

Aus der Klinik für Urologie und Urochirurgie
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. med. Maurice Stephan Michel)

Humane endogene Retroviren im Urothelkarzinom –
Expressionsanalysen in malignen und benignen Blasenzelllinien

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Florian Alexander Höfflin

aus
Freiburg im Breisgau
2023

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Prof. Dr. med. Philipp Erben

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG	3
1.1 Das Urothelkarzinom der Harnblase.....	3
1.2 Humane endogene Retroviren.....	9
1.3 Fragestellung.....	15
2 MATERIAL UND METHODEN.....	16
2.1 Material.....	16
2.2 Zellkultur gemäß den laborinternen Protokollen	23
2.3 Expressionsanalysen gemäß den laborinternen Protokollen	25
2.4 Statistik.....	29
3 ERGEBNISSE	30
3.1 Primeretablierung	30
3.2 Expressionsanalysen.....	33
3.3 Proliferationsassay	61
4 DISKUSSION	64
4.1 Oxygenierungsabhängige Veränderung urologischer Tumorzellen	64
4.2 Die Expressionsmuster der ERV korrelierten mit dem Subtyp	65
4.3 ERV-Kpol (Np9) war aktiver als ERV-Kenv (Rec).....	66
4.4 IFNGR und PD-L1 waren in malignen urologischen Zelllinien verändert.....	67
4.5 RIPK3 hemmte die Proliferation in SCaBER-Zellen	68
4.6 Ausblick: ERV im Kontext klinischer Anwendungen	69

5 ZUSAMMENFASSUNG.....	71
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	73
7 LEBENSLAUF	81
8 DANKSAGUNG.....	82

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BCG	Bacillus Calmette-Guérin
bp	Basenpaare
CALM	Calmodulin
CIS	carcinoma in situ
c-myc	cellular myelocytomatosis oncogene
CT	Computertomographie
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EAU	European Association of Urology
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor
env	envelope
ERK	extracellular-signal regulated kinase
ERV	endogenes Retrovirus
et al.	et alii
FBS	Fötales Kälberserum
FGFR3	fibroblast growth factor receptor
FOXA1	forkhead box protein A1
gag	group-specific antigen
GATA3	GATA binding protein 3
GLUT1	Glukosetransporter 1
GRE	glucocorticoid-response element
GUS	β -Glukosidase
Her2	human epidermal growth factor receptor 2
HERV	humanes endogenes Retrovirus
HG	high-grade
HIF1	hypoxia-inducible factor 1
HML	human endogenous MMTV-like
IFNGR1	Interferon-Gamma Rezeptor 1
IgG	Immunglobulin-G
IL-10	Interleukin-10
IRF	interferon regulatory factor
ISRE	interferon-stimulated response element
Ki67	Antigen KI-67
KRT	Keratin

LG	low-grade
LTR	Long terminal repeat
MERV	murines endogenes Retrovirus
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MIBC	Muskelinvasiver Blasenkrebs
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
NF-κB	nuclear faktor Kappa B
NMIBC	Nicht muskelinvasiver Blasenkrebs
Notch1	notch receptor 1
ORF	open reading frame
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	programmed cell death protein 1
PD-L1	programmed cell death ligand 1
PERV	porcines endogenes Retrovirus
pol	Polymerase
pro	Protease
PUNLMP	papillary urothelial neoplasia with low malignant potencial
ras	rat sarcoma
RB1	Retinoblastomprotein 1
RIPK3	receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Insitute
shRNA	small hairpin RNA
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TCGA	The cancer genome atlas
Tm	Schmelztemperatur
TNM	Tumor, Nodus, Metastasen
TP53	Tumorprotein p53
TUR-B	Transurethrale Resektion der Harnblase
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	Weltgesundheitsorganisation
β-hCG	β-humanes Choriongonadotropin

1 EINLEITUNG

1.1 Das Urothelkarzinom der Harnblase

1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Der Blasenkrebs (bladder cancer, BCa) ist der 4. häufigste Tumor beim Mann¹ und der 5. häufigste Tumor insgesamt. Tabakrauch und Exposition gegenüber anderen Karzinogenen wie zum Beispiel Nitrosaminen stellen die größten Risikofaktoren dar. Zusätzlich sind sozioökonomische Faktoren sowie das Geschlecht und der ethnische Hintergrund zu nennen.² Dadurch gibt es weltweit große Unterschiede in der Inzidenz.³ So zeigen Männer eine ca. vierfach höhere Inzidenz als Frauen (9,6/100.000 vs. 2,4/100.000).⁴ Ebenfalls zeigt sich, dass die Erkrankungsraten in westlichen Ländern um ein vielfaches höher sind als in ärmeren Regionen, wie Südostasien oder Afrika.³⁻⁵ Zum einen sind Risikofaktoren und Karzinogene, wie Übergewicht, Tabakrauch und aromatische Amine in entwickelten Regionen, wie Europa, mehr vertreten. Zum anderen sind die diagnostischen Mittel fortgeschrittener und es werden mehr Karzinome in frühen Stadien entdeckt.³ Zusätzlich gibt es in den Industrieländern eine höhere durchschnittliche Lebenserwartung und das Risiko am BCa zu erkranken steigt mit dem Lebensalter. Durch die steigende Lebenserwartung wird prognostiziert, dass die Inzidenz des Blasenkrebses in Zukunft weiter zunimmt.³

1.1.2 Einteilung

Das BCa kann in verschiedene Histologien eingeteilt werden. Mit ca. 90 % weist das Urothelkarzinom den größten Anteil auf.³ Daneben sind noch das Plattenepithelkarzinom (3-5 %), das Adenokarzinom (2 %) und das kleinzellige Karzinom (ca. 1 %) zu nennen.⁶

Das Urothelkarzinom wird in Karzinome des oberen und des unteren Harntraktes unterteilt. Die Karzinome des oberen Harntraktes befinden sich im Nierenbecken und im Ureter, die des unteren Harntraktes treten in der Harnblase und der Urethra auf.

