

Aus der  
Universitätsklinik für Urologie Tübingen

**Einfluss von Mykoplasmen auf die Expression von CD276  
auf Blasen tumorzellen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Zenner, Nathalie Elisa Christine**

**2024**



Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. W. K. Aicher

2. Berichterstatter: Professor Dr. J. Bauer

Tag der Disputation: 25.07.2023



## Inhaltsverzeichnis

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	7
1.1 Klinische Relevanz und Behandlungsaspekte des Urothelkarzinoms	7
1.1.1 Allgemeine Histologie und Eigenschaften des Urothels	8
1.1.2 Eigenschaften, Epidemiologie und Risikofaktoren des Urothelkarzinoms	9
1.1.3 Diagnostik	11
1.1.4 Klassifikation und Therapie von Blasenkarzinomen	13
1.1.5 Wirtschaftlicher Aspekt bei Blasenkrebs	18
1.2 Expression von CD276 und anderen Tumormarkern bei Blasenkarzinom und molekulare Regulationsmechanismen	19
1.2.1 Tumorthherapie allgemein und Grundlagen der Immunantwort	19
1.2.2 Klinische Relevanz	23
1.3 Eigenschaften von Mykoplasmen sowie Nachweis und Therapie	25
1.3.1 Eigenschaften und Nachweis	25
1.3.2 Screening und Therapie von Mykoplasmeninfektionen	27
1.3.3 Klinische Relevanz von Langzeit Infektionen mit Mykoplasmen	27
1.4 Ziel der Arbeit	29
2 Material und Methoden	30
2.1 Geräte und Materialien	30
2.2 Probenmaterial	32
2.3 Allgemeine Zellkultur und Proliferationsrate	33
2.3.1 Zellkultur und Passage der Zelllinien (Cal29, T24 und HT1197)	34
2.3.2 Zellkultur und Passage der aus nativ Präparaten isolierten Harnleiterzellen	36
2.3.3 Infektion von HT1197, HL20/31 und HL20/32	38
2.4 RNA-Extraktion, Umschreibung in cDNA und qRT-PCR	39
2.4.1 RNA-Extraktion	39
2.4.2 Umschreiben der RNA in cDNA mittels Reverser Transkription	41

2.4.3	qRT-PCR	43
2.5	Proteinbestimmung mittels Western Blot	45
2.5.1	Proteinextraktion	45
2.5.2	Proteinbestimmung	45
2.5.3	Herstellung des Gels und Proteintrennung mittels SDS-Page	50
2.5.4	Transfer, Erst- und Zweitantikörper Markierung mit CD276 sowie LI-COR Messung	51
2.5.5	Stripping	55
2.5.6	Erst- und Zweitantikörper Markierung mit Housekeeping Protein $\beta$ -Aktin	55
2.6	Durchflusszytometrie	56
2.7	Nachweis und Ausschluss einer Mykoplasmen Infektion mittels MycoSPY <sup>®</sup>	58
2.7.1	Behandlung des Zellkulturüberstands	58
2.7.2	PCR	59
2.7.3	Agarosegel	60
3	Ergebnisse	62
3.1	Duplikationsrate der Zelllinien mit und ohne Mykoplasmen Infektion	62
3.2	Morphologie von Mykoplasmen infizierten Zellen im Vergleich mit nicht-infizierten Zellen	63
3.2.1	Morphologische Unterschiede zwischen Cal29 mit und ohne Mykoplasmen Infektion	64
3.2.2	Morphologische Unterschiede zwischen T24 mit und ohne Mykoplasmen Infektion	65
3.2.3	Morphologische Unterschiede zwischen HT1197 mit und ohne Mykoplasmen Infektion	67
3.2.4	Morphologische Unterschiede zwischen aus Harnleitern isolierten Zellen mit und ohne Mykoplasmen Infektion	69
3.3	Expression von CD276 auf mRNA Ebene bei mit Mykoplasmen infizierten Zellen im Vergleich mit Mykoplasmen freien Zellen	73
3.3.1	CD276 mRNA Expression in Cal29 Zellen mit und ohne Mykoplasmen Infektion	73
3.3.2	CD276 mRNA Expression in den aus Harnleitern isolierten Zellen HL 20/31 und HL 20/32	77

3.4	Expression von CD276 auf Proteinebene bei nicht-infizierten sowie mit Mykoplasmen infizierten Zellen	79
3.5	Expression von CD276 an der Oberfläche von Mykoplasmen infizierten Urothelzellen im Vergleich mit nicht-infizierten Urothelzellen	85
3.6	Zusammenfassung und Überblick der Ergebnisse	88
4	Diskussion	91
4.1	Diskussion der Ergebnisse	92
4.1.1	Morphologische und Replikationsraten Unterschiede	92
4.1.2	Unterschiede in der CD276 Gen- und Proteinexpression durch eine Mykoplasmeninfektion	93
4.2	Diskussion des Materials und der Methoden	96
4.2.1	Nachweis der Infektion mit Mykoplasmen	96
4.2.2	In vitro Einfluss von Mykoplasmen auf die Expression von CD276	97
4.2.3	Auswahl der Zelllinien und Zellen aus klinischen Resektionspräparaten	98
4.3	Schlussfolgerung und Ausblick	99
5	Zusammenfassung	101
6	Literaturverzeichnis:	103
7	Erklärung zum Eigenanteil	119
8	Danksagung	120

## **Tabellen- und Abbildungsverzeichnis**

### **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1 Vergleich der Inzidenz, Mortalität und Prävalenz des Blasenkarzinoms 2013 und 2018 .....	11
Tabelle 2 UICC Stadieneinteilung der Harnblasenkarzinome.....	13
Tabelle 3 Allgemeine Geräte und Materialien.....	31
Tabelle 4 Übersicht der Zelllinien .....	32
Tabelle 5 Übersicht der Harnleiterzellen .....	33
Tabelle 6 Bestandteile Zelllinienmedium .....	35
Tabelle 7 Material für die Zellpassage.....	36
Tabelle 8 KSFM-Zellmedium der präparierten Tumorzellen.....	36
Tabelle 9 Substanzen für die Passage der aus Harnleitern isolierten Zellen ...	37
Tabelle 10 Reagenzien und Material für die RNA-Extraktion .....	41
Tabelle 11 Reagenzien für Reverse Transkription .....	41
Tabelle 12 Reagenzien für Mastermixe der PCR .....	43
Tabelle 13 Übersicht Programmeinstellung der qRT-PCR.....	44
Tabelle 14 Western Blot Material für die Proteinbestimmung.....	46
Tabelle 15 GlowMax Absorbtionswerte zur Erstellung der Kalibrierungslinie ...	48
Tabelle 16 Western Blot Material für Gele.....	50
Tabelle 17 Western Blot Material für den Transfer .....	52
Tabelle 18 Western Blot Material Erst- und Zweitantikörper .....	54
Tabelle 19 Western Blot Material Stripping .....	55
Tabelle 20 Western Blot Material Antikörper Färbung der Housekeeping Proteine.....	55
Tabelle 21 Material Durchflusszytometrie .....	56
Tabelle 22 Material MycoSPY <sup>®</sup> .....	59
Tabelle 23 Material zur Herstellung des Agarosegels .....	61
Tabelle 24 Daten der Duplikationstaten der Zelllinien .....	63
Tabelle 25 Werte der CD276 mRNA Expression in Cal29 .....	74
Tabelle 26 Werte der CD276 mRNA Expression bei T24.....	75
Tabelle 27 Werte der CD276 mRNA Expression bei HT1197 .....	76
Tabelle 28 Werte der CD276 mRNA Expression in HL 20/31 Zellen.....	78



Tabelle 29 Werte der CD276 mRNA Expression in HL 20/32 Zellen.....	79
Tabelle 30 Verhältnis Pigmentdichte CD276 Protein zu $\beta$ -Aktin im Western Blot .....	84
Tabelle 31 Ergebnisübersicht der CD276 Expression auf unterschiedlichen Ebenen in T24.....	88
Tabelle 32 Ergebnisübersicht der CD276 Expression auf unterschiedlichen Ebenen in Cal29.....	88
Tabelle 33 Ergebnisübersicht der CD276 Expression auf unterschiedlichen Ebenen in HT1197 .....	89
Tabelle 34 Ergebnisübersicht der CD276 Expression auf unterschiedlichen Ebenen in Harnleiter 20/31.....	90
Tabelle 35 Ergebnisübersicht der CD276 Expression auf unterschiedlichen Ebenen in Harnleiter 20/32.....	91

### **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1 Übersicht Vorkommen und Aufbau von Urothel .....	9
Abbildung 2 TNM-Klassifikation des Blasenkrebs .....	14
Abbildung 3 Versuchsaufbau der etablierten Zelllinien Cal29, T24 und HT1197 .....	33
Abbildung 4 Kulturschema der isolierten Harnleiterzellen .....	38
Abbildung 5 Konzentrationen der Standards.....	46
Abbildung 6 Befüllungsschema 96-well Platte für die GlowMax Messung .....	47
Abbildung 7 Kalibrierung .....	48
Abbildung 8 Ergebnis MycoSPY <sup>®</sup> .....	62
Abbildung 9 Cal29 Tag 1, 5 und 7 nach Passage .....	65
Abbildung 10 T24 Tag 1, 5 und 7 nach Passage.....	66
Abbildung 11 HT1197 Tag 2, 5, 7 und 14 nach Passage .....	69
Abbildung 12 HL20/31 mit und ohne Infektion mit Mykoplasmen an Tag 9, 14, 18 und 21 nach der Passage.....	71
Abbildung 13 HL20/32 mit und ohne Infektion mit Mykoplasmen an Tag 9, 14, 18 und 21 nach der Passage.....	72
Abbildung 14 CD276 mRNA Expression in Cal29 Zellen .....	74

Abbildung 15 CD276 mRNA Expression in T24 Zellen .....	75
Abbildung 16 CD276 mRNA Expression bei HT1197.....	76
Abbildung 17 Mittelwert der CD276 mRNA Expression in HT1197 Zellen mit und ohne Mykoplasmen Infektion.....	77
Abbildung 18 CD276 mRNA Expression in HL 20/31 Zellen.....	78
Abbildung 19 CD276 mRNA Expression in HL 20/32 Zellen.....	79
Abbildung 20 Ergebnisse CD276 und $\beta$ -Aktin Antikörper Färbung Western Blot für Cal29 und T24.....	80
Abbildung 21 Genormter Messbereich der CD276 und $\beta$ -Aktin Banden bei Cal29 und T24.....	81
Abbildung 22 Western Blot HT1197 und HL 20/31.....	82
Abbildung 23 genormter Messbereich der CD276 und $\beta$ -Aktin Banden bei HT1197 und HL 20/31 .....	82
Abbildung 24 Grafik des Verhältnisses der CD276 Protein und $\beta$ -Aktin Expression im Western Blot .....	84
Abbildung 25 Übersicht der Durchflusszytometrie Ergebnisse der Zelllinien Cal29, T24 und HT1197.....	87
Abbildung 26 Mittelwerte der CD276 Oberflächen Protein Expression in der Durchflusszytometrie.....	86

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
APC	Antigen präsentierende Zellen
APS	Ammonium Persulfat
BCG	Bacille-Calmette-Guerin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre desoxyribonukleinsäure
CIS	Carcinoma in situ
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HL	Harnleiter
HRP	Meerrettich peroxidase
ICD	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
Ig	Immunglobuline
IL	Interleukin
kbp	Kilobasenpaare
MEM	Minimum Essential Medium
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
Mrd	Milliarden
MSM	Männer, die Sex mit Männern haben
$\mu$ l	Mikroliter (= $10^{-6}$ l)
$\mu$ m	Mikrometer
nm	Nanometer
NTW	Non Template Water
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBS-T	Phosphate Buffered Saline Tween
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
qRT-PCR	Quantitative Real Time (Echtzeit) Polymerase-Kettenreaktion
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RNA	Ribonukleinsäure
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulfat (natriumdodecylsulfat) polyacrylamid gel Elektrophorese
SMC	Smooth muscle Cell (glatte Muskelzelle)
RKI	Robert Koch Institut
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNM	Tumor Lymphknoten Metastase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TUR	Transurethrale Resektion
UICC	Union for International Cancer Control
WHO	World Health Organisation

# 1 Einleitung

Tumormarker sind in der modernen Tumorthherapie von großem Interesse, da sie neue Perspektiven sowohl für die Diagnostik, Therapie als auch das Monitoring eröffnen. CD276 ist Teil der B7-Familie und als solches ein vielsprechender Kandidat sowohl als Marker als auch für die Therapie von Tumorerkrankungen, insbesondere für die Therapie von Blasenkrebs. Eine Modulation der Expression von CD276 durch eine häufig asymptomatisch verlaufende chronische Infektion mit Mykoplasmen kann unter Umständen zu einer falsch-positiven oder falsch-negativen Diagnostik oder sogar zu einem verminderten Therapieansprechen führen.

Die Einleitung zu der Arbeit unterteilt sich in drei Aspekte, die im Folgenden kurz erläutert werden. Der Einstieg erfolgt über die klinische Relevanz und Behandlungsaspekte des Urothelkarzinoms. Hierbei werden anatomische und physiologische Grundlagen wiederholt und der Stand der aktuellen S3 Behandlungsleitlinie für Blasenkrebs erläutert. Darauf aufbauend werden im zweiten Teil Behandlungsansätze in der Tumorthherapie und hierbei insbesondere die Expression und Relevanz von CD276 und anderen Tumormarkern erläutert. Außerdem wird auf die molekularen Regulationsmechanismen eingegangen, um den Zusammenhang zwischen CD276 und Blasenkrebs dazulegen. Der dritte Teil der Einleitung beschäftigt sich mit den Eigenschaften und dem Nachweis von Mykoplasmen, woraus sich in der Zusammenschau mit den vorherigen Punkten der Einleitung das Ziel dieser Arbeit ergibt.

## 1.1 Klinische Relevanz und Behandlungsaspekte des Urothelkarzinoms

Der Einstieg in die Thematik des Urothelkarzinoms erfolgt über die Wiederholung der allgemeinen Histologie und der Eigenschaften des Urothels. Darauf aufbauend werden die Eigenschaften, die Epidemiologie und die Risikofaktoren des Urothelkarzinoms erläutert. Anschließend erfolgt die Beschreibung der Diagnostik, Klassifikation und Therapie des Urothelkarzinoms. Zusätzlich wird der wirtschaftliche Aspekt des

Urothelkarzinoms beleuchtet, aus dem sich die Notwendigkeit zur Erforschung und Entwicklung neuer Therapie- und Screening- Möglichkeiten ergibt.

### **1.1.1 Allgemeine Histologie und Eigenschaften des Urothels**

Das Urothel, auch Übergangsepithel oder Epithelium transitionale genannt, ist ein mehrschichtiges Epithel, das sich aus einer einlagigen Basalschicht, einer aus mehreren Zelllagen bestehenden Intermediärschicht und oberflächlichen Deckzellen (engl.: Umbrella Cells) zusammensetzt (Lobban et al., 1998, Lüllmann-Rauch and Asan, 2015). Es wird immer wieder die Annahme geäußert, dass es sich bei dem Urothel nicht um ein mehrschichtiges, sondern um ein mehrreihiges Epithel handelt. Diese Annahme konnte aber bisher nicht abschließend geklärt werden (Lüllmann-Rauch and Asan, 2015).

Die Deckzellen sind deutlich größer und oft polyploid, was sie mit einer Lebensdauer von ca. 300 Tagen deutlich langlebiger als andere Zellen macht (Lüllmann-Rauch and Asan, 2015). Sie verfügen apikal zusätzlich über Uroplakine. Hierbei handelt es sich um spezifische Transmembranproteine, die gemeinsam mit den Tight Junctions für eine Permeabilitätsschranke gegenüber dem Harn sorgen (Min et al., 2003). Uroplakine liegen in den Deckzellen apikal in Vesikeln gespeichert vor (dies wird teilweise als Crusta urothelialis bezeichnet) und werden bei Ausdehnung der Blase durch Exozytose an die Zellmembran abgegeben, welche so noch mehr Intermediärzellen überdecken kann. Dies sorgt für eine noch bessere Abdichtung gegenüber dem Harn.

Urothel ist im Bereich der ableitenden Harnwege zu finden. Es beginnt an den Kelchen des Nierenbeckens und ist sowohl in den Harnleitern als auch in der Harnblase zu finden (siehe Zeichnung A in Abbildung 1). Bei Frauen ist nur im proximalen Teil der Harnröhre noch Urothel zu finden, während die restliche Harnröhre mit unverhorntem, mehrschichtigem Plattenepithel ausgekleidet ist. Bei Männern ist die Harnröhre bis zur den Ductus ejaculaorii mit Urothel ausgekleidet, während distal mehrschichtiges Zylinderepithel zu finden ist.

Aus diesen morphologischen wie auch anatomischen Eigenschaften ergibt sich die funktionale Besonderheit des Urothels. Es ist in der Lage, sich den regelmäßigen Volumenänderungen der Harnblase anzupassen und eine

optimale Abdichtung gegenüber dem Urin zu gewährleisten (siehe Zeichnungen B, C und D in Abbildung 1).

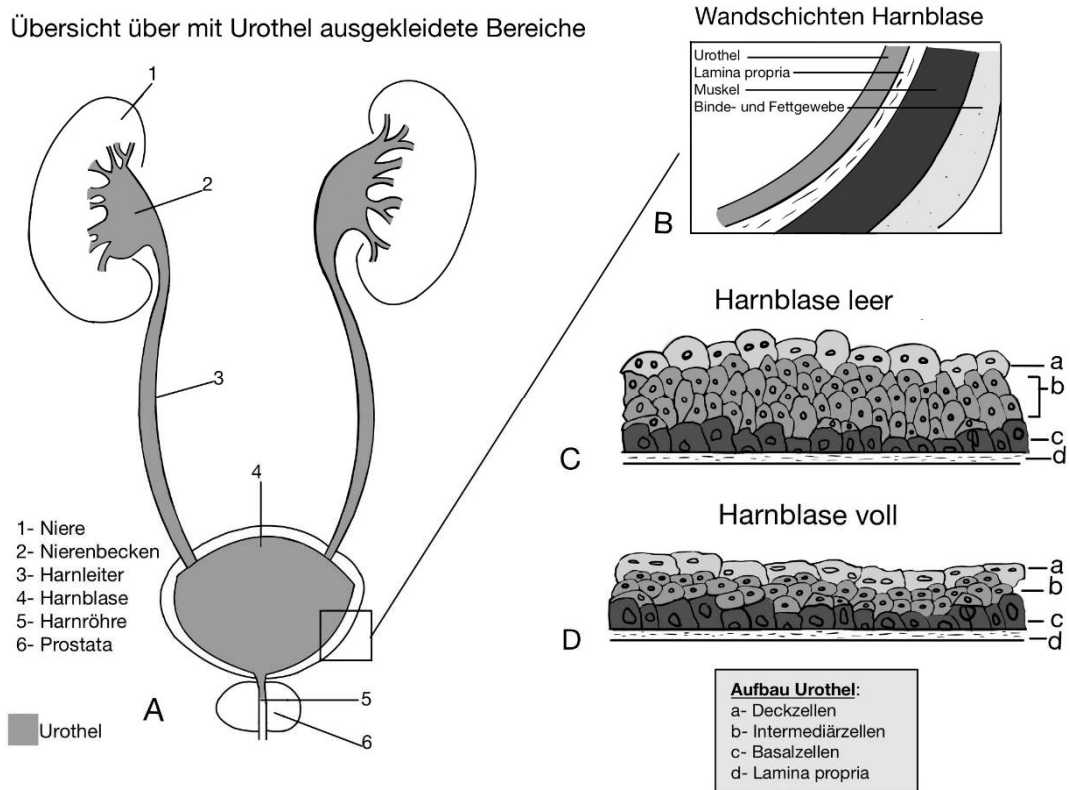


Abbildung 1 Übersicht Vorkommen und Aufbau von Urothel  
 Auf der Abbildung A ist das Vorkommen von Urothel im Urogenitaltrakt mit grau markiert. Abbildung B stellt den anatomischen Aufbau der Harnblase schematisch dar. Abbildung C zeigt die Morphologie des Epithels in der Harnblase bei leerer Blase und Abbildung D zeigt die morphologischen Eigenschaften des Epithels bei voller Harnblase.

### 1.1.2 Eigenschaften, Epidemiologie und Risikofaktoren des Urothelkarzinoms

Unter dem Begriff Karzinom versteht man eine bösartige Erkrankung, welche aus Epithelzellen entsteht und ca. 80% aller bösartigen soliden Tumore ausmacht (Pelaj, 2016). Zu den klassischen Symptomen gehört die B-Symptomatik, bestehend aus Fieber, Nachtschweiß und ungewollten Gewichtsverlust. Das Urothelkarzinom macht den Großteil der Blasentumore aus, ist jedoch nicht gleichzusetzen mit einem Blasenkrebs, da es nicht nur in der Blase, sondern im gesamten Bereich der ableitenden Harnwege, welche mit Urothel ausgekleidet sind, entstehen kann. Das Urothelkarzinom tritt oft an verschiedenen Stellen der Blase wie auch der ableitenden Harnwege

gleichzeitig auf (Lopez-Beltran and Cheng, 2006) (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2018). In der Blase gibt es auch andere, jedoch deutlich seltenere Tumorarten, wie beispielsweise das Plattenepithelkarzinom und das Adenokarzinom (Lopez-Beltran and Cheng, 2006).

Im Jahr 2018 gab es laut Robert-Koch-Institut 18270 Neuerkrankungen an einem invasiven Blasenkarzinom. Von den Erkrankten waren 13500 Männer. Zu dieser Anzahl addieren sich noch 12770 Personen, die an einem nicht-invasiven papillären Karzinom und in-situ Tumoren der Blase erkrankt sind. Das mittlere Erkrankungsalter beläuft sich auf 73 bis 77 Jahre. Vor dem Hintergrund der demographischen Transition in Deutschland ist davon auszugehen, dass die Zahl der Neuerkrankungen in den nächsten Jahren weiter zunehmen wird (Statistisches Bundesamt, o.J.) (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2018). Das Urothelkarzinom ist bei Männern die 4. und bei Frauen die 12. häufigste Lokalisation für eine Tumorneuerkrankung. Es macht etwa 5,1% aller Krebserkrankungen bei Männern aus und ist somit nach dem Prostatakarzinom die häufigste Tumorart des Urogenitaltraktes. Allgemein sind Männer mehr als doppelt so häufig betroffen wie Frauen (Erdmann et al., 2021). In Tabelle 1 werden Inzidenz, Mortalität und Prävalenz des Blasenkarzinoms des Jahres 2014 denen des Jahres 2018 gegenübergestellt. Seit dem Ende der 1990er Jahre erkennt man bei Männern bei der altersstandardisierten Erkrankungs- und Sterberate einen rückläufigen Trend (Erdmann et al., 2021). Dies ist wahrscheinlich auf die Verringerung des Konsums von Tabak seit den 1980er Jahren und möglicherweise auf eine geringere berufliche Exposition gegenüber krebserregenden Stoffen zurückzuführen. Bei Frauen sind die Zahlen der Neuerkrankungen und die der Prävalenz seit dem Ende der 1990er Jahre im Vergleich zu den Männern deutlich niedriger und relativ konstant (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2018, Bundesgesundheitsministerium, o.J., Erdmann et al., 2021).

Zu den Risikofaktoren des Blasenkarzinoms gehören das männliche Geschlecht und ein höheres Lebensalter und insbesondere sowohl das aktive wie auch das passive Rauchen (International Agency for Research on Cancer (IARC) Working Group, 2004). Aber auch aromatische Amine, welche in

Pestiziden, Zigarettenrauch, Dieselabgasen und Haarfärbemitteln vorkommen und teilweise in der Gummi- und Farbenindustrie genutzt werden, erhöhen das Risiko (Claude et al., 1988, Pesch et al., 2000, Vlaanderen et al., 2013). Hinzu kommen Risiken durch Chlor und Arsen im Trinkwasser sowie durch eingenommene Zytostatika und/oder Radiotherapien im Bereich der Harnblase oder chronische Infektionen und Entzündungen der Blase (Kunze et al., 1992, Kjaer et al., 1989, Chaturvedi et al., 2007). Pioglitazon, ein als Antidiabetikum eingesetztes Arzneimittel, steht ebenfalls im Verdacht, Blasenkrebs auszulösen (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2018, Azoulay et al., 2012, American Cancer Society, o.J.).

*Tabelle 1 Vergleich der Inzidenz, Mortalität und Prävalenz des Blasenkarzinoms 2013 und 2018  
Die Tabelle vergleicht die geschlechter spezifischen Zahlen der Neuerkrankungen, der Sterbefälle und der Prävalenz nach 5 Jahren von Blasenkrebs im Jahr 2013 mit den Zahlen im Jahr 2018.*

	2014 (Robert Koch-Institut, 2017)		2018 (Erdmann et al., 2021)	
	Männer	Frauen	Männer	Frauen
<b>Blasenkrebs Neuerkrankungen</b>	11680 bzw. 430*	4170 bzw. 7100*	13500 bzw. 23410*	4770 bzw. 7630*
	*Die gekennzeichneten Werte ergeben sich, wenn man die in-situ Tumore und Neubildungen unsicheren oder unbekanntes Verhaltens einberechnet.			
<b>Sterbefälle an Blasenkrebs</b>	3897	1795	3862	1840
<b>Prävalenz nach 5 Jahren</b>	36100	11100	60200	19100

### 1.1.3 Diagnostik

Entdeckt wird das in der Mehrzahl der Fälle über lange Zeit asymptomatische Urothelkarzinom oftmals durch eine schmerzlose Mikrohämaturie, das heißt Blut im Urin (Wakui and Shiigai, 2000, Massey et al., 1965). Außerdem kann eine Drangsymptomatik und eine Pollakisurie in 20-35% der Fälle vorliegen, welche in ca. 40% durch eine begleitende Harnwegsinfektion verursacht wird (Turner et al., 1977, Cox et al., 1969). Differentialdiagnostisch müssen andere



Blutungsursachen, wie beispielsweise Infektionen, Nieren- und Blasensteine abgeklärt werden. Beim Vorliegen einer Mikro- oder Makrohämaturie sollte zunächst eine Sonographie des oberen Harntraktes erfolgen, um einen Harnstau auszuschließen bzw. zu sichern, welcher als mögliche Folge eines lokal fortgeschrittenen Harnblasenkarzinoms aber auch bei Urolithiasis oder anderen Raumforderungen der Niere vorkommt. Eine weitere Untersuchungsmöglichkeit ist die Urinzytologie. Bei dieser erfolgt durch Zentrifugation einer frischen und möglichst zellreichen Urinprobe die Isolation und anschließende Färbung der Urothelzellen. Anschließend wird auf Malignitätskriterien wie Kernveränderungen (z.B. Größe und Form des Kerns sowie Hyperchromasie, Anisokaryose und verdickte Kernmembran) und gesteigerten Zellstoffwechsel untersucht. Diese Charakteristika können bei low-grade-Karzinomen noch sehr unauffällig sein, werden aber bei zunehmender Entdifferenzierung deutlicher (vom Dorp et al., 2011). Hieraus ergibt sich eine niedrige Sensitivität und auch bei einem negativen Ergebnis ist kein sicherer Ausschluss eines low-grade Harnblasenkarzinoms möglich (Turco et al., 2011). Dennoch wird die Urinzytologie als Referenzstandard bei vielen Markerstudien genutzt, da sie zwar eine niedrigere Sensitivität aber eine höhere Spezifität hat (Lotan and Roehrborn, 2003, van Rhijn et al., 2005). Die Diagnostik des Urothelkarzinoms ist erschwert, da es über eine lange Zeit asymptomatisch sein kann und es bisher keinen etablierten Marker gibt, der in der Klinik Anwendung findet. Der Goldstandard zur Primärdiagnostik bei Verdacht auf ein Harnblasenkarzinom und dem Vorliegen zusätzlicher Risikofaktoren bleibt laut Expertenkonsens weiterhin die Weißlicht-Zystoskopie mit einem flexiblen oder einem rigiden Zystoskop (Jocham et al., 2008). Im Rahmen dieser Untersuchung soll bei Verdacht auf ein Harnblasenkarzinom eine Gewebeprobe entnommen werden und durch den Pathologen eine histologische Sicherung erfolgen. Je nach operativem oder histologischem Befund sollte ebenfalls eine Abklärung des oberen Harntraktes erfolgen (Blick et al., 2012). Doch auch die Weißlicht-Zytoskopie ist in ihrer Detektion limitiert und sowohl von der Größe des Tumors als auch von den Fähigkeiten des Untersuchers abhängig (Jocham et al., 2008).

### 1.1.4 Klassifikation und Therapie von Blasenkarzinomen

Die WHO-Klassifikation der Tumore des Uro-Genitalsystems von 2004 wurde im Jahr 2016 aktualisiert (Moch et al., 2016). Sie unterscheidet zwischen dem invasiven Urothelkarzinom und der nicht-invasiven urothelialen Läsion. Beide Gruppen können weiter unterteilt werden. Die nicht-invasiven Urothelkarzinome machen etwa 70% der primär diagnostizierten Urotheltumore aus (Moch et al., 2016, Leitlinienprogramm Onkologie et al., 2020).

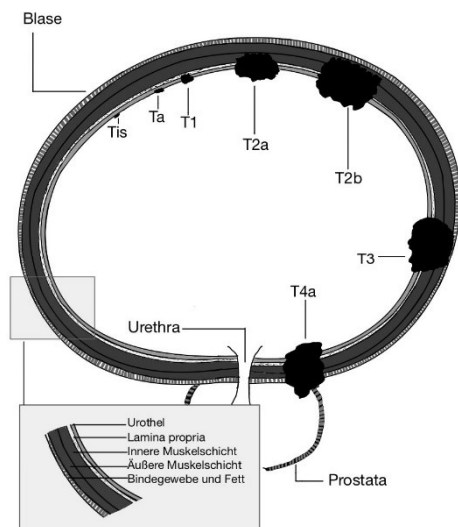
Die TNM-Klassifikation, welche von der UICC (Union for International Cancer Control) seit mehr als 50 Jahren veröffentlicht wird, dient der Klassifizierung der Größe und Ausdehnung von Krebserkrankungen. Diese Klassifikation ist wegweisend für die Einteilung in Tumorstadien und damit auch für die angemessene Behandlung und die Prognose. Außerdem erleichtert sie den Informationsaustausch zwischen unterschiedlichen Zentren und hilft auch dabei, Behandlungsergebnisse zu evaluieren. Das „T“ der Klassifikation steht für die Lokalisation und Größe des Primärtumors, das „N“ für lokalen Lymphknotenbefall und „M“ für (Fern-)Metastasen (Union for International Cancer Control). Die T-Kategorie des TNM kann für die klinische Stadieneinteilung in nicht-muskelinvasives Harnblasenkarzinom: pTis, pTa, pT1 und muskelinvasives Harnblasenkarzinom:  $\geq$  pT2 genutzt werden. Die detaillierte TNM der Urothelkarzinome der Harnblase ist in Abbildung 2 dargestellt. Die sich aus diesem System ergebende und etablierte Stadieneinteilung des Harnblasenkarzinoms ist in Tabelle 2 aufgelistet (Union for International Cancer Control).

*Tabelle 2 UICC Stadieneinteilung der Harnblasenkarzinome*

*Die Tabelle zeigt die UICC (Union International für Cancer Control) Einteilung von Blasenkrebs.*

Stadium <b>0a</b>	<b>Ta</b>	<b>N0</b>	<b>M0</b>
Stadium <b>0is</b>	Tis	N0	M0
Stadium <b>I</b>	T1	N0	M0
Stadium <b>II</b>	T2a, T2b	N0	M0
Stadium <b>IIIA</b>	T3a, T3b, T4a	N0	M0
	T1, T2, T3, T4a	N1	M0
Stadium <b>IIIB</b>	T1, T2, T3, T4a	N2, N3	M0
Stadium <b>IVA</b>	T4b	Jedes N	M0
	Jedes T	Jedes N	M1a
Stadium <b>IVB</b>	Jedes T	Jedes N	M1b

## TNM Klassifikation des Blasenkrebs



T	Primärtumor
TX	Primärtumor kann nicht bewertet werden
T0	Kein Nachweis von Primärtumor
Ta	Nicht-muskelinvasives papilläres Karzinom
Tis	Carcinoma in situ: „Flache Neoplasie“
T1	Tumor dringt in subepitheliales Bindegewebe ein
T2	Tumor dringt in Muskularis propria ein
T2a	Tumor dringt in oberflächliche Muskularis propria ein (innere Hälfte)
T2b	Tumor dringt tief in Muskularis propria ein (äußere Hälfte)
T3	Tumor dringt in perivesikales Gewebe ein:
T3a	Mikroskopisch
T3b	Makroskopisch (Extravesikale Masse)
T4	Tumor dringt in eines der Folgenden ein: Prostatastroma, Samenbläschen, Uterus, Vagina, Beckenwand
T4a	Tumor dringt ein in Prostatastroma, Samenbläschen, Uterus oder Vagina
T4b	Tumor dringt ein in Beckenwand oder Abdominalwand
N	Regionäre Lymphknoten
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht bewertet werden
N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in solitärem Lymphknoten des kleinen Beckens (hypogastrische, Obturator-, externe iliacele oder präsakrale Lymphknoten)
N2	Metastase(n) in multiplen Lymphknoten des kleinen Beckens (hypogastrische, Obturator-, externe iliacele oder präsakrale Lymphknoten)
N3	Metastase(n) der Lymphknoten an der Arteria iliaca communis
M	Fernmetastase
M0	Keine Fernmetastasen
M1a	Metastasen in nichtregionäre Lymphknoten
M1b	Andere Fernmetastasen

Abbildung 2 TNM-Klassifikation des Blasenkrebs

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der Wandschichten der Harnblase und die unterschiedlichen Eindringtiefen von Blasenkrebs, welche in der TNM-Klassifikation differenziert werden. In der Tabelle wird auf die gesamte TNM-Klassifikation eingegangen.

Im Jahre 2016 entstand die erste S3 Leitlinie zur Diagnostik und Therapie des Urothelkarzinoms der Harnblase. Die aktuelle S3 Leitlinie zur Behandlung des Blasenkarzinoms wurde 2020 verfasst und umfasst in der Langversion rund 400 Seiten (Leitlinienprogramm Onkologie et al., 2020). Im Folgenden werden die aktuellen Behandlungsleitlinien des Blasenkarzinoms kurz zusammengefasst.

Nicht nur bei der Diagnostik, sondern auch bei der Therapie des Harnblasenkarzinoms muss zwischen dem muskelinvasiven und dem nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinom unterschieden werden. Bei den nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen, welche sich auf die Mukosa (Ta,Cis) oder Submukosa (T1) beschränken, ist die transurethrale Resektion nicht nur für die Probengewinnung und zytologische Diagnostik notwendig, sondern dient teilweise gleichzeitig als Therapie (Richterstetter et al., 2012, Mariappan et al., 2012).

#### 1.1.4.1 Therapie der nicht-muskelinvasiven Blasen Tumore

Das Urothelkarzinom zeichnet sich unter anderem durch sein aggressives Wachstum und seine Progressionshäufigkeit aus. Dies bedeutet, dass oberflächliche Blasen Tumore je nach Tumorstadium und Grad der Differenzierung nach einer ausschließlich transurethralen Resektion in bis zu 70% der Fälle ein Rezidiv erleiden und bis zu 25% der Patienten einen Tumorprogress erleiden (Sylvester et al., 2006). In-situ Tumore der Blase gehören laut ICD10 nicht zu den bösartigen Tumoren, haben jedoch eine hohe klinische Relevanz, da sie ein deutlich höheres Risiko für eine Progression, das heißt weiteres Tumorstadium, sowie ein höheres Risiko für ein Rezidiv, das heißt Wiederauftreten nach der Behandlung, haben. Studien zeigen, dass Patienten mit einem initial lokal begrenzten Tumor auch nach einer erfolgten Zystektomie, das heißt einer chirurgischen Entfernung der gesamten Blase, innerhalb von 5 Jahren in bis zu 30% der Fälle eine systemische Tumorstadiumprogression erlitten (Hautmann et al., 2006).

Bei Nachweis eines nicht-muskelinvasiven Blasenkarzinoms mit niedriger Risikokonstellation muss keine Nachresektion erfolgen. Im Falle einer inkompletten Resektion oder Bestehen einer mittleren oder hohen Risikokonstellation sollte die Nachresektion innerhalb eines Zeitrahmens von 6 Wochen nach der primären transurethralen Resektion (TUR) erfolgen, da Studien gezeigt haben, dass nach der primären TUR meist noch Resttumore vorhanden sind (Klän et al., 1991, Schips et al., 2002). Hierbei sollte vor allem der Bereich der primären Resektion erneut reseziert werden, da sich hier 80% der Resttumore befinden (Ayati et al., 2019, Lazica et al., 2013). Weitere Gründe für eine Nachresektion sind der S3- Leitlinie zu entnehmen.

Eine Frühinstillation bzw. eine adjuvante intravesikale Chemotherapie kann die Rezidivrate verringern (Sivalingam et al., 2005). Vor allem Patienten mit einem low-risk bzw. unifokalen Urothelkarzinom haben den größten Profit von einer einmaligen Frühinstillation, das heißt eine Instillation innerhalb der ersten sechs bis 24 postoperativen Stunden (Abern et al., 2013, Sylvester et al., 2008). Zur Frühinstillation können Bacille-Calmette-Guerin (BCG), Mitomycin C, Doxorubicin und Epirubicin genutzt werden (Takenaka et al., 2008, Sylvester et

al., 2004, Böhle and Bock, 2004). Bei BCG handelt es sich um eine attenuierte Form des Mykobakteriums *Mycobacterium bovis*, das in der Lage ist als Immunmodulator zu agieren, indem es eine granulomatöse Entzündung im Organismus hervorruft und die Bildung von Zytokinen und die Aktivierung der T-Zellen fördert (Ärzteblatt, 1996).

Das Carcinoma in-situ (CIS) ist eine aggressive und nur gering differenzierte Neoplasie des Urothels, die sowohl allein als auch begleitend vorliegen kann (Meijer et al., 2011). Aufgrund seines flachen Wachstums wird das CIS endoskopisch oft nicht erkannt und auch in randomisierten Biopsien nicht immer gefunden (Burger et al., 2013, Bolenz et al., 2013). Die Behandlung mit BCG im Induktionsschema bzw. Erhaltungsschema, aber auch die etwas drastischere und teilweise übertherapeutische radikale Zystektomie stellen bei einem alleinigen CIS Therapieoptionen dar (Takenaka et al., 2008, Huang et al., 2009, Gofrit et al., 2009).

Da bei den nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen eine Rezidivneigung und ein Progressionsrisiko vorliegen, sollte nach Ermittlung der Risikoklassifikation eine regelmäßige Nachsorgeuntersuchung erfolgen.

#### 1.1.4.2 Muskelinvasive Harnblasenkarzinome

Nach der Diagnosestellung eines muskelinvasiven Blasenkarzinoms muss ein Abwägen von und eine Aufklärung über die peri- und postoperativen Risiken unter Beachtung des individuellen Risikoprofils und der Komorbiditäten des Patienten erfolgen. Die radikale Zystektomie soll, falls keine neoadjuvante Therapie erfolgt, nach Möglichkeit innerhalb von 3 Monaten erfolgen, da eine Verzögerung der Therapie die Prognose negativ beeinflusst (Gore et al., 2009, Kulkarni et al., 2009). Bei einem lokal begrenzten muskelinvasiven Blasenkarzinom (und teilweise auch bei nicht-invasivem Blasenkarzinom) ist die radikale Zystektomie in Verbindung mit der beidseitigen pelvinen Lymphadenektomie die Standardtherapie mit kurativer Intention.

Die Rate an Frühkomplikationen innerhalb der ersten drei postoperativen Monate ist mit bis zu 58% hoch und beinhaltet unter anderem Ileus, Harnwegsinfekte, Infektion der Wunde und thromboembolische Ereignisse

(Stein et al., 2001, Ramani et al., 2009, Froehner et al., 2009). Des Weiteren müssen die Möglichkeiten zur Harnableitung nach Zystektomie besprochen werden, inklusive der jeweiligen Vor- und Nachteile (Nieuwenhuijzen et al., 2008). Die Wahl der Harnableitung orientiert sich an der Lebensqualität, Morbidität und Mortalität. Man unterscheidet zwischen kontinenten und inkontinenten Formen der Harnableitung. Eine Übersicht zu den Formen und den jeweiligen Vor- und Nachteilen der unterschiedlichen Harnableitungen ist der S3-Leitlinie des Harnblasenkarzinoms zu entnehmen (Leitlinienprogramm Onkologie et al., 2020).

