-Isoformen untersucht.

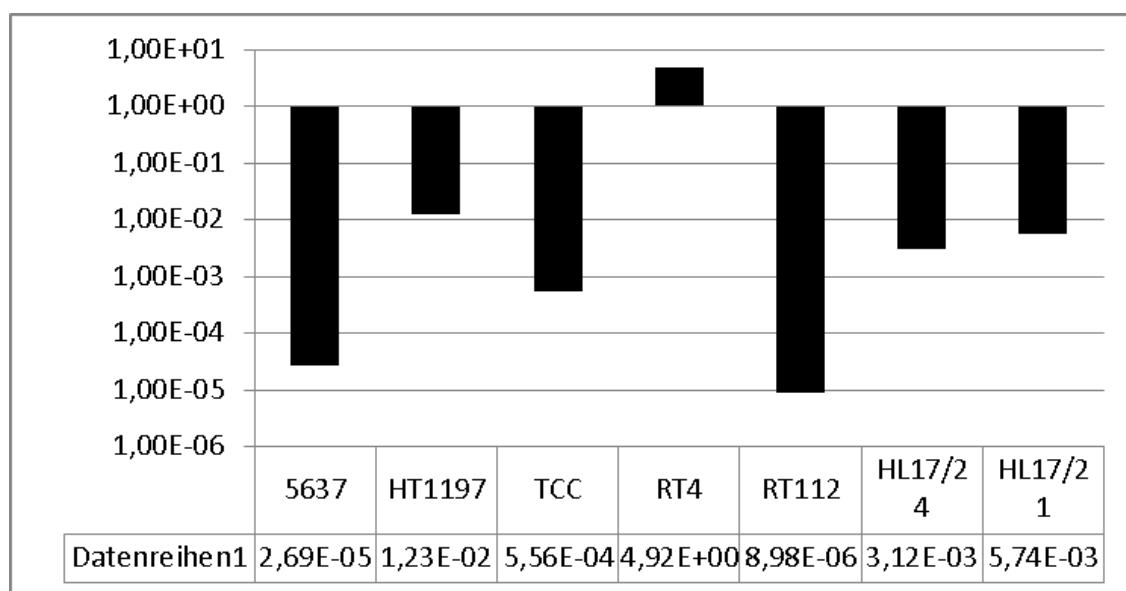


Abbildung 30: Zeigt die Konzentration von ALDH1-A1 auf mRNA-Ebene in den unterschiedlichen Zelllinien.

Wie die Abbildung 30 zeigt, haben wir ein deutlich positives Ergebnis auf ALDH1-A1 bei der Tumorzelllinie RT4, welche im Vergleich zu den restlichen Zelllinien deutlich erhöht ist.

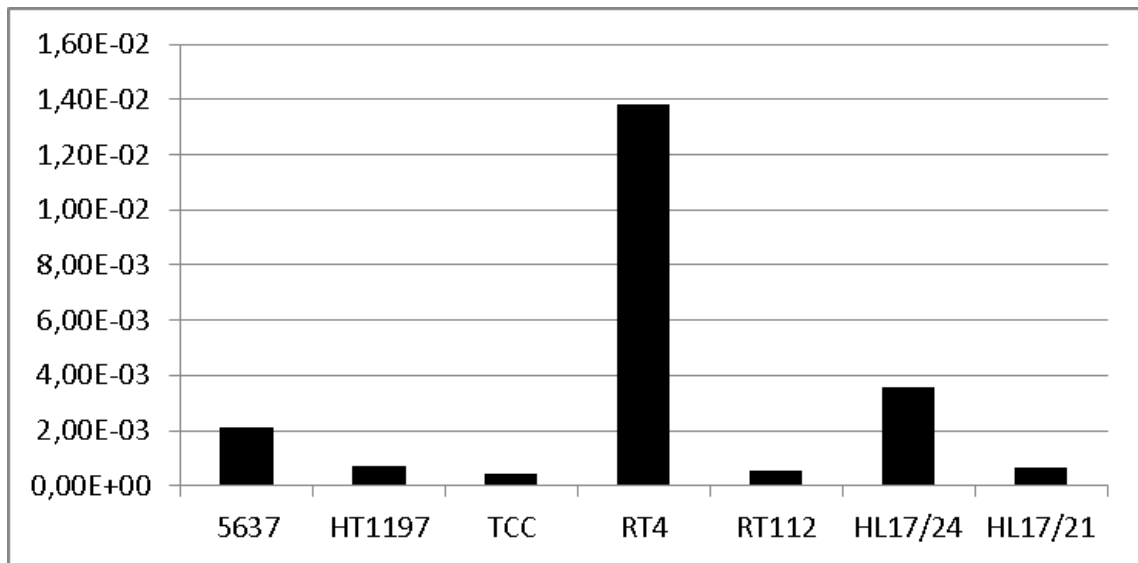


Abbildung 31: Zeigt die Konzentration von ALDH1-A2 auf mRNA-Ebene in den unterschiedlichen Zelllinien.

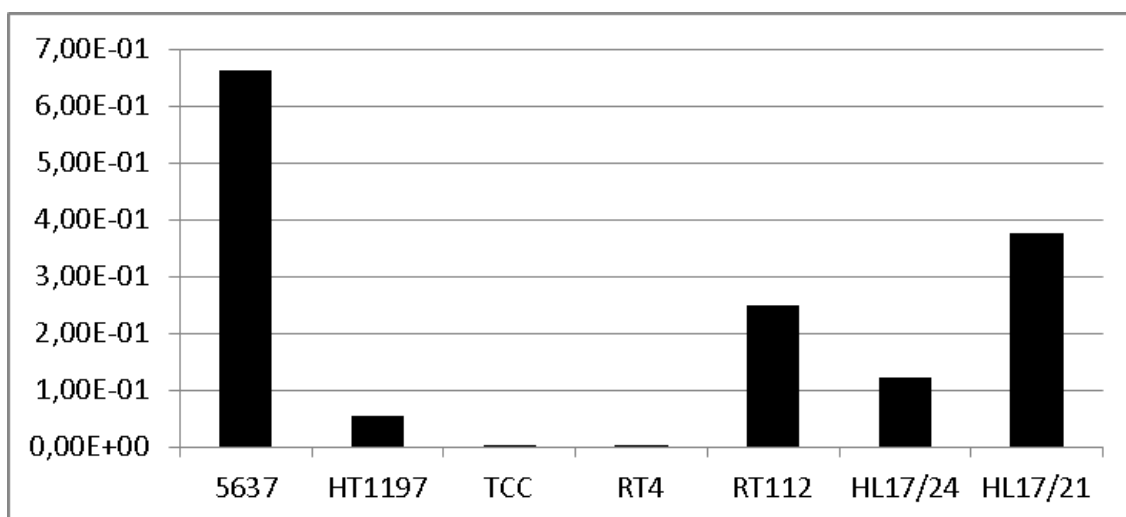


Abbildung 32: Zeigt die Konzentration von ALDH1-A3 auf mRNA-Ebene in den unterschiedlichen Zelllinien.

Es zeigt sich deutlich, dass bei der Tumorzelle RT4 die Expression von ALDH1-A1 und ALDH1-A2 im Verhältnis zu den restlichen Tumorzellen stark erhöht ist. Dies ist umso interessanter, wenn man sich die Zellmorphologie von RT4 in Erinnerung ruft (Abbildung 15 C), da es sich bei ALDH1 um einen Tumorstammzellmarker handelt und die Zellen von RT4 in Clustern wachsen. Teils wuchsen sie von einer einzelnen Zelle ausgehend und in mehreren Schichten übereinander und zeigten nicht das Verhalten der übrigen Tumorzellen, in die Breite zu wachsen. Nach den bereits in der Zellkultur beobachteten morphologischen Unterschieden von RT4 im Vergleich zu den restlichen Tumorzellen, ist es noch interessanter, dass ausgerechnet diese Tumorzelle eine hohe Expression der Stammzellmarker ALDH1-A1 und ALDH1-A2 zeigt. Jedoch erkennt man, dass RT4 nur eine ausgesprochen geringe Expression von ALDH1-A3 zeigt.

Abbildung 32 zeigt die Konzentration von ALDH1-A3 Transkripten und hier fällt auf, dass 5637 die höchste Expression von ALDH1-A3 ausweist, obwohl es für ALDH1-A1 und ALDH1-A2 nur eine sehr geringe Expression zeigt. Jedoch zeigte sich in der Zellkultur nicht ansatzweise ein ähnliches Verhalten, wie bei RT4, obwohl es sich auch bei ALDH1-A3 ebenfalls um einen Stammzellmarker handelt.

5.8 RT-PCR Ergebnisse von MMP-2 und MMP-9

Die RT-PCR, zur Analyse des mRNA Expression von MMP2 und MMP9 wurde mit Tumorzellen durchgeführt, welche in MEM Earle's Medium + 10% FCS, 1% NEA, 1% NA+ Pyruvat und 0,1% Pen./Strep. kultiviert wurden. Für diesen Versuch wurde lediglich nur eine somatische Urothelzelllinie verwendet, welche in Keratinozyten Standardmedium mit 0,1% Pen./Strep. kultiviert wurde.

Diesen Versuch führten wir mit acht Zelllinien, die auf Grundlage des Expressionslevels von CD276 ausgewählt wurden durch, um einen Querschnitt durch alle Expressionslevels zu bekommen. Wir entschieden uns auch hier für die Linien 5637, HT1197(CD276 hoch), TCC, RT4(CD276 mittel), SV1HUC1, RT112(CD276 niedrig), HL17/24 und HL17/21 als Kontrollen.

Die Proben wurden anschließend mit Hilfe einer qRT-PCR auf das Vorhandensein von MMP2 und MMP9 untersucht.

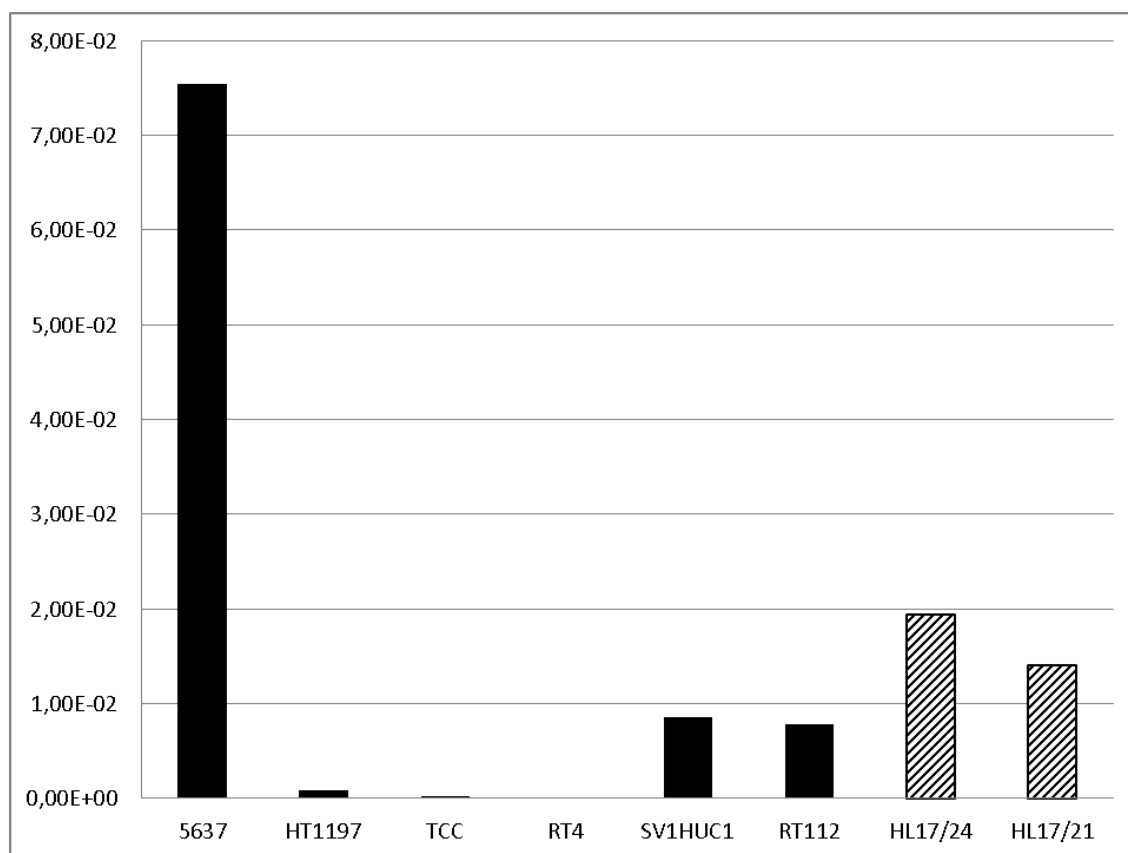


Abbildung 33: Zeigt den Gehalt von MMP2 in den einzelnen, untersuchten Zelllinien mittels RT-PCR im LightCycler®.