Am Häufigsten sind sie in der Harnblase zu finden.⁷ Im weiteren Verlauf bezieht sich diese Studie nur auf das Urothelkarzinom der Harnblase.

Das Staging des BCa erfolgt entsprechend der TNM-Klassifikation anhand der Infiltrationstiefe. Klinisch ist die Unterteilung in nichtmuskelinvasive (non muscle invasive bladder cancer, NMIBC) und muskelinvasive Blasentumore (muscle invasive

bladder cancer, MIBC) aufgrund der damit verbundenen Prognose besonders relevant. Zu den NMIBC zählen die Stadien CIS (*carcinoma in situ*), Ta (nichtinvasive papilläre Neoplasie) und T1 (Infiltration der Basalmembran). Ab Stadium T2 infiltriert der Tumor die Muskelschicht und gilt als MIBC.^{8, 9} Ab einem T3 Stadium erreicht der Tumor zusätzlich das perivesikale Fettgewebe und sobald er Nachbarorgane infiltriert, liegt ein T4-Stadium vor. Die NMIBC weisen bei Erstdiagnose einen Anteil von ca. 70 % auf.⁹

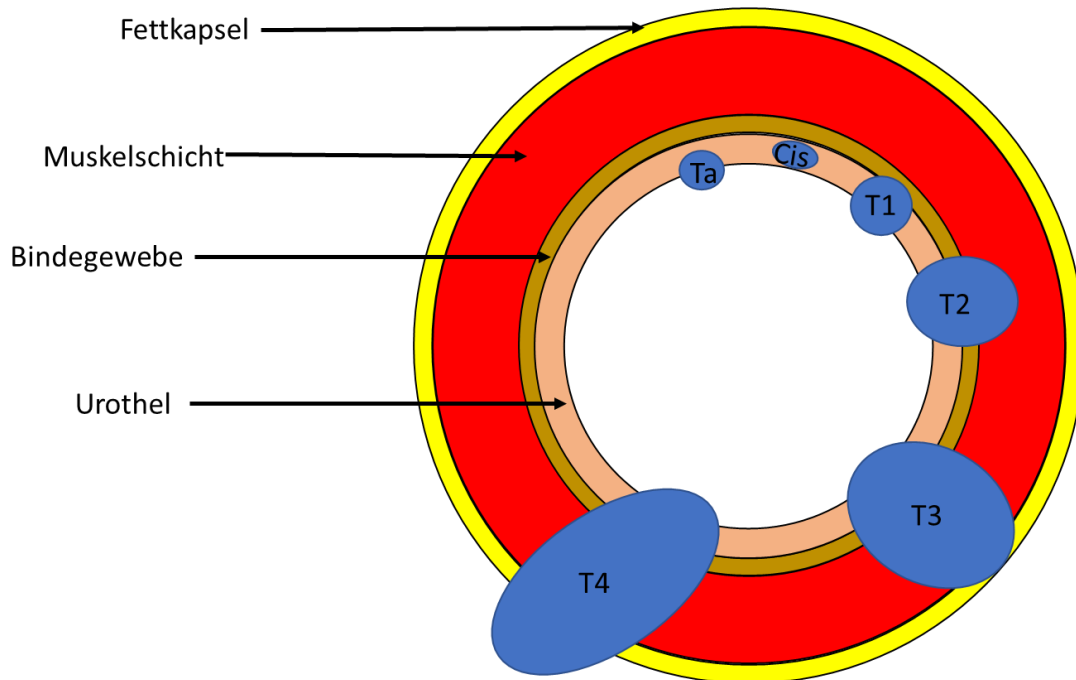


Abbildung 1: T-Stadien des Urothelkarzinoms der Harnblase

Ta = nichtinvasive papillärer Tumor; Cis = flächige Neoplasie; T1 = Infiltration der Basalmembran; T2 = Infiltration der Muscularis; T3 = Infiltration der Fettkapsel; T4 = Infiltration von Nachbarorganen

Beim Grading kommen unterschiedliche Klassifikationen zum Einsatz. Nach der WHO-Klassifikation von 1973 wird das BCa in G1 bis G3 unterteilt, wobei G1 einen hohen und G3 einen niedrigen Grad der Differenzierung anzeigt.¹⁰ Seit 1998 wird zwischen dem PUNLMP (papillary urothelial neoplasia of low malignant potential), low-grade (LG) und high-grade (HG) Tumoren unterschieden.^{10, 11} Dabei können frühere G2 Tumore entweder den LG oder HG Karzinomen zugeteilt werden. Das PUNLMP bezeichnet eine nicht invasive Neoplasie, die histologisch mit wenig Atypien einhergeht und ein sehr geringes Progressionsrisiko aufzeigt. Ein high-grade Tumor weist ein aggressives Wachstum mit vielen Zellatypien und Mitosen auf. Beim NMIBC wird zwischen LG oder HG unterschieden, während das MIBC seit der WHO-Klassifikation von 2016 als HG Tumor definiert ist.^{10, 12, 13}