Die Operationstechnik bei der radikalen Zystektomie hat sich über die Jahre weiterentwickelt und kann sowohl konventionell, laparoskopisch oder roboter-assistiert erfolgen. Jedoch bleibt die offene Variante mit einer bilateralen pelvinen Lymphadenektomie die Standardtherapie (Stein et al., 2001, Li et al., 2013). Trotz der Weiterentwicklung der Verfahren beträgt die krankheitsspezifische Überlebensrate maximal 66% bezogen auf alle pathologischen Tumorstadien (Hautmann et al., 2012, Shariat et al., 2006). Ab dem Tumorstadium  $\geq$ pT2 soll die radikale Zystektomie angeboten werden. Bei dieser Form werden auch die unmittelbaren Nachbarorgane, wie distale Harnleiter, Prostata und Samenblasen bzw. Uterus, Eierstöcke und Eileiter sowie Teile der vorderen Vaginalwand entfernt (Skinner et al., 2007). Eine Alternative zur radikalen Zystektomie mit kurativem Ansatz bei lokal begrenztem muskelinvasiven Urothelkarzinom der Harnblase (cT2-4 cN0/NX M0) bildet die primär organerhaltende Therapie (Chen et al., 2013, Given et al., 1995). Bei einer inkompletten Remission sollte eine Salvage-Zystektomie erfolgen (Ploussard et al., 2014).

Beim Vorliegen eines muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms ( $\geq$ T2) sollte die Therapie multidisziplinär, das heißt unter Einbeziehung der Urologen, Internisten und Radiologen erfolgen. Es sollte auch der Allgemeinzustand des Patienten einbezogen werden. Bei einer neoadjuvanten Chemotherapie erfolgt alle zwei Zyklen ein bildgebendes Re-staging zum Ausschluss einer Progression (Wallace et al., 1991, Grossman et al., 2003).

Aufgrund des bis zu 80% hohen Rezidivrisikos nach Zystektomie sollte beim organüberschreitenden muskelinvasiven Harnblasenkarzinom ( $\geq$ pT3 und/oder pN+) nach der Zystektomie über die Dauer von 3-4 Zyklen eine Cisplatinbasierte Kombinationschemotherapie folgen (Hautmann et al., 2012, Studer et al., 1994). Das metastasierte Urothelkarzinom der Harnblase soll nach Ausschluss der Kontraindikationen für Cisplatin mit einer cisplatinhaltigen Chemotherapie behandelt werden. Nach zwei Zyklen soll das Therapieansprechen mittels Re-Staging ermittelt werden, um eine unnötige Toxizität zu vermeiden (Mead et al., 1998, Studer et al., 1994).

Immuntherapien stehen aktuell nur für Patienten mit Cisplatin Unverträglichkeit oder Progress unter Chemotherapie zu Verfügung. Hierbei haben sich bei positiven PD-L1 Status die Immuncheckpoint Inhibitoren Atezolizumab und Pembrolizumab als geeignet erwiesen (Patel et al., 2018, Massard et al., 2016).

Bei dem metastasierten Harnblasenkarzinom gibt es bisher keinen Tumor- oder Biomarker, der sich für das Monitoring der palliativen Therapie oder im Rahmen der Nachsorge etabliert hat.

#### **1.1.5 Wirtschaftlicher Aspekt bei Blasenkrebs**

Die Behandlung von Krebserkrankungen ist allgemein kostspielig (Luengo-Fernandez et al., 2013). Insbesondere das Urothelkarzinom der Blase verursacht aufgrund hoher Rezidivraten, intensiver Überwachungsstrategien und teurer Behandlungen hohe Kosten für das Gesundheitssystem. Mit jährlichen Kosten von über 3 Mrd. US\$ gehört das Harnblasenkarzinom in den USA bereits zu den fünf teuersten Tumorentitäten und hat die höchsten Behandlungskosten pro Erkrankten (Brown et al., 2002). Dennoch findet, vor allem im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen, deutlich zu wenig Grundlagenforschung statt (Kunath et al., 2013). Trotz der kostenintensiven Therapien hat sich die 5-Jahres Überlebensrate bei Blasenkrebs in den letzten 30 Jahren kaum verbessert (Siegel et al., 2019). Um die Kosten für die Behandlung von Blasenkrebs und die Belastung durch die Erkrankung für die Patienten in Zukunft zu verringern, ist es wichtig, mehr Zeit und vor allem Geld in die Grundlagenforschung zu investieren. Ziel ist die Entdeckung, Erforschung

und Etablierung von Tumormarkern für das Screening, die Therapie und das Monitoring von Blasenkrebs. Dies ist der Grundstein für die Etablierung neuer Therapiemöglichkeiten aber auch zur Verbesserung des Ansprechens auf bereits etablierte Therapien wie beispielsweise die Immuntherapie. Auch die Früherkennung, beziehungsweise die Heilung und das Verhindern von Rezidiven des Blasenkarzinoms kann durch die Entdeckung und Etablierung eines neuen Markers verbessert werden.

## **1.2 Expression von CD276 und anderen Tumormarkern bei Blasenkarzinom und molekulare Regulationsmechanismen**

Im Folgenden wird zunächst auf die Tumorthherapie im Allgemeinen und die Grundlagen der Immunantwort eingegangen. Darauf aufbauend wird auf die Eigenschaften und Regulationsmechanismen der B7 Familie eingegangen und hierbei insbesondere auf CD276 (auch B7H3 genannt), das Teil der B7 Familie ist. Abschließend wird auf die klinische Relevanz der Tumormarker eingegangen.

### ***1.2.1 Tumorthherapie allgemein und Grundlagen der Immunantwort***

Operationen, Radio- und Chemotherapien bilden den Grundstein der heutigen Krebstherapie. Dennoch sind diese Formen der Therapie nicht bei jeder Tumorart ausreichend, um eine Heilung zu erreichen oder zumindest ein Fortschreiten der Erkrankung zu verhindern. In den letzten Jahrzehnten ist es der Forschung gelungen, Tumormarker und Entstehungswege von Tumoren zu erkennen und neue Medikamente zur Behandlung von Tumoren mit bestimmten molekularen beziehungsweise zellulären Mustern zu entwickeln (Esfahani et al., 2020). Diese Tumormarker werden im Zuge der personalisierten Medizin zunehmend relevanter für das Screening, die Diagnostik sowie die Therapie und das Monitoring von Tumorerkrankungen. Die so neu entstandene Immuntherapie bietet neue Möglichkeiten in der Behandlung von verschiedenen Krebsarten, da sie helfen kann, die Aktivität des Immunsystems des Patienten zu modulieren.

Um das Verständnis der Immuntherapie zu erleichtern, werden im Folgenden die grundlegenden Eigenschaften und die Funktionsweise des Immunsystems



vereinfacht dargestellt. Ein wichtiger Bestandteil der spezifischen Immunantwort sind die T-Zellen, bei welchen man die CD4<sup>+</sup> und die CD8<sup>+</sup> T Zellen unterscheiden kann. Die Aktivierung der T-Zelle ist abhängig von zwei voneinander unabhängigen Komponenten: erstens der richtigen Kombination aus T-Zellrezeptor (TCR) und dem antigenen Peptid, das auf den Molekülen des Major Histocompatibility Komplex 1 beziehungsweise 2 präsentiert und im folgenden MHC 1 oder MHC 2 genannt wird. MHC1 und MHC2 werden auf Antigen präsentierenden Zellen (APC) exprimiert. Zweitens ist die Aktivierung abhängig von co-stimulatorischen Signalen. Hier kommen CD276 und andere co-stimulatorische Signale ins Spiel. APC sind in der Lage, Bestandteile von nekrotischen Tumorzellen zu verarbeiten und nach Migration zu lymphoiden Geweben mit CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen zu interagieren und diese im Folgenden zu aktivieren, sodass die T Zellen in der Lage sind, tumorspezifische oder tumorassoziierte Antigene zu erkennen und somit den Tumor zu bekämpfen. Außerdem sind auf der Zellmembran von aktivierten APC immunregulatorische Proteine der B7-Familie zu finden, welche eine Rolle in der Regulation der T-Zellen und somit der adaptiven Immunantwort spielen (Flem-Karlsen et al., 2020). Aktuell gibt es zehn Mitglieder der Familie, von denen sieben B7-Homologe (B7-H) sind. Die B7-Proteine interagieren mit ihrer extrazellulären Immunoglobulin Domäne als Ligand mit den Rezeptoren der CD28/CTLA-4-Familie (Collins et al., 2005). Diese Ligand-Rezeptor-Interaktion kann, in Abhängigkeit vom Rezeptor, sowohl co-aktivierend als auch co-inhibierend auf die T-Zellen und somit das Immunsystem wirken (Yang et al., 2020) (Zang and Allison, 2007).

Studien zeigten, dass eine hoch-Regulation der inhibitorischen B7-Moleküle im Zusammenhang mit einer höheren Immuninvasion des Tumors steht. Ein bekanntes inhibitorisch auf das Immunsystem wirkendes Mitglied der B7-Familie ist das transmembranäre Protein B7-H1, welches auch unter dem Namen PD-L1 bekannt ist (Dong et al., 1999). PD-L1 wird auch von Zellen einer Vielzahl unterschiedlicher Tumore, unter anderem Blasenkrebs, Brustkrebs, Melanomen und nicht-klein-zelligem Lungenkrebs exprimiert (Powles et al., 2014, Herbst et al., 2014, Topalian et al., 2012, Brahmer et al., 2012, Brahmer

et al., 2015). PD-L1 bindet an den PD-1 Rezeptor, der unter anderem auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird und bewirkt deren Inaktivität bis hin zu deren Apoptose. So können Tumore einer Immunantwort entgehen und weiter proliferieren (Dong et al., 1999, Loos et al., 2008, Konishi et al., 2004). Die Expression von PD-L1 wird unter anderem durch Entzündungsmediatoren und Zytokine wie IFN- $\gamma$  und Tumornekrose Faktor (TNF)  $\alpha$  hoch reguliert. 2014 erfolgte die erste Zulassung eines PD-1 Inhibitors zur Behandlung des fortgeschrittenen, nicht resezierbaren Melanoms. Dabei handelte es sich um Pembrolizumab<sup>®</sup>, einen inhibitorisch wirksamen, monoklonalen IgG4 Antikörper. PD-1 wie auch PDL-1 Inhibitoren haben sich seitdem in der Therapie verschiedener Tumorarten, wie beispielsweise dem Melanom oder dem Lungenkrebs, etabliert, um ein Immun Escape der Tumorzellen zu verhindern und die Immunantwort des Körpers gegen den Tumor zu fördern (Topalian et al., 2012, Gong et al., 2018, Wei et al., 2018).

CD276, das auch B7-H3 genannt wird, wurde 2001 von Chapoval et al. entdeckt und wurde aufgrund von 20-27% Übereinstimmung mit anderen Mitgliedern der B7-Familie als ein Mitglied dieser identifiziert (Chapoval et al., 2001). Es existieren drei Isoformen des humanen CD276 mit unterschiedlichen extrazellulären Domänen. Diese Domänen sind homolog zu Immunoglobulin variabler (IgV) und Immunoglobulin konstanter (IgC) Domänen. Es handelt sich bei CD276 um ein Typ 1 transmembranäres Protein, das aber auch im Zytoplasma von Zellen sowie im Nukleus vorliegt (Zang and Allison, 2007, Suh et al., 2003, Flem-Karlsen et al., 2017). Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der B7 Familie kommt CD276 nicht nur in Antigen präsentierenden Zellen (APC), von Tumor infiltrierten dendritischen Zellen und Monozyten vor, sondern auch in Endothel, tumorassoziierten Fibroblasten und Epithel sowie in weiterem Organgewebe (Seaman et al., 2017, Kraan et al., 2014, Crispen et al., 2008). Dort weist es unter anderem auf eine immunmodulatorische Funktion im Bereich von Entzündungen hin (Suh et al., 2003, Chapoval et al., 2001, Seaman et al., 2017, Tran et al., 2008). Initial wurde aufgrund von in vitro Studien davon ausgegangen, dass CD276 einen rein stimulatorischen Effekt auf die Proliferation von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen hat und die Induktion von

zytotoxischen T-Zellen fördert. Außerdem wurde davon ausgegangen, dass CD276 in der Lage ist, selektiv die Produktion von Interferon (IFN)- $\gamma$  zu fördern (Chapoval et al., 2001). Auch einige in vivo Studien mit CD276-negativen Mäusen suggerierten einen rein stimulierend wirkenden Effekt von CD276 auf die Immunantwort. So zeigten CD276-negative Mäuse eine merklich reduzierte Produktion von Zytokinen und weniger chronische Abstoßungsreaktionen nach allogenen Transplantationen. Ein weiteres Mausmodell mit allergischem Asthma zeigte nach der Gabe von anti-CD276 monoklonalen Antikörpern eine signifikant reduzierte Hyperaktivität der Atemwege und eine reduzierte Produktion an IL-4, IL-5 und IL-13 (TH2 Zytokin) (Wang et al., 2005, Nagashima et al., 2008). Die Studien stimmen darin überein, dass CD276 an aktivierte CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> positive T-Zellen bindet (Suh et al., 2003, Sun et al., 2002, Chapoval et al., 2001). Neuere Studien legen jedoch nahe, dass CD276 an mindestens zwei unterschiedliche Rezeptoren binden kann, da es sowohl eine co-stimulatorische als auch eine co-inhibitorische Wirkung auf die T-Zellen haben kann (Prasad et al., 2004, Suh et al., 2003, Luo et al., 2004). Dies führt dazu, dass CD276 einerseits eine Entzündungsreaktion verstärken und andererseits die Immunantwort bei einer Graft-versus-Host-Disease unterdrücken kann (Luo et al., 2015, Veenstra et al., 2015, Zhang et al., 2010). CD276 kann eine Inhibition der T-Zellen und hier insbesondere die TH1 bewirken und so auch die Produktion von IFN- $\gamma$  hemmen. Es ist anzunehmen, dass die Expression von CD276 durch IFN- $\gamma$  gefördert und durch das Zytokin IL-4 gehemmt wird. Da das Zytokin IFN- $\gamma$  vorwiegend durch die TH1 Zellen produziert wird und CD276 die TH1-Zellen hemmt, ist von einer Feedback-Inhibition auszugehen, welche regulierend in die Immunreaktion eingreift und diese reduziert (Suh et al., 2003). Auch wenn einzelne Studien davon ausgehen, dass für einzelne Tumorentitäten eine positive Korrelation zwischen der Expression von CD276 und der Prognose besteht (Loos et al., 2009), so wurde in deutlich mehr Studien gezeigt, dass eine hohe Expression von CD276 mit einer weiter fortgeschrittenen Tumorerkrankung und mit einer kürzeren Überlebenszeit einhergeht (Wu et al., 2015, Zang et al., 2007, Xu et al., 2018a).

CD276 spielt jedoch nicht nur eine Rolle in der Regulation des Immunsystems, sondern auch als intrinsischer Regulator von Tumorwachstum, Metastasierung und Tumorprogression beziehungsweise Invasion (Dong et al., 2018). Es hat Einfluss auf den Zellmetabolismus und die Glykolyse. CD276-vermittelte Signale führen zum sogenannten Warburg Effekt, bei dem in den Tumorzellen eine verstärkte aerobe Glykolyse stattfindet, um den hohen Energiebedarf der Tumorzellen zu decken (Flem-Karlsen et al., 2017, Lim et al., 2016, Li et al., 2019). CD276 wird in Tumorentitäten wie Darm-, Lunge- und Brusttumoren exprimiert aber auch in Endothelzellen von Tumorgefäßen in Nieren-, Blasen- und Prostatumoren, was darauf hindeutet, dass CD276 im Zusammenhang mit der Tumor Neoangiogenese steht (Maeda et al., 2014, Arigami et al., 2010, Ingebrigtsen et al., 2012) (Xylinas et al., 2014b) (Zang et al., 2007). Weitere Studien konnten detailliertere Zusammenhänge zwischen der Höhe der CD276 Expression in Gefäßendothelien und der Mortalität in Abhängigkeit weiterer Faktoren ermitteln (Kasten et al., 2017, Inamura et al., 2019). CD276 wird zusätzlich in niedrigen Konzentrationen auch in gesunden Zellen und Gewebe wie Osteo- und Fibroblasten, Epithelzellen, Leber-, Lungen-, Blasen-, Placenta-, Prostata- und Lungenzellen exprimiert. In verschiedenen Tumorgeweben, wie beispielsweise Blasenkrebs, klarzelligem Nierenkarzinom, Brustkrebs, Zervixkarzinom, Kolorektalkarzinomen und vielen weiteren Tumoren sind jedoch deutlich höhere Konzentrationen von CD276 zu finden. Eine hohe Expression an CD276 verschlechtert oftmals deutlich die Prognose der betroffenen Krebspatienten durch gesteigerte Metastasierung und verringertes Überleben (Wu et al., 2015, Xu et al., 2018a, Xylinas et al., 2014a, Zang et al., 2007)

### **1.2.2 Klinische Relevanz**

Auch in der Zukunft werden die Chirurgie, die Radiotherapie und die Chemotherapie als Therapieoptionen für die Behandlung von Krebs eine wichtige Rolle spielen. Das Thema der individualisierten Medizin wird jedoch eine zunehmend wichtigere Rolle spielen, um Menschen mit Tumorerkrankungen noch bessere Therapieoptionen und eine bessere Prognose zu ermöglichen (Jackson and Chester, 2015). Ein erster Schritt war

die Entwicklung der Immuncheckpointinhibitoren PDL-1/PD1 und CTLA-4, welche sich bereits bei bestimmten Krebsformen in der Therapie etabliert haben, jedoch nicht für die Behandlung jeder Tumorart zur Verfügung stehen. Die Nutzung der monoklonalen anti-PD-1, beziehungsweise anti-PDL-1 Antikörper hat sich in der Therapie des metastasierten Blasenkarzinoms bei PatientInnen mit positiven PDL-1 Status, die nicht für eine Therapie mit Cisplatin geeignet sind oder nach erfolgter Chemotherapie einen Progress erleiden und eine Zweitherapie benötigen, bereits etabliert (Massard et al., 2016, Patel et al., 2018, Sharma et al., 2016). Es sprechen jedoch nicht alle Patienten auf die Immuntherapie an. Ein Teil der Patienten zeigt einen Progress unter der Therapie. Dies unterstreicht die Notwendigkeit der Erforschung der Pathomechanismen bei der Tumorentstehung und der Identifikation von weiteren Tumormarkern sowie -genen und der Etablierung neuer Therapieansätze. In einem zweiten Schritt müssen anschließend die Nutzbarkeit neuer Tumormarker für eine Therapie geprüft und Pharmaka für diesen Zweck entwickelt und erprobt werden.

CD276 als Vertreter der B7-Familie ist ein vielversprechender Marker für das Screening sowie Ansatzpunkt in der Therapie bei vielen Tumorerkrankungen, unter anderem auch Blasenkrebs (Ni and Dong, 2017). Die verstärkte Expression von CD276 in Tumoren wie auch in Tumorgefäßen bietet die Möglichkeit eines potentiellen Biomarkers und ist ein vielversprechender neuer Therapieansatzpunkt (Liu et al., 2021, Xu et al., 2018b, Ingebrigtsen et al., 2012, Ni and Dong, 2017). CD276 ist bei hoher Expression in der Lage, das Ansprechen auf eine Anti-Tumor Therapie zu senken (Liu et al., 2019b, Flem-Karlsen et al., 2019, Flem-Karlsen et al., 2017). Darum ist unter anderem auch die Blockade von CD276 interessant, um die Effizienz der bereits bestehenden Krebstherapien zu erhöhen (Seaman et al., 2017). Erste Daten von Studien mit monoklonalen Antikörpern gegen CD276 zeigten bereits vielversprechende Ergebnisse (Ahmed et al., 2015, Loo et al., 2012, Powderly et al., 2015). Es muss jedoch weiter Grundlagenforschung betrieben werden, um modulierende Faktoren der Expression von CD276 und Rezeptorinteraktionen zu erkennen und um eine zielgerichtete Therapie zu entwickeln. Die Untersuchung von

externen Einflussfaktoren, wie beispielsweise Urogenitaleinfektionen, auf die CD276 Expression bei Blasenkrebs ermöglicht eine präzisere Vorhersage über das Therapieansprechen und auch den Ausschluss von falsch-negativen oder falsch-positiven CD276 Expressionswerten.

### **1.3 Eigenschaften von Mykoplasmen sowie Nachweis und Therapie**

Dieser Teil der Einleitung geht sowohl auf die allgemeinen Eigenschaften als auch auf das kanzerogene Potential von Mykoplasmen ein. Es wird außerdem der Nachweis, das Screening und die Therapie bei einer Erkrankung kurz zusammengefasst. Zusätzlich wird auf die klinische Relevanz, die sich aus einer Langzeitinfektion mit Mykoplasmen ergibt, eingegangen.

#### **1.3.1 Eigenschaften und Nachweis**

Bei Mykoplasmen handelt es sich um Prokaryonten, die taxonomisch in die Klasse der Mollicutes („Weichhäutigen“) zusammengefasst werden. Die Gattung Mykoplasma ist Teil der Familie der Mycoplasmataceae und besteht aus ca. 100 Spezies, von denen beim Menschen bisher 16 Mykoplasma spp. isoliert werden konnten (Abele-Horn, 2004). Mykoplasmen weisen durchschnittlich eine Zellgröße von 0,3 bis 0,8 µm auf (Abele-Horn, 2004). Aufgrund ihres sehr kleinen Genoms mit 580 bis 2200 kbp verfügen sie über eine eingeschränkte Enzymausstattung, die sie in ihren Stoffwechselprozessen einschränkt. Im Vergleich dazu haben andere Bakterien, wie beispielsweise E. coli, eine Genomgröße von 4700kbp (Trevors, 1996). Mykoplasmen kommen als extrazelluläre an der Epithelzellenoberfläche anhaftende Parasiten oder fakultativ intrazelluläre Mikroorganismen vor (Abele-Horn, 2004, Neumann et al., 2010). Bei Parasiten handelt es sich um Lebewesen, welche auf Kosten anderer Spezies leben. Bei Mykoplasmen bedeutet dies konkret, dass sie durch die Anhaftung an der Epithelzelloberfläche und/oder fakultativ intrazelluläre Infektion der Wirtszelle für sich eine optimale Versorgung mit Aminosäuren, Cholesterin und Fettsäuren gewährleisten (Staats et al., 2007). Da sie abhängig von einem Wirt sind, weisen sie aber auch ein deutlich langsames Wachstum auf und sind auch gegenüber Umwelteinflüssen deutlich empfindlicher. Mykoplasmen besitzen eine Zytoplasmamembran, aber keine Zellwand

wodurch sie eine primäre  $\beta$ -Laktamantibiotika Resistenz aufweisen und keine Gram-Färbung als Nachweis möglich ist. Diese primäre Resistenz in Kombination mit ihrer sehr langsamen Proliferation erschwert die in vitro Anzucht für den Nachweis. Man unterscheidet zwischen den respiratorischen und den urogenitalen Mykoplasmen. Je nach Lokalisation weisen die Erreger unterschiedliche morphologische wie auch pathogene Aspekte auf. Während *M. pneumoniae* im Respirationstrakt nur als Krankheitserreger und Auslöser von Tracheobronchitis und teilweise der primär atypischen interstitiellen Pneumonie gilt, kommen *M. genitalium* und *M. hominis* im Urogenitaltrakt sowohl als pathogene als auch als kolonisierende Erreger vor und sind somit als fakultativ pathogen einzustufen (Manhart et al., 2003, Boujema et al., 2018, Waites and Talkington, 2004).

Aufgrund moderner molekularbiologischer Nachweisverfahren, wie beispielsweise dem Nukleinsäureamplifikationstest, hat in den letzten Jahren die Zahl der nachgewiesenen Infektionen mit *M. genitalium* zugenommen. Auch geht man aufgrund von Studien von einem nachgewiesenen Zusammenhang zwischen Infektion mit Mykoplasmen und der nicht-gonorrhöischen Urethritis und einem wahrscheinlichen Zusammenhang mit der Zervizitis sowie der pelvic inflammatory disease (PID) aus. Letztere hat als mögliche Folge eine Infertilität (Clausen et al., 2001). Dies führt dazu, dass *M. genitalium*, welches bei 1 bis 3% der Normalbevölkerung und bei bis zu 35% in Risikopopulationen (z.B. bei HIV-infizierten und MSM) nachzuweisen ist, von Klinikern zunehmend als pathogen eingestuft wird. *M. hominis*, welches vorwiegend auf den Epithelzellen des Urogenitaltraktes von Frauen zu finden sind, können sowohl durch sexuelle Kontakte, insbesondere bei häufigem Partnerwechsel, als auch über Schmierinfektionen während der Geburt übertragen werden und können in diesem Fall bei Neugeborenen im Respirationstrakt nachgewiesen werden. *M. hominis* ist bei 1 % der sexuell abstinenten Personen und bei bis zu 60 % der Prostituierten nachweisbar. *M. hominis* kann zu einer Urethritis, Prostatitis, Zervizitis und Salpingitis führen. Es wird aber auch bei bis zu 80 % der asymptomatischen Patienten nachgewiesen, was dazu führt, dass eine

abschließende klinische Bewertung nicht möglich ist (Dumke and Jacobs, 2020).

Der Labornachweis von Mykoplasmen im Urogenitaltrakt ist durch einen urogenitalen Abstrich und durch eine Analyse des ersten Urinstrahls möglich (Jensen et al., 2004).

### **1.3.2 Screening und Therapie von Mykoplasmeninfektionen**

Da sich bei vielen Menschen im Urogenitaltrakt eine Kolonisation (das heißt eine Besiedlung mit einer geringen Keimzahl, ohne klinische Merkmale einer Infektion bzw. bei fehlender Immunantwort) mit Mykoplasmen nachweisen lässt, diese aber auch oft für die Betroffenen ohne Krankheitswert ist, ist eine generelle Abklärung des Infektionsstatus nicht bei jedem Patienten sinnvoll. Empfohlen ist ein jährliches Screening, vor allem für junge und sexuell aktive Frauen, die ein Risikoverhalten haben oder bereits sexuell übertragbare Krankheiten in der Vorgeschichte aufweisen. Heterosexuelle Männer werden nicht routinemäßig gescreent, es sei denn, sie weisen Risikofaktoren wie beispielsweise wechselnde Sexualpartner oder andere sexuell übertragbare Krankheiten auf. Männer, die Sex mit Männern (MSM) haben, werden, sofern sie innerhalb der letzten 12 Monate sexuell aktiv waren, mindestens einmal jährlich gescreent. Liegt bei einem Patienten eine Infektion mit HIV vor, sollte eine Untersuchung alle 3- 6 Monate stattfinden (Morris, 2019).

Da Mykoplasmen eine primäre Resistenz gegen alle Makrolide besitzen und eine zunehmende Resistenz gegen weitere Antibiotika besteht, sollte bei Vorliegen einer gesicherten symptomatischen Infektion und nach Ausschluss anderer sexuell übertragbare Krankheiten (z.B. Chlamydien und Gonorrhö) eine Resistenztestung vor Therapiebeginn stattfinden, um eine gezielte Therapie zu beginnen (Bonkat et al., 2022, Manhart et al., 2015, Jensen et al., 2016).

### **1.3.3 Klinische Relevanz von Langzeit Infektionen mit Mykoplasmen**

Ein kausaler oder ko-faktorieller Zusammenhang zwischen einer Infektion und dem Auftreten von verschiedenen Krebsarten ist bei vielen Viren und Bakterien bereits bekannt. Zu den prominentesten Beispielen gehören Viren wie EBV, Hepatitis B-Virus, HPV und Bakterien wie Salmonella Typhi und Helicobacter



Pylori (Marshall and Windsor, 2005, Parkin, 2006, Vogelmann and Amieva, 2007). Insbesondere für Helicobacter Pylori ist der Zusammenhang zwischen einer Langzeitinfektion und dem Auftreten von Magenkrebs besonders gut beschrieben (Marshall and Windsor, 2005, Touati, 2010).

Feng et al. zeigten bereits 1999, dass Mykoplasmen infizierte 32D hämatopoetischen Zellen ihre Zelleigenschaften änderten, ein autonomes Wachstum entwickelten und sich vor Apoptose zu schützen (Feng et al., 1999). Paton et al. zeigten, dass die Infektion mit Mykoplasma orale bei WJ-38 Stammzellen einer embryonalen Lunge zu chromosomalen Veränderungen und einer Verlangsamung des Zellwachstums führt (Paton et al., 1965). Auch andere Arbeiten zeigten, dass eine chronische Infektion von Zellkulturen mit Mykoplasmen durch Suppression der p53 Aktivität und Aktivierung von NF-κB zu einer genetischen Instabilität und bösartigen Transformation führen kann (Borchsenius et al., 2018, Feng et al., 1999, Namiki et al., 2009, Logunov et al., 2008). In vivo kann die Infektion mit Mykoplasmen die Metastasierung von einigen menschlichen Tumorzellen steigern (Namiki et al., 2009, Tsai et al., 1995, Gong et al., 2008). Eine weitere negative Eigenschaft von Mykoplasmen ist, dass sie zu einem schlechteren Ansprechen auf eine Anti-Tumor Therapie führen können. Dies geschieht einerseits über eine Resistenz gegen Antikrebs Medikamente und andererseits über eine Unterdrückung der natürlichen Killer Zellen (Zella et al., 2018).

Bereits in den 50er Jahren gab es erste Vermutungen bezüglich des Zusammenhanges zwischen urogenitaler Mykoplasmen Infektion und dem Prostatakarzinom (Steele et al., 1971). Darauf aufbauend gab es weitere Studien, um den Einfluss von Mykoplasmen auf eine maligne Transformation von Prostatazellen nachzuweisen (Namiki et al., 2009, Ji et al., 2019). 2011 wurde von Barykova et al. ein möglicher Zusammenhang zwischen einer Infektion mit Mykoplasmen und der Entstehung eines Prostatakarzinoms aufgrund einer chronischen Entzündung untersucht. Im Rahmen der Studie wurden Männer mit Prostatakrebs mit Männern mit benigner Prostatahyperplasie verglichen. Bei Männern mit einem Prostatakarzinom wurden eine dreifach höhere Präsenz von *M. hominis* und höhere

Antikörpertiter gegen *M. hominis* als bei Männern mit benignen Prostatahyperplasie gefunden (Barykova et al., 2011). Diese Beobachtung wurde auch von weiteren Forschern gemacht (Erturhan et al., 2013). Zusätzlich wurde bei Nierenkrebs wie auch dem Blasenkarzinom die klinische Signifikanz einer Mykoplasmeninfektion untersucht (Pehlivan et al., 2005). Das Ergebnis legt nahe, dass Mykoplasmen die Entstehung von Krebs begünstigen können. Es ist jedoch nicht abschließend geklärt, welchen Einfluss Mykoplasmen bei der Entstehung von Blasenkrebs haben und wie sie sich auf die Expression von Tumormarkern und tumorassoziierten Proteinen bei Blasenkrebs auswirken.

#### **1.4 Ziel der Arbeit**

Das Urothelkarzinom der Blase macht bei Männern über 5% der Krebserkrankungen aus und tritt gehäuft in der 7. Lebensdekade auf (Erdmann et al., 2021). Aufgrund der demographischen Transition wird diese unzureichend erforschte Krebsform zunehmend relevanter und die Behandlung ist mit hohen Kosten verbunden (Brown et al., 2002, Statistisches Bundesamt, o.J.). Dennoch gibt es unzureichend Grundlagenforschung und noch keinen diagnostisch und prognostisch aussagekräftigen Gewebs- beziehungsweise Tumormarker, sodass sich die Therapiemöglichkeiten in den letzten Jahren nicht deutlich verbessert haben und die Behandlungskosten des Blasenkarzinoms aufgrund der Behandlung, Kontrollen und hohen Rezidivraten hoch sind. (Kunath et al., 2013). CD276 gehört zur B7-Familie hat eine vorwiegend negative modulierende Wirkung auf die Immunantwort, indem es die Aktivierung und Proliferation der T-Zellen unterdrückt. Er wird vor allem im Tumorgewebe vermehrt exprimiert und ist Bestandteil in der Immunescape-Strategie von Tumoren. Eine hohe Expression ist meist mit einer schlechteren Prognose und höheren Metastasierung vergesellschaftet da eine hohe Expression von CD276 auch zu einer stärkeren Migration, Invasion und Angiogenese bei Tumoren führt. Da CD276 auch im Blasenkarzinom vermehrt exprimiert wird, ist CD276 sowohl ein vielversprechender Marker für das Screening als auch ein Ansatzpunkt für eine zielgerichtete Therapie.

Der Einfluss von Mykoplasmen auf die Proteinexpression und insbesondere die Expression von Tumormarkern wie beispielsweise CD276, einem vielversprechenden Tumormarker und Therapieansatzpunkt bei Blasenkrebs, ist unzureichend erforscht. Falls Mykoplasmen die Expression von CD276 modulieren, kann sich hieraus nicht nur eine falsch-positive bzw. falsch-negative Diagnostik ergeben, sondern unter Umständen auch ein vermindertes Ansprechen auf neue Therapieansätze, was für den weiteren Therapieverlauf und -erfolg für Patienten entscheidend sein kann.

Ziel der Arbeit ist daher die Analyse des Einflusses einer Infektion mit Mykoplasmen auf die Expression von CD276 in verschiedenen Urothelzellen, sowohl mit als auch ohne Tumor. Für die Untersuchung wurde mit unterschiedlichen Zelllinien und mit aus OP-Präparaten isolierten Zellen und verschiedenen Nachweis- und Messmethoden gearbeitet, um die CD276 Expression der mit Mykoplasmen infizierten und der korrespondierenden gesunden Zellpopulation zu ermitteln und zu vergleichen. Die Vergleichsaspekte sollen zusätzlich Aufschluss darüber geben, auf welcher Ebene sich die Expression unterscheidet: Transkriptebene (RNA), Proteinebene oder bei den Oberflächenproteinen. Die genutzten Analysemethoden sind RT-PCR, Western Blot und Durchflusszytometrie. Zusätzlich wurde mit einer Bilddokumentation ermittelt, ob die Infektion auch zu Unterschieden in der Zellmorphologie oder der Proliferationsrate führt.

## **2 Material und Methoden**

Die genutzten Materialien und Methoden werden im Folgenden genannt und erläutert.

### **2.1 Geräte und Materialien**

Die nachstehende Aufstellung (Tabelle 3) enthält alle für die Versuche genutzten Geräte und Materialien. Um einen besseren Überblick zu ermöglichen, sind die genutzten Substanzen und Chemikalien oberhalb des jeweiligen Versuches separat aufgeführt.

Tabelle 3 Allgemeine Geräte und Materialien

In dieser Tabelle werden die für diese Arbeit genutzten Geräte und Hersteller aufgeführt.

Gerät/Name	Hersteller
CO <sub>2</sub> Inkubator Heracell 240i	ThermoFisher Scientific
Sterilbank SL-1200	BDK
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich
Zentrifuge CombiSpin FVL-2400N	BioSan
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3SR+	Thermo-Fisher Scientific
Zentrifuge 5424	Eppendorf
Zentrifuge 3-30KS	Sigma
Thermoblock LightCycler 480 II	Roche
Nanophotometer	IMPLEN
Mikroskop Primovert	Zeiss
Linse für 10x Vergrößerung Primo-Plan-ACHROMAT 10x/0,25 Ph1 415500-1605-001	Zeiss
Linse für 20x Vergrößerung Primo-Plan-ACHROMAT 20x/0,30 Ph1 415500-1614	Zeiss
Wasserbad 1083	IKA
GlowMax Explorer NanoLuc Technology	Promega
Thermomixer comfort	Eppendorf
Thermocycler	Biometra Uno II
Blot Scanner C-DiGit® Blot Scanner	LI-COR
pH Meter pH Level1	inoLab
FACS BD LSR II	BD Bioscience
Pipettboy	Hirschmann REF 820122218
Eppendorf research Pipetten - 0,5-10 µl - 10-100 µl - 20-200 µl - 100-1000 µl	Eppendorf
Voltage Generator PowerPack 25	Heidolph
Waage 440-47N	Kern
Schüttler DSG 304/M4	Heidolph
Pipetten Aufsätze - 1 ml - 5 ml - 10 ml - 25 ml	NEST REF 17191 NEST REF 326001 NEST REF 327001 Greiner Bio-one REF 760160
96 Well Rundbodenplatte	Greiner bio-one REF 655180
96 Well Platte für Light Cycler	Roche REF 04729692001
Zählkammern C-Chip Disposable Hemocytometer Chips	EnTek Neubauer improved DHC-N01
Trypan Blue 0,4% o,85% NaCl	Lanza REF 17-942E
T 75 Zellkulturflaschen mit Vented Cap	Corning REF 3290
T 25 Zellkulturflaschen Cellbind mit Vented Cap	Corning REF 3289
Luerlock Spritze	BD SM REF 309649
Luer-Lockfilter	Sartorius REF 17598
Fusselfreies Einmaltuch	Kimberly Clark Professional REF 05511
RNaway	Thermofisher Scientific REF 10328-011
Zellschaber	Corning REF 3010
Advantage RT-for-PCR-Kit	Takara REF 639506

## 2.2 Probenmaterial

Für die Arbeit wurden drei kommerziell erhältliche und in der Literatur gut beschriebene Blasentumor Zelllinien (siehe Tabelle 4) sowie zwei aus OP-Material präparierte somatische Urothelzellen aus zwei verschiedenen Harnleitern untersucht (Tabelle 5).

### Etablierte Tumor Zelllinien:

*Tabelle 4 Übersicht der Zelllinien*

*Übersicht über die Eigenschaften der kommerziell erwerblichen Tumor-Zelllinien T24, Cal29 und HT1197*

	<b>Cal29</b> (DSMZ, o.J.)	<b>T24</b> (ATCC, o.J.)	<b>HT1197</b> (ATCC, o.J. )
<b>Klon-nr.</b>	DSMZ no: ACC515	ATCC® HTB-4	ATCC® CRL- 1473
<b>Diagnose</b>	Blasenkrebs	Blasenkrebs	Blasenkrebs
<b>Geschlecht</b>	weiblich	weiblich	männlich
<b>Alter</b>	80 Jahre	81 Jahre	44 Jahre

Für den Versuch wurden sowohl kontaminationsfreie als auch mit Mykoplasmen infizierte Zellen separat gehalten und getestet. Hierbei ist es wichtig hervorzuheben, dass die Zelllinien Cal29 und T24 bereits infiziert aufgetaut wurden und über einen Zeitraum von vier Wochen mit gesunden Kulturen der Zelllinien verglichen wurden, während bei HT1197 nach einer Woche eine Neuinfektion durchgeführt wurde (siehe 2.3.3). Der genaue Versuchsaufbau der etablierten Zelllinien ist in Abbildung 3 dargestellt.

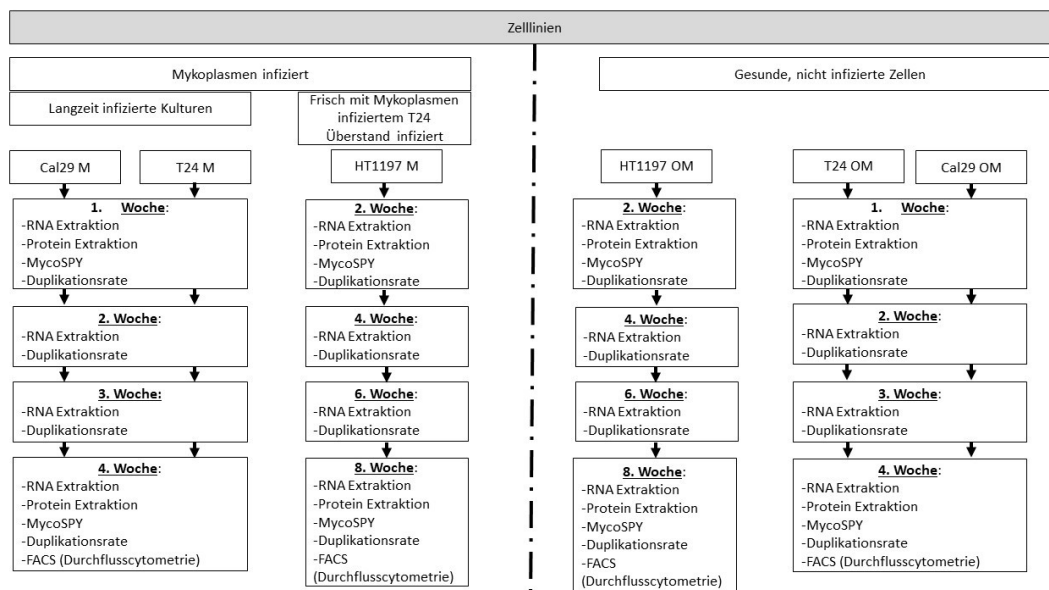


Abbildung 3 Versuchsaufbau der etablierten Zelllinien Cal29, T24 und HT1197  
 In dieser Abbildung ist der Versuchsaufbau für die kommerziellen Tumorzelllinien Cal29, T24 und HT1197 skizziert wobei zwischen den nicht-infizierten und den infizierten Kulturen unterschieden wird.  
 OM= Ohne Mykoplasmeninfektion M= mit Mykoplasmeninfektion

**Aus OP-Material präparierte und isolierte Zellen:**

Die Harnleiterzellen (siehe Tabelle 5) wurden aus Harnleitern aus Präparaten der Urologie der Uniklinik Tübingen isoliert und sofort verwendet. Die Verwendung dieser Zellen zu Studienzwecken wurde von der Ethikkommission unter 840/2020B02 bewilligt. Die Zellen wurden erst expandiert und schließlich auf sechs T25 Flaschen verteilt. Nach der zweiten Passage erfolgte nach einer Woche die Infektion von drei der sechs Kulturflaschen mit jeweils 1 ml aufbereitetem T24 Überstand (siehe 2.3.3).