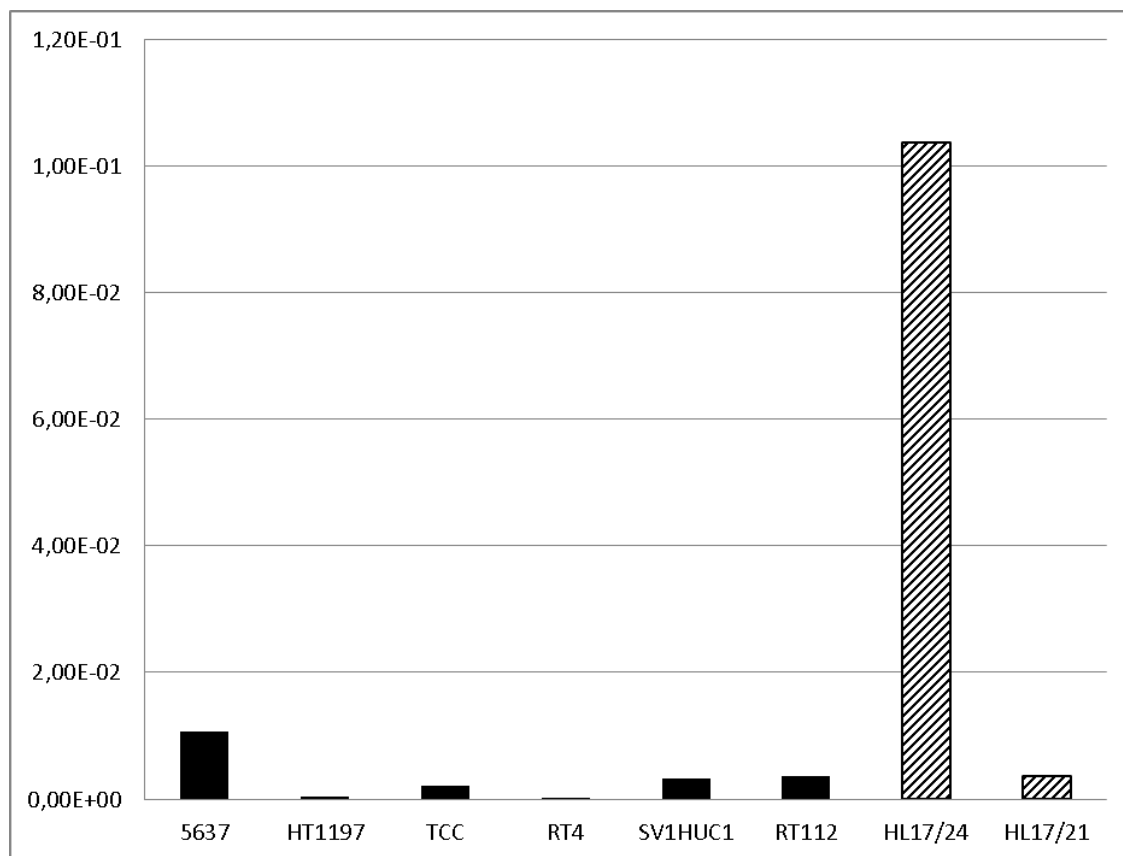


Abbildung 34: Zeigt den Gehalt von MMP9 in den einzelnen, untersuchten Zelllinien mittels RT-PCR im LightCycler®.

In den zwei Durchläufen zur Untersuchung von MMP2 und MMP9 ist jeweils, im Vergleich zu den anderen Linien ein Ausreißer zu erkennen. Im ersten Lauf, zur Bestimmung von MMP2 ist dies die Tumorzelle 5637 (Abbildung 33), welche eine deutlich erhöhte Expression von MMP2 im Vergleich zu den übrigen Linien zeigt.

Bei der Bestimmung des Gehaltes von MMP9 kann man erkennen, dass HL17/24 MMP9 im Vergleich zu den übrigen Linien erhöht transkribiert wird. Hier muss man jedoch auf die Skalierung des Diagramms achten, denn die Konzentration von MMP9 in der Linie HL17/24 ist in etwa genauso hoch wie die RNA-Menge von MMP2 in dieser Probe. Lediglich im Verhältnis zu den übrigen Proben wirkt dieser Wert stark erhöht.

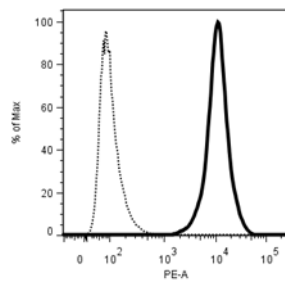
MMP2 und MMP9 gehören zu den Gelatinasen und sind für den Tumor wichtig, weil diese Proteasen den Abbau der EZM katalysieren und so zur Ausbildung von Metastasen beitragen können. Insbesondere ist dies bei dem Tumor 5637

interessant, denn dieser Tumor zeigt eine hohe Expression von MMP2. Unter Kulturbedingungen verhält sich dieser Tumor, nachdem er etwa eine Konfluenz von 50-60% erreicht hat so, dass man deutlich erkennen kann, dass sich einzelne Zellen bereits aus ihrem Verbund lösen und frei im Medium schwimmen. Diese Zellen wirken jedoch durch das Mikroskop betrachtet nicht abgestorben, sondern noch völlig vital.

Interessant sind die Ergebnisse der Expression von MMP2 und MMP9 auch in Bezug auf die Tumorklinie RT4, wenn man sie mit den Ergebnissen zur Bestimmung von ALDH1-Isoformen aus Abbildung 30 bis Abbildung 32 vergleicht. RT4 zeigt nämlich keinerlei Expression von MMP2 und nur eine sehr geringe Expression von MMP9. Besonders interessant sind diese Ergebnisse, wenn man sich die Kulturmorphologie von RT4 nochmal vor Augen führt. Diese Tumorklinie zeigt eine Bildung von Clustern und keine breite Ausbreitung der Zellen auf dem Boden der Kulturflasche.

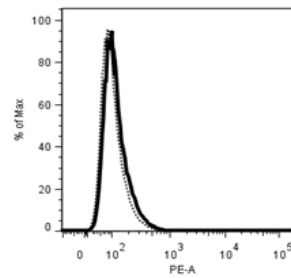
5.9 Durchflusszytometrie Expression von CD276 auf der Zelloberfläche

253BJV



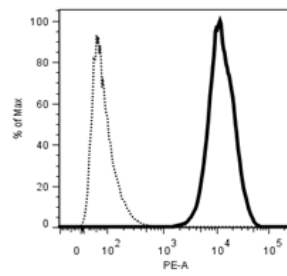
Sample Name	Mean, PE-A
Gorodetsky u Matthias CD276 253BJV CD276 PE fcs	1,14E4
Gorodetsky u Matthias CD276 Kontrolle 253BJV fcs	101

Isotypenkontrollen

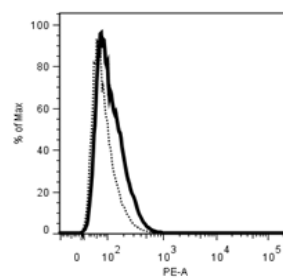


Sample Name	Mean, PE-A
Gorodetsky u Matthias CD276 253BJV IgG1 PE fcs	120
Gorodetsky u Matthias CD276 Kontrolle 253BJV fcs	101

5637

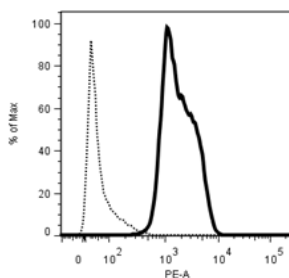


Sample Name	Mean, PE-A
Gorodetsky u Matthias CD276 5637 CD276 PE fcs	1,33E4
Gorodetsky u Matthias CD276 Kontrolle 5637 fcs	82,2



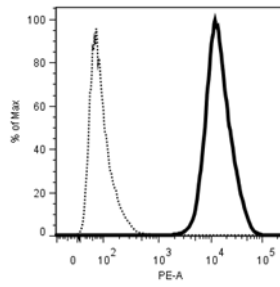
Sample Name	Mean, PE-A
Gorodetsky u Matthias CD276 5637 IgG1 PE fcs	121
Gorodetsky u Matthias CD276 Kontrolle 5637 fcs	82,2

HL 17/24

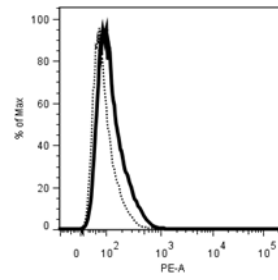


Sample Name	Mean, PE-A
Gorodetsky u Matthias CD276 HL17.5c.24 P3 CD.276 PE fcs	2120
Gorodetsky u Matthias CD276 Kontrolle HL17.5c.24 P3 fcs	55,5

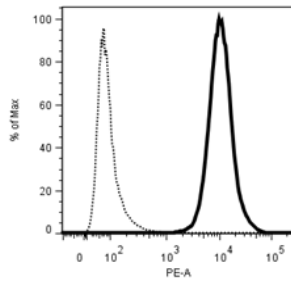
Abbildung 35: FACS Analysen von 253BJV, 5637 und HL17/24

HT1197

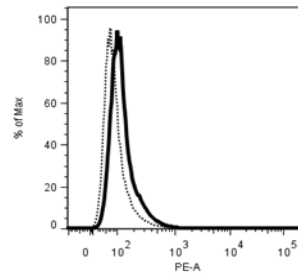
Sample Name	Mean, PE-A
Gorodetsky u Matthias CD276 HT1197 CD276 PE fcs	1.54E4
Gorodetsky u Matthias CD276 Kontrolle HT1197 fcs	92.5

Isotypenkontrollen

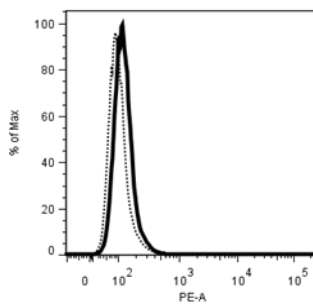
Sample Name	Mean, PE-A
Gorodetsky u Matthias CD276 HT1197 IgG1 PE fcs	142
Gorodetsky u Matthias CD276 Kontrolle HT1197 fcs	92.5

J82

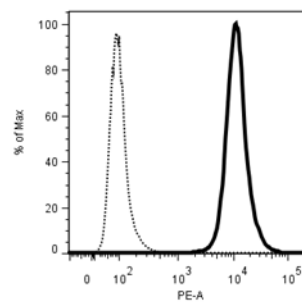
Sample Name	Mean, PE-A
Gorodetsky u Matthias CD276 J82 CD276 PE fcs	1.12E4
Gorodetsky u Matthias CD276 Kontrolle J82 fcs	91.5



Sample Name	Mean, PE-A
Gorodetsky u Matthias CD276 J82 IgG1 PE fcs	134
Gorodetsky u Matthias CD276 Kontrolle J82 fcs	91.5

TCC

Sample Name	Mean, PE-A
Gorodetsky u Matthias CD276 TCC IgG1 PE fcs	130
Gorodetsky u Matthias CD276 Kontrolle TCC fcs	95.9



Sample Name	Mean, PE-A
Gorodetsky u Matthias CD276 TCC CD276 PE fcs	1.19E4
Gorodetsky u Matthias CD276 Kontrolle TCC fcs	95.9

Abbildung 36: FACS Analyse von HT1197, J82 und TCC

Die Abbildung 35 und Abbildung 36 zeigen die Ergebnisse der FACS Analysen. Die jeweils linke Abbildung zeigt die Auswertung der Färbung mit anti-CD276 und damit die Anzahl der Oberflächenproteine pro Zelle und rechte zeigt die Isotypenkontrolle mit IgG1.

