

Aus der Urologischen Klinik
Am Zentrum für Medizinische Forschung
Labor für Experimentelle Urologie

Expression und Regulation von CD276/ B7-H3
auf Blasentumorlinien und somatischen
Urothelzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Lea Elisabeth Reitnauer

2023

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Professor Dr. ing. Bernd Pichler

Professor Dr. rer.nat. Wilhelm K. Aicher

Professorin Dr. D. Alexander-Friedrich

Tag der Disputation

29.09.2022

Widmung

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	X
1. Einleitung	1
1.1 <i>Harnblasenkrebs</i>	1
1.1.1 Inzidenzen und Ätiologie	1
1.1.2 Histologie, Staging und Klassifikation	2
1.1.3 Symptome und Therapieoptionen	3
1.2 <i>CD276</i>	4
1.2.1 Biochemische Aspekte	4
1.2.2 Funktion und Wirkung	4
1.2.3 Regulation	5
1.2.4 CD276 und Krebs	6
1.3 <i>Mögliche Stimuli einer Regulation von CD276 auf Urothelkarzinomen</i>	10
1.3.1 Infektionen	10
1.3.2 Hypoxie	12
1.4 <i>Zielsetzung dieser Arbeit</i>	12
2. Material und Methoden	14
2.1 <i>Geräte und Verbrauchsmaterial</i>	14
2.1.1 Geräte	14
2.1.2 Verbrauchsmaterial	15
2.1.3 Reagenzien	16
2.1.4 Hergestellte Puffer und Medien	19
2.2 <i>Zellkultur</i>	21
2.2.1 Zelllinien	21
2.2.2 Gewinnung von Harnleiterkulturen	21
2.2.3 Zellkulturmedien	22
2.2.4 Auftauen und Einfrieren von Zelllinien	23
2.2.5 Passage	23
2.2.6 Zellzählung und Bestimmung von Duplikationsraten	24
2.2.7 Stimulation mit Lipopolysacchariden	24
2.2.8 Stimulation mit Phorbol Myristate Acetate (PMA) und Ionomycin	24
2.2.9 Lösungsmittelkontrolle mit DMSO	25
2.2.10 Stimulation mit FSL-1 (Pam2CGDPKHPKSF)	25

Inhaltsverzeichnis

2.2.11	Stimulation mit Hypoxie	26
2.2.12	Mykoplasmentransfektionsversuch.....	26
2.3	<i>PCR</i>	27
2.3.1	RNA-Extraktion	27
2.3.2	Bestimmung der RNA-Konzentration.....	28
2.3.3	Umschreiben in cDNA.....	28
2.3.1	Quantitative RT-PCR	29
2.4	<i>Mycoplasmen-PCR</i>	31
2.4.1	Probenvorbereitung.....	31
2.4.2	RT-PCR.....	31
2.4.3	Gel und Auswertung.....	32
2.5	<i>SDS-Page und Western Blot</i>	33
2.5.1	Proteinextraktion	33
2.5.2	Proteinbestimmung und -verdünnung.....	33
2.5.3	Anfertigen der Gele	34
2.5.4	SDS-Page-Elektrophorese.....	35
2.5.5	Antikörperfärbung und Aufnahme	35
2.5.6	Stripping und Referenzprotein β -Aktin	36
2.5.7	Auswertung/ Normierung	36
2.6	<i>Durchflusszytometrie</i>	37
2.6.1	Vorbereitung der Zellen.....	37
2.6.2	Färbung.....	38
2.6.3	Messung und Auswertung.....	38
2.7	<i>Histologie</i>	38
2.7.1	AE1/AE3-Färbung	38
2.7.2	Paraffinschnitte	39
2.7.3	Entparaffinisierung	40
2.7.4	Antigen-Retrieval.....	40
2.7.5	Immunfluoreszenzfärbung CD276	40
2.7.6	Auswertung	41
2.8	<i>Statistische Auswertung</i>	41
3.	Ergebnisse	43
3.1	<i>Zellkulturanalyse</i>	43
3.1.1	Zellwachstum und Duplikationsraten	43
3.1.2	Vergleich der Expression von CD276 zwischen den Zelllinien	45
3.1.3	Vergleich der Expression von CD276 nach Stimulation mit Hypoxie oder LPS....	51
3.1.4	Expression von CD276 unter Stimulation mit PMA plus Ionomycin.....	64
3.1.5	Expression von CD276 unter Stimulation mit FSL-1	66

Inhaltsverzeichnis

3.1.6	Mykoplasmen	68
3.2	<i>Ergebnisse Immunfluoreszenz</i>	72
3.2.1	Unterschiede nach Tumorstadium	73
3.2.2	Unterschiede nach epidemiologischen, histologischen und anamnestischen Kriterien	77
4.	Diskussion	87
4.1	<i>Expression von CD276 auf den untersuchten Zelllinien und -kulturen</i>	87
4.2	<i>Stimulationsversuche</i>	89
4.2.1	Stimulation mit LPS	89
4.2.2	Stimulation durch Hypoxie	90
4.2.3	Stimulation mit PMA und Ionomycin	91
4.2.4	Stimulation mit FSL-1 und Expression von CD276 unter Infektion mit Mykoplasmen 92	
4.2.5	Analyse des Effekts durch Stimulation und Korrelation der Ergebnisse	93
4.3	<i>Untersuchung der Expression von CD276 auf Gewebeproben mittels Immunfluoreszenz</i>	94
4.4	<i>Fazit</i>	99
5.	Zusammenfassung	101
6.	Literaturverzeichnis	102
7.	Anhang	118
8.	Erklärung zum Eigenanteil	132
9.	Veröffentlichungen	133
10.	Danksagung	134

Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stadieneinteilung von Blasenkarzinomen nach dem TNM-System (a) sowie Grading nach histopathologischen Aspekten (b).....	2
Abbildung 2: Übersicht über Funktionen und Wirkungen von CD276 im Bezug auf Tumorzellen und deren Interaktion mit Zellen des Immunsystems.....	7
Abbildung 3: Formel zur Berechnung der Duplikationsrate pro Tag.....	24
Abbildung 4: Beispielansicht einer Pipettiervorlage für die quantitative RT- PCR.....	30
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Zyklen der Quantitativen-Real-Time-PCR.....	31
Abbildung 6: Schmelzkurven der Proben bei der Quantitativen-Real-Time-PCR (Beispieldarstellung).....	31
Abbildung 7: Formel zur Berechnung des Normalisierungsfaktors eines Western-Blot-Gels mithilfe des Housekeeping-Enzyms β -Aktin.....	37
Abbildung 8: Formel zur Berechnung des normalisierten CD276-Messwerts beim Western-Blot zum Vergleich zwischen Gelen.....	37
Abbildung 9: Berechnung des Effektstärkemaß Cohens' d beim t-Test (wenn $N_1 = N_2$).....	42
Abbildung 10: Berechnung des Effektstärkemaßes Pearsons Korrelationskoeffizient r beim t-Test ($N_1 = N_2$).....	42
Abbildung 11: Berechnung des Effektstärkemaßes Pearsons Korrelationskoeffizient r beim Mann-Whitney-U-Test.....	42
Abbildung 12: Exemplarische Darstellung der verwendeten Zelllinien und einer somatischen Urothelzellkultur.....	43
Abbildung 13: Mittlere Duplikationsraten der unterschiedlichen Zelllinien und somatischen Urothelzellkulturen pro 24 Stunden.....	44
Abbildung 14: Exemplarische Darstellung eines Western Blots als Grundlage der Quantifizierung der Proteinexpression. A: Färbung von CD276, B: Färbung von β -Aktin.....	46
Abbildung 15: mRNA-Expression von CD276 der unterschiedlichen Zelllinien und somatischen Urothelzellkulturen.....	47
Abbildung 16: Protein-Expression von CD276 der unterschiedlichen Zelllinien und somatischen Urothelzellkulturen.....	48
Abbildung 17: Exemplarische Darstellung der Auswertung der Durchflusszytometrischen Analyse der Tumorzelllinie TCC-SUP.....	49
Abbildung 18: Protein-Expression von CD276 auf der Zelloberfläche der unterschiedlichen Zelllinien und somatischen Urothelzellkulturen.....	50
Abbildung 19: mRNA-Expression von CD276 nach Stimulationen mit LPS und Hypoxie für alle untersuchten Zelllinien und -kulturen.....	52

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 20: Proteinexpression von CD276 nach Stimulationen mit LPS und Hypoxie für alle untersuchten Tumorzelllinien und somatischen Urothelzellkulturen.....	53
Abbildung 21: Proteinexpression von CD276 an der Zelloberfläche nach Stimulationen mit LPS und Hypoxie für alle untersuchten Tumorzelllinien und somatischen Urothelzellkulturen	54
Abbildung 22: mRNA-Expression von CD276 nach Stimulationen mit LPS und Hypoxie für alle untersuchten Tumorzelllinien.....	55
Abbildung 23: Proteinexpression von CD276 nach Stimulationen mit LPS und Hypoxie für alle untersuchten Tumorzelllinien.....	56
Abbildung 24: Expression von CD276 unter Stimulation mit LPS und Hypoxie an der Zelloberfläche für die Tumorzelllinien insgesamt	57
Abbildung 25: mRNA-Expression von CD276 unter Stimulation mit LPS und Hypoxie nach Tumorzelllinien	58
Abbildung 26: Proteinexpression von CD276 unter Stimulation mit LPS für die einzelnen Zelllinien und somatischen Urothelzellkulturen.....	60
Abbildung 27: Proteinexpression von CD276 an der Zelloberfläche unter Stimulation mit LPS für die einzelnen Zelllinien und somatischen Urothelzellkulturen.....	61
Abbildung 28: Regulation der mRNA von CD276 unter LPS bzw. Hypoxie nach Tumorzelllinien	62
Abbildung 29: mRNA-Expression von CD276 unter Stimulation mit PMA und Ionomycin	65
Abbildung 30: mRNA-Expression von CD276 unter Stimulation mit PMA und Ionomycin in den einzelnen untersuchten Tumorzelllinien und somatischen Urothelzellkulturen.....	66
Abbildung 31: mRNA-Expression von CD276 unter Stimulation mit FSL-1 für die Zelllinien 253J und T24	67
Abbildung 32: Proteinmenge von CD276 unter Stimulation mit FSL-1 für die Zelllinien 253J und T24	68
Abbildung 33: mRNA-Expression von CD276 unter Mykoplasmenkontamination für alle untersuchten Linien insgesamt.....	69
Abbildung 34: mRNA-Expression von CD276 vor und nach Infektion mit Mykoplasmen	70
Abbildung 35: mRNA-Expression von CD276 unter Infektion mit Mykoplasmen für die einzelnen Zelllinien.....	71
Abbildung 36: Exemplarische Darstellung verschiedener Präparate.	72
Abbildung 37: Häufigkeitsverteilung der CD276-Färbungen in % der Gesamtfläche	73

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 38: Expression von CD276 anhand des Ausbreitungsstatus in Blut- und Lymphgefäße	74
Abbildung 39: Expression von CD276 anhand des pathologischen Gradings ..	76
Abbildung 40: Expression von CD276 anhand des Geschlechts	78
Abbildung 41: Expression von CD276 nach Patienten.....	79
Abbildung 42: Expression von CD276 nach Auftreten von Zweitmalignomen in der Vorgeschichte	80
Abbildung 43: Expression von CD276 nach Voroperationen in der Anamnese	81
Abbildung 44: Expression von CD276 nach BCG-Instillation in der Vorgeschichte	82
Abbildung 45: Expression von CD276 nach Vorkommen von Tumorzellen oder Entzündungen in den Proben.....	82
Abbildung 46: Expression von CD276 nach anatomischer/histologischer Herkunft der Probe.....	84

Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Abkürzungen	XII
Tabelle 2: Verwendete Laborgeräte	14
Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien	15
Tabelle 4: Verwendete Reagenzien	18
Tabelle 5: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Medien.....	20
Tabelle 6: Überblick über die verwendeten Tumorzelllinien.....	21
Tabelle 7: Zusammensetzung des Master-Mix für die Transkription in cDNA ..	29
Tabelle 8: PCR-Primer	29
Tabelle 9: Programm der quantitativen RT-PCR.....	30
Tabelle 10: Zusammensetzung des Mastermix für die Untersuchung mittel MycoSPY-Kit	32
Tabelle 11: Programm der PCR bei der Mykoplasmandetektion	32
Tabelle 12: Standardkonzentrationen nach Proteinbestimmung von CD276....	34
Tabelle 13: Vergleich der Duplikationsraten der Tumorzelllinien und somatischen Urothelzellkulturen.....	45
Tabelle 14: Korrelationen zwischen der CD276-Expression auf mRNA-, Protein- und Oberflächenproteinebene und der Duplikationsrate.....	50
Tabelle 15: mRNA-Expression von CD276 unter Stimulation mit LPS und Hypoxie nach Tumorzelllinien und Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Tests	59
Tabelle 16: mRNA Hochregulation von CD276 unter LPS bzw. Hypoxie nach Tumorzelllinien	63
Tabelle 17: Korrelationen der Differenzen der Expression von CD276 nach Stimulation auf den verschiedenen Ebenen und der Duplikationsrate.....	64
Tabelle 18: Expression von CD276 anhand des Ausbreitungsstatus in Blut- und Lymphgefäße (V- und L-Status) und Ergebnisse der Mann-Whitney-U-Tests..	75
Tabelle 19: Expression von CD276 anhand des pathologischen Gradings und des Auftretens von Tumorzellen und Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Tests.....	77
Tabelle 20: Mittelwerte der CD276-Expression der Proben und des Alters der Patienten	78
Tabelle 21: Expression von CD276 anhand des Auftretens von Entzündung und Tumorzellen in den Proben und Ergebnisse der Mann-Whitney-U-Tests	83
Tabelle 22: Expression von CD276 anhand der anatomischen Herkunft der Proben und Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests	85
Tabelle 23: Vergleich der Expression von CD276 nach Organen und gruppiert nach Patienten - Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Tests	86

Tabellenverzeichnis

Tabelle 24: mRNA-Expression von CD276 der unterschiedlichen Zelllinien und somatischen Urothelzellkulturen	118
Tabelle 25: Protein-Expression von CD276 der unterschiedlichen Zelllinien und somatischen Urothelzellkulturen	118
Tabelle 26: Protein-Expression von CD276 auf der Zelloberfläche der unterschiedlichen Zelllinien und somatischen Urothelzellkulturen.	119
Tabelle 27: mRNA-Expression von CD276 nach Stimulationen mit LPS und Hypoxie für alle untersuchten Zelllinien und -kulturen.....	119
Tabelle 28: Proteinexpression von CD276 nach Stimulationen mit LPS und Hypoxie für alle untersuchten Tumorzelllinien und somatischen Urothelzellkulturen.....	119
Tabelle 29: Proteinexpression von CD276 an der Zelloberfläche nach Stimulationen mit LPS und Hypoxie für alle untersuchten Tumorzelllinien und somatischen Urothelzellkulturen	120
Tabelle 30: Expression von CD276 unter Stimulation mit LPS und Hypoxie an der Zelloberfläche für die Tumorzelllinien insgesamt	120
Tabelle 31: mRNA-Expression von CD276 nach Stimulationen mit LPS und Hypoxie für die somatischen Urothelzellkulturen	121
Tabelle 32: mRNA-Expression von CD276 nach Stimulationen mit LPS und Hypoxie für alle untersuchten Tumorzelllinien.....	121
Tabelle 33: Proteinexpression von CD276 nach Stimulationen mit LPS und Hypoxie für alle untersuchten Tumorzelllinien.....	121
Tabelle 34: Proteinexpression von CD276 unter Stimulation mit LPS für die einzelnen Zelllinien und somatischen Urothelzellkulturen.....	123
Tabelle 35: Proteinexpression von CD276 an der Zelloberfläche unter Stimulation mit LPS für die einzelnen Zelllinien und somatischen Urothelzellkulturen	124
Tabelle 36: mRNA-Expression von CD276 unter Stimulation mit PMA und Ionomycin für die einzelnen Zelllinien	125
Tabelle 37: mRNA-Expression von CD276 unter Stimulation mit FSL-1 für die Zelllinien 253J und T24	125
Tabelle 38: Proteinmenge von CD276 unter Stimulation mit FSL-1 für die Zelllinien 253J und T24	126
Tabelle 39: mRNA-Expression von CD276 unter Mykoplasmenkontamination für alle untersuchten Linien insgesamt.....	126
Tabelle 40: mRNA-Expression von CD276 unter Infektion mit Mykoplasmen für die einzelnen Zelllinien	126
Tabelle 41: Vergleich der Expression von CD276 (gemessen durch die Immunfluoreszenz pro Fläche) anhand des lokalen Ausbreitungsstadiums (T-Stadium).....	127
Tabelle 42: Mittelwerte der CD276-Expression nach Patienten.....	127

Tabellenverzeichnis

Tabelle 43: Expression von CD276 anhand der anatomischen Herkunft der Proben.....	128
Tabelle 44: Expression von CD276 in den verschiedenen Organproben gruppiert nach Patienten	131

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
d	Cohen's d
AE1/AE3	Antikörper gegen Zytokeratine
AKT	Proteinkinase B
Ampuwa®	Wasser für Injektionszwecke
ANOVA	Varianzanalyse
APS	Ammonium Persulfat
BCG	Bacillus Calmette Guerin
bp	Basenpaare
BPE	bovine pituary extract (Rinderhypophysenextrakt)
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
BSA	Bovines Serumalbumin
CAR-T-Zellen	Chimeric-antigen-receptor-T-Zellen
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
Cis	Carcinoma in situ
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CY3	Cyanin 3
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
Depc	Diethylpyrocarbonat
DFZ	Durchflusszytometer bzw. -metrie
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Deoxy-Nukleotidtriphosphat
DPBS	Dulbeccos Phosphate buffered Saline
E.coli	Escherichia coli
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintraacetat
EGF	epidermal growth factor (Epidermaler Wachstumsfaktor)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMT	Epithelial to mesenchymal transition
F	F-Statistik
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FCS	Fetales Kälberserum
FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3
FSL-1	Fibroblast-stimulating-Lipopeptid 1
g	G-Zahl (Beschleunigung der Zentrifuge)
G	Differenzierungsgrad der Tumorzellen
g	Gramm
Gamunex®	menschliche Immunglobuline
GLUT-1	Glukosetransporter Typ 1
gt α rb	goat anti rabbit
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
HBSS	Hanks balanced salt solution
HCL	Salzsäure
HHV	Humanes Herpes Virus
HIF1 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1 α
HPV	Humanes Papilloma Virus
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog

Abkürzungsverzeichnis

HRP	horseradish-protein
h β_2 MG	Humanes β_2 -Mikroglobulin
IFN- γ	Interferon γ
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
ILT-4	Immunoglobulin-like-Transkript 4
JAK	Januskinase
KCS	Keratinocyten-Standardmedium
kDa	Kilodalton
L	Invasion des Tumors in die Lymphgefäße (bei TNM-Klassifikation)
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharide
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mittelwert
M	Mol
mAb	monoklonaler Antikörper
MALT-Lymphom	Mucosa associated lymphoid tissue-Lymphom
MD-2	Myeloid Differentiation factor 2
Mdn	Median
MEM	Minimal Essential Medium
mg	Milligramm
miRNA	Mikro-Ribonukleinsäure
ml	Milliliter
MMP	Matrixmetalloproteinase
mo α hu	mouse anti human
M _{Rang}	Mittlerer Rang
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
N	Anzahl der Proben
NEAA	Non-essential aminoacids
NF- κ B	nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
O ₂	Sauerstoff
p	Signifikanzwert
PBS	Phosphate buffered Saline
PD-1	Programmed Death 1
PD-L1	Programmed Death-Ligand 1
PFEA-Puffer	PBS-Fetal calf serum-EDTA-sodium acid-Puffer
PIK3CA	Phosphatidlinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase katalytische Untereinheit alpha
PMA	Phorbolmyristataacetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPIA	Peptidylpolyisomerase
r	Pearsons Korrelationskoeffizient
rb α hu	rabbit anti human
rb α mo	rabbit anti mouse
RB1	retinoblastoma-associated protein
RDD-Puffer	Produkt der Firma Quiagen, keine Langform bekannt
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay Puffer

Abkürzungsverzeichnis

RLT-Puffer	Produkt der Firma Quiagen, keine Langform bekannt
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (Sauerstoffradikale)
RPE-Puffer	Produkt der Firma Quiagen, keine Langform bekannt
r_s	Spearman-Korrelation
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Chain-Reaktion
RW1-Puffer	Produkt der Firma Quiagen, keine Langform bekannt
sB7-H3	soluble B7-H3
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
Tag	Transgelin
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TERT	Telomerase Reverse Transkriptase
Tie2	Tyrosin-Protein Kinase- Rezeptor
TLR	Toll-like-Rezeptor
TLT-2	Triggering receptor expressed on myeloid cells-like-Transcript 2
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TNM-Klassifikation	Klassifikation nach Tumorausbreitung, Nodalstatus und (Fern-) Metastasen
TP53	Tumorprotein 53
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TUR-B	Transurethrale Resektion der Harnblase
TUR-P	Transurethrale Resektion der Prostata
U	Mann-Whitney-U-Statistik
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Invasion des Tumors in die Blutgefäße (bei TNM-Klassifikation)
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World-Health-Organisation
x	einzelner Messwert
Z	Standardisierte Zufallsvariable
η^2	partielltes Eta-Quadrat
μ l	Mikroliter

Tabelle 1: Verwendete Abkürzungen

1. Einleitung

1.1 Harnblasenkrebs

1.1.1 Inzidenzen und Ätiologie

Blasenkrebs war 2020 die zehnthäufigste Krebsneuerkrankung und die dreizehnhäufigste Krebstodesursache weltweit (Ferlay J, 2020). Im Jahr 2016 waren Krebserkrankungen der Harnblase in Deutschland die vierthäufigste Entität bei Männern und die vierzehnhäufigste Tumorerkrankung bei Frauen. Das Lebenszeitrisko einer Blasenkrebserkrankung liegt in Deutschland bei 0,8% für Frauen und 2,4% für Männer (Robert-Koch-Institut, 2019). Invasive Blasentumoren machten etwas über die Hälfte der Fälle aus. Insgesamt zeigt sich ein linearer Anstieg des Erkrankungsrisikos, aber auch der Invasivität mit dem Alter (Kraywinkel et al., 2018). Das mittlere Erkrankungsalter für das invasive Blasenkarzinom lag 2015 in Deutschland bei 77 Jahren für Frauen, bzw. 74 Jahren für Männer (Robert-Koch-Institut, 2019). Die relativen 10-Jahres-Überlebensraten liegen in Deutschland bei 40% für muskelinvasive Tumoren bzw. 63-94% für nicht-invasive Formen. Bei Letzteren ist vor allem das Risiko der Progression in muskelinvasiven Stadien prognoserelevant (Kraywinkel et al., 2018).

Neben dem Alter sind weitere bekannte Risikofaktoren für die Entwicklung von Harnblasenkrebs vor allem der Kontakt mit kanzerogenen Substanzen wie polyzyklischen Kohlenwasserstoffen und aromatischen Aminen (Zeegers et al., 2001). Expositionsrisiken bestehen beim Rauchen von Tabak, worauf ca. 50% der Harnblasenkarzinome zurückgeführt werden (Paul Brennan et al., 2000, P. Brennan et al., 2001), aber auch im beruflichen Kontext, beispielsweise bei Reinigungskräften oder Mechanikern (Reulen et al., 2008). Nach erfolgter Bestrahlung der Harnblasenregion, beispielsweise zur Behandlung eines Zervixkarzinoms, ist im Rahmen eines Sekundärmalignoms die Entwicklung eines Harnblasentumors möglich (Chaturvedi et al., 2007).

Die häufig auftretende benigne Hyperplasie der Prostata (BPH) wird ebenfalls als Risikofaktor diskutiert, ebenso zeigten Daten eine Assoziation zwischen der Transurethralen Resektion der Prostata (TUR-P) als therapeutische Option bei BPH und dem Auftreten einer Harnblasenkrebserkrankung (D. Kang et al., 2007,

Fang et al., 2018). Kontrovers diskutiert wird auch die Rolle von urogenitalen Entzündungen bei der Entstehung von Harnblasenkrebs. Dieser Aspekt wird in Kapitel 1.3.1 weiter ausgeführt.

1.1.2 Histologie, Staging und Klassifikation

Bei 94% der Harnblasenkarzinome handelt es sich um Urothelkarzinome. Seltener kommen andere Typen wie Plattenepithel- oder Adenokarzinome vor (Kraywinkel et al., 2018). Die Einteilung der Harnblasentumore, das sogenannte Staging, erfolgt nach der TNM-Klassifikation von Brierley und Kollegen. Hierfür werden die lokale Ausbreitung des Tumors (T), der Nodalstatus (N) und mögliche Fernmetastasen (M) beurteilt (Brierley et al., 2017). In Abbildung 1 wird die Stadieneinteilung nach Lokalinfiltrationsstatus schematisch dargestellt.

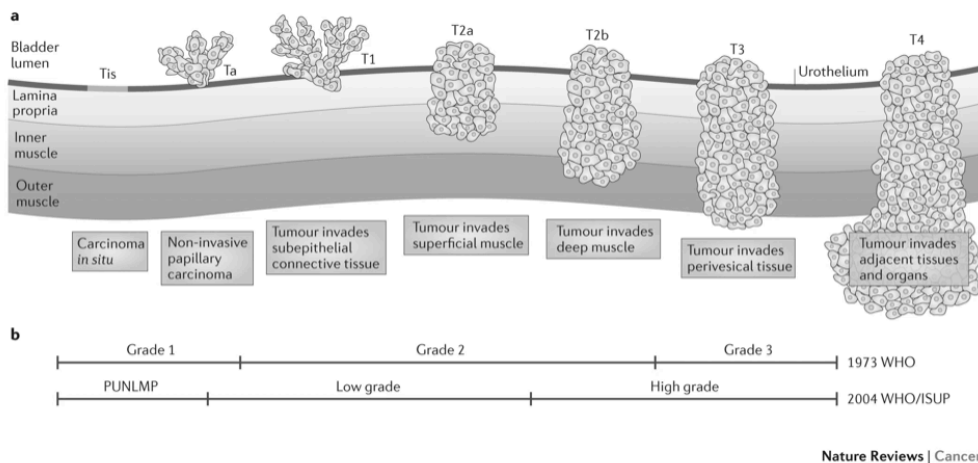


Abbildung 1: Stadieneinteilung von Blasenkarzinomen nach dem TNM-System (a) sowie Grading nach histopathologischen Aspekten (b).

PUNLMP: papillary urothelial malignancy of low malignant potential

Aus: Knowles M. & Hurst C. (2015) Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity, Nature Reviews Cancer, doi: 10.1038/nrc3817

Nach der Klassifikation der World-Health-Organisation (WHO) aus dem Jahr 2016 werden histopathologische Aspekte eingeteilt. Nicht-muskelinvasive Harnblasentumore, wie das urotheliale Karzinoma in situ (Cis) werden anhand ihres Rezidivrisikos in drei Gruppen eingeteilt. Muskelinvasive Tumore werden nach dem WHO-System von 1973 anhand ihres Differenzierungsgrades in Grade 1-3 eingestuft (Humphrey et al., 2016, Babjuk et al., 2017). Bei Frauen sind muskelinvasive Karzinome (T2-T4) häufiger als bei Männern (Kraywinkel et al., 2018). Häufige in Harnblasen gefundene Genmutationen betreffen TP53,

FGFR3, PIK3CA, RB1, HRAS, sowie Promotormutationen von TERT (Humphrey et al., 2016).

1.1.3 Symptome und Therapieoptionen

Bei der Diagnose von Harnblasentumoren können Symptome wie Hämaturie und Dysurie hinweisend sein (Shephard et al., 2012, Jones et al., 2007).

In der aktuellen Leitlinie werden Urinmarker zur Diagnostik nicht empfohlen, stattdessen ist die Zytologie weiterhin diagnostischer Standard (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019). Obwohl es mehrere solcher Marker gibt, zeigen viele von ihnen eine niedrigere Spezifität als die Zytologie (Evangelos Xylinas et al., 2014a).

Therapeutische Optionen sind vom Tumorstaging abhängig und können grundsätzlich Elemente von chirurgischer Intervention, Radiochemotherapie und Chemotherapie enthalten. Ein nicht-muskelinvasives Harnblasenkarzinom kann beispielsweise mittels Transurethraler Resektion der Harnblase (TUR-B) behandelt werden, wobei hier entgegen dem Namen nicht die gesamte Harnblase, sondern nur der Tumor entfernt wird. Die Entfernung der Harnblase (Zystektomie) ist bei muskelinvasiven Tumoren oder Rezidiven nach TUR-B indiziert. Je nach Risikoprofil erfolgt zusätzlich eine neoadjuvante oder adjuvante Chemotherapie (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019).

Für diese Arbeit von besonderem Interesse sind immunologische Therapieansätze. So stehen die Checkpointinhibitoren Pembrolizumab (Bellmunt et al., 2017) und Atezolizumab (Balar et al., 2017) zur Verfügung deren Evidenz allerdings noch diskutiert wird (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019). Beide Substanzen sind Antikörper zu Programmed Death 1 (PD-1), dessen Ligand (Programmed Death Ligand 1, PD-L1) auf Tumoren exprimiert wird. Durch die Bindung des inhibitorischen PD-1 (auch als B7-H1 bezeichnet) an den Liganden PD-L1 kommt es zur Hemmung der T-Zell-Aktivität und somit wird eine suffiziente Reaktion des Immunsystems gegen die Tumorzellen verhindert (Bellmunt et al., 2017, Balar et al., 2017). Des weiteren gibt es die Möglichkeit, bei superfiziellem Blasentumor nach TUR-B eine Installation mit Bacillus Calmette Guerin (BCG) (Han and Pan, 2006) oder Mitomycin C (Malmstrom et al., 2009) vorzunehmen, um eine Prognoseverbesserung zu erzielen. BCG ist ein attenuiertes

Mykobakterium, das bei Instillation durch Induktion einer lokalen Inflammationsreaktion auch eine Wirkung gegen verbliebene Tumorzellen zeigt (Redelman-Sidi et al., 2014).

1.2 CD276

1.2.1 Biochemische Aspekte

CD276 ist ein Typ-1-Transmembranprotein (Chapoval et al., 2001). Von ihm sind drei Isoformen beschrieben: Neben einer 4IgG-B7-H3-Form, die in menschlichen Zellen am häufigsten vorkommt, gibt es auch eine 2IgG-B7-H3-Form und auch im Serum gelöstes B7-H3 („soluble“, sB7-H3) (M. Sun et al., 2002, Weiwei Chen et al., 2013, Steinberger et al., 2004, Y. H. Zhou et al., 2007). Die 4-Ig-B7-H3-Form hat ein Molekulargewicht von 110 kDa (Steinberger et al., 2004).

Bereits bei der Erstbeschreibung von Chapoval und Kollegen wurde die breite Expression in vielen menschlichen Geweben, wie beispielsweise Prostata, Uterus, Plazenta, Herz und Leber beschrieben (Chapoval et al., 2001). Weitere Untersuchungen bestätigten das Vorkommen in vielen Geweben, wie Endothel und Epithel (Seaman et al., 2017), aber auch auf Fibroblasten (Tran et al., 2008) und Zellen des Immunsystems, beispielsweise T-Zellen, Makrophagen und Dendritischen Zellen (Chapoval et al., 2001, Suh et al., 2003, Steinberger et al., 2004). CD276 ist auf den Oberflächen der Zellen und in Vesikeln zu finden, es wird aber auch im Zytoplasma und im Zellkern exprimiert (Flem-Karlsen et al., 2017, Ingebrigtsen et al., 2012).

Bei der Untersuchung von Tumoren wurde eine starke Expression von CD276 auf tumorinfiltrierenden Dendritischen Zellen, Makrophagen, Monozyten, Fibroblasten und Endothel entdeckt (Lee et al., 2017, M. Li et al., 2014, Seaman et al., 2017, X. Zhang et al., 2017c, Kraan et al., 2014).

1.2.2 Funktion und Wirkung

CD276 wird auch als B7-H3 bezeichnet und wird, wie dieser Name verrät, der B7-Familie zugerechnet (Chapoval et al., 2001). Die B7-Familie hat regulatorische Funktionen auf die Aktivität von T-Zellen. Es sind sowohl kostimulatorische als auch koinhibitorische Effekte beschrieben. Das derzeit wohl

prominentestes Mitglied ist das bereits erwähnte PD-L1 (B7-H1) (Greenwald et al., 2005).

Chapoval und Kollegen beschrieben CD276 zunächst als Kostimulator der Proliferation von CD4- und CD8-positiven T-Zellen sowie als beteiligt bei der Induktion von zytotoxischen T-Zellen und kostimulatorisch zusammen mit dem T-Zell-Rezeptor an einer Ausschüttung des Zytokins IFN- γ (Chapoval et al., 2001).

Seit der Erstbeschreibung erfolgte eine Vielzahl an Studien und Untersuchungen der Funktionen und Regulationen von CD276. Die Daten zeigten ein großes Spektrum an möglichen Interaktionen und Wirkungen, nicht nur immunologischer Art. Im Folgenden sind einige der Ergebnisse zusammengefasst.

Konträr zur primären Beschreibung als kostimulatorischer Faktor der T-Zell-Antwort, wurden auch koinhibitorische Funktionen beschrieben. So bindet CD276 aktivierte CD4⁺- und CD8⁺-Zellen und verhindert eine durch Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) vermittelte Lyse der Zellen, die es exprimieren (Leitner et al., 2009, Castriconi et al., 2004). Zudem kann CD276 in Tumorzellen die Ausschüttung von Zytokinen wie IFN- γ , TNF- α und IL-2 hemmen (J. Ma et al., 2016). Passend zu dieser Kontroverse wurden einerseits inflammationssteigernde Effekte von CD276, beispielsweise bei Sepsis und Autoimmunerkrankungen festgestellt (G. Zhang et al., 2010, Luo et al., 2015, X. Chen et al., 2012). Andererseits zeigte sich auch eine Verminderung der Immunantwort bei Erkrankungen, wie der transplantationsassoziierten Graft-versus-Host-Disease (GvHD) (Veenstra et al., 2015). Zudem fanden sich auch nicht-immunologische Funktionen von CD276, wie beispielsweise eine Beteiligung bei Knochenmineralisierung und Osteoblastendifferenzierung (Suh et al., 2004, L. Xu et al., 2011) sowie bei der Motilität von Spermien (Wei et al., 2014).

1.2.3 Regulation

Auch die Regulation der Expression von CD276 ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Bislang ist noch kein Rezeptor spezifisch bestimmt worden, der CD276-vermittelte Signale auf Nachbarzellen direkt überträgt. Untersuchungen suggerierten diesbezüglich eine mögliche Interaktion mit TLT-2 (TREM-like-

Transcript 2; TREM steht für Triggering Receptor expressed on myeloid cells) (Hashiguchi et al., 2008). Allerdings konnten andere Studien einen entsprechenden Zusammenhang nicht belegen (Leitner et al., 2009, Vigdorovich et al., 2013). In neueren Untersuchungen wurde der Interleukinrezeptor IL20RA als möglicher Rezeptor für CD276 genannt (Husain et al., 2019). Eine weitere Arbeitsgruppe zeigte eine Hochregulation von CD276 durch Immunoglobulinlike-Transkript 4 (ILT-4) (P. Zhang et al., 2015a).

Die im Vergleich zur Proteinmenge hohe Expression von CD276-mRNA ist möglicherweise durch eine posttranskriptionelle Regulation zu erklären (Flem-Karlsen et al., 2018, Yi and Chen, 2009). Eine Möglichkeit für eine solche Regulation stellen MikroRNAs (miRNA) dar, die sich an die mRNA anlagern. Für CD276 sind einige solcher regulierender miRNAs bekannt und in verschiedenen Tumorgeweben untersucht worden (Nygren et al., 2014, Zhao et al., 2013, L. Wang et al., 2016b).

1.2.4 CD276 und Krebs

Für diese Arbeit von besonderem Interesse und daher ausführlicher dargelegt ist die Rolle von CD276 in Tumoren. In Abbildung 2 ist eine Übersicht der komplexen Funktionen und Wirkungen dargestellt. CD276 wird in sehr vielen Tumorarten, auch in epithelialen Tumoren exprimiert und zeigt dabei im Vergleich zu Normalgewebe in der Regel auch eine höhere Expression (Wu-Tong Zhou and Jin, 2021). Diese Expression bedingt wiederum eine Inhibition von T-Zellen und trägt damit zum Schutz des Tumors vor dem Immunsystem bei (Cai et al., 2020, J. Zhang et al., 2017a). Auch wurde im Zusammenhang mit der Expression von CD276 über verminderte Wirksamkeit oder Resistenz gegen verbreitete Tumorthapeutika, wie Cisplatin, Paclitaxel oder PD-1-Hemmer berichtet (H. Liu et al., 2011, Yonesaka et al., 2018, He et al., 2016, Flem-Karlsen et al., 2017, P. Zhang et al., 2017b). Insgesamt zeigt sich für verschiedene Tumorarten eine Assoziation der Expression von CD276 mit schlechterer Prognose der Erkrankung (Ye et al., 2016).

Einleitung

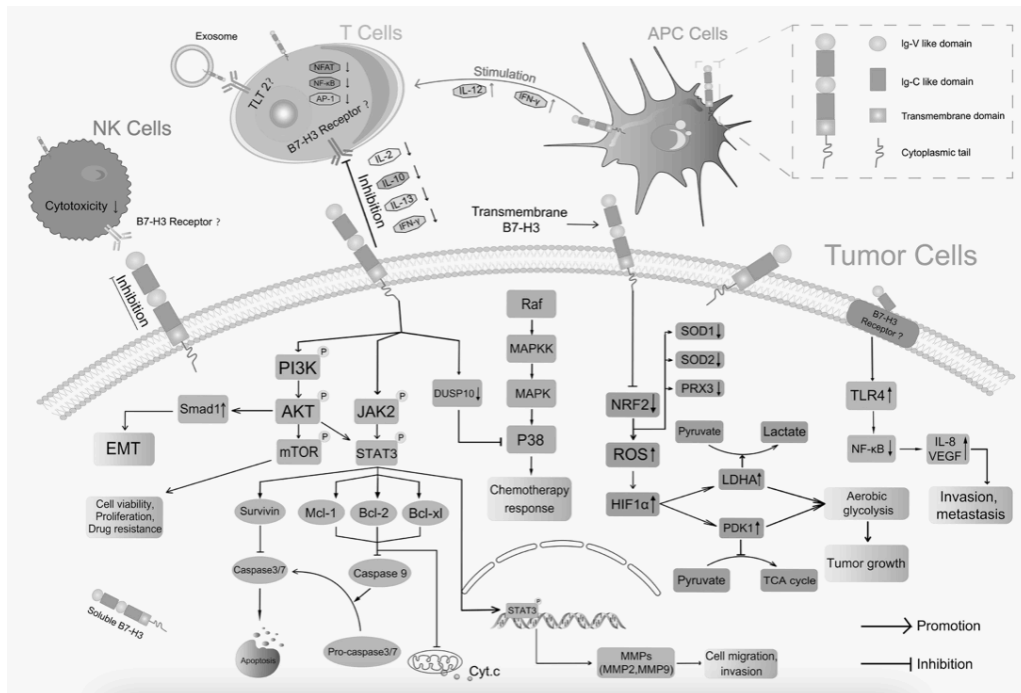


Abbildung 2: Übersicht über Funktionen und Wirkungen von CD276 im Bezug auf Tumorzellen und deren Interaktion mit Zellen des Immunsystems

Aus: Zhou W. & Jin W. (2021) B7-H3/CD276: An Emerging Cancer Immunotherapy, *Front. Immunol.* doi:10.3389/fimmu.2021.701006

Auch in Blasenmorgewebe wurde eine erhöhte Expression von CD276 nachgewiesen (Wu et al., 2015, E. Xylinas et al., 2014b, Boorjian et al., 2008, Y. Li et al., 2017, Aicher et al., 2021). Diese erhöhte Expression ist sowohl im Primärtumor als auch in Metastasen von Urothelkarzinomen nachweisbar (E. Xylinas et al., 2014b). Eine Korrelation zwischen CD276-Expression und lokaler Tumorausdehnung konnte bei Blasenkarzinomen gezeigt werden (Y. Li et al., 2017). Eine erhöhte Expression von CD276 in Blasenmorgewebe ist auch mit geringeren Überlebensraten assoziiert (Z. Xu et al., 2018a).

Die Mechanismen der Wirkung von CD276 in Tumorzellen sind vielfältig und komplex, im Folgenden soll ein Überblick zu einzelnen Aspekten gegeben werden.

Zellstoffwechsel und Zellzyklus

Für schnell proliferierende Tumorzellen ist die Versorgung mit Nährstoffen von entscheidender Bedeutung. Die Ausbildung von Metastasen beispielsweise ist mit anabolem Glukosestoffwechsel verbunden (McDonald et al., 2017). CD276

aktiviert den PI3K/AKT-Signalweg und steigert so die zelluläre Glukoseaufnahme durch erhöhte Expression von GLUT-1 (Nunes-Xavier et al., 2016, P. Zhang et al., 2015a, Frauwirth et al., 2002, Barthel et al., 1999). Flem-Karlsen und Kollegen schließen daraus, dass CD276-hochexprimierende Zellen aufgrund des erhöhten Glukosestoffwechsels ein höheres Metastasierungspotenzial haben könnten (Flem-Karlsen et al., 2018). Der Warbureffekt beschreibt eine Stoffwechsellaage vor allem in Tumorzellen, aber auch in anderen Zellen unter hypoxischen Bedingungen. Die Zellen stellen hierbei hauptsächlich auf eine Energiegewinnung aus Glykolyse und anschließender Milchsäuregärung mit Bildung von Laktat um, im Gegensatz zur physiologischen Energiegewinnung durch Glykolyse mit anschließendem Citratzyklus und Atmungskette (Liberti and Locasale, 2016). CD276 ist als Verstärker des Warbureffekts bekannt (J. Zuo et al., 2018, Nunes-Xavier et al., 2016, Flem-Karlsen et al., 2017, S. Lim et al., 2016). Diese Verstärkung scheint einerseits auf einer Stabilisierung des Hypoxie-induzierten-Faktors 1 α (HIF1 α) zu beruhen, die über die Regulation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) erreicht wird (S. Lim et al., 2016). Diese Regulation von ROS durch CD276 scheint interessanterweise in beide Richtungen zu bestehen. Durch Regulation des Gens NRF2 beeinflusst CD276 einerseits die Aktivität antioxidativer Enzyme, wie der Superoxiddismutase 1 (SOD-1). Andererseits scheint CD276 auch den Pentosephosphatweg hochzuregulieren. Dieser Stoffwechselweg ist wiederum wichtig zur Generierung von NADP⁺, das zur Neutralisation von ROS benötigt wird (S. Lim et al., 2016). Ein weiterer Mechanismus zur Verstärkung des Warbureffekt scheint eine unter CD276-Hochregulation erhöhte Hexokinase 2-Expression zu sein (Shi et al., 2019).