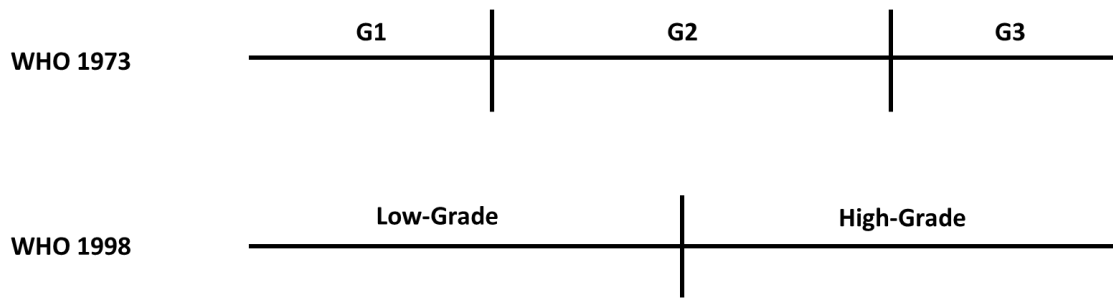


Abbildung 2: Grading des Urothelkarzinoms

Die WHO-Klassifikation von 1973 unterscheidet beim Grading zwischen G1, G2 und G3. Mit der neuen Klassifikation von 1998 wird nur zwischen low-grade und high-grade unterschieden. Frühere G2-Tumore werden je nach Befund in low- oder high-grade eingeteilt.

1.1.3 Prognose

Zur besseren Therapieplanung empfiehlt die *European Association of Urology* (EAU) die Einteilung in verschiedene Risikogruppen hinsichtlich der Progression zu einem MIBC sowie der Rezidivwahrscheinlichkeit. Die Einteilung erfolgt anhand eines Score-Systems, das Sylvester et al. 2006 entwickelt haben.¹⁴ In den Score fließen die Größe und Anzahl der Neoplasie, das T-Stadium und das Grading, ein eventuelles Rezidiv, sowie ein begleitendes CIS ein. Als Niedrig-Risiko gelten alle Tumore, die primär und solitär auftreten und maximal als TaT1 LG/G1 einzustufen sind. Erreicht ein Karzinom das Stadium T1 HG/G3 gilt es als Hoch-Risiko-Tumor. Da CIS endoskopisch nicht sanierbar sind werden auch sie mit einem hohen Risiko eingestuft. Neoplasien, die in keine der Gruppen einzuordnen sind, haben ein mittleres Risiko.¹¹ In der Hochrisikogruppe findet sich eine Rezidivwahrscheinlichkeit von 61 % nach einem Jahr und 75 % nach 5 Jahren, während in der Niedrigrisikogruppe die Wahrscheinlichkeit bei 15 % bzw. 30 % liegt. Das Progressionsrisiko variiert je nach Gruppe von 0,2 % nach einem Jahr und 0,8 % nach 5 Jahren bei niedrigem Risiko, bis 17 % bzw. 45 % bei hohem Risiko.¹⁴

In Europa liegt die 5-Jahres-Überlebensrate des BCa im Durchschnitt bei 70 %.⁴ Die Prognose ist jedoch stark abhängig vom Stadium. Bei einem frühen Stadium (bis T1) liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei ca. 75 %. Sobald der Tumor muskelinvasiv wächst (T2), sinkt die Rate auf unter 50 %.^{15, 16} Mit dem Vorhandensein von Fernmetastasen fällt die Wahrscheinlichkeit nach 5 Jahren noch zu leben auf unter 20 % ab.¹⁶

Durch das hohe Rezidiv- und Progressionsrisiko bringt das BCa hohe finanzielle Kosten mit sich. So betragen die therapiebedingten Kosten, die durch Urothelkarzinome im Jahre 2012 in der europäischen Union verursacht wurden,

annähernd 5 Milliarden Euro.¹⁷ Aufgrund der steigenden Inzidenz durch die demographische Entwicklung erscheint es naheliegend, dass die Kosten in Zukunft noch höher sein werden.

1.1.4 Therapie

Zur Diagnose des BCa ist eine Zystoskopie mit transurethraler Resektion (TUR-B) verdächtiger Läsionen indiziert. Je nach initialem Befund wird nach einem Intervall von 2-6 Wochen eine zystoskopische Kontrolle oder eine Revision mit eventuell weiterer Resektion empfohlen.¹³ Abhängig von der histopathologisch gesicherten Ausbreitung des Karzinoms bestehen unterschiedliche Therapieoptionen. Beim NMIBC kann je nach Risikoprofil des Patienten nach der Abtragung der Neoplasie eine intravesikale Instillation von Bacillus Calmette-Guérin (BCG) oder einem Chemotherapeutikum (meist Mitomycin C) indiziert sein. Bei Niedrig-Risiko Patienten wird eine einmalige Instillation empfohlen, während bei mittlerem Risiko weitere Behandlungen über den Zeitraum von einem Jahr angezeigt sind. Handelt es sich um Hoch-Risiko Patienten werden regelmäßige BCG-Instillation für drei Jahre empfohlen. Alternativ kann die radikale Zystektomie (RC) als Therapieoption erwogen werden.^{11, 18} Aufgrund der hohen Rezidivrate sind regelmäßige Nachuntersuchungen mit zystoskopischen Kontrollen indiziert. Während diese bei Niedrig-Risiko Patienten nach 5 Jahren durch nicht-invasive Methoden ersetzt werden können werden sie bei mittlerem und hohem Risiko lebenslänglich empfohlen.^{11, 13, 19}

Beim Nachweis eines MIBC ist die radikale Zystektomie mit bilateraler Lymphadenektomie die Therapie der Wahl.^{20, 21} Eine neoadjuvante, Cisplatin-basierte Chemotherapie steigert zusätzlich die 5-Jahres-Überlebensrate um ca. 8 % auf 58 %.^{8, 22} Sind Fernmetastasen vorhanden, wird eine Operation nur zur Symptomlinderung empfohlen (zum Beispiel Harnableitung bei stenosierendem Tumor).^{22, 23} Stattdessen ist als Erstlinientherapie eine palliative Cisplatin-basierte Chemotherapie indiziert.²⁴ Eine Erhaltungstherapie mit dem programmed cell death ligand 1 (PD-L1) Inhibitor Avelumab kann das Gesamtüberleben zusätzlich steigern. Die 1-Jahres-Überlebensrate wurde somit von 58,4 % auf 71,3 % gesteigert.²⁵