Durch den deutlichen Shift in den linken Abbildungen erkennt man, dass die Zellen deutlich positiv für CD276 sind. Hierbei gilt je größer der Shift, also der Abstand zwischen den beiden Kurven ist, desto mehr CD276 exprimiert diese Zelle auf der Oberfläche. Mit Hilfe eines zweiten Ansatzes (rechte Abbildung) lässt sich zeigen, dass IgG1 nicht unspezifisch, sondern spezifisch an die Zelloberfläche bindet. Sollte dies nämlich nicht der Fall sein, müsste man auch hier einen deutlichen Shift zwischen den ungefärbten (gestricheltes Histogramm) und den mit IgG1 gefärbten Zellen (durchgezogenes Histogramm) feststellen können.

5.10 RT-PCR von T24 Zellen nach Expansion in McCoy's 5A Medium

In der Literatur wurde T24 als eine Tumorzellenlinie beschrieben, welche eine hohe Expression von CD276 zeigt (Li, Guo et al. 2017). Diese Beobachtung konnten wir bei unseren Zellen in vitro nicht bestätigen. Jedoch wurde für die o.g. Studie ein anderes Medium, als unser standardmäßiges Kulturmedium verwendet. Um nun einen Einfluss des Mediums auf die Expression von CD276 und damit einen Unterschied zwischen unseren Ergebnissen und den publizierten Daten auszuschließen, wurden T24 in dem gleichen Medium expandiert, wie es in oben genannten Studie verwendet wurde und verglichen die Werte der RT-PCR mit den vorherigen Ergebnissen.

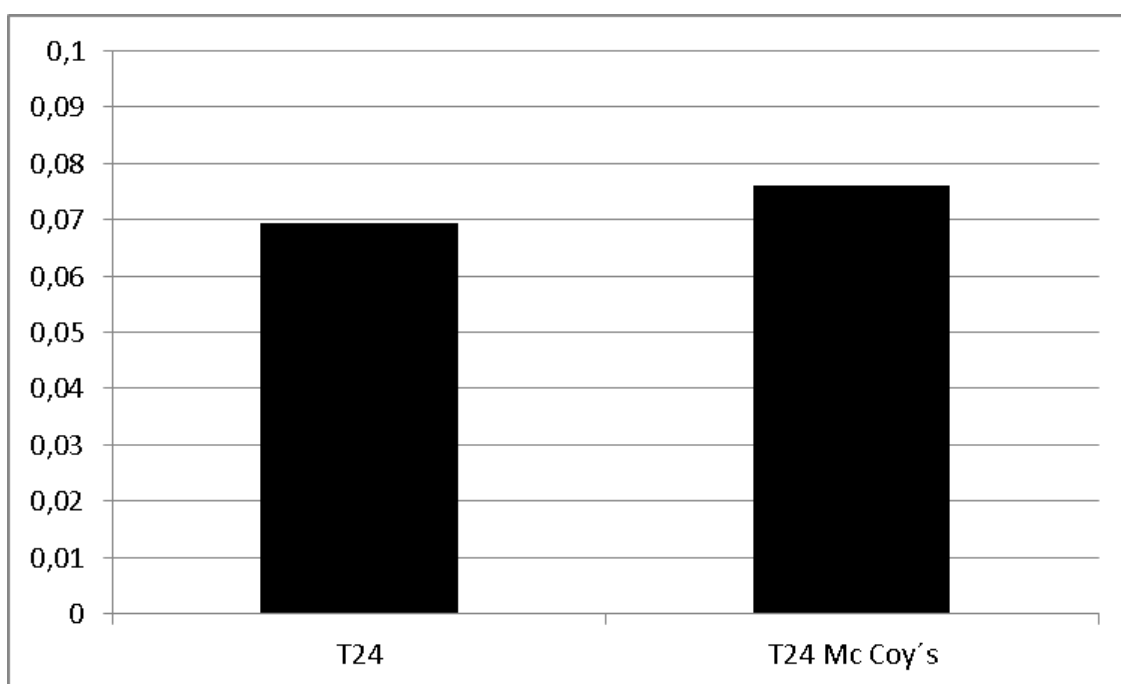


Abbildung 37: Vergleich der Expression von CD276 auf mRNA-Ebene zwischen T24 in MEM-Medium und T24 in McCoy's 5A Medium.

Bei unseren Versuchen stellten wir fest, dass es statistisch keinen signifikanten Unterschied des Expressionslevels von CD276 bei der Tumorzellenlinie T24, nach Expansion in beiden unterschiedlichen Medien gab. Folglich hat das McCoy's 5A Medium im Vergleich zu unserem Standardmedium keinen Einfluss auf die Expression von CD276. Damit können wir nicht bestätigen, dass es sich bei T24 um eine Tumorzellenlinie handelt, die eine hohe Expression von CD276 zeigt.

5.11 CD276 Nachweis mittels histologischem Microarray

Die mit anti-CD276 gefärbten histologische Mikroarrays wurden für diese Studie zur Verfügung gestellt. Die einzelnen Dot's wurden nach dem oben bereits beschriebenen Protokoll ausgewertet.

Bei der Auswertung der Microarray's konnte man bei den einzelnen Dot's deutliche Unterschiede in der Intensität der Färbung erkennen. Auch der Anteil der gefärbten Flächen innerhalb der Proben waren unterschiedlich groß.

Für jeden Dot wurde ein Score bestimmt, der zwischen 10-300 lag. Alles was unterhalb von 10 lag wurde als negativ gewertet.

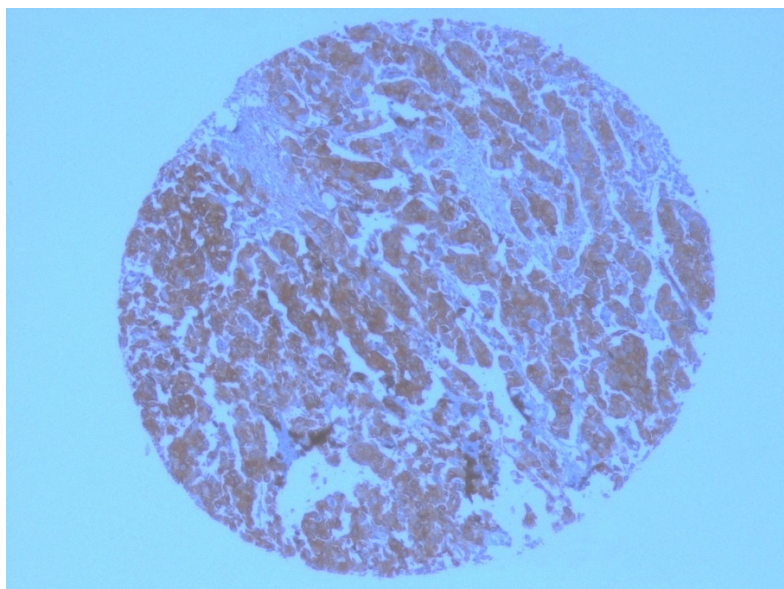


Abbildung 38: Hier sieht man einen exemplarischen Dot bei dem das gesamte Tumorgewebe mit einer Intensität von drei gefärbt ist. Da die gesamte Fläche gefärbt ist, ergibt sich der Score wie folgt $3 \times 100 = 300$.

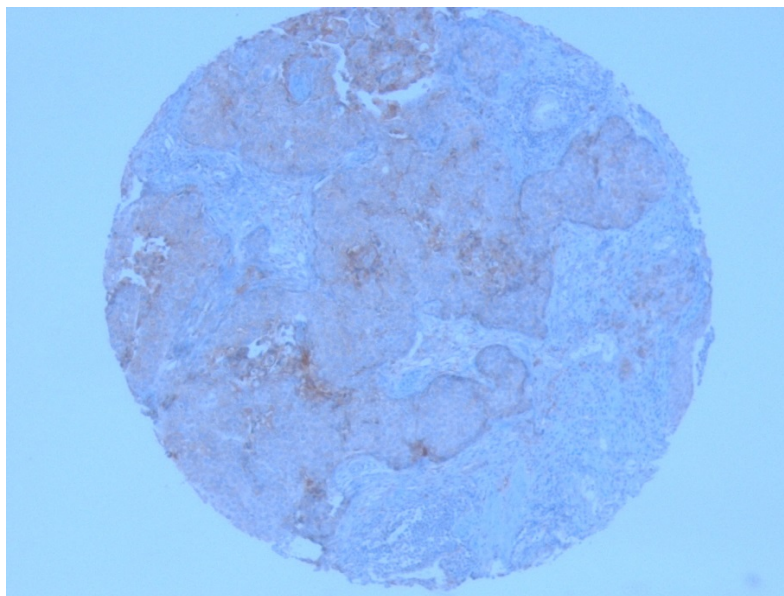


Abbildung 39: Hier sieht man einen exemplarischen Dot bei dem nicht das gesamte Tumorgewebe gefärbt ist.

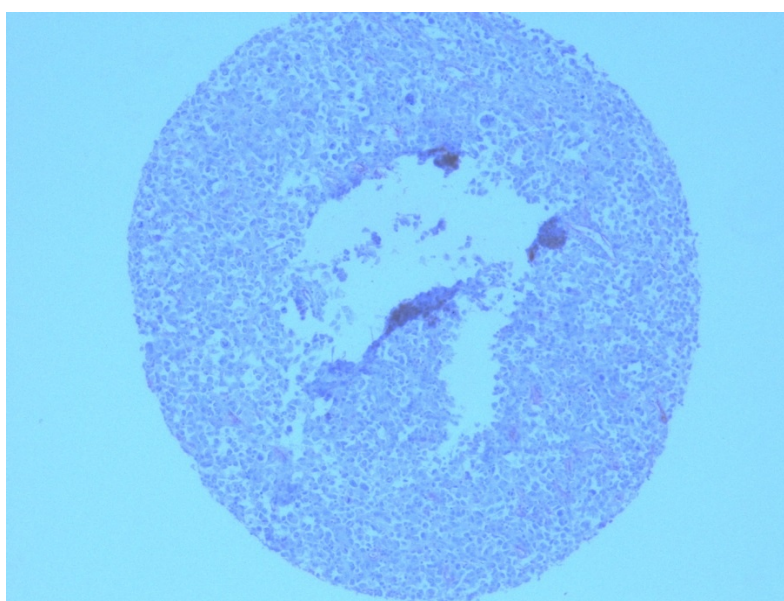


Abbildung 40: Hier sieht man einen Dot der somatisches Urothelgewebe darstellt.