Neben den bereits erwähnten Mechanismen kann eine Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs über weitere komplexe Mechanismen zur Proliferation und zum Überleben der Tumorzellen beitragen (Osaki et al., 2004). Ein weiterer, von CD276 beeinflusster Signalweg ist JAK/STAT3 (F. Liu et al., 2015, T. Zhang et al., 2015b, F. B. Kang et al., 2015). Auch über diese Kaskade erreichen Tumorzellen Proliferation und Schutz vor Apoptose (Jin, 2020). Speziell beim Blasenkarzinom konnte durch Knockout von B7-H3 eine geringere Zellmigration und -invasion durch verminderte Aktivität des STAT3- und des PI3K/Akt-

Signalwegs beobachtet werden (Y. Li et al., 2017). Ähnliche Effekte scheint CD276 in seiner gelösten Form sB7-H3 auch über den TLR4/NF- κ B-Signalweg zu erzielen (Xie et al., 2016).

Metastasierung und Angiogenese

Wie der Glukosemetabolismus hat auch die Angiogenese eine Schlüsselrolle für Wachstum und Metastasierung von Tumoren (Goldmann, 1907, Tonini et al., 2003). Erste Untersuchungen fanden eine Expression von CD276 nur in tumorassoziierten, aber nicht in normalen Blutgefäßen (Seaman et al., 2007). Die Angiogenese in Tumorgewebe wird unter anderem über den Vascular-endothelial-growth-factor (VEGF) vermittelt (Martiny-Baron and Marmé, 1995). Kontroverserweise zeigten einige Studien sowohl auf Tumorzellen als auch auf endothelialen Vorläuferzellen einen negativen Zusammenhang zwischen CD276 und VEGF (Son et al., 2019, J. Sun et al., 2014), während eine andere Studie eine Erhöhung von VEGF durch sB7-H3 über den TLR4/NF- κ B-Signalweg beschrieb (Xie et al., 2016). Auch über den Tie2-Signalweg könnte CD276 an der Angiogenese beteiligt sein (Hanhua Huang et al., 2010, X. Zhang et al., 2017c). Ein weiterer relevanter Aspekt der Funktion von CD276 in Tumoren könnte in einer Beteiligung an der Transition von epithelialelem zu mesenchymalem Phänotyp (EMT) der Zellen liegen (Jiang et al., 2016). EMT fasst komplexe Vorgänge zusammen, die physiologisch bei der embryologischen Entwicklung vorhanden sind, die aber auch bei Tumorerkrankungen an wichtigen Schritten wie Tumorentstehung, Invasion und Metastasierung beteiligt sind (Brabletz et al., 2018). Zusätzlich konnte mehrfach ein Zusammenhang zwischen der Expression von CD276 und der Matrixmetalloproteinase-2 (MMP-2) hergestellt werden (J. Zhang et al., 2017a, L. Xu et al., 2013, Tekle et al., 2012, Y. Li et al., 2017). Die MMPs zersetzen die extrazelluläre Matrix und können dabei Wachstumsfaktoren freisetzen. Dadurch wirken sie bei Angiogenese, Metastasierung und Wachstum von Tumoren mit (Klein et al., 2004).

CD276 als Ansatz für Diagnostik und Tumorthherapie

Aufgrund dieser Eigenschaften in Verbindung mit der höheren Expression in Tumorgewebe ist CD276 ein interessanter Ansatzpunkt für die Tumorthherapie mit

dem sich bereits viele Studien beschäftigt. Beispielsweise Lee und Kollegen berichten von geringerem Tumorwachstum in CD276-defizienten Mäusen (Lee et al., 2017). In Blasentumorzellen führt Inhibition von CD276 zu erhöhter Zytotoxizität und erhöhter Ausschüttung von Zytokinen wie $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ (W. Ma et al., 2018). Auch im präklinischen Rahmen wurden bereits einige Studien mit CD276-Antikörpern durchgeführt (Seaman et al., 2017, Fauci et al., 2014, G. Wang et al., 2016a, Ahmed et al., 2015). Bispezifische CAR-T-Zellen stellen eine weitere Möglichkeit der Anwendung dar (Du et al., 2019, Majzner et al., 2019, W. Ma et al., 2018). Erste Antikörper in klinischen Studien sind Enoblituzumab und Omburtamab (Ahmed et al., 2015, Flem-Karlsen et al., 2018, Powderly et al., 2015, Souweidane et al., 2017). Auch eine mögliche Kombination oder Substitution einer Therapie mit PD-L1-Inhibitoren bei mangelndem Ansprechen wird diskutiert (Cai et al., 2020, Lee et al., 2017). Desweiteren ist ein Nutzen von CD276 als Biomarker oder Antikörper für molekulares Imaging für Krebsdiagnostik denkbar (Burvenich et al., 2018, Wilson et al., 2018, Bachawal et al., 2015, Burugu et al., 2018, Ni and Dong, 2017).

1.3 Mögliche Stimuli einer Regulation von CD276 auf Urothelkarzinomen

1.3.1 Infektionen

Die Rolle von Infektionen bei der Tumorentstehung wird kontrovers diskutiert. Es gibt verschiedene Tumore, die klar mit bestimmten Infektionen assoziiert sind, beispielsweise das Burkitt-Lymphom mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) oder das MALT-Lymphom des Magens mit *Helicobacter pylori*. Allerdings bestehen offenbar unterschiedliche Zusammenhänge bei verschiedenen Pathogenen. Beim Kaposi-Sarkom, das durch das Humane-Herpes-Virus-8 (HHV-8) ausgelöst wird, ist eine Immundefizienz des Trägers zur Tumorentstehung nötig, während beim *Helicobacter-pylori*-assoziierten MALT-Lymphom offenbar eher genetische Faktoren über die Vulnerabilität entscheiden. So ist eine strenge Unterscheidung zwischen für die Tumorentstehung kausalen Infektionen (z.B. HPV beim Zervixkarzinom) gegenüber assoziierten Infektionen (z.B. EBV beim Hodgkin Lymphom) nötig (Pagano et al., 2004). Ein Zusammenhang zwischen einer Infektion der Harnblase und dem Auftreten eines Harnblasenkarzinoms ist vor

allem bei Infektion mit *Schistosoma haematobium* sowie bei Patienten mit Wirbelsäulenverletzung und konsekutiver Indikation zur Katheterisierung bekannt (Vermeulen et al., 2015). Die auch als Bilharziose bekannte Schistosomiasis ist jedoch vor allem in Afrika, Asien und Südamerika verbreitet und wird über verschmutztes Wasser übertragen (Colley et al., 2014). Ein direkter Zusammenhang einer Infektion mit dem Humanen Papilloma Virus (HPV) mit dem Auftreten eines Harnblasenkarzinoms ist zwar nicht belegt, allerdings erleichtert eine parallele HPV-Infektion den Tumorzellen die Adhäsion und Verbreitung in der Schleimhaut (Abol-Enein, 2008).

Der Harnwegsinfekt ist eine sehr häufige Infektion in Deutschland (Schmiemann et al., 2010). Die häufigsten Erreger sind die Enterobakterien *Escherichia coli* (*E.coli*) (Vermeulen et al., 2015). Analysen zeigten ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Harnblasenkarzinoms, sofern die Infektion sich als Zystitis darstellte. Ein sogar protektiver Effekt wurde bei einer geringen Anzahl von Harnwegsinfekt-Episoden, die mit Antibiotika behandelt wurden, beobachtet. Die Gründe hierfür sind allerdings unklar (Vermeulen et al., 2015).

Im Kontext der Untersuchung von CD276 ist relevant, dass Dendritische Zellen nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) eine Hochregulation der CD276-Expression zeigten (Steinberger et al., 2004). LPS ist Bestandteil der Membran gramnegativer Bakterien, wie zum Beispiel *E.coli*. Es wird durch den Toll-like-Rezeptor 4 (TLR-4) auf der Zelloberfläche erkannt und führt zur Freisetzung von Zytokinen und Stimulation einer Immunantwort (Lu et al., 2008).

Im Rahmen von Entzündungen der Harnröhre sind auch Infektionen mit Mykoplasmen relevant, sie können für chronische Entzündungen der Urogenitalregion verantwortlich sein (Taylor-Robinson and Horner, 2001). Auch hier sind Toll-like-Rezeptoren wichtig für das Erkennen der Infektion und das Einleiten einer Immunreaktion. Die bei Mykoplasmeninfektion beteiligten Rezeptoren sind TLR-2 und TLR-6, das mit TLR-2 ein Heterodimer bildet (L. L. Zuo et al., 2009).

1.3.2 Hypoxie

Aufgrund der raschen Proliferation von Tumorzellen kommt es innerhalb von Tumoren häufig zur Hypoxie (Eales et al., 2016). Die dadurch notwendige Adaption von Tumoren an die Hypoxie macht sie zu einem wichtigen Faktor für Tumorzellwachstum und Angiogenese (Ratcliffe et al., 2000, Kung et al., 2000). Unter hypoxischen Bedingungen erfolgt unter anderem über Transkriptionsfaktoren der hypoxia induced factor-Familie (HIF) die Anpassung an die veränderten Stoffwechselbedingungen durch verschiedene Kaskaden (Bárdos and Ashcroft, 2005, Eales et al., 2016). Beispielsweise wird durch HIF-1 α über den Vascular endothelial growth factor (VEGF) die Angiogenese stimuliert (Forsythe et al., 1996, Senger et al., 1993).

Seaman und Kollegen beschrieben eine Überexpression von CD276 auf Proteinebene im Endothel der Blutgefäße einiger Tumorarten, darunter auch Blasenkrebs. Da untersuchte Blutgefäße in Gelbkörperpräparaten keine Expression von CD276 zeigten, folgerten sie, dass CD276 eine Rolle bei pathologischen Tumorgefäßen, nicht aber in physiologischen Blutgefäßen im Gesunden spielt (Seaman et al., 2007). Für ein anderes Mitglied der B7-Familie, PD-L1, ist eine HIF-1 α -abhängige Erhöhung der Expression auf den untersuchten Tumorzellen beschrieben worden (Barsoum et al., 2014).

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Expression von CD276 auf Blasentumorzelllinien und somatischen Urothelzellen *in vitro* weiter zu untersuchen, sowie mögliche Regulationsmechanismen zu überprüfen. Hierzu wurden die bereits erwähnten Stimuli LPS und Hypoxie gewählt. Um eine breitere Untersuchung der inflammatorischen Ursachen zu ermöglichen, wurde eine kontrollierte Infektion von Tumorzelllinien mit Mykoplasmen durchgeführt. Außerdem wurde mit dem Lipopeptid Fibroblast-stimulating-Lipopeptid 1 (FSL-1), das von *Mycoplasma salivarium* abgeleitet ist, eine gezielte Stimulation des TLR-2/TLR-6 vorgenommen (Okusawa et al., 2004, Shibata et al., 2000). Da eine Stimulation der Expression von CD276 mit einem Phorbol-ester in Verbindung mit Ionomycin beobachtet worden war, sollte dies auf die Übertragbarkeit auf Blasentumorzellen überprüft werden (Steinberger et al., 2004, Chapoval et al., 2001).

Zusätzlich erfolgte die Untersuchung der Expression von CD276 unter Berücksichtigung klinischer und histopathologischer Merkmale mittels Immunfluoreszenzfärbung von Proben von Zystektomiepräparaten von Patienten mit Harnblasenkarzinomen.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

2.1.1 Geräte

Bezeichnung	Gerätename	Hersteller
Elektrische Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
ELISA-Reader	Kinetic Analyzer	Milenia DPC
Durchflusszytometer	BD LSR II	BD-Biosciences
Hypoxiebank	Invivo 2 400	Ruskinn Technology Limited
Inkubator	Heracell 240i	ThermoFisher Scientific
Blot Scanner	c-Digit	LICOR
Mikroskop Zellkultur	Primovert	Zeiss
Immunfluoreszenz-Mikroskop mit 3 Farbkanälen (rot, blau, grün)	Axiophot	Zeiss
NanoPhotometer	NP80 Mobile	Implen
Objektiv 10x	Primo-Plan-ACHROMAT 10x/0,25 Ph1 415500-1605-001	Zeiss
Objektiv 20x	Primo-Plan-ACHROMAT 20x/0,30 Ph1 415500-1614	Zeiss
Objektiv 40x	Primo-Plan-ACHROMAT LD-40x/0,5 Ph2 415500-1616	Zeiss
pH-Meter	pH Level1	inoLab
Pipetten: 0,5-10µl; 10-100µl; 20-200µl; 100-1000µl	Eppendorf research	Eppendorf
Pipetten: 0,5-10µl; 10-100µl; 20-200µl; 100-1000µl	Eppendorf reference	Eppendorf
Rührer	MR82	Heidolph
Schüttler	DSG 304/M4	Heidolph
Spannungsgenerator	PowerPack P25	Biometra
Sterilbank	SK-1200	BDK
Thermoblock	UNO II	Biometra
Thermoblock	LightCycler 480 II	Roche
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf
Vortex	MS1 Minishaker	IKA
Waage	440-47N	Kern
Wasserbad	1083	GFL
Zentrifuge für PCR	CombiSpin FVL-2400N	bioSan
Zentrifuge für RNA-Extraktion	Centrifuge 5424	Eppendorf
Zentrifuge für Proteinextraktion	3-30KS	Sigma
Zentrifuge für PCR-Platten	Rotina 420R	Hettich
Zentrifuge für Zellkultur	Heraeus Multifuge 3SR+	ThermoFisher Scientific

Tabelle 2: Verwendete Laborgeräte

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
96-well Platte F-Bottom	655 180	Greiner bio-one
96-well Platte für LightCycler	04729692001	Roche
96-well Platte U-Bottom	650 180	Greiner bio-one
Advantage RT-for-PCR-Kit	639506	Takara
Disposable Scalpel No.10	02.001.30.010	Feather
Einfrierröhrchen	368632	ThermoScientific
Entsorgungsbeutel	759705	Brand
FACS-Röhrchen	352052	Falcon
Handschuhe Nitril, powder-free	S: 290418 M: 290419	ABENA
Mikroreaktionsgefäß 0,5ml	0030 121.023	Eppendorf
Mikroreaktionsgefäß 1,5ml	616 201	Greiner bio-one
Mikroreaktionsgefäß 2ml	0030 120.094	Eppendorf
Pasteurpipetten	Long size 230 mm	WU Mainz
Pipetten für elektrische	Costar Stripette	Corning
Pipettierhilfe		
5ml	451	
10ml	4101	
25ml	4251	
50ml	4501	
Pipetten für elektrische	357507	Falcon
Pipettierhilfe 2ml		
Pipettenspitzen 10µl	765290	Greiner bio-one
Pipettenspitzen 1000µl	686290	Greiner bio-one
Pipettenspitzen 200µl	70.760.002	Sarstedt
Pipettenspitzen mit Filter		TipOne
100µl	S1123-1840	
1000µl	S1126-7810	
Pipettenspitzen mit Filter	81-1010	PEQLAB
10µl		
RNA Mini Kit	74106	Quiagen
Sterile Reagenzienflaschen	8390	Corning
250ml		
Zellkulturflaschen blue vented cap	353136	Falcon
Zellkulturflaschen Cellbind Surface	T25: 3289; T75: 3290	Corning
Zellkulturkammern „Chamber-Slides“	946140802	Sarstedt
8 well auf PCA ablösbar		
Zellschaber	3010	Corning
Zentrifugationsröhrchen	15 ml: 188217; 50ml: 227261	Greiner bio-one

Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien

2.1.3 Reagenzien

Produktname	Produktnummer	Hersteller
10% Ammonium-Persulfat (APS)	1610700	BioRad
30% Acrylamid-Mix	161-0156	BioRad
Accutase	A6964-100ML	Sigma
Advantage RT-for-PCR-Kit	639506	Takara
- Oligo-dt-Primer		
- 5x-Buffer		
- RNase Inhibitor		
- dNTP-Mix		
- Reverse Transkriptase		
- Depc-treated Water		
Ampuwa®	7151-5	Fresenius
Anti-CD276 DFZ und IF	ab105922	Abcam
Aprotinin	9087701	Sigma-Aldrich
Borsäure 1M	B6768	Sigma
Bovines Serum Albumin (BSA) 25%	A10008-01	gibco
100-Bp-Ladder	00946439	Invitrogen
Bromphenolblau	A2331	AppliChem
CD276-Primer PCR		Eurofins Genomics
CD276 Antikörper DFZ PE Anti-Human	351004	Biologend
CD276 Klon MIH42		
Cholera Toxin 1mg	100B	Hersteller: List Biological Laboratories; Bezogen über: Quadrach Diagnostics Ltd. BioRad
DC Protein Assay Kit II	5000112	
- Reagent A		
- Reagent S		
- Reagent B		
- Protein Assay Standard II Albumin		
DMSO	D2650-5X5ML	Sigma
Dulbeccos Phosphate Buffered Saline (DPBS)	D8537-500ml	Sigma
EDTA Versen (1% w/v)	L2113	Biochrom
EDTA-Pulver	E-6635	Sigma
Ethanol 100%	A1613	AppliChem
Essigsäure	1000631011	Merck
Ethanol absolute	20821.330	VWR Chemicals
FCS	F7524	Sigma
FSL-1	SML1420-100UG	Sigma
Gamunex® 10%	3036252	Grifols
Gel Red Nucleic Acid Gel stain 10000x in water	41003	Biotinum
Gentamycin 10mg/ml	A 2712	Biochrom
Hanks Buffered Salt Solution 0,35 g/l	H8264	Sigma

Material und Methoden

Produktname	Produktnummer	Hersteller
10% Ammonium-Persulfat (APS)	1610700	BioRad
30% Acrylamid-Mix	161-0156	BioRad
Accutase	A6964-100ML	Sigma
Advantage RT-for-PCR-Kit	639506	Takara
<ul style="list-style-type: none"> - Oligo-dt-Primer - 5x-Buffer - RNase Inhibitor - dNTP-Mix - Reverse Transkriptase - Depc-treated Water 		
HEPES Buffer Solution (1M)	15630-056	gibco
Humanes β 2-Mikroglobulin-Primer		Eurofins Genomics
Immunfluoreszenz Zweitantikörper Cy3 goat-anti-rabbit	111-165-045	Jackson Immuno Research
Ionomycin	I3909	Sigma
Keratinocyten Standardmedium	37000-015	gibco
<ul style="list-style-type: none"> - 500 ml Medium - 2,5μl EGF Human recombinant - 25 mg Bovine Pituitary Extract 		
LightCycler 480 SybrGreen I Master LPS	04887352001	Roche
Magic Mark XP Western Standard	L7895-1MG	Sigma
MEM Earle's	LC5602	Invitrogen
Mercaptoethanol	FG0325	Biochrom
Methanol 100%	A338,0100	AppliChem
MycosPY Mykoplasmen Detektionskit	20847.307	VWR Chemicals
<ul style="list-style-type: none"> - Taq-Polymerase-Puffer - Primer Mix - Interne Kontrolle (700bp) - Taq-Polymerase 	M030-050	Biontex
Natriumacetat x 3H ₂ O	21249	Serva
Natriumazid	K19461188	Merck
Nicht essentielle Aminosäuren	11140-035	gibco
PBS-Tabletten (Immunfärbung)	09-9499-100	Medicago
PBS-Tabletten (WesternBlot)	18912-014	Gibco
Penicillin/Streptomycin	15140-122	gibco
PMA	P8139	Sigma
PPIA-Primer	Primerset #1	Biomol
RIPA-Puffer	PL-25-M	CC Pro
+ PMSF 200mM		
RNA Mini Kit	74106	Quiagen
<ul style="list-style-type: none"> - RLT-Puffer - RPE-Puffer - RW1-Puffer - RNase-freies Wasser 		

Material und Methoden

Produktname	Produktnummer	Hersteller
10% Ammonium-Persulfat (APS)	1610700	BioRad
30% Acrylamid-Mix	161-0156	BioRad
Accutase	A6964-100ML	Sigma
Advantage RT-for-PCR-Kit	639506	Takara
<ul style="list-style-type: none"> - Oligo-dt-Primer - 5x-Buffer - RNase Inhibitor - dNTP-Mix - Reverse Transkriptase - Depc-treated Water 		
RNasefree DNase Set	79254	Quiagen
<ul style="list-style-type: none"> - DNase - RNase-freies Wasser - RDD-Buffer 		
SDS 10% (w/v) Solution	1610416	BioRad
Sodium Pyruvat 100mM	11360-039	gibco
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	2367	Roth
Transgelin-Primer (Tag)		Quiagen
Tris Base (1M)	A1086	AppliChem
Tris-Glycine Buffer	161-0734	BioRad
Trypanblau 0,4%	17-942E	Lonza
Trypsin	12563-011	gibco
Tween20	P2287	Sigma
Vectashield Mounting Medium	H-1000	Vector
Vectashield Mounting Medium Hardset with DAPI	H-1200	Vector
Westernblot-Antikörper Anti-CD276 (mouse)	ab-105922	Abcam
WesternBlot-Antikörper Anti-β-Actin (rb)	ab-8227	Abcam
WesternBlot-Zweitantikörper rabbit-anti-mouse HRP	P0260	Dako
WesternBlot-Zweitantikörper goat-anti-rabbit HRP	P0448	Dako
WesternSure Premium Chemiluminescent Substrate:	926-95000	LI-COR
<ul style="list-style-type: none"> - Stable Peroxide Solution - Luminol Enhancer Solution 		

Tabelle 4: Verwendete Reagenzien

2.1.4 Hergestellte Puffer und Medien

Name	Zusammensetzung
Einfriermedium	50% Zellkulturmedium; 40% FCS; 10% DMSO
FACS-Puffer (PFEA)	500 ml DPBS; 10ml FCS; 1ml 10%ige Natrium-Azid-Lösung; 372 mg EDTA
Gelpuffer für WesternBlot	89% Aqua dest.; 10% Tris-Glycin, 1% 10%iges SDS Lagerung bei 4°C
Keratinocyten-Standard-Medium (KCS)	Zu den 500 ml Medium wurden die mitgelieferten Supplemente 2,5µl EGF Human recombinant und 25 mg Bovine Pituitary Extract hinzugefügt. Desweiteren wurden 30 ng/ml der Cholera toxin-Arbeitslösung (c= 30µg/ml) hinzugegeben. Lagerung bei 4°C
Lämmli-Puffer	250 mM Tris-HCL pH 6,8; 20% Glycerin; 8% SDS; kleine Spatelspitze Bromphenolblau Lagerung bei -20°C
MEM Earles Medium	Vor Gebrauch: Hinzufügen von 5% (v/v) Mercaptoethanol 10% FCS, 1% NEAA, 1% Penicillin/Streptomycin Lagerung bei 4°C
MEM Earles Medium mit BSA	1% NEA, 1% Penicillin/Streptomycin, 0,5% BSA Lagerung bei 4°C
RIPA+ Puffer	RIPA-Puffer mit 5µl PMSF pro Milliliter Puffer Lagerung bei -20°
RLT-Puffer zum Einfrieren	10 ml RLT-Puffer (Quiagen RNA Mini Kit); 100 µl β-Mercaptoethanol Lagerung bei Raumtemperatur
Sammelgel 5%ig für WesternBlot	Ca. 70% Aqua dest.; 16,5% 30%iger Acrylamid-Mix; 12,5% 1M Tris (pH6,8); 1% 10%SDS; 1% 10%iges Ammonium-Persulfat; 0,1% TEMED
Strippinglösung für Urothelaufarbeitung	500 ml HBSS 0,35 g/l NaHCO ₃ ; 5 ml 10mM HEPES; 1,3 ml 20 KIU/ml Aprotinin; 50ml EDTA 1% (w/v) Lagerung bei 4°C
Strippingpuffer für WesternBlot	Ca. 99% Aqua dest; 0,2M Glycin; 0,1% SDS; 1% Tween20 pH-Einstellung auf 2,2 mit HCL Lagerung bei Raumtemperatur
Transferpuffer für WesternBlot	70% Aqua dest.; 20% Methanol; 10% Tris-Glycin Lagerung bei 4°C
Transportmedium	500 ml HBSS 0,35 g/l NaHCO ₃ ; 5 ml 10mM HEPES; 1,3 ml 20 KIU/ml Aprotinin; 5 ml 1%-Pen/Strep Lagerung bei 4°C
Trenngel 8%ig für WesternBlot	Ca. 46% Aqua dest.; 26% 30%iger Acrylamid-Mix; 26% 1,5M Tris (pH8,8); 1% 10%iges SDS; 2% 10%iges Ammonium-Persulfat; 0,1% TEMED

Material und Methoden

Name	Zusammensetzung
Tris-Urea-Puffer für Immunfluoreszenz (Antigen Retrieval)	Ca. 94% Aqua dest.; 5% Urea; 100mM Tris pH-Einstellung auf 9,5 mit HCl
TBE-Puffer 20x	Tris base (1M) 121g; Boric Acid (1M) 61,7g; EDTA-Na ₂ x 2H ₂ O (20mM) 7,44g; bis auf einen Liter mit Aqua dest. aufgefüllt
TBE-Puffer 1x Ladepuffer	950 ml Aqua dest.; 50 ml TBE 20x Puffer 5 ml Glycerol; 250 µl 40x TAE-Puffer; Spatelspitze Bromphenolblau; 3,75 ml H ₂ O Lagerung bei -20°C
100bp-Ladder-Mix 40x TAE-Puffer	30µl bp-Ladder; 80µl Ladepuffer; 50µl Aqua dest. Tris base (1,6M) 193,6g; Na-acetate x 3 H ₂ O (0,8M) 108,9g; EDTA-Na ₂ x 2H ₂ O (20mM) 7,44g pH auf 7,2 eingestellt Mit Aqua dest. auf einen Liter Flüssigkeitsvolumen auffüllen

Tabelle 5: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Medien

2.2 Zellkultur

2.2.1 Zelllinien

Aufgrund von Vorversuchen im Rahmen der Dissertation von Matthias Korn wurden für diese Arbeit die Blasentumorlinien 253J, 5637, Cal-29, T24, TCC-SUP und HT-1197 ausgewählt. Die genauen Charakteristika sind in Tabelle 6 dargestellt.

Zelllinie	Grade	Stage	Subtyp	Erstbeschreibung/ Etablierung	Herkunft der Linie
253J	IV	pT4	basal	(Elliott et al., 1974)	Laborbestand
5637	II	u	gemischt	(Fogh et al., 1977)	Laborbestand
Cal-29	IV	pT2	luminal	(Cattan et al., 2001)	Leibniz-Institut DSZM; ACC-515
T24	III	u	basal	(Bubenik et al., 1973)	Laborbestand
TCCSUP	IV	u	basal	(Nayak et al., 1977)	Laborbestand
HT-1197	IV	pT2	gemischt	(Rasheed et al., 1977)	ATCC; CRL-1473

Tabelle 6: Überblick über die verwendeten Tumorzelllinien

u= unbekannt

Informationen über Grade, Stage und Subtyp nach (Zuiverloon et al., 2018)

2.2.2 Gewinnung von Harnleiterkulturen

Um einen Vergleich mit somatischen Urothelzellen zu ermöglichen, wurden Gewebeproben von Harnleitern aus operativen Eingriffen in der Urologischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen aufbereitet. Dies erfolgte mit Zustimmung der Ethikkommission unter der Nummer 279/2013BO2.

Die Proben wurden im Operationssaal in bereits vorbereitete Zentrifugationsröhrchen mit Transportmedium gegeben und bei +4°C gelagert. Zur Aufbereitung wurde der Harnleiter zunächst unter sterilen Bedingungen in einer Petrischale in 5 ml Keratinozyten-Standard-Medium (KCS) weiter präpariert und vom umgebenden Gewebe befreit, um eine Kontamination mit Fett und Erythrozyten möglichst gering zu halten. Danach wurde der Harnleiter in circa 1 cm² große Stücke zerteilt und aufgeschnitten. Die Stücke wurden in 15 ml Stripping-Lösung in Zentrifugationsröhrchen gelegt und drei Stunden lang bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Innenseite der Gewebestücke in einer Petrischale in je 3 ml Keratinozyten-Standard-Medium mit einem Zellschaber abgeschabt und das Gewebe anschließend nochmals mit 5 ml Keratinozyten-Standard-Medium ab gespült. Das gesamte abgeschabte bzw. heruntergespülte Material wurde nun in ein 15-ml-Zentrifugationsröhrchen

überführt und bei 1100 Upm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das entstandene Zellpellet in 2,5 ml Keratinozyten-Standard-Medium resuspendiert und in eine T25-Kulturflasche ausgesät.

Die Kulturflasche wurde bei 37°C im Brutschrank inkubiert und alle zwei bis drei Tage bis zur 100% Konfluenz das Medium erneuert.

2.2.3 Zellkulturmedien

Die Tumorzelllinien wurden zur besseren Vergleichbarkeit in einer Zellzahl von $1,5 \times 10^5$ in 75 cm² Kulturflaschen ausgesät. Als Medium verwendeten wir MEM Earles Medium mit Zusatz von 50% fetalem Kälberserum (FCS), 1% Nicht-essentielle Aminosäuren (NEA) und 1% Penicillin/Streptomycin. Hiervon wurden 10 ml pro Kulturflasche verwendet.

Anfangs verwendeten wir im wöchentlichen Wechsel ein alternatives Medium, das wiederum auf MEM Earles Medium basierte und zusätzlich 50% FCS, 1% Nicht-essentielle Aminosäuren (NEA), 1% Natrium Pyruvat sowie 0,1% Gentamycin und 0,1% Tylosin enthielt.

Nach der Entdeckung einer Mycoplasmeninfektion der Zelllinien HT1197, T24 und Cal-29 und der konsekutiven Vernichtung der entsprechenden Kulturflaschen wurde ausschließlich die Variante mit Penicillin und Streptomycin verwendet.

Für die Untersuchung der Effekte von FSL-1 (vgl. 2.2.10) wurde zusätzlich eine Variante des MEM Earles Medium mit 1% NEA, 1% Penicillin/Streptomycin und 0,5% bovinem Serumalbumin (BSA) anstatt des MEM-Mediums mit FCS getestet.

Die somatischen Urothelzelllinien wurden in Keratinozyten Standard Medium in 75cm² Kulturflaschen gezogen. Das Keratinozyten Standard Medium (KCS) enthielt serumfreies Keratinozytenmedium mit 5 ng/ml rekombinantem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) und 50 µg/ml Rinderhypophysenextrakt (BPE). Zudem wurde Cholera-Toxin in einer Konzentration von 30 ng/ml zugesetzt.

Alle 2-3 Tage wurde das Medium in der Kulturflasche komplett gegen frisches Medium getauscht.

Die Medien wurden nach Herstellung jeweils bei + 4°C im Kühlschrank aufbewahrt und innerhalb von 2-3 Wochen verbraucht.

Zur vorübergehenden Lagerung von Präparaten aus dem Operationssaal wurde ein Transportmedium eingesetzt.

2.2.4 Auftauen und Einfrieren von Zelllinien

Zum Auftauen von Zelllinien aus dem Stickstofftank wurden zunächst 20 ml des entsprechenden Mediums in einem Zentrifugationsröhrchen vorgelegt. Das Einfrierröhrchen wurde kurz in ein 37°C warmes Wasserbad gehalten, bis nur noch ein kleiner Klumpen Eis vorhanden war. Dann wurde unter sterilen Bedingungen der Inhalt des Einfrierröhrchens mitsamt dem Eisklumpen in das vorbereitete Medium überführt und bei 1200 Upm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das entstandene Zellpellett in 5 ml Medium resuspendiert und in eine T75-Zellkulturflasche ausgesät.

Zum Einfrieren von Zellkulturen wurde zunächst Einfriermedium hergestellt. Dieses bestand aus 50% des jeweiligen Mediums, 40% FCS und 10% DMSO. Nach dem Ablösen der Zellen mit anschließender Zentrifugation (vgl. 2.2.5) wurde das Zellpellett in dem Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann milliliterweise in Einfrierröhrchen verteilt und sofort bei -80°C eingefroren. Zu einem späteren Zeitpunkt erfolgte die Übersiedlung in flüssigen Stickstoff zur Langzeitlagerung.

2.2.5 Passage

Bei 90-100% Konfluenz der Zellen in der Kulturflasche wurden durch Zugabe von 4 ml EDTA 0,1% und anschließender Inkubation bei 37°C für acht Minuten zunächst die Zell-Zell-Kontakte gelöst, sodass sich die Zellen abrundeten. Danach wurde 1,5 ml Trypsin auf die Zellen gegeben und für eine Minute bei 37°C inkubiert. Hierdurch lösten sich die Zellen ab. Durch Zugabe von 5 ml des jeweiligen Mediums wurde das Trypsin inaktiviert und die Zellen in ein Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach Zentrifugation mit 1200 Upm für 5 min bildete sich ein Zellpellet. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Medium resuspendiert, bei Bedarf gezählt (vgl. 2.2.6) und in gewünschter Zahl in eine neue T75-Kulturflasche ausgesät.

2.2.6 Zellzählung und Bestimmung von Duplikationsraten

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Passage vorgenommen (vgl. 2.2.5). Das hierbei entstandene Zellpellet wurde in 10 ml Medium resuspendiert. Je 20µl dieser Suspension wurden mit 20µl Trypanblau in zwei Vertiefungen einer 96-well-Platte vermischt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Dann wurden die Zellen innerhalb der Kammern gezählt und die Zellzahl innerhalb des Zentrifugationsröhrchens berechnet. Über die Bestimmung des Verdünnungsfaktors der gewünschten Zellzahl für die Aussaat erfolgte die Berechnung des entsprechenden Volumens.

Für die Berechnung der Duplikationsraten wurde folgende Formel genutzt (vgl. Abbildung 3).

$$\text{Duplikationsrate} = \frac{\left(\frac{\log_{10} \left(\frac{N_H}{N_1} \right)}{\log_{10}(2)} \right)}{d}$$

*Abbildung 3: Formel zur Berechnung der Duplikationsrate pro Tag
N_H = Zahl der ausgesäten Zellen; N₁ = Anzahl der Zellen bei der nächsten Passage; d = Anzahl der Tage zwischen Zellaussaat und Passage; Nach (Bieback et al., 2004)*

2.2.7 Stimulation mit Lipopolysacchariden

Zur Stimulation mit bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) wurde eine Konzentration von 1µg/ml nach Steinberger et al. (2004) angestrebt. Hierzu wurde mit Phosphate Buffered Saline (PBS) zunächst eine Stocklösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml hergestellt. Diese wurde jeweils am Versuchstag in Zellkulturmedium zu einer Endkonzentration von 1µg/ml verdünnt.

Der Versuch startete bei 70-80% Konfluenz der Zellen. Als Kontrolle diente eine Kulturflasche mit Zellkulturmedium ohne Zusatz von LPS.

Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ und 21% O₂ im Wärmeschrank inkubiert.

2.2.8 Stimulation mit Phorbol Myristate Acetate (PMA) und Ionomycin

Zur Induktion mit Phorbol Myristate Acetate (PMA) und Ionomycin wurde jeweils eine Konzentration von 100 nm nach Steinberger et al. (2004) angestrebt.

Hierzu wurde aus PMA mit Dimethylsulfoxid (DMSO) eine 1,621 mM Lösung hergestellt. Aus Ionomycin wurde ebenfalls mit DMSO eine 1mM Lösung

hergestellt. Am Versuchstag wurden die Lösungen mit Zellkulturmedium zur gewünschten Endkonzentration von 100nm/ml (0,6µl PMA und 1µl Ionomycin in 10 ml Medium) verdünnt.

Die Versuche starteten bei 70-80% Konfluenz der Zellen. Als Kontrolle diente eine Kulturflasche mit Zellkulturmedium ohne Ionomycin und PMA. Die Zellen wurden für 24 Stunden im Wärmeschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 21% O₂ inkubiert.

2.2.9 Lösungsmittelkontrolle mit DMSO

Aufgrund der Eigenwirkung von Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel wurde eine Lösungsmittelkontrolle mit je 1,6 µl DMSO in 10 ml Zellkulturmedium durchgeführt (Verheijen et al., 2019). Die Menge ergab sich aus der Menge an in DMSO gelösten Substanzen (vgl. 2.2.8).

Die Zellen wurden für 24 Stunden im Wärmeschrank bei 37 °C, 5% CO₂ und 21% O₂ inkubiert.

2.2.10 Stimulation mit FSL-1 (Pam2CGDPKHPKSF)

Zur Stimulation des Toll-Like-Rezeptor2/6-Heterodimers mit synthetischem diacyliertem Lipoprotein wurde FSL-1 eingesetzt. Nach R. Lim et al. (2014) wurde eine Endkonzentration von 100 nm/ml verwendet, ebenso wurde ein dort beschriebenes Medium mit 0,5% bovinem Serumalbumin (BSA) verwendet.

Aus FSL-1 wurde zunächst mit endotoxinfreiem Wasser eine Stammlösung mit einer Konzentration von 100µg/ml hergestellt. Diese Lösung wurde dann am Versuchstag mit Zellkulturmedium zur gewünschten Konzentration von 100 nm/ml verdünnt (1 µl pro 1 ml Medium).

Die Versuche wurden mit der Zelllinie T24 durchgeführt. Bei 70-80% Konfluenz der Zellen wurde das MEM Earles Medium mit 10% FCS bei der Hälfte der Kulturflaschen gegen die Variante mit 0,5% BSA ausgetauscht, die andere Hälfte erhielt frisches MEM-Medium mit 10% FCS. Für die Stimulation wurde dann der Hälfte der Flaschen mit BSA-haltigem Medium 100 nm/ml FSL-1 zugefügt, ebenso wurde mit den Kulturflaschen mit FCS-haltigem Medium verfahren. Als Kontrolle dienten Zellen, die im selben Medium, aber ohne Zusatz von FSL-1 inkubiert wurden.

Alle Zellkulturflaschen wurden bei 37 °C, 5% CO₂ und 21% O₂ für 24 Stunden im Wärmeschrank inkubiert.

2.2.11 Stimulation mit Hypoxie

Für die Versuche in Hypoxie wurden eine Sauerstoffkonzentration von 2% sowie eine Temperatur von 37°C erzeugt. Die Kulturflaschen wurden bei 70-80% Konfluenz in frischem Medium in die Hypoxiebank gebracht und nach 24, 48 oder 72 Stunden entnommen, worauf sofort mit der RNA-Extraktion begonnen wurde (vgl. 2.3.1). Die entsprechenden Kontrollen wurden über die gleiche Zeit im Wärmeschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 21% O₂ inkubiert.

2.2.12 Mykoplasmentransfektionsversuch

Bei einer routinemäßigen Überprüfung der Zellkulturen mittels MycoSpy-Mykoplasmandetektionskits (vgl. 2.4) stellten wir eine Mykoplasmenkontamination der Zelllinien T24, Cal-29 und HT1197 fest. Nach Wiederholung der Versuche mit neuen, unkontaminierten Kulturen stellten wir Unterschiede in den Ergebnissen im Vergleich zu den Kulturen mit Mykoplasmen fest. Um diese Unterschiede zu reproduzieren führten wir einen Infektionsversuch durch.

So wurden jeweils eine Kulturflasche mit unkontaminierten Zellen der entsprechenden Linien in einem Inkubator bebrütet. In einem separaten Labor in einem anderen Inkubator erfolgte unter den gleichen Bedingungen (37°C, 21% O₂) die Anzucht von bekannt kontaminierten Kulturen der Zelllinien. Für 14 Tage wurde alle 3 Tage ein Mediumwechsel durchgeführt und der Überstand asserviert. Die Arbeiten erfolgten zur Vermeidung von Verschleppung der Kontamination streng separat in getrennten Laboren, an unterschiedlichen Sterilbänken und mit ortständigem Material. Nach 14 Tagen bei Konfluenz der Zellkulturen erfolgte die Ablösung der Zellen (vgl. 2.2.5). Etwa 50% der resuspendierten, abgelösten Zellen wurden als Proben für die PCR verwendet. Bei den unkontaminierten Zelllinien wurden die restlichen 50% auf jeweils zwei Zellkulturflaschen pro Zelllinie aufgeteilt, sodass ca. 25% der ursprünglichen Zellen pro Flasche neu ausgesät wurden. Die Verarbeitung der Proben für die PCR erfolgte analog der Beschreibung in 2.3 sowie 2.4.

Die neu ausgesäten Zellen wurden über Nacht im unkontaminierten Inkubator bis zur Sicherung der Adhärenz und Beginn der Proliferation kulturiert. Anschließend wurde je eine Flasche als unkontaminierte Kontrolle behalten und die zweite Flasche in den „Mykoplasmen“-Inkubator gebracht. Ebenso erfolgte der erste Mediumwechsel mit 50% frischem sterilen Medium und 50% des asservierten Überstands, je nach Kultur mit oder ohne Kontamination. Die weiteren Mediumwechsel erfolgten alle 3 Tage für eine Woche nach dem gleichen Schema. Danach wurde der Mediumwechsel für alle Kulturen mit 100% sterilem Medium ohne Überstand durchgeführt. Nach 14 Tagen wurden alle Zellen abgelöst und analog 2.3 bzw. 2.4 weiterverarbeitet.

So konnten wir über das Mykoplasmandetektionskit den Kontaminationsstatus vor und nach Infektion, sowie über die RT-PCR die Expression von CD276 vor und nach Infektion untersuchen.

2.3 PCR

2.3.1 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion wurde mit dem RNA-Extraktionskit Mini von Qiagen durchgeführt.

Der erste Schritt der RNA-Extraktion schloss sich an die erfolgte Ablösung der Zellen nach dem Passageprotokoll an (vgl. 2.2.5). Nach der Gewinnung eines Zellpellets durch Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde wiederum bei 1200 Upm für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand abermals verworfen.

Das nun entstandene Zellpellet wurde in 350 µl mit Mercaptoethanol versetztem RLT-Puffer resuspendiert und anschließend bei -80°C eingefroren.

Zur weiteren Extraktion wurden die Proben aufgetaut und 350 µl 70%-Ethanol hinzugegeben, die Suspension wurde mithilfe einer Spritze homogenisiert und dann auf die Extraktionssäule gegeben. Diese wurde nun bei 9391 g 15 Sekunden lang zentrifugiert und danach der Durchfluss verworfen.

Nun wurden 350 µl Waschpuffer (RW1) auf die Säule gegeben und abermals bei 9391g für 15 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wieder verworfen. Dann wurden 80 µl eines Gemisches aus 70µl RDD-Puffer und 10 µl in RNase-

freiem Wasser gelöster DNase auf die Säule pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 350 μ l des RW1-Puffers hinzugegeben und wieder für 15 Sekunden bei 9391g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die Säule wurde in ein frisches Mikroreaktionsgefäß überführt und 500 μ l RPE-Puffer darauf pipettiert. Wieder wurde nun für 15 Sekunden bei 9391g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Danach wurden noch einmal 500 μ l RPE-Puffer hinzugegeben und nun zwei Minuten lang bei 9391g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen.