Sind die Patienten aufgrund von Vorerkrankungen (z.B. Nieren- oder Herzinsuffizienz) nicht für eine Therapie mit Cisplatin geeignet oder zeigte eine Cisplatin-basierte Therapie keinen Erfolg wird seit 2021 eine Immuntherapie mit dem programmed cell death protein 1 (PD-1) Inhibitor Pembrolizumab empfohlen. 2017

zeigte eine Studie ein medianes Gesamtüberleben von 10,4 Monaten mit Pembrolizumab, während dieses mit der klassischen Zweitlinientherapie bei 7,4 Monaten lag.^{26, 23} Die Immuntherapie nutzt die hohe Expression von PD-L1 im BCa. PD-L1 ist ein Oberflächenprotein, welches durch Bindung an PD-1 die T-Zell-vermittelte Immunantwort hemmt.²⁷ Durch eine Bindung der monoklonalen Antikörper an PD-L1 (z.B. Avelumab) oder PD-1 (z.B. Pembrolizumab) wird eine Bindung der zwei Proteine verhindert und somit die Immunevasion des Karzinoms gestoppt.²⁵ Nach erfolgreicher Therapie sind regelmäßige CT Kontrollen notwendig, da nach 2 Jahren bis zu 50 % der Patienten ein Rezidiv entwickeln.^{22, 24}

1.1.5 Genetischer Hintergrund

Wie in anderen Karzinomen auch, sind im BCa diverse Mutationen von Tumorsuppressorgenen und Proto-Onkogenen zu finden. Den größten Einfluss auf die Karzinogenese des BCa haben wahrscheinlich Mutationen in den Genen TP53 und RB1.^{28, 29} Zusätzlich sind häufig Mutationen in den RAS-Signalkaskaden und den dazugehörigen Tyrosinkinase (fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3), epidermal growth factor receptor (EGFR), human epidermal growth factor receptor 2 (Her2)) zu finden.^{29, 30} Diese Mutationen können als potentielle Therapieziele für spezifische Inhibitoren und Antikörper genutzt werden.³¹

In den letzten 10 Jahren gelang es verschiedenen Gruppen, das BCa anhand des individuell vorliegenden Genexpressionsmusters in verschiedene molekulare Subtypen zu unterteilen.^{29, 31, 32} Die zwei Häufigsten sind der basale und der lumbale Subtyp. Die verschiedenen Typen unterscheiden sich nicht nur in der Expression verschiedener Gene, sondern korrelieren auch häufig mit unterschiedlichen T-Stadien und zeigen somit verschiedene Prognosen auf.²⁹ Karzinome vom luminalen Subtyp finden sich häufig in niedrigeren TNM Stadien (T1-T2) und neigen seltener zu einer Progression. Dies kann mit der typischerweise verstärkten Expression der Marker für die urotheliale Differenzierung (GATA3, FOXA1) zusammenhängen.³³ Keratin 20 (KRT20) zeigt im luminalen Typ eine verstärkte Expression und dient somit als luminaler Indikatormarker.³²

Der basale Subtyp hingegen kann häufiger in fortgeschrittenen Stadien (T3-4) nachgewiesen werden und zeigt eine Assoziation mit dem weiblichen Geschlecht.³⁴ Die Prognose ist aufgrund der höheren Infiltrationstiefe schlechter als beim luminalen Subtyp. Der basale Subtyp zeigt jedoch insgesamt ein besseres Ansprechen auf eine Cisplatin-basierte Chemotherapie.^{29, 34} Zusätzlich weist er eine deutlich erhöhte

Expression von PD-L1 auf.³² Dies begünstigt ihn für eine Immuntherapie wie zuvor beschrieben.²³ Den Indikatormarker für den basalen Subtyp stellt Keratin 5 (KRT5) dar.³² Die für präklinisch durchgeführte Studien genutzten humanen Blasenzelllinien zeigen zum Teil auch typische Expressionsmuster für den basalen und den luminalen Subtyp und können molekulargenetisch eingeteilt werden. Ein typisches Beispiel für eine Zelllinie des luminalen Subtyps ist RT112, während z.B. SCaBER dem basalen Subtyp zugeordnet werden kann.³³ So können die Urothelkarzinomzelllinien als Modelle für die unterschiedliche Progression und Invasion der molekularen Subtypen genutzt werden.

Bezogen auf die Molekulargenetik weist das BCa Parallelen zum Mammakarzinom auf. So werden beide Karzinome anhand ähnlicher Expressionsmuster in verschiedene Subtypen unterteilt.³⁴ 2018 untersuchten Kriegmair et al. bereits im Mammakarzinom etablierte prognostische Marker im MIBC. Hierbei zeigte sich, dass ähnlich wie beim Mammakarzinom, auch im Urothelkarzinom die Expression von Her2 und Ki67 mit einem signifikant verminderten krebsspezifischen Überleben assoziiert ist.³⁵

1.2 Humane endogene Retroviren

1.2.1 Entstehung und Aufbau

Retroviren sind Viren mit Einzelstrang-RNA. Nach Infektion einer Wirtszelle synthetisiert das Virus mittels einer eigenen reversen Transkriptase eine DNA-Kopie (Provirus) und integriert diese in das Genom des Wirts (Abb. 4A).³⁶ Das Genom des Virus besteht aus den Elementen group-specific antigen (gag), Protease (pro), Polymerase (pol), die die reverse Transkriptase und die Integrase kodiert, und envelope (env), welches das Oberflächen- und das Transmembranprotein kodiert. Flankiert werden diese Elemente von sogenannten Long Terminal Repeats (LTRs) (Abb.4B).³⁶⁻³⁸ Diese beinhalten Promoter- und Enhancer-Regionen und haben somit regulatorische Eigenschaften für die Transkription.^{36, 39}