Abbildung 38 zeigt hier eine Probe mit dem maximal erreichbaren Score von 300. Dies sagt aus, dass das gesamte Urothel aus dieser Probe mit einer sehr starken Intensität gefärbt ist.

Abbildung 39 zeigt einen Dot der Tumorgewebe enthält das nicht vollständig gefärbt ist. Bei den hier untersuchten Proben kam dieses Ergebnis jedoch nur selten vor. In den meisten Fällen war es so, dass wenn das Tumorgewebe gefärbt und damit positiv auf CD276 war das gesamte Tumorgewebe eine Färbung aufwies.

Abbildung 40 zeigt schließlich einen Dot der somatisches Urothelgewebe enthält. Hier erkennt man, dass das gesamte Gewebe negativ für CD276 ist und keine Färbung zu sehen ist.

5.11.1 Statistische Auswertung der Daten der histologischen Microarray's

Die von uns bestimmten Werte der CD276 Expression in den Gewebeproben wurden anschließend in die Datenbank der Universitätsklinik für Urologie, die uns von Herrn Hennenlotter zur Verfügung gestellt wurde eingetragen. Anschließend wurden die Daten dann mit der Hilfe von Herrn Neumann statistisch analysiert.

Als erstes Ergebnis ließ sich hierbei festhalten, dass die Expression von CD276 in Tumorgewebe signifikant höher ist als in benignen Gewebe (Abbildung 41 und Tabelle 18Tabelle 19).

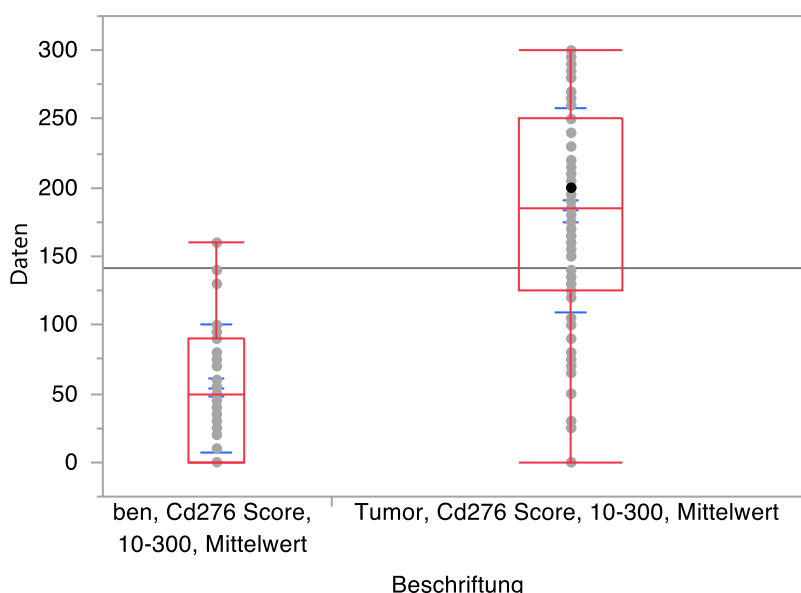


Abbildung 41: Zeigt die Scor's des benignen Gewebes auf der linken Seite und des Tumorgewebes auf der rechten Seite.

Tabelle 18: Mittelwerte und Std.-Abweichungen

Stufe	Anzahl	Mittelwert	Std.-Abw.	Std.-Fehler Mittelwert	95% KI unten	95% KI oben
Benigne, CD276 Score, 10-300, Mittelwert	47	53,936	46,2147	6,7411	40,37	67,51
Tumor, CD276 Score, 10-300, Mittelwert	99	182,980	74,3884	7,4763	168,14	197,82

Tabelle 19: Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation

Chi ²	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi ²
------------------	----------------	-----------------------------

Chi ²	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi ²
68,7728	1	<,0001*

Als nächstes Ergebnis ließ sich festhalten, dass die Expression von CD276 bei jedem Tumorstadium, bezogen auf das T-Stadium beginnend bei 2a-4b, im Vergleich zu dem benignen Gewebe erhöht war und sich die Expression zwischen den einzelnen Stadien nicht mehr veränderte (Abbildung 42 und Tabelle 21). Dies bedeutet, dass auch schon in sehr frühen Tumorstadien eine hohe Expression von CD276 zu beobachten war und diese bei fortschreitenden Tumorstadien nicht mehr zunimmt.

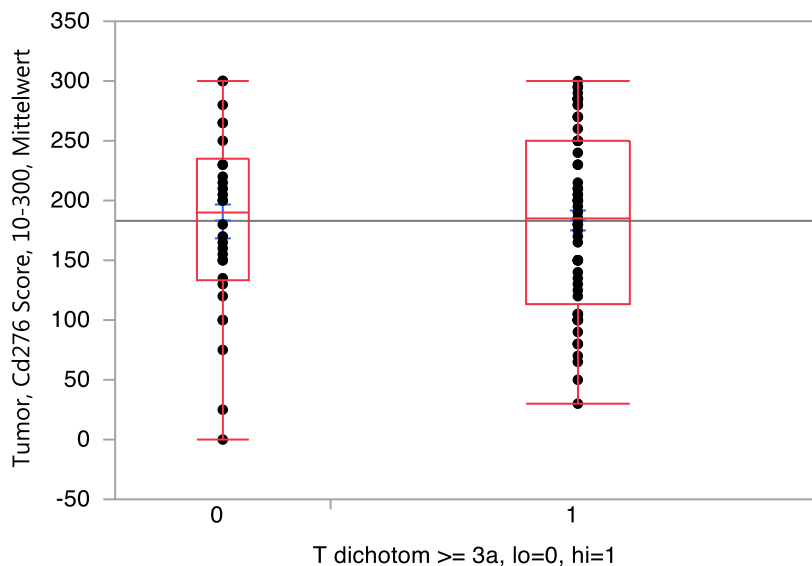


Abbildung 42: Einfaktorielle Analyse von Tumor, CD276 Score, 10-300, Mittelwert nach T dichotom $\geq 3a$, lo=0, hi=1

Tabelle 20: Mittelwerte und Std.-Abweichungen

Stufe	Anzahl	Mittelwert	Std.-Abw.	Std.-Fehler Mittelwert	95% KI unten	95% KI oben
0	30	182,833	77,4561	14,141	153,91	211,76
1	69	183,043	73,5958	8,860	165,36	200,72

Tabelle 21: Einfaktorieller Test, Chi-Quadrat-Approximation

Chi ²	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi ²
0,0307	1	0,8609

Abschließend lässt sich noch festhalten, dass bei fortgeschrittenen Tumoren, bezogen auf das T-Stadium das benigne Gewebe dieser Patienten eine signifikant erniedrigte Expression von CD276 im Vergleich zu anderem benignen Gewebe zeigte (Abbildung 43 und Tabelle 22/Tabelle 23).

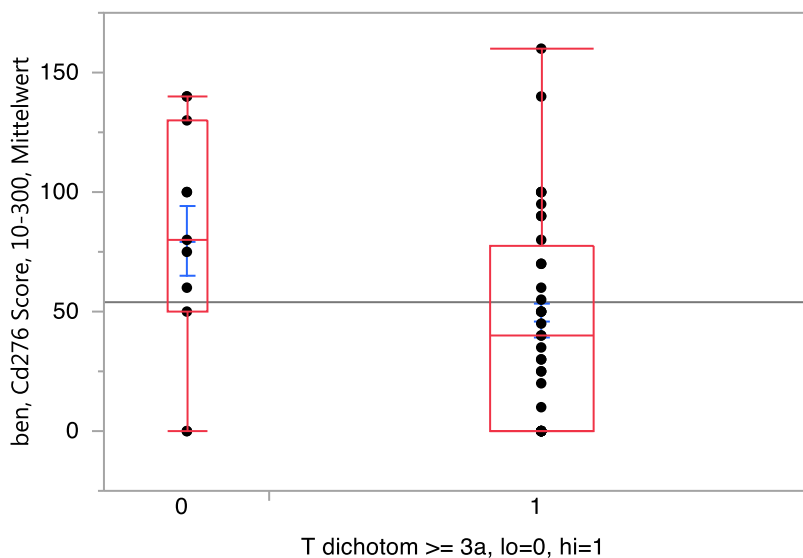


Abbildung 43: Einfaktorielle Analyse von ben, CD276 Score, 10-300, Mittelwert nach T dichotom >= 3a, lo=0, hi=1

Tabelle 22: Mittelwerte und Std.-Abweichungen

Stufe	Anzahl	Mittelwert	Std.-Abw.	Std.-Fehler Mittelwert	95% KI unten	95% KI oben
0	11	79,5455	49,6213	14,961	46,209	112,88
1	36	46,1111	42,8304	7,138	31,619	60,60

Tabelle 23: Einfaktorieller Test, Chi Quadrat-Approximation

Chi ²	Freiheitsgrade	Wahrsch. > Chi ²
4,1699	1	0,0411*

6 Diskussion

6.1 CD276 Expression und Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors

In den von uns durchgeführten Versuchen konnten wir keinen positiven Effekt zwischen einer erhöhten Expression von CD276 und einer erhöhten Wachstumsgeschwindigkeit von *in vitro* kultivierten Tumorzellen nachweisen. Es zeigte sich sogar eher das Gegenteil, dass eine geringere Expression mit einem schnelleren Wachstum korreliert. Zu Beginn dieser Studie bestand die Frage, ob die Expression von CD276 in den Tumorzellen mit dem Wachstum der Tumorzellen in Zusammenhang steht. Vorherige Studien hatten schon nahegelegt, dass es zwischen der Entstehung des Tumors und dessen Wachstum und der Expression von CD276 kein Zusammenhang besteht. Dies bedeutet, dass eine erhöhte Expression von CD276 nicht zwingend mit einem schnelleren Wachstum der Tumorzellen einhergeht (Seaman, Zhu et al. 2017). Um diesen Aspekt in dieser Arbeit zu überprüfen, untersuchten wir drei Tumorzellen. Wir benutzten die Linien HT1197, eine Tumorzellenlinie mit einer hohen Expression von CD276, Cal29 mit einer mittleren Expression und T24, mit einer niedrigen Expression um die Hypothese zu prüfen. Interessant ist hierbei auch, dass bei unseren T24 Linien nur eine geringe Expression von CD276 festgestellt werden konnte. In der Literatur war diese Linie jedoch mit einer hohen Expression von CD276 beschrieben worden (Li, Guo et al. 2017). Abbildung 9 zeigt, dass es bei unserer Studie, *in vitro* zu keiner Korrelation zwischen einer erhöhten Expression von CD276 und einem schnelleren Tumorzellenwachstum kommt. Man kann sogar erkennen, dass die erhöhte Expression von CD276 bei HT1197 mit einem verlangsamten Tumorzellenwachstum einhergeht. Da wir jedoch für diesen Versuch nur drei verschiedene etablierte Tumorzellenlinien verwendeten, könnte es sich bei diesen Ergebnissen auch um einen Zufall handeln. Dieser Aspekt wird daher in weiteren Untersuchungen genauer geprüft.