Die Säule wurde nun nochmals bei 9391g für 15 Sekunden zentrifugiert und danach erneut in ein frisches Mikroreaktionsgefäß gestellt. Dann wurden 40 μ l RNasefreies Wasser dazupipettiert und anschließend eine Minute lang bei 9391 g zentrifugiert.

Die nun im Mikroreaktionsgefäß enthaltene RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.3.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Zunächst wurde mithilfe des NanoPhotometers die Konzentration an RNA in den Proben bestimmt, als Nullwert-Referenz diente destilliertes Wasser. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm.

2.3.3 Umschreiben in cDNA

Das Umschreiben der RNA in cDNA erfolgte mit dem Advantage RT-to-PCR-Kit von Takara. 1 μ g der RNA-Probe wurde in einem Mikroreaktionsgefäß mit depc-Wasser auf 12,5 μ l aufgefüllt. Nun wurde jeweils 1 μ l Oligo-dT-Primer hinzugefügt. Die Proben wurden für zwei Minuten bei 70°C im PCR-Block erhitzt. Danach wurden jeweils 6,5 μ l Master-Mix hinzugefügt. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 7: Zusammensetzung des Master-Mix für die Transkription in cDNA dargestellt. Nun wurden die Proben für 60 Minuten bei 42°C im PCR-Block inkubiert und danach für fünf Minuten auf 94°C erhitzt. Dann folgte das Hinzufügen von jeweils 80 μ l depc- Wasser. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

4 µl	5x-Buffer
0,5 µl	RNase-Inhibitor
1 µl	dNTP-Mix
1 µl	Reverse Transkriptase

Tabelle 7: Zusammensetzung des Master-Mix für die Transkription in cDNA

2.3.1 Quantitative RT-PCR

Die quantitative RT-PCR wurde mit einem LightCycler 480 durchgeführt.

Als Referenzgene dienten Peptidylprolyl-Isomerase A (PPIA) und humanes β_2 -Mikroglobulin (h β_2 MG), das Zielgen war CD276. Das humane β_2 -Mikroglobulin wurde aufgrund seiner Stabilität auch unter hypoxischen Bedingungen als Referenz gewählt (Lima et al., 2016).

In eine 96-well-Platte wurde von jeder cDNA-Probe je 2 µl in 6 Wells pipettiert, sodass von jedem Gen eine Zweifachbestimmung durchgeführt werden konnte. Zur cDNA-Probe wurden 18 µl des Mastermixes der entsprechenden Probe hinzugefügt. Dieser Mastermix bestand aus je 10 µl SybrGreen, 2 µl des jeweiligen Primers und 6 µl Non-template-Water. Die Primer sowie ihre Sequenzen sind in Tabelle 8 dargestellt.

Gen	Primer	Sequenz 5' → 3'
CD276	Forward	TGTGACCAGCACATGCTTCC
	Reverse	TTTCCTTTCCCCTCCTCCTC
Humanes β_2 -Mikroglobulin	Forward	CCAGCAGAGAATGGAAAGTC
	Reverse	GATGCTGCTTACATGTCTCG
Peptidoprollyl-Isomerase A (PPIA)	Forward	TTCATCTGCACTGCCAAGCAC
	Reverse	TGCAGTTGTCCACAGTCAGC

Tabelle 8: PCR-Primer

Als Negativkontrolle dienten jeweils 2 µl Non-template-Water mit 18 µl Primermix.

Als technische Positivkontrolle wurden 2 µl einer cDNA-Probe aus glatten Muskelzellen verwendet und als Zielgen diente Tag.

In Abbildung 4 ist beispielhaft ein Pipettierschema für die Durchführung der PCR dargestellt.

Material und Methoden

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2159	2160	2163	2164	2148	2149	2167	2168	2156			
B												
C												
D												
E												NTC PPIA
F												NTC NF2HG
G												NTC CD276
H												pos. KO SUC Tap

SubGreen 10 µl × 21 = 210 µl
 Primer 2 µl × 21 = 42 µl
 NTW 6 µl × 21 = 126 µl

Abbildung 4: Beispielsicht einer Pipettiervorlage für die quantitative RT-PCR

Die quantitative RT-PCR im Lightcycler erfolgte in 39 Zyklen bei 60°C Hybridisierungstemperatur. Der Ablauf des PCR-Programms ergibt sich aus Tabelle 9. Ein entsprechendes Schema der Zyklen ist in Abbildung 5 dargestellt. Abbildung 6 zeigt beispielhaft die Schmelzkurven nach erfolgter quantitativer RT-PCR.

Reaktion	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Vordenaturierung	95°C	5 min	1
Denaturierung	95°C	5s	39
Primerhybridisierung	60°C	20s	
Elongation	72°C	30s	
Schmelzkurven	95°C	5s	1
	60°C	30s	1
	97°C	Kontinuierlich	1
Cooling	4°C		

Tabelle 9: Programm der quantitativen RT-PCR

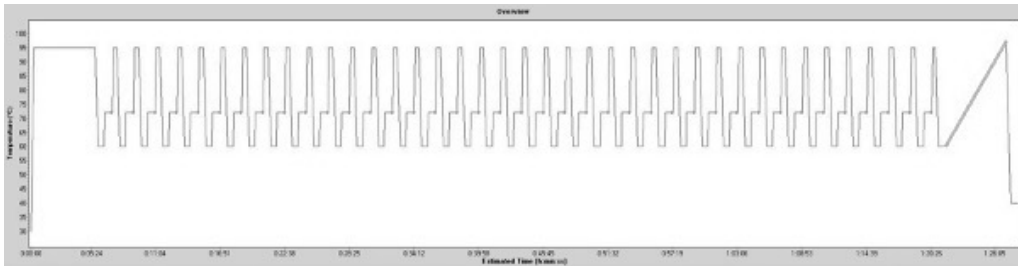


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Zyklen der Quantitativen-Real-Time-PCR

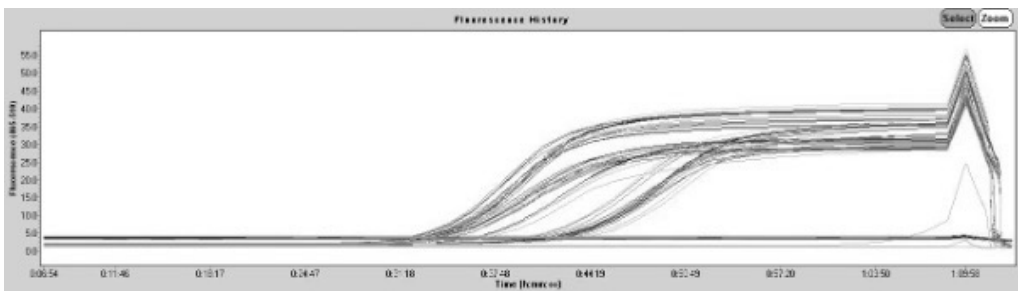


Abbildung 6: Schmelzkurven der Proben bei der Quantitativen-Real-Time-PCR (Beispieldarstellung)

2.4 Mycoplasmen-PCR

2.4.1 Probenvorbereitung

Nach ca. zwei bis drei Tagen ohne Manipulation an der Zellkultur und bei 80% Konfluenz der Zellen wurde 1 ml des Zellkulturmediums entnommen und in ein Mikroreaktionsgefäß überführt.

Der Überstand wurde nun bei 94°C für fünf Minuten im Thermomixer denaturiert und anschließend bei 13000 g für eine Minute zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand in ein frisches Mikroreaktionsgefäß transferiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.4.2 RT-PCR

Zur Detektion einer Mykoplasmeninfektion via quantitativer RT-PCR wurde das MycoSPY-Kit von Biontix verwendet.

Alle Schritte erfolgten auf Eis. Die Proben und benötigten Reagenzien wurden aufgetaut und sorgfältig gevortext. Jeweils 15 µl Mastermix pro Probe wurden mit 8 µl SybrGreen versetzt, um die Reaktion im LightCycler detektieren zu können. Die Zusammensetzung des Mastermix ist in Tabelle 10 dargestellt.

Menge	Substanz
9,3 µl	Non-template Water
2,7 µl	Taq-Polymerase-Puffer
9 µl	Primermix
1 µl	700bp-Kontrolle
1 µl	Taq-Polymerase

Tabelle 10: Zusammensetzung des Mastermix für die Untersuchung mittel MycoSPY-Kit

Von jeder Probe wurden 2 µl in eine Vertiefung der 96-Well-Platte pipettiert. Als Negativkontrolle dienten 2 µl Non-template-Water. In jedes dieser Wells wurden 23 µl des SybrGreen-Primermixes hinzugefügt. Als technische Positivkontrolle diente wieder eine cDNA-Probe glatter Muskelzellen und der Transgelineprimer (vgl. 2.3.1). Die Platte wurde nach dem Auftragen der Proben mit einer Folie verschlossen und für eine Minute bei 1000 Upm zentrifugiert. Der Ablauf des PCR-Programms ist in Tabelle 11 dargestellt. Nach Ablauf der quantitativen RT-PCR wurde die Platte bei -20°C über Nacht gelagert.

Temperatur	Dauer	Reaktion	Anzahl der Zyklen
94°C	60s	Vordenaturierung	1
94°C	30s	Denaturierung	35
62°C	30s	Primeranlagerung	
72°C	60s	Polymerisation	
72°C	180s	Endgültige Verlängerung	1

Tabelle 11: Programm der PCR bei der Mykoplasmandetektion

2.4.3 Gel und Auswertung

Zur Analyse der Produktqualität (Größe/ Nebenprodukte) der RT-PCR wurde ein 2%iges Agarosegel verwendet. Zu 50 ml der flüssigen Agarose wurden 5 µl Biotinum Gel Red Nucleic Acid Gel stain hinzugefügt. Dann wurde die Mischung auf ca. 60°C abgekühlt und in die Form gegossen. Nach 20-30 Minuten wurde das Gel mit 1x-TBE-Puffer übergossen.

Von jeder Probe waren zuvor 10 µl des PCR-Produkts mit 4 µl Ladepuffer vermischt worden. 10 µl von jeder dieser Verdünnungen wurden nun auf das Gel aufgetragen. Als Marker wurden 5 µl eines 100 bp Ladder-Markers aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte nun bei 50 Volt für etwa eine Stunde.

Bei 700 bp erscheint die Bande der internen Kontrolle aus dem MycoSpy-Kit. Falls eine Mykoplasmenkontamination vorliegt, sollte eine weitere Bande bei 500 bp auftauchen.

2.5 SDS-Page und Western Blot

2.5.1 Proteinextraktion

Die Proben wurden zunächst wie in 2.2.5 beschrieben abgelöst und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 ml PBS gewaschen. Dann wurden die Proben erneut bei 1200 Upm zentrifugiert und der Überstand wiederum verworfen. Das Pellet wurde nun in 100 – 200 µl Lysepuffer (RIPA+-Puffer) aufgenommen und anschließend bei -80°C eingefroren.

Die Menge an Lysepuffer ergab sich aus der Größe des Pellets, so wurde ein kleines Pellet mit 100 µl und ein großes Pellet mit 200 µl des Lysepuffers vermischt. Vor der Verwendung wurde dem Pufferansatz RIPA- pro Milliliter Puffer 5 µl Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) zugesetzt, dies ergab dann RIPA+-Puffer.

2.5.2 Proteinbestimmung und -verdünnung

Die Proteinbestimmung wurde mit dem DC Protein Assay Kit II von Biorad durchgeführt. Als Standard diente der BSA Standard von Biorad, der in 10 ml destilliertem Wasser gelöst wurde. Dies ergab eine Stammlösung mit einer Konzentration von 3,04 mg/ml.

Zur Durchführung der Proteinbestimmung wurden die Proben zunächst bei 15.000 Upm für 20 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand wurde in einer Rundbodenplatte 1:4 mit RIPA+-Lysepuffer (vgl. 2.5.1) vorverdünnt.

In einer Mikrotiterplatte erfolgte die eigentliche Bestimmung der Proteinkonzentration, hierbei wurden Dreifachwerte verwendet. Als Leerwert diente RIPA+-Puffer. Die Stammlösung des Standards 1 war zuvor mit RIPA+-Puffer 1:2, 1:4, 1:8 und 1:16 verdünnt worden, was insgesamt fünf Standards in folgenden Konzentrationen ergab. Die Standardkonzentrationen sind in Tabelle 12: Standardkonzentrationen nach Proteinbestimmung von CD276 dargestellt.

Standard 1	3,04 mg/ml
Standard 2	1,52 mg/ml
Standard 3	0,76 mg/ml
Standard 4	0,38 mg/ml
Standard 5	0,19 mg/ml

Tabelle 12: Standardkonzentrationen nach Proteinbestimmung von CD276

Pro Well wurden 5 μ l der Probe verwendet, 25 μ l der Reagenz A' (bestehend aus 20 μ l Reagenz S pro 1 ml Reagenz A) und 200 μ l der Reagenz B hinzugefügt. Die Mikrotiterplatte wurde für fünf Sekunden auf den Schüttler gestellt und danach für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Messung im ELISA-Reader bei 650 nm.

Um das benötigte Proteinvolumen zu berechnen, wurde nun von den Dreifachwerten jeder Probe, der Standards und des Blanks der Mittelwert gebildet, von dem dann der Mittelwert des Leerwerts abgezogen wurde.

Nun wurde aus den o.g. Konzentrationen der Standards und den jeweiligen Mittelwerten der Messergebnisse eine Regressionsgerade gebildet, wobei die Konzentrationen die x-Werte darstellten. Die Gleichung der Regressionsgeraden wurde zur Berechnung verwendet, indem für y der um den Leerwert bereinigte Mittelwert der Probe eingesetzt wurde. Von jeder Probe wurden 100 μ l verwendet und mit RIPA+-Puffer auf eine Konzentration von 2mg/ml verdünnt. Pro 25 μ l des Volumens der verdünnten Probe wurden 8 μ l Lämmli-Puffer hinzugefügt. Die Proben wurden für zehn Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend bei -20°C gelagert. Der Lämmli-Puffer bestand aus 250 mM Trishydroxymethylaminomethan-Salzsäure (Tris-HCL) pH6,8, 20% Glycerin, 8% Sodiumdodecylsulfat (SDS), sowie einer kleinen Spatelspitze Bromphenolblau. Nach dem Mischen der Zutaten wurde der pH auf 6,8 eingestellt und der Puffer bei -20°C gelagert. Vor Gebrauch erfolgte die Zugabe von 5% (v/v) Mercaptoethanol.

2.5.3 Anfertigen der Gele

Für das Auftrennen von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (SDS-Page) wurde ein 8%iges Trenngel (pH 8,8) sowie ein 5%iges Sammelgel (pH 6,8) verwendet.

Zunächst wurde das Trenngel gegossen, nach 30 Minuten erfolgte das Gießen des Sammelgels auf das polymerisierte Trenngel. Nach weiteren 30 Minuten wurden die fertigen Gele bei Bedarf in feuchte Moltontücher gewickelt und über Nacht bei 4°C gelagert.

2.5.4 SDS-Page-Elektrophorese

Zur Proteintrennung wurden die Glasplatten in die Kammern der Elektrophoreseapparatur eingespannt und die Kammern mit Gelpuffer gefüllt. Der Gelpuffer bestand aus: 10% Tris-Glycin, 1% 10%igem SDS und 89% destilliertem Wasser. Er wurde bei 4°C gelagert.

Die Taschen des Gels wurden mit Gelpuffer gespült und dann mit jeweils 25 µl der zu untersuchenden Proben gefüllt. Als Marker diente MagicMark, von diesem wurden 5 µl in eine Tasche gefüllt.

Anschließend wurde die Elektrophorese für 90 Minuten bei 100 Volt durchgeführt. Für den Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine Membran wurde ein Transferpuffer verwendet. Dieser bestand aus: 10% Tris-Glycin, 20% Methanol und 70% destilliertem Wasser. Er wurde bei 4°C gelagert.

Das Gel wurde im Transferpuffer von den Glasplatten gelöst und zwischen zwei Filterpapieren auf eine Membran gelegt. Die Konstruktion wurde in die mit Transferpuffer gefüllte Kammer gestellt und auf Eis wurde wiederum bei 100 Volt für 90 Minuten die Elektrophorese durchgeführt.

2.5.5 Antikörperfärbung und Aufnahme

Nach dem Transfer wurde die Membran drei Mal für zehn Minuten auf dem Schüttler in PBS gewaschen. Danach erfolgte für eine Stunde das Blocken in 5%iger Lösung von Milchpulver in PBS mit 0,1% Tween20.

Dann wurde die Membran für drei mal zehn Minuten in PBS mit 0,1% Tween20 und anschließend noch einmal für zehn Minuten in PBS ohne Zusätze gewaschen. Als Erstantikörper wurde anti-CD276 (mo α hu IgG1, mAb; abcam) 1:600 in 5%iger Lösung von Milchpulver in PBS verdünnt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C bei langsamer Rotation. Am nächsten Morgen wurde die Membran wieder dreimal für zehn Minuten in PBS mit 0,1% Tween20 und dann noch einmal für zehn Minuten in PBS ohne Zusatz gewaschen. Anschließend

wurde der Zweitantikörper aufgetragen (rb α mo IgG1, serum-HRP; Dako). Dieser wurde 1:10000 in 5%iger Lösung von Milchpulver in PBS verdünnt. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Danach wurde die Membran erneut dreimal für zehn Minuten mit PBS mit 0,1% Tween20 und einmal für zehn Minuten in PBS ohne Zusatz gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Entwicklung am Blot Scanner. Hierzu wurden die Substrate 1 und 2 in gleichen Teilen miteinander vermischt und auf die Membran gegeben. Dann wurde für fünf Minuten im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Messung mit der Software ImageStudio™ Lite von LICOR.

2.5.6 Stripping und Referenzprotein β -Aktin

Zum Ablösen der an die Membran gebundenen Antikörper (s.c. „Strippen“) wurde ein Strippingpuffer verwendet, dieser bestand aus: 0,2 M Glycin, 0,1% SDS, 1% Tween20 und ca. 99% destilliertem Wasser. Der pH-Wert wurde auf 2,2 eingestellt. Die Membran wurde dreimal für 20 Minuten in diesem Puffer gestriipt und danach für zehn Minuten in PBS gewaschen. Danach erfolgte das Auftragen des zweiten Erstantikörpers Anti- β -Actin (rb α hu, serum; abcam). Dieser wurde 1:1000 in 5%iger Milchpulver-PBS-Lösung verdünnt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler. Am nächsten Morgen wurde die Membran wieder dreimal für zehn Minuten in PBS mit 0,1% Tween20 und dann noch einmal für zehn Minuten in PBS ohne Zusatz gewaschen.

Anschließend wurde der zweite Zweitantikörper (gt α rb IgG, serum-HRP; Dako) aufgetragen. Dieser wurde 1:10000 in 5%iger Milchpulver-PBS-Lösung verdünnt. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Danach wurde die Membran erneut dreimal für zehn Minuten mit PBS mit 0,1% Tween20 und einmal für zehn Minuten in PBS ohne Zusatz gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Entwicklung am Blot Scanner (vgl. 2.5.5).

2.5.7 Auswertung/ Normierung

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm ImageStudio™ Lite von LICOR. Die Normalisierung erfolgte nach den Empfehlungen von ThermoFisher (ThermoFisherScientific, 2018). Von den Rohdaten der Messungen der Proteine CD276 und β -Aktin wurde jeweils der Hintergrund-Leerwert abgezogen.

Anschließend wurde jeder β -Aktin-Wert eines Gels durch den höchsten Wert von β -Aktin in diesem Gel geteilt (vgl. Abbildung 7). Die Messwerte für das Zielprotein CD276 des gleichen Gels wurden nun durch den so erhaltenen Normalisierungsfaktor geteilt (vgl. Abbildung 8).

$$\text{Normalisierungsfaktor eines Gels} = \frac{\text{Messwert von } \beta - \text{Aktin}}{\text{Höchsten Messwert von } \beta - \text{Aktin des Gels}}$$

Abbildung 7: Formel zur Berechnung des Normalisierungsfaktors eines Western-Blot-Gels mithilfe des Housekeeping-Enzyms β -Aktin

$$\text{Normalisierter CD276 - Messwert} = \frac{\text{Gemessenes CD276 - Signal}}{\text{Normalisierungsfaktor des Gels}}$$

Abbildung 8: Formel zur Berechnung des normalisierten CD276-Messwerts beim Western-Blot zum Vergleich zwischen Gelen

2.6 Durchflusszytometrie

2.6.1 Vorbereitung der Zellen

Zunächst wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, danach wurden die adhären Zellen in der Kulturflasche mit PBS gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 3 ml Accutase pro Flasche abgelöst. Die Inkubation erfolgte hierbei bei 37°C für 12 Minuten.

Die Proteolyse wurde durch Zugabe von 5 ml Zellkulturmedium in jede Flasche gestoppt und die Zellen wurden in Zentrifugationsröhrchen überführt. Hierauf folgte die Zentrifugation bei 200 g für fünf Minuten. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 3 ml PFEA-Puffer resuspendiert und wovon jeweils 1,5 ml in ein Mikroreaktionsgefäß überführt wurden, um von jeder Probe eine Kontrolle für die Durchflusszytometrie zu gewinnen. Dann folgte die Zentrifugation bei 300g für vier Minuten und das Dekantieren des Überstandes. Die Mikroreaktionsgefäße wurden trockengetupft und jedes Pellet wurde in 50 μ l Gamunex® resuspendiert. Das Gamunex® wurde ursprünglich 10%ig bezogen und dann 1:20 in PBS verdünnt. Die Proben wurden nun für 20 Minuten bei 4°C inkubiert.

Dann wurde in jedes Mikroreaktionsgefäß 1 ml PFEA-Puffer hinzugefügt. Danach erfolgte abermals die Zentrifugation bei 300 g für vier Minuten. Der Überstand wurde wieder dekantiert und das Mikroreaktionsgefäß trockengetupft.

2.6.2 Färbung

Alle Schritte erfolgten auf Eis. Der Antikörper Anti-CD276 wurde 1:20 in PFEA verdünnt. Pro Probe wurden 50 µl des Antikörpers verwendet, für die Kontrollen wurde PFEA genutzt. Nach Zugabe des Antikörpers bzw. PFEA-Puffers wurden die Proben für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 1 ml PFEA-Puffer pro Mikroreaktionsgefäß. Dann wurden die Proben bei 300 g für vier Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Mikroreaktionsgefäße trockengetupft. Jedes Pellet wurde in 300 µl PFEA-Puffer aufgenommen und in ein Durchflusszytometrie-Röhrchen überführt.

2.6.3 Messung und Auswertung

Die Messung erfolgte mit dem Durchflusszytometer LSR II von BD-Biosciences. Die Auswertung erfolgte mit der Software FlowJo™ Version 7.1 von LLC. Zur besseren statistischen Auswertung wurden die jeweiligen Messwerte der ungefärbten, internen Kontrolle von den Messdaten für Intervention und Negativkontrolle abgezogen.

2.7 Histologie

2.7.1 AE1/AE3-Färbung

Zum Nachweis des epithelialen Phänotyps der somatischen Urothelkulturen wurde jeweils eine immunzytochemische Färbung der Pankeratinmarker AE1/AE3 vorgenommen. Die Färbung erfolgte nach einem internen Protokoll. Hierzu wurden 20.000 Zellen der zu testenden Kultur in jeweils zwei Kammern eines Chamber Slides ausgesät und bis zur Konfluenz unter den in 2.2.2 beschriebenen Bedingungen gezogen. Bei Konfluenz erfolgte die Fixierung der Zellen: Zunächst wurde das Zellkulturmedium abgeklopft. Danach wurden die Kammern dreimal für zwei Minuten mit je 400 µl PBS pro Kammer gewaschen, um Rückstände zu entfernen. Die Fixierung erfolgte mit 300 µl 4% Paraformaldehyd (pH 7,4) pro Kammer für zehn Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Kammern erneut zweimal mit 400 µl PBS für je zwei Minuten gewaschen und der Plastikrahmen der Kammern entfernt. Zur Permeabilisierung erfolgte das Auftragen von 140 µl Saponinarbeitslösung pro Kammer für zehn Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde die

Saponinarbeitslösung mit PBS abgespült und der Chamber Slide dreimal für zwei Minuten in einer Standküvette mit PBS gewaschen.

Zur eigentlichen Färbung wurde das EnVision/HRP-Detection-System verwendet. Der Primärantikörper wurde 1:500 mit Antibody Diluent verdünnt und pro Kammer wurden 100 µl aufgetragen. Als Negativkontrolle diente Antibody Diluent ohne Antikörper, was ebenfalls mit 100 µl pro Kammer aufgetragen wurde. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur in feuchter Atmosphäre. Anschließend wurde der Antikörper bzw. die Negativkontrolle abgeklopft und mit PBS abgespült. Danach erfolgte abermals das Waschen mit PBS für fünf Minuten bei Raumtemperatur.

Das PBS wurde wiederum abgeklopft und in jede Kammer wurden 100 µl HRP-markiertes Polymer pipettiert. Dies wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert, danach wurde das Polymer abgeklopft und mit PBS abgewaschen.

Anschließend wurden 100 µl Substratchromogen pro Kammer hinzugefügt und für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Abklopfen erfolgte das Waschen in Ampuwa® für fünf Minuten.

Danach wurde mit Hämatoxylin eine Kernfärbung durchgeführt und die Lösung nach dem Auftropfen für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Abklopfen wurde unter fließendem Leitungswasser zehn Minuten lang gewässert. Anschließend wurde die Probe luftgetrocknet.

Für eine dauerhafte Lagerung wurde das Präparat mit Glyceringelatine eingedeckelt.

Die Auswertung erfolgte bei 10x-Objektivvergrößerung. Nachdem die Kammer einmal in der gesamten Fläche betrachtet wurde, wurde ein repräsentativer Ausschnitt gewählt und fotografiert. Die AE1/AE3-positiven Zellen zeigen eine deutliche Braunfärbung, während die negativen Zellen violett-bläulich erscheinen. Der Befund wurde als positiv gewertet, wenn $\geq 95\%$ der Zellen eine Braunfärbung aufwiesen.

2.7.2 Paraffinschnitte

Aus der Tumorbank der Universität erhielten wir 126 Gewebeproben in Paraffin von 10 Blasentumor-Patienten. Hieraus wurden am Mikrotom 5 µm dicke Schnitte

erstellt, wobei jeweils zwei konsekutive Schnitte auf einem Objektträger platziert wurden.

2.7.3 Entparaffinisierung

Die Schnitte wurden für 30 Minuten bei 40°C auf die Heizplatte gelegt. Danach wurden sie zweimal für 15 Minuten in Xylol getaucht und anschließend zweimal für fünf Minuten in Ethanol 100% gestellt. Danach kamen die Schnitte für fünf Minuten in Ethanol 80% und für weitere fünf Minuten in Ethanol 70%. Anschließend wurden sie für jeweils fünf Minuten in destilliertes Wasser gestellt.

2.7.4 Antigen-Retrieval

Zur Wiederherstellung der Proteinstrukturen und zur besseren Bindung des Erstantikörpers an die Paraffinschnitte erfolgte ein Antigen-Retrieval mit Tris-Urea-Puffer für 10 min bei 85°C im Wasserbad. Nach dem Abkühlen wurden die Schnitte zweimal für fünf Minuten in PBS gewaschen.

2.7.5 Immunfluoreszenzfärbung CD276

Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte nach einem internen Protokoll mit dem Erstantikörper Anti-CD276 (ab105922), der 1:2000 mit 0,1% BSA verdünnt wurde. Zur Negativkontrolle wurde je ein Schnitt mit der Antikörperverdünnung und ein Schnitt mit reinem 0,1 % BSA ohne Antikörper gefärbt. Um eine Vermischung der Kontrollen auf dem Objektträger zu verhindern, wurden die einzelnen Präparate vorher mit einem DAKO-Fettstift umrandet. Pro Schnitt wurden 100 µl aufgetragen. Die Inkubation erfolgte über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C. Am nächsten Morgen wurden die Schnitte zweimal für je fünf Minuten in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Färbung mit dem Zweitantikörper CY3 goat-anti-rabbit. Dieser wurde 1:300 mit 0,1% BSA verdünnt. Der Zweitantikörper wurde auf alle Schnitte aufgetragen. Die Einwirkzeit betrug hier 30 Minuten, sie erfolgte im Dunkeln. Danach wurden die Objektträger zweimal für fünf Minuten in PBS gewaschen und anschließend getrocknet.

Danach wurden die Objektträger mit aushärtendem Eindeckmedium mit DAPI eingedeckelt und direkt mikroskopiert. Die Langzeitlagerung erfolgte bei -70°C.

2.7.6 Auswertung

Am Mikroskop wurden die Schnitte hinsichtlich ihrer Fluoreszenz beurteilt. Dazu wurde die Fluoreszenz des mit dem Erstantikörper markierten Schnitts mit der Negativkontrolle (nur BSA) verglichen.

Die gefärbten Schnitte wurden am Mikroskop zunächst in 20x-Vergrößerung durchmustert und dann ein repräsentativer Ausschnitt bei 40x-Vergrößerung aufgenommen. Anschließend erfolgte das Aufsuchen der entsprechenden Stelle in der Negativkontrolle und ebenfalls eine Aufnahme hiervon. Die Belichtungszeiten wurden für den blauen DAPI-Kanal auf 1000 ms und für den roten CY3-Kanal auf 1100 ms festgelegt.

Falls die entsprechende Stelle im Schnitt der Negativkontrolle nicht auffindbar war, erfolgte das Aufsuchen und die Aufnahme eines entsprechenden, repräsentativen Ausschnitts im Schnitt mit Primärantikörper.

Die Bilder wurden mit der Open-Source-Software ImageJ (Rasband, 1997-2018) in der Version 1.53 ausgewertet. Zunächst wurden die Fotos in 8-bit-Grauskalen konvertiert, dann wurden die Farbkanäle (DAPI – blau und CY3 – rot) getrennt. Der weitere Vorgang erfolgte für beide Kanäle getrennt, aber in der gleichen Vorgehensweise. Zunächst wurde der Hintergrund minimiert (Rolling-ball-Radius 35,0 Pixels). Danach erfolgte die Schwellensetzung über Thresholding (Lower threshold level: 10, Upper threshold level: 255). Die erkannten Areale wurden nun markiert und Größe und Fluoreszenz der markierten Fläche gemessen.

Von den Messwerten für Fläche und Fluoreszenzintensität wurde zunächst der jeweilige Wert der Negativkontrolle abgezogen. Falls die Differenz ins Negative abwich, wurde sie manuell gleich null gesetzt, da weder für Fläche noch Fluoreszenz negative Werte sinnvolle Abbildungen sind. Anschließend wurde der erhaltene Wert der Fluoreszenzintensität durch die Fläche geteilt. Die manuell auf Null gesetzten Werte waren nicht teilbar und verblieben somit bei null.

2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software BM Corp. Released 2020. IBM SPSS Statistics for Macintosh, Version 27.0. Armonk, NY: IBM Corp.

Die Messwerte der Durchflusszytometrie und der WesternBlots wurden logarithmiert, um eine übersichtlichere Darstellung zu erhalten. Alle Daten wurden, falls aufgrund der Stichprobengröße möglich, zunächst mit dem Shapiro-Wilk-Test auf ihre Normalverteilung geprüft. Mittels Boxplot wurden Ausreißer identifiziert, diese wurden aber in jedem Fall in die Analyse übernommen. Anschließend wurde zum Vergleich der Gruppen je nach Anzahl der untersuchten Faktoren entweder ein t-Test für unabhängige Stichproben oder eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Wenn die Normalverteilung nicht gegeben war, wurde ein Mann-Whitney-U-Test oder ein Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrisches Verfahren durchgeführt. Alle Mann-Whitney-U-Tests wurden nach dem exakten Algorithmus von Dinneen und Blakesley berechnet (Dinneen and Blakesley, 1973). Als Maß für die Effektstärke wurden beim t-Test Cohens' d und beim Mann-Whitney-U-Test der Korrelationskoeffizient r nach Pearson berechnet (vgl. Abbildung 9, Abbildung 10, Abbildung 11). Korrelationen wurden mit dem Spearman's-Rank-Test untersucht.

$$d = \frac{2t}{\sqrt{df}}$$

Abbildung 9: Berechnung des Effektstärkemaß Cohens' d beim t-Test (wenn $N1 = N2$)

$$r = \sqrt{\frac{t^2}{t^2 + df}}$$

Abbildung 10: Berechnung des Effektstärkemaßes Pearsons Korrelationskoeffizient r beim t-Test ($N1 = N2$)

$$r = \frac{z}{\sqrt{N}}$$

Abbildung 11: Berechnung des Effektstärkemaßes Pearsons Korrelationskoeffizient r beim Mann-Whitney-U-Test

Die Gestaltung der Grafiken erfolgte mit der Software JMP®, Version 16, SAS Institute Inc., Cary, NC, 1989–2021.

3. Ergebnisse

3.1 Zellkulturanalyse

3.1.1 Zellwachstum und Duplikationsraten

Das Wachstumsmuster der unterschiedlichen Zellen ist beispielhaft in Abbildung 12 dargestellt. Bei jeder Passage wurden zudem durch Zellzählung die Duplikationsraten bestimmt (vgl. 2.2.6).

Nicht dargestellt sind die Ergebnisse der Mykoplasmentestungen und der AE1/AE3-Färbungen zur Identifikation des epithelialen Phänotyps der Urothelzellkulturen. Sofern nicht explizit erwähnt, beziehen sich alle im Folgenden genannten Werte auf mykoplasmennegative Zellkulturen. Alle im Folgenden verwendeten somatischen Urothelzellkulturen erfüllten die Kriterien des epithelialen Phänotyps nach AE1/AE3-Färbung (vgl. 2.7.1).

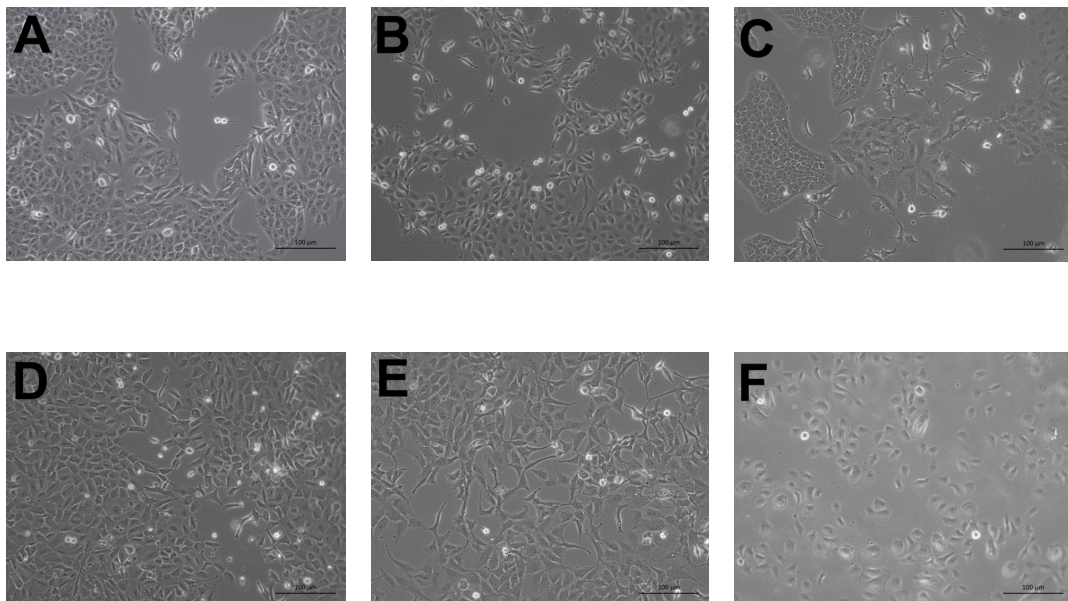


Abbildung 12: Exemplarische Darstellung der verwendeten Zelllinien und einer somatischen Urothelzellkultur.

A: 253J; B: 5637; C: Cal-29; D: T24; E: TCC; F: HL18/21

Es wurde eine einfaktorielle ANOVA berechnet, um zu untersuchen, ob sich die Duplikationsraten der untersuchten Tumorzelllinien und somatischen Urothelzellkulturen unterschieden. Die Daten waren für alle Zelllinien normalverteilt (Shapiro-Wilk-Test, $p > .05$). Varianzhomogenität war gemäß dem Levene-Test gegeben ($p > .05$). Es zeigte sich ein statistisch signifikanter

Ergebnisse

Unterschied der Duplikationsraten, $F(6,34) = 17.78$, $p < .001$, $\eta p^2 = .758$. Tukey-Post-hoc-Tests zeigten statistisch signifikante Unterschiede für mehrere Vergleiche. So war bei allen Tumorzelllinien, mit Ausnahme von HT1197, eine signifikant höhere Duplikationsrate im Vergleich zur somatischen Urothelzellkultur HL19/3 messbar. HT1197 zeigt eine signifikant niedrigere Duplikationsrate im Vergleich zu den Linien 253J, 5637, T24 und TCC. Die Duplikationsrate der Linie 5637 ist signifikant höher im Vergleich zu Cal-29 und TCC. Die deskriptiven Werte sind in Abbildung 13 dargestellt. Die genaue Teststatistik kann Tabelle 13 entnommen werden.

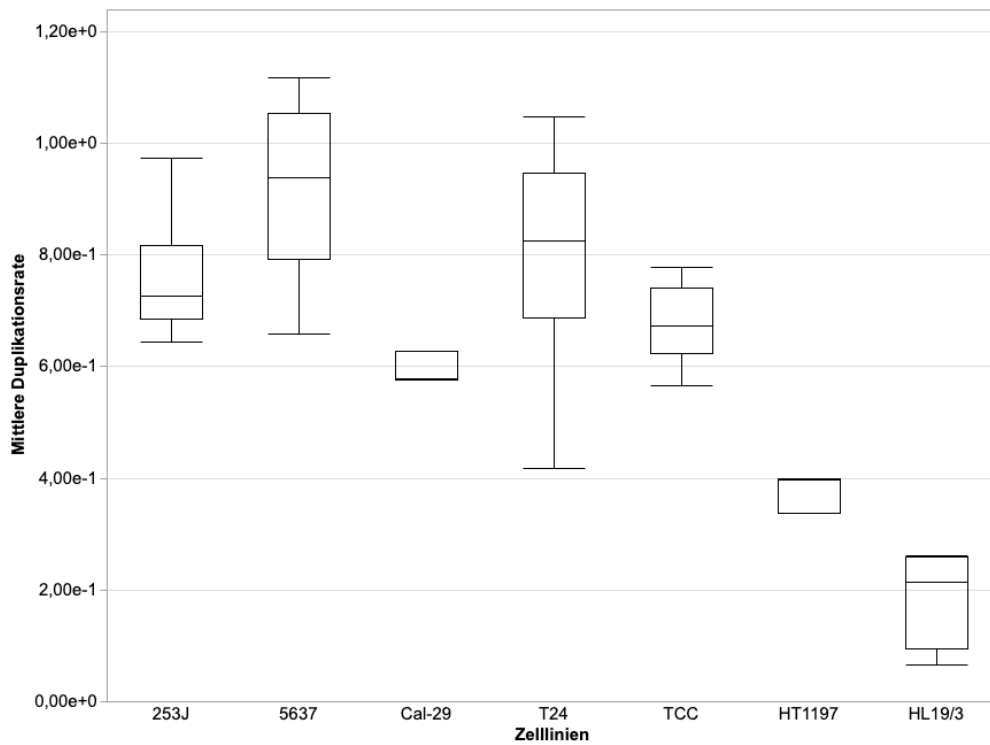


Abbildung 13: Mittlere Duplikationsraten der unterschiedlichen Zelllinien und somatischen Urothelzellkulturen pro 24 Stunden

Ergebnisse

Zelllinien/ -kultur	Teststatistik					
	253J	5637	Cal-29	T24	TCC	HT1197
5637	$p = 1.00$					
Cal-29	$p = 1.00$	$p = .033^*$				
T24	$p = 1.00$	$p = 1.00$	$p = .383$			
TCC	$p = 1.00$	$p = .042^*$	$p = 1.00$	$p = .922$		
HT1197	$p = .005^*$	$p < .001^{**}$	$p = 1.00$	$p < .001^{**}$	$p = .036^*$	
HL19/3	$p < .001^{**}$	$p < .001^{**}$	$p = .05$	$p < .001^{**}$	$p < .001^{**}$	$p = 1.00$

****** $p < .001$

***** $p < .05$

Tabelle 13: Vergleich der Duplikationsraten der Tumorzelllinien und somatischen Urothelzellkulturen

3.1.2 Vergleich der Expression von CD276 zwischen den Zelllinien

Die mRNA- und die Protein-Expressionen von CD276 der sechs Tumorzelllinien, sowie der somatischen Urothelzellkulturen wurden miteinander verglichen. Die genauen deskriptiven Statistiken sind in Tabelle 24 und Tabelle 25 im Anhang dargestellt. Für die Expression von CD276 auf der Zelloberfläche wurde aufgrund der geringen Stichprobengröße keine statistischen Tests durchgeführt.

Zunächst erfolgte der allgemeine Vergleich der CD276-mRNA-Expression zwischen Tumorzellen und somatischem Urothel. Beide Datensätze waren nach dem Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt ($p < .05$). Die Verteilungen der beiden Gruppen unterschieden sich nicht voneinander, Kolmogorov-Smirnov $p > .05$. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen der Expression von mRNA von CD276 zwischen den Tumorzellen ($N = 36$, $M = .18$, $Mdn = .13$, $SD = .13$) und den somatischen Urothelzellen ($N = 4$, $M = .21$, $Mdn = .25$, $SD = .08$), $U = 48.00$, $Z = -1.082$, $p = .300$, $r = -.02$.

Der Vergleich wurde ebenso auf Proteinebene durchgeführt. Hierfür wurden die Daten mittels Western Blot, wie in Kapitel 2.5 erläutert, erhoben. In Abbildung 14 ist ein solches Gel eines Western Blots exemplarisch dargestellt. Die Daten der somatischen Urothelzellkulturen waren normalverteilt (Shapiro-Wilk-Test, $p > .05$). Die Daten der Tumorzellen waren nach dem Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt ($p < .05$). Die Verteilungen der beiden Gruppen unterschieden sich

nicht voneinander, Kolmogorov-Smirnov $p > .05$. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen der Protein-Expression von CD276 zwischen den Tumorzellen ($N = 36$, $M = 11.58$, $Mdn = 11.78$, $SD = 1.31$) und den somatischen Urothelzellen ($N = 4$, $M = 10.90$, $Mdn = 10.91$, $SD = 1.81$), $U = 37.00$, $Z = -.722$, $p = .497$, $r = -.11$.