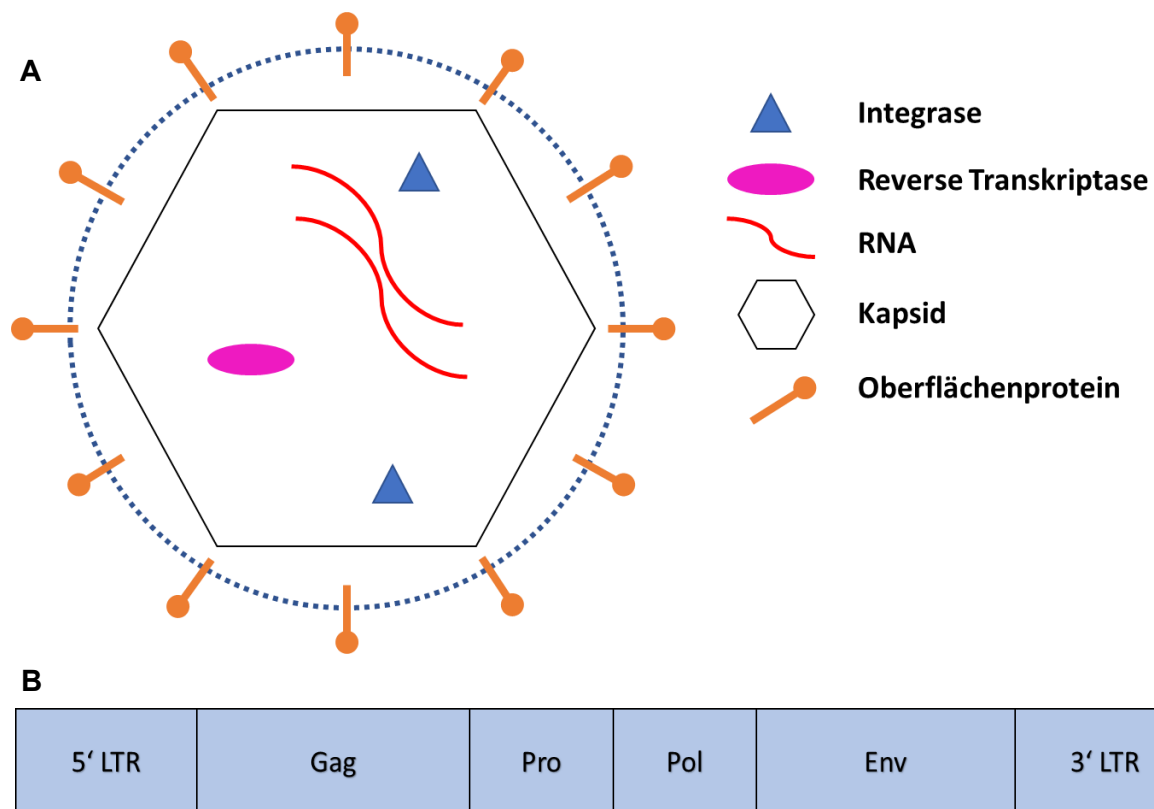


Abbildung 3: Aufbau eines Retrovirus

A: Mit dem Oberflächenprotein penetriert das Virus die Wirtszelle. Die Reverse Transkriptase synthetisiert aus der RNA das Provirus, welche mittels der Integrase in das Wirtsgenom eingefügt wird.

B: Das Provirus besteht aus den Abschnitten Gag, Pro, Pol und Env, welche von 2 LTRs flankiert sind

Infiziert ein Retrovirus eine Keimzelle kann es sein, dass die virale DNA vererbt wird. Im Laufe der Evolution wurde durch diesen Mechanismus so viel retrovirales Genom in das menschliche Genom integriert, dass es heute einen Anteil von ca. 8 % aufweist.⁴⁰ Diese DNA-Abschnitte retroviralen Ursprungs werden als endogene Retroviren (ERV) bezeichnet. Durch eine Vielzahl von Mutationen und Deletionen unserer DNA sind die Genloci der ERV nicht mehr intakt.^{36, 37} Dadurch haben sie die Funktion verloren, neue Viren zu bilden. Oftmals bleiben durch Rekombination nur die LTRs, wodurch die meisten ERV heute hauptsächlich genregulatorische Eigenschaften besitzen.^{39, 41, 42}

1.2.2 Induktion

Viele ERV zeigen nur noch schwache Expressionsmuster. Diversen Forschungsgruppen ist es jedoch gelungen, die Expression der ERV zu induzieren. Da viele Gene durch Cytosin-Methylierung epigenetisch stillgelegt werden, liegt es nahe, dass die DNA-Methylierung auch einen Einfluss auf retrovirale Elemente hat.⁴³ Dies wurde auch von Forschungsgruppen sowohl bei murinen als auch bei humanen ERV gezeigt. So wiesen in einer Studie Maus-Embryonen, denen das für die für Methylierung zuständige Protein DNA-Methyltransferase-1 fehlte, 50-100-fach höhere RNA-Level von ERV auf.⁴⁴ Einer anderen Forschungsgruppe gelang es in Teratokarzinomzellen ERV LTRs durch den Methyltransferaseinhibitor Decitabin zu reaktivieren.⁴⁵