Sollten sich diese Ergebnisse jedoch in weiteren Studien bestätigen, könnte man vielleicht hieraus schließen, dass es bei den Tumorzellen verschiedene Strategien gibt, um sich möglichst effektiv im menschlichen Körper zu entwickeln. Wenn man sich nun nochmal den Effekt von CD276 als Immunmodulator (Chen, Mo et al. 2017) im Körper in Erinnerung ruft, sind zwei möglichen Strategien gut nachzuvollziehen. Hier könnte man vermuten, dass

Tumorzellen der Linie HT1197, welche ein langsames Wachstum haben, eine Strategie brauchen, um vor dem Immunsystem möglichst lange verborgen zu bleiben. Die hohe Expression von CD276 und die damit verbundene immunmodulatorische Funktion, würde dem Tumor möglicherweise helfen, möglichst lange unentdeckt vom Körper zu wachsen.

Anders verhält sich dies bei den Tumorzellen der Linie T24. Diese weisen ein schnelles Wachstum und nur eine geringe Expression von CD276 auf. Hier lässt sich vermuten, dass durch die Transformation dieser Tumorklinie hohe Proliferationsraten ermöglicht sind und damit große Raumforderungen begünstigt werden. Zudem könnten dadurch im Tumor liegende Zellen vor dem Immunsystem geschützt werden, zugleich bedeutet dies aber auch Hypoxie im Inneren, falls nicht durch Vaskularisierung die Tumormasse ausreichend versorgt bzw. entsorgt wird. Wichtig in diesem Zusammenhang ist jedoch auch, dass etablierte Tumorklinien Artefakte sind, welche über Jahre der Expansion in Labors und Repositorien natürlich auf die schnell wachsenden Zellen selektiert worden sind. Somit präsentieren sie nur einzelne oder einige Aspekte der Ätiologie und Pathologie eines Tumors. Solche Zellen können im Verlauf der Zeit auch Unterlinien ausbilden, wie an der etwas unterschiedlich hohen Expression von der CD276 auf der „Tübinger T24 Linie“, welche im Jahr zuvor von Helmholz-Zentrum in Braunschweig karyotypisiert und als *bona fide* T24 eingestuft worden ist und der T24 Linie aus Kanada, zu erkennen ist.

6.2 Immunfluoreszenz

Bei denen von uns untersuchten Zellen konnten wir die Expression von CD276 auf der Zelloberfläche der Tumorzellen nachweisen, auf den somatischen Urothelzellen jedoch nicht. Zu Beginn dieser Arbeit, verwendeten wir ein Protokoll zur Immunfluoreszenzfärbung, welches keinen Antigenretrieval Schritt beinhaltete. Hierbei waren die Ergebnisse jedoch nicht zufriedenstellend. Nach der Umstellung auf ein anderes Protokoll konnten wir, wie zu erwarten war, deutliche Fluoreszenz auf der Oberfläche der Zellen nach der Inkubation mit dem monoklonalen Maus anti-CD276 Antikörper (6A1 ab105922), feststellen. Zur Kontrolle verwendeten wir einen polyklonalen Hasen Antikörper gegen β -Aktin (Ab8227).

Auch hier verwendeten wir, wie bei der Bestimmung der Proliferationsrate, die Tumorklinien HT1197, Cal29 und T24 und dazu noch die somatische Urothellinie HL17/17. Da man bei den Tumorklinien, sowohl bei der niedrig exprimierenden,

als auch bei der hoch exprimierenden Linie deutliche Fluoreszenz erkennen konnte und dies auch bei einer zweiten Färbung bestätigt werden konnte, gehen wir davon aus, dass CD276 auf den im Rahmen der vorliegenden Studie noch nicht untersuchten Tumorklinien ebenfalls mit diesem Protokoll anzufärben sein sollte. Überraschend war hier jedoch das Ergebnis der somatischen Urothelzellen HL17/17, da diese Zellen bei der Immunfluoreszenzfärbung kein Signal von CD276 auf der Oberfläche der Zellen zeigten. Dies ist auffällig, da bei der RT-PCR CD276 mRNA nachgewiesen werden konnte.

Hier könnte es sein, dass es nach der Transkription des CD276 Gens zu mRNA zu einer posttranskriptionellen Modifikation kommt und die Zellen CD276 daher nicht auf der Oberfläche präsentieren. Wie in der Literatur schon beschrieben wurde, könnte diese durch miR29 reguliert werden (Xu, Cheung et al. 2009), welche an die CD276 messenger-RNA binden und somit die Translation von CD276 verhindern kann. Dieser Mechanismus würde den Befund erklären, weshalb wir CD276 zwar in der RT-PCR aber nicht auf der Oberfläche nachweisen konnten. Um diese Hypothese zu überprüfen, sollten im Rahmen der nachfolgenden Studien mit HL17/17 ein Western Blot durchgeführt und die Expression von miRNA29 untersucht werden.

6.3 Morphologie der Zellen

Wie oben bereits in Abbildung 15 beschrieben, gibt es unter den verschiedenen Tumorklinien deutliche Unterschiede in der Morphologie der Zellen in Kulturfläschchen. Dabei fällt besonders die Tumorklinie RT4 auf. Während die Zellen aller anderen Tumorklinien möglichst rasch in die Breite wuchsen und sich somit einschichtig über den gesamten Boden der Kulturflasche ausbreiteten, wuchsen die Zellen der Linie RT4 in Clustern, mehrschichtig übereinander. Da wir zu Beginn nur eine sehr geringe Anzahl von Zellen hatten und diese sehr vereinzelt waren, fiel auf, dass sich diese Cluster aus nur einer einzelnen Zelle oder einigen wenigen Zellen entwickelten. Da die Linie RT4 eine hohe Expression von ALDH1-A1 und ALDH1-A2 zeigt lässt sich vermuten, dass es sich bei diesen Zellen um Tumorstammzellen handelt und sich die weiteren Zellen des Clusters aus dieser einzelnen Stammzelle entwickelt haben.

Interessant ist hier auch, dass RT4 keine Expression von MMP2 und nur eine sehr geringe Expression von MMP9 zeigt. Diese beiden Gelatinasen sind für einen Tumor jedoch sehr wichtig um Metastasen zu bilden (Visse and Nagase 2003), da sie die den Tumor umgebende EZM abbauen und es dem Tumor so ermöglichen sich in andere Bereiche des Körpers neu anzusiedeln. Es lässt sich vermuten, dass diese Tumorklinie nur eine geringe Expression von Faktoren

zeigt die eine Metastasierung ermöglichen und der Tumor so darauf angewiesen ist, sich aus einer einzelnen Zelle neu zu bilden.

Es könnte sein, dass RT4 Zellen Rezeptoren und Liganden zur Zell-Zell-Bindung, oder Rezeptoren und ECM-Komponenten hochexprimieren und dadurch die Clusterbildung gegenüber der Ausbreitung in vitro begünstigt wird.

Diese Vermutung wird auch durch das Verhalten der Zellen während des Ablösens vom Boden der Kulturflaschen bestärkt. Gibt man eine Protease wie TrypLE Express auf die Zellen und lässt es 1 min im Inkubator ohne es zu schütteln stehen, erkennt man, dass sich die Zellen zwar vom Boden lösen, aber immer noch als Cluster zusammenhängen und wie Plaques auf der Lösung schwimmen. Erst nach leichtem schütteln lösen sich die Zellen voneinander. Dies lässt vermuten, dass starke Zellverbindungen zwischen den Zellen bestehen. Diese Hypothese muss jedoch in separaten Experimenten spezifisch untersucht werden.

6.4 Vergleich CD276 auf Proteinebene mit Transkriptionslevel

Wie die Ergebnisse des Western Blots gezeigt haben, gibt es deutliche Unterschiede zwischen den Tumorklinien in Bezug auf deren Expression von CD276 auf Proteinebene. Es gibt hier jene Tumorklinien, die eine geringere Expression von CD276, im Vergleich zu den somatischen Linien zeigen, jene die geringe Expression von CD276 zeigen, die die eine mittlere Expression von CD276 aufweisen und eine weitere Gruppe die eine hohe Expression von CD276 zeigen.

Wie im oberen Teil zur Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen Linien bereits beschrieben, könnte es sich bei den unterschiedlichen Expressionshöhen der Tumorklinien für CD276 um verschiedene Mutationen und damit abweichende Strategien der Tumoren handeln, um sich möglichst effektiv im Körper zu etablieren und später dann eine Ausbreitung im Körper begünstigen.

Wenn man nun das Expressionslevel von CD276 auf Proteinebene mit dem auf mRNA-Ebene vergleicht, fallen bei einigen Tumorklinien deutliche Diskrepanzen auf. Am auffälligsten ist dies bei der Tumorklinie TCC, diese liegt auf mRNA-Ebene nur bei einer mittleren Expression von CD276. Betrachtet man nun jedoch die Ergebnisse des Western Blots für diese Tumorklinie fällt auf, dass sie mit Abstand die höchste Expression an Gesamtprotein von CD276 aufweist. Zudem lässt sich in der Durchflußzytometrie auf TCC auch eine hohe CD276 Expression nachweisen. Ähnlich verhält sich dies bei der Linie 253J welche

trotz einer geringen Expression auf mRNA-Ebene, die zweithöchste Expression von CD276 auf Proteinebene im Western Blot zeigte.

Es fällt auf, dass es sich bei denen von uns untersuchten Fällen jedoch nur so verhält, dass eine geringe Expression auf mRNA-Ebene für eine hohe Expression auf Proteinebene ausreichen kann, aber niemals eine hohe Expression auf mRNA-Ebene eine geringere Expression auf Proteinebene zur Folge hat. Daraus kann man schließen, dass der Effekt der miRNA keinen wesentlichen Effekt auf die Proteinexpression bei den von uns bisher untersuchten Tumorklinen hat.

Nun lässt sich vermuten, dass bei diesen Linien entweder der Gehalt an CD276 regulierender miRNA's sehr gering ist und somit die CD276 mRNA sehr effektiv in Protein translatiert werden kann, oder die Tumorzellen einen Weg gefunden haben, selbst mit einer geringen Konzentration von mRNA eine hohe Konzentration von CD276, auf der Oberfläche der Tumorzellen zu produzieren.

Eine weitere Möglichkeit, mit deren Hilfe die Tumorzellen in der Lage wären, eine hohe Expression von CD276 auf Proteinebene zu gewährleisten wäre es, trotz des Vorhandenseins von miRNA und der damit verbundenen geringeren Expression von CD276 möglichst effektiv jedes mRNA Molekül zu translatieren. Dies könnte wie folgt erklärt werden; Innerhalb bestimmter mRNA kann es bestimmte Sequenzen geben, welche für die Instabilität der mRNA verantwortlich sind. Hierbei handelt es sich um eine AU-reiches Nonamer (Muller, Slor et al. 1992, Zubiaga, Belasco et al. 1995). Durch diesen AU-reichen Abschnitt wird die mRNA instabil, wodurch sie wesentlich schneller abgebaut wird, als jene mRNA die nicht über diesen Abschnitt verfügt. Durch eine Punktmutation des CD276 Gens in diesem Nonamer könnte also eine stabilere mRNA zur Expression kommen. Dies würde bedeuten, dass ein einzelnes mRNA Molekül viel häufiger translatiert werden kann und so viel Protein aus nur wenig mRNA entstehen würde. Dies würde die Diskrepanz zwischen einem relativ geringem mRNA-Level und einer höheren Proteinexpression erklären, falls die biologisch nutzbare Halbwertszeit für CD276 in der Tat durch RNA-Instabilitätssequenzen moduliert wird. Ein daraus resultierender Vorteil für den Tumor wäre der erniedrigte Energieverbrauch innerhalb der Zelle. Der Effekt kommt dadurch zustande, dass wesentlich seltener das Gen von CD276 in mRNA transkribiert werden muss.