Tabelle 5 Übersicht der Harnleiterzellen  
 In dieser Tabelle sind die Eigenschaften der aus OP-Präparaten isolierten Harnleiterzellen aufgeführt

	HL 20/31	HL 20/32
<b>Diagnose</b>	Schrumpfniere	Blasenkrebs
<b>Geschlecht</b>	weiblich	männlich
<b>Alter</b>	64 Jahre	73 Jahre

**2.3 Allgemeine Zellkultur und Proliferationsrate**

Alle Kulturen wurden in einem CO<sub>2</sub>- Inkubator bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C inkubiert und erhielten in festgelegten Abständen einen Wechsel des Mediums sowie eine Passage. Es wurde ausnahmslos an der Sterilbank unter partikelfreier

Umluft gearbeitet. Um jegliches Kontaminationsrisiko zu vermeiden, wurde darauf geachtet, dass nicht dieselbe Pipette oder derselbe Saugaufsatz für unterschiedliche Kulturen genutzt wurde.

### **Proliferationsrate:**

Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurden Zählkammern genutzt. Die Zellen wurden wie gewohnt für die Passage abgelöst und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet bei Zelllinien in 10ml bzw. bei Harnleitern in 1 ml Medium suspendiert. Anschließend wurden 20 µl der Suspension mit einer Pipette abgenommen und mit 20 µl Trypan Blue in einer Kammer einer 96 Well Rundbodenplatte durch Auf- und Abpipettieren gut gemischt und schließlich jeweils 20 µl in Kammer A und B der Neubauer Zählkammer gegeben. Anschließend wurden die Zellen unter dem Mikroskop gezählt und der Mittelwert aus beiden Kammern für die Berechnung der nächsten Aussaat genutzt

### **Formel für die Aussaat von $5 \times 10^5$ Zellen:**

$$\frac{\left[ \frac{(A + B)}{2} \right]}{2} = x \times 10^4 \text{ Zellen pro ml} = (0,1 \times x) \times 10^5 \text{ Zellen pro ml} = x \times 10^5 \text{ pro 10ml}$$

A= Anzahl der lebendigen Zellen in Quadranten A

B= Anzahl der lebendigen Zellen in Quadranten B

$$10000 \div \left( \frac{x \times 10^5 \text{ Zellen}}{5 \times 10^5 \text{ Zellen}} \right) = y \mu\text{l Zellsuspension}$$

$$10000 - y = z \mu\text{l Medium}$$

#### **2.3.1 Zellkultur und Passage der Zelllinien (Cal29, T24 und HT1197)**

Die etablierten Zelllinien wurden in T 75 Zellkulturflaschen gehalten. Alle drei Tage wurde das alte Medium abgesaugt und durch 10 ml frisches Medium, welches zuvor im Wasserbad auf 37 °C erwärmt wurde, ersetzt.

Für die Passage wurde zunächst das alte Medium mit dem Sauger entfernt. Anschließend wurde in jede Flasche 7 ml PBS (siehe Tabelle 7) hinzugeben und die Flasche geschwenkt, um das Serum (FRS) zu entfernen. Danach wurde auch PBS wieder abgesaugt, um im nächsten Schritt 3 ml Trypsin-EDTA

hinzuzugeben. Die Kulturflaschen wurden nun in den Inkubator gestellt und nach 5 Minuten wurden die Flaschen seitlich beklopft, um danach unter mikroskopischer Kontrolle festzustellen, ob sich die Zellen gelöst haben. Nachdem sich alle Zellen gelöst hatten, wurden zunächst mit einer Pipette 3 ml Zelllinienmedium hinzugeben, um die Wirkung von Trypsin abzustoppen. Danach wurden die nun insgesamt 6 ml Flüssigkeit mehrfach am Flaschenboden entlang gespült, um noch verbleibende Zellen abzulösen und in der Suspension aufzunehmen. Anschließend wurden die Zellsuspension in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Danach wurde der Boden der Flasche ein weiteres Mal mit einer Pipette und 10 ml Zelllinienmedium mehrfach abgespült und auch diese 10 ml wurden in den 50 ml Zentrifugationsröhrchen übertragen.

Das Zentrifugationsröhrchen wurde anschließend in einer austarierten Zentrifuge für 7 Minuten bei 1500rpm zentrifugiert, sodass sich ein deutliches Zellpellet bildete und der Überstand vorsichtig abgesaugt werden konnte, bevor das Pellet in 10 ml Zelllinienmedium, durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren, wieder aufgelöst werden konnte. Im nächsten Schritt wurden die Zellen in Zählkammern gezählt (siehe 2.3) und mittels Eppendorf Pipette wurden  $5 \cdot 10^5$  Zellen (bzw.  $1 \cdot 10^5$  bei den mit Mykoplasmen infizierten Zellen) aus der Suspension in neue Kulturflaschen überführt und mit der passenden Menge an Zelllinienmedium (siehe Tabelle 6) ergänzt. Die Flasche wurde erneut geschwenkt, damit sich die Zellen gleichmäßig auf dem Flaschenboden verteilten und nicht nur an einer Stelle adhärent werden. Danach wurde die Flasche wieder in den Inkubator gelegt und das Medium wurde alle drei Tage erneuert. Für den gesamten Zeitraum zwischen der ersten und zweiten Passage wurde alle 24 Stunden eine Fotodokumentation unter dem Mikroskop bei 10- und 20-facher Vergrößerung durchgeführt.

*Tabelle 6 Bestandteile Zelllinienmedium*

*In dieser Tabelle sind die Bestandteile des Mediums für die kommerziellen Tumor-Zelllinien inklusive der Hersteller aufgeführt. MEM: Minimal Essential Medium*

<b>Menge</b>	<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
450 ml	MEM mit Earle's Salzen ohne L-Glutamin	BIO SELL REF BS.F 0325
50 ml	FRS (fetales Rinderserum)	Sigma
5 ml	Pen/Strep	Gibco REF 15140-122



Tabelle 7 Material für die Zellpassage

In dieser Tabelle ist das Material für die Zellpassage der kommerziellen Tumor-Zelllinien inklusive der Hersteller aufgeführt. EDTA: Ethylendiamintetraacetic acid PBS: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

Menge	Name	Hersteller
	Zelllinienmedium (s.o.)	Siehe Tabelle 6
Ca. 7 ml pro Kulturflasche	PBS	Sigma REF D8537
3 ml pro Kulturflasche	Trypsin- EDTA Solution	Sigma REF T3924

### 2.3.2 Zellkultur und Passage der aus nativ Präparaten isolierten

#### Harnleiterzellen

Das für die nativen Zellen verwendete KSFM-Medium ist lichtempfindlich und wurde zum Schutz mit Alufolie umwickelt. Es besteht aus den in Tabelle 8 aufgeführten Substanzen:

Tabelle 8 KSFM-Zellmedium der präparierten Tumorzellen

In dieser Tabelle sind die Bestandteile des Zellmediums für die aus OP-Präparaten isolierten Harnleiterzellen inklusive der Angabe der Hersteller. KSFM: Keratinocyten Serum-freies Medium. HEPES: 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure EDTA: Ethylendiamintetraacetat

Menge	Name	Hersteller
500 ml	Keratinocyte-SFM	Gibco REF 17 005-034
	Supplemente KSFM	Gibco REF 37000-015
5 ml	Pen/Strep	Gibco REF 15140-122
500 µl	Choleratoxin Arbeitslösung	Biological Laboratories Inc. REF 100B
	<b>Stripping- Lösung:</b> 500 ml HBSS 0,35g/l NaHCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 5 ml 10mM HEPES 20KIU/ml Aprotinin 50 ml EDTA 1%	Sigma REF H9394 Gibco REF 15630-056 Calbiochem REF 9087-70-1 Biochrom REF L-21133

Zunächst wurden die Harnleiterzellen aus dem Präparat isoliert. Hierfür wurde der native Harnleiter zunächst in einer sterilen Petrischale mit 5 ml Medium gelagert und mittels Schere und Pinzette geschlitzt und von Geweberesten befreit. Dann wurde das Gewebe in 15 ml Strippinglösung (Tabelle 8) überführt und für die Dauer von 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden in einer frischen Petrischale 3 ml KSFM-Medium vorgelegt und die Urothelzellen mittels Gewebeschaaber aus dem Präparat gewonnen, sodass sich die Zellen im vorgelegten Medium verteilten. Dieses Medium wurde in einen Zentrifugationsröhrchen überführt. Das Gewebe wurde noch zweimal mit jeweils 5 ml frischem KSFM -Medium gespült und auch diese Suspension wurde in das Zentrifugationsröhrchen überführt. Es folgte eine Zentrifugation mit 200 rpm für die Dauer von 5 Minuten bei 20 °C. Danach wurde der Überstand abgesaugt,

das Pellet in 2,5 ml Medium re-suspendiert und in eine T25 Zellkulturflasche überführt. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und erhielten alle 2 Tage einen Mediumswechsel, bei dem jedes Mal circa 10 % des alten Mediums belassen wurde, da die Zellen parakrine Wachstumsfaktoren sekretieren und ein besseres Wachstum beobachtet wurde, wenn man einen Teil des alten Mediums belässt.

Der gesamte Prozess der Gewinnung und Aufbereitung der Zellen über Fertigung eines Häutchenpräparats bis hin zur AE1/AE3 Färbung zum Nachweis des urothelialen Phänotyps wurde im Rahmen dieser Arbeit eigenständig gefilmt, vertont und zu Lehrzwecken der Universitätsklinik für Urologie (Kurs „Vitale Implantate“ für Studierende der Medizintechnik) zur Verfügung gestellt.

### **Passage**

Die Harnleiterzellen zeigten ein deutlich langsames Wachstum als die Zelllinien und wurden deshalb nur alle drei Wochen passagiert. Der genaue Versuchsaufbau ist aus Abbildung 4 zu entnehmen. Die verwendeten Substanzen pro Flasche sind in Tabelle 9 aufgeführt.

*Tabelle 9 Substanzen für die Passage der aus Harnleitern isolierten Zellen  
In dieser Tabelle sind die Substanzen für die Passage der aus Harnleitern isolierten Zellen inklusive der Hersteller angegeben. EDTA: Ethylendiamintetraacetat*

Menge	Name	Hersteller
25 ml	0,1% EDTA (36 ml PBS ergänzt mit 4 ml 1% EDTA)	Biochrom REF L2113 Sigma REF T3924
1 ml	TrypLE Express	Gibco REF 12563-011
16 ml	KSFM-Medium	Siehe Tabelle 8

Zunächst wurde das alte Medium komplett abgesaugt. Dann wurde mit einer Pipette 2,5 ml 0,1% EDTA in PBS pro Kulturflasche hinzugegeben und die Flasche zum Verteilen der Flüssigkeit geschwenkt. Danach wurde die Flasche bei 37 °C für 8 Minuten inkubiert. Es erfolgte eine mikroskopische Kontrolle, ob die Zellen sich abrunden und sich die Zell-Zell-Kontakte lösen, dabei waren die Zellen weiterhin adhärent am Flaschenboden. Im nächsten Schritt wurde die PBS-EDTA Lösung abgesaugt und je 1 ml TrypLE Express pro Kulturflasche hinzugegeben. Dann wurde die Flasche für 2 Minuten bei 37 °C inkubiert, bis

sich die Zellen durch leichtes Beklopfen der Flasche lösen. Nach Kontrolle unter dem Lichtmikroskop wurde mit einer Pipette zunächst mit 5 ml KSFM-Medium mehrfach entlang des Bodens der Kulturflasche gespült, bevor die 6 ml Flascheninhalt in einen Zentrifugationsröhrchen überführt wurden. Dann wurde der Boden nochmals mit einer frischen Pipette mehrfach mit weiteren 5 ml frischem Medium gespült und anschließend in das Zentrifugationsröhrchen übertragen. Es folgte eine austarierte Zentrifugation bei 1100 rpm für 7 Minuten. Danach wurde der Überstand mit einem Sauger abgenommen und verworfen und das Pellet mit einer Pipette in 1ml frischen Medium wieder aufgelöst. Die Urothelzellen wurden mit einer Eppendorf Pipette in neue, speziell beschichtete Kulturflaschen gegeben und mit 5 ml frischem KSFM-Medium ergänzt. Zuletzt wurde die Kulturflasche geschwenkt, damit sich der Inhalt über den gesamten Boden homogen verteilt, bevor die Kulturflaschen wieder in den CO<sub>2</sub>-Inkubator gelegt wurden und wie gewohnt nach zwei Tagen einen Mediums Wechsel erhielten.

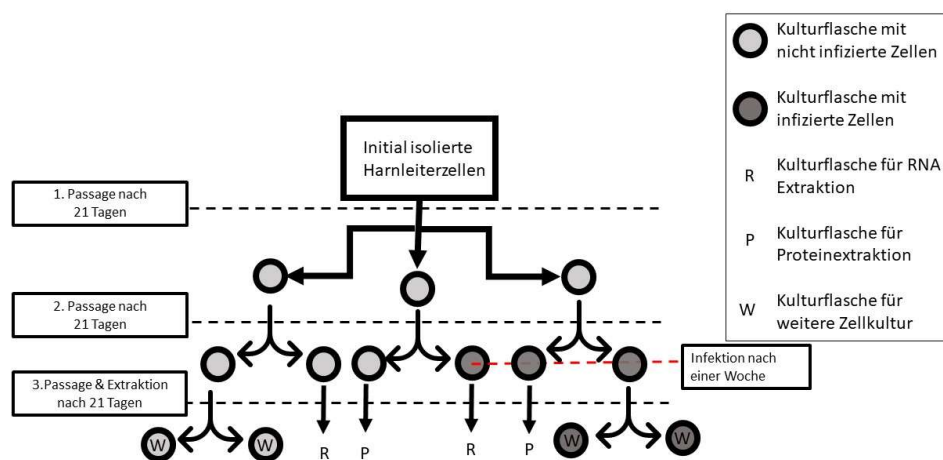


Abbildung 4 Kulturschema der isolierten Harnleiterzellen

Diese Abbildung zeigt das Schema, nach welchem die Zellkultur der aus OP-Präparaten isolierten Zellen kultiviert wurden, um die Zellmenge zu expandieren. Hierbei sind die nicht-infizierten Zellen hellgrau markiert, während die mit Mykoplasmen infizierten Zellen dunkelgrau markiert sind.

### 2.3.3 Infektion von HT1197, HL20/31 und HL20/32

Zunächst wurde der Überstand mehrerer, durch MycoSPY<sup>®</sup> nachgewiesenen, infizierten T 24 Zellkulturen abgenommen und 20 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Dann wurde der Überstand mit einer Pipette abgenommen und in eine offene 100 ml Luer-Lock-Spritze mit aufgeschraubten 0,4 µm Filter

überführt. Anschließend wurde der Spritzenstempel wieder eingebracht und der Überstand in einen frischen sterilen 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und im Kühlschrank gelagert. Durch dieses Verfahren wurde sichergestellt, dass die Zellbestandteile entfernt wurden, aber die Mykoplasmen mit einer Größe von 0,3 bis 0,8 µm noch vorhanden sind und für eine Infektion sorgen können.

Dieses Konzentrat wurde im Folgenden genutzt, um gesunde Zellen zu infizieren.

### **Infektion von HT1197:**

Die Zelllinie HT1197 wurde zunächst mit einer Aussaat von  $5 \times 10^5$  Zellen pro Flasche auf sechs Kulturflaschen hochgezogen. Nach einer Woche wurden bei drei Flaschen beim regulären Mediumwechsel, nachdem das alte Medium zuvor vollkommen entfernt wurde, je 1,5 ml aufbereiteter T24 Überstand und je 8,5 ml frisches Medium hinzugegeben. Dieser Ablauf wurde nach drei Tagen wiederholt, danach erfolgte die normale Zellkultur wie unter 2.3.1 beschrieben.

### **Infektion der nativen Urothelzellen:**

Vor der ersten Infektion wurden die Harnleiterzellen zunächst eine Woche expandiert, dann wurde 1 ml altes Medium incl. der parakrin gebildeten Wachstumsfaktoren belassen und mit 4 ml frischem KSFM-Medium ergänzt. Zur Infektion mit Mykoplasmen wurde 1 ml zentrifugierter und gefilterter T 24 Überstand hinzugegeben, sodass in Summe 6 ml Medium in der T 25 Flasche waren. Zwei Tage später, wurden 5 ml des alten Mediums abgenommen und durch 4 ml frisches KSFM-Medium sowie erneut 1 ml T24-Überstand ersetzt. Danach erfolgte der Wechsel des Mediums wie unter 2.3.2 beschrieben.

## **2.4 RNA-Extraktion, Umschreibung in cDNA und qRT-PCR**

### **2.4.1 RNA-Extraktion**

Über einen Zeitraum von vier Passagen wurde bei jeder Passage der Zellkulturen RNA für die PCR isoliert. Hierfür wurden die Zellen zunächst wie gewohnt abgelöst, mit PBS verdünnt und zentrifugiert (nach dem unter 2.3.1 beschriebenen Verfahren für Zelllinien und nach dem unter 2.3.2 bei

Harnleiterzellen). Dann wurde der Überstand mit einer Pipette abgesaugt und das Pellet in 10 ml gekühltem (4 °C) PBS re-suspendiert und erneut bei 1500 rpm für 7 Minuten zentrifugiert. Dann wurde der PBS-Überstand erneut mit einer Pipette entfernt und verworfen und das Pellet mit einer Eppendorf Pipette in 350 µl RLT mit Mercaptoethanol gelöst und dann bei -80 °C gelagert. Die RNA-Extraktion erfolgte mit einem Reagenzienkit nach Angaben des Herstellers (RNeasy, Qiagen; (Tabelle 10). Nachdem sämtliche Proben von allen Zelllinien und Harnleitern vorhanden waren und mindestens eine Stunde bei -70 ° gelagert waren, wurde die RNA im ersten Schritt in cDNA umgeschrieben.

### **RNA Aufreinigung durch Chemo-adsorption:**

Zunächst wurde der Arbeitsplatz mit RNAway gereinigt, um eine Kontamination mit fremder RNA und mit RNasen zu vermeiden. Im Folgenden wurde mit den Reagenzien und dem Material aus Tabelle 10 gearbeitet. Mit einer Eppendorf Pipette wurden zu jedem Zellextrakt je 350 µl 70% Ethanol hinzugegeben. Anschließend wurde jede Probe einzeln, immer mit einer frischen 1 ml Spritze mit Kanüle, mehrfach aufgezogen und ausgestoßen, sodass die Zellen homogenisiert wurden und die RNA frei wurde. Dann wurde mit derselben Spritze die gesamte Menge auf eine Mini Spin Column übertragen, welche bereits in einem 2 ml Collection Tube steckte.

Nachdem so alle Proben einzeln auf ihre Säulen übertragen wurden, folgte die erste Zentrifugation bei 10000 rpm für 15 Sekunden. Die Zentrifuge wurde bei jeder Nutzung austariert. Der Durchfluss, der sich nach diesem Prozess im 2 ml Collection Tube befand, wurde entfernt und im nächsten Schritt wurde auf die Säulen der Proben jeweils 350 µl RW1 hinzugegeben und es folgte die zweite Zentrifugation wieder bei 10000 rpm für 15 Sekunden. Auch nach diesem Schritt wurde der Durchfluss verworfen. Dann wurde mit einer Eppendorf Pipette 80 µl DNase auf jede Säule übertragen und es folgte eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach dieser Zeit wurden jeder Säule 350 µl RW1 hinzugegeben und die Proben wurden erneut bei 10000 rpm für eine Dauer von 15 Sekunden zentrifugiert. Nun wurden die Säulen auf die 2 ml Zentrifugationsröhrchen (sog. Collection Tubes) umgesteckt und die Säulen mit

jeweils 500 µl RPE zweimal gewaschen. Nach der ersten Zugabe wurde 15 Sekunden und bei der zweiten 2 Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde nach jeder Zentrifugation verworfen. Abschließend wurden die Säulen nochmals 15 Sekunden diesmal aber ohne Waschzusatz zentrifugiert. Die Säulen wurden nach diesem Schritt auf das 1,5 ml Collection Tube mit Deckel umgesetzt und jede Säule wurde mit einer Pipette mit 40 µl RNA-freiem Wasser zum Lösen der RNA aus der Säule versetzt und eine Minute inkubieren gelassen. Es folgte die letzte einminütige Zentrifugation bei 10000 rpm. Danach konnte die Säule verworfen und die nun isolierte RNA auf Eis gelagert werden.

*Tabelle 10 Reagenzien und Material für die RNA-Extraktion  
In dieser Tabelle sind Reagenzien zur Durchführung der RNA-Extraktion inklusive der Hersteller aufgeführt.*

Name	Hersteller
70% Ethanol	Sigma-Aldrich
RLT Mercaptoethanol RW1 Wash Buffer	AppliChem REF A3380100
Buffer RPE Wash buffer	RNA Mini Kit Qiagen® REF 74106
RNase Free Water	
RNeasy Mini Spin Column (Säulen)	
2 ml Collection Tubes	
1,5 ml Collection Tubes mit Deckel	
DNase: 70 µl RDD Buffer mit 10 µl Aliquot	

#### **2.4.2 Umschreiben der RNA in cDNA mittels Reverser Transkription**

Alle Reagenzien aus Tabelle 11 mussten nach dem Auftauen gevortext, abzentrifugiert und auf Eis gelagert werden. Das UV-Spektralphotometer (NanoDrop) wurde genutzt, um die Menge an enthaltener RNA zu bestimmen.

*Tabelle 11 Reagenzien für Reverse Transkription  
In dieser Tabelle sind die Mengen der Substanzen und deren Hersteller für die Reverse Transkription zum Umschreiben von mRNA in cDNA aufgeführt.*

Menge	Name	Hersteller
1 µl pro Probe	Oligo dt-Primer	Takara cDNA SyntheseKit
	Depc-Water	Takara cDNA SyntheseKit
<b>Mastermix pro Probe:</b>		Takara cDNA SyntheseKit
-4 µl 5x Puffer		
-1 µl dNTP		
-1 µl AMV reverse Transkriptase		
-0,5 µl RNase Inhibitor		

Zunächst wurde mit 1 µl Ampuwa der Blank bestimmt und dann jeweils der RNA Gehalt von 1 µl pro Probe mittels Extinktion bei 260 nm Wellenlänge gemessen. Das Ergebnis wurde durch das Gerät in ng/µl angegeben. Zwischen jeder Probe wurde der Rest der vorherigen Probe mit einem fussselfreien Einmaltuch entfernt, um eine Falschmessung zu verhindern.

Mit den notierten Werten und der folgenden Formel wurde berechnet, mit wieviel µl Depc-Water die Proben verdünnt werden mussten, um 1 µg/ml umzuschreiben.

$$1000 \div x = y \text{ (Menge an RNA in } \mu\text{l)}$$

$$12,5 - y = \text{Menge an Depc - Water in } \mu\text{l}$$

$$y + z = 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

X= in Nanodrop ermittelter Wert der Probe

Y= Menge an RNA in µl

Nun wurde in neuen Zentrifugationsröhrchen für jede Probe das errechnete Verhältnis an RNA und Depc-Water zusammen pipettiert und im Anschluss gevortext und auf Eis gelagert. Danach wurde jeder Probe 1 µl oligo-dT Primer hinzugegeben und erneut gevortext und zentrifugiert. Dann wurden die Proben für die Dauer von zwei Minuten bei einer Temperatur von +70 °C in den PCR-Block gestellt, um Bereiche mit RNA-RNA-Doppelhelices aufzuschmelzen und eine durchgehende cDNA-Synthese zu ermöglichen. Nach Ablauf der zwei Minuten wurden die Proben wieder auf Eis gestellt und daraufhin wurde in einem separaten Zentrifugationsröhrchen der Mastermix angemischt.

Jedem Zentrifugationsröhrchen wurden 6,5 µl Mastermix hinzugegeben und im Anschluss gründlich gevortext und kurz zentrifugiert, bevor die Proben zügig erneut in den PCR-Block gegeben wurden und die cDNA-Synthese für die Dauer von 67 Minuten bei 42 °C stattfand. Nach Ablauf der Zeit wurden die Proben erneut auf Eis gelagert und jeder Probe 80 µl Depc Water hinzugegeben, sodass sich in Summe in jedem Zentrifugationsröhrchen nun 100 µl befinden. Die cDNA-Proben wurden bis zur PCR bei -20 °C gelagert,

während die restliche RNA jeder Probe als Reserve bei -80 °C aufbewahrt wurde.

### 2.4.3 qRT-PCR

Für die PCR wurden zunächst alle in Tabelle 12 aufgeführten Substanzen und Proben aufgetaut, gevortext, abzentrifugiert und auf Eis gelagert. In sterilen Zentrifugationsröhrchen wurden danach die Mastermixe hergestellt.

*Tabelle 12 Reagenzien für Mastermixe der PCR*

*In dieser Tabelle sind die Menge der Substanzen und deren Hersteller zur Herstellung des Mastermix für die qRT-PCR aufgeführt.*

Menge	Name	Hersteller
2 µl	cDNA pro Probe	
<b>Material Mastermix pro Probe:</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 6 µl NTW</li> <li>- 10 µl Sybrgreen</li> <li>- 2 µl Primer (pro Mastermix nur ein Primer):               <ul style="list-style-type: none"> <li>- CD276 (Efficiency 1,775)</li> <li>FORWARD Sequence: TTTCCCTTTCCCTCCTTCCTCC</li> <li>REVERSE Sequence: TGTGACCAGCACATGCTTCC</li> </ul> </li> <li>- GAPDH (Efficiency 1,66)               <ul style="list-style-type: none"> <li>FORWARD Sequence: GAGTCAACGGATTTGGTCGT</li> <li>REVERSE Sequence: TTGATTTTGGAGGGATCTCG</li> </ul> </li> <li>- β-Aktin (Efficiency 1,915)               <ul style="list-style-type: none"> <li>FORWARD Sequence: AACTGGGACGACATGGAGAA</li> <li>REVERSE Sequence: ATACCCCTCGTAGATGGGCA</li> </ul> </li> </ul>		
		Roche REF 04887352001
		Eurofins
		Biomol GmbH
		Eurofins
2 µl	SMC (smooth muscle cell cDNA)	
<b>Transgelina-Mastermix (Positiv Kontrolle):</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 6 µl NTW</li> <li>- 10 µl Sybrgreen</li> <li>- 2 µl Tag-Primer</li> </ul>		
		Roche REF04887352001
		Qiagen

Für jede Probe wurde drei Mastermixe, welche sich in den Primern (CD276 sowie die Housekeeping Gene (oder auch Referenz Gene genannt) GAPDH und β-Aktin) unterschieden hergestellt. Jeder Primer wurde pro Probe doppelt getestet. Nachdem nun drei Mastermixe für die Proben und ein Mastermix für die Positivkontrolle hergestellt wurden und diese nach der Herstellung gevortext, abzentrifugiert und auf Eis gelagert wurden, konnte mit dem Pipettieren nach dem Layout Schema begonnen werden.



Zunächst wurden 2 µl SMC für die Positivkontrolle pipettiert. Danach wurden mit einer frischen Pipettenspitze in drei Wells jeweils 2 µl NTW für die Negativkontrolle des jeweiligen Primers pipettiert. Nachdem die ersten vier (Standard) Wells befüllt waren, wurde immer mit einer frischen Pipettenspitze auf den Boden von sechs frischen Wells der Platte jeweils 2 µl pro Probe pipettiert. Anschließend konnte mit der Zugabe des Mastermix begonnen werden. Im ersten Schritt wurden 18 µl Transgelin (Tag)-Mastermix an den Rand des Wells der SMC Probe hinzugegeben. Dann wurde, mit einer frischen Pipettenspitze, zunächst 18 µl GAPDH Mastermix einem der Wells mit NTW als Negativkontrolle hinzugegeben. Danach wurden an den Rand von jeweils zwei Wells pro Probe jeweils 18 µl GAPDH Mastermix hinzugegeben. Analog dazu wurde jeweils mit dem β-Aktin- als auch mit dem CD276- Mastermix verfahren. Daraus ergibt sich, dass pro Probe sechs Wells der Platte benötigt wurden und jeder Mastermix in 2 Wells pro Probe und zusätzlich ein Well für die Kontrolle benötigte.

Nachdem alles zusammen pipettiert war, wurde die Folie auf der Platte angebracht und festgestrichen. Dann wurde die Platte für die Dauer von einer Minute bei 1000 rpm in einer austarierten Zentrifuge zentrifugiert. Danach wurde der LightCycler480 programmiert und die PCR gestartet. Die genauen Angaben der Programmeinstellungen sind Tabelle 13 zu entnehmen.

*Tabelle 13 Übersicht Programmeinstellung der qRT-PCR  
In der Tabelle sind die Schritte der qRT-PCR inklusive Zyklen und Zeit sowie Temperatur aufgeführt.*

Programm	Zyklen	Zeit	Temperatur
Denaturierung	1	5 Minuten	95 °C
Amplifikation	39	10 s – 20 s – 30 s	95 °C – 60 °C – 72 °C
Schmelzkurve	1	5 s – 30 s - kontinuierlich	95 °C – 60 °C – 97 °C
Kühlung	1	30 s	4 °C

Nach Ablauf der PCR konnte die Platte bei -20 °C gelagert werden.

Für die Berechnung der relativen Expression an CD276 wurden die Werte der qRT-PCR von CD76 sowie der Referenz Gene GAPDH und β-Aktin in folgende Formel eingesetzt:

$$\Delta C_t = \Delta C_t (CD276) - \Delta C_t (Referenzgene)$$

$$\text{Relative Expression CD267} = 2^{(-\Delta C_t)}$$

## **2.5 Proteinbestimmung mittels Western Blot**

Nachfolgend werden die Schritte zur Durchführung des Western Blots erläutert.

### **2.5.1 Proteinextraktion**

Nach der ersten als auch der vierten Versuchswoche wurden zusätzlich von jeder Zelllinie jeweils Proteine für Western Blot Lysate isoliert. Bei den isolierten Harnleiterzellen war dies nur nach der ersten Passage möglich. Zum Herstellen der Lysate wurden die Zellen, in einem ersten Schritt wie gewohnt abgelöst, gewaschen und zentrifugiert (siehe 2.3). Das entstandene Pellet wurde nun jedoch, analog zur RNA-Extraktion, in 10 ml 4 °C PBS gelöst und im Zentrifugationsröhrchen erneut bei 1500 rpm für eine Dauer von 7 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde danach abgesaugt und das entstandene Zellpellet wurde in 200 µl RIPA+ re-suspendiert. Die Proben wurden bis zum Western Blot bei -80 °C gelagert.

Nachdem von allen Proben die Lysate vorhanden waren, wurden diese aufgetaut und in 2 ml Zentrifugationsröhrchen überführt, bevor sie für die Dauer von 20 Minuten bei 15000 rpm und 4 °C abzentrifugiert wurden, um unlösliche Fraktionen zu sedimentieren. Anschließend wurde der Überstand in frische und bereits gekühlte Zentrifugationsröhrchen überführt und auf Eis gelagert, während das vorherige Zentrifugationsröhrchen inklusive Pellet verworfen wurde. Es folgte die Proteinbestimmung (Abbildung 5).

### **2.5.2 Proteinbestimmung**

Um die Proteinmenge zu bestimmen, wurden zunächst Reagenz A', bestehend aus Reagenz A und S in dem in Tabelle 14 genannten Verhältnis, in einem Zentrifugationsröhrchen hergestellt. Auch die Menge an Reagenz B wurde mit einer Pipette in ein weiteres Zentrifugationsröhrchen pipettiert.

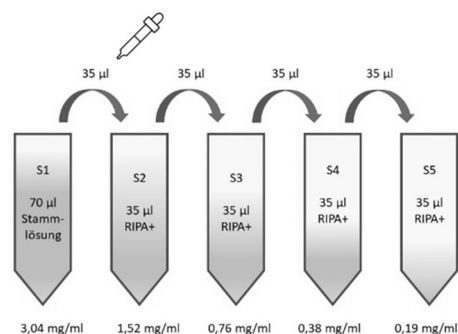
Anschließend wurden die Standards gemischt. Hierfür wurden fünf Zentrifugationsröhrchen mit S1 bis S5 beschriftet und in S1 wurden 70 µl Stammlösung pipettiert. In die S2 bis S5 wurden jeweils 35 µl RIPA+ vorgelegt. Dann wurden die unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt, indem von S1

beginnend 35 µl in S2 überführt und die Mischung anschließend gevortext wurde. Im Folgenden wurde dieser Prozess von S2 zu S3 über S3 zu S4 bis hin zu S4 zu S5 wiederholt. So ergaben sich die in Abbildung 5 aufgeführten Konzentrationen.

*Tabelle 14 Western Blot Material für die Proteinbestimmung*

*In dieser Tabelle sind die Substanzen zur Ermittlung der Proteinmenge inklusive der Mengenangabe und der Hersteller aufgeführt.*

Menge	Name	Hersteller
	DC Protein Assay Kit II, einschließlich BSA Standard	BIORAD REF (Cat.nr. 500-0112)
70 µl	Stammlösung (3,04 mg/ml), bestehend aus BIORAD, BSA in 10 ml AMPUWA-Wasser gelöst und bei -20°C gelagert	
	Ampuwa	Fresenius REF 7151-5
	RIPA(+) (Lysepuffer, bestehend aus 10 ml Ripa(-) versetzt mit 50 µl PMSF)	CC Pro REF PL-25-M
25 µl pro Well	Reagenz A <sup>†</sup> (Mischung aus 20 µl DC Protein Assay (Reagent S) pro 1 ml DC Assay Reagent A	BIORAD REF 10000046270 BIORAD REF 10000047350
200 µl pro Well	DC™ Protein Assay Reagent B	BIORAD REF 10000044069
1,5 ml	Lämmli Puffer mit ME (pro 100 µl Lämmli 5 µl Mercaptoethanol	(Sigma-Aldrich)
	Lämmli: -Tris Ultra Pure -Glycerin -SDS -Bronphenolblau	ICN Biomedicals Sigma Sigma AppliChem



*Abbildung 5 Konzentrationen der Standards*

*In dieser Abbildung ist schematisch die Herstellung der Standard-Verdünnungsreihe dargestellt.*

Auf einer Rundbodenplatte wurde im Anschluss die 1:5 Verdünnung der Proben erstellt. Hierfür wurden zunächst für die Anzahl der Proben pro Well 16 µl RIPA+ vorgelegt und anschließend pro Probe 4 µl in das entsprechende Well hinzugegeben. Um eine homogene Durchmischung zu erreichen, wurde die

Platte anschließend auf den Schüttler gestellt. Im Anschluss wurden je 5 µl des Blanks (bestehend aus RIPA+), der Standards S1-S5 sowie der verdünnten Proben in dreifacher Ausführung in dem in Abbildung 6 angegebenen Schema, auf eine 96-well Flachbodenplatte gegeben. Zu diesen 5 µl wurden dann jeweils 25 µl Reagenz A' sowie 200 µl Reagenz B hinzugeben, sodass sich zum Schluss in jedem Well 230 µl befanden. Dann wurde die Platte zum Durchmischen für die Dauer von einer Minute auf den Schüttler gestellt und im Anschluss 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Messung der Absorption im GlowMax bei 600 nm durchgeführt wurde. Es wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen in den Wells befinden, da diese die Messung verfälschen können.

Befüllungsschema 96-well Platte zur Proteinbestimmung mittels GlowMax

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	Blank (RIPA+)	Blank (RIPA+)	Blank (RIPA+)	HT1197 OM 4. Woche	HT1197 OM 4. Woche	HT1197 OM 4. Woche	Cal29 OM 4. Woche	Cal29 OM 4. Woche	Cal29 OM 4. Woche
B	S1	S1	S1	HT1197 M 4. Woche	HT1197 M 4. Woche	HT1197 M 4. Woche	Cal29 M 4. Woche	Cal29 M 4. Woche	Cal29 M 4. Woche
C	S2	S2	S2	T24 OM Initial Testung	T24 OM Initial Testung	T24 OM Initial Testung	HL20/31 OM Initial Testung	HL20/31 OM Initial Testung	HL20/31 OM Initial Testung
D	S3	S3	S3	T24 M Initial Testung	T24 M Initial Testung	T24 M Initial Testung	HL20/31 M Initial Testung	HL20/31 M Initial Testung	HL20/31 M Initial Testung
E	S4	S4	S4	T24 OM 4. Woche	T24 OM 4. Woche	T24 OM 4. Woche	HL20/32 OM Initial Testung	HL20/32 OM Initial Testung	HL20/32 OM Initial Testung
F	S5	S5	S5	T24 M 4. Woche	T24 M 4. Woche	T24 M 4. Woche	HL20/31 M Initial Testung	HL20/31 M Initial Testung	HL20/31 M Initial Testung
G	HT1197 OM Initial Testung	HT1197 OM Initial Testung	HT1197 OM Initial Testung	Cal29 OM Initial Testung	Cal29 OM Initial Testung	Cal29 OM Initial Testung			
H	HT1197 M Initial Testung	HT1197 M Initial Testung	HT1197 M Initial Testung	Cal29 M Initial Testung	Cal29 M Initial Testung	Cal29 M Initial Testung			

OM= Ohne Mykoplasmen M= Mykoplasmen Infiziert S= Standardkonzentration in Verdünnungsreihe 1 bis 5

**Abbildung 6 Befüllungsschema 96-well Platte für die GlowMax Messung**

Dies ist ein Schema der Befüllung der 96-well Platte. Bei S1 bis S5 handelt es sich um die Standardkonzentrationen, welche in einer Verdünnungsreihe hergestellt wurden. Es wurden die kommerziellen Tumor-Zelllinien T24, Cal29 und HT1197 sowie die aus OP-Präparaten isolieren Zellen HL20/31 und HL20/32 analysiert. Jede Probe wurde drei Mal separat pipettiert und im Anschluss im GlowMAX gemessen.

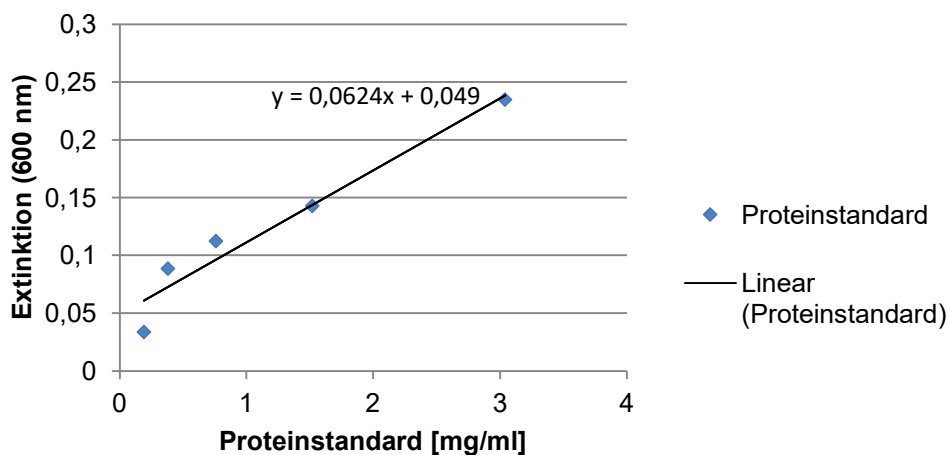
Nach Messung der Absorption wurden zunächst die Mittelwerte von den dreifachen Werten des Leerwerts und der Standards festgelegt. Von jedem der Standardmittelwerte (S1 bis S5) wurde jeweils der Mittelwert des Leerwerts abgezogen. Die so ermittelten Werte wurden auf die Y-Koordinate aufgetragen, während die dazugehörigen Konzentrationen der Standards auf der X-Achse

aufgetragen wurden. So konnte eine Kalibrierungslinie erstellt werden und anhand dieser eine Steigung und ein Achsenabschnitt festgelegt werden (siehe Tabelle 15 und Abbildung 7).