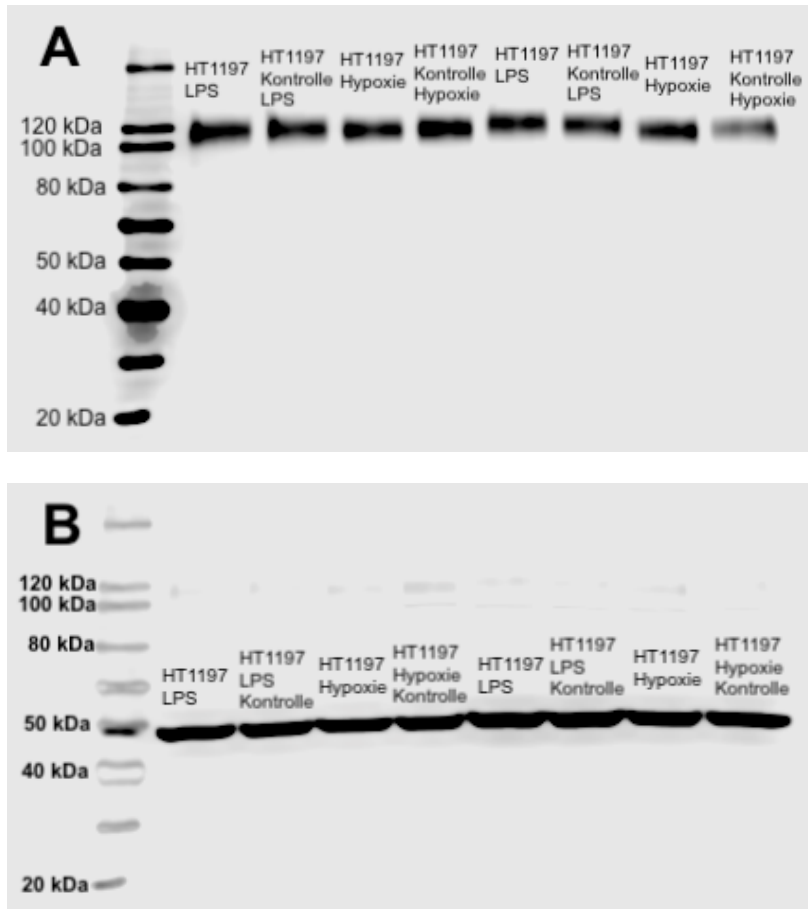


Abbildung 14: Exemplarische Darstellung eines Western Blots als Grundlage der Quantifizierung der Proteinexpression. A: Färbung von CD276, B: Färbung von β -Aktin.

Für die CD276-Expression auf der Zelloberfläche konnten aufgrund der geringen Stichprobengröße des somatischen Urothels keine statistischen Tests durchgeführt werden. Allerdings exprimieren die Tumorzellen mehr CD276 auf ihrer Oberfläche ($N = 12$, $M = 9.13$, $Mdn = 9.28$, $SD = .64$) als die somatischen Urothelzellen ($N = 2$, $M = 8.33$, $SD = .29$).

Die Expression von CD276 wurde auch getrennt nach Zelllinien untersucht.

Die Expression von CD276-mRNA der unterschiedlichen Zelllinien ist in Abbildung 15 dargestellt. Rein deskriptiv kann man auf mRNA-Ebene zwei hochexprimierende Zelllinien erkennen: 253J und HT1997. Im mittleren Bereich liegen 5637, Cal-29, sowie die somatischen Urothelzellkulturen. T24 und TCC exprimieren im Vergleich zu den anderen untersuchten Linien wenig mRNA von CD276.

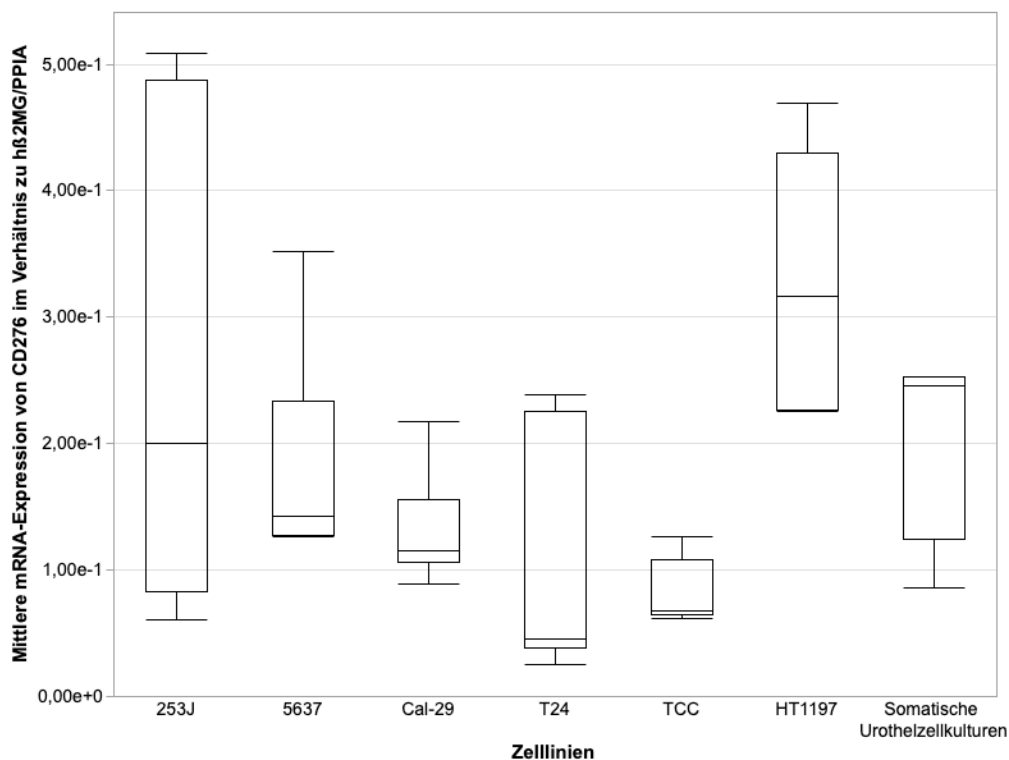


Abbildung 15: mRNA-Expression von CD276 der unterschiedlichen Zelllinien und somatischen Urothelzellkulturen

Die Daten von 253J und HT1197 waren normalverteilt (Shapiro-Wilk-Test, $p > .05$). Die Daten der restlichen Linien und der somatischen Urothelzellkulturen waren nicht normalverteilt (Shapiro-Wilk-Test, $p < .05$). Im Kruskal-Wallis-Test zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p = .005$, $H(6) = 18.324$). Ein Dunn-Bonferonni-Post-hoc-Test zeigte signifikante Unterschiede für die Vergleiche zwischen TCC und HT1197 ($z = -23.00$, $p = .014$, $r = -6.64$), sowie zwischen T24 und HT1197 ($z = -22.167$, $p = .021$, $r = -6.40$).

Auf Proteinebene und auf der Zelloberfläche liegen die CD276-Expressionen der Zelllinien und -kulturen jeweils nah beisammen, T24 und die somatischen

Ergebnisse

Urothelzellkulturen bilden auf beiden Ebenen den unteren Bereich. Die genauen Expressionen von CD276 auf Proteinebene und der Ebene der Zelloberfläche sind getrennt nach Zelllinien in Abbildung 16 und Abbildung 18 dargestellt.

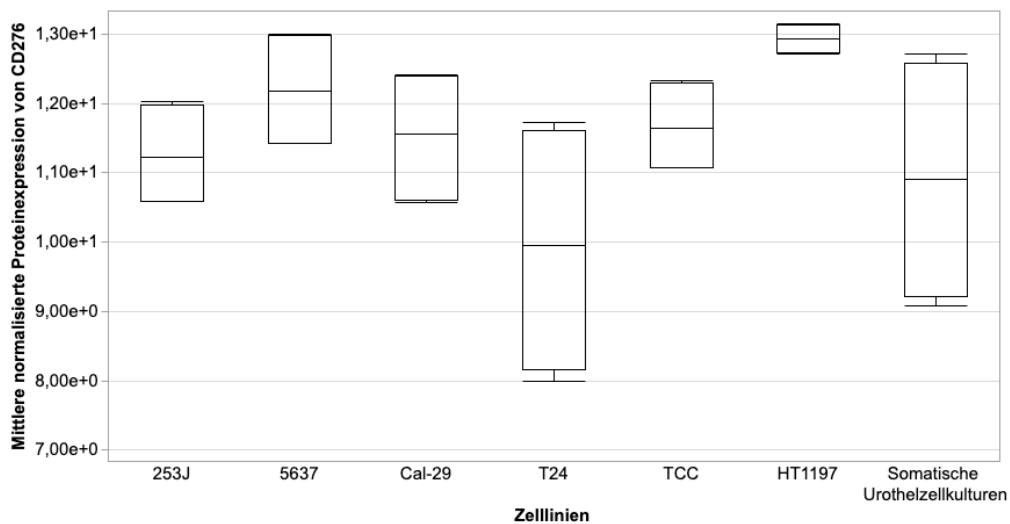


Abbildung 16: Protein-Expression von CD276 der unterschiedlichen Zelllinien und somatischen Urothelzellkulturen

Die Daten von 5637 waren nach dem Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt ($p < .05$). Die Daten aller anderen Tumorzelllinien und Urothelzellkulturen waren normalverteilt (Shapiro-Wilk-Test, $p > .05$). Im Kruskal-Wallis-Test zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied ($p = .005$, $H(6) = 12.605$). Ein Dunn-Bonferroni-Post-hoc-Test zeigte nach Bonferroni-Korrektur einen signifikanten Unterschied für den Vergleich zwischen T24 und HT1197 ($z = -18.25$, $p = .036$, $r = -3,45$).

Ergebnisse

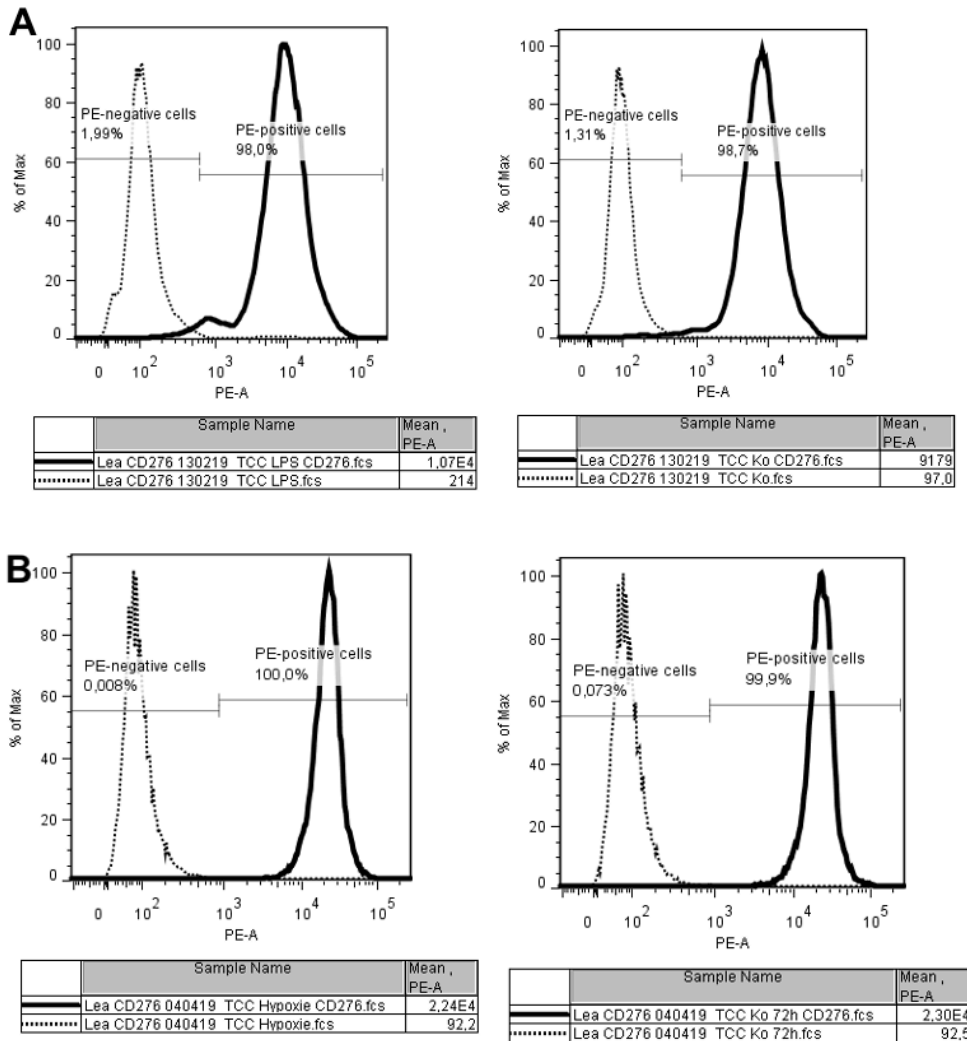


Abbildung 17: Exemplarische Darstellung der Auswertung der Durchflusszytometrischen Analyse der Tumorzelllinie TCC-SUP.

A: Inkubation mit LPS und Kontrolle. B: Inkubation unter hypoxischen Bedingungen und Kontrolle. Dünne Linie jeweils die ungefärbte Kontrolle, dickere Linie: jeweils Zellen nach Färbung von CD276

Aufgrund der geringen Stichprobengröße wurden für die CD276-Expression auf der Zelloberfläche keine statistischen Tests durchgeführt. Die Testung erfolgte wie in Kapitel 2.6 erläutert. Das Ergebnis einer solchen durchflusszytometrischen Messung wird exemplarisch in Abbildung 17 gezeigt. Die deskriptiven Daten sind im Anhang in Tabelle 26 dargestellt. Die höchste Expression von CD276 auf der Zelloberfläche zeigt die Zelllinie 5637, gefolgt von TCC. Die geringste Expression von CD276 zeigt T24.

Ergebnisse

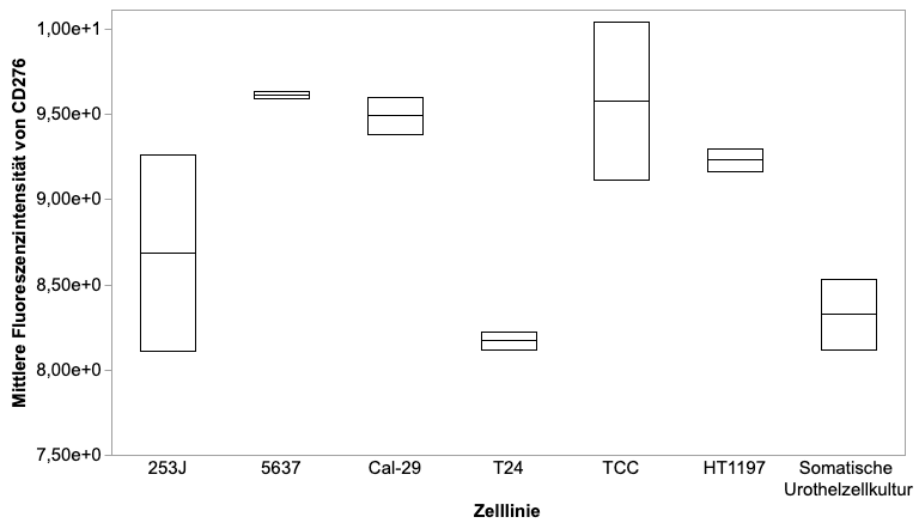


Abbildung 18: Protein-Expression von CD276 auf der Zelloberfläche der unterschiedlichen Zelllinien und somatischen Urothelzellkulturen

Um eine mögliche Korrelation zwischen der Expression von CD276 auf den unterschiedlichen untersuchten Ebenen und der Duplikationsrate zu untersuchen, wurden Spearman-Korrelationen berechnet. Hier zeigte sich eine Korrelation mittlerer Stärke zwischen der Expression von CD276 auf mRNA- und Proteinebene, $r_s(5) = .413$, $p = .029$. Die weiteren Vergleiche sind in Tabelle 14 dargestellt.

Korrelationen				
		mRNA- Expression von CD276	Proteinexpression von CD276	Proteinexpression von CD276 auf der Zelloberfläche
Proteinexpression von CD276	von	.029*		
Proteinexpression CD276 auf der Zelloberfläche	von der	.464	.714	
Duplikationsrate		.840	.250	.831

* $p < .05$

Tabelle 14: Korrelationen zwischen der CD276-Expression auf mRNA-, Protein- und Oberflächenproteinebene und der Duplikationsrate

3.1.3 Vergleich der Expression von CD276 nach Stimulation mit Hypoxie oder LPS

Unterschiede in der Expression von CD276 nach Stimulation mit LPS oder Hypoxie wurden bezüglich der Transkripte, der Proteinmenge und der Expression des Proteins auf der Zelloberfläche untersucht. Miteinander verglichen wurden jeweils mit LPS stimulierte Zellen, unter Hypoxie inkubierte Zellen und entsprechende Kontrollen für beide Gruppen (im Folgenden auch als LPS-Kontrolle bzw. Hypoxie-Kontrolle bezeichnet). Die Untersuchung erfolgte sowohl für die Gesamtheit aller untersuchten Zelllinien und -kulturen als auch für das Kollektiv der Tumorzellen und für alle Zelllinien bzw. -kulturen getrennt.

Es wurde untersucht, ob es einen Unterschied in der mRNA-Expression von CD276 abhängig von Stimulation mit LPS oder Hypoxie gab. Eine Aufteilung nach Zelllinien erfolgte nicht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 und die genauen deskriptiven Werte sind im Anhang in Tabelle 27 dargestellt. Die beiden Stimulationsgruppen und die LPS-Kontrollgruppe waren normalverteilt (Shapiro-Wilk-Test, $p > .05$). Die Daten der Hypoxie-Kontrolle waren nach dem Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt ($p < .05$). Im Kruskal-Wallis-Test zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen einer der Gruppen ($p = .652$, $H(3) = 1.631$).

Ergebnisse

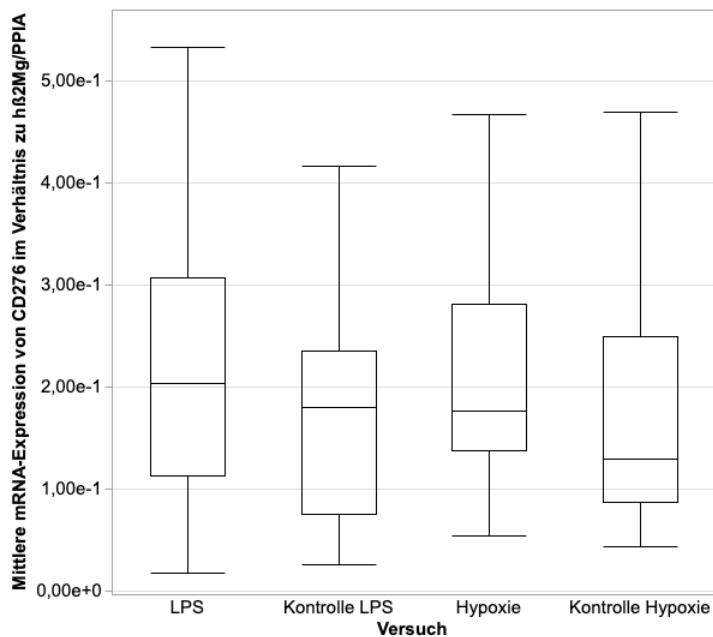


Abbildung 19: mRNA-Expression von CD276 nach Stimulationen mit LPS und Hypoxie für alle untersuchten Zelllinien und -kulturen

Es wurde eine einfaktorielle ANOVA berechnet, um zu untersuchen, ob es durch LPS oder Hypoxie einen Unterschied in der Proteinmenge von CD276 in den untersuchten Zellen gab. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 und die genauen deskriptiven Werte sind im Anhang in Tabelle 28 dargestellt. Die Daten waren für jede Gruppe normalverteilt (Shapiro-Wilk-Test, $p > .05$) und Varianzhomogenität war gemäß dem Levene-Test gegeben ($p > .05$). Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der Proteinexpression von CD276 für die verschiedenen Inkubationsbedingungen, $F(3,52) = .008$, $p = .999$, $\eta p^2 = -.057$.

Ergebnisse

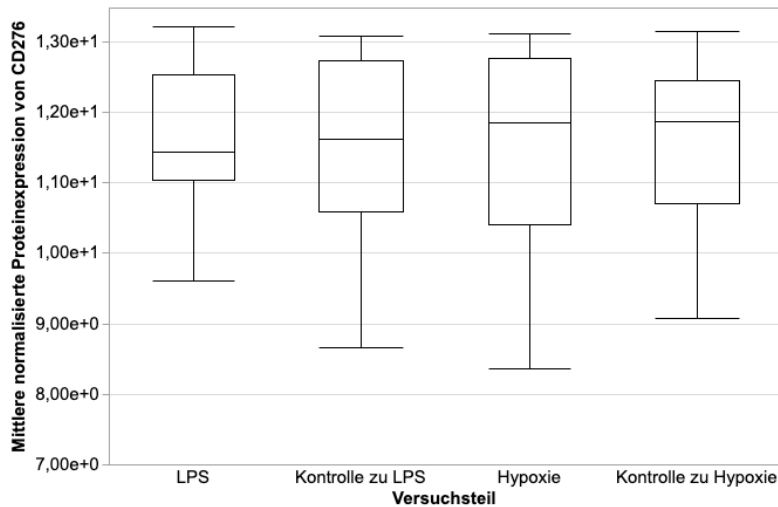


Abbildung 20: Proteinexpression von CD276 nach Stimulationen mit LPS und Hypoxie für alle untersuchten Tumorzelllinien und somatischen Urothelzellkulturen

Es wurde untersucht, ob es einen Unterschied in der Expression von CD276 auf der Zelloberfläche abhängig von Stimulation mit LPS oder Hypoxie gab. Eine Aufteilung nach Zelllinien erfolgte nicht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 und die genauen deskriptiven Werte sind im Anhang in Tabelle 29 dargestellt. Die Daten der Stimulation mit LPS waren nach dem Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt ($p < .05$). Alle anderen Daten waren normalverteilt (Shapiro-Wilk-Test, $p > .05$). Im Kruskal-Wallis-Test zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen einer der Gruppen ($p = .947$, $H(3) = .365$).

Ergebnisse

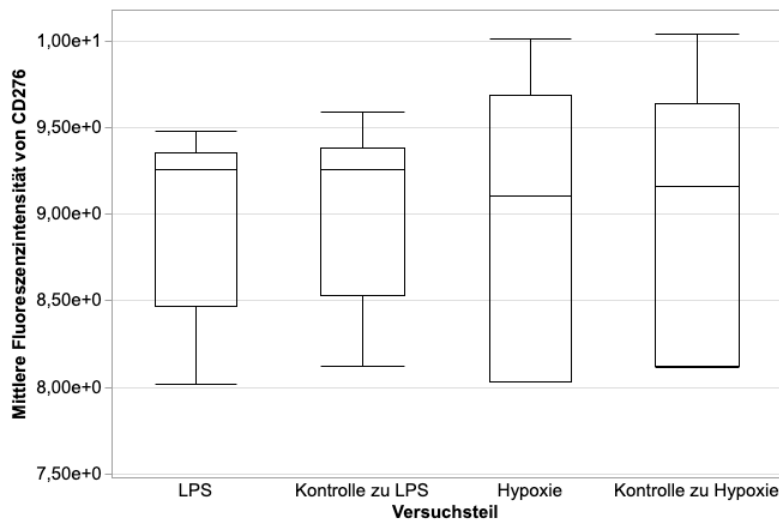


Abbildung 21: Proteinexpression von CD276 an der Zelloberfläche nach Stimulationen mit LPS und Hypoxie für alle untersuchten Tumorzelllinien und somatischen Urothelzellkulturen

Für die Tumorzellen als Kollektiv wurde untersucht, ob es einen Unterschied in der mRNA-Expression von CD276 abhängig von Stimulation mit LPS oder Hypoxie gab. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 gezeigt und die genauen deskriptiven Daten sind in Tabelle 32 dargestellt. Die beiden Stimulationsgruppen und die LPS-Kontrolle waren normalverteilt (Shapiro-Wilk-Test, $p > .05$). Die Daten der Hypoxie-Kontrolle waren nach dem Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt ($p < .05$). Im Kruskal-Wallis-Test zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen einer der Gruppen ($p = .659$, $H(3) = 1.601$).

Ergebnisse

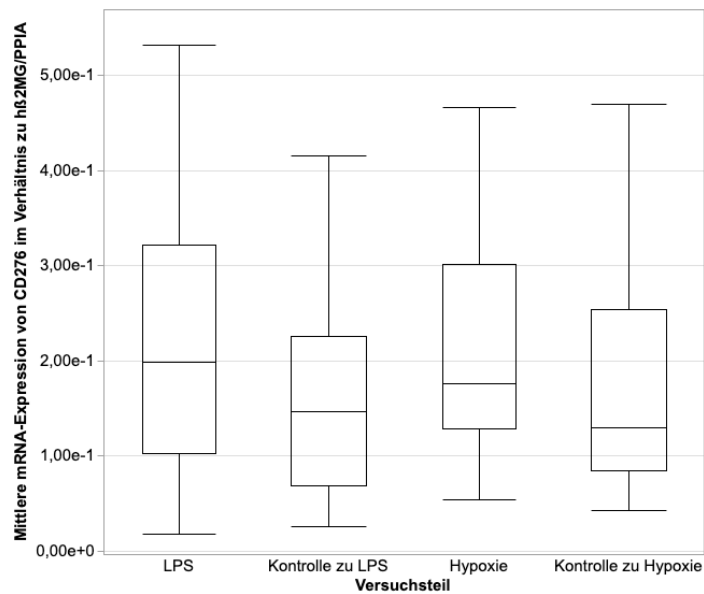


Abbildung 22: mRNA-Expression von CD276 nach Stimulationen mit LPS und Hypoxie für alle untersuchten Tumorzelllinien

Um den Effekt der Stimulation mit LPS oder Hypoxie auf die Proteinmenge von CD276 nur für die Tumorzellen zu untersuchen, wurde eine einfaktorielle ANOVA durchgeführt. Die Ergebnisse werden in Abbildung 23 gezeigt. Die Daten (vgl. Tabelle 33 im Anhang) waren für alle Gruppen normalverteilt (Shapiro-Wilk-Test, $p > .05$) und Varianzhomogenität war gemäß dem Levene-Test gegeben ($p > .05$). Es zeigte sich für die Tumorzellen kein statistisch signifikanter Unterschied in der Proteinexpression von CD276 unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen, $F(3,44) = .001$, $p = 1.000$, $\eta p^2 = -.068$.

Ergebnisse

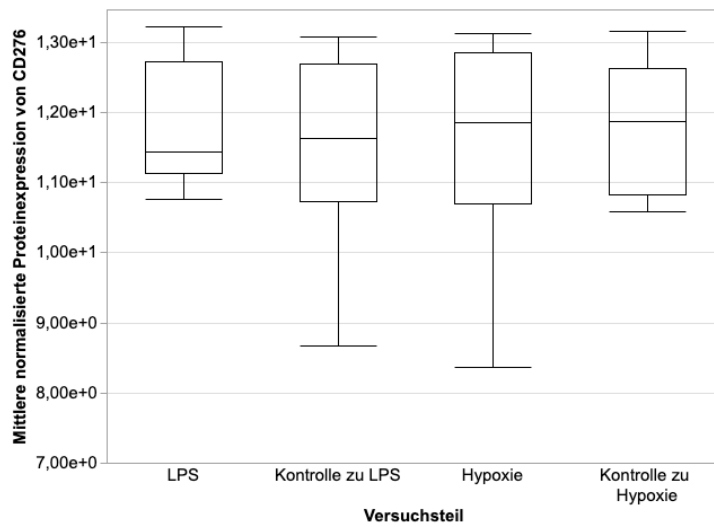


Abbildung 23: Proteinexpression von CD276 nach Stimulationen mit LPS und Hypoxie für alle untersuchten Tumorzelllinien

Um die Expression von CD276 an der Zelloberfläche unter Stimulation mit LPS und Hypoxie zu analysieren, wurden Messungen mit dem Durchflusszytometer (DFZ) durchgeführt. Abbildung 24 können die Ergebnisse entnommen werden. Die Daten für Hypoxie und die zugehörige Kontrolle waren normalverteilt (Shapiro-Wilk-Test, $p > .05$). Die Daten für LPS und die zugehörige Kontrolle waren nach dem Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt ($p < .05$). Im Kruskal-Wallis-Test zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen einer der Gruppen ($p = .916$, $H(3) = .513$). Die genauen deskriptiven Daten sind im Anhang in Tabelle 30 dargestellt.

Ergebnisse

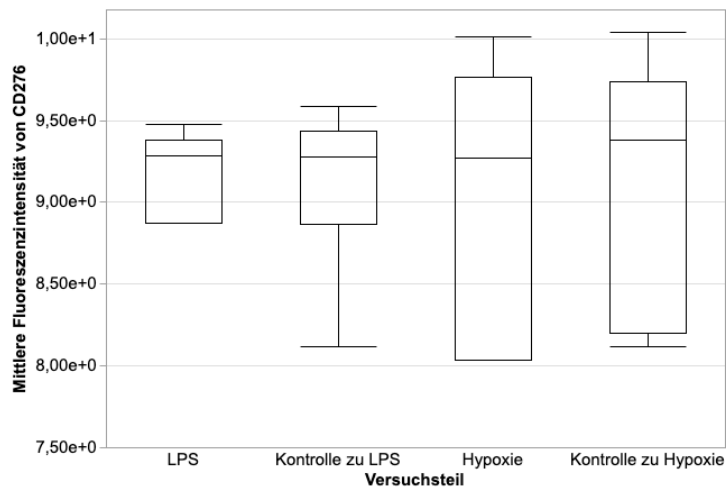


Abbildung 24: Expression von CD276 unter Stimulation mit LPS und Hypoxie an der Zelloberfläche für die Tumorzelllinien insgesamt

Aufgrund der geringen Stichprobengröße wurden für die Auswertung der somatischen Urothelzelllinien keine statistischen Tests durchgeführt. Die Ergebnisse der Versuche werden in den nächsten Kapiteln dargestellt.

Expression von CD276 der einzelnen Zelllinien unter LPS oder Hypoxie

Unter LPS oder nach Inkubation unter hypoxischen Bedingungen zeigte sich ein variables Bild der Expression von CD276 in den unterschiedlichen Tumorzelllinien und somatischen Urothelzellkulturen. Abbildung 25 zeigt die Expression auf Transkriptionsebene. In den Tumorzelllinien 5637, T24 und TCC war nach Stimulation mit LPS und nach Inkubation in Hypoxie im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen mehr mRNA von CD276 nachweisbar. Die Linie 253J und die somatische Urothelzellkultur BL18/23 zeigten nach Stimulation mit LPS eine höhere und nach Inkubation in Hypoxie eine niedrigere Expression von CD276-mRNA im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. Unter LPS war bei der Tumorzelllinie Cal-29 ein gleichbleibender Wert für mRNA von CD276 messbar, nach Inkubation unter Hypoxie war ein höherer Wert messbar im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. Die Tumorzelllinie HT1197 und die somatische Urothelzellkultur HL19/3 zeigten nach beiden Stimulationen niedrigere Messwerte für CD276-mRNA im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. Die genauen deskriptiven Daten sind in Tabelle 15 und für die somatischen Urothelzellkulturen in Tabelle 31 im Anhang dargestellt.

Ergebnisse

Um Unterschiede in der mRNA-Expression von CD276 unter Stimulation mit LPS oder Hypoxie für jede Zelllinie einzeln zu untersuchen, wurden Kruskal-Wallis-Tests durchgeführt. Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test, $p > .05$) bestand für alle Gruppen, außer für die Hypoxiedaten von 253J, die Daten der Hypoxie-Kontrolle von T24 und TCC, sowie die Daten der LPS-Kontrolle von HT1197 (jeweils Shapiro-Wilk-Test, $p < .05$). Die Kruskal-Wallis-Tests zeigten für keine Zelllinie einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen einer der Gruppen ($p > .05$). Die genauen Daten sind in Tabelle 15 dargestellt. Aufgrund der geringen Stichprobengröße wurden für die Auswertung der einzelnen somatischen Urothelzelllinien keine statistischen Tests durchgeführt.

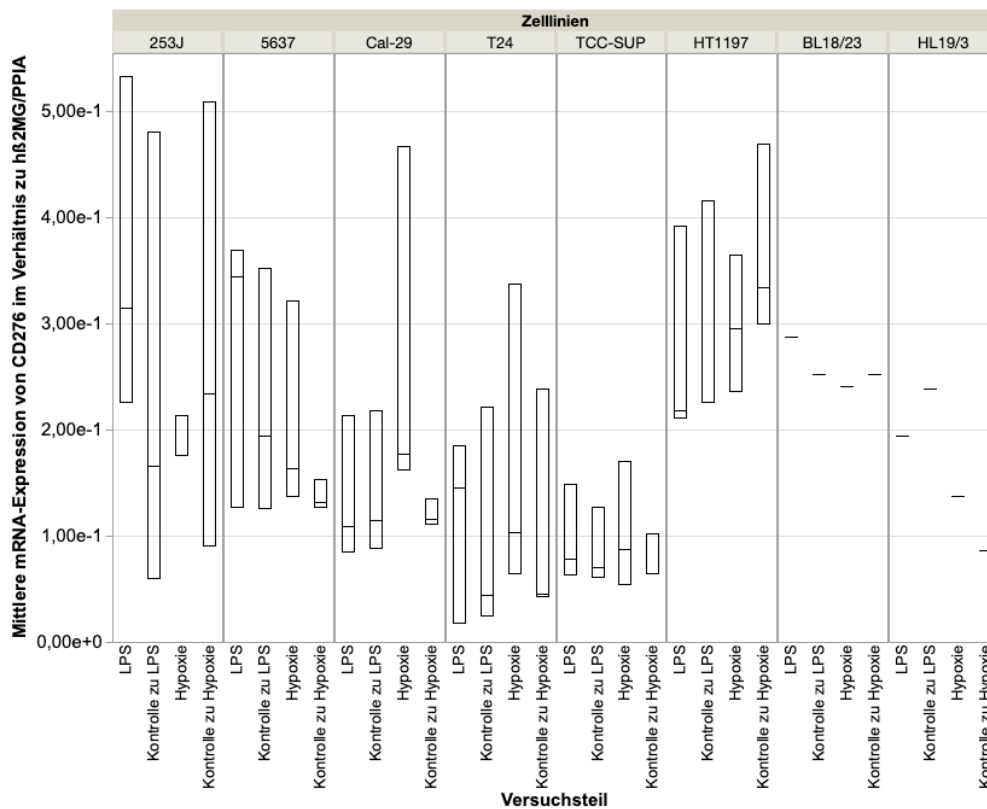


Abbildung 25: mRNA-Expression von CD276 unter Stimulation mit LPS und Hypoxie nach Tumorzelllinien

Ergebnisse

Zelllinie/ -kultur	Versuch	Deskriptive Statistik		Teststatistiken	
		M (SD)	Mdn	H (3)	p
253J	LPS	.36 (.16)	.31	3.216	.359
	Kontrolle_LPS	.24 (.22)	.17		
	Hypoxie	.19 (.02)	.18		
	Kontrolle_Hypoxie	.28 (.21)	.23		
5637	LPS	.28 (.13)	.34	2.282	.516
	Kontrolle_LPS	.22 (.12)	.19		
	Hypoxie	.21 (.10)	.16		
	Kontrolle_Hypoxie	.14 (.01)	.13		
Cal-29	LPS	.14 (.07)	.11	3.308	.347
	Kontrolle_LPS	.14 (.07)	.12		
	Hypoxie	.27 (.17)	.18		
	Kontrolle_Hypoxie	.12 (.01)	.12		
T24	LPS	.12 (.08)	.15	1.154	.764
	Kontrolle_LPS	.10 (.11)	.04		
	Hypoxie	.17 (.15)	.10		
	Kontrolle_Hypoxie	.11 (.11)	.05		
TCC	LPS	.10 (.05)	.08	.231	.972
	Kontrolle_LPS	.09 (.04)	.07		
	Hypoxie	.10 (.06)	.09		
	Kontrolle_Hypoxie	.08 (.02)	.08		
HT1197	LPS	.27 (.10)	.22	2.590	.459
	Kontrolle_LPS	.29 (.11)	.23		
	Hypoxie	.30 (.06)	.29		
	Kontrolle_Hypoxie	.34 (.09)	.33		

Jeweils N = 3

Tabelle 15: mRNA-Expression von CD276 unter Stimulation mit LPS und Hypoxie nach Tumorzelllinien und Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Tests

Ergebnisse

Die Expression von CD276 der unterschiedlichen Zelllinien und somatischen Urothelzellkulturen auf Proteinebene ist in Abbildung 26 gezeigt. Die Proteinexpression von CD276 war in den Linien 253J, TCC und HT1197 nach Stimulation mit LPS und nach Stimulation mit Hypoxie jeweils höher als in der zugehörigen Kontrolle. Die Tumorzelllinie T24 und die somatische Urothelzellkultur HL19/3 zeigten nur nach Inkubation unter hypoxischen Bedingungen höhere Werte für die Proteinmenge von CD276 im Vergleich zur Kontrolle. Nach Inkubation mit LPS zeigten sie niedrigere Werte. Die Tumorzelllinien 5637, Cal-29 und die somatische Urothelzellkultur BL18/23 zeigten nach beiden Stimulationen jeweils niedrigere Werte für die Proteinmenge von CD276 im Vergleich zu den Kontrollen.

Aufgrund der geringen Stichprobengröße wurden keine statistischen Tests durchgeführt. Die genauen deskriptiven Daten können der Tabelle 34 im Anhang entnommen werden.

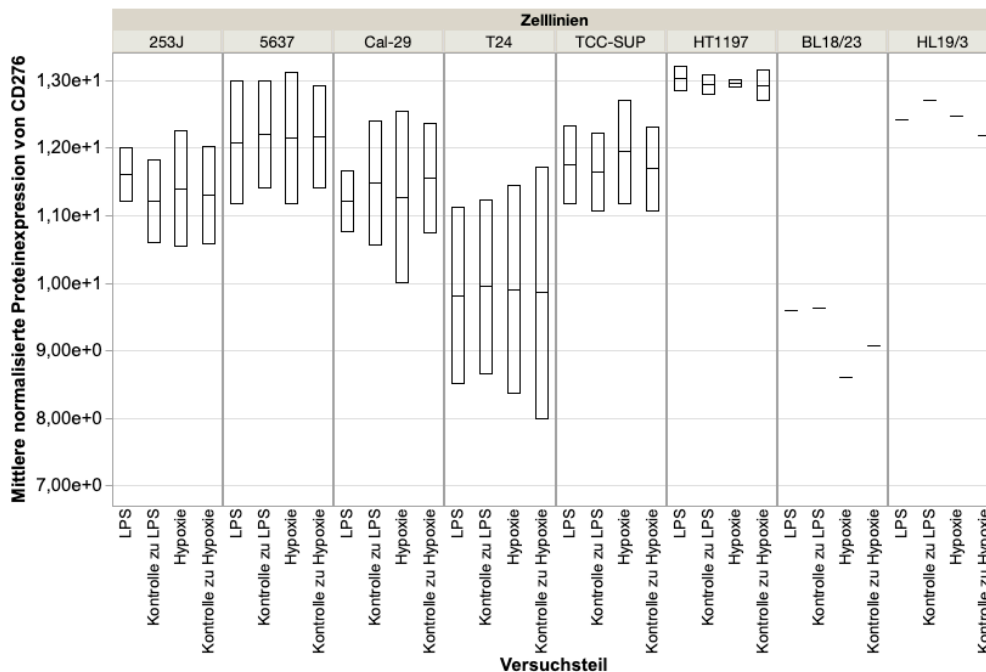


Abbildung 26: Proteinexpression von CD276 unter Stimulation mit LPS für die einzelnen Zelllinien und somatischen Urothelzellkulturen

Um die Expression von CD276 an der Zelloberfläche unter Stimulation mit LPS zu analysieren, wurden DFZ-Messungen durchgeführt.

Ergebnisse

Die Proteinexpression von CD276 auf der Zelloberfläche unter Stimulation mit LPS wurde getrennt nach Tumorzelllinien und der somatischen Urothelzellkultur untersucht. In Abbildung 27 sind die Ergebnisse dargestellt. Die Tumorzelllinie Cal-29 zeigte nach Stimulation mit LPS und nach Inkubation unter hypoxischen Bedingungen eine höhere Menge an CD276 auf der Zelloberfläche im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Die Linien TCC und HT1197 zeigten nur nach Stimulation mit LPS eine höhere Expression an der Zelloberfläche, nach Inkubation in Hypoxie war eine niedrigere Expression im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen messbar. Die Tumorzelllinien 253J, 5637 und T24 sowie die somatische Urothelzellkultur HL19/5 zeigten nach beiden Stimulationen geringere Werte im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen.

Aufgrund der geringen Stichprobengröße wurden keine statistischen Tests durchgeführt. Die deskriptiven Daten sind in Tabelle 35 im Anhang dargestellt.

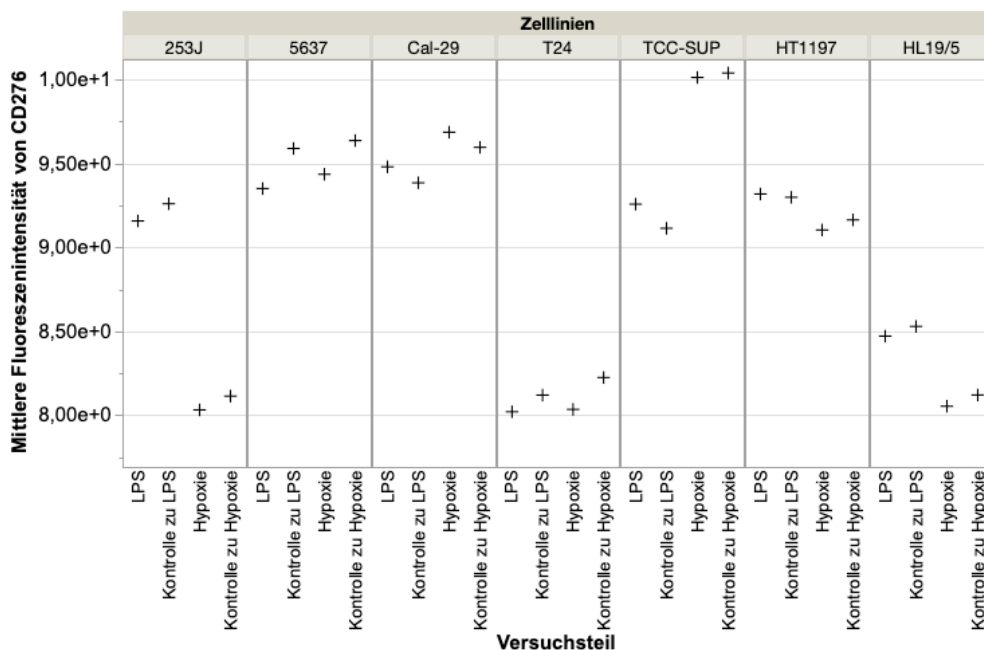


Abbildung 27: Proteinexpression von CD276 an der Zelloberfläche unter Stimulation mit LPS für die einzelnen Zelllinien und somatischen Urothelzellkulturen

Analyse der Regulation

Um den Effekt der Stimulation zu vergleichen, wurde von jedem Messwert der mRNA-Expression von CD276 nach Stimulation der entsprechende Kontrollwert abgezogen. Um für das Kollektiv der Tumorzelllinien zu untersuchen, ob sich

Ergebnisse

diese Differenzen nach Stimulation mit LPS oder Hypoxie unterschieden, wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Beide Datensätze waren nach dem Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt ($p < .05$). Die Verteilungen der beiden Gruppen unterschieden sich nicht voneinander, Kolmogorov-Smirnov $p > .05$. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen der Expression von mRNA von CD276 zwischen der mit LPS stimulierten Gruppe ($N = 18$, $M = .03$, $Mdn = -.003$, $SD = .08$) und der mit Hypoxie stimulierten Gruppe ($N = 18$, $M = .04$, $Mdn = .02$, $SD = .11$), $U = 142.00$, $Z = -.633$, $p = .542$, $r = -.11$.