Eine weitere Ebene der Regulation der CD276 Expression wird ebenfalls durch die miRNA's ermöglicht. MiRNA's können den mRNA-Abbau katalysieren. Dieser Mechanismus kann jedoch nicht die in diesen Zellen gemessene, vergleichsweise hohe Expression von CD276 Protein bei geringer

Transkriptmenge erklären. Hier müssen weitere Tests im Rahmen von nachfolgenden Studien und mit anderen Methoden durchgeführt werden.

6.5 Vergleich CD276 Expressionslevel mit ALDH1 und MMP

Vorherige Studien hatten gezeigt, dass ALDH1 als Stammzellmarker für Tumorstammzellen dienen kann (Tomita, Tanaka et al. 2016). Dies wurde in weiterführenden Studien benutzt, um Tumorstammzellen unterschiedlicher Tumorkonstruktionen zu identifizieren und auf deren Konzentration von ALDH1 zu untersuchen. Der Grund, warum es wichtig ist, diesen Gehalt an Tumorstammzellen zu identifizieren liegt darin, dass vorangegangene Studien vermuten lassen, dass die Resistenz der Blasen Tumoren gegen herkömmliche Chemotherapie auf das Vorhandensein von Tumorstammzellen zurückzuführen ist. Dies würde auch bedeuten, dass es selbst bei einer operativen Entfernung des Tumors reicht, wenn nur einzelne Stammzellen zurückbleiben ein mögliches Rezidiv sehr wahrscheinlich ist (Hanahan and Weinberg 2011). Dies hängt vermutlich mit der Tatsache zusammen, dass Tumorzellen mit einer erhöhten Expression von ALDH1 eine gesteigerte Fähigkeit zur Migration und Invasion zeigen.

Um dies zu bestätigen, untersuchte eine Studie aus dem Jahr 2012 drei Tumorkonstruktionen, welche auch uns vorliefen, auf den Gehalt von ALDH1. Dabei handelte es sich um die Konstruktionen 5637, TCC-SUP und T24. Das interessante war, dass die Konstruktionen 5637 und T24 gegen eine Chemotherapie mit Cisplatin immun sind. Während dieser Studie stellte sich heraus, dass die Konstruktionen 5637 und T24 eine höhere Expression von ALDH1 im Vergleich zu TCCSUP aufwiesen siehe Abbildung 30 bis Abbildung 32 (Falso, Buchholz et al. 2012).

Bei unserer RT-PCR Analyse der Expression von ALDH1 benutzten wir unter anderem auch die Tumorkonstruktionen 5637 und TCC. Hier zeigte sich bei uns jedoch im Vergleich zu der Tumorkonstruktion RT4 ein anderes Ergebnis. Die Expression von ALDH1-A1 und auch ALDH1-A2 war hier um bis zu vier Zehnerpotenzen im Vergleich zu RT4 geringer. Auch zeigte hier die Tumorkonstruktion HT1197 eine höhere Expression von ALDH1-A1. Lediglich bei ALDH1-A3 zeigt 5637 die höchste Konzentration der untersuchten Tumorkonstruktionen. Aufgrund dieser Ergebnisse können wir für unsere Experimente nicht bestätigen, dass es sich bei 5637 in vitro zwingend um einen Tumor mit einer hohen Expression von ALDH1 handelt. Möglicherweise gibt es hier jedoch auch Unterschiede in der Zellkultur oder in der Analysemethode, welche einen Einfluss auf die Expression von ALDH1 haben, da in der vorher erwähnten Studie ein anderes Medium verwendet wurde. Möglicherweise gibt es auch Unterschiede in der

verwendeten Methode, welche für eine unterschiedliche Ergebnislage verantwortlich sind.

Wie in der Arbeit von (Falso, Buchholz et al. 2012) berichtet soll eine erhöhte Expression von ALDH1 zu einer verstärkten Migration und Invasion der Tumorzellen führen. Ein entscheidender Schritt bei der Metastasierung von Tumoren, stellt jedoch auch die Fähigkeit der Tumoren dar, die sie Umgebende EZM umzubauen und abzubauen (Mook, Frederiks et al. 2004). Da wir auch die Expression von MMP2 und MMP9 für die Tumorklinien 5637 und TCC untersuchten konnten wir diese Ergebnisse miteinander vergleichen.

Es zeigte sich, dass die Tumorklinie 5637 eine extrem hohe Expression von MMP2 aufweist und nur eine gering erhöhte Expression von MMP9. Anders verhält es sich bei TCC, diese Tumorklinie zeigt sowohl für MMP2, als auch bei MMP9 nur eine geringe Expression. Ähnlich verhält es sich bei der Tumorklinie RT4, welche eine extrem hohe Expression von ALDH1-A1 und ALDH1-A2 zeigt. Für MMP2 zeigt sich hier gar keine Expression und für MMP9 ein extrem geringe.

Nun lässt sich diskutieren, ob die vorher beschriebene, gesteigerte Migration und Invasion von 5637 und T24 nicht auf einer hohen Expression von MMP2 und MMP9 beruht und nicht auf der erhöhten Expression von ALDH1. Diese Annahme beruht auch auf der Tatsache, dass RT4 die höchste Expression von ALDH1-A1 und ALDH1-A2 zeigt, jedoch fast keine Expression der Gelatinasen, obwohl diese nachweislich eine ausgesprochen wichtige Rolle in der Entstehung von Metastasen einnehmen. Auch zeigt diese Linie wie bereits oben beschrieben keine schnelle Ausbreitung auf dem Boden der Kulturflaschen, wobei es sich nur um eine subjektive Beobachtung handelt.

Um diese Vermutung jedoch zu bestätigen müsste man weiterführende Tests durchführen. Zum einen müsste man T24 auf die Expression von ALDH1 und auch die Expression von MMP2 und MMP9 untersuchen. Die Linie RT4 sollte auf die Expression weiterer Enzyme untersucht werden, die eine Metastasierung dieser Tumorzellen ermöglichen, wie z.B. MMP3, um sicherzustellen, dass dieser Tumorzellen nicht diese Protease hoch exprimieren und so in der Lage sind Metastasen zu bilden. Des Weiteren könnte man untersuchen, ob eine erhöhte Expression von ALDH1 die Expression von anderen Proteasen induziert und so dazu beiträgt, dass es zu einer stärkeren Migration und Invasion kommt, obwohl dieser Effekt nicht primär auf der Wirkung von ALDH1 beruht.

6.6 Expression von MMP2 und MMP9

Wie die Ergebnisse der RT-PCR deutlich gezeigt haben, gibt es unter denen von uns getesteten Tumorkulturen deutliche Unterschiede im Expressionslevel von MMP2 und MMP9. Diese Unterschiede im Expressionslevel könnten teilweise erklären, welche verschiedenen Mechanismen Tumorzellen nutzen, um sich möglichst effektiv im Körper zu etablieren und zu vermehren.

Auffällig ist hier die Tumorkultur RT4, welche eine extrem hohe Expression von ALDH1-A1, im Vergleich zu den anderen Tumorkulturen zeigt und keine Expression von MMP2 und MMP9 aufweist. Eine dieser Strategien wäre, dass man eine Population von Tumorstammzellen hat und diese sich in einer geeigneten Nische im Körper ansiedeln, wo sie die perfekten Bedingungen vorfinden. Hier würden sie die meiste Zeit in Quieszenz verbringen und sich nur selten teilen, bzw. zu Tumorzellen differenzieren. Dies hat zur Folge, dass diese Tumorstammzellen sehr unempfindlich, oder sogar völlig immun gegen eine herkömmliche Chemotherapie wären, da eine solche Chemotherapie hauptsächlich jene Zellen angreift, die schnell proliferieren. Für das Überleben dieser Zellen wäre es zunächst von keiner großen Bedeutung sich im Körper auszubreiten, wenn sie an einem Ort eine perfekte Nische gefunden haben. Dies würde erklären, warum die Tumorkultur RT4, welche eine hohe Expression von ALDH1-Stammzellmarkern zeigt, keine hohe Expression von MMP2 und MMP9 *in vitro* zeigt, da MMP's und die Metastasierung, durch Umbau der EZM erst in späteren Tumorstadien zum Tragen kommen.

Völlig unterschiedlich verhält sich dies bei der Tumorkultur 5637, diese zeigt eine sehr hohe Expression von MMP2 und nur eine geringe Expression von Tumorstammzellmarkern. Hier lässt sich vermuten, dass die Tumorzellen aus Proben eines Tumorstadiums gewonnen wurden, bei welchem ein schnelles Wachstum und eine frühe Metastasierung imponieren. Subjektiv konnte man dieses Verhalten auch in den *in vitro* Kulturen beobachten. Während die Linie 5637 ungefähr 10 Tage nachdem man sie aufgetaut hatte wieder zum ersten Mal konfluent war, dauerte dies bei der Linie RT4 deutlich länger. Zum Teil musste man bis zu vier Wochen warten, bis die Linie RT4 soweit konfluent war, dass man sie passagieren konnte.

6.7 FACS Analyse

Die FACS Analyse zeigt deutlich, dass auf allen hier untersuchten Tumorkulturen eine hohe Expression von CD276 zu finden ist. Dies ist hierbei unabhängig von

der Expression von CD276 auf mRNA und Proteinebene. Das lässt vermuten, dass schon bei geringer Expression auf Proteinebene die Oberfläche der Tumorzellen mit einer maximalen Anzahl von CD276 Molekülen gesättigt ist und nicht durch die Menge an mRNA oder Gesamtproteinkonzentration bestimmt wird. FACS-Analyse zeigt auch einen deutlichen Unterschied in der Expression der Tumorlinien zu der überprüften somatischen Zelllinie. Dies könnte mit der biologischen Wirkung von CD276 in der Regulation des Immunsystems eine Rolle spielen. Geht man nämlich davon aus, dass CD276 das Immunsystem bei Tumorzellen, wie bereits oben beschrieben runterreguliert, erscheint es logisch, dass dies auf somatischen Zellen nicht von Nöten ist.

Auch lässt sich mit der FACS-Analyse deutlich aufweisen, dass die Tumorzellen fast allesamt eine sehr ähnliche, vergleichsweise hohe Oberflächenexpression aufweisen unabhängig von der Proteinexpression die man im Western Blot nachweisen konnte. Hier lässt sich vermuten, dass schon eine geringe Proteinexpression der Tumorzellen ausreicht, um die Oberfläche der Tumorzellen mit CD276 Proteinen zu sättigen.

6.8 Vergleich CD276 Expression mittels histologischem Microarray

Wie zuvor bereits oben beschrieben, ließ sich als erstes Ergebnis festhalten, dass die Expression von CD276 in Tumorgewebe signifikant höher ist als in benignen Gewebe. Dies stimmt mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit überein. Jedoch muss man bei den Microarray's beachten, dass bei einer Vielzahl der somatischen Proben der „Dot“ nicht vollständig, oder gar nicht vorhanden war. Dies kam möglicherweise durch die automatische Färbung der Proben in einem entsprechenden Laborgerät zustande. Deshalb wäre es sinnvoll, in einer nachfolgenden Arbeit die automatische Färbung durch eine Färbung per Hand, welche schonender ist, zu ersetzen.