In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass ERV auch über sogenannte glucocorticoid response elements durch Glucocorticoide auf ein 85-faches aktiviert werden können.⁴⁶ Zellen, die für 5 h mit Dexamethason behandelt wurden, zeigten eine Veränderung der Expressionsmuster muriner ERV im Vergleich zu nicht behandelten Kontrollzellen. Zusätzlich scheinen HERV durch interferon-stimulated response elements (ISRE) aktiviert zu werden.^{47, 48} Diese Elemente sind in den LTRs der ERV zu finden und induzieren ihre Transkription. Die Stimulation der ISRE erfolgt durch Transkriptionsfaktoren wie interferon-regulatory factors (IFRs) und nuclear factor kappa b (NF- κ B).⁴⁷ Auch der durch Interferon aktivierte Transkriptionsfaktor STAT1 kann an die LTRs binden und ERV somit aktivieren.^{48, 49}

Hu et al. zeigten 2016, dass ERV auch durch eine Hypoxie mit folgender Reoxygenierung induziert werden können.⁵⁰ Der Mechanismus basiert auf dem hypoxia-inducible factor 1 (HIF1). Dieser Faktor besteht aus den zwei Untereinheiten HIF1 α und HIF1 β .⁵¹ Die α -Untereinheit ist zwar ubiquitär vorhanden, wird jedoch

aufgrund von Hydroxyl-Gruppen vom Proteasom abgebaut. Unter hypoxischem Stress werden die OH-Gruppen abgespalten und beide HIF1 Untereinheiten können sich im Nukleus verbinden und als Transkriptionsfaktor dienen.⁵² Mit einem verminderten Sauerstoffgehalt steigen die Level der HIF1 Untereinheiten exponentiell an.⁵³ Unter den von HIF1 beeinflussten Genen sind u.a. Wachstumsfaktoren, wie VEGF und auch der Glukosetransporter GLUT1.⁵⁴ Dadurch wird die Angiogenese gefördert (VEGF) und durch ein verbessertes Glucoseangebot (GLUT1) die Glykolyse unterstützt. Diese Mechanismen dienen dem Überleben der Zelle unter hypoxischen Bedingungen, wie sie z.B. im Tumor zu finden sind. So wurde in der Vergangenheit in Blasenkrebszellen gezeigt, dass eine verstärkte Expression von HIF1 α die Angiogenese und Proliferation des Tumors fördern kann, und mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet ist.^{55, 56}

1.2.3 Klassifizierung

Die Klassifizierung der einzelnen ERV erfolgt nach verschiedenen Systemen. Zum einem werden sie durch den Wirt spezifiziert. So gibt es die HERV (human), MERV (murin), PERV (porcin) und Weitere.⁵⁷ Ein anderes System bezieht sich lediglich auf die erste Aminosäure der t-RNA, die an die Primerbindungsstelle bindet, um die reverse Transkription zu starten. Dies wird mittels Buchstaben dargestellt (z.B. HERV-K).⁵⁷ Diese Nomenklatur ist die verbreitetste und gliedert die ERV in 22 Familien.³⁹ Bei allen Systemen besteht das Problem, dass ERV in Gruppen zusammengeführt werden, obwohl sie sehr wenig Gemeinsamkeiten aufzeigen. Eine strukturierte, einheitliche Einteilung ist bisher noch nicht etabliert, wird aber in Zukunft nötig sein, um die ERV besser voneinander abzugrenzen.^{37, 57}

Die jüngsten ERV gehören zur Familie der ERV-K (t-RNA Aminosäure Lysin) und sind vor ca. 3 Mio. Jahren in das menschliche Genom integriert worden. Sie lassen sich nochmals in 11 Gruppen unterteilen (HML1-HML11).^{39, 58} Die Untergruppe der HML-2 sind die einzigen HERV, die noch intakte offene Leseraster (open reading frames, ORF) besitzen.³⁹ Sie können anhand einer 292 Basenpaare langen Deletion im Bereich des env Elements nochmals unterteilt werden. Im Bereich dieser Deletion liegt die Sequenz zur Steuerung des Spleißvorgangs. Normalerweise wird durch den ORF des HML-2 das Protein Rec kodiert. Liegt jedoch die Deletion vor, so wird der ORF anders gespleißt und das Provirus kodiert nun das Protein Np9.⁵⁸⁻⁶⁰ Rec wird in gesundem Gewebe exprimiert und unterstützt den Transport von viralem Material aus dem Nukleus in das Zytoplasma.^{61, 62} Np9 wird überwiegend in Tumorgewebe

exprimiert und hat hier Einfluss auf das Tumorwachstum.⁶³ In Leukämiezellen wurde nachgewiesen, dass das Protein verschiedene onkogene Signalkaskaden, wie ras/ERK und Notch1, aktiviert.⁶³ Zusätzlich wirkt es negativ auf die Hemmung des Protoonkogens c-myc und führt zu einer Überproduktion dieses Transkriptionsfaktors. Dadurch werden ebenfalls das Tumorwachstum und die Proliferation gefördert.⁶⁴

1.2.4 Funktion

Seit ihrer Entdeckung in den 1970er Jahren wird die Expression der ERV genauer untersucht. Dabei wurde klar, dass HERV in vielen verschiedenen Geweben exprimiert werden.⁶⁵⁻⁶⁸ Dabei zeigen sich große Unterschiede zwischen den einzelnen Familien: Die ältesten HERV zeigten die geringste Expression, während jüngere Familien noch vermehrt transkribiert werden. Jedoch stellt sich weiterhin die Frage, welche Funktion ERV haben, beziehungsweise inwiefern sie Einfluss auf unser Gewebe nehmen. Neben den bereits erwähnten genregulatorischen Eigenschaften sind auch Proteine mit retroviralem Ursprung bekannt.⁶⁶ Das am häufigsten beschriebene Protein ist das Syncytin-1. Es wird vom env Element eines HERV-W kodiert und von Trophoblasten in der Plazenta exprimiert. Dort fördert es die Bildung des Synzytiums, welches in der Embryogenese von großer Bedeutung ist.^{36, 69} Zusätzlich wird dies durch ERV-3 über eine β -hCG Stimulation unterstützt.⁷⁰ Ein weiteres Beispiel für eine symbiotische Funktion ist die von der Parotis sekretierte Amylase. Sie wird ebenfalls von einem ERV codiert (HERV-E) und könnte der Menschheit mit der Verdauung von langkettigen Kohlenhydraten einen evolutionären Vorteil verschafft haben.^{42, 71}