*Tabelle 15 GlowMax Absorptionswerte zur Erstellung der Kalibrierungslinie  
Aus dieser Tabelle kann man die Mittelwerte der im GlowMAX gemessenen Absorption, sowie die Proteinmenge und der entnehmen.*

		Proteinmenge [mg/ml]	Mittelwert der gemessenen Absorption	Absorption ohne Blank
Leerwert			0,063	
Proteinstandard	S1	3,04	0,298	0,235
	S2	1,52	0,206	0,143
	S3	0,76	0,175	0,112
	S4	0,38	0,152	0,089
	S5	0,19	0,097	0,034

## Kalibrierungslinie



*Abbildung 7 Kalibrierung*

*In dieser Abbildung ist die Kalibrierungslinie dargestellt, welche sich durch die in den Proteinstandards enthaltene Proteinmenge und die bei 600nm gemessene Extinktion ergibt.*

Formel der Steigung und Formel Achsenabschnitt:

$$y = mx + n$$

$$m = \frac{Y2 - Y1}{X2 - X1}$$

Im Anschluss daran wurde für die Dreifachwerte jeder Probe auch der Mittelwert bestimmt und von diesem der Leerwert abgezogen. Danach wurde die Standardabweichung jeder Probe berechnet

Nun konnte die absolute Konzentration jeder Probe wie folgt berechnet werden:

$$\text{absolute Konzentration} = \left( \frac{(\text{Probenmittelwert} - \text{Achsenabschnitt})}{\text{Steigung}} \right) \times VF$$

$VF = \text{Verdünnungsfaktor} = 5$

Danach wurde für jede Probe berechnet:

$$V2 = \left( \frac{(\text{absolute Konzentration} \times 0,05)}{2} \right) \times 1000$$

Im nächsten Schritt konnte die benötigte Verdünnung berechnet werden, welche bei 50 µl der jeweiligen Probe mit RIPA+ und Lämmli -Puffer erfolgen musste, um eine Konzentration von 2 mg/ml zu erhalten. Bei der Zelllinie T24 ergab sich hierbei eine zu niedrige Proteinkonzentration, sodass für diese Probe eine Konzentration von 1 mg/ml gewählt wurde.

Von den V2 Werten wurden jeweils 50 µl (die Menge der Probe) abgezogen und so die Menge an RIPA+ ermittelt.

Außerdem wurde die Menge an Lämmli Puffer mit nachstehender Formel ermittelt:

$$\text{Menge an Lämmli in } \mu\text{l} = \left( \frac{V2}{25} \right) \times 8$$

Nun wurden für jede Probe ein Zentrifugationsröhrchen mit jeweils 50 µl der Probe befüllt und mit der jeweiligen Menge an RIPA+ und Lämmli Puffer ergänzt. Abschließend wurden die Zentrifugationsröhrchen für 10 Minuten bei 95 °C im Thermomixer denaturiert und entweder sofort für den Western Blot genutzt oder auf Dauer bei -20 °C gelagert.

### 2.5.3 Herstellung des Gels und Proteintrennung mittels SDS-Page

#### Material:

*Tabelle 16 Western Blot Material für Gele*

*In dieser Tabelle sind die Mengenangaben der Materialien zur Herstellung des Gels für die Proteintrennung mittels SDS-Page inklusive der Hersteller aufgeführt. TEMED:*

*Tetramethylethyldiamin)*

*APS: Ammonium persulfate*

Menge	Name	Hersteller
10 % Trenngel (für 2 Gele)	-4 ml Aqua Dest. -3,3 ml 30% AcrylamidMix - 2,5 ml Tris pH 8,8 - 100 µl 10% SDS - 100 µl 10% APS bestehend aus: 1g APS gelöst in 10 ml Aqua Dest. - 8 µl TEMED	BioRad REF 161-0156  BioRad REF 161-0734  BioRad REF 1610416  Sigma-Aldrich  Roth REF 2367
5 % Sammelgel (für 2 Gele)	- 1,4 ml Aqua Dest. - 330 µl 30% AcrylamidMix - 250 µl 0,1 M Tris pH 6,8 - 20 µl 10% SDS - 20 µl 10% APS - 2 µl TEMED	BioRad REF 161-0156  BioRad REF 161-0734  BioRad REF 1610416 BioRad REF 1610416 Roth REF 2367
1 Liter gekühlter Gelpuffer	- 100 ml Tris Glycin 10-fach Buffer - 10 ml 10% SDS - 890 ml Aqua Dest.	BioRad REF 161-0734  BioRad REF 161-0416
4x je 5 µl	Magic Mark	Invitrogen REF LC5602

Pro Gel wurden jeweils zwei zuvor mit Alkohol gereinigte, unterschiedlich große Glasplatten mit Distanzleisten versehen und in die vorgesehenen Halterungen eingespannt und auf den kleineren Platten ein Abstand von 2 cm zum Oberrand markiert. Es folgte eine Überprüfung der Dichtigkeit mittels einer Aqua Dest. Probe. Da die Lysat-Proben beim Western Blot im Sammelgel starten und nach unten durch das Trenngel laufen sollen, wurde zunächst das Trenngel für zwei Gele hergestellt und durch Schwenken gut gemischt (Tabelle 16). Dann wurde das Aqua Dest. zwischen den Platten entfernt und mit einer Pipette das Trenngel jeweils zwischen die Platten gegeben bis ca. 7 mm oberhalb der

angebrachten Markierung. Dann wurde mit einer frischen Pipette der Spalt zwischen den Platten tröpfchenweise jeweils bis zum Oberrand mit Aqua Dest. aufgefüllt und das Gel über einen Zeitraum von 20 Minuten polymerisiert. Nach dieser Zeit wurde das Aqua Dest wieder durch Abkippen entfernt und das Sammelgel in der in Tabelle 16 beschriebenen Zusammensetzung in einem frischen Becherglas hergestellt und durchmischt. Mit einer Pipette wurde nun jeweils 1 ml des Sammelgels oberhalb des Trenngels zwischen die Glasplatten gegeben und abschließend der 10-Kammer-Kamm langsam in das Gel gesteckt, um eine Luftblasenbildung zu verhindern. Auch dieses Gel wurde für die Dauer von 20 Minuten polymerisiert.

### **Proteintrennung:**

Nach dem Aushärten der Gele wurden die Kämmen entfernt und die Gele wurden in die Halterung der Elektrophoresekammer gespannt. Danach wurde die Kammer inklusive der Gele auf Naßeis gekühlt und bis zur Markierung komplett mit Gelpuffer befüllt. Mit einer Pipette wurden die Taschen der Gele mittels Gelpuffer mehrfach vorsichtig gespült. Nun wurden die Taschen sorgfältig, aber zügig mit einer Eppendorf Pipette befüllt. Begonnen wurde mit jeweils 5 µl Magic Mark in der ersten und sechsten Tasche beider Gele. In die leeren Taschen wurden jeweils 18 µl der Probe pipettiert. Anschließend wurde die Kammer mit dem Deckel verschlossen und an die Stromquelle angeschlossen. Protein im Gel wurden elektrophoretisch für die Dauer von mindestens 90 Minuten bei 100 Volt getrennt. Es wurde regelmäßig kontrolliert, ob genügend Puffer in der Kammer vorhanden ist.

### ***2.5.4 Transfer, Erst- und Zweitantikörper Markierung mit CD276 sowie LICOR Messung***

#### **Transfer:**

Nach der Trennung die Proteine wurde eine Glaswanne mit dem vorstehend unter Material beschriebenen Transferpuffer befüllt und die Halterung für die zweite Kammer in die Flüssigkeit gelegt. Außerdem wurde bereits der erste der beiden Schwämme in der Flüssigkeit getränkt und auf der Halterung platziert. Auf diesem wurde das erste der zwei Filterpapiere in der Flüssigkeit platziert



(Tabelle 17). Nun wurden die Glasplatten des ersten Gels vorsichtig getrennt und mittels Spatel das Sammelgel vorsichtig entlang der erkennbaren Grenze vom Trenngel getrennt und verworfen. Im nächsten Schritt wurde das Trenngel vorsichtig von der Glasplatte gelöst und auf dem nassen Filterpapier in der Glaswanne platziert. Nun wurde die Membran mit einem Bleistift beschriftet und dann mit einer Pinzette im Transferpuffer befeuchtet und mit der beschrifteten Seite nach unten auf dem Gel platziert. Dadurch konnte in den weiteren Schritten sichergestellt werden, dass klar ist auf welcher Seite der Membran der Transfer stattgefunden hat. Danach wurde wieder ein nasses Filterpapier auf die Membran gelegt und über diesem wurden Luftblasen ausgerollt, da diese den Transfer gestört hätten. Es wurde darauf geachtet, dass alles unter der Wasseroberfläche bleibt, damit sich keine neuen Luftblasen bilden. Abschließend wurde ein zweites zuvor befeuchtetes Schwämmchen auf das Filterpapier gelegt und die Halterung der zweiten Kammer wurde geschlossen und in die Kammer gehängt.

Mit dem zweiten Gel wurde gleichermaßen verfahren und zuletzt wurde die zweite Kammer mit Transferpuffer bis zur Markierung befüllt und der Deckel auf der Kammer angebracht. Auch diese Kammer wurde auf Eis platziert und erneut wurden für eine Dauer von 90 Minuten 100 Volt angelegt und regelmäßig die Funktion sowie der Flüssigkeitsstand in der Kammer kontrolliert.

### **Material:**

*Tabelle 17 Western Blot Material für den Transfer  
In dieser Tabelle sind die für den Transfer benötigten Mengen der Substanzen und deren Hersteller aufgeführt.*

Menge	Name	Hersteller
1 Liter gekühlter Transferpuffer	- 100ml Tris Glycin - 200ml Methanol - 700ml Aqua Dest.	BioRad REF 161-0734 VWR Chemicals REF 20847.307
4x	Filterpapier	Whatman, Schleicher & Schüll
4x	Schwamm	BioRad
2x	Membran	GE Healthcare lifescience Amersham

### **Erst- und Zweitantikörper-Markierung:**

Nach dem Transfer folgte das Waschen der beiden Membranen. Hierfür wurden die Membranen zunächst mit einer Pinzette aus den Halterungen der zweiten

Kammer entnommen, in eine Wanne auf den Schüttler gelegt und drei Mal für jeweils 10 Minuten in PBS-T gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschschritten wurde jeweils das PBS-T verworfen und durch frisches ersetzt- dies erfolgte auch für die im weiteren Verlauf folgenden Waschschrritte.

Nach dem letzten Waschen wurde erneut das PBS verworfen und die beiden Membranen wurden auf dem Schüttler 60 Minuten lang mit 50 ml 5 % Milchpulver-PBS-T geblockt. Daraufhin folgten erneut drei zehnmünütige Waschschrritte, diesmal jeder mit PBS-T und zuletzt eine weitere Waschung mit PBS für 10 Minuten. Auch diese erfolgte auf dem Schüttler.

Nun konnte der erste Antikörper (Tabelle 18) auf die Membranen gebracht werden. Hierfür wurde Anti-CD276 AK im Verhältnis 1:600 mit 5 % Milchpulver-PBS verdünnt und die Membranen in jeweils 6 ml dieser Lösung in einer Wanne über Nacht auf dem Schüttler bei 4 °C im Dunkeln inkubiert.

Am nächsten Tag wurden der Schüttler und das Gefäß aus dem Kühlschrank entnommen und die Membranen mit einer Pinzette in das Waschbehältnis auf dem Schüttler überführt. Nun wurde erneut dreimal für die Dauer von jeweils 10 Minuten mit PBS-T und anschließend nochmals 10 Minuten mit PBS gewaschen.

Nach diesen Waschschrritten folgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper. Hierfür wurde zunächst die Membranen mit einer Pinzette in das lichtgeschützte Behältnis überführt und dann der polyklonale Hase Anti-Maus Antikörper HRP (Horseradish peroxidase auf Deutsch Meerrettich Peroxidase) in einem Verhältnis 1:10000 mit 5 % Milchpulver PBS verdünnt. 10 ml dieser Lösung wurden mit einer Pipette auf die Membranen gegeben. Anschließend wurde der Behälter mit einem Deckel verschlossen und auf der Schüttelplatte eine Stunde bei Raumtemperatur inkubieren gelassen.

Nach Ablauf der Zeit wurden die Membranen erneut mit einer Pinzette in das Waschgefäß überführt und es folgten erneut die Waschungen auf dem Schüttler. Begonnen wurde mit drei Waschungen mit PBS-T für je 10 Minuten und abschließend weitere 10 Minuten mit PBS.

## **Material:**

*Tabelle 18 Western Blot Material Erst- und Zweitantikörper  
Aufgeführt sind die Substanzen und deren Hersteller, welche für die Erst- und Zweitantikörper Markierung im Rahmen des Western Blots benötigt werden. PBS: Phosphate-buffered saline*

<b>Menge</b>	<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
1 Liter	<b>PBS</b> 2 Tabletten PBS gelöst mit 1000 ml Aqua Dest	Medicago REF 09-9499-100
1 Liter	<b>PBS-T:</b> PBS (s.o.) versetzt mit 1 ml Tween 20 (0,1%)	Merck REF 8221840500
	Anti-CD276 AK	Abcam REF 105922
	Polyklonal Rabbit Anti-Maus Immunoglobulin HRP 1,3 g/l	Dako REF P0260
50 ml 5% Milchpulver PBS-T	2,5 g Milchpulver gelöst in 50 ml PBS-T	Tip
20 ml 5% Milchpulver PBS	1 g Milchpulver gelöst in 20 ml PBS	Tip Gibco REF 18912-014
2 ml	WesternSure® Premium Chemiluminescent Substrate	Li-Cor® REF 926-95000 402-467-0973

## **LI-COR Bilddokumentation:**

Nach dem letzten Waschschrift wurde die erste Membran erneut in ein lichtgeschütztes Behältnis gepackt und mit einer Eppendorf Pipette mit 2 ml einer 1:1 Mischung der beiden Substrate des Westernsure (siehe Tabelle 18) bedeckt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bei den Substraten handelt es sich um eine stabile, durch Oxidation chemilumineszente, dem Luminol ähnliche Komponente und einen Luminol Enhancer welche mit dem HRP des Antikörpers reagieren. Danach wurde die Membran mit einer Pinzette mit der proteinhaltigen Seite auf dem Scanbereich des C-DiGit® Blot Scanner platziert. Nachdem mittels einer Folie die Luftbläschen ausgestrichen wurden, erfolgte eine Aufnahme mittels LI-COR® ImageStudio™ Lite Software. Es wurde die sogenannte Enhanced chemiluminescence (ECL) Detection genutzt. Hierbei handelt es sich um eine indirekte Methode, bei der die Wirkung des HRP Enzym (Horseradish peroxidase) des sekundären Antikörpers genutzt wird.

HRP reagiert mit den Substraten und generiert daraufhin Licht-Photonen, welche von dem digitalen Imager (C-DiGit® Blot Scanner) detektiert und gemessen werden. Mit der zweiten Membran wurde identisch verfahren.

### 2.5.5 Stripping

#### Material:

*Tabelle 19 Western Blot Material Stripping*

*In der Tabelle sind die für das Stripping (Entfernen des ersten Antikörper Paares) benötigten Substanzen inklusive der Hersteller.*

Name	Hersteller
<b>Stripping Buffer</b> bestehend aus: M Glycin 10% SDS Tween20 Aqua Dest.	Merck REF 4201 Serva Feinbiochemika REF 20760 Merck REF 8221840500
PBS Tween	(siehe Tabelle 18)
PBS	

Zum Strippen, also Entfernen des ersten Antikörper Paares, mussten die beiden Membranen dreimal für die Dauer von jeweils 20 Minuten mit der Stripping Lösung (Tabelle 19) auf dem Schüttler gewaschen werden. Zum Abschluss folgte erneut ein 10-minütiger Waschgang mit PBS.

### 2.5.6 Erst- und Zweitantikörper Markierung mit Housekeeping Protein $\beta$ -Aktin

#### Material:

*Tabelle 20 Western Blot Material Antikörper Färbung der Housekeeping Proteine*

*Aufgeführt sind die Mengen- und Herstellerangaben der für die Antikörper Färbung des Housekeeping Protein beta-Aktin benötigten Substanzen.*

Menge	Name	Hersteller
1:1000	Anti-beta Aktin AK	Abcam REF 8227
1:2000	Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP	Dako REF P0448
	PBS	(siehe Tabelle 18)
	PBS-T	

Um die Expression des Zielproteins CD276 messen und die Daten einer Messung mit denen anderer Messungen vergleichen zu können, wurde die Expression von  $\beta$ -Aktin (siehe Tabelle 20) als Housekeeping Protein mittels Antikörper dargestellt. Hierfür wurden die Membranen mit einer Pinzette erneut in das lichtgeschützte Behältnis überführt. Dann wurde mit einer Pipette der

Kaninchen anti- $\beta$ -Aktin Antikörper im Verhältnis 1:1000 mit 5 % Milchpulver PBS gemischt und 10 ml dieser Lösung erneut auf die Membranen gegeben, und wie für CD276 Detektion beschrieben inkubiert. Die Färbung mit dem Zweitantikörper Ziege anti-Hase HRP (mit einer Verdünnung von 1:2000 in Milchpulver-PBS) sowie die Detektion erfolgten wie oben beschrieben (siehe 2.5.4).

## 2.6 Durchflusszytometrie

Nach vier Wochen der Expansion von infizierten Zellen und den gesunden Kontrollen wurde eine Durchflusszytometrie durchgeführt, um die Expression von CD276 auf der Oberfläche zu messen. Das hierfür genutzte Material findet sich in Tabelle 21.

*Tabelle 21 Material Durchflusszytometrie  
In dieser Tabelle sind die Mengen der Substanzen inklusive der Hersteller aufgeführt, welche für die Durchführung der Durchflusszytometrie benötigt werden.*

Menge	Name	Hersteller
	<b>Dulbelcco's Phosphate Buffered Saline (=PBS)</b> im Wasserbad auf 37 °C erwärmt	Sigma REF D8537
3 ml pro Probe	Accutase im Wasserbad auf 37 °C erwärmt	Sigma REF A6964-100ML
	Zelllinienmedium (siehe 2.3.1 Seite 34)	
50 $\mu$ l pro Zentrifugationsröhrchen	Gamunex Workingsolution (Stammlösung 1:20 mit PBS verdünnt)	Grifols Deutschland GmbH REF 3036252
	<b>FACS-Puffer (PFEA):</b> - 500 ml PBS - 10 ml FCS - 1 ml Natrium-Azid-Stocklösung - 375 mg EDTA	Siehe Tabelle 18 Gibco REF 26140079 Gibco REF 11360-039 Biochrom REF L2113
50 $\mu$ l pro Probe	<b>Antikörperlösung</b> - 2,5 $\mu$ l CD276 Antikörper (PE markiert, B7H3,) - 47,5 $\mu$ l PFEA	BioLegend Cat. Nr. 351004
1 pro Probe	FACS-Röhrchen	Falcon REF 352052

Für diesen Versuch wurden ab der dritten Woche pro Zelllinie jeweils eine zusätzliche, nicht-infizierte Kontrolle und eine mit Mykoplasmen infizierte Kulturflasche hochgezogen. Die Flaschen mussten dicht bewachsen sein, damit eine Zellzahl von 400000 bis 500000 pro Ansatz gewährleistet war und man mit einer Flasche zwei Färbungen für die Durchflußzytometrie (sowohl Positiv als auch Negativkontrolle) herstellen konnte. Die für den Versuch benötigten

Arbeitsschritte sind im Folgenden für eine Probe beschrieben und wurden bei allen gesunden als auch mit Mykoplasmen infizierten Zelllinien in gleicher Weise durchgeführt.

Ähnlich wie bei einer normalen Passage, wurde im ersten Schritt das alte Zellmedium mit einem Sauger abgenommen und danach 7 ml PBS (siehe Tabelle 21) in die Zellkulturflasche hinein pipettiert und über den Boden der Flasche geschwenkt, bevor auch das PBS wieder mit einem frischen Saueransatz abgesaugt wurde. Im nächsten Schritt wurden mit einer Pipette jeder Zellkulturflasche 3 ml Accutase hinzugeben und die Flasche so geschwenkt, dass sich die Flüssigkeit homogen auf dem Boden der Flasche verteilte. Nach ca. 9 Minuten Inkubation bei 37 °C, wurde unter dem Mikroskop kontrolliert ob die Zellen sich voneinander gelöst und in Suspension gegangen sind. Die Reaktion wurde dann mit 3 ml des normalen Zelllinienmediums (siehe 2.3.1 ) abgestoppt und in einen Zentrifugationsröhrchen überführt. Außerdem wurde der Flaschenboden mit weiteren 10 ml Zelllinienmedium nachgespült und auch diese Spülung wurde überführt. Nachfolgend wurden die Zentrifugationsröhrchen für die Dauer von sieben Minuten bei 1500 rpm abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand mit einem Sauger entfernt, sodass das verbleibende Zellpellet mit einer Pipette in 3 ml PFEA-Puffer re-suspendiert werden konnte. Von dieser Zellsuspension wurden jeweils 1,5 ml in zwei 2 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und die Zentrifugationsröhrchen vier Minuten bei 300 g zentrifugiert. Es bildete sich erneut ein Zellpellet und ein Überstand, letzterer wurde dekantiert und die Zentrifugationsröhrchen mit Zellpellet wurden auf einem saugfähigen Tuch trocken geklopft.

In jedes Zentrifugationsröhrchen wurden jeweils zusätzlich 50 µl Gamunex pipettiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren und das Pellet wurde re-suspendiert. Es folgte ein Vortexen und Abfugen und eine abgedunkelte Inkubation bei 4 °C. Nach 20 Minuten Inkubation wurden jedem Röhrchen 1 ml PFEA hinzu pipettiert und das Zentrifugationsröhrchen wurde gevortext. Die sich anschließende Zentrifugation wurde bei 300 g für die Dauer von 4 Minuten durchgeführt. Wie bereits zuvor beschrieben, wurde erneut der Überstand dekantiert und die Zentrifugationsröhrchen auf Papier trocken geklopft.

Für den Versuch wurde das Verfahren der direkten Färbung gewählt. Hierfür wurde zunächst die Antikörperlösung, wie weiter oben unter Material und Methoden beschrieben hergestellt und in mit Alufolie umwickelten Röhrchen auf Eis gelagert. Um sowohl eine Positiv- als auch eine Negativkontrolle zu erhalten, wurden die zwei Zentrifugationsröhrchen der gleichen Zelllinien Probe im Folgenden unterschiedlich ergänzt. Für den Nachweis des Zielantigens wurden jeweils 50 µl der 1:20 in PFEA verdünnten Antikörperlösung (siehe Material) zu den Zellen hinzugegeben, während der Kontrolle 50 µl PFEA ohne Antikörper hinzugegeben wurden. Alle Proben wurden nun bei 4 °C für die Dauer von 20 Minuten inkubiert, danach wurde jeder Probe 1 ml PFEA hinzugegeben und die Zentrifugationsröhrchen bei 300 g für die Dauer von 4 Minuten zentrifugiert und zum Schluss dekantiert. Nun wurden die Pellets in jeweils 300 µl PFEA re-suspendiert und in speziellen FACS-Röhrchen überführt und mit Aluminiumfolie bedeckt bei 4 °C bis zur Messung gelagert. Im Anschluss konnte für jede Zelllinie im LSR II (FACS-Gerät) zunächst die korrespondierende ungefärbte Kontrolle und danach die mit Antikörpern markierte Probe analysiert und mittels der Software ausgewertet werden.

## **2.7 Nachweis und Ausschluss einer Mykoplasmen Infektion mittels MycoSPY®**

Sowohl anfangs als auch am Ende der Versuchsreihe wurden die Überstände von jeder Zellkultur mittels MycoSPY®-PCR untersucht, um eine Infektion mit Mykoplasmen nachzuweisen bzw. auszuschließen.

### **2.7.1 Behandlung des Zellkulturüberstands**

Erst nachdem die Zellkultur zu 90 % konfluent war und der letzte Mediumswechsel drei Tage zurück lag, wurde 1 ml Überstand pro Kultur entnommen und in ein Zentrifugationsröhrchen überführt. Dann wurde dieser für die Dauer von vier Minuten bei 94 °C im Thermomixer erhitzt und anschließend eine Minute bei 13000 g zentrifugiert, sodass sich ein Pellet aus Zellmaterial bildete. Im nächsten Schritt wurde mit einer Eppendorf Pipette 800 µl dieses Überstands in einen neues Zentrifugationsröhrchen überführt und der Rest inklusive Pellet verworfen. Die Proben wurden dann bis zur Durchführung des

MycosPY® bei -20 °C gelagert. Das benötigte Material ist in Tabelle 22 aufgeführt.

### 2.7.2 PCR

#### Material:

*Tabelle 22 Material MycoSPY®*

*Aufführung des Materials und der Hersteller zum Durchführen des MycoSPY® zum Nachweis/ Ausschluss einer Infektion mit Mykoplasmen. bp: Basenpaare NTW: Non Template Water*

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
MasterMix MycoSPY® pro Probe bestehend aus: - 9,3 µl Non Template Water (NTW) - 2,7 µl Taq Polymerase Puffer - 9 µl Primer Mix - 1 µl Interne Kontrolle (700 bp) - 1 µl Taq Polymerase  →ergeben 23 µl davon werden 15 µl mit 8 µl Sybr Green ergänzt	Biontex REF M030-050          Roche REF 04887352001
MasterMix TAG (für positiv Kontrolle): - 10 µl Sybr Green - 6 µl Non Template Water (NTW) - 2 µl TAG (Primermix)	Roche REF 04887352001
2 µl SMC (smooth muscle Cell cDNA)	

Zunächst wurden sämtliche in Tabelle 22 aufgeführten Substanzen aufgetaut, gevortext, zentrifugiert, und auf Eis gelagert. Dann wurde zunächst der Mastermix für die Positivkontrolle hergestellt Nach dem Zusammenpipettieren von Sybr Green, NTW und TAG in ein 0,5 µl Zentrifugationsröhrchen, wurden die 18 µl Mastermix gevortext und nochmals kurz zentrifugiert, bevor sie wieder auf Eis gelagert wurden.

Im nächsten Schritt wurde der Mastermix des MycoSPY® mit einer Pipette in einem weiteren 0,5 µl Zentrifugationsröhrchen zubereitet. Die oben angegebene Mengenangabe der Substanzen des MycoSPY® Mastermix ergab in Summe 23 µl. Man braucht pro Probe jeweils 15 µl dieses Mastermixes. Diese wurden in ein neues Zentrifugationsröhrchen überführt und pro Probe mittels Pipette mit 8 µl Sybr Green ergänzt, anschließend gevortext, abzentrifugiert und auf Eis gelagert.

Nun wurde auf der PCR-Platte, nach dem zuvor in einem Layout erstellten Schema, pipettiert. Zuerst wurde für die Negativkontrolle 2 µl NTW in einem



Well vorgelegt, anschließend mit einer neuen Pipettenspitze 2 µl SMC in einem neuen Well. Dann folgten 2 µl pro Probe mit einer frischen Pipettenspitze in ein neues Well. Nachdem die Proben vorgelegt waren, wurde im nächsten Schritt zunächst 18 µl des Mastermix der Positivkontrolle (TAG) an den Rand des SMC Wells (Positivkontrolle) hinzugeben. Dann wurde mit einer frischen Pipettenspitze 23 µl des MycoSPY® Mastermix an den Rand des NTW Wells (negativ Kontrolle) hinzugegeben und im Folgenden je 23 µl MycoSPY®-Mastermix an den Well-Rand jeder Probe. Nachdem jedes Well sowohl Probe als auch seinen Mastermix enthielt wurde auf der PCR Platte die dafür vorgesehene Folie angebracht und die Platte 1 Minute bei 1000 rpm zentrifugiert.

#### **PCR Programm im Lite Cycler:**

- 1 Zyklus Vordenaturierung für 60 Sekunden bei 94 °C
- 35 Zyklen bestehend aus:
  - Denaturierung für 30 Sekunden bei 94 °C
  - Primerannealing für 30 Sekunden bei 62 °C
  - Polymerisation für 60 Sekunden bei 72 °C
- 1 Zyklus endgültige Verlängerung für 180 Sekunden bei 72 °C

Dies diente dazu, die vorhandene Mykoplasmen DNA aus dem Überstand hochzuamplifizieren, damit sie später im Gel nachgewiesen werden können. Die Platte mit den Proben konnte fortan bei -20 °C gelagert werden.

#### **2.7.3 Agarosegel**

Zur Herstellung des Agarosegels wurde 1 g Agarose zusammen mit 50 ml TBE-Puffer in einem Erlenmeyerkolben und einem Rührfisch erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte (Tabelle 23). Dann wurde mittels Rührfisch 5 µl Gel Red Acid eingerührt. Das Gel wurde in der Kammer, bei gesteckten 10 Kammerkamm, gegossen und 30 Minuten ausgehärtet. Nach dieser Zeit wurde der Kamm entfernt und die Kammer mit TBE bis zur Markierung befüllt, sodass das gesamte Gel bedeckt war. Nun wurden mit einer Eppendorf Pipette in einer 96 Well Rundbodenplatte jeweils 4 µl Ladepuffer pro Probe vorgelegt und diese wurden mit 10 µl Probe ergänzt und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren

gut gemischt. In die erste Tasche des Gels wurden mit einer Pipette 10 µl 100 bp Ladder zum Größenvergleich mit den PCR-Produkten gegeben. Danach wurden immer mit frischen Pipettenspitzen zügig 8 µl pro Probe aus dem Gemisch aus der 96 Well Platte in die einzelnen Taschen übertragen und die Kammer geschlossen und für ca. 50 Minuten bei 100V und 48 mA an die Elektrophorese angeschlossen, bis die Proben zu 4/5 der Länge des Gels durchwandert hatten. Dann wurden die Banden unter UV-Licht betrachtet. Die Kontrollbande lag bei 700 bp und die bei Mykoplasmen Infektion erwartete Bande lag bei 500-520 bp.

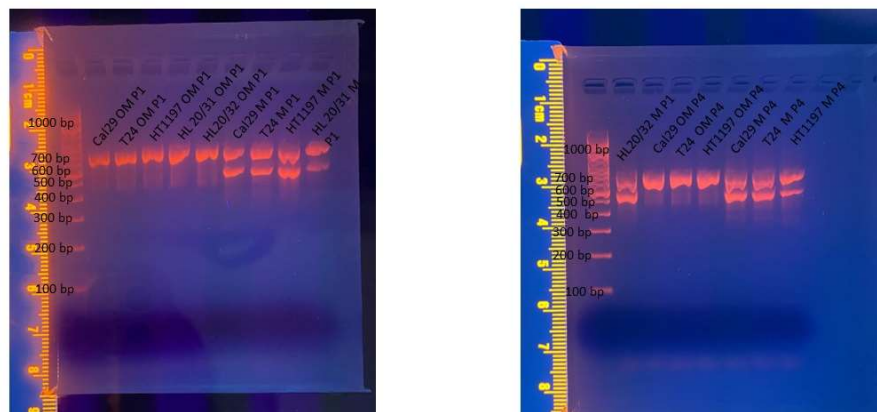
*Tabelle 23 Material zur Herstellung des Agarosegels  
In dieser Tabelle sind das Material sowie die Mengen- und Herstellerangaben aufgeführt.  
bp: Basenpaare PCR: Polymerase-Kettenreaktion*

Menge	Name	Hersteller
1 g	Agarosepulver	Sigma-Aldrich REF 9012-36-6
50 ml	TBE Puffer: Tris Borsäure EDTA	Sigma Sigma Sigma
5 µ	Gel Red Acid Gelstain 10000x	Biotinum REF 41003
10 µl (pro Gel)	100bp Ladder	Invitrogen REF 15628019
4 µl (pro Probe)	Ladepuffer	Invitrogen
10 µl	Probe nach PCR	

In Abbildung 8 ist das Ergebnis des MycoSPY® zu sehen. Bei allen Proben der Kulturen zeigt sich die interne Kontrolle bei 700 bp, welche eine erfolgreiche PCR anzeigt. Bei den mit Mykoplasmen infizierten Zellen zeigt sich zusätzlich eine zweite Bande bei 500 bp im Gel, welche durch die Mykoplasmen Infektion zustande kommen.

Das Ergebnis des MycoSPY® bestätigt die bereits bestehende Infektion von T24 M und Cal29 M und eine erfolgreiche Neuinfektion der Zelllinie HT1197 M sowie der aus OP-Präparaten gewonnenen Zellen HL 20/31M sowie HL 20/32 M. Außerdem konnte bei allen Zelllinien und isolierten Zellen auch nachweislich mykoplasmenfreie Kulturen (ohne zweite Bande) identifiziert werden.

Resultat des MycoSPY®



OM= Ohne Mykoplasmen Infektion  
M= mit Mykoplasmen Infektion

P1= nach der ersten Passage  
P4= nach der vierten Passage

bp= Basenpaare

Abbildung 8 Ergebnis MycoSPY®

In dieser Abbildung ist das Ergebnis des MycoSPY® dargestellt. Die interne Kontrollbande bei 700 zeigt einen erfolgreichen Ablauf der zuvor Durchgeführten PCR an. Eine Bande bei 500-520 Basenpaaren zeigt eine Infektion mit Mykoplasmen an.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Duplikationsrate der Zelllinien mit und ohne Mykoplasmen Infektion

Die Duplikationsrate wurde für die infizierten und die nicht-infizierten Zellkulturen jeder Zelllinien mit der nachfolgenden Formel bestimmt.

$$\text{Duplikationsrate} = \frac{\left( \frac{\log_{10} \left( \frac{\text{Zellzahl die ausgesät wurde}}{\text{Zellzahl nach der Proliferationszeit}} \right)}{\log_{10}(2)} \right)}{\text{Anzahl der Proliferationsstage}}$$

Es ist hervorzuheben, dass die Zelllinie HT1197 vierzehn Tage für die Proliferation hatte, während die Zelllinien Cal29 und T24 sieben Tage für die Proliferation hatten. Des Weiteren ist wichtig, dass die mit Mykoplasmen infizierten Cal29 Zellen aufgrund ihrer schnellen Proliferation in einer Konzentration von  $1 \cdot 10^5$  Zellen ausgesät wurden, damit weiterhin die gleiche Anzahl an Proliferationsstagen wie bei den nicht-infizierten Cal29 gewährleistet werden konnte. Alle anderen Zellen (auch die der anderen Zelllinien) wurden mit einer Konzentration von  $5 \cdot 10^5$  ausgesät. Die Ergebnisse sind in Tabelle 24 zusammengefasst.

Tabelle 24 Daten der Duplikationstaten der Zelllinien  
 In der Tabelle sind die Duplikationsraten der Zelllinien Cal29, T24 und HT1197 angegeben.  
 OM: Ohne Mykoplasmeninfektion M: mit Mykoplasmeninfektion P: Passage

		Cal29 OM	Cal29 M	T24 OM	T24 M	HT1197 OM	HT1197 M
Duplikationsrate	P1	0,722	1	0,617	0,713	0,248	0,205
Duplikationsrate	P2	0,782	0,983	0,667	0,738	0,249	0,196
Duplikationsrate	P3	0,717	0,957	0,615	0,785	0,223	0,243
Duplikationsrate	P4	0,738	0,972	0,621	0,676	0,253	0,258
Duplikationsrate	P5	0,739	0,974	0,407	0,609	0,223	0,246
	Mittelwert	0,7396	0,9772	0,5854	0,7042	0,2392	0,2296

Es stellte sich heraus, dass die infizierten Cal29 mit eine Duplikationsrate von durchschnittlich 0,98 am schnellsten proliferierten. Dieses Ergebnis wurde mit einem doppelten T-Test in seiner Signifikanz bestätigt ( $p < 0,001$ ). Auch bei der Zelllinie T24 war auffallend, dass die mit Mykoplasmen infizierten Zellen schneller (0,7) proliferieren als die nicht-infizierten (0,59). Der Doppelte T-Test konnte die Signifikanz jedoch nicht bestätigen ( $p \approx 0,061$ ). Die langsamste Proliferation zeigte sich bei den mit Mykoplasmen infizierten HT1197 Zellen mit 0,23. Diese Proliferationsgeschwindigkeit ist aber im Gegensatz zu den Zelllinien T24 und Cal29 nicht deutlich abweichend von den nicht mit Mykoplasmen infizierten HT1197 Zellen (0,24).

### 3.2 Morphologie von Mykoplasmen infizierten Zellen im Vergleich mit nicht-infizierten Zellen

In dieser Arbeit wurde die Morphologie der mit Mykoplasmen infizierten Zelllinien und nativen Zellen mit der Morphologie nicht-infizierter Zellen der gleichen Linie verglichen. Hierfür wurden in regelmäßigen Abständen an der zentralen markierten Stelle der Zellkulturflaschen Bilder der Zellen unter dem Mikroskop in unterschiedlichen Vergrößerungen (10x und 20x) angefertigt. In der 10x-Vergrößerung wurde ein 100  $\mu\text{m}$  Maßstab in der rechten Bild Ecke hinzugefügt. In der 20x-Vergrößerung wurde ein 50  $\mu\text{m}$  Maßstab gewählt und hinzugefügt.

### **3.2.1 Morphologische Unterschiede zwischen Cal29 mit und ohne Mykoplasmen Infektion**

Es ist nochmals hervorzuheben, dass die mit Mykoplasmen infizierten Zellen der Zelllinie Cal29 bereits infiziert in Kultur gingen und für die Fragestellung keine frische Infektion stattgefunden hat. Die Zellen wurden am ersten, fünften und siebten Tag nach der Passage fotodokumentiert und miteinander verglichen. Die Fotodokumentation der Zellmorphologie der nicht-infizierten Zellen im Vergleich mit den mit Mykoplasmen infizierten Zellen ist in Abbildung 9 zu sehen.

Bei den nicht-infizierten Cal29 Zellen kann man 24 Stunden nach der Passage bereits deutlich mehr adhärente Zellen und weniger apoptotische Zellen beobachten als bei den mit Mykoplasmen infizierten Cal29 Zellen. Auch fällt auf, dass bei stärker Vergrößerung die Größe der nicht-infizierten Zellen meist circa 50 µm beträgt und somit im Vergleich mit den infizierten Zellen deutlich (bis zu 2x) größer ist.

Auch im Verlauf kann man an Tag 5 nach der Passage klar erkennen, dass die nicht-infizierten Zellen im Vergleich mit den infizierten Zellen deutlich schneller einen konfluierenden Zellrasen bilden, in dem einzelne apoptotischen Zellen zu finden sind. Es bilden sich bei den mit Mykoplasmen infizierten Zellen kleinere Zellverbände mit deutlich mehr Apoptosen.

Am siebten Tag nach der Passage haben die nicht-infizierten Zellen einen über 90 % konfluenten Zellrasen gebildet und sind kohärent. Es waren auch vermehrt apoptotische Zellen sichtbar, jedoch ist zu vermuten, dass die Zellen aufgrund des zu dichten Wachstums in Apoptose gegangen sind. Die mit Mykoplasmen infizierten Zellen hingegen waren deutlich weniger konfluent und hatten sehr viel kleinere kohärente Zellinseln gebildet. Sie wiesen im Schnitt ein kleineres Zellvolumen auf als die nicht-infizierten Zellen.