Weiter ließ sich feststellen, dass die Expression von CD276 bei jedem Tumorstadium, bezogen auf das T-Stadium beginnend bei 2a-4b, im Vergleich zu dem benignen Gewebe erhöht war und sich die Expression zwischen den einzelnen Stadien nicht mehr veränderte. Dies lässt vermuten, dass die Tumoren schon in ihren frühesten Stadien eine maximale Expression von CD276 zeigen. Wenn man nun davon ausgeht, dass die Tumoren CD276 exprimieren um sich vor dem Immunsystem zu maskieren und sich so im Körper zu

etablieren, schützt eine hohe Expression von CD276 die malignen Zellen schon in sehr frühen, oberflächlichen Tumorstadien vor der zytotoxischen Wirkung von Immunzellen. Dies bietet dem Tumor einen selektiven Vorteil, weil er dadurch möglicherweise in situ bereits vor der Vaskularisierung des Tumors vor der Attacke durch Immunzellen geschützt wird. Und dies, obwohl frühe Stadien aufgrund der geringen TumorgroÙe eigentlich anfälliger für das Immunsystem sein sollten.

7 Zusammenfassung

Da es sich bei Urotheltumoren um eine der häufigsten Tumorerkrankungen handelt, ist es wichtig sowohl deren Entstehungsmechanismus, als auch neue Methoden des Screenings und der Therapie zu finden. Ein für diese Anforderungen interessantes Protein ist CD276.

Im Rahmen dieser medizinischen Doktorarbeit konnten wir nachweisen, dass es bei denen von uns untersuchten Tumorkulturen einige gab die eine erhöhte Expression von CD276 aufwiesen. Jedoch konnten wir auch beobachten, dass nicht jede Tumorkultur im Vergleich zu den somatischen Urothelkulturen eine erhöhte Expression von CD276 aufwies. So gab es auch Tumorkulturen die eine geringere Expression von CD276 im Vergleich zu den somatischen Urothelkulturen aufwiesen. Diese Ergebnisse fanden wir sowohl auf Protein als auch auf RNA Ebene.

Nach der Auswertung der Western Blots und auch der quantitativen PCR konnte man erkennen, dass es nicht so verhielt, dass eine hohe Expression von CD276 auf RNA Ebene mit einer hohen Expression von CD276 auf Proteinebene zur Folge hatte

Zusätzlich zu CD276 überprüften wir auch noch die Expression von MMP2 und MMP9. Bei den statistischen Auswertungen und dem Vergleich zu der Expression von CD276 konnten wir keine Korrelation zwischen der Expression von CD276 und der Expression von MMP-2 oder MMP-9 feststellen.

Des Weiteren untersuchten wir in dieser Arbeit die Expression der Stammzellmarker ALDH1-A1, ALDH1-A2 und ALDH1-A3. Hier erhielten wir vergleichbare Ergebnisse wie bei MMP2 und MMP9. Einige Tumorkulturen zeigten eine erhöhte Expression von ALDH1, wohingegen andere Tumorkulturen so gut wie keine Expression zeigten. Auch stellte sich bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse keine Korrelation zwischen ALDH1 und CD276 dar.

Ein interessantes Ergebnis konnten wir bei der FACS-Analyse der Zellen feststellen. Bei der quantitativen Bestimmung der Expression von CD276 auf der Oberfläche der Zellen zeigte sich, dass sowohl bei Tumorkulturen mit einer geringen, als auch mit einer hohen Expression von CD276 die Werte für die Expression auf der Oberfläche nahezu identisch waren. Somit schien es, dass auch eine geringe Expression von CD276 auf RNA und Proteinebene ausreicht um für eine maximale Expression auf der Oberfläche zu sorgen.

Bei der Auswertung der histologischen Microarray's stelle sich zum einen heraus, dass die Expression von CD276 in Tumorgewebe signifikant höher ist als in benignen Gewebe und das die Expression, bezogen auf das TNM-Stadium schon bei frühen Tumoren im Vergleich zu benignem Gewebe erhöht ist. Somit stellt die Analyse von CD276 mit Hilfe einer FACS-Analyse und im Gewebe immunhistochemisch einen potenziellen frühen Tumormarker da

8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Wilhelm K. Aicher für die Aufnahme als Doktorand in seinem Labor bedanken. Auch bei fachlichen und inhaltlichen Fragen stand er mir immer mit seiner Hilfe zur Seite.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Arnulf Stenzl für die Möglichkeit in der Universitätsklinik für Urologie meine Doktorarbeit zu schreiben.

Mein ganz besonderer Dank gilt auch Tanja Abruzzese und Cornelia Bock. Ohne deren Hilfe ich besonders am Anfang meiner Arbeit nicht gewusst hätte, wie ich überhaupt hätte starten sollen und die mich auch im weiteren Verlauf meiner Arbeit ausgezeichnet unterstützt haben.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Kollegen der Universitätsklinik für Urologie bedanken, die mir die benötigten Urothelgewebeproben zur Verfügung gestellt haben. Auch gilt meine Dank Herrn PD Dr. med. Tilman Todenhöfer für das zur Verfügung stellen der Tumorkliniken aus Kanada.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die es mir erst überhaupt ermöglicht haben dieses Studium zu wählen und mich stets auf diesem Weg begleitet haben.

9 Literaturverzeichnis

Anderstrom, C., S. L. Johansson and L. von Schultz (1983). "Primary adenocarcinoma of the urinary bladder. A clinicopathologic and prognostic study." Cancer **52**(7): 1273-1280.

Bellet, D., V. Lazar, I. Bieche, V. Paradis, Y. Giovangrandi, P. Paterlini, R. Lidereau, P. Bedossa, J. M. Bidart and M. Vidaud (1997). "Malignant transformation of nontrophoblastic cells is associated with the expression of chorionic gonadotropin beta genes normally transcribed in trophoblastic cells." Cancer Res **57**(3): 516-523.

Boorjian, S. A., Y. Sheinin, P. L. Crispen, S. A. Farmer, C. M. Lohse, S. M. Kuntz, B. C. Leibovich, E. D. Kwon and I. Frank (2008). "T-cell coregulatory molecule expression in urothelial cell carcinoma: clinicopathologic correlations and association with survival." Clin Cancer Res **14**(15): 4800-4808.

Cattan, N., N. Rochet, C. Mazeau, E. Zanghellini, B. Mari, C. Chauzy, H. Stora de Novion, J. Amiel, J. L. Lagrange, B. Rossi and J. Giovanni (2001). "Establishment of two new human bladder carcinoma cell lines, CAL 29 and CAL 185. Comparative study of cell scattering and epithelial to mesenchyme transition induced by growth factors." Br J Cancer **85**(9): 1412-1417.

Chan, K. S., I. Espinosa, M. Chao, D. Wong, L. Ailles, M. Diehn, H. Gill, J. Presti, Jr., H. Y. Chang, M. van de Rijn, L. Shortliffe and I. L. Weissman (2009). "Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(33): 14016-14021.

Chapoval, A. I., J. Ni, J. S. Lau, R. A. Wilcox, D. B. Flies, D. Liu, H. Dong, G. L. Sica, G. Zhu, K. Tamada and L. Chen (2001). "B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production." Nat Immunol **2**(3): 269-274.

Chen, Y., J. Mo, X. Jia and Y. He (2017). "The B7 Family Member B7-H6: a New Bane of Tumor." Pathol Oncol Res.

Chute, J. P., G. G. Muramoto, J. Whitesides, M. Colvin, R. Safi, N. J. Chao and D. P. McDonnell (2006). "Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(31): 11707-11712.

Coleman, M. P., P. Babb, A. Sloggett, M. Quinn and B. De Stavola (2001). "Socioeconomic inequalities in cancer survival in England and Wales." Cancer **91**(1 Suppl): 208-216.

Elizondo, G., J. Corchero, E. Sterneck and F. J. Gonzalez (2000). "Feedback inhibition of the retinaldehyde dehydrogenase gene ALDH1 by retinoic acid through retinoic acid receptor alpha and CCAAT/enhancer-binding protein beta." J Biol Chem **275**(50): 39747-39753.

- Falso, M. J., B. A. Buchholz and R. W. White (2012). "Stem-like cells in bladder cancer cell lines with differential sensitivity to cisplatin." Anticancer Res **32**(3): 733-738.
- Fogh, J. (1978). "Cultivation, characterization, and identification of human tumor cells with emphasis on kidney, testis, and bladder tumors." Natl Cancer Inst Monogr(49): 5-9.
- Fukuta, F., N. Masumori, I. Honma, M. Muto, K. Ichihara, H. Kitamura and T. Tsukamoto (2011). "Clinical Outcomes of Patients with pT0 Bladder Cancer after Radical Cystectomy: A Single-institute Experience." Japanese Journal of Clinical Oncology **41**(1): 115-120.
- Ginestier, C., M. H. Hur, E. Charafe-Jauffret, F. Monville, J. Dutcher, M. Brown, J. Jacquemier, P. Viens, C. G. Kleer, S. Liu, A. Schott, D. Hayes, D. Birnbaum, M. S. Wicha and G. Dontu (2007). "ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome." Cell Stem Cell **1**(5): 555-567.
- Gregoire, M., Y. Fradet, F. Meyer, B. Tetu, R. Bois, G. Bedard, R. Charrois and A. Naud (1997). "Diagnostic accuracy of urinary cytology, and deoxyribonucleic acid flow cytometry and cytology on bladder washings during followup for bladder tumors." J Urol **157**(5): 1660-1664.
- H. Yuan, X. W., G. Zhang, C. Lie (2011). B7-H3 over expression in prostate cancer promotes tumor cell progression. J Urol: 1093-1099.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.
- Hashiguchi, M., H. Kobori, P. Ritprajak, Y. Kamimura, H. Kozono and M. Azuma (2008). "Triggering receptor expressed on myeloid cell-like transcript 2 (TLT-2) is a counter-receptor for B7-H3 and enhances T cell responses." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(30): 10495-10500.
- Jakse, G., G. H. Jacobi and J. E. Altwein (1979). "[Adenocarcinoma of the bladder (author's transl)]." Urologe A **18**(2): 86-90.
- Jinesh, G. G., S. Chundururu and A. M. Kamat (2012). "Smac mimetic enables the anticancer action of BCG-stimulated neutrophils through TNF-alpha but not through TRAIL and FasL." J Leukoc Biol **92**(1): 233-244.
- Jordan, C. T., M. L. Guzman and M. Noble (2006). "Cancer stem cells." N Engl J Med **355**(12): 1253-1261.
- Koss, L. G., D. Deitch, R. Ramanathan and A. B. Sherman (1985). "Diagnostic value of cytology of voided urine." Acta Cytol **29**(5): 810-816.
- Kulkarni, D. and G. A. Miller (2003). "Multiple primary neoplasms developing in a case of prostate cancer." Ulster Med J **72**(1): 55-57.
- Kumar, B., S. Koul, J. Petersen, L. Khandrika, J. S. Hwa, R. B. Meacham, S. Wilson and H. K. Koul (2010). "p38 mitogen-activated protein kinase-driven MAPKAPK2 regulates invasion of bladder cancer by modulation of MMP-2 and MMP-9 activity." Cancer Res **70**(2): 832-841.
- Lee, J., S. Ham, M. H. Lee, S. J. Kim, J. H. Park, S. E. Lee, J. Y. Chang, K. H. Joung, T. Y. Kim, J. M. Kim, H. J. Sul, G. R. Kweon, Y. S. Jo, K. S. Kim, Y. K. Shong, G. Gasparre, J. K. Chung, A. M. Porcelli and M. Shong (2015).

"Dysregulation of Parkin-mediated mitophagy in thyroid Hurthle cell tumors." Carcinogenesis **36**(11): 1407-1418.