Humane endogene Retroviren sind jedoch auch mit verschiedenen Pathologien vergesellschaftet. Zum Beispiel zeigte sich, dass in neurodegenerativen Erkrankungen, wie der multiplen Sklerose oder der amyotrophen Lateralsklerose und auch bei der Schizophrenie verschiedene HERV erhöhte Expressionsmuster aufwiesen und mit einer Progression der Erkrankung assoziiert sind.^{72, 73}

Auch ein Zusammenhang zwischen HERV und malignen Neoplasien wird immer deutlicher.^{39, 41} Insbesondere HERV-K zeigt in verschiedenen Tumoren im Vergleich zum Normalgewebe eine erhöhte Expression. Dies wurde unter anderem im Melanom^{74, 75}, im Brustkrebs⁷⁶⁻⁷⁸ und einigen weiteren Krebserkrankungen^{79, 80} festgestellt. Im Mammakarzinom untersuchten Zhou et al. durch einen shRNA vermittelten Knockdown des ERV-K envelope Proteins den genauen Einfluss des

ERV auf den Tumor.⁸¹ Dadurch konnte festgestellt werden, dass die Expression im Tumor nicht nur erhöht war, sondern dass dadurch die Proliferation und die Migration verstärkt wurden. Zusätzlich entdeckte die Forschungsgruppe eine Veränderung der zellulären Signalkaskaden durch das virale Protein. Onkogene Signalwege, wie zum Beispiel die Ras-Kaskade, wurden durch HERV vermehrt aktiviert, während Tumorsuppressorgene, wie TP53 vermindert exprimiert wurden. Dadurch scheint HERV-K env die Tumorgenese zu fördern. Das ERV scheint im Mammakarzinom auch eine Antigen-vermittelte Immunantwort auszulösen. Ca. 50 % der Patientinnen mit Brustkrebs wiesen IgG Antikörper gegen das von HERV-K kodierte Np9 auf. Auch die T-Zellproliferationsrate war nach Kontakt mit dem Antigen erhöht. Dies könnte in Zukunft als Target für eine spezifische Therapie genutzt werden.⁷⁷ Die gebildeten Antikörper gegen das HERV-K envelope Protein könnten zusätzlich als Marker für eine frühzeitige Diagnose des Brustkrebses dienen.⁷⁸ Auch im Pankreaskarzinom konnten durch einen ERV-Kenv Knockdown das Tumorwachstum und die Metastasierung vermindert werden. Einen Einfluss auf intrazelluläre Signalkaskaden wurde hier ebenfalls nachgewiesen. Durch die Hemmung des HERV-K wurden auch Protoonkogene, wie Ras und c-myc, herunterreguliert.⁸² In Gewebeproben von Sarkompatienten konnte zudem ein Zusammenhang zwischen der ERV Expression und dem Überleben der Patienten festgestellt werden.⁸³ Je höher die Expression von HERV-K war, desto schlechter war das Überleben der Patientenkohorte.

Auch im BCa wurde die Expression verschiedener ERV-Stämme nachgewiesen.^{84, 85} Jedoch wurden bis dato keine signifikanten Unterschiede zwischen Karzinomzellen und normalem Gewebe festgestellt. Anhand von Daten der TCGA wurde allerdings ein Einfluss der ERV-Expression auf das Überleben festgestellt. Bei einer hohen Expression von ERV-3 zeigte sich eine 5-Jahres-Überlebensrate von 35 % während bei einer niedrigen Expression die Überlebensrate 44 % betrug.

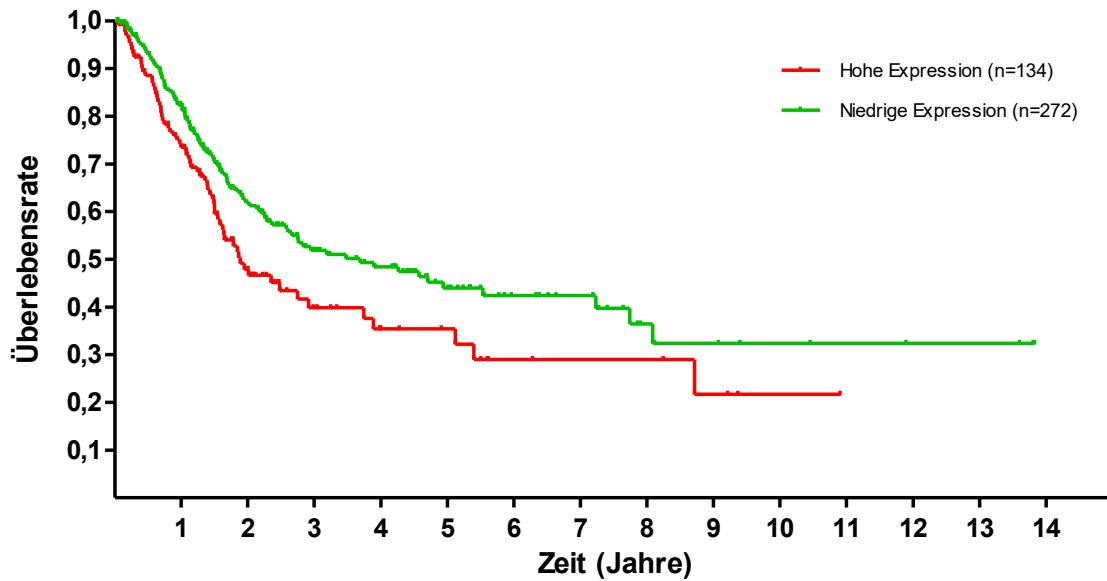


Abbildung 4: Überlebensrate abhängig von der ERV-3 Expression

Die Überlebensrate der Patienten mit BCa unterscheidet sich, je nach Expression des endogenen Retrovirus ERV-3. Der Cut-Off zwischen niedriger und hoher Expression liegt bei 4,59 fragments per kilobase million.