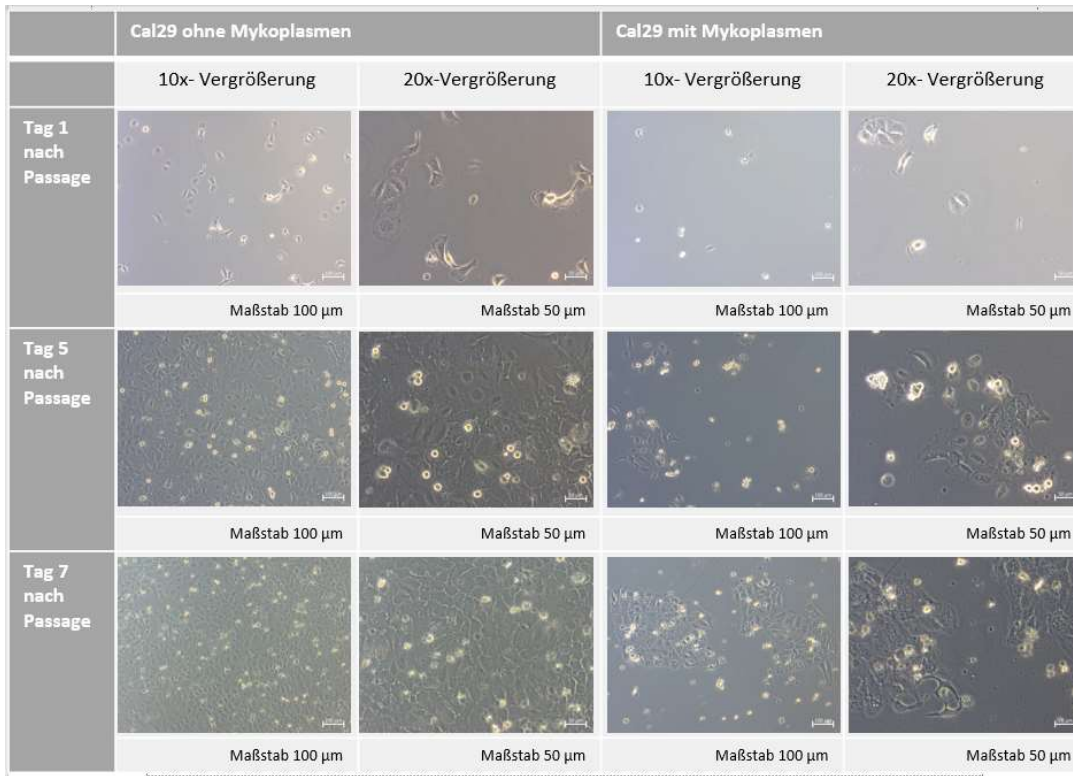


Abbildung 9 Cal29 Tag 1, 5 und 7 nach Passage

In dieser Abbildung ist die Fotodokumentation der Morphologischen Unterschiede zwischen den mit Mykoplasmen infizierten und den nicht-infizierten Cal29 Zellen dokumentiert. Die Dokumentation erfolgte am ersten, fünften und siebten Tag nach Passage jeweils in 10- und 20-facher Vergrößerung. Die infizierten Zellen weisen im Vergleich mit den nicht-infizierten eine kleinere Zellgröße und ein weniger kohärentes Wachstum sowie eine höhere Rate an Zelltod auf.

### 3.2.2 Morphologische Unterschiede zwischen T24 mit und ohne Mykoplasmen Infektion

Es ist auch bei T24 nochmals hervorzuheben, dass die mit Mykoplasmen infizierte Zelllinie T24 bereits infiziert in Kultur ging und für die Fragestellung keine frische Infektion stattgefunden hat. Die Zellen wurden am ersten, fünften und siebten Tag (Abbildung 10) nach der Passage fotodokumentiert und miteinander verglichen.

Bei T24 war auffallend, dass die mit Mykoplasmen infizierten Zellen am ersten Tag nach der Passage schneller an Volumen zunahmten als die nicht-infizierten Zellen. Dies fiel schon bei niedriger Vergrößerung (10x) auf und wurde bei stärkerer Vergrößerung (20x) noch deutlicher, da hier die infizierten Zellen teilweise über 50 µm groß waren. Im weiteren Verlauf schien die Infektion mit Mykoplasmen jedoch hinderlich am Wachstums- und Expansionsverhalten dieser Zelllinien zu sein, da bereits an Tag 5 die nicht-infizierten Zellen deutlich

dichter gewachsen waren und ein höheres Proliferationsverhalten zeigten als die infizierten Zellen. Optisch ließ sich vermuten, dass die infizierten Zellen deutlich weniger kohärent sind als die nicht-infizierten, bei welchen sich kohärente Zellverbände zeigen. Sieben Tage nach der Passage sah man sowohl in der 10x- als auch 20x- Vergrößerung, dass die mit Mykoplasmen infizierten Zellen der Zelllinie T24 im Vergleich mit den nicht-infizierten Zellen der gleichen Linie immer noch größer, aber weniger kohärent waren und eher solitär lagen. Auch waren deutlich mehr Zellen durch Zelltod zu Grunde gegangen waren. Bei den nicht-infizierten Zellen hatte sich innerhalb der sieben Tage ein dichter Zellrasen gebildet, bei dem die Zellen zu ca. 90 % konfluent sind. Auch bei den nicht-infizierten Zellen waren vereinzelte apoptotische Zellen auszumachen, aber deutlich weniger als bei den mit Mykoplasmen infizierten Zellen. Formal wurde in dieser Untersuchung nicht unterschieden, ob der Zelltod durch Apoptose oder Nekrose zustande kam.

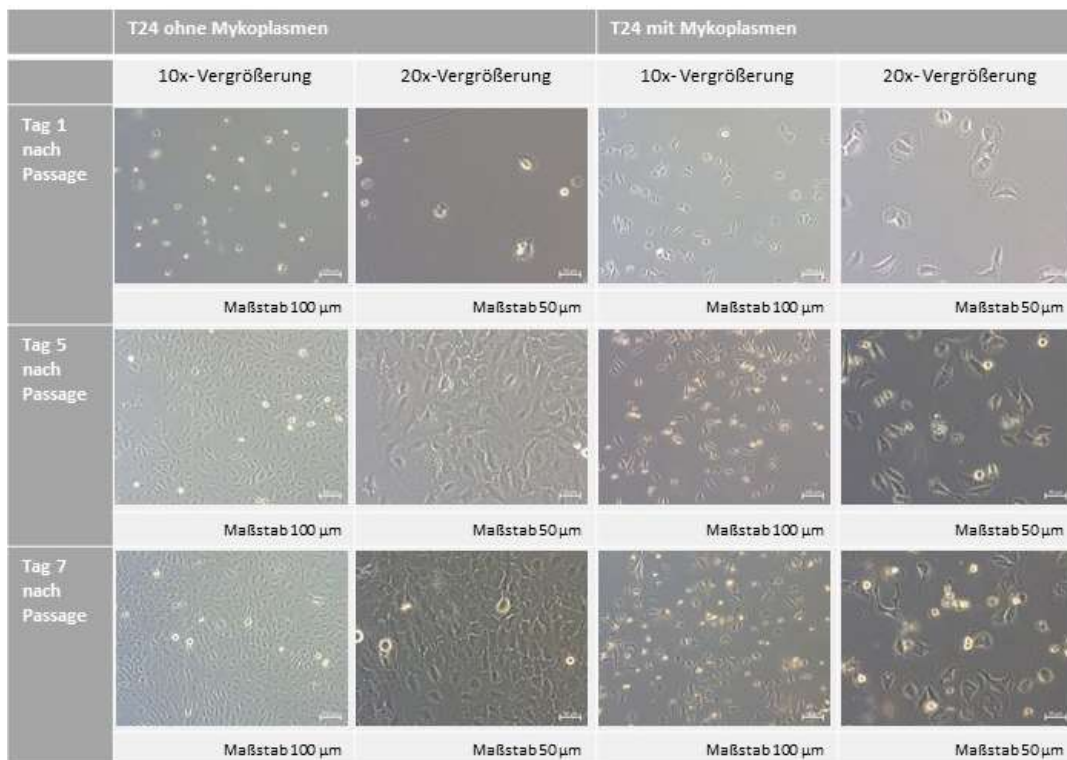


Abbildung 10 T24 Tag 1, 5 und 7 nach Passage

In dieser Abbildung ist die Fotodokumentation der Morphologischen Unterschiede zwischen den mit Mykoplasmen infizierten und den nicht-infizierten T24 Zellen dokumentiert. Die Dokumentation erfolgte am ersten, fünften und siebten Tag nach Passage jeweils in 10- und 20-facher Vergrößerung. Bei den mit Mykoplasmen infizierten Zellen ist zunächst eine schnellere Volumen Zunahme als bei den nicht-infizierten Zellen zu beobachten. Im Verlauf weisen die infizierten Zellen jedoch ein deutlich weniger kohärentes Wachstum und eine höhere Zelltodrate auf.

### **3.2.3 Morphologische Unterschiede zwischen HT1197 mit und ohne Mykoplasmen Infektion**

Anders als bei den zwei anderen Zelllinien wurde bei HT1197 eine frische Infektion mit Mykoplasmen durchgeführt. Die Methode, nach welcher die Infektion erfolgte, ist beschrieben in Material und Methoden ( 2.3.3 Infektion von HT1197, HL20/31 und HL20/32)

Aufgrund des allgemein sehr langsamen Wachstums und der Fragilität der HT1197 Zelllinie wurden die Zellen erst 24 Stunden nach der Passage infiziert und anders als die anderen Zelllinien im 14-tägigen Rhythmus passagiert. Am zweiten Tag nach der Passage erfolgte die erste Foto Dokumentation (Abbildung 11). Die weiteren Tage der Dokumentation waren der fünfte, und vierzehnte Tag nach der Passage.

Bei der Zelllinie HT1197 war auffallend, dass auch bei den nicht-infizierten Zellen in den ersten zwei Tagen sehr viele Zellen apoptotisch wurden und nur eine kleinere Anzahl in der Zellkulturflasche adhärent wurde und zu wachsen begann. Am zweiten Tag nach der Passage und somit 24 Stunden nach der Infektion mit Mykoplasmen, konnte man keinen deutlichen Unterschied im Wachstumsverhalten zwischen den Zellen erkennen.

Am fünften Tag nach der Passage hingegen sah man einen klaren Unterschied. Die nicht-infizierten Zellen hatten deutlich an Größe zugelegt und waren zwischen 50 und 100  $\mu\text{m}$  groß. Des Weiteren wuchsen die nicht-infizierten Zellen kohärent und bildeten Zellverbände. Es waren immer noch vereinzelt apoptotische Zellen zu sehen. Die mit Mykoplasmen infizierten Zellen bildeten im Gegensatz dazu deutlich weniger kohärente Zellverbände und lagen einzeln oder in kleinen Zellverbänden, bestehend aus bis zu drei Zellen vor. Auch die Größe war mit maximal 50  $\mu\text{m}$  deutlich geringer. Auch bei den infizierten Zellen sind apoptotische Zellen und Zelldebris zu sehen.

Am siebten Tag nach der Passage sah man bei den nicht-infizierten Zellen eine Kompression der im Zellverband zentralgelagerten Zellen, während die außen gelagerten Zellen eine Größe zwischen 50 und 100  $\mu\text{m}$  aufwiesen. Auch zu diesem Zeitpunkt waren einige apoptische Zellen vorhanden, obwohl die



Zellkultur noch nicht annähernd konfluent war. Die infizierten Zellen bildeten auch zu diesem Zeitpunkt nur kleinste Zellverbände von 3-4 Zellen, während ihre Größe annähernd konstant zum fünften Tag nach der Passage geblieben war. Es schien jedoch so, als wäre die Zelltodrate noch etwas höher und etwas mehr Zelldebris erkennbar. Im Rahmen dieser Untersuchung wurde nicht unterschieden, ob der Zelltod durch Apoptose oder Nekrose verursacht wurde.

Zwei Wochen nach der Passage hatten die nicht-infizierten Zellen größere Areale mit konfluenten Zellrasen gebildet. Die zentral gelegenen Zellen wirkten weiterhin komprimiert, während die äußeren Zellen spindelförmig ausliefen. Es waren etwas weniger apoptotische Zellen erkennbar. Die infizierten Zellen hatten im Vergleich zu vorherigen Aufnahmen größere Zellinseln und Zellverbände gebildet, aber wiesen morphologische Unterschiede auf. Sie waren deutlich kleiner und wirken deutlich kompakter ohne spindelförmige Ausläufer. Auch wiesen sie deutlich mehr Zelldebris auf als die gesunden Zellen.

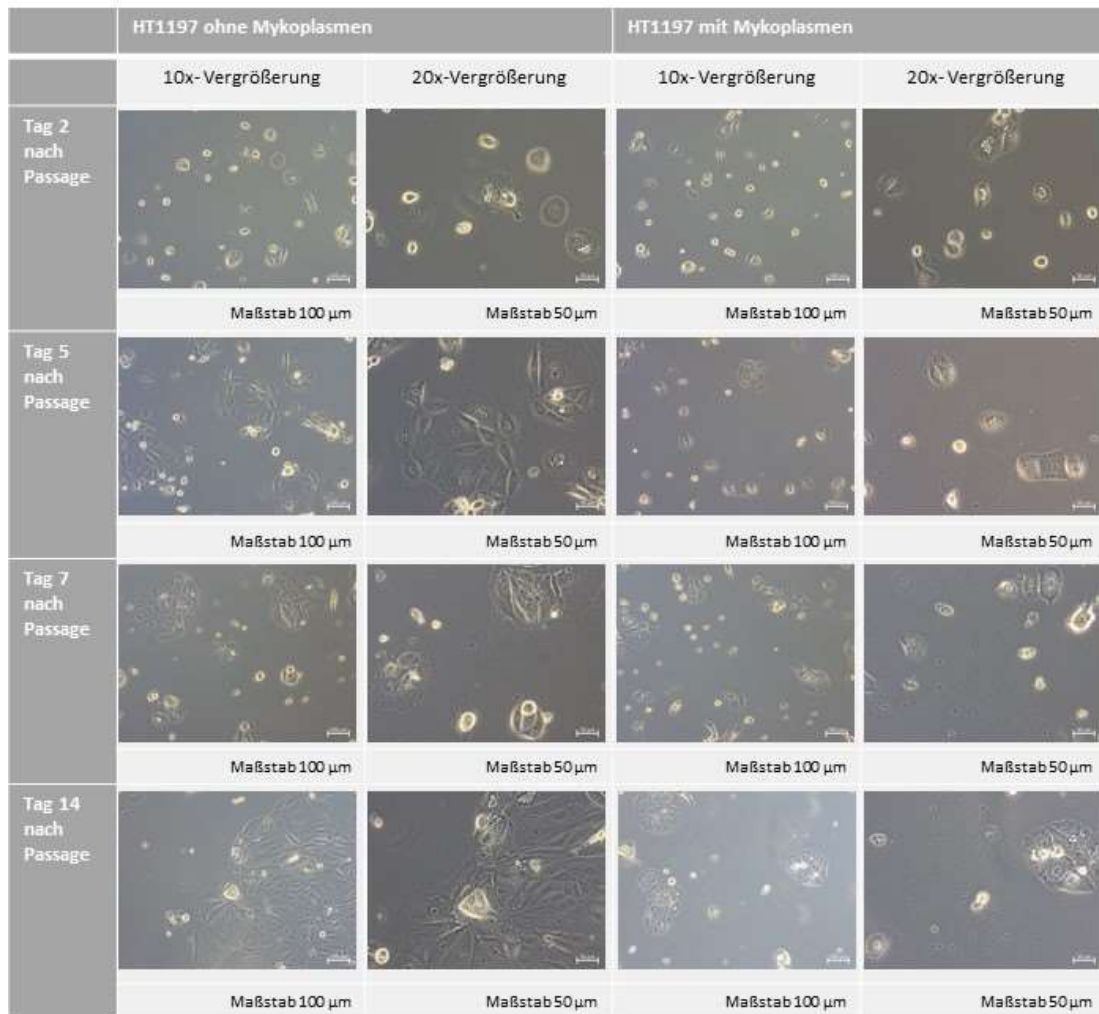


Abbildung 11 HT1197 Tag 2, 5, 7 und 14 nach Passage  
 In dieser Abbildung ist die Fotodokumentation der Morphologischen Unterschiede zwischen den mit Mykoplasmen infizierten und den nicht-infizierten HT1197 Zellen dokumentiert. Die Dokumentation erfolgte am zweiten, fünften, siebten und vierzehnten Tag nach Passage, jeweils in 10- und 20-facher Vergrößerung. Die mit Mykoplasmen infizierten Zellen weisen eine deutlich geringere Kohärenz auf

### 3.2.4 Morphologische Unterschiede zwischen aus Harnleitern isolierten Zellen mit und ohne Mykoplasmen Infektion

Wie bei der Zelllinie HT1197 erfolgte bei den aus Harnleitern isolierten Zellen eine frische Infektion mit Mykoplasmen. Die Methode, nach welcher die Infektion erfolgte, ist beschrieben in Material und Methoden ( 2.3.3 Infektion von HT1197, HL20/31 und HL20/32)

Aufgrund des sehr langsamen Wachstums und der Fragilität der Harnleiterzellen wurden die Zellen erst für die Dauer von 9 Tagen nach der zweiten Passage expandiert und erst nach dieser Zeit infiziert und im 21-tägigen Rhythmus passagiert. Zum Zeitpunkt der Infektion befanden sich die

Zellen bereits in der zweiten Passage. Am ersten Tag nach der Infektion mit Mykoplasmen erfolgte die erste Foto Dokumentation sowohl der infizierten als auch der nicht-infizierten Harnleiterzellen. Die weiteren Tage der Dokumentation waren der neunte, zwölfte, achtzehnte und 21. Tag nach der Passage. Beim Vergleich der aus Harnleitern isolierten Zellen wurde beachtet, dass es sich bei HL 20/31 um einen tumorfreien Harnleiter handelte, während HL 20/32 ein Harnleiter mit Urothelkarzinom war.

#### 3.2.4.1 Morphologische Unterschiede zwischen mit Mykoplasmen infizierten und Mykoplasmen freien aus tumorfreien Harnleitern isolierten Zellen (HL 20/31)

Bei den aus dem tumorfreien Harnleiter gewonnenen nicht-infizierten Urothelzellen (HL20/31) ließ sich über den gesamten beobachteten Zeitraum (siehe Abbildung 12) ein flächenhaft dichtes und kohärentes Wachstum beobachten. Die Zellen waren nahezu 100% konfluent in der T25 Zellkulturflasche und wiesen ab dem achtzehnten Tag nach der Passage eine erhöhte Rate an apoptotischen Zellen auf. Die Zellgröße war mit ca. 50-75 µm über den gesamten Zeitraum annähernd konstant.

Die mit Mykoplasmen infizierten, jedoch tumorfreien Urothelzellen wiesen am zwölften Tag nach der Passage, entsprechend dem vierten Tag nach der Infektion, keinen merklichen morphologischen Unterschied zu den nicht-infizierten Zellen auf. Dies änderte sich am achtzehnten Tag nach der Passage, da nun trotz kohärenter Zellen deutlich mehr apoptotische Zellen vorhanden waren und die Zellgröße mit maximal 50 µm kleiner ausfiel als die der nicht-infizierten Zellen am gleichen Tag nach der Passage. Diese Eigenschaften verstärkten sich bis zum 21. Tag nach Passage deutlich, da nun bei den infizierten Zellen eine Großzahl der Zellen durch Zelltod zu Grunde gegangen war und eine geringere Zellgröße um 25 µm aufwiesen. Des Weiteren war auffallend, dass die Zellen nun nicht mehr so kohärent waren wie zuvor und auch nicht so konfluent wie die nicht-infizierte Vergleichspopulation. Formal konnte im Rahmen dieses Versuchs nicht zwischen Zelltod durch Nekrose oder durch Apoptose unterschieden werden.

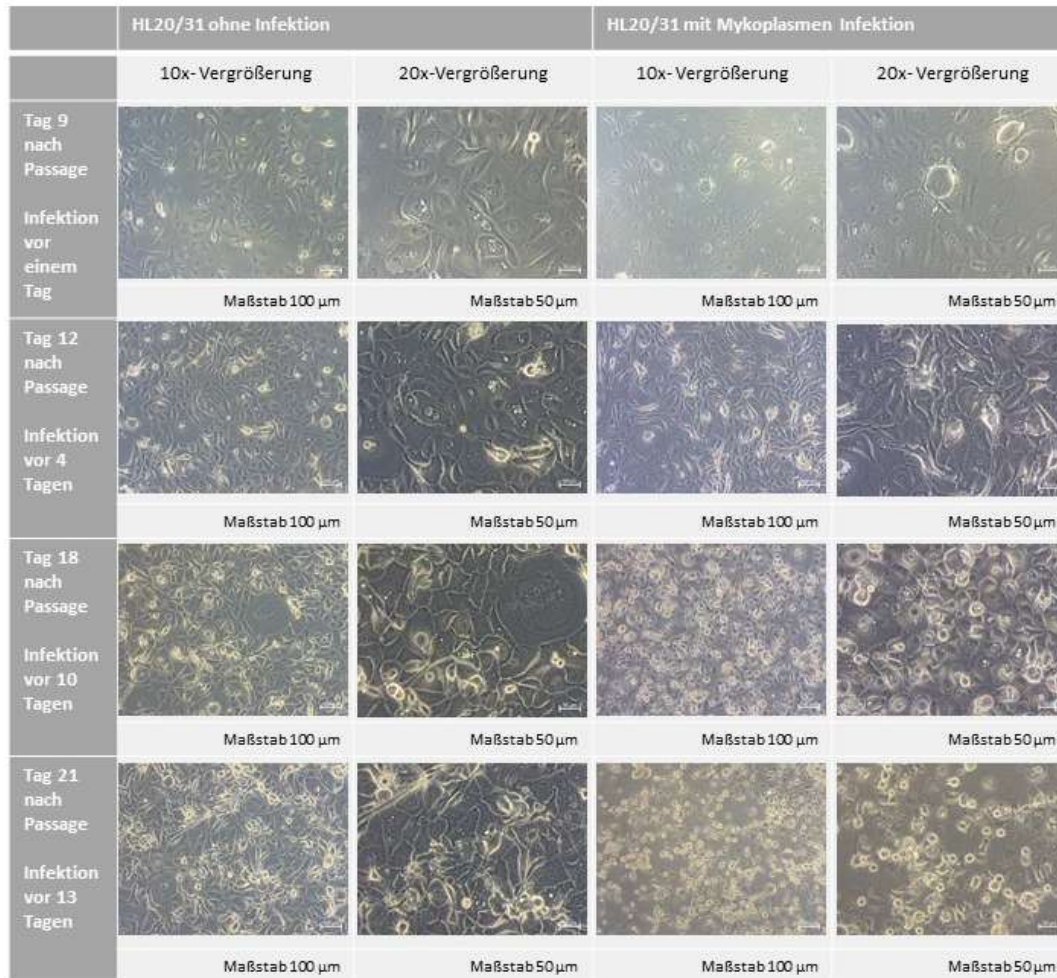


Abbildung 12 HL20/31 mit und ohne Infektion mit Mykoplasmen an Tag 9, 14, 18 und 21 nach der Passage  
 In dieser Abbildung ist die Fotodokumentation der Morphologischen Unterschiede zwischen den mit Mykoplasmen infizierten und den nicht-infizierten HL20/31 Zellen dokumentiert. Die Dokumentation erfolgte am neunten Tag nach Passage, entsprechend dem ersten Tag nach der Infektion mit Mykoplasmen. Des Weiteren am zwölften, achtzehnten und 21. Tag nach Passage. Die Aufnahme erfolgte jeweils in 10- und 20-facher Vergrößerung. Die mit Mykoplasmen infizierten Zellen weisen im Verlauf eine kleinere Zellgröße und höhere Zelltod Raten auf als die nicht-infizierten.

### 3.2.4.2 Morphologische Unterschiede zwischen Mykoplasmen infizierten und Mykoplasmen freien aus Harnleitern mit Urothelkarzinom isolierten Zellen (HL 20/32)

Bei den aus einem Präparat mit Urothelkarzinom isolierten Harnleiterzellen war auffallend, dass sowohl die infizierten als auch die nicht-infizierten Urothelzellen am neunten Tag nach der Passage nicht annähernd konfluent und nur wenig kohärent waren (siehe Abbildung 13). Vereinzelt waren apoptotische Zellen sichtbar.

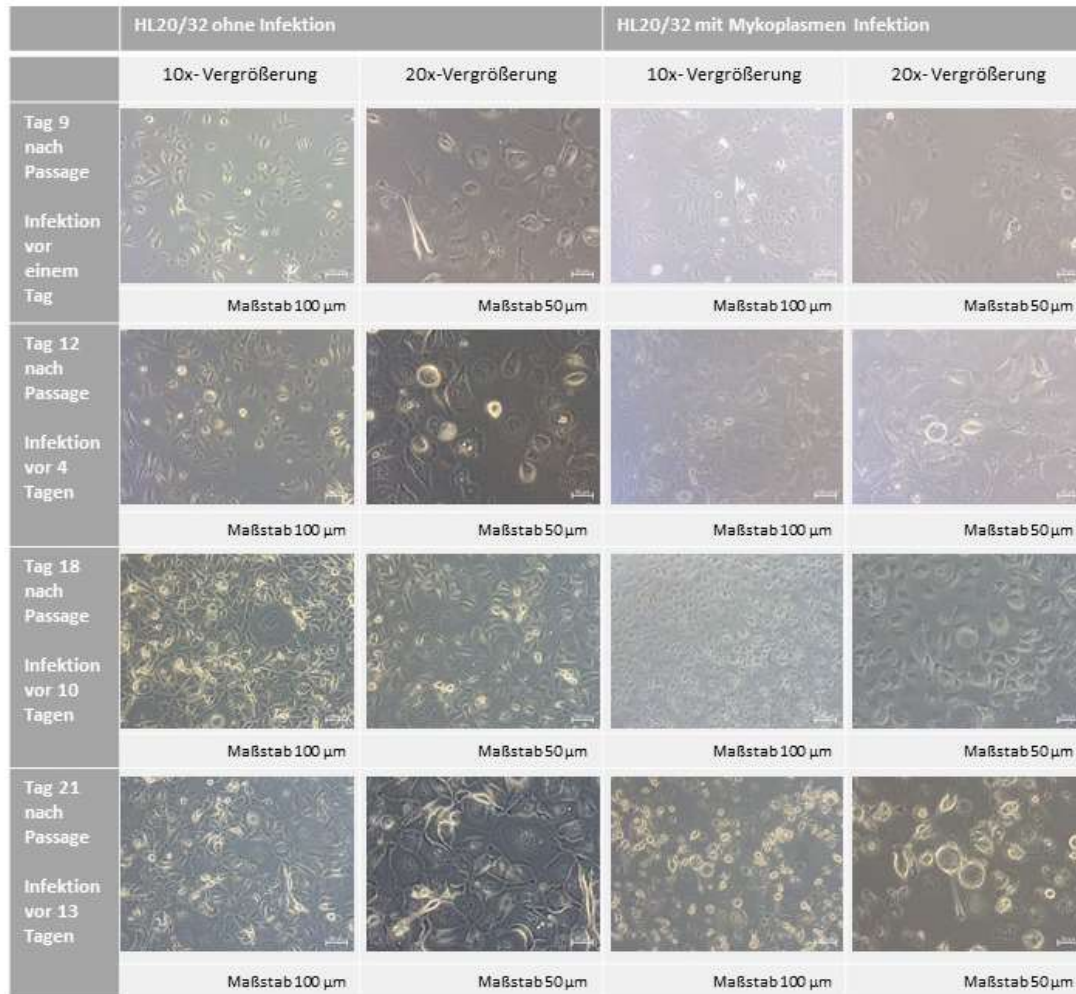


Abbildung 13 HL20/32 mit und ohne Infektion mit Mykoplasmen an Tag 9, 14, 18 und 21 nach der Passage  
 In dieser Abbildung ist die Fotodokumentation der Morphologischen Unterschiede zwischen den mit Mykoplasmen infizierten und den nicht-infizierten HL20/32 Zellen dokumentiert. Die Dokumentation erfolgte am neunten Tag nach Passage, entsprechend dem ersten Tag nach der Infektion mit Mykoplasmen. Des Weiteren am zwölften, achtzehnten und 21. Tag nach Passage. Die Aufnahme erfolgte jeweils in 10- und 20-facher Vergrößerung. Die mit Mykoplasmen infizierten Zellen weisen ein deutlich weniger kohärentes und konfluentes Wachstum als die nicht-infizierten Zellen auf.

Am zwölften Tag nach der Passage hatten die nicht-infizierten an Größe zugenommen und waren im Schnitt zwischen 50-100 µm groß. Am achtzehnten Tag nach der Passage waren die Zellen konfluent und kohärent mit etwas vermehrt zwischengelagerten apoptotischen Zellen. Dieser Trend setzte sich bis zum 21. Tag nach Passage fort. Zu diesem Zeitpunkt waren die Zellen noch größer geworden und wiesen einen Durchmesser zwischen 50-150 µm auf.

Im Vergleich dazu zeigten die mit Mykoplasmen infizierten Zellen bereits 12 Tage nach der Passage (und somit 4 Tage nach der Infektion) ein abweichendes Wachstumsmuster. Die Zellen wiesen dünne spindelförmige

Ausläufer auf, die sich bis zum achtzehnten Tag nach der Passage wieder zurückbildeten, wobei die Zellen auch zu diesem Zeitpunkt deutlich weniger kohärent waren als die Vergleichskultur ohne Infektion. Am 21. Tag nach der Passage waren die mit Mykoplasmen infizierten Zellen deutlich atrophiert und deutlich weniger kohärent und konfluent. Des Weiteren ließen sich deutlich mehr apoptotische Zellen ausmachen als bei den nicht-infizierten Zellen. Formal konnte im Rahmen dieser Studie nicht zwischen Zelltod durch Apoptose oder durch Nekrose unterschieden werden.

### **3.3 Expression von CD276 auf mRNA Ebene bei mit Mykoplasmen infizierten Zellen im Vergleich mit Mykoplasmen freien Zellen**

Mittels qRT-PCR wurde bei den Zelllinien Cal29, T24 und HT1197 der Gehalt an CD276 mRNA und den Referenzgenen GAPDH und  $\beta$ -Aktin analysiert und in ein Verhältnis gesetzt. Bei den Zelllinien HT1197, Cal29 und T24 gab es bereits eine Grundtestung zu Beginn der Arbeit. Dann wurden bei Cal29 und T24, für die Dauer von vier Wochen alle sieben Tage eine RNA-Isolation vorgenommen. Dies geschah sowohl mit den mit Mykoplasmen infizierten als auch mit den nicht-infizierten Zellen. Bei HT1197 erfolgte die Isolation der RNA alle zwei Wochen.

#### **3.3.1 *CD276 mRNA Expression in Cal29 Zellen mit und ohne Mykoplasmen Infektion***

Zunächst ist festzuhalten, dass bei der Zelllinie Cal29, wie auch bei T24, keine neue Infektion stattgefunden hat, sondern die Zellen bereits über einen längeren Zeitraum infiziert waren.

Beim Vergleich der Zelllinie Cal29 mit und ohne Mykoplasmen Infektion fiel optisch (Abbildung 14 und Tabelle 25) zunächst auf, dass die Zellen ohne Mykoplasmen Infektion eine deutlich größere Menge an CD276 mRNA aufwiesen als die infizierten Zellen.

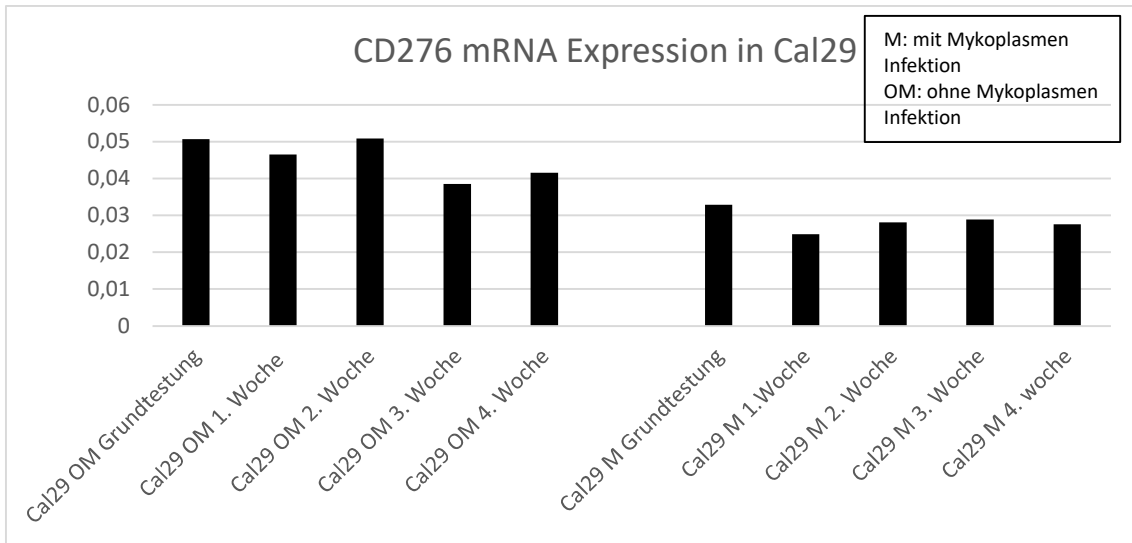


Abbildung 14 CD276 mRNA Expression in Cal29 Zellen  
 In dieser Abbildung ist die Menge der CD276 mRNA Expression von Cal29 (welche zuvor für die qRT-PCR in cDNA umgeschrieben wurde) mit und ohne Mykoplasmeninfektion nach der ersten, zweiten, dritten und vierten Woche Zellkultur graphisch dargestellt. Es zeigt sich eine höhere CD276 mRNA Expression bei den mit Mykoplasmen infizierten Cal29 Zellen.

Tabelle 25 Werte der CD276 mRNA Expression in Cal29  
 Menge der CD276 mRNA Expression in Cal29 mit und ohne Mykoplasmen Infektion zu verschiedenen Zeitpunkten. Es zeigt sich eine geringere Expression den nicht-infizierten Zellen.

Zeitpunkt der Testung	CD276 mRNA Expression in Cal29
Cal29 ohne Mykoplasmen Infektion Grundtestung	0,0507
Cal29 ohne Mykoplasmen Infektion 1. Woche	0,0465
Cal29 ohne Mykoplasmen Infektion 2. Woche	0,0509
Cal29 ohne Mykoplasmen Infektion 3. Woche	0,0385
Cal29 ohne Mykoplasmen Infektion 4. Woche	0,0416
Cal29 <b>mit</b> Mykoplasmen Infektion Grundtestung	0,0329
Cal29 <b>mit</b> Mykoplasmen Infektion 1. Woche	0,0249
Cal29 <b>mit</b> Mykoplasmen Infektion 2. Woche	0,0281
Cal29 <b>mit</b> Mykoplasmen Infektion 3. Woche	0,0289
Cal29 <b>mit</b> Mykoplasmen Infektion 4. Woche	0,0276

Wie bereits bei Cal29 erwähnt, fand auch bei der Zelllinie T24 keine frische Infektion statt. Die mit Mykoplasmen infizierten Zellen waren bereits über einen längeren Zeitraum infiziert und wurden im Folgenden mit den nicht-infizierten T24 Zellen im Bezug auf ihr Gehalt an CD276 mRNA analysiert. Es war auffallend, dass bei der Zelllinie T24 die nicht-infizierten Zellen durchschnittlich eine deutlich geringere Menge an CD276 mRNA aufwiesen als die mit Mykoplasmen infizierten Zellen (siehe Abbildung 15 und Tabelle 26). Dieses Verhalten war genau umgekehrt zu dem der Zelllinie Cal29, bei der die mit

Mykoplasmen infizierten Zellen eine geringere Menge an CD276 aufwiesen als die nicht-infizierten.



Abbildung 15 CD276 mRNA Expression in T24 Zellen  
Übersicht der Unterschiede in der CD276 mRNA Expression bei mit Mykoplasmen infizierten und nicht-infizierten T24 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten.

Tabelle 26 Werte der CD276 mRNA Expression bei T24  
Übersicht der Genauen Zahlenwerte der Unterschiede in der CD276 mRNA Expression in T24 mit und ohne Mykoplasmen Infektion zu verschiedenen Zeitpunkten.

Zeitpunkt der Testung	CD276 mRNA Expression in T24
T24 ohne Mykoplasmen Infektion Grundtestung	0,00669
T24 ohne Mykoplasmen Infektion 1. Woche	0,00622
T24 ohne Mykoplasmen Infektion 2. Woche	0,00681
T24 ohne Mykoplasmen Infektion 3. Woche	0,00665
T24 ohne Mykoplasmen Infektion 4. Woche	0,0068
T24 mit Mykoplasmen Infektion Grundtestung	0,00855
T24 mit Mykoplasmen Infektion 1. Woche	0,0139
T24 mit Mykoplasmen Infektion 2. Woche	0,0122
T24 mit Mykoplasmen Infektion 3. Woche	0,00889
T24 mit Mykoplasmen Infektion 4. Woche	0,00914

Bei der Zelllinie HT1197 erfolgte eine Infektion mit Mykoplasmen durch T24-Überstand. Im Vergleich mit den Zelllinien Cal29 und T24 ließ sich bei HT1197 auf den ersten Blick (Abbildung 16 und Tabelle 27) keine klare Tendenz des CD276 mRNA Gehalts der Zellen erkennen. Vergleicht man jedoch die Mittelwerte (Abbildung 17), erkennt man, dass die nicht-infizierten HT1197



Zellen durchschnittlich einen höheren Gehalt an CD276 mRNA hatten als die mit Mykoplasmen infizierten Zellen.

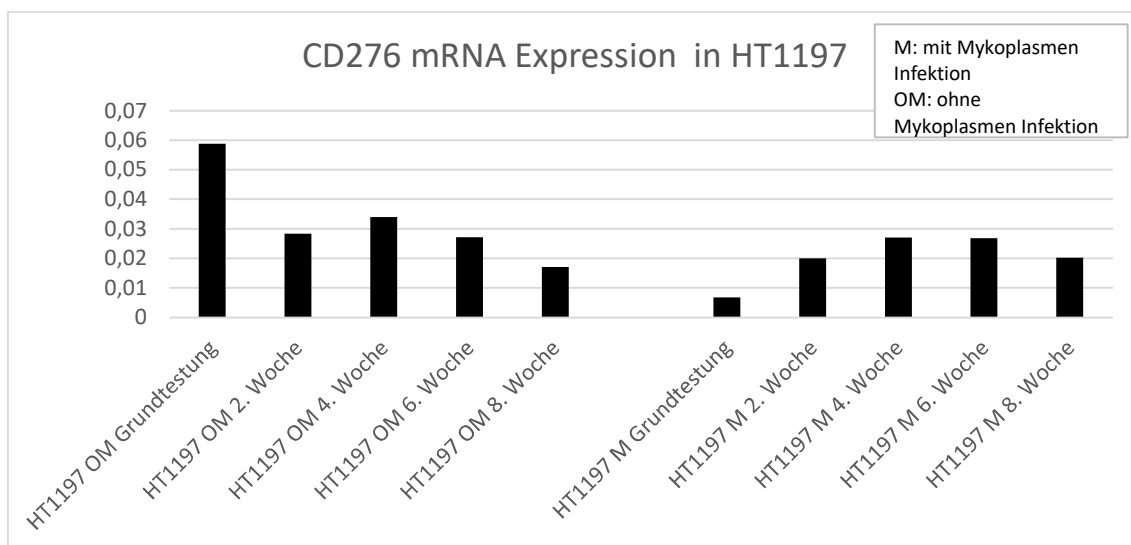


Abbildung 16 CD276 mRNA Expression bei HT1197  
Übersicht der Unterschiede in der CD276 mRNA Expression bei mit Mykoplasmen infizierten und nicht-infizierten HT1197 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten.

Tabelle 27 Werte der CD276 mRNA Expression bei HT1197  
Übersicht der Genauen Zahlenwerte der Unterschiede in der CD276 mRNA Expression in HT1197 mit und ohne Mykoplasmen Infektion zu verschiedenen Zeitpunkten.