Um für die einzelnen Tumorzelllinien zu untersuchen, ob sich die Differenzen der CD276-mRNA-Expression nach Stimulation mit LPS oder Hypoxie unterschieden, wurden Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. Die Vergleiche sind in Abbildung 28 dargestellt.

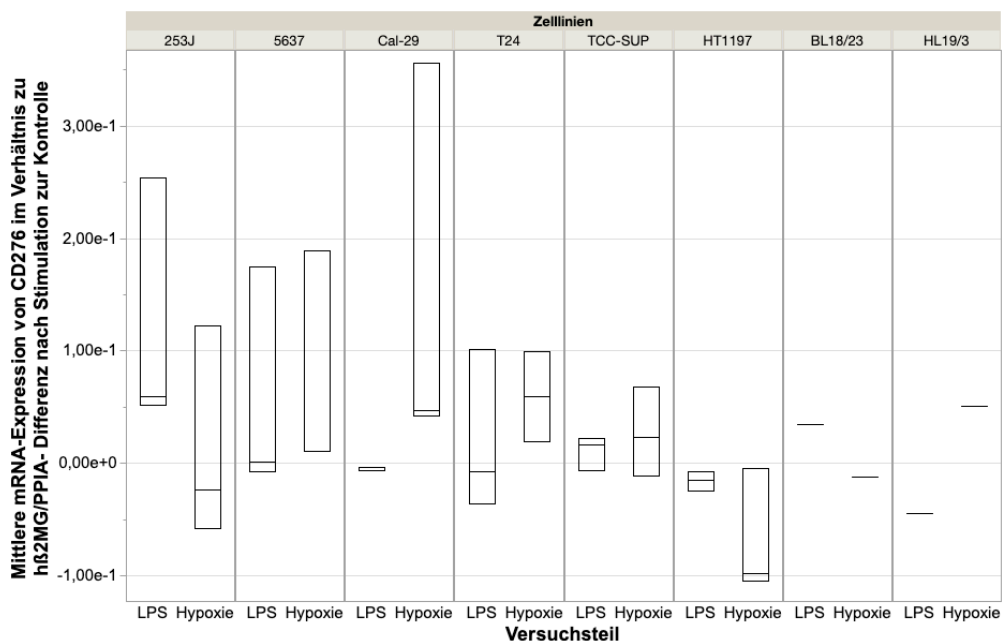


Abbildung 28: Regulation der mRNA von CD276 unter LPS bzw. Hypoxie nach Tumorzelllinien

Die Daten von Cal-29 waren nach dem Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt ($p < .05$). Die Daten der restlichen Zelllinien waren normalverteilt (Shapiro-Wilk-Test, $p > .05$). Die Verteilungen der beiden Gruppen unterschieden sich bei allen Zelllinien nicht voneinander, Kolmogorov-Smirnov jeweils $p > .05$. Es gab für alle Zelllinien keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Reaktion der Zellen auf LPS und Hypoxie, gemessen anhand der Differenz der mRNA-

Ergebnisse

Expression von CD276. Die genauen Teststatistiken sind in Tabelle 16 dargestellt.

Zelllinie	Versuchsteil	Deskriptive Statistik		Teststatistik			
		M (SD)	Mdn	U	Z	p	r
253J	LPS	.12 (.11)	.06	2.00	-1.091	.400	-.45
	Hypoxie	.01 (.10)	-.02				
5637	LPS	.06 (.10)	.001	2.00	-1.091	.400	-.45
	Hypoxie	.07 (.10)	.01				
Cal-29	LPS	-.005 (.001)	-.004	0.00	-1.964	.100	-.08
	Hypoxie	.15 (.18)	.05				
T24	LPS	.02 (.07)	-.008	3.00	-.655	.700	-.27
	Hypoxie	.06 (.04)	.06				
TCC	LPS	.01 (.02)	.02	3.00	-.655	.700	-.27
	Hypoxie	.03 (.04)	.02				
HT1197	LPS	-.02 (.009)	-.01	3.00	-.655	.700	-.27
	Hypoxie	-.07 (.06)	-.10				

Anmerkung: N = 3 für alle Analysen

Tabelle 16: mRNA Hochregulation von CD276 unter LPS bzw. Hypoxie nach Tumorzelllinien

Korrelationen der Reaktion auf Stimulation mit LPS oder Hypoxie

Um mögliche Korrelationen zwischen der zellulären Reaktion bezüglich der Expression von CD276 nach Stimulation auf den unterschiedlichen untersuchten Ebenen und der Duplikationsrate zu untersuchen, wurden Spearman-Korrelationen berechnet.

Zuvor wurde von jedem Messwert nach Stimulation der zugehörige Kontroll-Messwert abgezogen. Es erfolgte die Berechnung der Mittelwerte für die Expression von CD276 auf Transkript-, Protein- und Oberflächenproteinebene nach Stimulation mit LPS bzw. Hypoxie für jede Zelllinie und die somatischen Urothelzellkulturen. Auch für die Duplikationsraten der Zelllinien wurden Mittelwerte berechnet. Es zeigten sich starke positive Korrelationen zwischen der

Ergebnisse

mRNA-Expression nach Stimulation mit LPS und der Duplikationsrate ($r_s(5) = .786, p = .036$) sowie zwischen der Proteinexpression nach Stimulation mit LPS und der Oberflächenexpression nach Stimulation mit LPS ($r_s(5) = .857, p = .014$). Starke negative Korrelationen bestanden zwischen der mRNA-Expression nach Inkubation unter hypoxischen Bedingungen und der Protein-Expression nach Stimulation mit LPS ($r_s(5) = -.786, p = .036$) sowie zwischen der Zelloberflächenexpression nach Inkubation unter hypoxischen Bedingungen und der Zelloberflächenexpression nach Stimulation mit LPS ($r_s(5) = -.893, p = .007$). Die Signifikanzen der gesamten Korrelationsanalysen sind in Tabelle 17 dargestellt.

	Spearman's Rangkorrelation					
	mRNA nach LPS	mRNA nach Hypoxie	Protein nach LPS	Protein nach Hypoxie	Protein auf der Zelloberfläche nach LPS	Protein auf der Zelloberfläche nach Hypoxie
mRNA nach Hypoxie	.589					
Protein nach LPS	.879	.036*				
Protein nach Hypoxie	.645	.819	.760			
Protein auf der Zelloberfläche nach LPS	.879	.253	.014*	.215		
Protein auf der Zelloberfläche nach Hypoxie	.819	.482	.119	.071	.007**	
Duplikationsrate	.036*	.645	.535	.939	.337	.294

** $p < .01$

* $p < .05$

Tabelle 17: Korrelationen der Differenzen der Expression von CD276 nach Stimulation auf den verschiedenen Ebenen und der Duplikationsrate

3.1.4 Expression von CD276 unter Stimulation mit PMA plus Ionomycin

Um die mRNA-Expression von CD276 unter Stimulation mit dem Phorbolester PMA und Ionomycin zu analysieren, wurden RT-PCRs durchgeführt. Hierbei

wurde auch ein möglicher Einfluss durch das Lösungsmittel DMSO getestet. Es wurden nur Tumorzelllinien untersucht.

Es wurde eine einfaktorielle ANOVA berechnet, um zu untersuchen, ob durch Inkubation mit PMA und Ionomycin ein Unterschied in der mRNA-Expression von CD276 messbar ist. Zusätzlich wurde der Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf die mRNA-Expression von CD276 untersucht. Somit ergaben sich drei zu analysierende Gruppen: Eine Gruppe, die mit PMA und Ionomycin (beides gelöst in DMSO) inkubiert wurde, eine Gruppe, die mit DMSO inkubiert wurde und eine unbehandelte Kontrollgruppe. Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 dargestellt. Es gab keine Ausreißer (beurteilt mit dem Box-Plot). Die Daten waren für jede Gruppe normalverteilt (Shapiro-Wilk-Test, $p > .05$) und Varianzhomogenität war gemäß dem Levene-Test gegeben ($p > .05$). Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression von CD276 für die verschiedenen Inkubationsbedingungen, $F(2, 15) = .559$; $p = .583$; $\eta p^2 = -.055$.

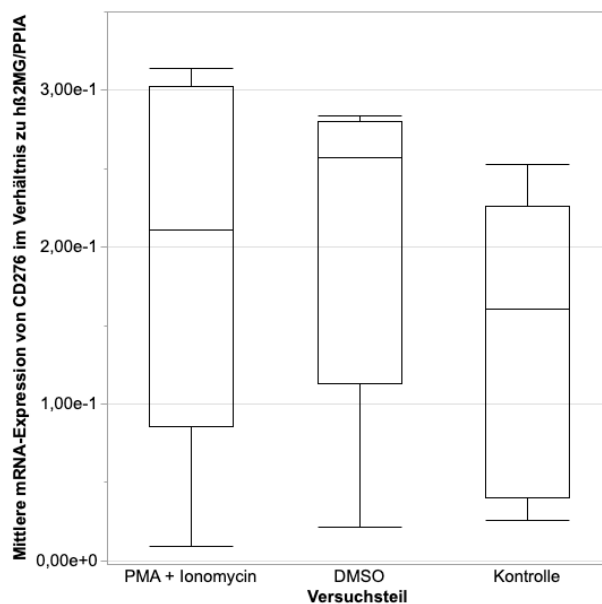


Abbildung 29: mRNA-Expression von CD276 unter Stimulation mit PMA und Ionomycin

Für die Auswertung der einzelnen Zelllinien wurden aufgrund der geringen Stichprobengröße keine statistischen Tests durchgeführt. Die deskriptiven Daten sind in Abbildung 30 grafisch dargestellt, die genauen Werte können Tabelle 36 im Anhang entnommen werden. Rechnerisch war die mRNA-Expression von

CD276 unter Stimulation mit PMA und Ionomycin bei den Linien 253J, 5637, TCC und HT1197 größer als in der Kontrolle. Bei den Linien Cal-29 und T24 war die mRNA-Expression von CD276 unter PMA und Ionomycin geringer als in der Kontrolle. Für das Lösungsmittel DMSO zeigte sich bei allen untersuchten Linien, außer bei T24 eine höhere mRNA-Expression von CD276 im Vergleich zur Kontrolle. Bei den Linien Cal-29 und TCC war der Anstieg unter DMSO höher als bei Inkubation mit PMA und Ionomycin.

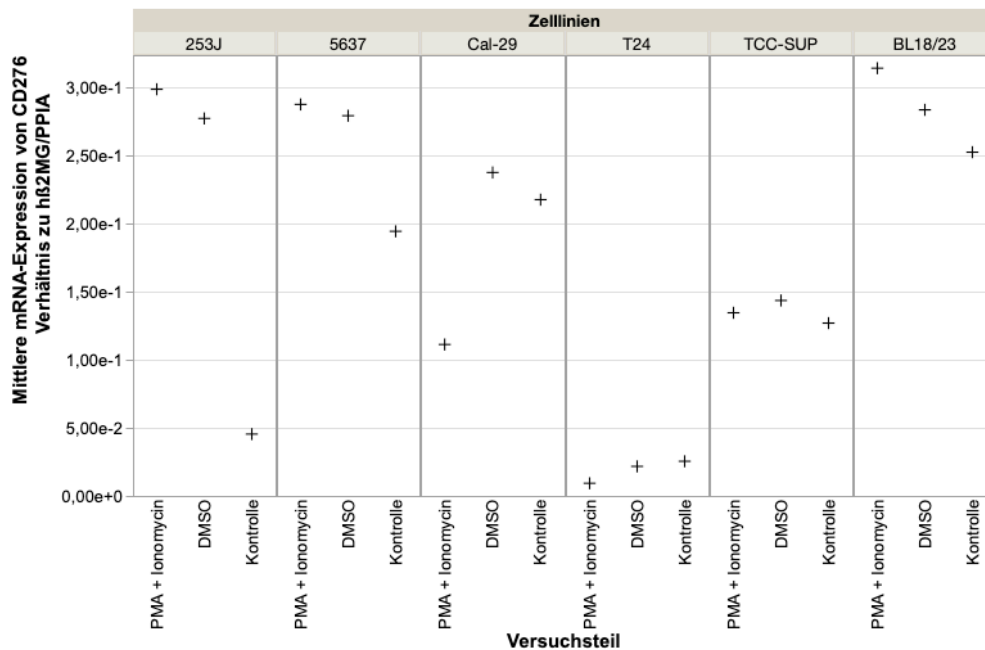


Abbildung 30: mRNA-Expression von CD276 unter Stimulation mit PMA und Ionomycin in den einzelnen untersuchten Tumorzelllinien und somatischen Urothelzellkulturen

3.1.5 Expression von CD276 unter Stimulation mit FSL-1

Um die mRNA-Expression von CD276 unter Stimulation mit dem TLR2/TLR6-Agonisten FSL-1 zu analysieren, wurden RT-PCRs durchgeführt. Hierbei wurde auch ein möglicher Einfluss durch einen Austausch von FCS durch BSA im Medium getestet. Es wurden nur die Tumorzelllinien 253J und T24 untersucht. Für die Auswertung wurden aufgrund der geringen Stichprobengröße keine statistischen Tests durchgeführt. Die Messwerte sind in Abbildung 31 grafisch dargestellt. Die genauen deskriptiven Daten können Tabelle 37 im Anhang entnommen werden. Deskriptiv war die mRNA-Expression von CD276 unter Stimulation mit FSL-1 in beiden Linien und für beide Medium-

Ergebnisse

Zusammensetzungen geringer als in der Kontrolle. Bei der Zelllinie 253J war der Messwert für die mit FSL-1-stimulierten Zellen für beide Medium-Zusammensetzungen gleich, der Messwert der Kontrolle war mit FCS höher als mit BSA. Bei der Zelllinie T24 war der Messwert für Stimulation und Kontrolle jeweils bei BSA höher als bei FCS.

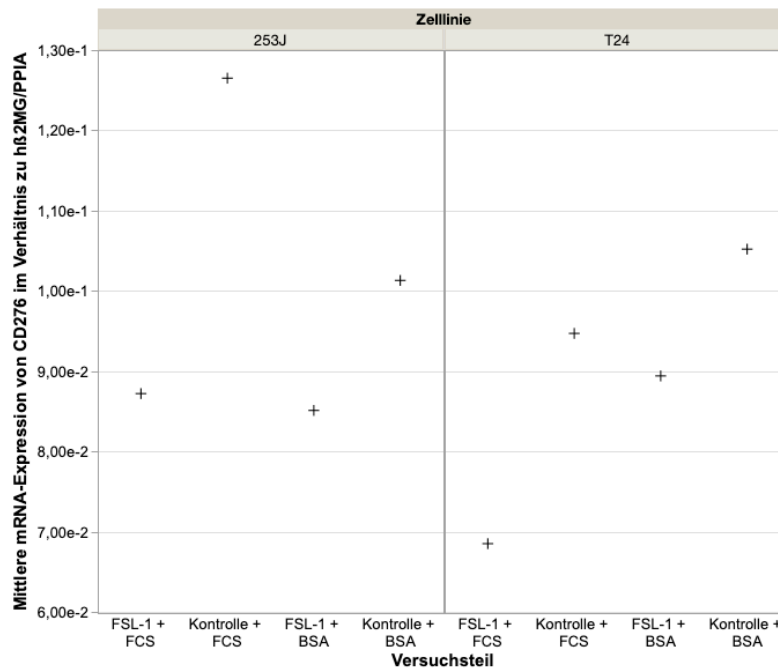


Abbildung 31: mRNA-Expression von CD276 unter Stimulation mit FSL-1 für die Zelllinien 253J und T24

Die Expression von CD276 unter Stimulation mit FSL-1 wurde auch hinsichtlich der Proteinmenge mittels Western Blot untersucht. Die Ergebnisse sind grafisch in Abbildung 32 dargestellt. Für die Auswertung wurden aufgrund der geringen Stichprobengröße keine statistischen Tests durchgeführt. Die deskriptiven Daten können der Tabelle 38 im Anhang entnommen werden. Rechnerisch war die Proteinexpression von CD276 unter Stimulation mit FSL-1 in der Linie 253J höher als in der Kontrolle und in der Linie T24 niedriger als in der Kontrolle.

Ergebnisse

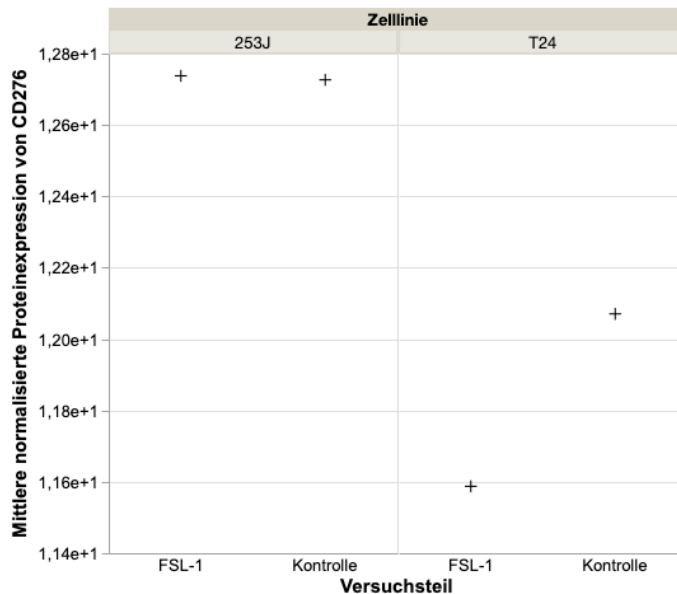


Abbildung 32: Proteinmenge von CD276 unter Stimulation mit FSL-1 für die Zelllinien 253J und T24

3.1.6 Mykoplasmen

Um den Einfluss einer Infektion mit Mykoplasmen auf die mRNA-Expression von CD276 zu untersuchen, wurden RT-PCRs durchgeführt. Es wurden die Tumorzelllinien Cal-29, T24 und HT1197 untersucht.

Ein Mann-Whitney-U-Test wurde berechnet, um zu überprüfen, ob sich die mRNA-Expression von CD276 unter Infektion der Kultur mit Mykoplasmen veränderte. Die Mykoplasmen-negative Gruppe war gemäß dem Shapiro-Wilk-Test normalverteilt ($p > .05$), die Mykoplasmen-positive Gruppe nicht ($p < .05$). Die Verteilungen der beiden Gruppen unterschieden sich nicht voneinander, Kolmogorov-Smirnov $p > .05$. Es gab keinen signifikanten Unterschied der Expression von CD276 zwischen den mykoplasmeninfizierten Zellen und der Kontrollgruppe, $U = 14.00$, $Z = -.641$, $p = .589$, $r = -.19$. Die Ergebnisse sind grafisch in Abbildung 33 dargestellt. Die genauen Daten können Tabelle 39 im Anhang entnommen werden.

Ergebnisse

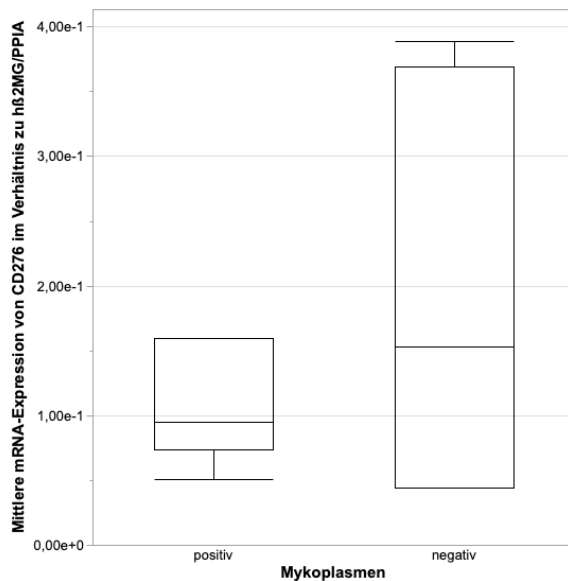


Abbildung 33: mRNA-Expression von CD276 unter Mykoplasmenkontamination für alle untersuchten Linien insgesamt

Die RT-PCR wurde direkt nach Konfluenz der aufgetauten, bereits kontaminierten Zellen durchgeführt und nach Infektion zuvor steriler Zellen durch Zugabe von kontaminiertem Überstand. Um einen möglichen Zusammenhang der mRNA-Expression von CD276 und dem Mykoplasmen-Infektionsstatus sowie dem Zeitpunkt der Analyse zu untersuchen wurde eine einfaktorielle ANOVA berechnet. Beide Gruppen war gemäß dem Shapiro-Wilk-Test normalverteilt ($p > .05$). Das Gesamtmodell war nicht signifikant ($F(3,8) = .312$, $p = .816$, $\eta p^2 = .105$, $N = 12$). Weder für den Infektionsstatus mit Mykoplasmen ($F(1,8) = .662$, $p = .439$, $\eta p^2 = .076$) noch für den Versuchsteil ($F(1,8) = .148$, $p = .711$, $\eta p^2 = .018$) gab es einen signifikanten Unterschied. Auch für eine Interaktion zwischen beidem gab es keinen signifikanten Unterschied ($F(1,8) = .126$, $p = .731$, $\eta p^2 = .016$). Die Verteilung der Daten ist in Abbildung 34 dargestellt.

Ergebnisse

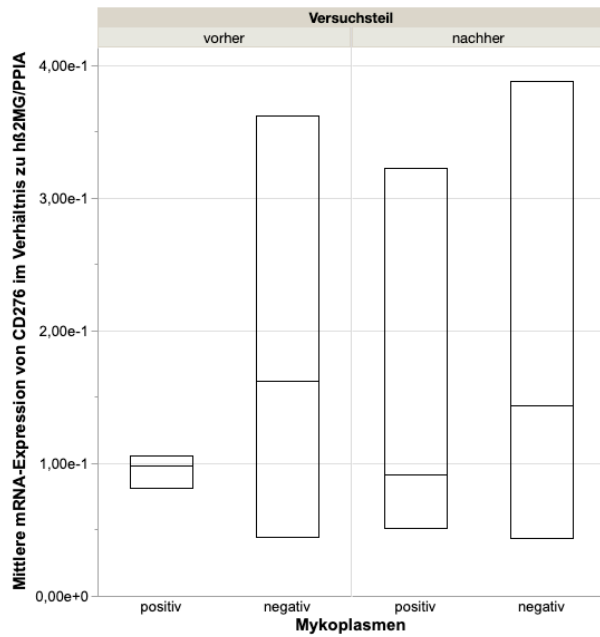


Abbildung 34: mRNA-Expression von CD276 vor und nach Infektion mit Mykoplasmen

Für die Auswertung der einzelnen Zelllinien wurden aufgrund der geringen Stichprobengröße keine statistischen Tests durchgeführt. Die Daten sind in Abbildung 35 dargestellt. Die deskriptiven Daten können zusätzlich der Tabelle 40 im Anhang entnommen werden. Rechnerisch war die mRNA-Expression von CD276 unter Infektion mit Mykoplasmen bei allen Linien geringer als in der Kontrolle.

Ergebnisse

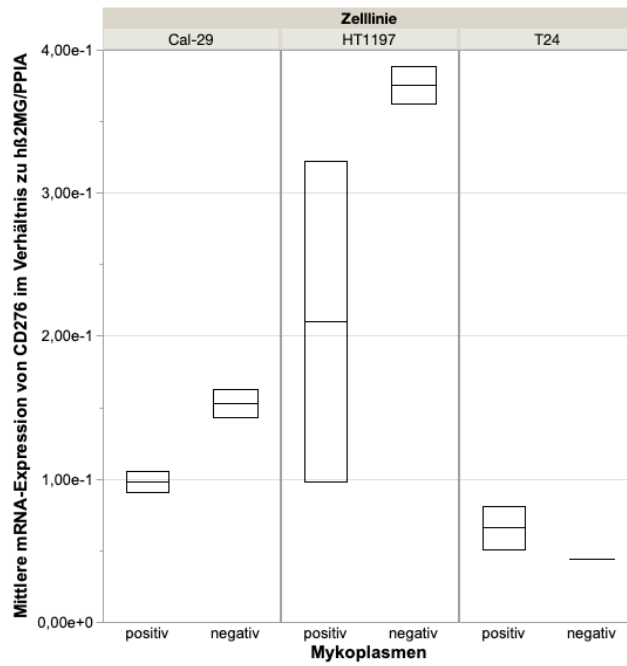


Abbildung 35: mRNA-Expression von CD276 unter Infektion mit Mykoplasmen für die einzelnen Zelllinien

3.2 Ergebnisse Immunfluoreszenz

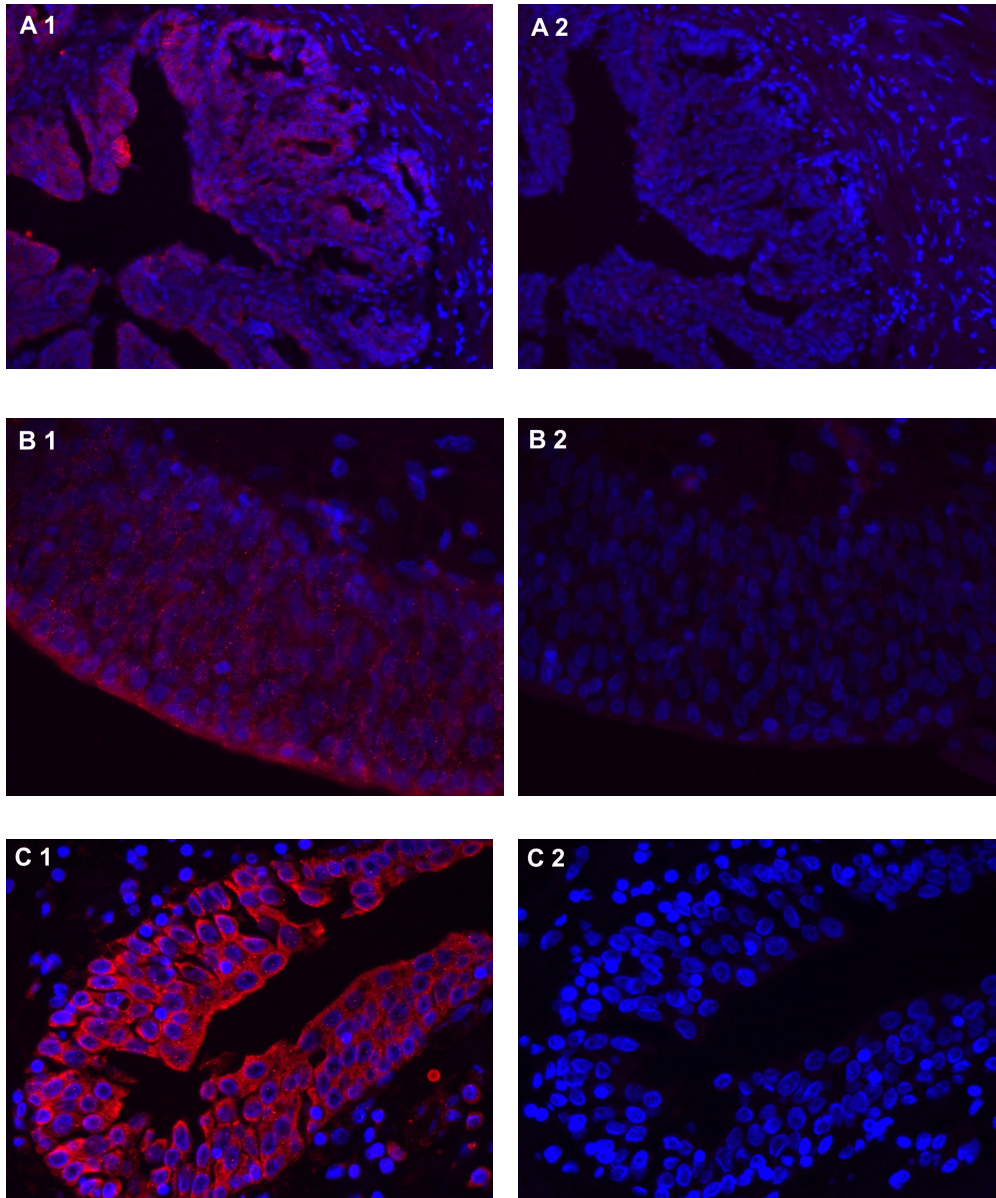


Abbildung 36: Exemplarische Darstellung verschiedener Präparate.

(1): Jeweils die Immunfluoreszenz-Färbung von CD276

(2): Negativkontrolle

A: Patientenprobe des untersuchten Kollektivs in 20x-Vergrößerung

B: Patientenprobe des untersuchten Kollektivs in 40x-Vergrößerung

C: Gewebe des Patienten der Somatischen Urothelzelllinie HL19-3 in 40x-Vergrößerung

Die CD276-Expression auf Blasenmorgewebe wurde bereits mehrfach untersucht (unter anderem: (Y. Li et al., 2017, Boorjian et al., 2008, Aicher et al., 2021)). Dies erfolgte mittels Immunhistochemie, anschließend wurden die

Proben anhand des prozentualen Anteils der gefärbten Fläche in Gruppen eingeteilt. Eine entsprechende Adaption dieses Systems wurde für diese Arbeit getestet (vgl. Abbildung 37). Es zeigt sich für das in dieser Arbeit untersuchte Kollektiv eine durchschnittliche Expression von 4%. Daher erfolgte die weitere Auswertung anhand der Bildung einer Ratio zwischen Fluoreszenzintensität und gefärbter Fläche (vgl. 2.7.6).

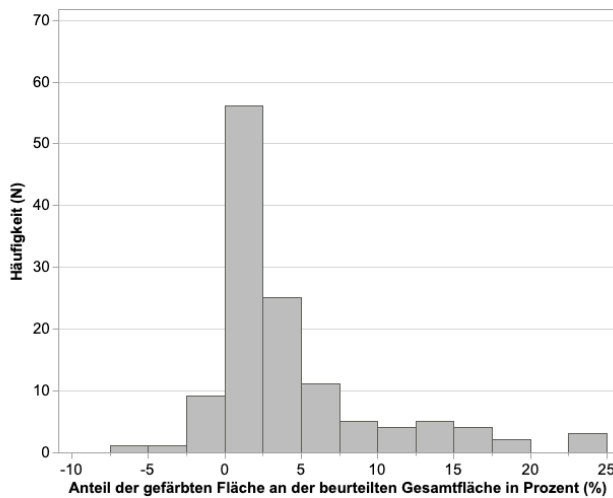


Abbildung 37: Häufigkeitsverteilung der CD276-Färbungen in % der Gesamtfläche

3.2.1 Unterschiede nach Tumorstadium

Vergleich nach T-Stadium

Es wurde ein Kruskal-Wallis-Test berechnet, um zu untersuchen, ob es einen Unterschied in der Expression von CD276 (gemessen durch die Immunfluoreszenz pro Fläche) abhängig vom lokalen Ausbreitungsstadium (T-Stadium nach TNM-Klassifikation) gab. Das lokale Ausbreitungsstadium im untersuchten Kollektiv wurde in drei Gruppen aufgeteilt: T2, T3 und T4. Deskriptiv zeigt sich bei beiden Einteilungen ein Anstieg der CD276-Expression zwischen T2 und T3- Stadium und ein Abfall der CD276-Expression zwischen T3- und T4- Stadium (vgl. Abbildung 38).

Ergebnisse

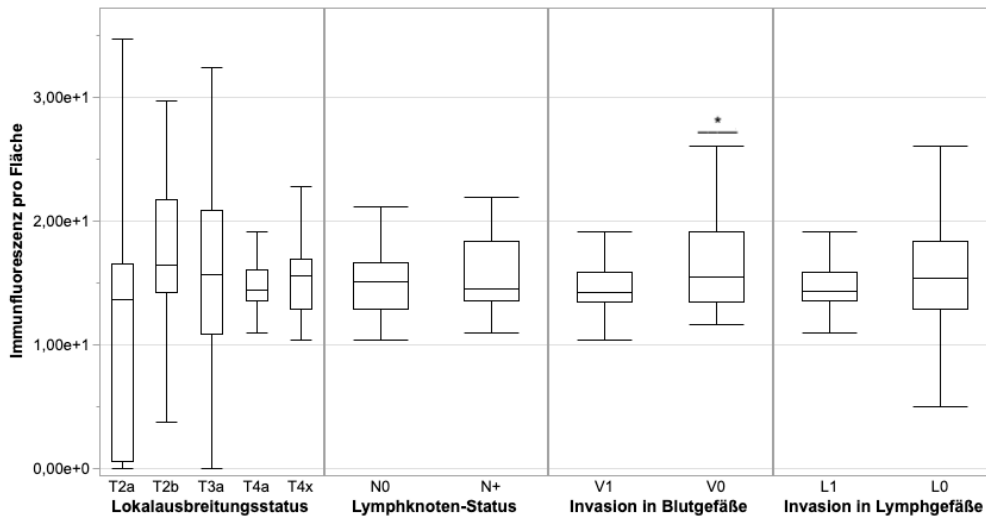


Abbildung 38: Expression von CD276 anhand des Ausbreitungsstatus in Blut- und Lymphgefäße
*: $p < .05$

Die Daten waren für die Gruppen T2b und T3a normalverteilt (Shapiro-Wilk-Test, $p > .05$), die Daten der Gruppen T2a, T4a und T4x waren nach dem Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt ($p < .05$). Im Kruskal-Wallis-Test zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen einer der Gruppen ($p = .448$, $H(2) = 1.606$). Die genauen Daten können der Tabelle 41 im Anhang entnommen werden.

Vergleich nach N-Stadium

Die CD276-Expression der Proben wurde für den nodalen Status nach der TNM-Klassifikation verglichen. Die Proben eines Patienten mit unbekanntem Nodalstatus ($N = 8$) wurden von der Analyse ausgeschlossen. Deskriptiv ist die Fluoreszenz pro Fläche in den Proben von Patienten ohne Nachweis von Lymphknotenmetastasen geringer (vgl. Abbildung 38). Beide Gruppen waren gemäß dem Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt ($p < .05$). Die Verteilungen der beiden Gruppen unterschieden sich nicht voneinander, Kolmogorov-Smirnov $p > .05$. Im Mann-Whitney-U-Test zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Proben der Patienten mit ($N = 42$, $M = 15.25$, $SD = 6.47$, $Mdn = 14.53$) und ohne Lymphknotenmetastasen ($N = 76$, $M = 14.21$, $SD = 6.46$, $Mdn = 15.08$), $U = 1567.00$, $Z = -.163$, $p = .873$, $r = -.02$.

Vergleich nach V-Stadium

Ein Mann-Whitney-U-Test wurde berechnet, um zu überprüfen, ob sich die Expression von CD276 anhand des Ausbreitungsstatus in die Blutgefäße (V-Status nach TNM) unterschied. Beide Gruppen waren gemäß dem Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt ($p < .05$). Die Verteilungen der beiden Gruppen unterschieden sich nicht voneinander, Kolmogorov-Smirnov $p > .05$. Die Daten sind in Abbildung 38 gezeigt. Die genauen deskriptiven Daten sind in Tabelle 18 dargestellt. Es gab einen signifikanten Unterschied ($p < .05$) der Expression von CD276, gemessen anhand der Fluoreszenzintensität pro Fläche, zwischen den Medianen der Patienten mit V0- und V1-Status.

Stadium	Deskriptive Statistik				Teststatistik			
	N	M (SD)	Mdn	M _{Rang}	U	Z	p	r
V0	74	15.13 (7.98)	15.54	k.A.	1455.00	-2.325	.020*	-.21
V1	52	14.26 (3.04)	14.27	k.A.				
L0	92	14.78 (7.52)	15.41	65.97	1337.00	-1.248	.214	-.11
L1	34	14.73 (1.90)	14.37	56.82				

* = $p < .05$

Tabelle 18: Expression von CD276 anhand des Ausbreitungsstatus in Blut- und Lymphgefäße (V- und L-Status) und Ergebnisse der Mann-Whitney-U-Tests

Vergleich nach L-Stadium

Ein Mann-Whitney-U-Test wurde berechnet, um zu überprüfen, ob sich die Expression von CD276 anhand des Ausbreitungsstatus in die Lymphgefäße (L-Status nach TNM) unterschied. Die Gruppe mit L1-Status war gemäß dem Shapiro-Wilk-Test normalverteilt ($p > .05$), die Gruppe mit L0-Status nicht ($p < .05$). Die Verteilungen der beiden Gruppen unterschieden sich voneinander, Kolmogorov-Smirnov $p < .05$. Die Daten sind in Abbildung 38 gezeigt. Die genauen deskriptiven Daten sind in Tabelle 18 dargestellt. Es gab keinen signifikanten Unterschied ($p > .05$) der Expression von CD276, gemessen anhand der Fluoreszenzintensität pro Fläche, zwischen den Patienten mit L0- und L1-Status.

Vergleich nach Grade

Es wurde ein Kruskal-Wallis-Test berechnet, um zu untersuchen, ob es einen Unterschied in der Expression von CD276 (gemessen durch die Immunfluoreszenz pro Fläche) abhängig von der Tumordifferenzierung (Grading) gab. Die Differenzierung im untersuchten Kollektiv wurde in drei Gruppen aufgeteilt: G2, G2-3 und G3. Die Daten waren für die Gruppen G2 und G2-3 normalverteilt (Shapiro-Wilk-Test, $p > .05$), die Daten der Gruppe G3 ($p < .05$) waren nach dem Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt. Im Kruskal-Wallis-Test zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen einer der Gruppen ($p > .05$). Die Daten sind in Abbildung 39 gezeigt. Die genaue Statistik ist in Tabelle 19 dargestellt.

Die Daten wurden nach Nachweisbarkeit von Tumorzellen gefiltert und die Proben der Gruppen G2, G2-3 und G3 mit Nachweis von Tumorzellen erneut auf Unterschiede bezüglich der CD276-Expression gemessen an der Fluoreszenz-Intensität pro Fläche untersucht. Die Daten waren für die Gruppen G2 und G2-3 normalverteilt (Shapiro-Wilk-Test, $p > .05$), die Daten der Gruppe G3 ($p < .05$) waren nach dem Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt. Im Kruskal-Wallis-Test zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen einer der Gruppen ($p > .05$). Die genaue Statistik ist in Tabelle 19 dargestellt.

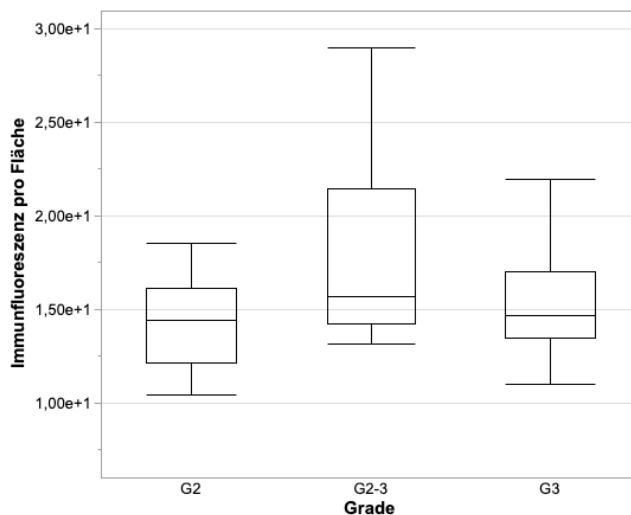


Abbildung 39: Expression von CD276 anhand des pathologischen Gradings

Ergebnisse

Grade	Tumorzellen nachweisbar	Deskriptive Statistik			Teststatistik	
		N	M (SD)	Mdn	H(2)	p
G2		22	13.83 (4.80)	14.39		
G2-3	alle Proben	20	16.21 (8.67)	15.70	3.414	.181
G3		84	14.67 (6.30)	14.68		
G2		5	12.43 (4.46)	13.49		
G2-3	ja	5	19.07 (12.76)	18.46	3.095	.213
G3		31	14.97 (3.44)	14.45		

Tabelle 19: Expression von CD276 anhand des pathologischen Gradings und des Auftretens von Tumorzellen und Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Tests

3.2.2 Unterschiede nach epidemiologischen, histologischen und anamnestischen Kriterien

Vergleich nach Geschlecht

Ein Mann-Whitney-U-Test wurde berechnet, um zu überprüfen, ob sich die Expression von CD276 in den untersuchten Proben anhand des Geschlechts der Patienten unterschied. Beide Gruppen waren gemäß dem Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt ($p < .05$). Die Ergebnisse sind in Abbildung 40 dargestellt. Die Verteilungen der beiden Gruppen unterschieden sich nicht voneinander, Kolmogorov-Smirnov $p > .05$. Die Expression von CD276 der Proben von Männern ($N = 58$, $M = 16.09$, $Mdn = 15.95$, $SD = 7.38$) war signifikant größer als die der Proben von Frauen ($N = 68$, $M = 13.64$, $Mdn = 14.27$, $SD = 5.42$), $U = 1279.00$, $Z = -3.393$, $p < .001$, $r = -.30$.

Ergebnisse

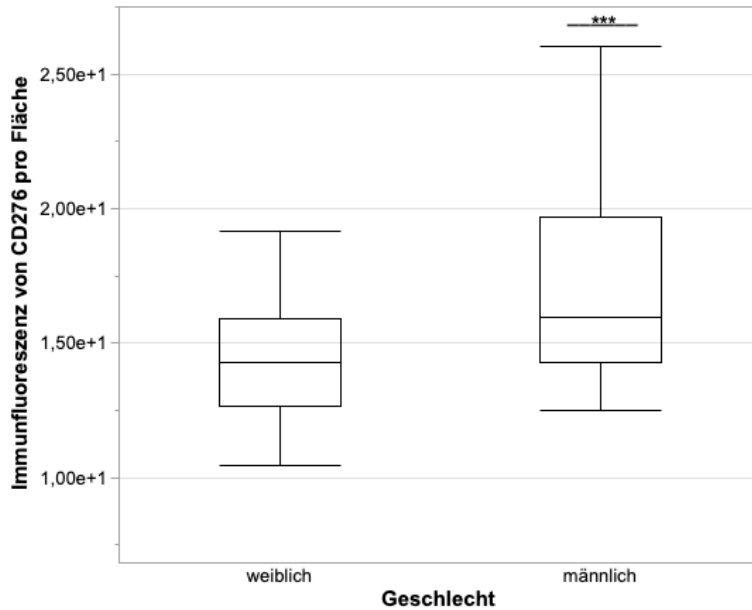


Abbildung 40: Expression von CD276 anhand des Geschlechts
 ***: $p < .001$

Korrelation nach Alter

Es wurde eine zweiseitige Korrelation nach Pearson berechnet, um einen Zusammenhang zwischen den Mittelwerten der CD276-Expression der Patienten mit dem Alter zu untersuchen. Beide Variablen waren nach dem Shapiro-Wilk-Test normalverteilt ($p > .05$). Höhe der Expression von CD276 und das Alter der Patienten korrelieren signifikant ($n = 10$, $p = .016$, $r = .733$). Je älter ein Patient war, desto höher war der Mittelwert der CD276-Expression und umgekehrt. Nach Cohen (1992) ist dies ein starker Effekt. Die deskriptive Statistik ist in Tabelle 20 dargestellt.