Li, J. L. and A. L. Harris (2007). "The potential of new tumor endothelium-specific markers for the development of antivascular therapy." Cancer Cell **11**(6): 478-481.

Li, Y., G. Guo, J. Song, Z. Cai, J. Yang, Z. Chen, Y. Wang, Y. Huang and Q. Gao (2017). "B7-H3 Promotes the Migration and Invasion of Human Bladder Cancer Cells via the PI3K/Akt/STAT3 Signaling Pathway." J Cancer **8**(5): 816-824.

Loo, D., R. F. Alderson, F. Z. Chen, L. Huang, W. Zhang, S. Gorlatov, S. Burke, V. Ciccarone, H. Li, Y. Yang, T. Son, Y. Chen, A. N. Easton, J. C. Li, J. R. Rillema, M. Licea, C. Fieger, T. W. Liang, J. P. Mather, S. Koenig, S. J. Stewart, S. Johnson, E. Bonvini and P. A. Moore (2012). "Development of an Fc-enhanced anti-B7-H3 monoclonal antibody with potent antitumor activity." Clin Cancer Res **18**(14): 3834-3845.

Loos, M., D. M. Hedderich, H. Friess and J. Kleeff (2010). "B7-h3 and its role in antitumor immunity." Clin Dev Immunol **2010**: 683875.

Marshall, C. J., L. M. Franks and A. W. Carbonell (1977). "Markers of neoplastic transformation in epithelial cell lines derived from human carcinomas." J Natl Cancer Inst **58**(6): 1743-1751.

Maygarden, S. J., D. B. Novotny, J. W. Moul, V. L. Bae and J. L. Ware (1994). "Evaluation of cathepsin D and epidermal growth factor receptor in prostate carcinoma." Mod Pathol **7**(9): 930-936.

Micheli, A., A. Mariotto, A. Giorgi Rossi, G. Gatta and P. Muti (1998). "The prognostic role of gender in survival of adult cancer patients. EURO CARE Working Group." Eur J Cancer **34**(14 Spec No): 2271-2278.

Modak, S., K. Kramer, S. H. Gultekin, H. F. Guo and N. K. Cheung (2001). "Monoclonal antibody 8H9 targets a novel cell surface antigen expressed by a wide spectrum of human solid tumors." Cancer Res **61**(10): 4048-4054.

Mook, O. R., W. M. Frederiks and C. J. Van Noorden (2004). "The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis." Biochim Biophys Acta **1705**(2): 69-89.

Muller, W. E., H. Slor, K. Pfeifer, P. Huhn, A. Bek, S. Orsulic, H. Ushijima and H. C. Schroder (1992). "Association of AUUUA-binding protein with A+U-rich mRNA during nucleo-cytoplasmic transport." J Mol Biol **226**(3): 721-733.

Murphy, B. R., S. M. Rynard, K. L. Pennington, W. Grosh and P. J. Loehrer (1994). "A phase II trial of vinblastine plus dipyrindamole in advanced renal cell carcinoma. A Hoosier Oncology Group Study." Am J Clin Oncol **17**(1): 10-13.

Nygren, M. K., C. Tekle, V. A. Ingebrigtsen and O. Fodstad (2011). "B7-H3 and its relevance in cancer; immunological and non-immunological perspectives." Front Biosci (Elite Ed) **3**: 989-993.

O'Toole, C., P. Perlmann, B. Unsgaard, G. Moberger and F. Edsmyr (1972). "Cellular immunity to human urinary bladder carcinoma. I. Correlation to clinical stage and radiotherapy." Int J Cancer **10**(1): 77-91.

- O'Toole, C., Z. H. Price, Y. Ohnuki and B. Unsgaard (1978). "Ultrastructure, karyology and immunology of a cell line originated from a human transitional-cell carcinoma." Br J Cancer **38**(1): 64-76.
- Park, K. S., M. H. Han, H. K. Jang, K. A. Kim, E. J. Cha, W. J. Kim, Y. H. Choi and Y. Kim (2013). "The TREK2 Channel Is Involved in the Proliferation of 253J Cell, a Human Bladder Carcinoma Cell." Korean J Physiol Pharmacol **17**(6): 511-516.
- Parkin, D. M., F. Bray, J. Ferlay and P. Pisani (2001). "Estimating the world cancer burden: Globocan 2000." Int J Cancer **94**(2): 153-156.
- Picarda, E., K. C. Ohaegbulam and X. Zang (2016). "Molecular Pathways: Targeting B7-H3 (CD276) for Human Cancer Immunotherapy." Clin Cancer Res **22**(14): 3425-3431.
- Rasheed, S., M. B. Gardner, R. W. Rongey, W. A. Nelson-Rees and P. Arnstein (1977). "Human bladder carcinoma: characterization of two new tumor cell lines and search for tumor viruses." J Natl Cancer Inst **58**(4): 881-890.
- Riede, U.-N. and C.-P. Adler (1995). Allgemeine und spezielle Pathologie 155 Tabellen. Stuttgart New York, Thieme.
- Roth, T. J., Y. Sheinin, C. M. Lohse, S. M. Kuntz, X. Frigola, B. A. Inman, A. E. Krambeck, M. E. McKenney, R. J. Karnes, M. L. Blute, J. C. Cheville, T. J. Sebo and E. D. Kwon (2007). "B7-H3 ligand expression by prostate cancer: a novel marker of prognosis and potential target for therapy." Cancer Res **67**(16): 7893-7900.
- Rubben, H., W. Lutzeyer and J. Bubenzer (1979). "Therapy of urothelial bladder tumors. Results of a retrospective study of 615 cases." Eur Urol **5**(1): 1-6.
- S. Boorjian, Y. S., P. Crispen, S. Farmer, C. Lohse (2008). T-cell coregulatory molecule expression in urothelial cell carcinoma. Clinic Cancer Res.: 4800-4808.
- Seaman, S., J. Stevens, M. Y. Yang, D. Logsdon, C. Graff-Cherry and B. St Croix (2007). "Genes that distinguish physiological and pathological angiogenesis." Cancer Cell **11**(6): 539-554.
- Seaman, S., Z. Zhu, S. Saha, X. M. Zhang, M. Y. Yang, M. B. Hilton, K. Morris, C. Szot, H. Morris, D. A. Swing, L. Tessarollo, S. W. Smith, S. Degrado, D. Borkin, N. Jain, J. Scheiermann, Y. Feng, Y. Wang, J. Li, D. Welsch, G. DeCrescenzo, A. Chaudhary, E. Zudaire, K. D. Klarmann, J. R. Keller, D. S. Dimitrov and B. St Croix (2017). "Eradication of Tumors through Simultaneous Ablation of CD276/B7-H3-Positive Tumor Cells and Tumor Vasculature." Cancer Cell **31**(4): 501-515 e508.
- Sen, S. E., R. S. Malek, G. M. Farrow and M. M. Lieber (1985). "Sarcoma and carcinosarcoma of the bladder in adults." J Urol **133**(1): 29-30.
- Sharma, S., C. D. Zippe, L. Pandrangi, D. Nelson and A. Agarwal (1999). "Exclusion criteria enhance the specificity and positive predictive value of NMP22 and BTA stat." J Urol **162**(1): 53-57.
- She, J. J., P. G. Zhang, Z. M. Wang, W. M. Gan and X. M. Che (2008). "Identification of side population cells from bladder cancer cells by DyeCycle Violet staining." Cancer Biol Ther **7**(10): 1663-1668.

Steinberger, P., O. Majdic, S. V. Derdak, K. Pfistershammer, S. Kirchberger, C. Klauser, G. Zlabinger, W. F. Pickl, J. Stockl and W. Knapp (2004). "Molecular characterization of human 4Ig-B7-H3, a member of the B7 family with four Ig-like domains." J Immunol **172**(4): 2352-2359.

Stenzl, A., H. Penkoff, E. Dajc-Sommerer, A. Zumbraegel, L. Hoeltl, M. Scholz, C. Riedl, J. Bugelnig, A. Hobisch, M. Burger, G. Mikuz and U. Pichlmeier (2011). "Detection and clinical outcome of urinary bladder cancer with 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence cystoscopy." Cancer **117**(5): 938-947.

Stephen A. Boorjian, Y. S., Paul L. Crispen, Sara A. Farmer, Christine M. Lohse, Susan M. Kuntz, Bradley C. Leibovich, Eugene D. Kwon, Igor Frank (2008). T-Cell Coregulatory Molecule Expression in Urothelial Cell Carcinoma: Clinicopathologic Correlations and Association with Survival. Clin Cancer Res **2008**;14(15).

Su, Y., Q. Qiu, X. Zhang, Z. Jiang, Q. Leng, Z. Liu, S. A. Stass and F. Jiang (2010). "Aldehyde dehydrogenase 1 A1-positive cell population is enriched in tumor-initiating cells and associated with progression of bladder cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **19**(2): 327-337.

T. Roth, Y. S., C. Lohse, S. Kuntz (2007). B7-H3 ligand expression by prostate cancer. Cancer Res: 7893-7900.

Taylor Iii, J. A. and G. A. Kuchel (2009). "Bladder cancer in the elderly: clinical outcomes, basic mechanisms, and future research direction." Nature Clinical Practice Urology **6**: 135.

Tharakan, S. T., T. Inamoto, B. Sung, B. B. Aggarwal and A. M. Kamat (2010). "Curcumin potentiates the antitumor effects of gemcitabine in an orthotopic model of human bladder cancer through suppression of proliferative and angiogenic biomarkers." Biochem Pharmacol **79**(2): 218-228.

Tomita, H., K. Tanaka, T. Tanaka and A. Hara (2016). "Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer." Oncotarget **7**(10): 11018-11032.

Visse, R. and H. Nagase (2003). "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry." Circ Res **92**(8): 827-839.

Vogelzang, N. J. and D. Raghaven (1990). "Criteria of response to neo-adjuvant chemotherapy in the treatment of invasive bladder cancer: a critical assessment." Prog Clin Biol Res **353**: 225-236.

Wang, Z. S., M. Zhong, Y. H. Bian, Y. F. Mu, S. L. Qin, M. H. Yu and J. Qin (2016). "MicroRNA-187 inhibits tumor growth and invasion by directly targeting CD276 in colorectal cancer." Oncotarget **7**(28): 44266-44276.

Wiener, H. G., G. P. Vooijs and B. van't Hof-Grootenboer (1993). "Accuracy of urinary cytology in the diagnosis of primary and recurrent bladder cancer." Acta Cytol **37**(2): 163-169.

Xu, H., I. Y. Cheung, H. F. Guo and N. K. Cheung (2009). "MicroRNA miR-29 modulates expression of immunoinhibitory molecule B7-H3: potential implications for immune based therapy of human solid tumors." Cancer Res **69**(15): 6275-6281.

Yanagawa, Y., J. C. Chen, L. C. Hsu and A. Yoshida (1995). "The transcriptional regulation of human aldehyde dehydrogenase I gene. The

structural and functional analysis of the promoter." J Biol Chem **270**(29): 17521-17527.

Zang, X. and J. P. Allison (2007). "The B7 family and cancer therapy: costimulation and coinhibition." Clin Cancer Res **13**(18 Pt 1): 5271-5279.

Zubiaga, A. M., J. G. Belasco and M. E. Greenberg (1995). "The nonamer UUAUUUAUU is the key AU-rich sequence motif that mediates mRNA degradation." Mol Cell Biol **15**(4): 2219-2230.

Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Urologie unter Betreuung von Prof. Dr. rer. nat. Wilhelm Aicher durchgeführt.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Wiebke Weiß von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Tim Neumann durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 19.02.2019