Zeitpunkt der Testung	CD276 mRNA Expression in HT1197
HT1197 ohne Mykoplasmen Infektion Grundtestung	0,0588
HT1197 ohne Mykoplasmen Infektion 2. Woche	0,0284
HT1197 ohne Mykoplasmen Infektion 4. Woche	0,034
HT1197 ohne Mykoplasmen Infektion 6. Woche	0,0272
HT1197 ohne Mykoplasmen Infektion 8. Woche	0,0171
HT1197 mit Mykoplasmen Infektion Grundtestung	0,0068
HT1197 mit Mykoplasmen Infektion 2. Woche	0,02
HT1197 mit Mykoplasmen Infektion 4. Woche	0,0271
HT1197 mit Mykoplasmen Infektion 6. Woche	0,0268
HT1197 mit Mykoplasmen Infektion 8. Woche	0,0202

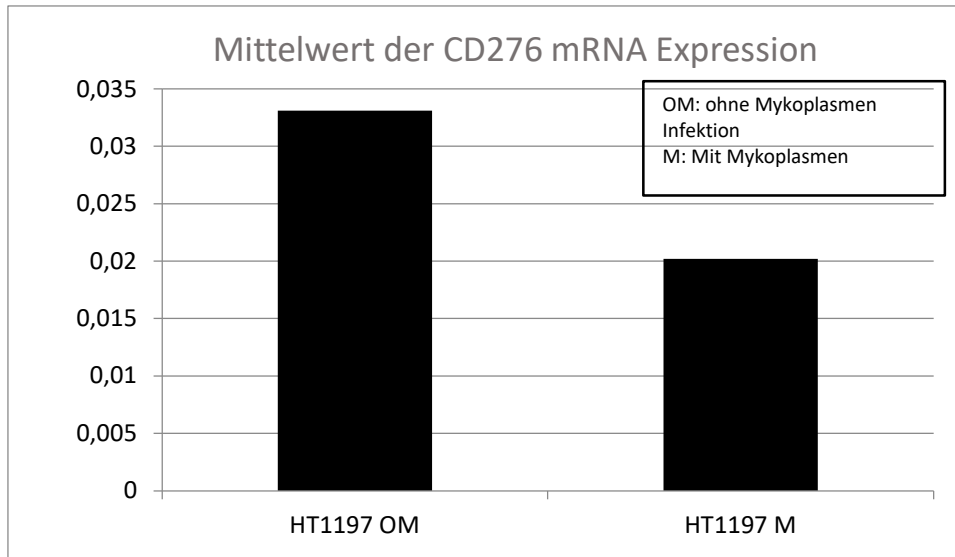


Abbildung 17 Mittelwert der CD276 mRNA Expression in HT1197 Zellen mit und ohne Mykoplasmen Infektion Grafische Darstellung

### 3.3.2 CD276 mRNA Expression in den aus Harnleitern isolierten Zellen HL 20/31 und HL 20/32

Wie bei den Zelllinien Cal29, T24 und HT1197 wurde auch bei den aus Präparaten gewonnen Zellen HL 20/31 und HL 20/32 der Gehalt an CD276 mRNA und den Referenzgenen GAPDH und  $\beta$ -Aktin analysiert und in ein Verhältnis gesetzt.

Die aus den Präparaten gewonnen Zellen HL 20/31 und HL 20/32 befanden sich zum Zeitpunkt der Infektion bereits in der zweiten Passage. Drei Wochen nach der Infektion erfolgte die erste RNA-Extraktion der mit Mykoplasmen infizierten und der nicht-infizierten Zellen sowie die Passage der Zellen. Nach dieser dritten Passage wurden jedoch kaum Zellen adhären und es fanden sich zunehmend apoptotische Zellen in den Kulturflaschen, sodass aufgrund der minimalen Menge an vitalen Zellen keine erneute RNA-Extraktion zu einem späteren Zeitpunkt möglich war. Im Folgenden kann darum nur ein Vergleich, zwischen den aus einem Tumor isolierten Harnleiterzellen HL 20/32 und den aus einem tumorfreien Harnleiter isolierten Zellen HL 20/31 jeweils mit und ohne Mykoplasmen Infektion für den Zeitraum 3 von Wochen nach der Infektion erfolgen.

Beim Vergleich der tumorfreien HL 20/31 Zellen in Abbildung 18 ist auffallend, dass drei Wochen nach Infektion mit Mykoplasmen die Menge an CD276 mRNA in den mit Mykoplasmen infizierten Zellen annähernd halb so groß war wie in den Mykoplasmen-freien Zellen. Die genauen Werte können in Tabelle 28 eingesehen werden.

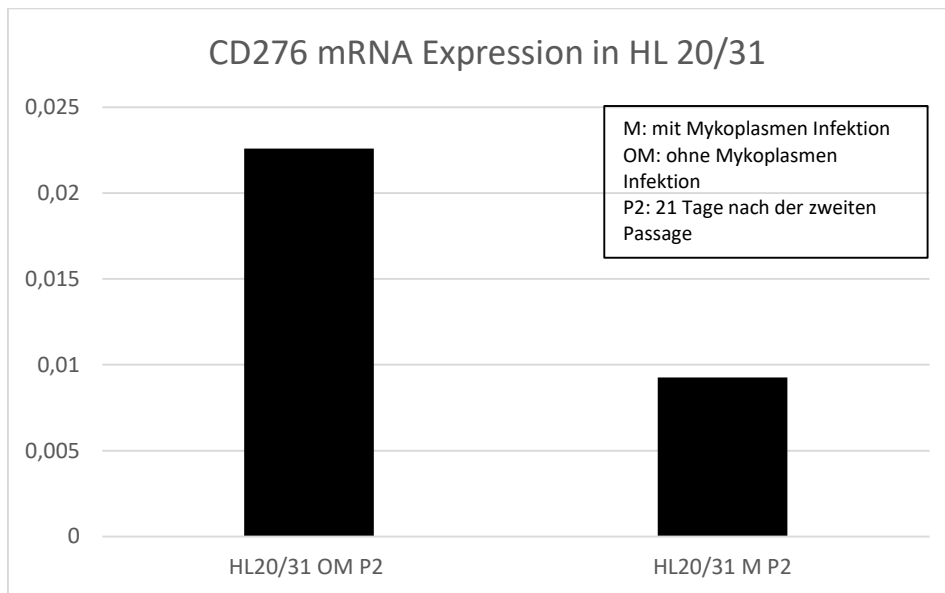


Abbildung 18 CD276 mRNA Expression in HL 20/31 Zellen  
Grafische Darstellung der ermittelten Unterschiede in der CD276 mRNA Expression bei den Zellen HL 20/31 mit und ohne Mykoplasmeninfektion.

Tabelle 28 Werte der CD276 mRNA Expression in HL 20/31 Zellen  
Übersicht der ermittelten Werte der CD276 mRNA Expression in HL 20/31 Zellen mit und ohne Mykoplasmeninfektion.

Zeitpunkt der Testung	CD276 mRNA Expression in HL 20/31
HL 20/31 ohne Mykoplasmen Infektion P2	0,0226
HL 20/31 mit Mykoplasmen Infektion P2	0,00926

Im Vergleich dazu wiesen bei den aus einem Harnleiter mit Tumor isolierten Zellen HL 20/32 (Abbildung 19 und Tabelle 29) drei Wochen nach der Infektion die mit Mykoplasmen-infizierten Zellen nur geringfügig mehr CD276 mRNA auf als die nicht-infizierten Zellen. Der Unterschied in der CD276 mRNA Expression kann Tabelle 29 entnommen werden. Es fällt auf, dass das Verhalten der Zellen mit Tumor (HL 20/32) mit einer höheren Expression von CD276 mRNA einhergeht und somit genau gegensätzlich zu dem der tumorfreien Zellen (HL 20/31) ist. Jedoch ist beim Vergleich der Zellen auf die unterschiedliche Scala zu achten, da der Unterschied zwischen HL 20/32 mit und ohne Mykoplasmen

Infektion deutlich geringer ist als der Unterschied zwischen den infizierten und nicht-Infizierten HL 20/31 Zellen.

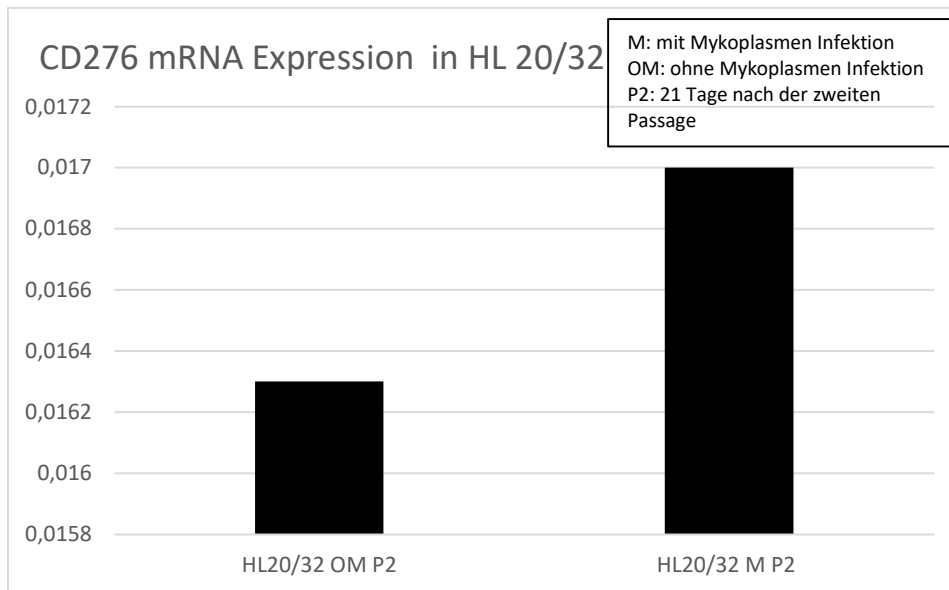


Abbildung 19 CD276 mRNA Expression in HL 20/32 Zellen  
In der Abbildung ist der Unterschied in der CD276 mRNA Expression grafisch dargestellt.

Tabelle 29 Werte der CD276 mRNA Expression in HL 20/32 Zellen  
In der Tabelle sind die Werte der CD276 mRNA Expression in den Zellen HL 20/32 aufgeführt. Es gibt keinen großen Unterschied zwischen den infizierten und den nicht-infizierten Zellen.

Zeitpunkt der Testung	CD276 mRNA Expression in HL 20/32
HL20/32 ohne Mykoplasmen Infektion P2	0,0163
HL20/32 mit Mykoplasmen Infektion P2	0,017

### 3.4 Expression von CD276 auf Proteinebene bei nicht-infizierten sowie mit Mykoplasmen infizierten Zellen

Mittels SDS-PAGE und einem quantitativen Western Blot wurde die Menge an CD276 Protein für die Zelllinien Cal29, T24 und HT1197 sowie den HL 20/31 ermittelt.

Die Zelllinie Cal29 hatte optisch, abgesehen von der Probe der nicht-infizierten Zellen, nach der ersten Woche annähernd die gleiche Menge an CD276 Protein, sowohl in den infizierten als auch in den nicht-infizierten Zellen. Die Pigmentdichte der  $\beta$ -Aktin Bande von Cal29 war jedoch in allen Proben der infizierten als auch der nicht-infizierten Cal29 Zellen deutlich stärker als die Bande des CD276 Proteins. Beim Vergleich des Gehalts an CD276 Protein in

den Zelllinien Cal29 und T24 in Abbildung 20, fiel auf, dass in T24 deutlich weniger CD276 Protein vorhanden war. Auch die Bande des Housekeeping Protein  $\beta$ -Aktin war in T24 deutlich schwächer ausgeprägt als bei Cal29. Bei den nicht-infizierten T24 Zellen war optisch sowohl mehr CD276 Protein als auch  $\beta$ -Aktin vorhanden als bei den infizierten T24 Zellen. Dies bestätigte sich bei der Messung der Pigment Dichte in Abbildung 21.

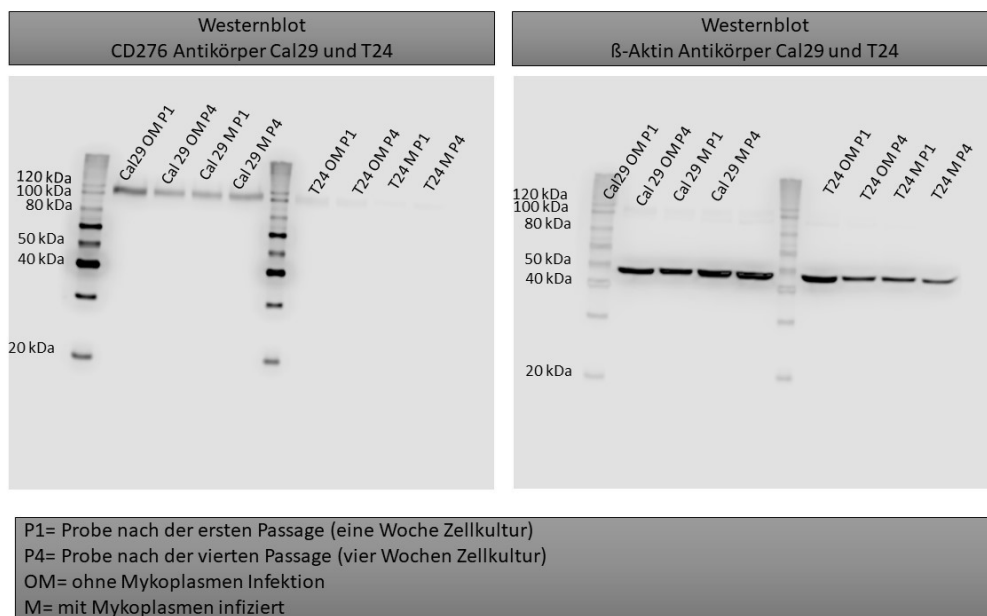


Abbildung 20 Ergebnisse CD276 und  $\beta$ -Aktin Antikörper Färbung Western Blot für Cal29 und T24  
In der Abbildung ist das Ergebnis der LI-COR<sup>®</sup> Messung der Western Blot Färbung mit dem CD276 Antikörper (links) und dem  $\beta$ -Aktin Antikörper (rechts) für die Zellen der Zelllinien Cal29 und T24 zu sehen. Hierbei wird zwischen den mit Mykoplasmen infizierten Zellen und den nicht-infizierten Zellen unterschieden und außerdem zwischen der ersten und der vierten Passage.

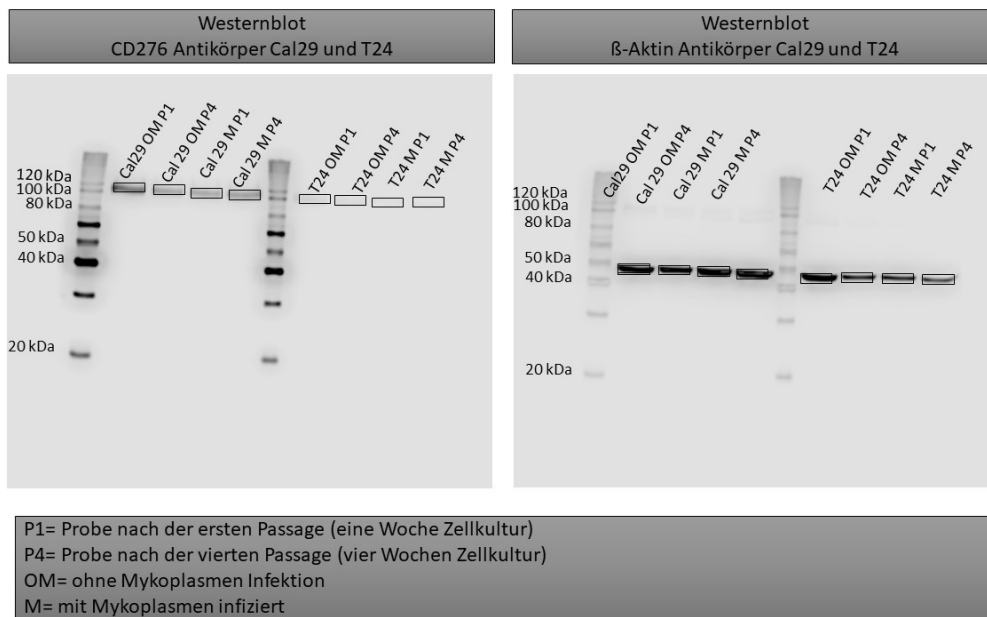


Abbildung 21 Genormter Messbereich der CD276 und β-Aktin Banden bei Cal29 und T24  
In der Abbildung ist das Ergebnis der LI-COR® Messung der Western Blot Färbung mit dem CD276 Antikörper (links) und dem β-Aktin Antikörper (rechts) für die Zellen der Zelllinien Cal29 und T24 jeweils nach der ersten und nach der vierten Passage zu sehen. Hierbei wird zwischen den mit Mykoplasmen infizierten Zellen und den nicht-infizierten Zellen unterschieden. Es handelt sich um das gleiche Bild wie in Abbildung 22 jedoch wurde in dieser Abbildung zusätzlich ein standardisierter Messbereich für die Messung der Pigmentdichte in den Banden eingezeichnet.

Auf der zweiten Membran befanden sich die Proben der Zelllinie HT1197 und die aus einem tumorfreien Harnleiter isolierten Zellen HL 20/31. Die Proben der Zellen, die aus einem Harnleiter mit Tumor isoliert wurden (HL 20/32), wiesen bei der Proteinbestimmung einen zu geringen Wert auf, um sie für den Western Blot zu nutzen und wurden deshalb nicht für den Western Blot verwendet. Die Banden des CD276 Proteins waren sowohl in der mit Mykoplasmen infizierten als auch in den Mykoplasmen-freien Probe des Harnleiters etwas schwächer als die Banden in HT1197.

In den HT1197 Zellen ohne Mykoplasmen Infektion ließ sich nach der ersten Passage eine etwas schwächere Bande des CD276 Proteins darstellen. Die Banden der vierten Woche ohne Infektion und der beiden Proben von HT1197 mit Mykoplasmen Infektion zeigen eine ähnlich starke Bande (siehe Abbildung 22). Bei der Darstellung des β-Aktins ließ sich optisch kein herausstechender Unterschied zwischen der Stärke der Banden feststellen. Auch hier wurde die Pigmentdichte in einem genormten Bereich (siehe Abbildung 23) gemessen.

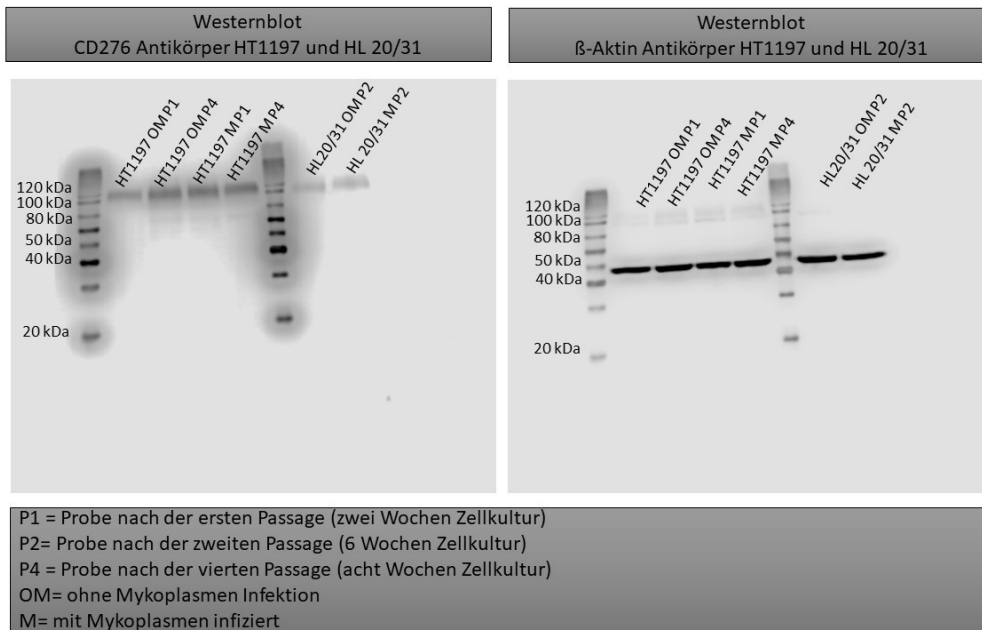


Abbildung 22 Western Blot HT1197 und HL 20/31

In der Abbildung ist das Ergebnis der LI-COR® Messung der Western Blot Färbung mit dem CD276 Antikörper (links) und dem β-Aktin Antikörper (rechts) für die Zellen der Zelllinie HT1197 und die aus dem OP-Präparat isolierten Zellen HL 20/31 zu sehen. Hierbei wird zwischen den mit Mykoplasmen infizierten Zellen und den nicht-infizierten Zellen unterschieden. Bei HT1197 ist außerdem der Unterschied zwischen der ersten und der vierten Passage erfasst während bei den Zellen von HL 20/31 nur eine Probe nach der zweiten Passage erfasst wurde.

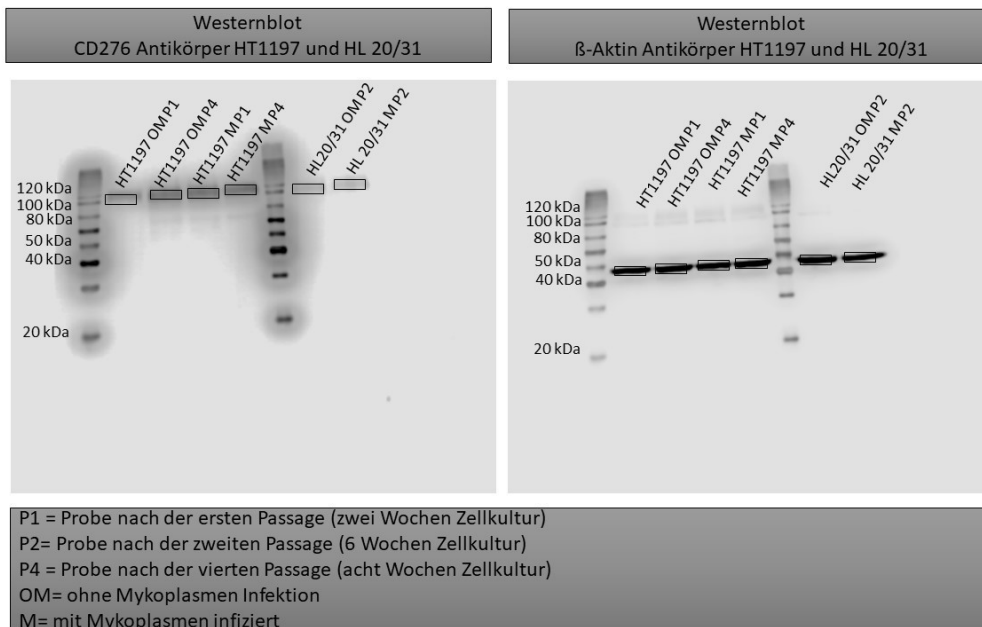


Abbildung 23 genormter Messbereich der CD276 und β-Aktin Banden bei HT1197 und HL 20/31

In der Abbildung ist das Ergebnis der LI-COR® Messung der Western Blot Färbung mit dem CD276 Antikörper (links) und dem β-Aktin Antikörper (rechts) für die Zellen der Zelllinie HT1197 und die aus dem OP-Präparat isolierten Zellen HL 20/31 zu sehen. Hierbei wird zwischen den mit Mykoplasmen infizierten Zellen und den nicht-infizierten Zellen unterschieden. Es handelt sich um das gleiche Bild wie in Abbildung 22 jedoch wurde in dieser Abbildung zusätzlich ein standardisierter Messbereich für die Messung der Pigmentdichte in den Banden eingezeichnet.

Mittels LI-COR® ImageStudio™ Lite Software wurde in einem immer gleich großen Messbereich die Pigmentdichte der Banden gemessen (siehe Abbildung 21, Abbildung 22 und Abbildung 23). So konnte die errechnete Menge an CD276 in ein Verhältnis zu der errechneten Menge an  $\beta$ -Aktin derselben Probe gesetzt werden und ein Quotient ermittelt werden (siehe Tabelle 30). Bei der grafischen Darstellung dieser Quotienten (siehe Abbildung 24) ergaben sich folgende Ergebnisse:

Bei der Zelllinie Cal29 hatte sich Verhältnis CD276/ $\beta$ -Aktin bei den nicht-infizierten Zellen beim Vergleich der ersten mit der vierten Woche annähernd halbiert. Bei den über lange Zeit mit Mykoplasmen infizierten Zellen hingegen hatte sich das Verhältnis von der ersten auf die vierte Woche gesteigert.

Bei der Zelllinie T24 war das Verhältnis CD276/ $\beta$ -Aktin sowohl bei den infizierten als auch bei den nicht-infizierten deutlich geringer. Dies hatte sich zuvor bereits bei den deutlich schwächeren Banden angedeutet. Hier verhält es sich ähnlich wie bei der Zelllinie Cal29: bei den nicht-infizierten Zellen ist beim Vergleich der ersten mit der vierten Woche eine Verringerung des Verhältnisses sichtbar, während bei den infizierten Zellen das Verhältnis leicht zunahm.

Bei den nicht-infizierten Zellen der Zelllinie HT1997 war in der Probe nach der vierten Passage der CD276/ $\beta$ -Aktin Quotient annähernd doppelt so groß wie der Wert der ersten Woche. Vergleicht man den Quotienten bei den beiden Proben der infizierten HT1197 Zellen, so sinkt dieser beim Vergleich der ersten mit der vierten Passage ab.

Bei den zwei Proben der tumorfreien Harnleiterzellen HL 2031 hatte sich der Wert des Quotienten bei den mit Mykoplasmen infizierten Zellen im Vergleich mit den nicht-infizierten Zellen annähernd halbiert. Da es jeweils nur eine Probe der infizierten und der nicht-infizierten Zellen gab, war es nicht möglich, etwas über die Tendenz der Expression des CD276 Proteins beziehungsweise des  $\beta$ -



Aktins zu sagen.

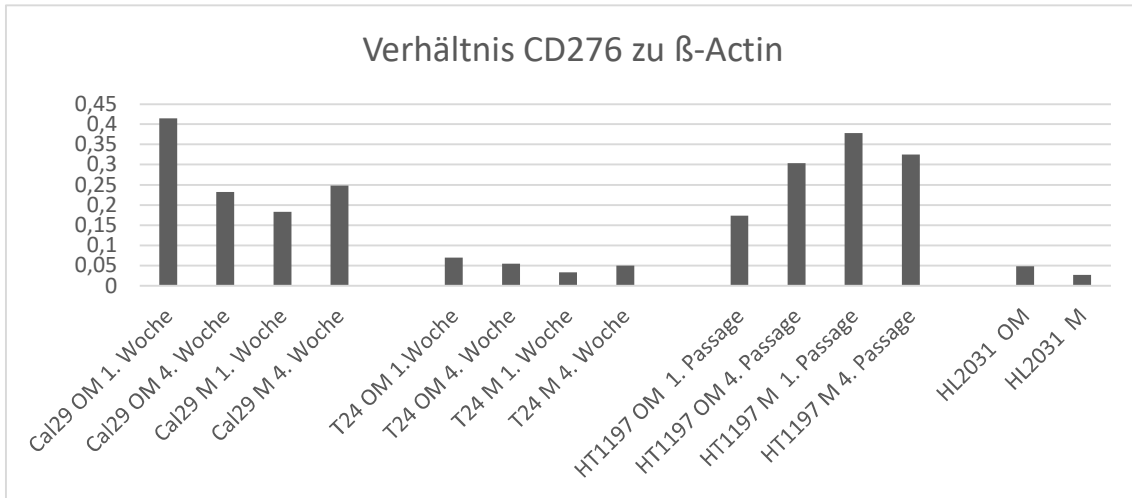


Abbildung 24 Grafik des Verhältnisses der CD276 Protein und  $\beta$ -Aktin Expression im Western Blot  
In der Abbildung ist das Verhältnis von CD276 zu dem Housekeeping Gen  $\beta$ -Aktin grafisch für die Zelllinien Cal29, T24 und HT1197 sowie die aus Harnleitern isolierten Zellen HL 20/31 dargestellt. Hierbei wird erstens zwischen den infizierten Zellen und den Mykoplasmen-freien Zellen und zweitens zwischen der erste und der vierten Passage unterschieden.

Tabelle 30 Verhältnis Pigmentdichte CD276 Protein zu  $\beta$ -Aktin im Western Blot  
In der Tabelle ist die Anzahl der im Li-COR<sup>®</sup> gemessenen Pigmente von CD276 und  $\beta$ -Aktin für die Zelllinien Cal29, T24, HT1197 und HL 20/31 jeweils mit und ohne Mykoplasmen Infektion aufgeführt. Hierbei wird außerdem zwischen der ersten und vierten Woche unterschieden.

	Pigmentdichte CD276	Pigmentdichte $\beta$ -Aktin	Verhältnis der Pigmentdichte CD276 zu $\beta$ -Aktin
Cal29 OM 1. Woche	192000	463000	0,414686825
Cal29 OM 4. Woche	94600	407000	0,232432432
Cal29 M 1. Woche	85000	465000	0,182795699
Cal29 M 4. Woche	117000	471000	0,248407643
T24 OM 1. Woche	36200	520000	0,069615385
T24 OM 4. Woche	14600	267000	0,054681648
T24 M 1. Woche	8550	258000	0,033139535
T24 M 4. Woche	8980	179000	0,050167598
HT1197 OM 1. Passage	49400	285000	0,173333333
HT1197 OM 4. Passage	98700	325000	0,303692308
HT1197 M 1. Passage	99800	264000	0,378030303
HT1197 M 4. Passage	108000	332000	0,325301205
HL20/31 OM	15700	325000	0,048307692
HL20/31 M	7140	265000	0,026943396

### **3.5 Expression von CD276 an der Oberfläche von Mykoplasmen infizierten Urothelzellen im Vergleich mit nicht-infizierten Urothelzellen**

In der Durchflusszytometrie wurde die oberflächliche CD276 Expression der verschiedenen Zelllinien gemessen. Dabei wurden die Unterschiede zwischen den nicht-infizierten Zellen einer Zelllinie und den mit Mykoplasmen infizierten Zellen derselben Zelllinie erfasst. Jede der beiden Proben einer Zelllinie hatte jeweils eine zusätzliche Kontrolle, welche in Abbildung 26 in grau dargestellt ist.

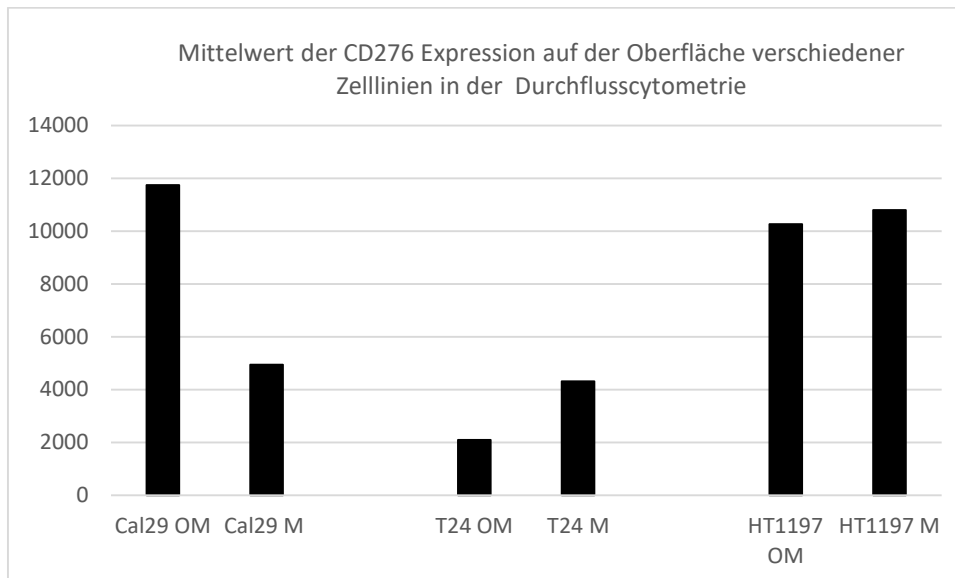
Zur Auswertung der Daten, die sich anhand der Durchflusszytometrie ergaben, wird im Folgenden besonders auf den Median und den Mittelwert (Mean) geachtet. Diese Werte der zentralen Tendenz ermöglichen einen Vergleich der Expression zwischen den mit Mykoplasmen infizierten und nicht-infizierten Zellen einer Zelllinie. Um diesen Vergleich zu verdeutlichen, wurden die Mittelwerten der CD276 Expression in Abbildung 25 nochmals graphisch dargestellt. Aufgrund des schlechten Wachstums nach der dritten Passage war eine Analyse der aus Harnleitern isolierten Zellen HL 20/31 und HL 20/32 mittels Durchflusszytometrie nicht möglich und somit gibt es keine Analyse der Oberflächen Expression von CD276 dieser Zellen.

Auch hier ist festzuhalten, dass bei den Zelllinien T24 und Cal29 keine frische Infektion mit Mykoplasmen stattgefunden hatte, sondern die beiden Zelllinien bereits über einen längeren Zeitraum infiziert waren. Bei der Zelllinie Cal29 erfolgte die Durchflusszytometrie nach vier Wochen Zellkultur. Beim Vergleich der beiden Kulturen fiel auf, dass die mit Mykoplasmen infizierte Kultur eine deutlich geringere oberflächliche CD276 Expression aufwies als die Mykoplasmen-freie Kultur.

Bei der Zelllinie T24 war genau der gegenteilige Effekt zu beobachten, da hier die mit Mykoplasmen infizierten Zellen im Vergleich mit den Mykoplasmen-freien Zellen eine annähernd doppelt so hohe Expression an CD276 an der Oberfläche aufwiesen.

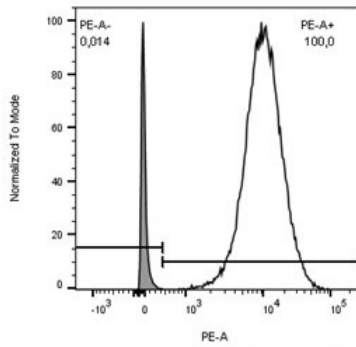
HT1197 war die dritte Zelllinie, deren oberflächliche Expression von CD276 analysiert wurde. Bei diesen Zellen hatte eine frische Infektion mit

Mykoplasmen stattgefunden und die Durchflusszytometrie fand acht Wochen nach der Infektion statt. Beim Vergleich fiel auf, dass die mit Mykoplasmen infizierten Zellen eine minimal höhere Expression von CD276 an der Oberfläche aufwiesen als die nicht-infizierten Zellen. Auffallend war auch, dass der Unterschied zwischen der mittleren Expression von CD276 bei HT1997 deutlich geringer ausfiel als bei den Zelllinien Cal29 und T24.



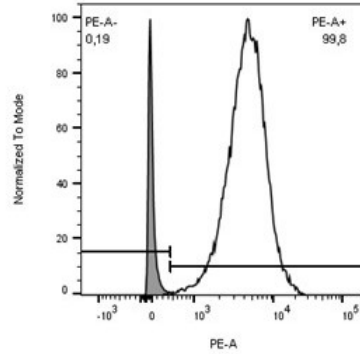
*Abbildung 25 Mittelwerte der CD276 Oberflächen Protein Expression in der Durchflusszytometrie*  
*In der Abbildung ist die oberflächliche Expression von CD276 für die kommerziellen Tumorzelllinien Cal29, T24 und HT1197 dargestellt. Hierbei ist jeweils der direkte Vergleich, zwischen den mit Mykoplasmen infizierten und den nicht-infizierten Zellen der Zelllinien möglich. Es zeigt sich, dass bei Cal29 die Mykoplasmen infizierten Zellen eine geringere CD276 Expression haben als die gesunde Referenz. Bei T24 sieht es genau umgekehrt aus und bei HT1197 sieht man keinen signifikanten Unterschied.*  
*M: Mit Mykoplasmen OM: Ohne Mykoplasmen*

### Cal29 ohne Mykoplasmen



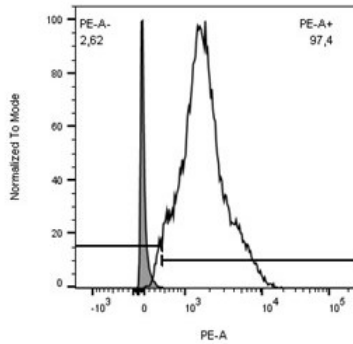
Sample Name	Median : PE-A	Mean : PE-A
T24 und Cal29 CD276_Cal29 OM Kontrolle.fcs	79,6	94,9
T24 und Cal29 CD276_Cal29 OM CD276.fcs	9729	11738

### Cal29 mit Mykoplasmen



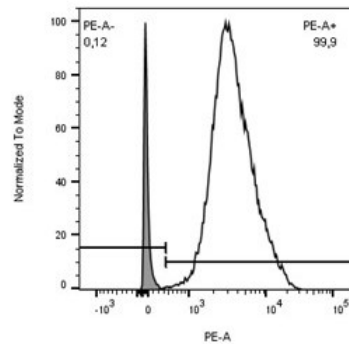
Sample Name	Median : PE-A	Mean : PE-A
T24 und Cal29 CD276_Cal29 M Kontrolle.fcs	84,8	107
T24 und Cal29 CD276_Cal29 M CD276.fcs	4334	4947

### T24 ohne Mykoplasmen



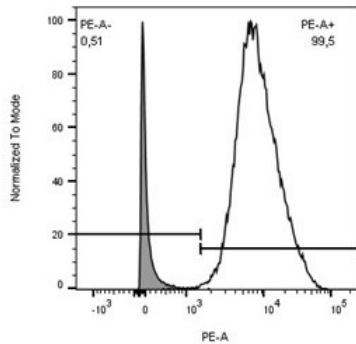
Sample Name	Median : PE-A	Mean : PE-A
T24 und Cal29 CD276_T24 OM Kontrolle.fcs	74,5	95,0
T24 und Cal29 CD276_T24 OM CD276.fcs	1606	2089

### T24 mit Mykoplasmen



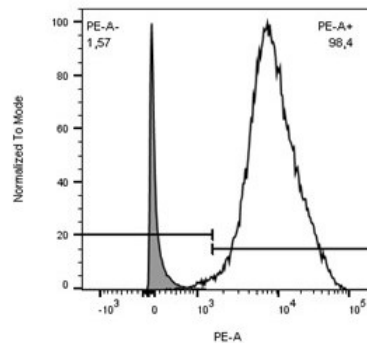
Sample Name	Median : PE-A	Mean : PE-A
T24 und Cal29 CD276_T24 M Kontrolle.fcs	65,6	87,0
T24 und Cal29 CD276_T24 M CD276.fcs	3279	4309

### HT1197 ohne Mykoplasmen



Sample Name	Median : PE-A	Mean : PE-A
Ht1197 OM und M_HT1197 OM Kontrolle.fcs	87,4	195
Ht1197 OM und M_HT1197 OM CD276.fcs	7529	10265

### HT1197 mit Mykoplasmen



Sample Name	Median : PE-A	Mean : PE-A
Ht1197 OM und M_HT1197 M Kontrolle.fcs	84,8	187
Ht1197 OM und M_HT1197 M CD276.fcs	7629	10798

Abbildung 26 Übersicht der Durchflusszytometrie Ergebnisse der Zelllinien Cal29, T24 und HT1197. Ergebnis der Messung der oberflächlichen Expression von CD276 in Cal29, T24 und HT1197 jeweils mit und ohne Mykoplasmeninfektion. Die Kontrolle der jeweiligen Probe ist in grau dargestellt.

### 3.6 Zusammenfassung und Überblick der Ergebnisse

Die Ergebnisse der unterschiedlichen Messungen sind für die jeweiligen Tumorzelllinien und aus OP-Präparaten isolierten Harnleiterzellen in den folgenden Tabellen (Tabelle 31, Tabelle 32, Tabelle 33, Tabelle 34 und Tabelle 35) zusammengefasst.

*Tabelle 31 Ergebnisübersicht der CD276 Expression auf unterschiedlichen Ebenen in T24*

<b>T24</b>	
<b>Morphologie und Proliferationsrate</b>	Mit Mykoplasmen infizierte Zellen wiesen eine schnellere Proliferationsrate auf und waren morphologisch größer. Im Verlauf zeigten die infizierten Zellen aber deutlich höhere Raten an Zelltod und ein weniger kohärentes Wachstum als die nicht-infizierten Zellen.
<b>CD276 mRNA Expression</b>	Die mit Mykoplasmen infizierten Zellen wiesen durchschnittlich eine größere Menge an CD276 mRNA auf.
<b>Western Blot Analyse der CD276 Protein Expression</b>	Die CD276 Protein Expression war in den nicht-infizierten Zellen höher als in den mit Mykoplasmen infizierten.
<b>Oberflächen Expression von CD276 in der Durchflusszytometrie (FACS)</b>	Die infizierten Zellen hatten im Vergleich zu den nicht-infizierten eine annähernd doppelt so hohe Expression an oberflächlichen CD276 Protein.

*Tabelle 32 Ergebnisübersicht der CD276 Expression auf unterschiedlichen Ebenen in Cal29*

<b>Cal29</b>	
<b>Morphologie und Proliferationsrate</b>	Mit Mykoplasmen infizierte Zellen wiesen eine schnellere Proliferationsrate auf und waren morphologisch kleiner und weniger kohärent als die

	nicht-infizierten Zellen und wiesen einen vermehrt apoptotische Zellen auf.
<b>CD276 mRNA Expression</b>	Die infizierten Zellen hatten eine deutlich geringere CD276 mRNA Expression als die nicht-infizierten Zellen. Die nicht-infizierten wiesen eine deutlich größere (annähernd doppelt so große) Expression an CD276 mRNA auf.
<b>Western Blot Analyse der CD276 Protein Expression</b>	Die mit Mykoplasmen infizierten Zellen wiesen einen geringeren Gehalt an CD276 Protein auf.
<b>Oberflächen Expression von CD276 in der Durchflusszytometrie (FACS)</b>	Die infizierten Zellen hatten einen geringeren Gehalt an oberflächlich exprimierten CD276. Die nicht-infizierten Zellen wiesen eine deutlich höhere (annähernd doppelt so große) oberflächliche CD276 Expression auf.