	Deskriptive Statistik		
	<i>N</i>	<i>M (SD)</i>	<i>Mdn</i>
CD276-Expression	10	15.44 (2.08)	15.29
Alter der Patienten in Jahren	10	60.90 (13.40)	60.50

Tabelle 20: Mittelwerte der CD276-Expression der Proben und des Alters der Patienten

Vergleich nach Patienten

Es wurde ein Kruskal-Wallis-Test berechnet, um zu untersuchen, ob es einen Unterschied in der Expression von CD276 (gemessen durch die

Immunfluoreszenz pro Fläche) abhängig von den Patienten selbst gab. Die Differenzierung im Kollektiv erfolgte nach den zehn untersuchten Patienten (vgl. Abbildung 41). Die genauen deskriptiven Daten sind in Tabelle 42 im Anhang dargestellt.

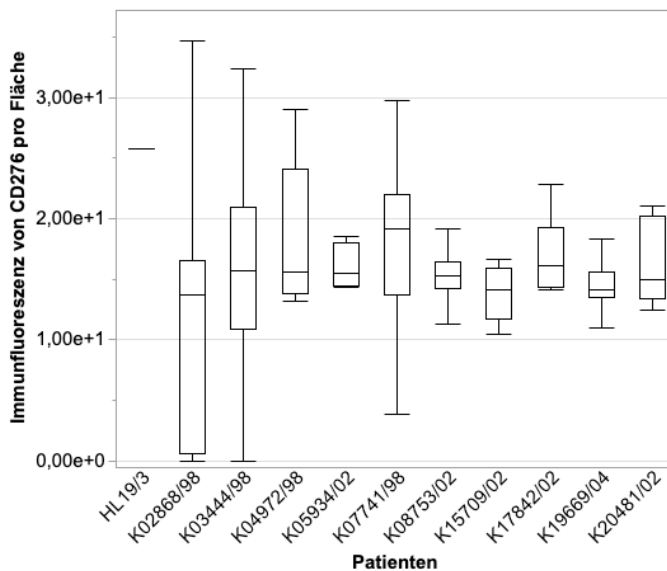


Abbildung 41: Expression von CD276 nach Patienten
Zum Vergleich links der Wert der Probe des somatischen Hamleiters HL19/3

Die Daten waren für K04972/02, K05934/02, K07741/98, K08753/02 und K19669/04 normalverteilt (Shapiro-Wilk-Test, $p > .05$), die Daten von K02868/98, K03444/98, K15709/02 und K17842/02 ($p < .05$) waren nach dem Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt. Im Kruskal-Wallis-Test zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen einer der Gruppen ($p = .130$, $H(9) = 13.793$).

Vergleich nach weiteren Malignomen

Ein Mann-Whitney-U-Test wurde berechnet, um zu überprüfen, ob sich die Expression von CD276 in den untersuchten Proben anhand des Geschlechts der Patienten unterschied. Die Ergebnisse sind in Abbildung 42 dargestellt. Beide Gruppen waren gemäß dem Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt ($p < .05$). Die Verteilungen der beiden Gruppen unterschieden sich voneinander, Kolmogorov-Smirnov $p < .05$. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Expression von CD276 zwischen Proben von Patienten mit weiteren malignen Erkrankungen ($N = 32$, $M = 16.48$, $SD = 5.12$, $Mdn = 15.27$, $M_{Rang} = 70.91$) und ohne weitere

maligne Erkrankungen ($N = 94$, $M = 14.19$, $SD = 6.82$, $Mdn = 14.74$, $M_{Rang} = 60.98$), $U = 1267.00$; $Z = -1.329$; $p = .186$; $r = -.12$.

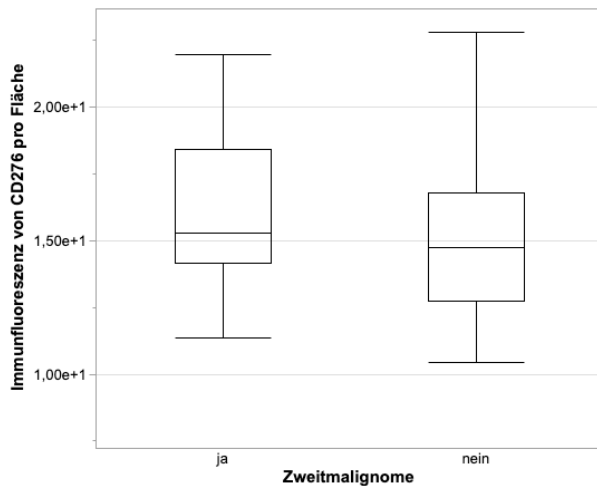


Abbildung 42: Expression von CD276 nach Auftreten von Zweitmalignomen in der Vorgeschichte

Vergleich nach urogenitalen Vor-OPs

Im untersuchten Kollektiv gab es Patienten, bei denen im Vorfeld der radikalen Zystektomie bereits eine Operation im urogenitalen Bereich vorgenommen worden war. Dies waren TUR-Bs, TUR-Ps oder Hysterektomien. Die Daten werden in Abbildung 43 gezeigt. Ein Mann-Whitney-U-Test wurde berechnet, um zu überprüfen, ob sich die Expression von CD276 in den untersuchten Proben zwischen Patienten mit vorausgegangenem urogenitalen Operationen und Patienten ohne solche Operationen unterschied. Beide Gruppen waren gemäß dem Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt ($p < .05$). Die Verteilungen der beiden Gruppen unterschieden sich nicht voneinander, Kolmogorov-Smirnov $p > .05$. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Expression von CD276 zwischen Proben von Patienten mit ($N = 86$, $M = 14.86$, $SD = 7.13$, $Mdn = 15.01$) und ohne urogenitalen Vor-Operationen ($N = 40$, $M = 14.57$, $SD = 4.92$, $Mdn = 14.62$), $U = 1711.00$; $Z = -.047$; $p = .965$; $r = -.004$.

Ergebnisse

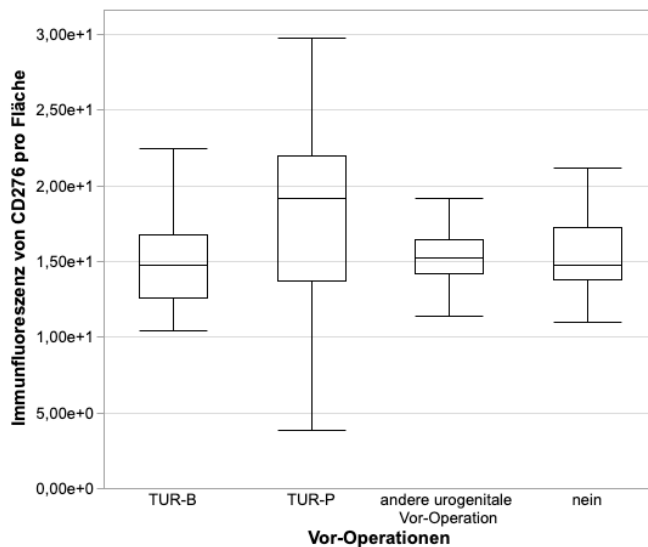


Abbildung 43: Expression von CD276 nach Voroperationen in der Anamnese

Vergleich nach BCG-Installation

Ein Mann-Whitney-U-Test wurde berechnet, um zu überprüfen, ob sich die Expression von CD276 in den untersuchten Proben bei vorheriger Instillationsbehandlung mit Bacillus Calmette-Guerin (BCG) unterschied. Die Daten werden in Abbildung 44 gezeigt. Die Gruppe mit vorheriger BCG-Instillation war gemäß dem Shapiro-Wilk-Test normalverteilt ($p > .05$), die Gruppe ohne BCG-Instillation nicht ($p < .05$). Die Verteilungen der beiden Gruppen unterschieden sich nicht voneinander, Kolmogorov-Smirnov $p > .05$. Es gab keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Expression von CD276 zwischen den Medianen der Proben mit vorheriger BGC-Behandlung ($N = 6$, $M = 18.34$, $Mdn = 15.65$, $SD = 6.20$) und der ohne vorherige BCG-Instillation ($N = 120$, $M = 14.59$, $Mdn = 14.82$, $SD = 6.48$), $U = 281.00$, $Z = -.932$; $p = .363$, $r = -.08$.

Ergebnisse

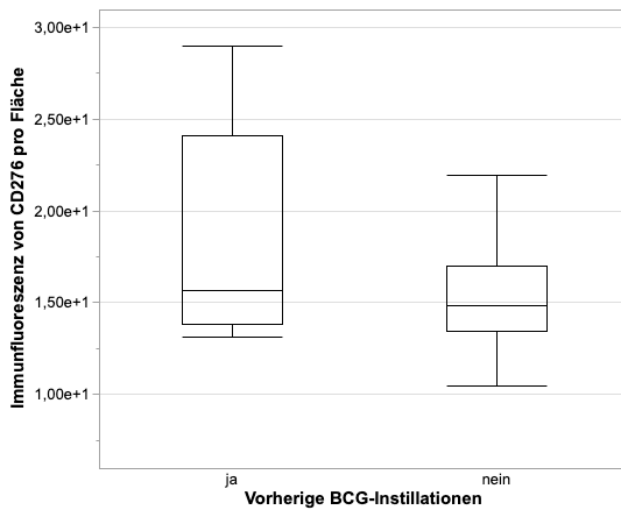


Abbildung 44: Expression von CD276 nach BCG-Instillation in der Vorgeschichte

Vergleich nach Tumorzellen und Entzündung

Um zu überprüfen, ob das Vorhandensein von Tumorzellen oder Entzündungsherden in den untersuchten Proben einen Effekt auf die Expression von CD276 hat, wurden Mann-Whitney-U-Tests berechnet.

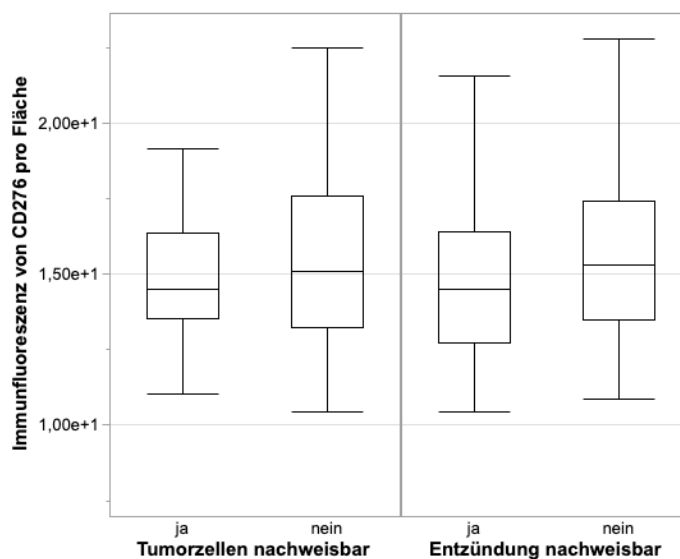


Abbildung 45: Expression von CD276 nach Vorkommen von Tumorzellen oder Entzündungen in den Proben

Rein deskriptiv zeigte sich eine höhere Expression von CD276 in den Proben mit Tumorzellnachweis und in den Proben ohne Nachweis einer Entzündung (vgl. Abbildung 45). Für beide Analysen waren beide Gruppen gemäß dem Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt ($p < .05$). Für beide Analysen unterschieden sich

Ergebnisse

die Verteilungen der beiden Gruppen nicht voneinander, Kolmogorov-Smirnov $p > .05$. Es gab weder einen signifikanten Unterschied bezüglich der Expression von CD276 zwischen den Medianen der Proben mit und ohne Nachweis von Tumorzellen noch zwischen den Medianen der Proben mit und ohne Entzündung. Die genauen Daten und Statistiken sind in Tabelle 21 dargestellt.

Histologie		Deskriptive Statistik			Teststatistik			
		<i>N</i>	<i>M (SD)</i>	<i>Mdn</i>	<i>U</i>	<i>Z</i>	<i>p</i>	<i>r</i>
Tumorzellen nachweisbar	Ja	41	15.16 (5.48)	14.52	1674.00	-.357	.72 4	-.03
	Nein	85	14.58 (6.94)	15.10				
Entzündung nachweisbar	Ja	20	13.16 (6.27)	14.53	905.00	-1.035	.30 5	-.09
	Nein	106	15.07 (6.52)	15.29				

Tabelle 21: Expression von CD276 anhand des Auftretens von Entzündung und Tumorzellen in den Proben und Ergebnisse der Mann-Whitney-U-Tests

Vergleich nach Gewebe

Es wurde ein Kruskal-Wallis-Test berechnet, um zu untersuchen, ob es einen Unterschied in der Expression von CD276 (gemessen durch die Immunfluoreszenz pro Fläche) je nach Ursprung der Probe gab. Die Differenzierung im Kollektiv erfolgte nach den 17 unterschiedlichen Organherkünften der Proben. Die unterschiedlichen Gruppen und jeweiligen Expressionen von CD276 werden in Abbildung 46 gezeigt. Die genauen Werte zur deskriptiven Statistik sind in Tabelle 43 im Anhang dargestellt.

Ergebnisse

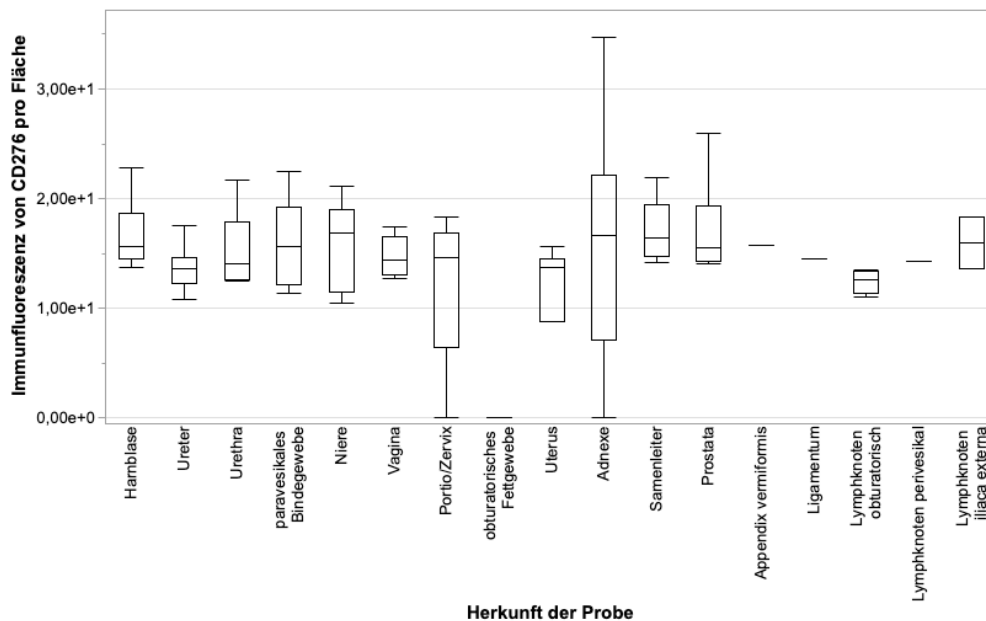


Abbildung 46: Expression von CD276 nach anatomischer/histologischer Herkunft der Probe

Die Daten waren für Niere, paravesikales Bindegewebe, Portio/Zervix, Adnexe, Samenleiter, Prostata, und Lymphknoten obturatorisch normalverteilt (Shapiro-Wilk-Test, $p > .05$), die Daten von Harnblase, Ureter, Urethra, Vagina, Uterus und Samenleiter ($p < .05$) waren nach dem Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt. Im Kruskal-Wallis-Test zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p = .048$, $H(16) = 26.430$). Ein Dunn-Bonferonni-Post-hoc-Test zeigte nach Bonferonni-Korrektur der Signifikanz keine signifikanten Unterschiede zwischen einer der Gruppen ($p > .05$). Die Vergleiche, die nach den unkorrigierten Signifikanzen des Dunn-Bonferonni-Post-hoc-Test signifikant sind, werden in Tabelle 22 dargestellt.

Vergleich	p	$p_{\text{Bonferonni-korr}}$
Obturatorisches Fettgewebe - Samenleiter	.034	1.000
Obturatorische Lymphknoten – paravesikales Bindegewebe	.023	1.000
Obturatorische Lymphknoten – Prostata	.013	1.000
Obturatorische Lymphknoten - Niere	.019	1.000
Obturatorische Lymphknoten – Harnblase	.005	.730
Obturatorische Lymphknoten – Adnexe	.012	1.000

Ergebnisse

Obturatorische Lymphknoten – Samenleiter	.002	.215
Uterus – Prostata	.049	1.000
Uterus – Harnblase	.024	1.000
Uterus – Adnexe	.043	1.000
Uterus – Samenleiter	.007	.975
Ureter – Harnblase	.015	1.000
Ureter – Adnexe	.049	1.000
Ureter – Samenleiter	.004	.560

p = Signifikanz des Kruskal-Wallis-post-hoc-Tests unkorrigiert

$p_{\text{Bonferonni-korr}}$ = Signifikanz des Kruskal-Wallis-post-hoc-Tests nach der Bonferonni-Korrektur

Tabelle 22: Expression von CD276 anhand der anatomischen Herkunft der Proben und Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests

Die Analyse nach Gewebetyp wurde nochmals nach Patienten sortiert durchgeführt. Aufgrund der nun geringen Stichprobengröße ergaben sich nur noch einige testbare Normalverteilungen, sie sind in Tabelle 44 im Anhang aufgezeigt. Im Kruskal-Wallis-Test zeigte sich lediglich bei Patient K15709/02 ein statistisch signifikanter Unterschied (Kruskal-Wallis-Test: $p < .05$, $H(6) = 14.363$) zwischen den untersuchten Strukturen. Ein Dunn-Bonferonni-Post-hoc-Test zeigte signifikante Unterschiede für die Vergleiche zwischen Niere und Adnexe ($z = -3.078$, $p = .044$, $r = -1.38$) sowie zwischen Ureter und Adnexe ($z = -3.059$, $p = .047$, $r = -1.25$). Die gesamte deskriptive Statistik ist in Tabelle 44 im Anhang zu finden und die gesamten Teststatistiken und Signifikanzen sind in Tabelle 23 aufgeführt.

Patient	Teststatistik	
	Kruskal-Wallis-Test	Signifikanz (p)
K02868/98	H (7) = 6.481	.485
K04972/98	H (4) = 4.857	.302
K05934/02	H (2) = 1.800	.407
K03444/98	H (4) = 2.823	.588
K07741/98	H (3) = 4.500	.212

Ergebnisse

K08753/02	H (5) = 6.736	.241
K15709/02	H (6) = 14.363	.026 **
K20481/02	H (4) = 4.139	.388
K17842/02	H (8) = 13.125	.108
K19669/04	H (10) = 17.325	.067

** = $p < .05$

Tabelle 23: Vergleich der Expression von CD276 nach Organen und gruppiert nach Patienten - Ergebnisse der Kruskal-Wallis-Tests

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation der Expression von CD276 auf Urothelkarzinomzelllinien und somatischen Urothelkulturen sowie die Expression von CD276 auf Schnittproben von zehn Patienten mit Urothelkarzinom nach radikaler Zystektomie untersucht. Die Zellkulturexperimente umfassten die Induktionsversuche mit LPS, Hypoxie, PMA und Ionomycin, FSL-1 und Mykoplasmen und die anschließende Untersuchung der Expression von CD276 auf der mRNA- und Proteinebene sowie auf der Zelloberfläche. Für histologische Analysen von Tumorgeweben wurden Präparatschnitte mittels Immunfluoreszenz gefärbt und dann anhand verschiedener klinischer und pathologischer Parameter verglichen.

4.1 Expression von CD276 auf den untersuchten Zelllinien und -kulturen

Die Expression von CD276 zwischen den hier untersuchten Blasentumorzelllinien war sehr inhomogen. Die Tumorzelllinie HT1197 exprimiert signifikant mehr mRNA von CD276 als die Linien T24 oder TCC-SUP. Auf Proteinebene wurde in Zellen der Linie HT1197 ebenfalls signifikant mehr CD276 gefunden, im Vergleich zu T24. Diese Beobachtungen bestätigten auch eine mittelstarke Korrelation zwischen der Expression von CD276 auf mRNA- und Proteinebene. Eine Korrelation zwischen der Expression von CD276 mit den Duplikationsraten der Zellen fand sich auf keiner der untersuchten Expressionsebenen. Dies kann dadurch veranschaulicht werden, dass HT-1197 auf mRNA- und Proteinebene die höchste Expression von CD276 zeigte, aber auch die niedrigste Duplikationsrate der Tumorzellen aufwies. Sie war signifikant niedriger als die Raten der anderen untersuchten Zellen, mit Ausnahme der Tumorzelllinie Cal-29 und der somatischen Urothelkultur. Letztere zeigte eine signifikant niedrigere Verdopplungszeit im Vergleich zu allen anderen untersuchten Tumorzelllinien. Dies passt zu der Beobachtung, dass eine höhere Proliferationsaktivität mit der Malignität und Aggressivität des Harnblasentumors korreliert (Limas et al., 1993, Lipponen et al., 1991). Möglicherweise besteht auch ein Zusammenhang mit der Ausbreitung des Ursprungstumors. So stammen Cal-29 und HT-1197 aus T2-Tumoren (Rasheed et al., 1977, Cattani et al., 2001) und

weisen die niedrigsten Duplikationsraten unter den Tumorzellen auf. Die Tumorzelllinie 253J dagegen, die aus einer Lymphknotenmetastase eines T4-Tumors isoliert wurde (Elliott et al., 1974), zeigt eine höhere Duplikationsrate. Für die restlichen Tumorzelllinien ist kein Staging des Primärtumors bekannt (Zuiverloon et al., 2018). Interessanterweise zeigte HT-1197 bei Analyse der Expression von CD276 auf der Zelloberfläche nur einen Wert im Mittelfeld der untersuchten Linien und Kulturen. Dagegen exprimiert TCC-SUP vergleichsweise viel CD276 auf der Zelloberfläche, auf mRNA-Ebene zeigt es aber die niedrigste gemessene CD276-Expression. Insgesamt gab es neben der bereits beschriebenen Korrelation zwischen mRNA- und Proteinexpression von CD276 keine Korrelation mit dem Vorkommen von CD276 auf der Zelloberfläche. Diese Beobachtungen unterstützen die These einer posttranskriptionellen Regulation der CD276-Expression (Picarda et al., 2016, Yi and Chen, 2009) und suggerieren auch eine zusätzliche Regulationsebene der Oberflächenexpression. MiRNAs stellen eine Möglichkeit solcher posttranskriptioneller Regulation dar und sind für einige Tumorarten bereits als Regulatoren der CD276-Expression bekannt (L. Wang et al., 2016b, H. Xu et al., 2009, Zhu et al., 2019, Zhao et al., 2013).

Eine signifikant höhere Expression der Tumorzellen im Vergleich zum somatischen Urothel konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Das somatische Urothel lag in den Untersuchungen dieser Arbeit bei mRNA und Proteinmenge von CD276 im Mittelfeld. Dies weicht von früheren Beobachtungen der Arbeitsgruppe ab (Aicher et al., 2021). Dort war allerdings ein anderes Kollektiv an Zelllinien verwendet worden, nämlich HT-1197, TCC-SUP und 5637, sowie RT-4. Aber auch andere Untersuchungen zeigten eine signifikant höhere CD276-Expression in Tumorgewebe im Vergleich zu tumorfreien Proben- auf mRNA- und Proteinebene (Wu et al., 2015, Y. Li et al., 2017) und im immunhistologischen Vergleich (E. Xylinas et al., 2014b, Boorjian et al., 2008). In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass Untersuchungen in der Tumorzelllinie T24 im Vergleich zu 5637 eine hohe Expression von CD276 beschrieben (Y. Li et al., 2017, Z. L. Xu et al., 2018b). Die in dieser Arbeit gemessene CD276-Expression von T24 lag aber auf allen Ebenen unterhalb der

von 5637. Eine mögliche Ursache dieser Varianzen könnte in genetischen Veränderungen der Zelllinien liegen, die im Laufe der Jahre nach Etablierung entstehen (Pinto-Leite et al., 2014). Auch eine Kontamination durch Kreuzung mit anderen Zelllinien kann zu fehlerhaften Vergleichen zwischen Publikationen und Forschungsergebnissen führen (Yaqing Huang et al., 2017). Für Leukozyten und Lymphozyten ist bekannt, dass durch Matrixmetalloproteinasen eine lösliche Form (sB7-H3) freigesetzt wird (Guangbo Zhang et al., 2008). Möglicherweise könnte ein ähnlicher Mechanismus auch auf Blasen tumorzellen existieren und dies einen Grund für die Variabilität der CD276-Expression darstellen (Aicher et al., 2021).

4.2 Stimulationsversuche

4.2.1 Stimulation mit LPS

LPS wird von Toll-like-Rezeptor-4 (TLR4) auf der Zelloberfläche erkannt und zusammen mit CD14 und MD-2 werden verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, durch die es zur Ausschüttung proinflammatorischer, aber auch antiinflammatorischer Zytokine kommt (Wright et al., 1990, Nagai et al., 2002, Shimazu et al., 1999, Haziot et al., 1996, Lu et al., 2008, Siegemund and Sauer, 2012). Auch in Blasen tumoren kommt es unter anderem zur Erhöhung von TNF- α , IL-8 und IL-6 (Olbert et al., 2015, Shimizu et al., 2004). Zudem ist eine Hochregulation von B7-H1 (PD-1) nach Stimulation von Blasen tumorzellen mit LPS beschrieben (Qian et al., 2008, Y. H. Wang et al., 2014). Andere Studien demonstrierten eine solche Hochregulation für CD276 unter Stimulation mit LPS auf Dendritischen Zellen (Steinberger et al., 2004). Eine Übertragung dieses Mechanismus auf Blasen tumorzellen gelang in dieser Arbeit nicht. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der mRNA-, Protein- und Oberflächenproteinexpression von CD276 nach Stimulation mit LPS auf Blasen tumorzellen oder somatischem Urothel. Methodisch wurde für diese Arbeit ein LPS von *Salmonella typhi* verwendet, Steinberger und Kollegen verwendeten LPS von *E.coli*. Hinsichtlich des Effekts der Stimulation von TLR4-Signalkaskaden auf der Blasen tumorzelllinie T24, gemessen an der Induktion von IL-8, ist zwischen diesen beiden LPS-Reagenzien kein Unterschied bekannt (Bäckhed et al., 2003). Die Expression von TLR4 ist auf Blasen tumorzelllinien

ebenfalls untersucht worden. So konnte für die Linien 5637, T24, TCC-SUP und HT1197 das Vorkommen von TLR4 auf der Zelloberfläche bestätigt werden (LaRue et al., 2013, Olbert et al., 2015, Bäckhed et al., 2002, Y. H. Wang et al., 2014, Qian et al., 2008). Auf der Tumorzelllinie 253J ist dagegen kein TLR4 exprimiert (LaRue et al., 2013). Für die Tumorzelllinie Cal-29 wurden bisher keine Untersuchungen hinsichtlich TLR4 durchgeführt. Die TLR4-Expression auf somatischen Urothelzellen ist höher als die in Blasen-tumorzellen, vor allem im Vergleich zu muskulinvasiven Blasen-tumoren (Ayari et al., 2011, Y. H. Wang et al., 2014). (Shimizu et al., 2004) untersuchten die Expression von CD14 als für die LPS-Erkennung relevanten Faktor. Auf T24 und 5637 ist CD14 in seiner membranverankerten Form vorhanden, während in HT-1197 kein CD14 nachweisbar ist (Shimizu et al., 2004). Auch auf somatischem Urothel konnte CD14 nachgewiesen werden (Shimizu et al., 2004). Das fehlende Vorkommen von TLR4 oder CD14 und somit eine Resistenz gegenüber einer Stimulation mit LPS kann daher die fehlende Hochregulation von CD276 in allen in dieser Arbeit untersuchten Linien und Kulturen nicht erklären. Eine andere Arbeitsgruppe fand für T24 eine zeitabhängige Hochregulation von B7-H1 (PD-L1) nach Stimulation mit LPS, so wurde der Höhepunkt nach achtstündiger Inkubation erreicht, während zu einem späteren Zeitpunkt der Messwert von B7-H1 wieder abfiel (Qian et al., 2008). Für die Messungen dieser Arbeit wurde allerdings, analog zur Literatur, eine Inkubationszeit von 24 Stunden angewendet (Steinberger et al., 2004). Durch Wiederholung des Stimulationsversuchs mit LPS mit engmaschiger, früherer Messung von CD276, könnte ein möglicher Zeiteffekt untersucht werden. Ein anderer Zusammenhang wurde von Xie und Kollegen bei Pankreaskarzinomen berichtet. So würde sB7-H3, eine lösliche Form von CD276, den TLR4/NF- κ B-Signalweg aktivieren (Xie et al., 2016).

4.2.2 Stimulation durch Hypoxie

In dieser Arbeit wurde auch untersucht, ob CD276 durch Hypoxie in Blasen-tumorzellen und somatischem Urothel hochreguliert wird. Wang und Kollegen berichten eine vermehrte Expression von HIF- α in den Tumorzelllinien T24 und 5637 unter Hypoxie (Jing-Zi Wang et al., 2021). Eine prinzipielle Stimulierbarkeit zumindest dieser Zelllinien durch Hypoxie ist somit anzunehmen.

Die ausbleibende Hochregulation von CD276 unter hypoxischen Bedingungen spricht somit gegen eine Regulation der Expression über HIF- α in den Urothelzellen. Zum aktuellen Zeitpunkt sind meines Wissens keine anderen Studien zur Regulation von CD276 über Hypoxie durchgeführt worden. Angesichts vieler Studien bezüglich der Funktion von CD276 in den Tumorgefäßzellen zeigt sich ein sehr breites Bild der Effekte. Für orale Plattenepithelkarzinome wurde eine Regulation der Expression von HIF- α durch B7-H3 über den PI3K/Akt/mTOR-Signalweg und dadurch letztlich eine Stimulation der Glykolyse in den Tumorzellen beschrieben (Z. Li et al., 2019). Lim und Kollegen untersuchten den Einfluss von B7-H3 in Mammakarzinomlinien auf den Stoffwechsel der Tumorzellen. Sie fanden eine durch HIF- α induzierte erhöhte Glykolyseaktivität unter hypoxischen Bedingungen (S. Lim et al., 2016). Zusätzlich beschrieben sie eine durch B7-H3 vermittelte Hochregulation des Pentosephosphatwegs in den Zellen, wodurch es zur Verringerung von Sauerstoffradikalen (ROS) kam (S. Lim et al., 2016). Daraus folgerten sie, dass CD276 in Tumorzellen unter hypoxischen Bedingungen eine Rolle bei der Reduktion von oxidativem Stress spielt (S. Lim et al., 2016). Die Bedeutung von CD276 hinsichtlich Angiogenese scheint aber noch deutlich komplexer zu sein. So berichten Son und Kollegen eine Expression von CD276 auf im Blut zirkulierenden physiologischen Late Endothelial Progenitorzellen, wo es deren Proliferation und Migration reguliert, aber auch die Angiogenese und Differenzierung der Endothelzellen durch verminderte VEGF-Sekretion hemmt (Son et al., 2019). Eine ähnliche Beobachtung machten Sun und Kollegen bei der Untersuchung von Mammakarzinomzellen. Auch hier zeigte sich eine negative Korrelation zwischen VEGF und der Expression von CD276 (J. Sun et al., 2014). Insgesamt scheint CD276 also weniger eine direkte neoangiogenetische Funktion in hypoxischen Tumorarealen als eine komplexe optimierende Rolle auf metabolische und antioxidative Prozesse in Tumorzellen, aber auch in somatischen Zellen zu spielen.

4.2.3 Stimulation mit PMA und Ionomycin

Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) in Kombination mit Ionomycin wird in vielfältigen experimentellen Ansätzen als Stimulator von Lymphozyten

verwendet. PMA aktiviert die Proteinkinase C und Ionomycin ist ein Calciumionophor, es transportiert also Calciumionen durch die Zellmembran und simuliert damit einen Effekt, der der Aktivierung des T-Zell-Rezeptors ähnlich ist (Ai et al., 2013, Mastro and Smith, 1983, Truneh et al., 1985, Chaudhri et al., 1988). Eine Hochregulation von CD276 nach Inkubation mit PMA und Ionomycin wurde auf Dendritischen Zellen, T-Zellen und Monozyten sowie NK-Zellen beobachtet (Chapoval et al., 2001, Steinberger et al., 2004). Eine Hochregulation von CD276 auf epithelialen Tumoren durch PMA und Ionomycin erfolgte nicht (Chapoval et al., 2001). In dieser Arbeit wurden Blasen-tumorlinien und somatische Urothelzellkulturen mit PMA und Ionomycin inkubiert und die Expression von CD276 auf mRNA-Ebene gemessen. Es zeigte sich, übereinstimmend mit den Ergebnissen von Chapoval und Kollegen, kein signifikanter Effekt nach Stimulation mit PMA und Ionomycin.

Für den Stimulationsversuch mit PMA und Ionomycin mussten die Substanzen in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst werden, daher wurde eine Lösungsmittelkontrolle durchgeführt. Für DMSO zeigte sich keine statistisch signifikante Änderung der Expression von CD276. Allerdings konnte ein Anstieg der Transkription im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet werden, während die zusätzlich mit PMA und Ionomycin nur einen minimalen Unterschied in der CD276-Expression verglichen mit der DMSO-Kontrolle zeigten. Santos und Kollegen beschreiben bei Untersuchung eines anderen Calciumionophors eine Verminderung des gewünschten Calciumeinstroms in die Zellen durch DMSO (Santos et al., 2002). Auch Schwächung von Lymphozytenaktivierung und Zytokinproduktion wurden für DMSO beschrieben (De Abreu Costa et al., 2017). Diese Beschreibungen implizieren eine mögliche Minderung des bei anderen Zellen beschriebenen Effekts von PMA und Ionomycin durch DMSO (Chapoval et al., 2001, Steinberger et al., 2004).

4.2.4 Stimulation mit FSL-1 und Expression von CD276 unter Infektion mit Mykoplasmen

Ergänzend zur Stimulation mit LPS als Bestandteil der Membran gramnegativer Bakterien wurde für diese Arbeit auch die Stimulation mit dem Lipopeptid Fibroblast-stimulating-Lipopeptid-1 (FSL-1) und der Effekt einer gezielten

Infektion der Zellen mit Mykoplasmen untersucht. FSL-1 ist ein synthetisches Lipopeptid, welches von *Mykoplasma salivarium* abgeleitet ist (Shibata et al., 2000). FSL-1 wird von TLR2 und TLR6 erkannt (Okusawa et al., 2004, Fujita et al., 2003). Beide Rezeptoren werden sowohl auf somatischem Urothel als auch auf den Tumorzelllinien 5637 und T24 exprimiert (Ayari et al., 2011). In der Tumorzelllinie 253J ist kein TLR2-Protein nachweisbar (LaRue et al., 2013). Nach Stimulation mit FSL-1 zeigte sich kein Unterschied in der CD276-Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen.

Die Rolle einer Infektion mit Mykoplasmen für die Entstehung von Tumoren ist Gegenstand von Untersuchungen und wird kontrovers diskutiert. In über Wochen mit Mykoplasmen infizierten Fibroblastenkulturen zeigten sich morphologische Auffälligkeiten sowie genetische Veränderungen der Zellen und nach Beimpfung von Mäusen mit diesen Zellen wurde das Auftreten von Tumoren beobachtet (Tsai et al., 1995). Auch Zhang und Kollegen beschreiben eine veränderte Genexpression unter Mykoplasmeninfektion, woraus eine maligne Transformation durch veränderte Expression von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen entstehen könnte (Shimin Zhang et al., 2006). In Proben von Nierenzellkarzinomen im Vergleich zu somatischen Gewebeproben wurde mehr Mykoplasmen-DNA gefunden (Pehlivan et al., 2005). Eine solche Assoziation konnte beim MALT-Lymphom aber nicht nachgewiesen werden (Chanudet et al., 2007). Ein Vergleich der Expression von CD276 in mykoplasmeninfizierten Tumorzellen und mykoplasmenfreien Kulturen zeigte keinen signifikanten Unterschied.

4.2.5 Analyse des Effekts durch Stimulation und Korrelation der Ergebnisse

Betrachtet man die Differenz zwischen der CD276-Expression der Zellen nach Stimulation und der Kontrolle als Maß des Effekts der Stimulation, so ergaben sich mehrere Korrelationen. Zum einen zeigte sich eine starke zweiseitige positive Korrelation zwischen der Änderung der mRNA-Expression nach Stimulation mit LPS und der Duplikationsrate. Dies könnte bedeuten, dass durch eine schnellere Zellverdopplung auch eine schnellere Reaktion auf Änderungen der Wachstumsbedingungen möglich ist. Eine entsprechende Korrelation für die

Stimulation mit Hypoxie zeigte sich nicht. Allerdings waren die Stichprobengrößen gering, es wurden jeweils die Mittelwerte der sechs Tumorzelllinien und der somatischen Urothelzellen insgesamt miteinander korreliert. Eine weitere zweiseitige positive Korrelation zeigte sich zwischen den Trends der Proteinexpression und der Oberflächenproteinexpression von CD276 nach Inkubation mit LPS. Eine mögliche Interpretation ist, dass beides von den gleichen Regulationsmechanismen gesteuert wird und somit bei Erhöhung der gesamten Proteinexpression auch auf der Zelloberfläche mehr CD276 exprimiert wird. Allerdings wurde in den für diese Arbeit erhobenen Daten keine entsprechende Korrelation für die Inkubation unter hypoxischen Bedingungen gefunden. Dementsprechend ist die Frage zu stellen, ob es sich um eine Scheinkorrelation bei zu geringer Stichprobenzahl handelt, da die Proteinexpression nach Stimulation für jede Zelllinie und -kultur nur zweimal gemessen wurde und die DFZ-Analyse zur Bestimmung der CD276-Expression auf der Zelloberfläche wurde pro Linie und Stimulation nur einmal durchgeführt.

Die Trends der mRNA-Expression von CD276 nach Inkubation in Hypoxie und die Trends der Expression an der Zelloberfläche nach Inkubation mit LPS zeigten eine negative zweiseitige Korrelation. Eine negative zweiseitige Korrelation bestand ebenso bei den Trends der Expression an der Zelloberfläche nach Inkubation mit LPS und unter Hypoxie. Letztere könnte dahingehend interpretiert werden, dass die Zellen entweder nach LPS oder nach Hypoxie mehr CD276 auf der Zelloberfläche exprimieren. Allerdings war die analysierte Stichprobengröße von jeweils sieben eher gering und eine entsprechende Korrelation für die Protein- und mRNA-Ebenen konnte nicht gefunden werden.

4.3 Untersuchung der Expression von CD276 auf Gewebeproben mittels Immunfluoreszenz

Zusätzlich zu den in-vitro-Versuchen wurde die Expression von CD276 auch mittels Immunfluoreszenz auf Proben untersucht, die bei radikalen Zystektomien bei Patienten mit Urothelkarzinomen gewonnen worden waren. Es wurden 126 in Paraffin eingebettete Proben von zehn Patienten untersucht und die Expression von CD276 anhand der Fluoreszenzintensität pro Fläche verglichen. Hierzu wurden die zugehörigen pathologischen Befunde und Arztbriefe

ausgewertet. Das Kollektiv war zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit bereits vorhanden und war im Vorfeld anhand des T-Stadiums und der Diagnose eines Urothelkarzinoms zusammengestellt worden.

Die Auswertung erfolgte anhand der Fluoreszenzintensitäten von CD276 pro Fläche, da es sich um zusammenhängende histologische Präparate ohne definierte Zellzahl handelte. Für die Bestimmung erfolgte die Aufnahme eines repräsentativen Ausschnitts der Probe mit CD276-Erst-Antikörper und der Negativkontrolle. Li und Kollegen hatten für ihre Untersuchung der Expression von CD276 immunhistochemische Verfahren verwendet und anhand des prozentualen Anteils der gefärbten Bereiche eine Einteilung vorgenommen (Y. Li et al., 2017). Als Cut-off-Wert für die Wertung einer CD276-Expression als positiv wurden 30% angesetzt. Andere Arbeitsgruppen legten- ebenfalls bei immunhistologischer Untersuchung- demgegenüber die 10%-Marke als Cut-off fest (Boorjian et al., 2008, E. Xylinas et al., 2014b). Bei Auswertung der Daten der vorliegenden Arbeit nach diesen Systemen erreichten die 126 untersuchten Proben durchschnittlich 4%, keine einzige erreichte die 30%-Marke. Eine mögliche Ursache könnte die Verwendung eines Bildausschnitts in 40x-Vergrößerung sein. Die Aufnahme der gesamten Probe mit den Fluoreszenzen war nicht möglich. Bei der Immunhistologie ist es durch eine zusätzliche Färbung mit Hämatoxylin-Eosin dagegen einfacher, die gesamte Probe in geringer Vergrößerung zu dokumentieren. Auch das Alter der Proben könnte eine Rolle spielen. So wird ein beginnender Zerfall der Antigenstrukturen in Paraffinblöcken nach 15 bis 20 Jahren vor allem für nukleäre oder membranständige Antigene beschrieben (Grillo et al., 2017). Für diese Arbeit wurden ca. 20 Jahre alte Proben untersucht. Ein testweise untersuchter Paraffinschnitt aus einer frischen Gewebeprobe des Patienten, von dem auch die somatische Urothelzellkultur HL19/3 stammt, zeigte eine Expression von über 30% der Fläche. Möglicherweise ist die Bindungsstelle des Erstantikörpers nach jahrelanger Lagerung trotz Antigenretrieval verändert, sodass eine Bindung des Erstantikörpers nur noch eingeschränkt möglich ist. Eine erneute Untersuchung von Patientenproben jüngeren Datums wäre nötig, um diese Frage zu klären. Um einen validen Cut-off-Wert für die Wertung als positiv für CD276 festzulegen,

wäre zusätzlich ein Vergleich mit Urothelproben von Patienten ohne Tumor sinnvoll, um die Baselines der Expression zu untersuchen. Insgesamt gibt es zwar einige immunhistologische Untersuchungen der Expression von CD276 auf Blasen Tumoren, allerdings sind diese nur bedingt vergleichbar, da die Bewertungen der Qualität und Quantität der Färbungen durch unterschiedliche Methoden oder mit unterschiedlichen Grenzwerten vorgenommen wurden. Dementsprechend sind die Variationen der Expression nur schwer einzuordnen. Zudem wird die Expression auf Gewebe auch teilweise anhand der mRNA-Menge von CD276 beurteilt, beispielsweise bei Li und Kollegen (Y. Li et al., 2017). Auch hier könnten, wie bereits erläutert, posttranskriptionelle Modifikation eine Erklärung für die Varianz der Ergebnisse darstellen.