*Tabelle 33 Ergebnisübersicht der CD276 Expression auf unterschiedlichen Ebenen in HT1197*

<b>HT1197</b>	
<b>Morphologie und Proliferationsrate</b>	Mit Mykoplasmen infizierte Zellen wuchsen annähernd gleich schnell wie nicht-infizierte Zellen, waren jedoch im Vergleich zu den nicht-infizierten Zellen deutlich kleiner und bildeten kleinere kohärente Zellverbände.
<b>CD276 mRNA Expression</b>	Im Verlauf war keine klare Tendenz der CD276 mRNA Expression erkennbar, aber insgesamt wurde eine minimal größere Expression in den mit Mykoplasmen infizierten Zellen beobachtet.
<b>Western Blot Analyse der CD276 Protein Expression</b>	Nach der ersten Passage nach der Infektion wiesen die infizierten Zellen eine höhere Konzentration an CD276 Protein auf als die nicht-infizierten Zellen. Im Verlauf wiesen die infizierten Zellen einen ähnlichen

	CD276 Proteingehalt wie die nicht-infizierten Zellen auf.
<b>Oberflächen Expression von CD276 in der Durchflusszytometrie (FACS)</b>	Die mit Mykoplasmen infizierten Zellen wiesen im Vergleich zu den nicht-infizierten Zellen eine leicht erhöhte Expression an oberflächlichen CD276 auf.

*Tabelle 34 Ergebnisübersicht der CD276 Expression auf unterschiedlichen Ebenen in Harnleiter 20/31*

<b>HL20/31 (Zellen aus einem tumorfreien Harnleiter)</b>	
<b>Morphologie und Proliferationsrate</b>	Mit Mykoplasmen infizierte Zellen wiesen im Vergleich zu den nicht-infizierten Zellen im Verlauf eine deutlich kleinere Zellgröße und ein weniger kohärentes Wachstum mit höheren Zelltod Raten auf.
<b>CD276 mRNA Expression</b>	Die nicht-infizierten Zellen wiesen im Vergleich zu den mit Mykoplasmen infizierten Zellen eine annähernd doppelt so große Menge an CD276 mRNA auf.
<b>Western Blot Analyse der CD276 Protein Expression</b>	Die nicht-infizierten Zellen wiesen eine höhere CD276 Protein Konzentration auf als die mit Mykoplasmen infizierten Zellen.
<b>Oberflächen Expression von CD276 in der Durchflusszytometrie (FACS)</b>	Aufgrund einer zu geringen Zellmenge war keine Beurteilung der Oberflächen Expression von CD276 möglich.

Tabelle 35 Ergebnisübersicht der CD276 Expression auf unterschiedlichen Ebenen in Harnleiter 20/32

<b>HL20/32 (Zellen aus Harnleiter mit Tumor)</b>	
<b>Morphologie und Proliferationsrate</b>	Mit Mykoplasmen infizierte Zellen wiesen im Vergleich zu den nicht-infizierten Zellen deutlich mehr Zelltod und ein weniger kohärentes Wachstum auf. Im Verlauf kam es bei den infizierten Zellen zu einer Atrophie.
<b>CD276 mRNA Expression</b>	Die mit Mykoplasmen infizierten Zellen aus dem Tumorpharnleiter wiesen nach der Infektion im Vergleich mit den nicht-infizierten Zellen eine minimal erhöhte CD276 Expression auf.
<b>Western Blot Analyse der CD276 Protein Expression</b>	Aufgrund einer unzureichenden Extraktion von Proteinen war keine Beurteilung möglich.
<b>Oberflächen Expression von CD276 in der Durchflusszytometrie (FACS)</b>	Aufgrund einer zu geringen Zellmenge war keine Beurteilung der Oberflächen Expression von CD276 möglich

## 4 Diskussion

Das Ziel der Arbeit ist die Erforschung des Einflusses von Mykoplasmen auf die Expression von CD276 auf der Transkriptebene, der Proteinebene und auf der Ebene der Oberflächenproteine. Zusätzlich sollte der Einfluss von Mykoplasmen auf die Morphologie und die Proliferationsrate erfasst werden. Diese Daten wurden sowohl bei den infizierten Zellen als auch bei den entsprechenden Mykoplasmen-freien Zellen erfasst und miteinander verglichen. Hierbei zeigte sich, dass sich die Expression von CD276 durch eine Infektion mit Mykoplasmen verändert. Der Einfluss auf die Expression variiert jedoch nicht nur zwischen unterschiedlichen Zelllinien, sondern auch auf unterschiedlichen Expressionsebenen. Im folgenden Teil werden die in der



Arbeit erhobenen Daten und Ergebnisse diskutiert und in den aktuellen wissenschaftlichen Kontext eingeordnet. Außerdem wird auf die gewählten Materialien und Methoden eingegangen und abschließend werden die Schlussfolgerung und ein Ausblick dargelegt.

#### **4.1 Diskussion der Ergebnisse**

Zunächst wird auf die beobachteten morphologischen und genetischen Eigenschaften und Unterschiede zwischen den infizierten und nicht-infizierten Zellen eingegangen. Außerdem wird auf die Abweichungen zwischen unterschiedlichen Zelllinien und den aus Präparaten isolierten Zellen eingegangen.

##### **4.1.1 Morphologische und Replikationsraten Unterschiede**

Die mit Mykoplasmen infizierten Zellen der Zelllinie T24 wiesen bereits am ersten Tag nach der Passage eine größere Zellgröße, eine schnellere Proliferationsrate und eine höhere Zelltodrate auf als die nicht-infizierten Zellen der gleichen Zelllinie. Bei der Zelllinie Cal29 wiesen die mit Mykoplasmen infizierten Zellen, genau wie die infizierten Zellen der T24 Zelllinie, eine schnellere Proliferationsrate und eine höhere Apoptoserate auf als die nicht-infizierten Zellen. Wobei formal im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurde, ob der Zelltod durch Apoptose oder Nekrose eingetreten ist. Ein entscheidender Unterschied ist aber, dass die infizierten Cal29 Zellen eine kleinere Zellgröße als die nicht-infizierten Cal29 Zellen aufwiesen. Dies steht im Gegensatz zu dem Verhalten der infizierten Zellen der T24 Zelllinien. Die Proliferationsrate der Zellen der HT1197 Zelllinie war bei den infizierten und nicht-infizierten Zellen annähernd gleich langsam. Initial war kein deutlicher morphologischer Unterschied zwischen den Zellen erkennbar. Im Verlauf der Zellkultur zeigte sich jedoch, dass die Zellgröße der mit Mykoplasmen infizierten Zellen kleiner war und die Zellen weniger kohärente Zellverbände bildeten als die nicht-infizierten Zellen. Die aus Harnleitern isolierten Urothelzellen HL 20/31 stammten aus einem tumorfreien Harnleiter, während die Zellen HL20/32 aus einem Harnleiter mit Tumor stammten. Nach der Infektion mit Mykoplasmen verhielten sich beide Zellkulturen jedoch identisch: Sie waren im Verlauf der

Infektion morphologisch deutlich kleiner und wiesen einen höheren Zelluntergang (Apoptose oder Nekrose) als ihre jeweilige nicht-infizierte Vergleichspopulation auf. Bei den aus Harnleitern isolierten Zellen war jedoch sowohl bei den nicht-infizierten als auch bei den infizierten Zellen die Proliferationsrate so niedrig, dass ein Einfluss auf diese nicht abschließend ermittelt werden konnte. Jedoch ist festzuhalten, dass die kleinere Zellgröße der infizierten Zellen im Vergleich mit den nicht-infizierten Zellen mit dem Verhalten der im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls frisch infizierten Zelllinie HT1197 und der bereits über einen längeren Zeitraum infizierten Zelllinie Cal29 übereinstimmte. Diese Größenregression der Zellen, welche sich bereits nach wenigen Tagen nach der Infektion mit Mykoplasmen zeigte, wurde bereits Mitte der sechziger Jahre von Paton et al. beschrieben (Paton et al., 1965). Tsai et al. zeigten in ihrer Studie, dass die maligne Transformation der Zellen bei einer Langzeitinfektion mit Mykoplasmen ein mehrstufiger Prozess ist, bei dem auch phänotypische Unterschiede mit der Dauer der Infektion zunehmen. Sie beobachteten bereits nach 7 Wochen morphologische Unterschiede bei den mit Mykoplasmen infizierten Zellen. Außerdem fanden sie heraus, dass die Eigenschaften, die mit der malignen Zelltransformation assoziiert sind, noch bis zu elf Wochen nach initialer Infektion durch eine antibiotische Eradikation der Mykoplasmen reversibel waren. Nach der achtzehnten Woche jedoch war die Transformation irreversibel und auch nach Entfernen der Mykoplasmen zeigten sich chromosomale Veränderungen und die Fähigkeit der Zellen, Tumore zu bilden (Tsai et al., 1995). Die infizierten Zelllinien T24 und Cal29 hatten ihre Infektion bereits über einen längeren Zeitraum und hatten dementsprechend auch bereits mehrere Passage Zyklen durchlaufen. Es ist davon auszugehen, dass sich deshalb die Unterschiede in der Morphologie und Zellproliferation hier stärker zeigten.

#### ***4.1.2 Unterschiede in der CD276 Gen- und Proteinexpression durch eine Mykoplasmeninfektion***

Es ist bereits bekannt, dass Bakterien beim Eindringen in einen Wirt einen Einfluss auf die Zellen und deren Genaktivierung haben. Dies erleichtert ihnen die Invasion und dient ihrem eigenen Schutz (Bliska et al., 1993, Pettersson et

al., 1996). Auch der Einfluss von Mykoplasmen auf die Genexpression ist bereits durch vorherige Arbeiten bekannt. So zeigten Arbeiten von unterschiedlichen Forschern bereits, dass die Infektion von Zellen mit Mykoplasmen zu einer Veränderung der Genexpression führt und die Zellen sowohl ein autonomes Wachstumsverhalten entwickeln als auch Tumore bilden können (Feng et al., 1999, Zhang et al., 2000, Zhang et al., 2004, Paton et al., 1965). Die Studien, die bereits in der Ausführung zu den morphologischen Unterschieden erwähnt wurden, zeigten auch, dass Mykoplasmen nicht nur die Zellmorphologie verändern, sondern auch in einem mehrstufigen Prozess die genetischen Modifikationen von Tumorsuppressorgenen und Aktivierungen von Onkogenen und pro-inflammatorischen Zytokinen bewirken (Tsai et al., 1995, Zhang et al., 1997, Liu and Shou, 2011). Diese Modifikationen sind bis zu einem gewissen Zeitpunkt durch eine antibiotische Eradikation der Mykoplasmen reversibel (Felsher, 2004, Zhang et al., 1997, Zhang et al., 2006). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten Unterschiede in der CD276 Expression gemessen werden, jedoch wurde nicht überprüft, ob und wenn ja wie schnell die Veränderung in der Expression an CD276 durch die Eradikation von Mykoplasmen reversibel ist.

Bei den mit Mykoplasmen infizierten T24 und Cal29 Zellen zeigte sich der Einfluss der Mykoplasmen auf die Expression von CD276 deutlicher als bei den HT1197 Zellen und den aus Harnleitern isolierten Zellen. Jedoch zeigte sich der Einfluss auf unterschiedliche Weise. Bei den mit Mykoplasmen infizierten T24 waren sowohl die Proliferationsrate als auch die mRNA-Expression und Oberflächenexpression von CD276 erhöht. Nur die Proteinexpression von CD276 war in den infizierten Zellen geringer als in den nicht-infizierten. Bei den mit Mykoplasmen infizierten Cal29 zeigten sich im Vergleich mit den nicht-infizierten Zellen eine höhere Proliferationsrate und eine höhere Proteinexpression von CD276. Bei den infizierten Zellen waren jedoch die CD276 mRNA Expression und auch die oberflächliche Proteinexpression geringer als in den gesunden Zellen. Dies korreliert mit den Ergebnissen von Zhang et al., die bereits zeigten, dass der Effekt auf die Genexpression sowohl von der Mykoplasmenart als auch vom Zelltyp abhängig ist und hierdurch

unterschiedliche und sogar teilweise gegenteilige Effekte auftreten können. Auch zeigten Sie, dass abhängig von der Dauer der Infektion die Hochbeziehungsweise Runterregulation von Genen unterschiedlich ausgeprägt ist (Zhang et al., 2006, Zhang et al., 2000). Die Zelllinien T24 und Cal29 sind zwar beide Blasenkrebszellen, sie stammen jedoch von unterschiedlichen Patienten, was auch unterschiedliche Zelleigenschaften zur Folge haben kann. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde jedoch nicht überprüft, ob es sich bei den beiden Zelllinien, bei denen die Infektion mit Mykoplasmen bereits über einen längeren Zeitraum besteht, um die gleiche Art von Mykoplasmen handelte. Dies kann auch zu einem Unterschied in der Expression von CD276 führen.

Bei HT1197 wurde im Rahmen der Arbeit eine frische Infektion mit Mykoplasmen der infizierten T24 Zelllinie durchgeführt. Bei den infizierten Zellen ließ sich eine verstärkte Expression von CD276 mRNA und CD276 Oberflächenprotein erkennen. Die Änderungen in der Zellmorphologie und Expression von CD276 auf unterschiedlichen Ebenen war jedoch nicht so stark ausgeprägt wie bei den bereits über einen längeren Zeitraum infizierten Zelllinien T24 und Cal29. Dies ist im Einklang mit anderen Studien, die bereits zeigten, dass der Einfluss von Mykoplasmen auf eine maligne Transformation der infizierten Zellen von der Dauer der Infektion und der Anzahl der Zellpassagen abhängig ist und deutlicher hervortritt, wenn die Infektion bereits über einen längeren Zeitraum besteht (Tsai et al., 1995, Zhang et al., 2006).

Bei den kommerziell erwerblichen und in der Forschung etablierten Zelllinien T24, Cal29 und HT1197 gestaltet sich die Zellkultur erheblich leichter und auch die Anzahl der Passagen ist nicht limitiert. Dies erleichtert nicht nur die Erforschung des Einflusses der Mykoplasmeninfektion auf die Expression von CD276, sondern ermöglicht auch die Beurteilung über einen längeren Zeitraum. Die aus Harnleitern isolierten Urothelzellen HL20/31 und HL20/32 sind aufgrund ihrer Extraktion aus dem Resektionspräparat eines Tumors beziehungsweise eines gesunden Harnleiters in ihrer Ausbeute ex-vivo und Expansionsfähigkeit in-vitro limitiert. Hinzukommt, dass die Zellen zwischen den Passagen über einen deutlich längeren Zeitraum kultiviert werden müssen, um ein konfluentes

Wachstum zu erreichen. Auch nimmt die Anzahl an vitalen Zellen nach jeder Passage stark ab, was dazu führt, dass bereits nach der dritten Passage eine Zellkultur aufgrund der geringen Zellmenge kaum mehr möglich ist, mit der Folge, dass der Einfluss auf die CD276 Protein- und mRNA-Expression bei aus OP-Präparaten isolierten Urothelzellen nach mehreren Passagen nicht abschließend beurteilbar ist. Ein Ansatzpunkt zum Lösen dieser Problematik ist die Re-evaluation des Nährmediums, auch kann es sinnvoll sein die Untersuchungen nochmals an etablierten kommerziell erwerblichen tumorfreien Urothelzellen durchzuführen, um den Einfluss auf die CD276 Expression durch eine Infektion mit Mykoplasmen weiter zu erforschen (Sciencell Research Laboratories, o.J.).

## **4.2 Diskussion des Materials und der Methoden**

Im Rahmen der Arbeit wurden unterschiedliche Methoden genutzt, um die Expression von CD276 auf unterschiedlichen zellulären Ebenen zu messen und um zu ermitteln, ob eine Infektion mit Mykoplasmen die Expression beeinflusst. Die genutzten Methoden zeigen bereits, dass Mykoplasmen mit hoher Wahrscheinlichkeit einen Einfluss auf die Expression von CD276 haben.

### **4.2.1 Nachweis der Infektion mit Mykoplasmen**

Für den Nachweis, beziehungsweise den Ausschluss einer Infektion mit Mykoplasmen wurde im Rahmen dieser Arbeit mit dem MycoSPY® der Firma Biontexas gearbeitet. Der MycoSPY® ist bei richtiger Durchführung gemäß Hersteller Angaben eine zuverlässige Methode für das Screening auf Mykoplasmen in einer Zellkultur. Er erkennt über 40 verschiedene Mykoplasmen sowie weitere Mollicutes-Stämme, wie unter anderem Ureaplasmen und Spiroplasma (BIONTEX Laboratories GmbH, o.J.). In dieser Arbeit wurde er genutzt, um bei den mit Mykoplasmen infizierten Zellen sowohl initial als auch am Ende der Untersuchungen eine Infektion nachzuweisen. Außerdem konnte mit dem MycoSPY® bei den nicht-infizierten Zellen eine Infektion sowohl initial als auch am Ende des Untersuchungszeitraums ausgeschlossen werden. Mit dem MycoSPY® kann man jedoch nicht ermitteln,

welche Art von Mykoplasmen vorliegt. Dementsprechend ist nicht sicher, ob bei den infizierten Zellen jeweils die identische Art von Mykoplasmen vorlag oder ob verschiedene Spezies in der Kultur vorlagen. Im Rahmen dieser Forschung wurden die Zelllinien T24 wie auch Cal29 nicht frisch infiziert, sondern waren bereits seit mehreren Passagen mit Mykoplasmen infiziert. Nur die Zelllinie HT1197 und die aus Harnleitern gewonnenen Zellen HL20/31 wie auch HL20/32 wurden frisch mit Mykoplasmen infiziert. Diese für die Infektion genutzten Mykoplasmen wurden zuvor aus der T24 Zellkultur isoliert. Wie bereits in der Diskussion der Ergebnisse hervorgehoben wurde, hat bei einer Infektion mit Mykoplasmen die Spezies einen unterschiedlich stark ausgeprägten Einfluss sowohl auf die Morphologie als auch auf die molekularen Eigenschaften von Zellen. So zeigten Zhang et al. bereits, dass beispielsweise *M. fermentans* und *M. penetrans* die Genexpression von Zytokinen stärker beeinflusst als *M. genitalium* und *M. hominis* (Zhang et al., 2006, Zhang et al., 2000). Eine Differenzierung zwischen den Mykoplasmen gestaltet sich schwierig. Ein möglicher Ansatz wäre, die Infektion erneut mit bekannten Stämmen zu wiederholen, um herauszufinden, ob bestimmte Arten von Mykoplasmen einen stärkeren Einfluss auf die Modifikation der CD276 Expression haben.

#### **4.2.2 *In vitro* Einfluss von Mykoplasmen auf die Expression von CD276**

Yang et al. haben in ihrer Studie bereits gezeigt, dass Mykoplasmen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im Zusammenhang mit Tumorgenese stehen (Yang et al., 2010). Dies wurde weiter untermauert durch weitere Studien, die ebenfalls zeigten, dass Mykoplasmen durch die Aktivierung unterschiedlicher Signalwege zu einer malignen Transformation von Magen­zellen führen (Xu et al., 2013, Liu et al., 2019a).

Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurde ausschließlich *in vitro* an dem Einfluss von Mykoplasmen auf die Expression von CD276 geforscht. Krebszellen verhalten sich jedoch *in vitro* anders als *in vivo*. Die erneute Durchführung der Untersuchung an einem Organoid kann helfen, den Einfluss von Mykoplasmen auf die CD276 Expression besser zu erfassen und nachzuvollziehen, welche molekulargenetischen Pathways genutzt werden. Die Etablierung von

Organoidmodellen zum besseren Verständnis von Zelleigenschaften ist ein zukunftsreicher Bereich der Wissenschaft. Auch zur Erforschung der Wirkung von Medikamenten sind Organoide hilfreich, so haben unter anderem humane Organoidmodelle von Nieren dazu beigetragen, die Nephrotoxizität besser zu erforschen (Takasato et al., 2015, Freedman et al., 2015). Besonders interessant ist auch die Erforschung des Einflusses von pathogenen Erregern auf ihren Wirt. Hierbei macht man sich zu Nutzen, dass Organoide dem Verhalten von in vivo wachsenden Zellen sehr ähnlich sind und sie über einen längeren Zeitraum untersucht werden können. Die in Organoiden genutzten Zellen weisen die Eigenschaften der in vivo Zellen auf. So behalten intestinale Organoide beispielsweise ihre apico-basale Polarität (Dutta and Clevers, 2017). Die Erforschung der Pathogenese von Infektionskrankheiten an Organoidmodellen hat entscheidende Erkenntnisse erbracht (Dutta and Clevers, 2017). Das gramnegative Stäbchenbakterium *Helicobacter Pylori* ist bekannt für seine Fähigkeit, Magenkrebs auszulösen (Amieva and Peek Jr, 2016). Anhand von Magen-Organoiden konnten die genauen Mechanismen und Interaktionen besser erforscht werden (Bartfeld et al., 2015, Schlaermann et al., 2016). Die Etablierung eines Blasen-Organoids und das Erforschen des Einflusses einer Mykoplasmeninfektion auf die CD276 Expression wäre eine Möglichkeit, dem in vivo Pathomechanismus näher zu kommen.

#### **4.2.3 Auswahl der Zelllinien und Zellen aus klinischen Resektionspräparaten**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen sowohl an den etablierten Zelllinien T24, Cal29 und HT1197 als auch an den aus OP-Präparaten gewonnenen Zellen HL20/31 und HL20/32 durchgeführt. Der Versuchsablauf wurde mit jeder der infizierten Zellgruppen und ihrer korrespondierenden nicht-infizierten Kohorte jeweils nur einmal durchgeführt. Dies ergab sich einerseits durch den zeitlich begrenzten Rahmen der Forschung und andererseits durch die in 4.1.2 beschriebene limitierte Anzahl an Zellen aus OP-Präparaten, die eine Wiederholung der Messung unmöglich machte. Die Mehrheit der für Messungen ausgewählten Zellpopulationen waren Tumorzellen. Die Zellen der Zelllinien T24, Cal29, HT1197 und die aus einem Harnleiter isolierten Zellen HL

20/32 stammen alle aus Tumoren. Nur die Zellen des Harnleiters HL 20/31 waren tumorfrei. Die ersten Ergebnisse sind bereits sehr vielversprechend. Im Rahmen weiterer Untersuchungen sollten ergänzend sowohl mehrfach die gleichen Zellen als auch zusätzliche tumorfremie Urothelzellen untersucht werden, um eine genauere und statistisch signifikante Aussage über den Einfluss von Mykoplasmen auf die Expression von CD276 treffen zu können.

### **4.3 Schlussfolgerung und Ausblick**

Die Forschungsergebnisse legen einen Einfluss von Mykoplasmen auf die Expression von CD276 nahe. Der Einfluss variiert jedoch zwischen den unterschiedlichen Zelllinien und auch zwischen an einem Tumor erkrankten und gesunden Zellen. Durch die länger bestehende Infektion bei den T24 und Cal29 Zellen waren die Effekte der Mykoplasmen Infektion bei diesen Zelllinien deutlicher erkennbar als bei den frisch infizierten Zellen. Sie wichen sowohl in ihrer Replikationsrate als auch morphologisch und ihrer Expression an CD276 von ihrer gesunden Vergleichspopulation ab. Der Einfluss durch die Infektion war bei den frisch infizierten Zellen schwächer ausgeprägt aber dennoch sowohl bei der Zelllinie HT1197 als auch bei den aus Harnleitern isolierten Zellen HL20/31 und HL20/32 im Vergleich mit der korrespondierenden gesunden Kohorte bereits messbar.

Aufgrund dieser klaren und vielversprechenden Ergebnisse sollten die beschriebenen Untersuchungen erneut und gegebenenfalls mehrfach durchgeführt werden, um die Ergebnisse weiter zu stützen und zusätzliche Erkenntnisse zu gewinnen. Vor allem sollte ein längerer Zeitrahmen für die Untersuchung gewählt werden, da der Einfluss der Mykoplasmen auf die Morphologie und die molekularen Eigenschaften von der Dauer der Infektionszeit abhängt. Die eingangs gestellte Frage über den Einfluss von Mykoplasmen auf die Expression von CD276 ist nicht vollends geklärt. Die Frage nach dem genauen Pathomechanismus, durch den die Mykoplasmen eine Hochregulation der CD276 Expression in manchen der urothelialen Tumorzellen bewirken und in anderen jedoch nicht, konnte durch diese Untersuchungen nicht geklärt werden. Das Ergebnis der Untersuchungen ist für



einen klinischen Einsatz möglicherweise von großer Bedeutung, da es aktuell noch Bestandteil der Forschung ist, einen Marker für das Urothelkarzinom der Blase zu etablieren, um ein besseres Screening und Monitoring des Therapieansprechens bei Blasenkrebs zu ermöglichen. CD276 ist ein vielversprechender Marker für Blasenkrebs und da Mykoplasmen gehäuft in der Bevölkerung vorkommen und asymptomatisch über eine lange Zeit im Urogenitaltrakt persistieren und dort wirken können, ist eine weitere Erforschung des Einflusses von Mykoplasmen notwendig. Für andere Krebsarten, wie beispielsweise das Magenkarzinom, hat sich das Screening auf und die Eradikation von Mikroorganismen bereits eine wichtige Rolle eingenommen, um eine Krebserkrankung zu vermeiden.

Weitere Studien sind erforderlich, um das Verhalten der frisch infizierten Zellen über einen längeren Zeitraum zu beobachten und um die Veränderungen im Verlauf zu beurteilen. Ein weiterer wichtiger Forschungsaspekt ist das Verständnis der Signalwege, welche die Mykoplasmen in den Zellen beeinflussen, um die Veränderung der Expression von CD276 und anderen Faktoren zu bewirken. Unabdingbar für eine abschließende Klärung der Frage nach dem Einfluss von Mykoplasmen auf die Expression von CD276 ist außerdem die Untersuchung einer größeren Fallzahl und eine Beteiligung weiterer Untersucher, um Zufallsbefunde und spontane Mutationen auszuschließen und eine Konsolidierung der Ergebnisse zu erreichen. Dies ist allerdings aufwendig und erfordert weitere personelle, finanzielle und logistische Unterstützung

## 5 Zusammenfassung

CD276 ist ein neuer vielversprechender Marker für die Diagnostik und Behandlung von Blasenkrebs. Ziel der Arbeit war die Klärung der Frage, ob und wenn ja auf welcher Ebene eine häufig asymptomatische Infektion mit Mykoplasmen einen Einfluss auf die zelluläre CD276 Expression bei Blasenkrebs hat.

Es wurde mit infizierten und nicht-infizierten Zellkulturen der kommerziellen Tumorzelllinien T24, Cal29 und HT1197 und mit aus OP-Präparaten isolierten Urothelzellen (HL 20/31 und HL 20/32) gearbeitet. Die Methoden umfassen die Ermittlung der Proliferationsrate und morphologische Unterschiede, Bestimmung der CD276 mRNA mittels qRT-PCR, die CD276 Proteinbestimmung mittels Western Blot und Messung der CD276 Oberflächen-expression in der Durchflusszytometrie.

Hinsichtlich der Morphologie und Proliferation ließ sich bei allen mit Mykoplasmen infizierten Proben ein vermehrter Zelltod und ein weniger kohärentes Wachstum als bei den nicht-infizierten Zellen beobachten. Bei T24 und Cal29 ließ sich zusätzlich eine erhöhte Proliferationsrate bei den infizierten Zellen beobachten. Im Rahmen der qRT-PCR zeigte sich bei den mit Mykoplasmen infizierten T24 und HL 20/32 Zellen eine größere Menge an CD276 mRNA. Bei den infizierten Cal29, HT1197 und HL 20/31 zeigte sich eine geringere Menge CD276 mRNA als bei der nicht-infizierten Referenz Gruppe. Bei SDS PAGE und dem quantitativen Western Blot zeigt sich bei den infizierten Cal29, T24 HL20/31 eine geringere Menge CD276 Protein als bei der nicht-infizierten Zellpopulation. Bei HT1197 war kein eindeutiger Unterschied erkennbar. Die Durchflusszytometrie zeigte bei den infizierten T24 und HT1197 Zellen eine höhere und bei den infizierten Cal29 eine niedrigere Expression an oberflächlichen CD276 als bei der gesunden Referenz.

Die Ergebnisse legen einen Einfluss von Mykoplasmen auf die CD276 Expression nahe. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die Ergebnisse zu konsolidieren und die genutzten Signalwege zur Regulierung der CD276 Expression zu erforschen und zu entscheiden, ob bei Blasenkrebs ein systematisches Screening auf und eine Eradikation von Mykoplasmen sinnvoll ist.



## 6 Literaturverzeichnis:

- ABELE-HORN, M. 2004. Mykoplasmen. In: ADAM, D., DOERR, H. W., LINK, H. & LODE, H. (eds.) *Die Infektiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- ABERN, M. R., OWUSU, R. A., ANDERSON, M. R., RAMPERSAUD, E. N. & INMAN, B. A. 2013. Perioperative intravesical chemotherapy in non-muscle-invasive bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 11, 477-484.
- AHMED, M., CHENG, M., ZHAO, Q., GOLDGUR, Y., CHEAL, S. M., GUO, H.-F., LARSON, S. M. & CHEUNG, N.-K. V. 2015. Humanized affinity-matured monoclonal antibody 8H9 has potent antitumor activity and binds to FG loop of tumor antigen B7-H3. *Journal of Biological Chemistry*, 290, 30018-30029.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. o.J. *Bladder Cancer Risk Factors* [Online]. Available: <https://www.cancer.org/cancer/bladder-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html#references> [Accessed 10.04.2022 2022].
- AMIEVA, M. & PEEK JR, R. M. 2016. Pathobiology of Helicobacter pylori-induced gastric cancer. *Gastroenterology*, 150, 64-78.
- ARIGAMI, T., NARITA, N., MIZUNO, R., NGUYEN, L., YE, X., CHUNG, A., GIULIANO, A. E. & HOON, D. S. B. 2010. B7-H3 Ligand Expression by Primary Breast Cancer and Associated With Regional Nodal Metastasis. *Annals of Surgery*, 252.
- ÄRZTEBLATT. 1996. *Oberflächliches Blasenkarzinom: Weniger Rezidive durch Mykobakterien* [Online]. Ärzteblatt. Available: <https://www.aerzteblatt.de/archiv/3996/Oberflaechliches-Blasenkarzinom-Weniger-Rezidive-durch-Mykobakterien> [Accessed 22.05.2022 2022].
- ATCC. o.J. T24 [Online]. Available: <https://www.atcc.org/products/htb-4> [Accessed 11.04.2022].
- ATCC. o.J. . HT1197 [Online]. Available: <https://www.atcc.org/products/crl-1473> [Accessed 11.04.2022 2022].
- AYATI, M., AMINI, E., SHAHROKHI DAMAVAND, R., NOWROOZI, M. R., SOLEIMANI, M., RANJBAR, E. & NOWROOZI, A. 2019. Second Transurethral Resection of Bladder Tumor: Is it Necessary in All T1 and/or High-Grade Tumors? *Urology Journal*, 16, 152-156.
- AZOULAY, L., YIN, H., FILION, K. B., ASSAYAG, J., MAJDAN, A., POLLAK, M. N. & SUISSA, S. 2012. The use of pioglitazone and the risk of bladder cancer in people with type 2 diabetes: nested case-control study. *BMJ : British Medical Journal*, 344, e3645.
- BARTFELD, S., BAYRAM, T., VAN DE WETERING, M., HUCH, M., BEGTHEL, H., KUJALA, P., VRIES, R., PETERS, P. J. & CLEVERS, H. 2015. In vitro expansion of human gastric epithelial stem cells and their responses to bacterial infection. *Gastroenterology*, 148, 126-136. e6.
- BARYKOVA, Y. A., LOGUNOV, D. Y., SHMAROV, M. M., VINAROV, A. Z., FIEV, D. N., VINAROVA, N. A., RAKOVSKAYA, I. V., BAKER, P. S., SHYSHYNOVA, I., STEPHENSON, A. J., KLEIN, E. A., NARODITSKY,

- B. S., GINTSBURG, A. L. & GUDKOV, A. V. 2011. Association of Mycoplasma hominis infection with prostate cancer. *Oncotarget*, 2, 289-97.
- BIONTEX LABORATORIES GMBH. o.J. *MycoSPY- PCR Mycoplasmen Test Kit* [Online]. Available: <https://www.biontex.com/mycospy.html> [Accessed 26.09.2022].
- BLICK, C. G. T., NAZIR, S. A., MALLETT, S., TURNEY, B. W., ONWU, N. N., ROBERTS, I. S. D., CREW, J. P. & COWAN, N. C. 2012. Evaluation of diagnostic strategies for bladder cancer using computed tomography (CT) urography, flexible cystoscopy and voided urine cytology: results for 778 patients from a hospital haematuria clinic. *BJU International*, 110, 84-94.
- BLISKA, J. B., GALÁN, J. E. & FALKOW, S. 1993. Signal transduction in the mammalian cell during bacterial attachment and entry. *Cell*, 73, 903-920.
- BÖHLE, A. & BOCK, P. R. 2004. Intravesical bacille calmette-guérin versus mitomycin c in superficial bladder cancer: formal meta-analysis of comparative studies on tumor progression. *Urology*, 63, 682-686.
- BOLENZ, C., WEST, A. M., ORTIZ, N., KABBANI, W. & LOTAN, Y. 2013. Urinary cytology for the detection of urothelial carcinoma of the bladder—a flawed adjunct to cystoscopy? *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 31, 366-371.
- BONKAT, G. C., BARTOLETTI, R., BRUYÈRE, F., CAI, T., GEERLINGS, S. E., KÖVES, B., SCHUBERT, S., PILATZ, A., VEERATTERAPILLAY, R. & WAGENLEHNER, F. 2022. *European Association Urology EAU Guidelines. Edn. presented at the EAU Annual Congress Amsterdam, the Netherlands 2022*, Arnhem, The Netherlands, EAU Guidelines Office.
- BORCHSENIUS, S. N., DAKS, A., FEDOROVA, O., CHERNOVA, O. & BARLEV, N. A. 2018. Effects of mycoplasma infection on the host organism response via p53/NF-κB signaling. *J Cell Physiol*, 234, 171-180.
- BOUJEMAA, S., BEN ALLAYA, A., MLIK, B., MARDASSI, H. & BEN ABDELMOUMEN MARDASSI, B. 2018. Phylogenetics of Mycoplasma hominis clinical strains associated with gynecological infections or infertility as disclosed by an expanded multilocus sequence typing scheme. *Scientific reports*, 8, 1-10.
- BRAHMER, J., RECKAMP, K. L., BAAS, P., CRINÒ, L., EBERHARDT, W. E. E., PODDUBSKAYA, E., ANTONIA, S., PLUZANSKI, A., VOKES, E. E., HOLGADO, E., WATERHOUSE, D., READY, N., GAINOR, J., ARÉN FRONTERA, O., HAVEL, L., STEINS, M., GARASSINO, M. C., AERTS, J. G., DOMINE, M., PAZ-ARES, L., RECK, M., BAUDELET, C., HARBISON, C. T., LESTINI, B. & SPIGEL, D. R. 2015. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England journal of medicine*, 373, 123-135.
- BRAHMER, J. R., TYKODI, S. S., CHOW, L. Q. M., HWU, W.-J., TOPALIAN, S. L., HWU, P., DRAKE, C. G., CAMACHO, L. H., KAUH, J., ODUNSI, K., PITOT, H. C., HAMID, O., BHATIA, S., MARTINS, R., EATON, K., CHEN, S., SALAY, T. M., ALAPARTHY, S., GROSSO, J. F., KORMAN, A. J., PARKER, S. M., AGRAWAL, S., GOLDBERG, S. M., PARDOLL,

- D. M., GUPTA, A. & WIGGINTON, J. M. 2012. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *The New England journal of medicine*, 366, 2455-2465.
- BROWN, M. L., RILEY, G. F., SCHUSSLER, N. & ETZIONI, R. 2002. Estimating Health Care Costs Related to Cancer Treatment from SEER-Medicare Data. *Medical Care*, 40, IV104-IV117.
- BUNDESGESUNDHEITSMINISTERIUM. o.J. *Rauchen* [Online]. Available: <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/service/begriffe-von-a-z/r/rauchen.html> [Accessed 10.04.2022 2022].
- BURGER, M., OOSTERLINCK, W., KONETY, B., CHANG, S., GUDJONSSON, S., PRUTHI, R., SOLOWAY, M., SOLSONA, E., SVED, P., BABJUK, M., BRAUSI, M. A., CHENG, C., COMPERAT, E., DINNEY, C., OTTO, W., SHAH, J., THÜROF, J. & WITJES, J. A. 2013. ICUD-EAU International Consultation on Bladder Cancer 2012: Non-Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder. *European Urology*, 63, 36-44.
- 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. *Nature Immunology*, 2, 269-274.
- 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., FOSSÅ, S. D., JOENSUU, H., BOICE, J. D., KLEINERMAN, R. A. & TRAVIS, L. B. 2007. Second Cancers Among 104760 Survivors of Cervical Cancer: Evaluation of Long-Term Risk. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 99, 1634-1643.
- CHEN, R. C., SHIPLEY, W. U., EFSTATHIOU, J. A. & ZIETMAN, A. L. 2013. Trimodality bladder preservation therapy for muscle-invasive bladder cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 11, 952-960.
- CLAUDE, J. C., FRENTZEL-BEYME, R. R. & KUNZE, E. 1988. Occupation and risk of cancer of the lower urinary tract among men. A case-control study. *Int J Cancer*, 41, 371-9.
- CLAUSEN, H. F., FEDDER, J., DRASBEK, M., NIELSEN, P. K., TOFT, B., INGERSLEV, H. J., BIRKELUND, S. & CHRISTIANSEN, G. 2001. Serological investigation of Mycoplasma genitalium in infertile women. *Human Reproduction*, 16, 1866-1874.
- COLLINS, M., LING, V. & CARRENO, B. M. 2005. The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome biology*, 6, 1-7.
- COX, C. E., CASS, A. S. & BOYCE, W. H. 1969. Bladder Cancer: A 26-Year Review. *Journal of Urology*, 101, 550-558.
- CRISPEN, P. L., SHEININ, Y., ROTH, T. J., LOHSE, C. M., KUNTZ, S. M., FRIGOLA, X., THOMPSON, R. H., BOORJIAN, S. A., DONG, H. & LEIBOVICH, B. C. 2008. Tumor cell and tumor vasculature expression of B7-H3 predict survival in clear cell renal cell carcinoma. *Clinical cancer research*, 14, 5150-5157.
- DONG, H., ZHU, G., TAMADA, K. & CHEN, L. 1999. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nature Medicine*, 5, 1365-1369.