Um dennoch eine Auswertung der erhobenen Daten zu ermöglichen, wurden für diese Arbeit vor allem Mittelwertvergleiche durchgeführt. Die genaue Auswertungsstrategie wird in 2.7.6 beschrieben.

Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der CD276-Expression abhängig von dem lokalen Ausbreitungsstatus des Tumors gefunden. Die höchsten Expressionen zeigten sich im T3-Stadium. Hin zum T4-Stadium gab es einen leichten, nicht signifikanten Abfall der CD276-Expression. Eine ähnliche Beobachtung bei Untersuchung von Tissue-microarrays mittels Immunhistochemie wurde von der Arbeitsgruppe bereits im Vorfeld publiziert. Auch hier zeigten sich die Höchstwerte der CD276-Expression in T2b- und T3a-Stadien mit nicht-signifikantem Abfall zum T4-Stadium (Aicher et al., 2021). Für den nodalen Ausbreitungsstatus waren Unterschiede in der Expression von CD276 ebenfalls nicht signifikant. Das Fehlen von signifikanten Unterschieden in der Expression von CD276 für lokale Tumorausbreitung und Nodalstatus wurde bereits mehrfach beschrieben (Boorjian et al., 2008, E. Xylinas et al., 2014b, Z. L. Xu et al., 2018b, Wu et al., 2015). Allerdings wurde auch eine Erhöhung der CD276-Expression beim Vergleich von geringer lokaler Ausbreitung (T_a- und T₁-Stadium) mit den Stadien T₂ bis T₄ berichtet (Y. Li et al., 2017). Dies lässt sich anhand der vorliegenden Daten nicht untersuchen, da nur Proben ab T₂-Stadium untersucht wurden. Die Fluoreszenzintensität pro Fläche war bei fehlender Gefäßinvasion (V₀) signifikant größer als bei Patienten mit Nachweis von

Tumorzellen in den Blutgefäßen. Die Gefäßinvasion von Urothelzellkarzinomen ist mit höheren Tumorstadien assoziiert (Langner et al., 2006). Die verminderte Expression von CD276 bei Proben von Patienten mit Gefäßinvasion könnte also mit der bereits beschriebenen Beobachtung in Verbindung gebracht werden, dass es in höheren Tumorstadien zu einem nicht signifikanten Abfall der CD276-Expression kommt (Aicher et al., 2021). Allerdings konnte ein entsprechender signifikanter Unterschied für die Invasion in Lymphgefäße in den Daten dieser Arbeit nicht gezeigt werden.

Eine Analyse anhand des Status bei Fernmetastasierung konnte nicht erfolgen, da das Kollektiv keine Patienten mit nachgewiesener Fernmetastasierung enthielt.

Ein signifikanter Unterschied der CD276-Expression bezüglich des Tumorgrades konnte nicht nachgewiesen werden. Es zeigte sich auch kein signifikanter Unterschied zwischen den Grading in den Proben, die laut den pathologischen Befunden Tumorzellen enthielten. Eine fehlende Assoziation zwischen Tumorgrade und CD276-Expression in Urothelzellkarzinomen wurde bereits mehrfach publiziert (E. Xylinas et al., 2014b, Y. Li et al., 2017, Z. L. Xu et al., 2018b, Wu et al., 2015).

Übereinstimmend mit bereits bekannten Daten zeigten Proben, die laut den pathologischen Befunden Tumorzellen enthielten, eine höhere CD276-Expression als tumorfreie Proben (E. Xylinas et al., 2014b, Y. Li et al., 2017, Aicher et al., 2021). Allerdings war der Unterschied für die in dieser Arbeit untersuchten Proben nicht signifikant.

Die Altersstruktur mit einem Median von 61 Jahren war etwas jünger als in anderen Untersuchungen, wo das mediane Alter 66 bis 69 Jahre betrug (Boorjian et al., 2008, E. Xylinas et al., 2014b, Aicher et al., 2021). Es zeigte sich eine starke positive Korrelation zwischen dem Alter der Patienten und dem Mittelwert der CD276-Expression der jeweiligen Proben. Dies steht im Kontrast zu den Beobachtungen von Li und Kollegen sowie Xu und Kollegen, die keine Assoziation zwischen der CD276-Expression und dem Alter fanden (Y. Li et al., 2017, Z. L. Xu et al., 2018b). Eine mögliche Erklärung könnte wiederum in den

bereits ausgeführten Unterschieden der Auswertung und Wertung der Färbung liegen. Ähnlich verhält es sich für eine in dieser Arbeit gefundene signifikant höhere Expression von CD276 in den Proben männlicher Patienten. Eine Assoziation der CD276-Expression und des Geschlechts wurde mehrfach verneint (Boorjian et al., 2008, Y. Li et al., 2017, Z. L. Xu et al., 2018b).

Bei einigen Patienten des untersuchten Kollektivs waren weitere maligne Erkrankungen des Urogenitaltrakts z.B. Prostata- oder Zervixkarzinome bekannt. Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression von CD276 zwischen Patienten mit und ohne weitere maligne urogenitale Erkrankungen gefunden werden.

Ein Patient erhielt in der Vorgeschichte eine Instillationsbehandlung mit BCG. Der Unterschied der CD276-Expression in den Proben dieses Patienten war nicht signifikant gegenüber den restlichen Proben des Kollektivs. Jedoch wiesen die Proben des mit BCG-behandelten Patienten im Mittel den höchsten Expressionswert von CD276 unter allen untersuchten Patienten auf. Die Expressionsunterschiede von CD276 zwischen allen Patienten waren aber ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich. Allerdings war in dem Kollektiv nur ein Patient mit BCG-Instillation enthalten. Von diesem Patienten waren lediglich sechs Proben zur Analyse vorhanden, demgegenüber standen 120 Proben von Patienten ohne BCG-Instillation. Es wäre also möglicherweise interessant, an einem anderen Kollektiv diesen Sachverhalt gezielt erneut zu untersuchen, denn auch Boorjian und Kollegen berichteten eine höhere Intensität der CD276-Färbung nach BCG-Instillation im Vorfeld (Boorjian et al., 2008).

Bei einer radikalen Zystektomie werden neben der Harnblase auch weitere Organe entnommen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019). Anhand der pathologischen Berichte wurden die untersuchten Paraffinproben histologisch eingeordnet und die CD276-Expression der unterschiedlichen Gewebsarten miteinander verglichen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Nach Aufteilung des Datensatzes pro Patient zeigten sich bei einer Patientin signifikant höhere CD276-Expressionen in den Proben, in denen Teile der Adnexe eingebettet worden waren, im Vergleich zu Proben von Niere und Ureter. Bei

dieser Patientin war keine weitere maligne Erkrankung bekannt, die Proben der Adnexe waren laut pathologischem Befund tumorfrei. Insgesamt zeigte sich hinsichtlich der CD276-Expression kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten. Eine Fehlkorrelation ist nicht auszuschließen, da jeweils nur drei Proben von Ureter und Adnexe und nur zwei Proben von der Niere gefärbt und die Mittelwerte verglichen wurden. Auch ist die schiefe Anzahl an Vergleichen von mehreren Geweben nach Patienten sortiert anfällig für Zufallsbefunde. Zudem berichteten auch Aicher und Kollegen über sehr variable Expressionen innerhalb der dort untersuchten Proben (Aicher et al., 2021).

4.4 Fazit

Zusammenfassend zeigte sich in dieser Arbeit ein variables Bild der Expression von CD276 auf Blasen-tumorzellen und -gewebe. Eine höhere Expression von CD276 in malignen Zellen und Geweben konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Bei Experimenten mit Blasen-tumorzelllinien erscheint es angesichts der sehr variablen CD276-Expressionen außerdem wichtig, eine gezielte Auswahl der untersuchten Linien zu treffen. Auch sind Untersuchungen weiterer somatischer Urothelzellkulturen nötig, um eine verlässliche Baseline zu generieren und mögliche Verzerrungen durch individuelle Unterschiede zu verringern.

Für die Untersuchung der Expression von CD276 auf Tumorgewebe mittels immunhistologischer oder Immunfluoreszenz-Techniken wäre eine allgemeine Definition der Wertung als positiv oder negativ hilfreich, um Verzerrungen bei der Auswertung zu vermeiden. Beispielsweise könnte eine parallele Untersuchung der mRNA-Expression in den Geweben eine zusätzliche Informationsebene schaffen, um die Färbung besser beurteilen zu können.

Eine Hochregulation der Expression durch Stimulation mit LPS, Hypoxie, PMA und Ionomycin, FSL-1 oder unter Mykoplasmeninfektion konnte nicht gefunden werden. Ein direkter Zusammenhang zwischen einer Infektion der Harnblase und der Expression von CD276 scheint daher nicht zu bestehen.

Ebenso konnte kein signifikanter Unterschied der CD276-Expression zwischen den unterschiedlichen Ausbreitungsstadien und Infiltrations- sowie

Tumordifferenzierungsgraden gefunden werden. Auch eine erhöhte Expression in Proben mit entzündlicher Infiltration konnte nicht gezeigt werden. Allerdings konnte übereinstimmend mit Boorjian und Kollegen eine höhere Expression von CD276 nach Instillation mit BCG nachgewiesen werden (Boorjian et al., 2008). Weitere Versuche sind hier nötig um einen möglichen Zusammenhang gezielt zu untersuchen. Insgesamt könnten miRNAs als mögliche Faktoren der posttranskriptionellen Regulation der Expression von CD276 auch bei Blasentumorzellen eine Rolle spielen.

5. Zusammenfassung

Das Harnblasenkarzinom zählt zu den häufigsten Krebsarten weltweit. Fast alle Harnblasenkarzinome sind Urothelzellkarzinome. Etwa die Hälfte der Fälle in Deutschland gehören zur prognostisch schlechteren Gruppe der invasiven Harnblasenkarzinome. Diese Tumoren müssen aufgrund ihrer größeren Ausbreitung potenziell intensiver therapiert werden. Ein wichtiger Baustein einer solchen Therapie kann eine Immuntherapie sein. Aktuell stehen hier für das Urothelzellkarzinom vor allem PD-1-Inhibitoren zu Verfügung. Wie PD-1 gehört auch CD276 zur immunmodularischen B7-Familie. Zielsetzung dieser Arbeit war es, das Expressionsverhalten von CD276 sowie dessen Regulation auf Urothelkarzinomzellen und auf somatischen Urothelzellkulturen zu untersuchen und so dieses potenziell therapeutisch relevante Molekül auf Urothelzellen besser verstehen zu können.

Es wurden Zellkulturversuche und Immunfluoreszenzfärbungen von Gewebeproben durchgeführt, um die Expression von CD276 sowohl auf Zellebene als auch im gesamten histologischen Kontext beurteilen zu können. Die grundsätzliche Expression von CD276 war in den untersuchten Zellen sehr heterogen. Ebenso zeigte sich ein variables Bild bei einem Vergleich der Expression auf Transkriptebeine, Proteinebene und auf der Zelloberfläche. Unter verschiedenen Triggerfaktoren wie Hypoxie, LPS, PMA und Ionomycin, FSL-1 und Mycoplasmen zeigte sich keine Änderung der Expression von CD276 auf Tumorzelllinien und somatischen Urothelzellkulturen.

Die Auswertung der Immunfluoreszenz war erschwert durch die uneinheitlichen Auswertungsstrategien bereits publizierter Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen. In dieser Arbeit konnte kein Zusammenhang der Expression von CD276 mit dem Ausbreitungsstadium des Tumors oder seines Differenzierungsgrads gezeigt werden. Eine signifikant erhöhte Expression von CD276 zeigte sich dagegen in Proben eines Patienten, der einige Zeit zuvor eine BCG-Instillation erhalten hatte.

Weitere Studien sind nötig, um die Ergebnisse zu überprüfen und die Expression von CD276 auf Urothelkarzinomzellen zu erforschen.

6. Literaturverzeichnis

- Abol-Enein, H. 2008. Infection: is it a cause of bladder cancer? *Scand J Urol Nephrol Suppl*, 79-84.
- Ahmed, M., Cheng, M., Zhao, Q., Goldgur, Y., Cheal, S. M., Guo, H. F., Larson, S. M. & Cheung, N. K. 2015. Humanized Affinity-matured Monoclonal Antibody 8H9 Has Potent Antitumor Activity and Binds to FG Loop of Tumor Antigen B7-H3. *J Biol Chem*, 290, 30018-29.
- Ai, W., Li, H., Song, N., Li, L. & Chen, H. 2013. Optimal method to stimulate cytokine production and its use in immunotoxicity assessment. *International journal of environmental research and public health*, 10, 3834-3842.
- Aicher, W. K., Korn, M., Reitnauer, L., Maurer, F. B., Hennenlotter, J., Black, P. C., Todenhofer, T., Bedke, J. & Stenzl, A. 2021. Expression patterns of the immune checkpoint ligand CD276 in urothelial carcinoma. *BMC Urology*, 21, 60.
- Ayari, C., Bergeron, A., Larue, H., Ménard, C. & Fradet, Y. 2011. Toll-Like Receptors in Normal and Malignant Human Bladders. *Journal of Urology*, 185, 1915-1921.
- Babjuk, M., Bohle, A., Burger, M., Capoun, O., Cohen, D., Comperat, E. M., Hernandez, V., Kaasinen, E., Palou, J., Roupret, M., Van Rhijn, B. W., Shariat, S. F., Soukup, V., Sylvester, R. J. & Zigeuner, R. 2017. EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. *Eur Urol*, 71, 447-461.
- Bachawal, S. V., Jensen, K. C., Wilson, K. E., Tian, L., Lutz, A. M. & Willmann, J. K. 2015. Breast Cancer Detection by B7-H3-Targeted Ultrasound Molecular Imaging. *Cancer Res*, 75, 2501-9.
- Bäckhed, F., Meijer, L., Normark, S. & Richter-Dahlfors, A. 2002. TLR4-dependent recognition of lipopolysaccharide by epithelial cells requires sCD14. *Cellular Microbiology*, 4, 493-501.
- Bäckhed, F., Normark, S., Schweda, E. K. H., Oscarson, S. & Richter-Dahlfors, A. 2003. Structural requirements for TLR4-mediated LPS signalling: a biological role for LPS modifications. *Microbes and Infection*, 5, 1057-1063.
- Balar, A. V., Galsky, M. D., Rosenberg, J. E., Powles, T., Petrylak, D. P., Bellmunt, J., Loriot, Y., Necchi, A., Hoffman-Censits, J., Perez-Gracia, J. L., Dawson, N. A., Van Der Heijden, M. S., Dreicer, R., Srinivas, S., Retz, M. M., Joseph, R. W., Drakaki, A., Vaishampayan, U. N., Sridhar, S. S., Quinn, D. I., Durán, I., Shaffer, D. R., Eigl, B. J., Grivas, P. D., Yu, E. Y., Li, S., Kadel, E. E., Iii, Boyd, Z., Bourgon, R., Hegde, P. S., Mariathasan, S., Thåström, A., Abidoye, O. O., Fine, G. D. & Bajorin, D. F. 2017. Atezolizumab as first-line treatment in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *The Lancet*, 389, 67-76.

- Bárdos, J. I. & Ashcroft, M. 2005. Negative and positive regulation of HIF-1: A complex network. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1755, 107-120.
- Barsoum, I. B., Smallwood, C. A., Siemens, D. R. & Graham, C. H. 2014. A Mechanism of Hypoxia-Mediated Escape from Adaptive Immunity in Cancer Cells. *Cancer Research*, 74, 665-674.
- Barthel, A., Okino, S. T., Liao, J., Nakatani, K., Li, J., Whitlock, J. P., Jr. & Roth, R. A. 1999. Regulation of GLUT1 gene transcription by the serine/threonine kinase Akt1. *J Biol Chem*, 274, 20281-6.
- Bellmunt, J., De Wit, R., Vaughn, D. J., Fradet, Y., Lee, J. L., Fong, L., Vogelzang, N. J., Climent, M. A., Petrylak, D. P., Choueiri, T. K., Necchi, A., Gerritsen, W., Gurney, H., Quinn, D. I., Culine, S., Sternberg, C. N., Mai, Y., Poehlein, C. H., Perini, R. F., Bajorin, D. F. & Investigators, K.-. 2017. Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med*, 376, 1015-1026.
- Bieback, K., Kern, S., Klüter, H. & Eichler, H. 2004. Critical Parameters for the Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Blood. *STEM CELLS*, 22, 625-634.
- Boorjian, S. A., Sheinin, Y., Crispen, P. L., Farmer, S. A., Lohse, C. M., Kuntz, S. M., Leibovich, B. C., Kwon, E. D. & Frank, I. 2008. T-cell coregulatory molecule expression in urothelial cell carcinoma: clinicopathologic correlations and association with survival. *Clin Cancer Res*, 14, 4800-8.
- Brabletz, T., Kalluri, R., Nieto, M. A. & Weinberg, R. A. 2018. EMT in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 18, 128-134.
- Brennan, P., Bogillot, O., Cordier, S., Greiser, E., Schill, W., Vineis, P., Lopez-Abente, G., Tzonou, A., Chang-Claude, J., Bolm-Audorff, U., Jöckel, K.-H., Donato, F., Serra, C., Wahrendorf, J., Hours, M., T'mannetje, A., Kogevinas, M. & Boffetta, P. 2000. Cigarette smoking and bladder cancer in men: A pooled analysis of 11 case-control studies. *International Journal of Cancer*, 86, 289-294.
- Brennan, P., Bogillot, O., Greiser, E., Chang-Claude, J., Wahrendorf, J., Cordier, S., Jöckel, K. H., Lopez-Abente, G., Tzonou, A., Vineis, P., Donato, F., Hours, M., Serra, C., Bolm-Audorff, U., Schill, W., Kogevinas, M. & Boffetta, P. 2001. The contribution of cigarette smoking to bladder cancer in women (pooled European data). *Cancer Causes Control*, 12, 411-7.
- Brierley, J., Gospodarowicz, M. K. & Wittekind, C. 2017. *TNM classification of malignant tumours*, Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ, John Wiley & Sons, Inc.
- Bubenik, J., Baresova, M., Viklicky, V., Jakoubkova, J., Sainerova, H. & Donner, J. 1973. Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumour-specific antigen. *Int J Cancer*, 11, 765-73.
- Burugu, S., Dancsok, A. R. & Nielsen, T. O. 2018. Emerging targets in cancer immunotherapy. *Semin Cancer Biol*, 52, 39-52.

- Burvenich, I. J. G., Parakh, S., Lee, F. T., Guo, N., Liu, Z., Gan, H. K., Rigopoulos, A., O'keefe, G. J., Gong, S. J., Goh, Y. W., Tochon-Danguy, H., Scott, F. E., Kotsuma, M., Hirotsu, K., Senaldi, G. & Scott, A. M. 2018. Molecular imaging of T cell co-regulator factor B7-H3 with (89)Zr-DS-5573a. *Theranostics*, 8, 4199-4209.
- Cai, D., Li, J., Liu, D., Hong, S., Qiao, Q., Sun, Q., Li, P., Lyu, N., Sun, T., Xie, S., Guo, L., Ni, L., Jin, L. & Dong, C. 2020. Tumor-expressed B7-H3 mediates the inhibition of antitumor T-cell functions in ovarian cancer insensitive to PD-1 blockade therapy. *Cell Mol Immunol*, 17, 227-236.
- Castriconi, R., Dondero, A., Augugliaro, R., Cantoni, C., Carnemolla, B., Sementa, A. R., Negri, F., Conte, R., Corrias, M. V., Moretta, L., Moretta, A. & Bottino, C. 2004. Identification of 4Ig-B7-H3 as a neuroblastoma-associated molecule that exerts a protective role from an NK cell-mediated lysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 12640-12645.
- Cattan, N., Rochet, N., Mazeau, C., Zanghellini, E., Mari, B., Chauzy, C., Stora De Novion, H., Amiel, J., Lagrange, J. L., Rossi, B. & Gioanni, J. 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, 1412-7.
- Chanudet, E., Adam, P., Nicholson, A. G., Wotherspoon, A. C., Ranaldi, R., Goteri, G., Pileri, S. A., Ye, H., Müller-Hermelink, H. K. & Du, M. Q. 2007. Chlamydiae and Mycoplasma infections in pulmonary MALT lymphoma. *British Journal of Cancer*, 97, 949-951.
- Chapoval, A. I., Ni, J., Lau, J. S., Wilcox, R. A., Flies, D. B., Liu, D., Dong, H., Sica, G. L., Zhu, G., Tamada, K. & Chen, L. 2001. B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. *Nat Immunol*, 2, 269-74.
- Chaturvedi, A. K., Engels, E. A., Gilbert, E. S., Chen, B. E., Storm, H., Lynch, C. F., Hall, P., Langmark, F., Pukkala, E., Kaijser, M., Andersson, M., Fossa, S. D., Joensuu, H., Boice, J. D., Kleinerman, R. A. & Travis, L. B. 2007. Second cancers among 104,760 survivors of cervical cancer: evaluation of long-term risk. *J Natl Cancer Inst*, 99, 1634-43.
- Chaudhri, G., Hunt, N. H., Clark, I. A. & Ceredig, R. 1988. Antioxidants inhibit proliferation and cell surface expression of receptors for interleukin-2 and transferrin in T lymphocytes stimulated with phorbol myristate acetate and ionomycin. *Cellular Immunology*, 115, 204-213.
- Chen, W., Liu, P., Wang, Y., Nie, W., Li, Z., Xu, W., Li, F., Zhou, Z., Zhao, M. & Liu, H. 2013. Characterization of a Soluble B7-H3 (sB7-H3) Spliced from the Intron and Analysis of sB7-H3 in the Sera of Patients with Hepatocellular Carcinoma. *PLOS ONE*, 8, e76965.
- Chen, X., Quinn, E. M., Ni, H., Wang, J., Blankson, S., Redmond, H. P., Wang, J. H. & Feng, X. 2012. B7-H3 participates in the development of

- experimental pneumococcal meningitis by augmentation of the inflammatory response via a TLR2-dependent mechanism. *J Immunol*, 189, 347-55.
- Colley, D. G., Bustinduy, A. L., Secor, W. E. & King, C. H. 2014. Human schistosomiasis. *The Lancet*, 383, 2253-2264.
- De Abreu Costa, L., Henrique Fernandes Ottoni, M., Dos Santos, M. G., Meireles, A. B., Gomes De Almeida, V., De Fátima Pereira, W., Alves De Avelar-Freitas, B. & Eustáquio Alvim Brito-Melo, G. 2017. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Decreases Cell Proliferation and TNF- α , IFN- γ , and IL-2 Cytokines Production in Cultures of Peripheral Blood Lymphocytes. *Molecules*, 22.
- Dinneen, L. C. & Blakesley, B. C. 1973. A Generator for the Sampling Distribution of the Mann-Whitney U Statistic. *Journal of the Royal Statistical Society: Series C (Applied Statistics)*, 22, 269-273.
- Du, H., Hirabayashi, K., Ahn, S., Kren, N. P., Montgomery, S. A., Wang, X., Tiruthani, K., Mirlekar, B., Michaud, D., Greene, K., Herrera, S. G., Xu, Y., Sun, C., Chen, Y., Ma, X., Ferrone, C. R., Pylayeva-Gupta, Y., Yeh, J. J., Liu, R., Savoldo, B., Ferrone, S. & Dotti, G. 2019. Antitumor Responses in the Absence of Toxicity in Solid Tumors by Targeting B7-H3 via Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Cancer Cell*, 35, 221-237 e8.
- Eales, K. L., Hollinshead, K. E. R. & Tennant, D. A. 2016. Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. *Oncogenesis*, 5, e190-e190.
- Elliott, A. Y., Cleveland, P., Cervenka, J., Castro, A. E., Stein, N., Hakala, T. R. & Fraley, E. E. 1974. Characterization of a cell line from human transitional cell cancer of the urinary tract. *J Natl Cancer Inst*, 53, 1341-9.
- Fang, C.-W., Liao, C.-H., Wu, S.-C. & Muo, C.-H. 2018. Association of benign prostatic hyperplasia and subsequent risk of bladder cancer: an Asian population cohort study. *World Journal of Urology*, 36, 931-938.
- Fauci, J. M., Sabbatino, F., Wang, Y., Londono-Joshi, A. I., Straughn, J. M., Jr., Landen, C. N., Ferrone, S. & Buchsbaum, D. J. 2014. Monoclonal antibody-based immunotherapy of ovarian cancer: targeting ovarian cancer cells with the B7-H3-specific mAb 376.96. *Gynecol Oncol*, 132, 203-10.
- Ferlay J, E. M., Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor a, Soerjomataram I, Bray F. 2020. *Global Cancer Observatory: Cancer Today* [Online]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available: <https://gco.iarc.fr/today> [Accessed 05.08. 2021].
- Flem-Karlsen, K., Fodstad, O., Tan, M. & Nunes-Xavier, C. E. 2018. B7-H3 in Cancer - Beyond Immune Regulation. *Trends Cancer*, 4, 401-404.
- Flem-Karlsen, K., Tekle, C., Andersson, Y., Flatmark, K., Fodstad, O. & Nunes-Xavier, C. E. 2017. Immunoregulatory protein B7-H3 promotes growth and decreases sensitivity to therapy in metastatic melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res*, 30, 467-476.

- Fogh, J., Wright, W. C. & Loveless, J. D. 1977. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst*, 58, 209-14.
- Forsythe, J. A., Jiang, B. H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D. & Semenza, G. L. 1996. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*, 16, 4604-13.
- Frauwirth, K. A., Riley, J. L., Harris, M. H., Parry, R. V., Rathmell, J. C., Plas, D. R., Elstrom, R. L., June, C. H. & Thompson, C. B. 2002. The CD28 Signaling Pathway Regulates Glucose Metabolism. *Immunity*, 16, 769-777.
- Fujita, M., Into, T., Yasuda, M., Okusawa, T., Hamahira, S., Kuroki, Y., Eto, A., Nisizawa, T., Morita, M. & Shibata, K.-I. 2003. Involvement of Leucine Residues at Positions 107, 112, and 115 in a Leucine-Rich Repeat Motif of Human Toll-Like Receptor 2 in the Recognition of Diacylated Lipoproteins and Lipopeptides and *Staphylococcus aureus* Peptidoglycans. *The Journal of Immunology*, 171, 3675.
- Goldmann, E. 1907. THE GROWTH OF MALIGNANT DISEASE IN MAN AND THE LOWER ANIMALS,; WITH SPECIAL REFERENCE TO THE VASCULAR SYSTEM. *The Lancet*, 170, 1236-1240.
- Greenwald, R. J., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. 2005. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*, 23, 515-48.
- Grillo, F., Bruzzone, M., Pigozzi, S., Prosapio, S., Migliora, P., Fiocca, R. & Mastracci, L. 2017. Immunohistochemistry on old archival paraffin blocks: is there an expiry date? *Journal of Clinical Pathology*, 70, 988.
- Han, R. F. & Pan, J. G. 2006. Can intravesical bacillus Calmette-Guérin reduce recurrence in patients with superficial bladder cancer? A meta-analysis of randomized trials. *Urology*, 67, 1216-1223.
- Hashiguchi, M., Kobori, H., Ritprajak, P., Kamimura, Y., Kozono, H. & Azuma, M. 2008. Triggering receptor expressed on myeloid cell-like transcript 2 (TLT-2) is a counter-receptor for B7-H3 and enhances T cell responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 10495-10500.
- Haziot, A., Ferrero, E., Köntgen, F., Hijiya, N., Yamamoto, S., Silver, J., Stewart, C. L. & Goyert, S. M. 1996. Resistance to Endotoxin Shock and Reduced Dissemination of Gram-Negative Bacteria in CD14-Deficient Mice. *Immunity*, 4, 407-414.
- He, C. S., Liu, Y. C., Xu, Z. P., Dai, P. C., Chen, X. W. & Jin, D. H. 2016. Astragaloside IV Enhances Cisplatin Chemosensitivity in Non-Small Cell Lung Cancer Cells Through Inhibition of B7-H3. *Cell Physiol Biochem*, 40, 1221-1229.

- Huang, H., Bhat, A., Woodnutt, G. & Lappe, R. 2010. Targeting the ANGPT–TIE2 pathway in malignancy. *Nature Reviews Cancer*, 10, 575-585.
- Huang, Y., Liu, Y., Zheng, C. & Shen, C. 2017. Investigation of Cross-Contamination and Misidentification of 278 Widely Used Tumor Cell Lines. *PLOS ONE*, 12, e0170384.
- Humphrey, P. A., Moch, H., Cubilla, A. L., Ulbright, T. M. & Reuter, V. E. 2016. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part B: Prostate and Bladder Tumours. *European Urology*, 70, 106-119.
- Husain, B., Ramani, S. R., Chiang, E., Lehoux, I., Paduchuri, S., Arena, T. A., Patel, A., Wilson, B., Chan, P., Franke, Y., Wong, A. W., Lill, J. R., Turley, S. J., Gonzalez, L. C., Grogan, J. L. & Martinez-Martin, N. 2019. A Platform for Extracellular Interactome Discovery Identifies Novel Functional Binding Partners for the Immune Receptors B7-H3/CD276 and PVR/CD155. *Mol Cell Proteomics*, 18, 2310-2323.
- Ingebrigtsen, V. A., Boye, K., Tekle, C., Nesland, J. M., Flatmark, K. & Fodstad, O. 2012. B7-H3 expression in colorectal cancer: nuclear localization strongly predicts poor outcome in colon cancer. *Int J Cancer*, 131, 2528-36.
- Jiang, B., Zhang, T., Liu, F., Sun, Z., Shi, H., Hua, D. & Yang, C. 2016. The costimulatory molecule B7-H3 promotes the epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer. *Oncotarget*, 7, 31755-71.
- Jin, W. 2020. Role of JAK/STAT3 Signaling in the Regulation of Metastasis, the Transition of Cancer Stem Cells, and Chemoresistance of Cancer by Epithelial–Mesenchymal Transition. *Cells*, 9.
- Jones, R., Latinovic, R., Charlton, J. & Gulliford, M. C. 2007. Alarm symptoms in early diagnosis of cancer in primary care: cohort study using General Practice Research Database. *BMJ*, 334, 1040.
- Kang, D., Chokkalingam, A. P., Gridley, G., Nyren, O., Johansson, J. E., Adami, H. O., Silverman, D. & Hsing, A. W. 2007. Benign prostatic hyperplasia and subsequent risk of bladder cancer. *British Journal of Cancer*, 96, 1475-1479.
- Kang, F. B., Wang, L., Jia, H. C., Li, D., Li, H. J., Zhang, Y. G. & Sun, D. X. 2015. B7-H3 promotes aggression and invasion of hepatocellular carcinoma by targeting epithelial-to-mesenchymal transition via JAK2/STAT3/Slug signaling pathway. *Cancer Cell Int*, 15, 45.
- Klein, G., Vellenga, E., Fraaije, M. W., Kamps, W. A. & De Bont, E. S. J. M. 2004. The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 50, 87-100.
- Kraan, J., Van Den Broek, P., Verhoef, C., Grunhagen, D. J., Taal, W., Gratama, J. W. & Sleijfer, S. 2014. Endothelial CD276 (B7-H3) expression is

- increased in human malignancies and distinguishes between normal and tumour-derived circulating endothelial cells. *Br J Cancer*, 111, 149-56.
- Kraywinkel, K., Fiebig, J. & Schulz, G. B. 2018. Epidemiologie des Harnblasenkarzinoms in Deutschland. *Der Onkologe*, 24, 6-13.
- Kung, A. L., Wang, S., Klco, J. M., Kaelin, W. G. & Livingston, D. M. 2000. Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription. *Nature Medicine*, 6, 1335-1340.
- Langner, C., Hutterer, G., Chromecki, T., Winkelmayr, I., Rehak, P. & Zigeuner, R. 2006. pT classification, grade, and vascular invasion as prognostic indicators in urothelial carcinoma of the upper urinary tract. *Modern Pathology*, 19, 272-279.
- Larue, H., Ayari, C., Bergeron, A. & Fradet, Y. 2013. Toll-like receptors in urothelial cells--targets for cancer immunotherapy. *Nat Rev Urol*, 10, 537-45.
- Lee, Y.-H., Martin-Orozco, N., Zheng, P., Li, J., Zhang, P., Tan, H., Park, H. J., Jeong, M., Chang, S. H., Kim, B.-S., Xiong, W., Zang, W., Guo, L., Liu, Y., Dong, Z.-J., Overwijk, W. W., Hwu, P., Yi, Q., Kwak, L., Yang, Z., Mak, T. W., Li, W., Radvanyi, L. G., Ni, L., Liu, D. & Dong, C. 2017. Inhibition of the B7-H3 immune checkpoint limits tumor growth by enhancing cytotoxic lymphocyte function. *Cell research*, 27, 1034-1045.
- Leitlinienprogramm Onkologie. 2019. *S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms* [Online]. Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF. Available: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/harnblasenkarzinom/> [Accessed 07.04.2020].
- Leitner, J., Klauser, C., Pickl, W. F., Stockl, J., Majdic, O., Bardet, A. F., Kreil, D. P., Dong, C., Yamazaki, T., Zlabinger, G., Pfistershammer, K. & Steinberger, P. 2009. B7-H3 is a potent inhibitor of human T-cell activation: No evidence for B7-H3 and TREML2 interaction. *Eur J Immunol*, 39, 1754-64.
- Li, M., Zhang, G., Zhang, X., Lv, G., Wei, X., Yuan, H. & Hou, J. 2014. Overexpression of B7-H3 in CD14+ monocytes is associated with renal cell carcinoma progression. *Med Oncol*, 31, 349.
- Li, Y., Guo, G., Song, J., Cai, Z., Yang, J., Chen, Z., Wang, Y., Huang, Y. & Gao, Q. 2017. B7-H3 Promotes the Migration and Invasion of Human Bladder Cancer Cells via the PI3K/Akt/STAT3 Signaling Pathway. *J Cancer*, 8, 816-824.
- Li, Z., Liu, J., Que, L. & Tang, X. 2019. The immunoregulatory protein B7-H3 promotes aerobic glycolysis in oral squamous carcinoma via PI3K/Akt/mTOR pathway. *J Cancer*, 10, 5770-5784.
- Liberti, M. V. & Locasale, J. W. 2016. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci*, 41, 211-218.

- Lim, R., Barker, G. & Lappas, M. 2014. The TLR2 ligand FSL-1 and the TLR5 ligand Flagellin mediate pro-inflammatory and pro-labour response via MyD88/TRAF6/NF-kappaB-dependent signalling. *Am J Reprod Immunol*, 71, 401-17.
- Lim, S., Liu, H., Madeira Da Silva, L., Arora, R., Liu, Z., Phillips, J. B., Schmitt, D. C., Vu, T., Mcclellan, S., Lin, Y., Lin, W., Piazza, G. A., Fodstad, O. & Tan, M. 2016. Immunoregulatory Protein B7-H3 Reprograms Glucose Metabolism in Cancer Cells by ROS-Mediated Stabilization of HIF1alpha. *Cancer Res*, 76, 2231-42.
- Lima, L., Gaiteiro, C., Peixoto, A., Soares, J., Neves, M., Santos, L. L. & Ferreira, J. A. 2016. Reference Genes for Addressing Gene Expression of Bladder Cancer Cell Models under Hypoxia: A Step Towards Transcriptomic Studies. *PLOS ONE*, 11, e0166120.
- Limas, C., Bigler, A., Bair, R., Bernhart, P. & Reddy, P. 1993. Proliferative activity of urothelial neoplasms: comparison of BrdU incorporation, Ki67 expression, and nucleolar organiser regions. *Journal of Clinical Pathology*, 46, 159.
- Lipponen, P. K., Eskelinen, M. J. & Nordling, S. 1991. Progression and survival in transitional cell bladder cancer: a comparison of established prognostic factors, S-phase fraction and DNA ploidy. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 27, 877-881.
- Liu, F., Zhang, T., Zou, S. T., Jiang, B. & Hua, D. 2015. B7-H3 promotes cell migration and invasion through the Jak2/Stat3/MMP9 signaling pathway in colorectal cancer. *Molecular Medicine Reports*, 12, 5455-5460.
- Liu, H., Tekle, C., Chen, Y. W., Kristian, A., Zhao, Y., Zhou, M., Liu, Z., Ding, Y., Wang, B., Maelandsmo, G. M., Nesland, J. M., Fodstad, O. & Tan, M. 2011. B7-H3 silencing increases paclitaxel sensitivity by abrogating Jak2/Stat3 phosphorylation. *Mol Cancer Ther*, 10, 960-71.
- Lu, Y.-C., Yeh, W.-C. & Ohashi, P. S. 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42, 145-151.
- Luo, L., Zhu, G., Xu, H., Yao, S., Zhou, G., Zhu, Y., Tamada, K., Huang, L., Flies, A. D., Broadwater, M., Ruff, W., Van Deursen, J. M., Melero, I., Zhu, Z. & Chen, L. 2015. B7-H3 Promotes Pathogenesis of Autoimmune Disease and Inflammation by Regulating the Activity of Different T Cell Subsets. *PLoS One*, 10, e0130126.
- Ma, J., Ma, P., Zhao, C., Xue, X., Han, H., Liu, C., Tao, H., Xiu, W., Cai, J. & Zhang, M. 2016. B7-H3 as a promising target for cytotoxicity T cell in human cancer therapy. *Oncotarget*, 7, 29480-91.
- Ma, W., Ma, J., Ma, P., Lei, T., Zhao, M. & Zhang, M. 2018. Targeting immunotherapy for bladder cancer using anti-CD3x B7-H3 bispecific antibody. *Cancer Med*, 7, 5167-5177.
- Majzner, R. G., Theruvath, J. L., Nellan, A., Heitzeneder, S., Cui, Y., Mount, C. W., Rietberg, S. P., Linde, M. H., Xu, P., Rota, C., Sotillo, E., Labanieh, L.,

- Lee, D. W., Orentas, R. J., Dimitrov, D. S., Zhu, Z., Croix, B. S., Delaidelli, A., Sekunova, A., Bonvini, E., Mitra, S. S., Quezado, M. M., Majeti, R., Monje, M., Sorensen, P. H. B., Maris, J. M. & Mackall, C. L. 2019. CAR T Cells Targeting B7-H3, a Pan-Cancer Antigen, Demonstrate Potent Preclinical Activity Against Pediatric Solid Tumors and Brain Tumors. *Clin Cancer Res*, 25, 2560-2574.
- Malmstrom, P. U., Sylvester, R. J., Crawford, D. E., Friedrich, M., Krege, S., Rintala, E., Solsona, E., Di Stasi, S. M. & Witjes, J. A. 2009. An individual patient data meta-analysis of the long-term outcome of randomised studies comparing intravesical mitomycin C versus bacillus Calmette-Guerin for non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol*, 56, 247-56.
- Martiny-Baron, G. & Marmé, D. 1995. VEGF-mediated tumour angiogenesis: a new target for cancer therapy. *Current Opinion in Biotechnology*, 6, 675-680.
- Mastro, A. M. & Smith, M. C. 1983. Calcium-dependent activation of lymphocytes by ionophore, A23187, and a phorbol ester tumor promoter. *Journal of Cellular Physiology*, 116, 51-56.
- Mcdonald, O. G., Li, X., Saunders, T., Tryggvadottir, R., Mentch, S. J., Warmoes, M. O., Word, A. E., Carrer, A., Salz, T. H., Natsume, S., Stauffer, K. M., Makohon-Moore, A., Zhong, Y., Wu, H., Wellen, K. E., Locasale, J. W., Iacobuzio-Donahue, C. A. & Feinberg, A. P. 2017. Epigenomic reprogramming during pancreatic cancer progression links anabolic glucose metabolism to distant metastasis. *Nat Genet*, 49, 367-376.
- Nagai, Y., Akashi, S., Nagafuku, M., Ogata, M., Iwakura, Y., Akira, S., Kitamura, T., Kosugi, A., Kimoto, M. & Miyake, K. 2002. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nature Immunology*, 3, 667-672.
- Nayak, S. K., O'toole, C. & Price, Z. H. 1977. A cell line from an anaplastic transitional cell carcinoma of human urinary bladder. *Br J Cancer*, 35, 142-51.
- Ni, L. & Dong, C. 2017. New B7 Family Checkpoints in Human Cancers. *Mol Cancer Ther*, 16, 1203-1211.
- Nunes-Xavier, C. E., Karlsen, K. F., Tekle, C., Pedersen, C., Øyjord, T., Hongisto, V., Nesland, J. M., Tan, M., Sahlberg, K. K. & Fodstad, Ø. 2016. Decreased expression of B7-H3 reduces the glycolytic capacity and sensitizes breast cancer cells to AKT/mTOR inhibitors. *Oncotarget*, 7.
- Nygren, M. K., Tekle, C., Ingebrigtsen, V. A., Makela, R., Krohn, M., Aure, M. R., Nunes-Xavier, C. E., Perala, M., Tramm, T., Alsner, J., Overgaard, J., Nesland, J. M., Borgen, E., Borresen-Dale, A. L., Fodstad, O., Sahlberg, K. K. & Leivonen, S. K. 2014. Identifying microRNAs regulating B7-H3 in breast cancer: the clinical impact of microRNA-29c. *Br J Cancer*, 110, 2072-80.
- Okusawa, T., Fujita, M., Nakamura, J.-I., Into, T., Yasuda, M., Yoshimura, A., Hara, Y., Hasebe, A., Golenbock Douglas, T., Morita, M., Kuroki, Y.,

- Ogawa, T. & Shibata, K.-I. 2004. Relationship between Structures and Biological Activities of Mycoplasmal Diacylated Lipopeptides and Their Recognition by Toll-Like Receptors 2 and 6. *Infection and Immunity*, 72, 1657-1665.
- Olbert, P. J., Kesch, C., Henrici, M., Subtil, F. S., Honacker, A., Hegele, A., Hofmann, R. & Hänze, J. 2015. TLR4- and TLR9-dependent effects on cytokines, cell viability, and invasion in human bladder cancer cells¹These authors contributed equally to this work. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 33, 110.e19-110.e27.
- Osaki, M., Oshimura, M. & Ito, H. 2004. PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*, 9, 667-676.
- Pagano, J. S., Blaser, M., Buendia, M. A., Damania, B., Khalili, K., Raab-Traub, N. & Roizman, B. 2004. Infectious agents and cancer: criteria for a causal relation. *Semin Cancer Biol*, 14, 453-71.
- Pehlivan, M., Pehlivan, S., Onay, H., Koyuncuoglu, M. & Kirkali, Z. 2005. Can mycoplasma-mediated oncogenesis be responsible for formation of conventional renal cell carcinoma? *Urology*, 65, 411-414.
- Picarda, E., Ohaegbulam, K. C. & Zang, X. 2016. Molecular Pathways: Targeting B7-H3 (CD276) for Human Cancer Immunotherapy. *Clin Cancer Res*, 22, 3425-3431.
- Pinto-Leite, R., Carreira, I., Melo, J., Ferreira, S. I., Ribeiro, I., Ferreira, J., Filipe, M., Bernardo, C., Arantes-Rodrigues, R., Oliveira, P. & Santos, L. 2014. Genomic characterization of three urinary bladder cancer cell lines: understanding genomic types of urinary bladder cancer. *Tumor Biology*, 35, 4599-4617.
- Powderly, J., Cote, G., Flaherty, K., Szmulewitz, R. Z., Ribas, A., Weber, J., Loo, D., Baughman, J., Chen, F., Moore, P., Bonvini, E., Vasselli, J., Wigginton, J., Cohen, R., Burris, H. & Chmielowski, B. 2015. Interim results of an ongoing Phase I, dose escalation study of MGA271 (Fc-optimized humanized anti-B7-H3 monoclonal antibody) in patients with refractory B7-H3-expressing neoplasms or neoplasms whose vasculature expresses B7-H3. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 3, O8.
- Qian, Y., Deng, J., Geng, L., Xie, H., Jiang, G., Zhou, L., Wang, Y., Yin, S., Feng, X., Liu, J., Ye, Z. & Zheng, S. 2008. TLR4 Signaling Induces B7-H1 Expression Through MAPK Pathways in Bladder Cancer Cells. *Cancer Investigation*, 26, 816-821.
- Rasband, W. S. 1997-2018. ImageJ. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.
- Rasheed, S., Gardner, M. B., Rongey, R. W., Nelson-Rees, W. A. & Arnstein, P. 1977. Human bladder carcinoma: characterization of two new tumor cell lines and search for tumor viruses. *J Natl Cancer Inst*, 58, 881-90.
- Ratcliffe, P. J., Pugh, C. W. & Maxwell, P. H. 2000. Targeting tumors through the HIF system. *Nature Medicine*, 6, 1315-1316.