- DONG, P., XIONG, Y., YUE, J., HANLEY, S. J. B. & WATARI, H. 2018. B7H3 As a Promoter of Metastasis and Promising Therapeutic Target. *Frontiers in Oncology*, 8.
- DSMZ. o.J. *Cal-29 ACC 515* [Online]. Available: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-515> [Accessed 11.04.2022 2022].
- DUMKE, R. & JACOBS, E. 2020. Mykoplasmen und Ureaplasmen. In: SUERBAUM, S., BURCHARD, G.-D., KAUFMANN, S. H. E. & SCHULZ, T. F. (eds.) *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- DUTTA, D. & CLEVERS, H. 2017. Organoid culture systems to study host-pathogen interactions. *Current Opinion in Immunology*, 48, 15-22.
- ERDMANN, F., SPIX, C., KATALINIC, A., CHRIST, M., FOLKERTS, J., HANSMANN, J., KRANZHÖFER, K., KUNZ, B., MANEGOLD, K., PENZKOFER, A., TREML, K., VOLLMER, G., WEG-REMERS, S., BARNES, B., BUTTMANN-SCHWEIGER, N., DAHM, S., FIEBIG, J., FRANKE, M., GURUNG-SCHÖNFELD, I., HABERLAND, J., IMHOFF, M., KRAYWINKEL, K., STARKER, A., VON BERENBERG-GOSSLER, P. & WIENECKE, A. 2021. Krebs in Deutschland für 2017/2018. Robert Koch-Institut.
- ERTURHAN, S. M., BAYRAK, O., PEHLIVAN, S., OZGUL, H., SECKINER, I., SEVER, T. & KARAKÖK, M. 2013. Can mycoplasma contribute to formation of prostate cancer? *Int Urol Nephrol*, 45, 33-8.
- ESFAHANI, K., ROUDAIA, L., BUHLAIGA, N., DEL RINCON, S. V., PAPNEJA, N. & MILLER, W. H. 2020. A Review of Cancer Immunotherapy: From the Past, to the Present, to the Future. *Current Oncology*, 27, 87-97.
- FELSHER, D. W. 2004. Reversibility of oncogene-induced cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*, 14, 37-42.
- FENG, S. H., TSAI, S., RODRIGUEZ, J. & LO, S. C. 1999. Mycoplasmal infections prevent apoptosis and induce malignant transformation of interleukin-3-dependent 32D hematopoietic cells. *Molecular and cellular biology*, 19, 7995-8002.
- FLEM-KARLSEN, K., FODSTAD, Ø. & NUNES-XAVIER, C. E. 2020. B7-H3 Immune Checkpoint Protein in Human Cancer. *Current Medicinal Chemistry*, 27, 4062-4086.
- FLEM-KARLSEN, K., TEKLE, C., ØYJORD, T., FLØRENES, V. A., MÆLANDSMO, G. M., FODSTAD, Ø. & NUNES-XAVIER, C. E. 2019. p38 MAPK activation through B7-H3-mediated DUSP10 repression promotes chemoresistance. *Scientific reports*, 9, 1-9.
- FLEM-KARLSEN, K., TEKLE, C., ANDERSSON, Y., FLATMARK, K., FODSTAD, Ø. & NUNES-XAVIER, C. E. 2017. Immunoregulatory protein B7-H3 promotes growth and decreases sensitivity to therapy in metastatic melanoma cells. *Pigment cell & melanoma research*, 30, 467-476.
- FREEDMAN, B. S., BROOKS, C. R., LAM, A. Q., FU, H., MORIZANE, R., AGRAWAL, V., SAAD, A. F., LI, M. K., HUGHES, M. R. & WERFF, R. V. 2015. Modelling kidney disease with CRISPR-mutant kidney organoids

- derived from human pluripotent epiblast spheroids. *Nature communications*, 6, 1-13.
- FROEHNER, M., BRAUSI, M. A., HERR, H. W., MUTO, G. & STUDER, U. E. 2009. Complications Following Radical Cystectomy for Bladder Cancer in the Elderly. *European Urology*, 56, 443-454.
- GIVEN, R. W., PARSONS, J. T., MCCARLEY, D. & WAJSMAN, Z. 1995. Bladder-sparing multimodality treatment of muscle-invasive bladder cancer: A five-year follow-up. *Urology*, 46, 499-505.
- GOFRIT, O. N., PODE, D., PIZOV, G., ZORN, K. C., KATZ, R., DUVDEVANI, M. & SHAPIRO, A. 2009. The natural history of bladder carcinoma in situ after initial response to bacillus Calmette-Gúerin immunotherapy. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 27, 258-262.
- GONG, J., CHEHRAZI-RAFFLE, A., REDDI, S. & SALGIA, R. 2018. Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: a comprehensive review of registration trials and future considerations. *Journal for immunotherapy of cancer*, 6, 8-8.
- GONG, M., MENG, L., JIANG, B., ZHANG, J., YANG, H., WU, J. & SHOU, C. 2008. p37 from Mycoplasma hyorhinis promotes cancer cell invasiveness and metastasis through activation of MMP-2 and followed by phosphorylation of EGFR. *Molecular cancer therapeutics*, 7, 530-537.
- GORE, J. L., LAI, J., SETODJI, C. M., LITWIN, M. S. & SAIGAL, C. S. 2009. Mortality increases when radical cystectomy is delayed more than 12 weeks. *Cancer*, 115, 988-996.
- GROSSMAN, H. B., NATALE, R. B., TANGEN, C. M., SPEIGHTS, V. O., VOGELZANG, N. J., TRUMP, D. L., WHITE, R. W. D., SAROSDY, M. F., WOOD, D. P., RAGHAVAN, D. & CRAWFORD, E. D. 2003. Neoadjuvant Chemotherapy plus Cystectomy Compared with Cystectomy Alone for Locally Advanced Bladder Cancer. *New England Journal of Medicine*, 349, 859-866.
- HAUTMANN, R. E., DE PETRICONI, R. C., PFEIFFER, C. & VOLKMER, B. G. 2012. Radical Cystectomy for Urothelial Carcinoma of the Bladder Without Neoadjuvant or Adjuvant Therapy: Long-Term Results in 1100 Patients. *European Urology*, 61, 1039-1047.
- HAUTMANN, R. E., GSCHWEND, J. E., DE PETRICONI, R. C., KRON, M. & VOLKMER, B. G. 2006. Cystectomy for Transitional Cell Carcinoma of the Bladder: Results of a Surgery Only Series in the Neobladder Era. *The Journal of Urology*, 176, 486-492.
- HERBST, R. S., SORIA, J.-C., KOWANETZ, M., FINE, G. D., HAMID, O., GORDON, M. S., SOSMAN, J. A., MCDERMOTT, D. F., POWDERLY, J. D., GETTINGER, S. N., KOHRT, H. E. K., HORN, L., LAWRENCE, D. P., ROST, S., LEABMAN, M., XIAO, Y., MOKATRIN, A., KOEPPEN, H., HEGDE, P. S., MELLMAN, I., CHEN, D. S. & HODI, F. S. 2014. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*, 515, 563-567.
- HUANG, G. J., KIM, P. H., SKINNER, D. G. & STEIN, J. P. 2009. Outcomes of patients with clinical CIS-only disease treated with radical cystectomy. *World Journal of Urology*, 27, 21-25.



- INAMURA, K., AMORI, G., YUASA, T., YAMAMOTO, S., YONESE, J. & ISHIKAWA, Y. 2019. Relationship of B7-H3 expression in tumor cells and tumor vasculature with FOXP3+ regulatory T cells in renal cell carcinoma. *Cancer Management and Research*, 11, 7021.
- INGEBRIGTSEN, V. A., BOYE, K., TEKLE, C., NESLAND, J. M., FLATMARK, K. & FODSTAD, Ø. 2012. B7-H3 expression in colorectal cancer: Nuclear localization strongly predicts poor outcome in colon cancer. *International Journal of Cancer*, 131, 2528-2536.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC) WORKING GROUP 2004. Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 83, 1-1438.
- JACKSON, S. E. & CHESTER, J. D. 2015. Personalised cancer medicine. *International Journal of Cancer*, 137, 262-266.
- JENSEN, J. S., BJÖRNELIUS, E. V. A., DOHN, B. & LIDBRINK, P. 2004. Comparison of First Void Urine and Urogenital Swab Specimens for Detection of Mycoplasma genitalium and Chlamydia trachomatis by Polymerase Chain Reaction in Patients Attending a Sexually Transmitted Disease Clinic. *Sexually Transmitted Diseases*, 31, 499-507.
- JENSEN, J. S., CUSINI, M., GOMBERG, M. & MOI, H. 2016. 2016 European guideline on Mycoplasma genitalium infections. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 30, 1650-1656.
- JI, Y., KARBASCHI, M. & COOKE, M. S. 2019. Mycoplasma infection of cultured cells induces oxidative stress and attenuates cellular base excision repair activity. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 845, 403054.
- JOCHAM, D., STEPP, H. & WAIDELICH, R. 2008. Photodynamic Diagnosis in Urology: State-of-the-Art. *European Urology*, 53, 1138-1150.
- KASTEN, B. B., AREND, R. C., KATRE, A. A., KIM, H., FAN, J., FERRONE, S., ZINN, K. R. & BUCHSBAUM, D. J. 2017. B7-H3-targeted 212Pb radioimmunotherapy of ovarian cancer in preclinical models. *Nuclear medicine and biology*, 47, 23-30.
- KJAER, S., KNUDSEN, J., SØRENSEN, B. & JENSEN, O. M. 1989. The Copenhagen case-control study of bladder cancer V. Review of the role of urinary-tract infection. *Acta Oncologica*, 28, 631-636.
- KLÄN, R., LOY, V. & HULAND, H. 1991. Residual Tumor Discovered in Routine Second Transurethral Resection in Patients with Stage T1 Transitional Cell Carcinoma of the Bladder. *The Journal of Urology*, 146, 316-318.
- KONISHI, J., YAMAZAKI, K., AZUMA, M., KINOSHITA, I., DOSAKA-AKITA, H. & NISHIMURA, M. 2004. B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clinical cancer research*, 10, 5094-5100.
- 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. *British journal of cancer*, 111, 149-156.

- KULKARNI, G. S., URBACH, D. R., AUSTIN, P. C., FLESHNER, N. E. & LAUPACIS, A. 2009. Longer Wait Times Increase Overall Mortality in Patients With Bladder Cancer. *Journal of Urology*, 182, 1318-1324.
- KUNATH, F., KRAUSE, S. F., WULLICH, B., GOEBELL, P. J., ENGEHAUSEN, D. G., BURGER, M., MEERPOHL, J. J. & KECK, B. 2013. Bladder cancer--the neglected tumor: a descriptive analysis of publications referenced in MEDLINE and data from the register ClinicalTrials.gov. *BMC urology*, 13, 56-56.
- KUNZE, E., CHANG-CLAUDE, J. & FRENTZEL-BEYRNE, R. 1992. Life style and occupational risk factors for bladder cancer in Germany. A case-control study. *Cancer*, 69, 1776-1790.
- LAZICA, D., BÖTTCHER, S., DEGENER, S., VON RUNDSTEDT, F.-C., BRANDT, A., ROTH, S., STÖRKEL, S. & MATHERS, M. 2013. T1 high grade-Blasentumor–Wertigkeit der Nachresektion mit prognostischen Parametern der Initialresektion: Analyse von 167 Fällen. *Aktuelle Urologie*, 44, 124-128.
- LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE, DEUTSCHE KREBSGESELLSCHAFT, DEUTSCHE KREBSHILFE & AWMF. 2020. *S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms* [Online]. Available: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/harnblasenkarzinom/> [Accessed 19.04.2022].
- LI, K., LIN, T., FAN, X., XU, K., BI, L., DUAN, Y., ZHOU, Y., YU, M., LI, J. & HUANG, J. 2013. Systematic review and meta-analysis of comparative studies reporting early outcomes after robot-assisted radical cystectomy versus open radical cystectomy. *Cancer Treatment Reviews*, 39, 551-560.
- 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. *Journal of Cancer*, 10, 5770.
- LIM, S., LIU, H., DA SILVA, L. M., ARORA, R., LIU, Z., PHILLIPS, J. B., SCHMITT, D. C., VU, T., MCCLELLAN, S. & LIN, Y. 2016. Immunoregulatory Protein B7-H3 Reprograms Glucose Metabolism in Cancer Cells by ROS-Mediated Stabilization of HIF1 $\alpha$ B7-H3 Regulates Glucose Metabolism in Cancer Cells. *Cancer research*, 76, 2231-2242.
- LIU, S., LIANG, J., LIU, Z., ZHANG, C., WANG, Y., WATSON, A. H., ZHOU, C., ZHANG, F., WU, K., ZHANG, F., LU, Y. & WANG, X. 2021. The Role of CD276 in Cancers. *Frontiers in Oncology*, 11.
- LIU, W. & SHOU, C. 2011. Mycoplasma hyorhinis and Mycoplasma fermentans induce cell apoptosis and changes in gene expression profiles of 32D cells. *Biological Research*, 44, 383-391.
- LIU, X., RONG, Z. & SHOU, C. 2019a. Mycoplasma hyorhinis infection promotes gastric cancer cell motility via  $\beta$ -catenin signaling. *Cancer Med*, 8, 5301-5312.
- LIU, Z., ZHANG, W., PHILLIPS, J. B., ARORA, R., MCCLELLAN, S., LI, J., KIM, J.-H., SOBOL, R. W. & TAN, M. 2019b. Immunoregulatory protein B7-H3 regulates cancer stem cell enrichment and drug resistance through MVP-mediated MEK activation. *Oncogene*, 38, 88-102.

- LOBBAN, E. D., SMITH, B. A., HALL, G. D., HARNDEN, P., ROBERTS, P., SELBY, P. J., TREJDOSIEWICZ, L. K. & SOUTHGATE, J. 1998. Uroplakin Gene Expression by Normal and Neoplastic Human Urothelium. *The American Journal of Pathology*, 153, 1957-1967.
- LOGUNOV, D. Y., SCHEBLYAKOV, D. V., ZUBKOVA, O. V., SHMAROV, M. M., RAKOVSKAYA, I. V., GUROVA, K. V., TARAROVA, N. D., BURDELYA, L. G., NARODITSKY, B. S., GINZBURG, A. L. & GUDKOV, A. V. 2008. Mycoplasma infection suppresses p53, activates NF-kappaB and cooperates with oncogenic Ras in rodent fibroblast transformation. *Oncogene*, 27, 4521-4531.
- LOO, D., ALDERSON, R. F., CHEN, F. Z., HUANG, L., ZHANG, W., GORLATOV, S., BURKE, S., CICCARONE, V., LI, H. & YANG, Y. 2012. Development of an Fc-Enhanced Anti-B7-H3 Monoclonal Antibody with Potent Antitumor Activity. *Clinical cancer research*, 18, 3834-3845.
- LOOS, M., GIESE, N. A., KLEEFF, J., GIESE, T., GAIDA, M. M., BERGMANN, F., LASCHINGER, M., W.BÜCHLER, M. & FRIESS, H. 2008. Clinical significance and regulation of the costimulatory molecule B7-H1 in pancreatic cancer. *Cancer Letters*, 268, 98-109.
- LOOS, M., HEDDERICH, D. M., OTTENHAUSEN, M., GIESE, N. A., LASCHINGER, M., ESPOSITO, I., KLEEFF, J. & FRIESS, H. 2009. Expression of the costimulatory molecule B7-H3 is associated with prolonged survival in human pancreatic cancer. *BMC cancer*, 9, 1-10.
- LOPEZ-BELTRAN, A. & CHENG, L. 2006. Histologic variants of urothelial carcinoma: differential diagnosis and clinical implications. *Human Pathology*, 37, 1371-1388.
- LOTAN, Y. & ROEHRBORN, C. G. 2003. Sensitivity and specificity of commonly available bladder tumor markers versus cytology: results of a comprehensive literature review and meta-analyses. *Urology*, 61, 109-118.
- LUENGO-FERNANDEZ, R., LEAL, J., GRAY, A. & SULLIVAN, R. 2013. Economic burden of cancer across the European Union: a population-based cost analysis. *The Lancet Oncology*, 14, 1165-1174.
- LÜLLMANN-RAUCH, R. & ASAN, E. 2015. *Taschenlehrbuch Histologie*, Stuttgart, Thieme.
- LUO, L., CHAPOVAL, A. I., FLIES, D. B., ZHU, G., HIRANO, F., WANG, S., LAU, J. S., DONG, H., TAMADA, K. & FLIES, A. S. 2004. B7-H3 enhances tumor immunity in vivo by costimulating rapid clonal expansion of antigen-specific CD8+ cytolytic T cells. *The Journal of Immunology*, 173, 5445-5450.
- LUO, L., ZHU, G., XU, H., YAO, S., ZHOU, G., ZHU, Y., TAMADA, K., HUANG, L., FLIES, A. D. & BROADWATER, M. 2015. B7-H3 promotes pathogenesis of autoimmune disease and inflammation by regulating the activity of different T cell subsets. *PloS one*, 10, e0130126.
- MAEDA, N., YOSHIMURA, K., YAMAMOTO, S., KURAMASU, A., INOUE, M., SUZUKI, N., WATANABE, Y., MAEDA, Y., KAMEI, R., TSUNEDOMI, R., SHINDO, Y., INUI, M., TAMADA, K., YOSHINO, S., HAZAMA, S. & OKA, M. 2014. Expression of B7-H3, a Potential Factor of Tumor Immune

- Evasion in Combination with the Number of Regulatory T Cells, Affects Against Recurrence-Free Survival in Breast Cancer Patients. *Annals of Surgical Oncology*, 21, 546-554.
- MANHART, L. E., CRITCHLOW, C. W., HOLMES, K. K., DUTRO, S. M., ESCHENBACH, D. A., STEVENS, C. E. & TOTTEN, P. A. 2003. Mucopurulent cervicitis and Mycoplasma genitalium. *The Journal of infectious diseases*, 187, 650-657.
- MANHART, L. E., JENSEN, J. S., BRADSHAW, C. S., GOLDEN, M. R. & MARTIN, D. H. 2015. Efficacy of Antimicrobial Therapy for Mycoplasma genitalium Infections. *Clin Infect Dis*, 61 Suppl 8, S802-17.
- MARIAPPAN, P., FINNEY, S. M., HEAD, E., SOMANI, B. K., ZACHOU, A., SMITH, G., MISHRIKI, S. F., N'DOW, J., GRIGOR, K. M. & GROUP, F. M. O. T. E. U. C. 2012. Good quality white-light transurethral resection of bladder tumours (GQ-WLTURBT) with experienced surgeons performing complete resections and obtaining detrusor muscle reduces early recurrence in new non-muscle-invasive bladder cancer: validation across time and place and recommendation for benchmarking. *BJU International*, 109, 1666-1673.
- MARSHALL, B. J. & WINDSOR, H. M. 2005. The relation of Helicobacter pylori to gastric adenocarcinoma and lymphoma: pathophysiology, epidemiology, screening, clinical presentation, treatment, and prevention. *Medical Clinics*, 89, 313-344.
- MASSARD, C., GORDON, M. S., SHARMA, S., RAFII, S., WAINBERG, Z. A., LUKE, J., CUIEL, T. J., COLON-OTERO, G., HAMID, O., SANBORN, R. E., O'DONNELL, P. H., DRAKAKI, A., TAN, W., KURLAND, J. F., REBELATTO, M. C., JIN, X., BLAKE-HASKINS, J. A., GUPTA, A. & SEGAL, N. H. 2016. Safety and Efficacy of Durvalumab (MEDI4736), an Anti-Programmed Cell Death Ligand-1 Immune Checkpoint Inhibitor, in Patients With Advanced Urothelial Bladder Cancer. *J Clin Oncol*, 34, 3119-25.
- MASSEY, B. D., NATION, E. F., GALLUP, C. A. & HENDRICKS, E. D. 1965. Carcinoma of the Bladder: 20-year Experience in Private Practice. *Journal of Urology*, 93, 212-216.
- MEAD, G. M., RUSSELL, M., CLARK, P., HARLAND, S. J., HARPER, P. G., COWAN, R., ROBERTS, J. T., USCINSKA, B. M., GRIFFITHS, G. O., PARMAR, M. K. B. & ON BEHALF OF THE, M. R. C. A. B. C. W. P. 1998. A randomized trial comparing methotrexate and vinblastine (MV) with cisplatin, methotrexate and vinblastine (CMV) in advanced transitional cell carcinoma: results and a report on prognostic factors in a Medical Research Council study. *British Journal of Cancer*, 78, 1067-1075.
- MEIJER, R. P., VAN ONNA, I. E. W., KOK, E. T. & BOSCH, R. 2011. The risk profiles of three clinical types of carcinoma in situ of the bladder. *BJU International*, 108, 839-843.
- MIN, G., ZHOU, G., SCHAPIRA, M., SUN, T.-T. & KONG, X.-P. 2003. Structural basis of urothelial permeability barrier function as revealed by Cryo-EM studies of the 16 nm uroplakin particle. *Journal of cell science*, 116, 4087-4094.

- MOCH, H., CUBILLA, A. L., HUMPHREY, P. A., REUTER, V. E. & ULBRIGHT, T. M. 2016. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *European Urology*, 70, 93-105.
- MORRIS, S. R. 2019. *Chlamydien-, Mykoplasmen- und Ureaplasmen-Schleimhautinfektionen* [Online]. Available: <https://www.msmanuals.com/de/profi/infektionskrankheiten/geschlechtskrankheiten-stds/chlamydien-mykoplasmen-und-ureaplasmen-schleimhautinfektionen> [Accessed 06.04.2022].
- NAGASHIMA, O., HARADA, N., USUI, Y., YAMAZAKI, T., YAGITA, H., OKUMURA, K., TAKAHASHI, K. & AKIBA, H. 2008. B7-H3 contributes to the development of pathogenic Th2 cells in a murine model of asthma. *The Journal of Immunology*, 181, 4062-4071.
- NAMIKI, K., GOODISON, S., PORVASNIK, S., ALLAN, R. W., ICZKOWSKI, K. A., URBANEK, C., REYES, L., SAKAMOTO, N. & ROSSER, C. J. 2009. Persistent exposure to Mycoplasma induces malignant transformation of human prostate cells. *PloS one*, 4, e6872-e6872.
- NEUMANN, G., FEUCHT, H. H., BECKER, W. & SPÄTH, M. 2010. Mykoplasmen. In: NEUMANN, G., FEUCHT, H. H., BECKER, W. & SPÄTH, M. (eds.) *Gynäkologische Infektionen*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- NI, L. & DONG, C. 2017. New B7 family checkpoints in human cancers. *Molecular cancer therapeutics*, 16, 1203-1211.
- NIEUWENHUIJZEN, J. A., DE VRIES, R. R., BEX, A., VAN DER POEL, H. G., MEINHARDT, W., ANTONINI, N. & HORENBLAS, S. 2008. Urinary Diversions after Cystectomy: The Association of Clinical Factors, Complications and Functional Results of Four Different Diversions. *European Urology*, 53, 834-844.
- PARKIN, D. M. 2006. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *International journal of cancer*, 118, 3030-3044.
- PATEL, M. R., ELLERTON, J., INFANTE, J. R., AGRAWAL, M., GORDON, M., ALJUMAILY, R., BRITTEN, C. D., DIRIX, L., LEE, K.-W., TAYLOR, M., SCHÖFFSKI, P., WANG, D., RAVAUD, A., GELB, A. B., XIONG, J., ROSEN, G., GULLEY, J. L. & APOLO, A. B. 2018. Avelumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum failure (JAVELIN Solid Tumor): pooled results from two expansion cohorts of an open-label, phase 1 trial. *The Lancet Oncology*, 19, 51-64.
- PATON, G. R., JACOBS, J. P. & PERKINS, F. T. 1965. Chromosome Changes in Human Diploid-Cell Cultures Infected with Mycoplasma. *Nature*, 207, 43-45.
- 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.
- PELAJ, P. 2016. *Karzinome* [Online]. Available: <https://www.journalonko.de/thema/lesen/karzinome> [Accessed 31.03.2022].
- PESCH, B., HAERTING, J., RANFT, U., KLIMPEL, A., OELSCHLÄGEL, B. & SCHILL, W. 2000. Occupational risk factors for renal cell carcinoma:

- agent-specific results from a case-control study in Germany. MURC Study Group. Multicenter urothelial and renal cancer study. *Int J Epidemiol*, 29, 1014-24.
- PETTERSSON, J., NORDFELTH, R., DUBININA, E., BERGMAN, T., GUSTAFSSON, M., MAGNUSSON, K. E. & WOLF-WATZ, H. 1996. Modulation of Virulence Factor Expression by Pathogen Target Cell Contact. *Science*, 273, 1231-1233.
- PLOUSSARD, G., DANESHMAND, S., EFSTATHIOU, J. A., HERR, H. W., JAMES, N. D., RÖDEL, C. M., SHARIAT, S. F., SHIPLEY, W. U., STERNBERG, C. N., THALMANN, G. N. & KASSOUF, W. 2014. Critical Analysis of Bladder Sparing with Trimodal Therapy in Muscle-invasive Bladder Cancer: A Systematic Review. *European Urology*, 66, 120-137.
- POWDERLY, J., COTE, G., FLAHERTY, K., SZMULEWITZ, R. Z., RIBAS, A., WEBER, J., LOO, D., BAUGHMAN, J., CHEN, F. & MOORE, P. 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, 1-2.
- POWLES, T., EDER, J. P., FINE, G. D., BRAITEH, F. S., LORIOT, Y., CRUZ, C., BELLMUNT, J., BURRIS, H. A., PETRYLAK, D. P., TENG, S.-L., SHEN, X., BOYD, Z., HEGDE, P. S., CHEN, D. S. & VOGELZANG, N. J. 2014. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature*, 515, 558-562.
- PRASAD, D. V. R., NGUYEN, T., LI, Z., YANG, Y., DUONG, J., WANG, Y. & DONG, C. 2004. Murine B7-H3 Is a Negative Regulator of T Cells. *The Journal of Immunology*, 173, 2500.
- RAMANI, V. A. C., BROMAGE, S. J. & CLARKE, N. W. 2009. A contemporary standard for morbidity and outcome after radical cystectomy. *BJU International*, 104, 628-632.
- RICHTERSTETTER, M., WULLICH, B., AMANN, K., HAEBERLE, L., ENGEHAUSEN, D. G., GOEBELL, P. J. & KRAUSE, F. S. 2012. The value of extended transurethral resection of bladder tumour (TURBT) in the treatment of bladder cancer. *BJU International*, 110, E76-E79.
- ROBERT KOCH-INSTITUT 2017. Krebs in Deutschland für 2013/2014. Robert Koch-Institut.
- SCHIPS, L., AUGUSTIN, H., ZIGEUNER, R. E., GALLÉ, G., HABERMANN, H., TRUMMER, H., PUMMER, K. & HUBMER, G. 2002. Is repeated transurethral resection justified in patients with newly diagnosed superficial bladder cancer? *Urology*, 59, 220-223.
- SCHLAERMANN, P., TOELLE, B., BERGER, H., SCHMIDT, S. C., GLANEMANN, M., ORDEMANN, J., BARTFELD, S., MOLLENKOPF, H. J. & MEYER, T. F. 2016. A novel human gastric primary cell culture system for modelling *Helicobacter pylori* infection in vitro. *Gut*, 65, 202-213.
- SCIENCECELL RESEARCH LABORATORIES. o.J. *Human Urothelial Cells from Human Bladder* [Online]. Available:

- <https://www.sciencellonline.com/human-urothelial-cells.html> [Accessed 27.09.2022].
- 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.
- SHARIAT, S. F., KARAKIEWICZ, P. I., PALAPATTU, G. S., LOTAN, Y., ROGERS, C. G., AMIEL, G. E., VAZINA, A., GUPTA, A., BASTIAN, P. J., SAGALOWSKY, A. I., SCHOENBERG, M. P. & LERNER, S. P. 2006. Outcomes of Radical Cystectomy for Transitional Cell Carcinoma of the Bladder: A Contemporary Series From the Bladder Cancer Research Consortium. *Journal of Urology*, 176, 2414-2422.
- SHARMA, P., CALLAHAN, M. K., BONO, P., KIM, J., SPILIOPOULOU, P., CALVO, E., PILLAI, R. N., OTT, P. A., DE BRAUD, F. & MORSE, M. 2016. Nivolumab monotherapy in recurrent metastatic urothelial carcinoma (CheckMate 032): a multicentre, open-label, two-stage, multi-arm, phase 1/2 trial. *The lancet oncology*, 17, 1590-1598.
- SIEGEL, R. L., MILLER, K. D. & JEMAL, A. 2019. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*, 69, 7-34.
- SIVALINGAM, S., PROBERT, J. L. & SCHWAIBOLD, H. 2005. The role of repeat transurethral resection in the management of high-risk superficial transitional cell bladder cancer. *BJU international*, 96, 759.
- SKINNER, E. C., STEIN, J. P. & SKINNER, D. G. 2007. Surgical benchmarks for the treatment of invasive bladder cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 25, 66-71.
- STAATS, C. C., BOLDO, J., BROETTO, L., VAINSTEIN, M. & SCHRANK, A. 2007. Comparative genome analysis of proteases, oligopeptide uptake and secretion systems in *Mycoplasma* spp. *Genetics and Molecular Biology*, 30, 225-229.
- STATISTISCHTES BUNDESAMT. o.J. *Ältere Menschen Demographischer Wandel* [Online]. Available: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Querschnitt/Demografischer-Wandel/Aeltere-Menschen/bevoelkerung-ab-65-j.html?nn=238640> [Accessed].
- STEELE, R., LEES, R. E., KRAUS, A. S. & CHANDAR, R. 1971. Sexual factors in the epidemiology of cancer of the prostate. *Journal of Chronic Diseases*, 24, 29-37.
- STEIN, J. P., LIESKOVSKY, G., COTE, R., GROSHEN, S., FENG, A.-C., BOYD, S., SKINNER, E., BOCHNER, B., THANGATHURAI, D., MIKHAIL, M., RAGHAVAN, D. & SKINNER, D. G. 2001. Radical Cystectomy in the Treatment of Invasive Bladder Cancer: Long-Term Results in 1,054 Patients. *Journal of Clinical Oncology*, 19, 666-675.
- STUDER, U. E., BACCHI, M., BIEDERMANN, C., JAEGER, P., KRAFT, R., MAZZUCHELLI, L., MARKWALDER, R., SENN, E. & SONNTAG, R. W.

1994. Adjuvant Cisplatin Chemotherapy Following Cystectomy for Bladder Cancer: Results of a Prospective Randomized Trial. *The Journal of Urology*, 152, 81-84.
- 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. *Nature Immunology*, 4, 899-906.
- SUN, M., RICHARDS, S., PRASAD, D. V. R., MAI, X. M., RUDENSKY, A. & DONG, C. 2002. Characterization of Mouse and Human B7-H3 Genes. *The Journal of Immunology*, 168, 6294.
- SYLVESTER, R. J., OOSTERLINCK, W. & VAN DER MEIJDEN, A. P. M. 2004. A SINGLE IMMEDIATE POSTOPERATIVE INSTILLATION OF CHEMOTHERAPY DECREASES THE RISK OF RECURRENCE IN PATIENTS WITH STAGE Ta T1 BLADDER CANCER: A META-ANALYSIS OF PUBLISHED RESULTS OF RANDOMIZED CLINICAL TRIALS. *Journal of Urology*, 171, 2186-2190.
- SYLVESTER, R. J., OOSTERLINCK, W. & WITJES, J. A. 2008. The Schedule and Duration of Intravesical Chemotherapy in Patients with Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer: A Systematic Review of the Published Results of Randomized Clinical Trials. *European Urology*, 53, 709-719.
- SYLVESTER, R. J., VAN DER MEIJDEN, A. P. M., OOSTERLINCK, W., WITJES, J. A., BOUFFIOUX, C., DENIS, L., NEWLING, D. W. W. & KURTH, K. 2006. Predicting Recurrence and Progression in Individual Patients with Stage Ta T1 Bladder Cancer Using EORTC Risk Tables: A Combined Analysis of 2596 Patients from Seven EORTC Trials. *European Urology*, 49, 466-477.
- TAKASATO, M., ER, P. X., CHIU, H. S., MAIER, B., BAILLIE, G. J., FERGUSON, C., PARTON, R. G., WOLVETANG, E. J., ROOST, M. S. & CHUVA DE SOUSA LOPES, S. M. 2015. Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature*, 526, 564-568.
- TAKENAKA, A., YAMADA, Y., MIYAKE, H., HARA, I. & FUJISAWA, M. 2008. Clinical outcomes of bacillus Calmette-Guérin instillation therapy for carcinoma in situ of urinary bladder. *International Journal of Urology*, 15, 309-313.
- TOPALIAN, S. L., HODI, F. S., BRAHMER, J. R., GETTINGER, S. N., SMITH, D. C., MCDERMOTT, D. F., POWDERLY, J. D., CARVAJAL, R. D., SOSMAN, J. A., ATKINS, M. B., LEMING, P. D., SPIGEL, D. R., ANTONIA, S. J., HORN, L., DRAKE, C. G., PARDOLL, D. M., CHEN, L., SHARFMAN, W. H., ANDERS, R. A., TAUBE, J. M., MCMILLER, T. L., XU, H., KORMAN, A. J., JURE-KUNKEL, M., AGRAWAL, S., MCDONALD, D., KOLLIA, G. D., GUPTA, A., WIGGINTON, J. M. & SZNOL, M. 2012. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *The New England journal of medicine*, 366, 2443-2454.



- TOUATI, E. 2010. When bacteria become mutagenic and carcinogenic: lessons from *H. pylori*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 703, 66-70.
- 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. *The Journal of Immunology*, 180, 2989-2998.
- TREVORS, J. T. 1996. Genome size in bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69, 293-303.
- TSAI, S., WEAR, D. J., SHIH, J. W. & LO, S. C. 1995. Mycoplasmas and oncogenesis: persistent infection and multistage malignant transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 10197-201.
- TURCO, P., HOUSSAMI, N., BULGARESI, P., TRONI, G. M., GALANTI, L., CARIAGGI, M. P., CIFARELLI, P., CROCETTI, E. & CIATTO, S. 2011. Is Conventional Urinary Cytology Still Reliable for Diagnosis of Primary Bladder Carcinoma? Accuracy Based on Data Linkage of a Consecutive Clinical Series and Cancer Registry. *Acta Cytologica*, 55, 193-196.
- TURNER, A. G., HENDRY, W. F., WILLIAMS, G. B. & WALLACE, D. M. 1977. A haematuria diagnostic service. *British Medical Journal*, 2, 29-31.
- UNION FOR INTERNATIONAL CANCER CONTROL. *TNM Classification of Malignant Tumours* [Online]. Available: <https://www.uicc.org/resources/tnm> [Accessed 14.02.2022 2022].
- VAN RHIJN, B. W. G., VAN DER POEL, H. G. & VAN DER KWAST, T. H. 2005. Urine Markers for Bladder Cancer Surveillance: A Systematic Review. *European Urology*, 47, 736-748.
- 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. 2015. B7-H3 expression in donor T cells and host cells negatively regulates acute graft-versus-host disease lethality. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 125, 3335-3346.
- VLAANDEREN, J., TAEGER, D., WELLMAN, J., KEIL, U., SCHÜZ, J. & STRAIF, K. 2013. Extended cancer mortality follow-up of a German rubber industry cohort. *J Occup Environ Med*, 55, 966-72.
- VOGELMANN, R. & AMIEVA, M. R. 2007. The role of bacterial pathogens in cancer. *Current opinion in microbiology*, 10, 76-81.
- VOM DORP, F., PAL, P., TSCHIRDEWAHN, S., ROSSI, R., BÖRGERMANN, C., SCHENCK, M., BECKER, M., SZARVAS, T., HAKENBERG, O. W. & RÜBBEN, H. 2011. Correlation of Pathological and Cytological-Cytometric Grading of Transitional Cell Carcinoma of the Urinary Tract. *Urologia Internationalis*, 86, 36-40.
- WAITES, K. B. & TALKINGTON, D. F. 2004. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. *Clinical microbiology reviews*, 17, 697-728.
- WAKUI, M. & SHIIGAI, T. 2000. Urinary tract cancer screening through analysis of urinary red blood cell volume distribution. *Int J Urol*, 7, 248-53.
- WALLACE, D. M. A., RAGHAVAN, D., KELLY, K. A., SANDEMAN, T. F., CONN, I. G., TERIANA, N., DUNN, J., BOULAS, J. & LATIEF, T. 1991.

- Neo-adjuvant (Pre-emptive) Cisplatin Therapy in Invasive Transitional Cell Carcinoma of the Bladder. *British Journal of Urology*, 67, 608-615.
- WANG, L., FRASER, C. C., KIKLY, K., WELLS, A. D., HAN, R., COYLE, A. J., CHEN, L. & HANCOCK, W. W. 2005. B7-H3 promotes acute and chronic allograft rejection. *European Journal of Immunology*, 35, 428-438.
- WEI, S. C., DUFFY, C. R. & ALLISON, J. P. 2018. Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer discovery*, 8, 1069-1086.
- 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. *Oncology Letters*, 9, 1420-1424.
- XU, Y., LI, H., CHEN, W., YAO, X., XING, Y., WANG, X., ZHONG, J. & MENG, G. 2013. Mycoplasma hyorhinis activates the NLRP3 inflammasome and promotes migration and invasion of gastric cancer cells. *PloS one*, 8, e77955.
- 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. *Oncology Letters*, 15, 6519-6526.
- XU, Z. L., ZHANG, Y., WANG, L., LI, F., MAN, H. W., LI, P.-F. & SHAN, B. E. 2018b. B7-H3 promotes malignant progression of muscle-invasive bladder cancer. *Oncology Reports*, 40.
- XYLINAS, E., ROBINSON, B., KLUTH, L., VOLKMER, B., HAUTMANN, R., KÜFER, R., ZERBIB, M., KWON, E., THOMPSON, R. & BOORJIAN, S. 2014a. Association of T-cell co-regulatory protein expression with clinical outcomes following radical cystectomy for urothelial carcinoma of the bladder. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 40, 121-127.
- XYLINAS, E., ROBINSON, B. D., KLUTH, L. A., VOLKMER, B. G., HAUTMANN, R., KÜFER, 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. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 40, 121-127.
- YANG, H., QU, L., MA, H., CHEN, L., LIU, W., LIU, C., MENG, L., WU, J. & SHOU, C. 2010. Mycoplasma hyorhinis infection in gastric carcinoma and its effects on the malignant phenotypes of gastric cancer cells. *BMC Gastroenterol*, 10, 132.
- YANG, S., WEI, W. & ZHAO, Q. 2020. B7-H3, a checkpoint molecule, as a target for cancer immunotherapy. *International journal of biological sciences*, 16, 1767-1773.
- ZANG, X. & ALLISON, J. P. 2007. The B7 Family and Cancer Therapy: Costimulation and Coinhibition. *Clinical Cancer Research*, 13, 5271.
- ZANG, X., THOMPSON, R. H., AL-AHMADIE HIKMAT, A., SERIO ANGEL, M., REUTER VICTOR, E., EASTHAM JAMES, A., SCARDINO PETER, T., SHARMA, P. & ALLISON JAMES, P. 2007. B7-H3 and B7x are highly expressed in human prostate cancer and associated with disease spread and poor outcome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 19458-19463.

- ZELLA, D., CURRELI, S., BENEDETTI, F., KRISHNAN, S., COCCHI, F., LATINOVIC, O. S., DENARO, F., ROMERIO, F., DJAVANI, M. & CHARURAT, M. E. 2018. Mycoplasma promotes malignant transformation in vivo, and its DnaK, a bacterial chaperone protein, has broad oncogenic properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115, E12005-E12014.
- ZENTRUM FÜR KREBSREGISTERDATEN. 2018. *Krebsdaten* [Online]. Available: [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Harnblasenkrebs/harnblasenkrebs\\_node.html](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Harnblasenkrebs/harnblasenkrebs_node.html) [Accessed 08.04.2022].
- ZHANG, B., SHIH, J. W.-K., WEAR, D. J., TSAI, S. & LO, S.-C. 1997. High-Level Expression of H-ras and c-myc Oncogenes in Mycoplasma-Mediated Malignant Cell Transformation. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 214, 359-366.
- 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. *The Journal of Immunology*, 185, 3677-3684.
- ZHANG, S., TSAI, S. & LO, S.-C. 2006. Alteration of gene expression profiles during mycoplasma-induced malignant cell transformation. *BMC Cancer*, 6, 116.
- ZHANG, S., TSAI, S., WU, T. T., LI, B., SHIH, J. W. K. & LO, S.-C. 2004. Mycoplasma fermentans infection promotes immortalization of human peripheral blood mononuclear cells in culture. *Blood*, 104, 4252-4259.
- ZHANG, S., WEAR, D. J. & LO, S.-C. 2000. Mycoplasmal infections alter gene expression in cultured human prostatic and cervical epithelial cells. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 27, 43-50.

#### **Bücher:**

Lüllmann-Rauch. (2015). *Taschenlehrbuch Histologie*. Stuttgart: Thieme.

## **7 Erklärung zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde im Forschungslabor der Klinik für Urologie im Zentrum Medizinische Forschung unter Betreuung von Prof. Dr. rer. nat. Wilhelm K. Aicher durchgeführt.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch techn. Assistentinnen im Labor Tanja Abruzzese und Cornelia Bock von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

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

Tübingen, den 27.11.2022

## **8 Danksagung**

Mein besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. Wilhelm K. Aicher für die Annahme als Doktorandin und die durchgehend exzellente Betreuung.

Auch möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen im Labor des Zentrums für medizinische Forschung im Bereich der Urologie für die praktische Unterstützung bei der fachlichen Einarbeitung im Labor bedanken.

Ebenso bedanke ich mich bei den ärztlichen Kollegen der urologischen Abteilung der Uniklinik Tübingen für die Bereitstellung von urothelialen Gewebeproben.

An dieser Stelle möchte ich auch der Stiftung Begabtenförderung berufliche Bildung (SBB) für die Aufnahme als Stipendiatin und die damit verbundene Förderung während des Studiums danken.

Abschließend bedanke ich mich herzlich bei meinen Freunden, meinem Partner und vor allem bei meiner Familie, die mich immer unterstützt haben.