- Redelman-Sidi, G., Glickman, M. S. & Bochner, B. H. 2014. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer--a current perspective. *Nat Rev Urol*, 11, 153-62.
- Reulen, R. C., Kellen, E., Buntinx, F., Brinkman, M. & Zeegers, M. P. 2008. A meta-analysis on the association between bladder cancer and occupation. *Scand J Urol Nephrol Suppl*, 64-78.
- Robert-Koch-Institut 2019. Krebs in Deutschland 2015/2016. Robert-Koch-Institut; Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
- Santos, N. C., Figueira-Coelho, J., Saldanha, C. & Martins-Silva, J. 2002. Biochemical, biophysical and haemorheological effects of dimethylsulphoxide on human erythrocyte calcium loading. *Cell Calcium*, 31, 183-188.
- Schmiemann, G., Kniehl, E., Gebhardt, K., Matejczyk, M. M. & Hummers-Pradier, E. 2010. Diagnose des Harnwegsinfekts. *Dtsch Arztebl International*, 107, 361-367.
- Seaman, S., Stevens, J., Yang, M. Y., Logsdon, D., Graff-Cherry, C. & St Croix, B. 2007. Genes that distinguish physiological and pathological angiogenesis. *Cancer Cell*, 11, 539-54.
- Seaman, S., Zhu, Z., Saha, S., Zhang, X. M., Yang, M. Y., Hilton, M. B., Morris, K., Szot, C., Morris, H., Swing, D. A., Tessarollo, L., Smith, S. W., Degrado, S., Borkin, D., Jain, N., Scheiermann, J., Feng, Y., Wang, Y., Li, J., Welsch, D., Decrescenzo, G., Chaudhary, A., Zudaire, E., Klarmann, K. D., Keller, J. R., Dimitrov, D. S. & St Croix, B. 2017. Eradication of Tumors through Simultaneous Ablation of CD276/B7-H3-Positive Tumor Cells and Tumor Vasculature. *Cancer Cell*, 31, 501-515 e8.
- Senger, D. R., Van De Water, L., Brown, L. F., Nagy, J. A., Yeo, K.-T., Yeo, T.-K., Berse, B., Jackman, R. W., Dvorak, A. M. & Dvorak, H. F. 1993. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer and Metastasis Reviews*, 12, 303-324.
- Shephard, E. A., Stapley, S., Neal, R. D., Rose, P., Walter, F. M. & Hamilton, W. T. 2012. Clinical features of bladder cancer in primary care. *Br J Gen Pract*, 62, e598-604.
- Shi, T., Ma, Y., Cao, L., Zhan, S., Xu, Y., Fu, F., Liu, C., Zhang, G., Wang, Z., Wang, R., Lu, H., Lu, B., Chen, W. & Zhang, X. 2019. B7-H3 promotes aerobic glycolysis and chemoresistance in colorectal cancer cells by regulating HK2. *Cell Death Dis*, 10, 308.
- Shibata, K., Hasebe, A., Into, T., Yamada, M. & Watanabe, T. 2000. The N-terminal lipopeptide of a 44-kDa membrane-bound lipoprotein of *Mycoplasma salivarium* is responsible for the expression of intercellular adhesion molecule-1 on the cell surface of normal human gingival fibroblasts. *J Immunol*, 165, 6538-44.

- Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K. & Kimoto, M. 1999. MD-2, a Molecule that Confers Lipopolysaccharide Responsiveness on Toll-like Receptor 4. *Journal of Experimental Medicine*, 189, 1777-1782.
- Shimizu, T., Yokota, S., Takahashi, S., Kunishima, Y., Takeyama, K., Masumori, N., Takahashi, A., Matsukawa, M., Itoh, N., Tsukamoto, T. & Fujii, N. 2004. Membrane-anchored CD14 is important for induction of interleukin-8 by lipopolysaccharide and peptidoglycan in uroepithelial cells. *Clin Diagn Lab Immunol*, 11, 969-76.
- Siegemund, S. & Sauer, K. 2012. Balancing pro- and anti-inflammatory TLR4 signaling. *Nature Immunology*, 13, 1031-1033.
- Son, Y., Kwon, S. M. & Cho, J. Y. 2019. CD276 (B7-H3) Maintains Proliferation and Regulates Differentiation in Angiogenic Function in Late Endothelial Progenitor Cells. *Stem Cells*, 37, 382-394.
- Souweidane, M. M., Kramer, K., Pandit-Taskar, N., Zanzonico, P., Zhou, Z., Donzelli, M., Lyashchenko, S. K., Haque, S., Thakur, S. B., Cheung, N.-K. V., Larson, S. M. & Dunkel, I. J. 2017. A phase I study of convection enhanced delivery (CED) of 124I-8H9 radio-labeled monoclonal antibody in children with diffuse intrinsic pontine glioma (DIPG). *Journal of Clinical Oncology*, 35, 2010-2010.
- Steinberger, P., Majdic, O., Derdak, S. V., Pfistershammer, K., Kirchberger, S., Klauser, C., Zlabinger, G., Pickl, W. F., Stockl, J. & Knapp, W. 2004. Molecular characterization of human 4Ig-B7-H3, a member of the B7 family with four Ig-like domains. *J Immunol*, 172, 2352-9.
- Suh, W. K., Gajewska, B. U., Okada, H., Gronski, M. A., Bertram, E. M., Dawicki, W., Duncan, G. S., Bukczynski, J., Plyte, S., Elia, A., Wakeham, A., Itie, A., Chung, S., Da Costa, J., Arya, S., Horan, T., Campbell, P., Gaida, K., Ohashi, P. S., Watts, T. H., Yoshinaga, S. K., Bray, M. R., Jordana, M. & Mak, T. W. 2003. The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses. *Nat Immunol*, 4, 899-906.
- Suh, W. K., Wang, S. X., Jheon, A. H., Moreno, L., Yoshinaga, S. K., Ganss, B., Sodek, J., Grynblas, M. D. & Mak, T. W. 2004. The immune regulatory protein B7-H3 promotes osteoblast differentiation and bone mineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 12969-73.
- Sun, J., Guo, Y. D., Li, X. N., Zhang, Y. Q., Gu, L., Wu, P. P., Bai, G. H. & Xiao, Y. 2014. B7-H3 expression in breast cancer and upregulation of VEGF through gene silence. *Oncotargets Ther*, 7, 1979-86.
- Sun, M., Richards, S., Prasad, D. V., Mai, X. M., Rudensky, A. & Dong, C. 2002. Characterization of mouse and human B7-H3 genes. *J Immunol*, 168, 6294-7.
- Taylor-Robinson, D. & Horner, P. J. 2001. The role of *Mycoplasma genitalium* in non-gonococcal urethritis. *Sexually Transmitted Infections*, 77, 229.

- Tekle, C., Nygren, M. K., Chen, Y. W., Dybsjord, I., Nesland, J. M., Maeldandsmo, G. M. & Fodstad, O. 2012. B7-H3 contributes to the metastatic capacity of melanoma cells by modulation of known metastasis-associated genes. *Int J Cancer*, 130, 2282-90.
- ThermoFisherScientific. 2018. *Normalization in western blotting to obtain relative quantitation* [Online]. ThermoFisher Scientific. Available: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/Technical-Notes/ibright-normalization-western-blotting-relative-quantitation-technical-note.pdf> [Accessed 05.07. 2021].
- Tonini, T., Rossi, F. & Claudio, P. P. 2003. Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene*, 22, 6549-6556.
- Tran, C. N., Thacker, S. G., Louie, D. M., Oliver, J., White, P. T., Endres, J. L., Urquhart, A. G., Chung, K. C. & Fox, D. A. 2008. Interactions of T cells with fibroblast-like synoviocytes: role of the B7 family costimulatory ligand B7-H3. *J Immunol*, 180, 2989-98.
- Truneh, A., Albert, F., Golstein, P. & Schmitt-Verhulst, A.-M. 1985. Early steps of lymphocyte activation bypassed by synergy between calcium ionophores and phorbol ester. *Nature*, 313, 318-320.
- Tsai, S., Wear, D. J., Shih, J. W. & Lo, S. C. 1995. Mycoplasmas and oncogenesis: persistent infection and multistage malignant transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 10197.
- Veenstra, R. G., Flynn, R., Kreymborg, K., Mcdonald-Hyman, C., Saha, A., Taylor, P. A., Osborn, M. J., Panoskaltsis-Mortari, A., Schmitt-Graeff, A., Lieberknecht, E., Murphy, W. J., Serody, J. S., Munn, D. H., Freeman, G. J., Allison, J. P., Mak, T. W., Van Den Brink, M., Zeiser, R. & Blazar, B. R. 2015. B7-H3 expression in donor T cells and host cells negatively regulates acute graft-versus-host disease lethality. *Blood*, 125, 3335-46.
- Verheijen, M., Lienhard, M., Schrooders, Y., Clayton, O., Nudischer, R., Boerno, S., Timmermann, B., Selevsek, N., Schlapbach, R., Gmuender, H., Gotta, S., Geraedts, J., Herwig, R., Kleinjans, J. & Caiment, F. 2019. DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro. *Sci Rep*, 9, 4641.
- Vermeulen, S. H., Hanum, N., Grotenhuis, A. J., Castaño-Vinyals, G., Van Der Heijden, A. G., Aben, K. K., Mysorekar, I. U. & Kiemeny, L. A. 2015. Recurrent urinary tract infection and risk of bladder cancer in the Nijmegen bladder cancer study. *British Journal of Cancer*, 112, 594-600.
- Vigdorovich, V., Ramagopal, U. A., Lazar-Molnar, E., Sylvestre, E., Lee, J. S., Hofmeyer, K. A., Zang, X., Nathenson, S. G. & Almo, S. C. 2013. Structure and T cell inhibition properties of B7 family member, B7-H3. *Structure*, 21, 707-17.
- Wang, G., Wu, Z., Wang, Y., Li, X., Zhang, G. & Hou, J. 2016a. Therapy to target renal cell carcinoma using 131I-labeled B7-H3 monoclonal antibody. *Oncotarget*, 7, 24888-98.

- Wang, J.-Z., Zhu, W., Han, J., Yang, X., Zhou, R., Lu, H.-C., Yu, H., Yuan, W.-B., Li, P.-C., Tao, J., Lu, Q., Wei, J.-F. & Yang, H. 2021. The role of the HIF-1 α /ALYREF/PKM2 axis in glycolysis and tumorigenesis of bladder cancer. *Cancer Communications*, 41, 560-575.
- Wang, L., Kang, F. B., Sun, N., Wang, J., Chen, W., Li, D. & Shan, B. E. 2016b. The tumor suppressor miR-124 inhibits cell proliferation and invasion by targeting B7-H3 in osteosarcoma. *Tumour Biol*, 37, 14939-14947.
- Wang, Y. H., Cao, Y. W., Yang, X. C., Niu, H. T., Sun, L. J., Wang, X. S. & Liu, J. 2014. Effect of TLR4 and B7-H1 on immune escape of urothelial bladder cancer and its clinical significance. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15, 1321-6.
- Wei, X., Li, Z., Zhang, G., Yuan, H., Lv, J., Jiang, Y., Zhang, W., Huang, Y. & Hou, J. 2014. B7-H3 Promoted Sperm Motility in Humans. *Urology*, 83, 324-330.
- Wilson, K. E., Bachawal, S. V. & Willmann, J. K. 2018. Intraoperative Resection Guidance with Photoacoustic and Fluorescence Molecular Imaging Using an Anti-B7-H3 Antibody-Indocyanine Green Dual Contrast Agent. *Clin Cancer Res*, 24, 3572-3582.
- Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J. & Mathison, J. C. 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 249, 1431.
- Wu, D., Zhang, Z., Pan, H., Fan, Y., Qu, P. & Zhou, J. 2015. Upregulation of the B7/CD28 family member B7-H3 in bladder cancer. *Oncol Lett*, 9, 1420-1424.
- Xie, C., Liu, D., Chen, Q., Yang, C., Wang, B. & Wu, H. 2016. Soluble B7-H3 promotes the invasion and metastasis of pancreatic carcinoma cells through the TLR4/NF-kappaB pathway. *Sci Rep*, 6, 27528.
- Xu, H., Cheung, I. Y., Guo, H. F. & Cheung, N. K. 2009. MicroRNA miR-29 modulates expression of immunoinhibitory molecule B7-H3: potential implications for immune based therapy of human solid tumors. *Cancer Res*, 69, 6275-81.
- Xu, L., Ding, X., Tan, H. & Qian, J. 2013. Correlation between B7-H3 expression and matrix metalloproteinases 2 expression in pancreatic cancer. *Cancer Cell Int*, 13, 81.
- Xu, L., Zhang, G., Zhou, Y., Chen, Y., Xu, W., Wu, S. & Zhang, X. 2011. Stimulation of B7-H3 (CD276) directs the differentiation of human marrow stromal cells to osteoblasts. *Immunobiology*, 216, 1311-7.
- Xu, Z., Wang, L., Tian, J., Man, H., Li, P. & Shan, B. 2018a. High expression of B7-H3 and CD163 in cancer tissues indicates malignant clinicopathological status and poor prognosis of patients with urothelial cell carcinoma of the bladder. *Oncol Lett*, 15, 6519-6526.
- Xu, Z. L., Zhang, Y., Wang, L., Li, F., Man, H. W., Li, P. F. & Shan, B. E. 2018b. B7H3 promotes malignant progression of muscle-invasive bladder cancer. *Oncol Rep*, 40, 2722-2733.

- Xylinas, E., Kluth, L. A., Rieken, M., Karakiewicz, P. I., Lotan, Y. & Shariat, S. F. 2014a. Urine markers for detection and surveillance of bladder cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 32, 222-229.
- Xylinas, E., Robinson, B. D., Kluth, L. A., Volkmer, B. G., Hautmann, R., Kufer, R., Zerbib, M., Kwon, E., Thompson, R. H., Boorjian, S. A. & Shariat, S. F. 2014b. Association of T-cell co-regulatory protein expression with clinical outcomes following radical cystectomy for urothelial carcinoma of the bladder. *Eur J Surg Oncol*, 40, 121-7.
- Ye, Z., Zheng, Z., Li, X., Zhu, Y., Zhong, Z., Peng, L. & Wu, Y. 2016. B7-H3 Overexpression Predicts Poor Survival of Cancer Patients: A Meta-Analysis. *Cell Physiol Biochem*, 39, 1568-80.
- Yi, K. H. & Chen, L. 2009. Fine tuning the immune response through B7-H3 and B7-H4. *Immunol Rev*, 229, 145-51.
- Yonesaka, K., Haratani, K., Takamura, S., Sakai, H., Kato, R., Takegawa, N., Takahama, T., Tanaka, K., Hayashi, H., Takeda, M., Kato, S., Maenishi, O., Sakai, K., Chiba, Y., Okabe, T., Kudo, K., Hasegawa, Y., Kaneda, H., Yamato, M., Hirotsu, K., Miyazawa, M., Nishio, K. & Nakagawa, K. 2018. B7-H3 Negatively Modulates CTL-Mediated Cancer Immunity. *Clin Cancer Res*, 24, 2653-2664.
- Zeegers, M. P., Swaen, G. M., Kant, I., Goldbohm, R. A. & Van Den Brandt, P. A. 2001. Occupational risk factors for male bladder cancer: results from a population based case cohort study in the Netherlands. *Occup Environ Med*, 58, 590-6.
- Zhang, G., Hou, J., Shi, J., Yu, G., Lu, B. & Zhang, X. 2008. Soluble CD276 (B7-H3) is released from monocytes, dendritic cells and activated T cells and is detectable in normal human serum. *Immunology*, 123, 538-546.
- Zhang, G., Wang, J., Kelly, J., Gu, G., Hou, J., Zhou, Y., Redmond, H. P., Wang, J. H. & Zhang, X. 2010. B7-H3 augments the inflammatory response and is associated with human sepsis. *J Immunol*, 185, 3677-84.
- Zhang, J., Liu, L., Han, S., Li, Y., Qian, Q., Zhang, Q., Zhang, H., Yang, Z. & Zhang, Y. 2017a. B7-H3 is related to tumor progression in ovarian cancer. *Oncol Rep*, 38, 2426-2434.
- Zhang, P., Chen, Z., Ning, K., Jin, J. & Han, X. 2017b. Inhibition of B7-H3 reverses oxaliplatin resistance in human colorectal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 490, 1132-1138.
- Zhang, P., Yu, S., Li, H., Liu, C., Li, J., Lin, W., Gao, A., Wang, L., Gao, W. & Sun, Y. 2015a. ILT4 drives B7-H3 expression via PI3K/AKT/mTOR signalling and ILT4/B7-H3 co-expression correlates with poor prognosis in non-small cell lung cancer. *FEBS Lett*, 589, 2248-56.
- Zhang, S., Tsai, S. & Lo, S.-C. 2006. Alteration of gene expression profiles during mycoplasma-induced malignant cell transformation. *BMC Cancer*, 6, 116.

- Zhang, T., Jiang, B., Zou, S. T., Liu, F. & Hua, D. 2015b. Overexpression of B7-H3 augments anti-apoptosis of colorectal cancer cells by Jak2-STAT3. *World J Gastroenterol*, 21, 1804-13.
- Zhang, X., Ji, J., Zhang, G., Fang, C., Jiang, F., Ma, S. & Hou, J. 2017c. Expression and significance of B7-H3 and Tie-2 in the tumor vasculature of clear cell renal carcinoma. *Oncotargets Ther*, 10, 5417-5424.
- Zhao, J., Lei, T., Xu, C., Li, H., Ma, W., Yang, Y., Fan, S. & Liu, Y. 2013. MicroRNA-187, down-regulated in clear cell renal cell carcinoma and associated with lower survival, inhibits cell growth and migration through targeting B7-H3. *Biochem Biophys Res Commun*, 438, 439-44.
- Zhou, W.-T. & Jin, W.-L. 2021. B7-H3/CD276: An Emerging Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 12, 2912.
- Zhou, Y. H., Chen, Y. J., Ma, Z. Y., Xu, L., Wang, Q., Zhang, G. B., Xie, F., Ge, Y., Wang, X. F. & Zhang, X. G. 2007. 4IgB7-H3 is the major isoform expressed on immunocytes as well as malignant cells. *Tissue Antigens*, 70, 96-104.
- Zhu, X. W., Wang, J., Zhu, M. X., Wang, Y. F., Yang, S. Y. & Ke, X. Y. 2019. MicroRNA-506 inhibits the proliferation and invasion of mantle cell lymphoma cells by targeting B7H3. *Biochem Biophys Res Commun*, 508, 1067-1073.
- Zuiverloon, T. C. M., De Jong, F. C., Costello, J. C. & Theodorescu, D. 2018. Systematic Review: Characteristics and Preclinical Uses of Bladder Cancer Cell Lines. *Bladder Cancer*, 4, 169-183.
- Zuo, J., Wang, B., Long, M., Gao, Z., Zhang, Z., Wang, H., Wang, X., Li, R., Dong, K. & Zhang, H. 2018. The type 1 transmembrane glycoprotein B7-H3 interacts with the glycolytic enzyme ENO1 to promote malignancy and glycolysis in HeLa cells. *FEBS Lett*, 592, 2476-2488.
- Zuo, L. L., Wu, Y. M. & You, X. X. 2009. Mycoplasma lipoproteins and Toll-like receptors. *J Zhejiang Univ Sci B*, 10, 67-76.

7. Anhang

Zelllinie/ -kultur	Deskriptive Statistik der mRNA-Expression von CD276		
	<i>N</i>	<i>M (SD)</i>	<i>Mdn</i>
253J	6	.26 (.19)	.20
5637	6	.18 (.09)	.14
Cal-29	6	.13 (.05)	.16
T24	6	.10 (.10)	.05
TCC	6	.08 (.03)	.07
HT1197	6	.33 (.10)	.32
Somatische Urothelzellkulturen	4	.21 (.08)	.25

Tabelle 24: mRNA-Expression von CD276 der unterschiedlichen Zelllinien und somatischen Urothelzellkulturen

Zelllinie/ -kultur	Deskriptive Statistik der Protein-Expression von CD276		
	<i>N</i>	<i>M (SD)</i>	<i>Mdn</i>
253J	4	11.26 (.77)	11.22
5637	4	12.19 (.89)	12.17
Cal-29	4	11.52 (1.00)	11.56
T24	4	9.90 (1.85)	9.95
TCC	4	11.67 (.69)	11.65
HT1197	4	12.93 (.22)	12.94
Somatische Urothelzellkulturen	4	10.90 (1.81)	10.91

Tabelle 25: Protein-Expression von CD276 der unterschiedlichen Zelllinien und somatischen Urothelzellkulturen

Anhang

Deskriptive Statistik der Protein-Expression von CD276 auf der Zelloberfläche

Zelllinie/ -kultur	N	M (SD)
253J	2	8.69 (.81)
5637	2	9.61 (.03)
Cal-29	2	9.49 (.15)
T24	2	8.17 (.07)
TCC	2	9.58 (.65)
HT1197	2	9.23 (.10)
Somatische Urothelzellkultur HL19/5	2	8.33 (.29)

Table 26: Protein-Expression von CD276 auf der Zelloberfläche der unterschiedlichen Zelllinien und somatischen Urothelzellkulturen.

Deskriptive Statistik der mRNA-Expression von CD276

Versuch	N	M (SD)	Mdn
LPS	20	.21 (.13)	.20
Kontrolle_LPS	20	.19 (.12)	.18
Hypoxie	20	.20 (.11)	.18
Kontrolle_Hypoxie	20	.18 (.13)	.13

Table 27: mRNA-Expression von CD276 nach Stimulationen mit LPS und Hypoxie für alle untersuchten Zelllinien und -kulturen

Deskriptive Statistik der Proteinexpression von CD276

Versuch	N	M (SD)	Mdn
LPS	14	11.51 (1.31)	11.44
Kontrolle nach 24h (für LPS)	14	11.52 (1.32)	11.63
Hypoxie	14	11.46 (1.58)	11.86
Kontrolle nach 72h (für Hypoxie)	14	11.45 (1.47)	11.88

Table 28: Proteinexpression von CD276 nach Stimulationen mit LPS und Hypoxie für alle untersuchten Tumorzelllinien und somatischen Urothelzellkulturen

Anhang

Versuch	Deskriptive Statistik der Expression von CD276 auf der Zelloberfläche		
	<i>N</i>	<i>M (SD)</i>	<i>Mdn</i>
LPS	7	9.01 (.55)	9.26
Kontrolle nach 24h (für LPS)	7	9.04 (.52)	9.26
Hypoxie	7	8.91 (.86)	9.10
Kontrolle nach 72h (für Hypoxie)	7	8.99 (.82)	9.16

Tabelle 29: Proteinexpression von CD276 an der Zelloberfläche nach Stimulationen mit LPS und Hypoxie für alle untersuchten Tumorzelllinien und somatischen Urothelzellkulturen

Zelllinie	Versuchsteil	Deskriptive Statistik	
		<i>M (SD)</i>	<i>Mdn</i>
Tumorzellen insgesamt	LPS	9.10 (.54)	9.29
	Kontrolle_LPS	9.13 (.52)	9.28
	Hypoxie	9.05 (.84)	9.27
	Kontrolle_Hypoxie	9.13 (.79)	9.38

Jeweils N = 6

Tabelle 30: Expression von CD276 unter Stimulation mit LPS und Hypoxie an der Zelloberfläche für die Tumorzelllinien insgesamt

Anhang

Zelllinie	Versuch	Deskriptive Statistik
		x
BL18/23	LPS	.29
	Kontrolle_LPS	.25
	Hypoxie	.24
	Kontrolle_Hypoxie	.25
HL19/3	LPS	.19
	Kontrolle_LPS	.24
	Hypoxie	.24
	Kontrolle_Hypoxie	.25

Jeweils $N = 1$

Tabelle 31: mRNA-Expression von CD276 nach Stimulationen mit LPS und Hypoxie für die somatischen Urothelzellkulturen

Versuch	Deskriptive Statistik der mRNA-Expression von CD276		
	N	M (SD)	Mdn
LPS	18	.21 (.13)	.20
Kontrolle nach 24h (für LPS)	18	.18 (.13)	.15
Hypoxie	18	.21 (.11)	.18
Kontrolle nach 72h (für Hypoxie)	18	.18 (.14)	.13

Tabelle 32: mRNA-Expression von CD276 nach Stimulationen mit LPS und Hypoxie für alle untersuchten Tumorzelllinien

Versuch	Deskriptive Statistik der Protein-Expression von CD276		
	N	M (SD)	Mdn
LPS	12	11.59 (1.27)	11.44
Kontrolle nach 24h (für LPS)	12	11.57 (1.27)	11.63
Hypoxie	12	11.61 (1.45)	11.86
Kontrolle nach 72h (für Hypoxie)	12	11.59 (1.41)	11.88

Tabelle 33: Proteinexpression von CD276 nach Stimulationen mit LPS und Hypoxie für alle untersuchten Tumorzelllinien

Anhang

Zelllinie/ -kultur	Versuch	Deskriptive Statistik
		<i>M (SD)</i>
253J	LPS	11.61 (.57)
	Kontrolle_LPS	11.22 (.87)
	Hypoxie	11.40 (.86)
	Kontrolle_Hypoxie	11.30 (.72)
5637	LPS	12.08 (1.29)
	Kontrolle_LPS	12.21 (1.11)
	Hypoxie	12.15 (.97)
	Kontrolle_Hypoxie	12.17 (.75)
Cal-29	LPS	11.22 (.65)
	Kontrolle_LPS	11.49 (1.30)
	Hypoxie	11.28 (1.79)
	Kontrolle_Hypoxie	11.56 (1.15)
T24	LPS	9.82 (1.84)
	Kontrolle_LPS	9.95 (1.82)
	Hypoxie	9.91 (2.18)
	Kontrolle_Hypoxie	9.85 (2.64)
TCC	LPS	11.76 (.81)
	Kontrolle_LPS	11.65 (.81)
	Hypoxie	11.95 (1,08)
	Kontrolle_Hypoxie	11,70 (.88)
HT1197	LPS	13.04 (.26)
	Kontrolle_LPS	12.84 (2.00)
	Hypoxie	12.96 (.08)
	Kontrolle_Hypoxie	12.93 (.31)
BL18/23	LPS	$x = 9.60$
	Kontrolle_LPS	$x = 9.63$

Anhang

	Hypoxie	$x = 8.62$
	Kontrolle_Hypoxie	$x = 9.08$
HL19/3	LPS	$x = 12.43$
	Kontrolle_LPS	$x = 12.71$
	Hypoxie	$x = 12.48$
	Kontrolle_Hypoxie	$x = 12.19$

Jeweils N = 2 für die Tumorzelllinien

Jeweils N = 1 für die somatischen Urothelzelllinien BL18/23 und HL19/3

Tabelle 34: Proteinexpression von CD276 unter Stimulation mit LPS für die einzelnen Zelllinien und somatischen Urothelzellkulturen

Zelllinie/ -kultur	Versuch	Deskriptive Statistik
		x
253J	LPS	9.16
	Kontrolle_LPS	9.26
	Hypoxie	8.03
	Kontrolle_Hypoxie	8.11
5637	LPS	9.35
	Kontrolle_LPS	9.59
	Hypoxie	9.44
	Kontrolle_Hypoxie	9.64
Cal-29	LPS	9.48
	Kontrolle_LPS	9.39
	Hypoxie	9.69
	Kontrolle_Hypoxie	9.60
T24	LPS	8.02
	Kontrolle_LPS	8.12
	Hypoxie	8.04
	Kontrolle_Hypoxie	8.23

Anhang

TCC	LPS	9.26
	Kontrolle_LPS	9.11
	Hypoxie	10.01
	Kontrolle_Hypoxie	10.04
HT1197	LPS	9.32
	Kontrolle_LPS	9.30
	Hypoxie	9.10
	Kontrolle_Hypoxie	9.16
HL19/5	LPS	8.47
	Kontrolle_LPS	8.53
	Hypoxie	8.05
	Kontrolle_Hypoxie	8.12

Jeweils N = 1 für alle Tumorzelllinien und somatischen Urothelzellkulturen

Tabelle 35: Proteinexpression von CD276 an der Zelloberfläche unter Stimulation mit LPS für die einzelnen Zelllinien und somatischen Urothelzellkulturen

Zelllinie/ -kultur	Versuch	Deskriptive Statistik
		Messwert (x)
253J	PMA und Ionomycin	.297
	DMSO-Kontrolle	.277
	Kontrolle	.045
5637	PMA und Ionomycin	.288
	DMSO-Kontrolle	.279
	Kontrolle	.194
Cal-29	PMA und Ionomycin	.111
	DMSO-Kontrolle	.238
	Kontrolle	.218
T24	PMA und Ionomycin	.009
	DMSO-Kontrolle	.022

Anhang

	Kontrolle	.025
TCC	PMA und Ionomycin	.135
	DMSO-Kontrolle	.144
	Kontrolle	.127
HT1197	PMA und Ionomycin	.314
	DMSO-Kontrolle	.284
	Kontrolle	.252

Jeweils N = 1

Tabelle 36: mRNA-Expression von CD276 unter Stimulation mit PMA und Ionomycin für die einzelnen Zelllinien

Zelllinie	Mediumzusatz	Versuch	Deskriptive Statistik
			x
253J	FCS	FSL-1	.09
		Kontrolle	.13
	BSA	FSL-1	.09
		Kontrolle	.10
T24	FCS	FSL-1	.07
		Kontrolle	.09
	BSA	FSL-1	.09
		Kontrolle	.11

Jeweils N = 1

Tabelle 37: mRNA-Expression von CD276 unter Stimulation mit FSL-1 für die Zelllinien 253J und T24

Anhang

Zelllinie	Versuch	Deskriptive Statistik
		x
253J	FSL-1	12.74
	Kontrolle	12.73
T24	FSL-1	11.59
	Kontrolle	12.07

Jeweils N = 1

Tabelle 38: Proteinmenge von CD276 unter Stimulation mit FSL-1 für die Zelllinien 253J und T24

Versuchsteil	Deskriptive Statistik	
	M (SD)	Mdn
Mykoplasmen	.12 (.10)	.09
Kontrolle	.19 (.15)	.15

Jeweils N = 6

Tabelle 39: mRNA-Expression von CD276 unter Mykoplasmenkontamination für alle untersuchten Linien insgesamt

Zelllinie/ -kultur	Versuch	Deskriptive Statistik
		M (SD)
Cal-29	Mykoplasmen-positiv	.01 (.01)
	Kontrolle	.15 (.01)
T24	Mykoplasmen-positiv	.07 (.02)
	Kontrolle	.04 (.0002)
HT1197	Mykoplasmen-positiv	.21 (.16)
	Kontrolle	.38 (.02)

Jeweils N = 2

Tabelle 40: mRNA-Expression von CD276 unter Infektion mit Mykoplasmen für die einzelnen Zelllinien

Anhang

T-Stadium	Deskriptive Statistik		
	<i>N</i>	<i>M (SD)</i>	<i>Mdn</i>
T2	33	14.68 (8.30)	14.74
T3	14	15.29 (9.60)	15.70
T4	79	14.71 (4.88)	14.52

Tabelle 41: Vergleich der Expression von CD276 (gemessen durch die Immunfluoreszenz pro Fläche) anhand des lokalen Ausbreitungsstadiums (T-Stadium)

Patient	Deskriptive Statistik		
	<i>N</i>	<i>M (SD)</i>	<i>Mdn</i>
K02868/98	16	11.64 (9.31)	13.70
K04972/98	6	18.34 (6.20)	15.65
K05934/02	4	15.97 (1.93)	15.49
K03444/98	14	15.29 (9.60)	15.70
K07741/98	7	17.76 (8.16)	19.17
K08753/02	13	15.28 (2.01)	15.24
K15709/02	18	13.36 (5.15)	14.11
K20481/02	8	17.58 (6.70)	14.97
K17842/02	19	14.77 (6.98)	16.12
K19669/04	21	14.39 (1.79)	14.10

Tabelle 42: Mittelwerte der CD276-Expression nach Patienten

Probe	Deskriptive Statistik		
	<i>N</i>	<i>M (SD)</i>	<i>Mdn</i>
Harnblase	22	16.22 (7.10)	15.61
Ureter	17	13.68 (6.41)	13.61
Urethra	5	15.01 (3.82)	14.01
Paravesikales Bindegewebe	11	14.93 (5.95)	15.58
Niere	8	14.66 (6.74)	16.88

Anhang

Vagina	8	13.51 (4.72)	14.35
Portio/Zervix	5	12.21 (7.11)	14.62
Obturatorisches Fettgewebe	1	x = .00	
Uterus	6	11.50 (5.78)	13.77
Adnexe	9	15.90 (10.95)	16.60
Samenleiter	11	17.95 (4.53)	16.43
Prostata	13	15.22 (6.84)	15.52
Appendix vermiformis	1	x = 15.71	
Ligamentum (nicht näher bezeichnet)	1	x = 14.45	
Lymphknoten obturatorisch	5	12.43 (1.06)	12.65
Lymphknoten perivesikal	1	x = 14.25	
Lymphknoten iliaca externa	2	15.99 (3.37)	

Tabelle 43: Expression von CD276 anhand der anatomischen Herkunft der Proben

Patient	Gewebe	Normalverteilung	Deskriptive Statistik			
		(Shapiro-Wilk-Test)	<i>p</i>	<i>N</i>	<i>M (SD)</i>	<i>Mdn</i>
K02868/98	Harnblase			2	15.94 (1.46)	
	Ureter			2	16.57 (1.43)	
	Urethra			1	x = 12.77	
	Paravesikales Bindegewebe			1	x = 15.34	
	Vagina			2	7.58 (7.20)	
	Portio/Zervix			2	7.31 (1.34)	
	Uterus			2	5.84 (8.26)	
	Adnexe	> .05		4	12.90 (16.57)	8.47
K04972/98	Harnblase			1	x = 29.00	
	Ureter			1	x = 13.15	

Anhang

	Paravesikales Bindegewebe		1	x = 22.48	
	Samenleiter		2	15.65 (1.28)	
	Prostata		1	x = 14.01	
K05934/02	Harnblase		1	x = 14.57	
	Samenleiter		2	15.40 (1.43)	
	Prostata		1	x = 18.52	
K03444/98	Harnblase	> .05	6	13.57 (12.26)	15.31
	Ureter		1	x = 14.54	
	Urethra		1	x = 15.49	
	Paravesikales Bindegewebe		1	x = 20.64	
	Prostata	> .05	5	15.15 (9.47)	15.89
K07741/98	Harnblase		2	17.63 (5.55)	
	Paravesikales Bindegewebe		1	x = 19.17	
	Samenleiter		2	25.84 (5.49)	
	Prostata		2	9.10 (7.45)	
K08753/02	Harnblase	> .05	3	15.03 (.86)	15.24
	Ureter	> .05	3	14.11 (.59)	14.29
	Paravesikales Bindegewebe		2	13.32 (2.79)	
	Vagina		1	x = 16.12	
	Adnexe		1	x = 19.41	
	Niere	> .05	3	16.45 (1.82)	16.72
K15709/02	Harnblase		2	15.22 (1.17)	
	Ureter	> .05	3	9.28 (3.75)	10.86
	Paravesikales Bindegewebe		2	14.06 (2.64)	
	Portio/Zervix		2	14.03 (1.78)	

Anhang

	Uterus	> .05	4	14.33 (0.90)	14.11
	Adnexe	< .05	3	19.42 (4.93)	16.60
	Niere		2	5.22 (7.38)	
K20481/02	Ureter		2	23.10 (13.54)	
	Urethra		1	x = 12.50	
	Samenleiter		1	x = 17.58	
	Prostata	> .05	3	16.99 (3.54)	15.52
	Lymphknoten obturatorisch		1	x = 13.34	
K17842/02	Harnblase	> .05	3	19.35 (3.34)	19.13
	Ureter	< .05	3	9.69 (8.39)	14.34
	Paravesikales Bindegewebe		2	7.79 (11.01)	
	Samenleiter	> .05	4	16.52 (2.23)	16.22
	Prostata		1	x = 20.26	
	Niere	> .05	3	19.15 (2.04)	19.28
	Obturatorisches Fettgewebe		1	x = .00	
	Appendix vermiformis		1	x = 15.71	
	Lymphknoten externa	iliaca	1	x = 18.38	
K19669/04	Harnblase		2	15.58 (.19)	
	Ureter		2	13.12 (.69)	
	Urethra		2	14.02 (.01)	
	Paravesikales Bindegewebe		1	x = 16.31	
	Vagina	> .05	5	15.36 (1.57)	14.52
	Portio/Zervix		1	x = 18.35	
	Adnexe		1	x = 14.10	
	Lymphknoten obturatorisch	> .05	4	12.20 (1.07)	12.17

Anhang

Lymphknoten externa	iliaca	1	$x = 13.61$
Ligamentum		1	$x = 14.45$
Lymphknoten perivesikal		1	$x = 14.25$

Der Shapiro-Wilk-Test ist nur für $N > 2$ dargestellt, da er erst ab dieser Stichprobengröße berechnet wird.

Für $N = 1$ sind statt der Mittelwerte jeweils die Messwerte angegeben (x). Der Median (Mdn) ist jeweils nur für $N > 2$ angegeben.

Tabelle 44: Expression von CD276 in den verschiedenen Organproben gruppiert nach Patienten

8. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. rer. nat. Wilhelm K. Aicher durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte durch ebendiesen.

Sämtliche Versuche wurden (nach Einarbeitung durch die Labormitglieder Frau Tanja Abruzzese und Frau Conny Bock) von mir eigenständig durchgeführt. Die Bereitstellung der Proben zur Gewinnung somatischer Referenz-Zellen erfolgte durch die Klinik für Urologie.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung durch das Institut für klinische Epidemiologie und Biometrie (namentlich: Lina Maria Serna Higuita) durch mich.

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

Tübingen, den

9. Veröffentlichungen

Teile dieser Promotionsarbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Aicher, W. K., Korn, M., Reitnauer, L., Maurer, F. B., Hennenlotter, J., Black, P. C., Todenhofer, T., Bedke, J. & Stenzl, A. 2021. Expression patterns of the immune checkpoint ligand CD276 in urothelial carcinoma. BMC Urology, 21, 60.

Teile dieser Promotionsarbeit wurden an folgenden Kongressen vorgestellt:

M. Korn, F. Maurer, L. Reitnauer, T. Todenhöfer, A. Stenzl, W. K. Aicher (2019)
Expression of CD276 / B7-H3 is significantly elevated in bladder cancer in stages T1 – T4a (DGU Congress Hamburg 2019)

F. Maurer, L. Reitnauer, M. Korn, T. Todenhöfer, A., W. K. Aicher (2019)
Exploring the expression of tumor marker CD276/B7-H3 in urothelial carcinoma cell lines and somatic urothelial cells in vitro (DGU Congress Hamburg 2019)

W. K. Aicher, F. Maurer, L. Reitnauer, M. Korn, M. Maas, J. Hennenlotter, T. Todenhöfer, A. Stenzl (2020)
Expression of immune checkpoint ligand CD276 (B7-H3) is regulated in urothelial carcinoma on a transcriptional and post-transcriptional level and drops significantly in late-stage tumor tissue samples. (EAU Convention Amsterdam 2020 poster # 231)

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben. Insbesondere gilt mein Dank den folgenden Personen, ohne deren Hilfe die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank gilt zuallererst meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Wilhelm K. Aicher, für die Betreuung dieser Arbeit. Insbesondere der konstruktive Austausch und die regelmäßigen Gespräche auf fachlicher und persönlicher Ebene waren stets eine große Hilfe für mich und haben mich stets positiv beeinflusst und ermutigt.

Frau Tanja Abruzzese und Frau Conny Bock danke ich für die großartige Zusammenarbeit in der Arbeitsgruppe. Ohne ihre Expertise und außerordentliche Bereitschaft, ihr Wissen weiterzugeben, wäre nicht ein einziges Experiment durchführbar gewesen. Vielen Dank auch für die Geduld und die vielen lieben Gespräche, die mir immer Mut gemacht haben.

Herrn Jörg Hennenlotter danke ich für die große Hilfe bei der Recherche der Patientendaten und für die Bereitstellung der Präparate.

Zudem danke ich Frau Lina Maria Serna Higueta vom Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie der Universität Tübingen für die statistische Beratung.

Meinen Eltern und meiner Schwester möchte ich ganz besonders danken für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung während meines Studiums, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

Darüber hinaus gilt mein Dank allen Verwandten, Freunden und Studienkollegen, die mich immer unterstützt und immer wieder ermutigt haben.