Quelle: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000213462-ERV3-1/pathology/urothelial+cancer>

1.3 Fragestellung

In Anbetracht der bisherigen Erkenntnisse insbesondere im Brustkrebs und der molekulargenetischen Ähnlichkeit zwischen Urothel- und Mammakarzinom scheint auch im Blasenkrebs ein bisher ungeklärter Zusammenhang zwischen ERV-Expression und dem Tumorgeschehen möglich. Deshalb war das Ziel dieser Studie die Expression verschiedener ERV in unterschiedlichen Zelllinien des Urothelkarzinoms zu untersuchen. Dabei wurden die Expressionen im Zusammenhang mit den molekularen Subtypen und anderen auf das Karzinom Einfluss nehmender Gene verglichen, um einen möglichen Einfluss der ERV auf das BCa herauszufinden und folgende Fragen zu klären:

- Werden endogene Retroviren in malignen und benignen Blasenzelllinien exprimiert?
- Unterscheiden sich die ERV in ihren Expressionsmustern in urologischen Blasenkarzinomzelllinien?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen den Expressionsmustern der ERV und den für die molekularen Subtypen des BCa typischen Zelllinien?
- Gibt es eine Assoziation zwischen den ERV und dem Immunsystem und könnten sie somit die PD-L1 getriggerte Immunevasion des Tumors begünstigen?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Die verwendeten Geräte sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Firma
Fluorometer	Quibit 3 Fluorometer	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA USA
Gefrierschrank -20 °C	Comfort NoFrost	Liebherr, Bulle, D
Gefrierschrank -80 °C	MDF-DU500VH	Panasonic, JP
Geldokumentationssystem GelDoc	XR+	Bio-Rad, München, D
Gelelektrophorese Netzteil	Consort E143	Consort, Turnhout, BE
Gelkammer	B1A	PeqLab, Erlangen, D
Inkubator	B5060	Heraeus, D
Inkubator Hypoxie	B6060	Heraeus, D
Mikroskop	Axioskop 2plus	Zeiss, Oberkochen, D
Mikrowelle	MikroTime FM 1315t	Moulimex, Alecon, FR
Nanophotometer	Nanodrop 1000	VWR, Darmstadt, D
Pipettierhilfe	Pipetus-akku	Hirschmann, D
Real-Time PCR Gerät	StepOnePlus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Sterilwerkbank	Herasafe KSP 18	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA
Thermocycler cDNA	FlexCycler 2	Analytikjena, Jena, D
Thermocycler PCR	T100 Thermal Cycler	Bio-Rad, München, D
Tischzentrifuge	Minispin	Eppendorf, Hamburg, D
Vortex	MS1 Minishaker	IKA, Staufen, D
Wasserbad	1083	GFL, Burgwedel, D
Zellzähler	LUNA dual fluorescence cell counter	Logos Biosystems, KR
Zentrifuge	Centrifuge 5804	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge	Rotina 420 R	Hettich, Tuttlingen, D

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
MicroAmp Fast 96-Well-Reaction Plate (0,1 ml)	Thermo Scientific, Waltham, MA USA
Optical adhesive cover	Thermo Scientific, Waltham, MA USA
Pipettenspitzen mit Filter (1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl)	STARLAB GmbH, Hamburg, D
Pipettenspitzen ohne Filter (20 µl, 10 µl)	STARLAB GmbH, Hamburg, D
Reaktionsgefäße (2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml, 0,2 ml)	Biozym, Oldendorf, D
Serologische Pipetten (25 ml, 10 ml, 5 ml, 2 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Zellkulturflaschen (75 cm ² , 25 cm ²)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Zentrifugenröhrchen (50 ml, 15 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D

2.1.3 Reagenzien und Kits

Die verwendeten Reagenzien sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Verwendete Reagenzien

Reagenz	Firma
0,1 M DTT	Invitrogen, Waltham, MA USA
10 mM dNTPs	Thermo Scientific, Waltham, MA USA
100 bp DNA-Leiter	Thermo Scientific, Waltham, MA USA
10x PCR-Puffer	Thermo Scientific, Waltham, MA USA
5x First Strand Puffer ohne MgCl ₂	Invitrogen, Waltham, MA USA
Agarose	Biozym, Oldendorf, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Darmstadt, D
DMEM	GIBCO, Waltham, MA USA
dNTPs (25 mM)	Thermo Scientific, Waltham, MA USA
Ethanol vergällt 96 %	Roth, Karlsruhe, D
Fast SYBR Green Master Mix	Thermo Scientific, Waltham, MA USA
FBS	GIBCO, Waltham, MA USA
MgCl ₂ (50 mM)	Thermo Scientific, Waltham, MA USA
Midori Green direct	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
MinELute PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, D
m-MLV-reverse Transkriptase (200 U/μl)	Invitrogen, Waltham, MA USA
Nuklease freies Wasser	BRAUN, Melsungen, D
pdN6 random primer	Roche Life Science, Mannheim, D
RNase OUT (40 U/μl)	Invitrogen, Waltham, MA USA
RNeasy MiniKit	Qiagen, Hilden, D
RPMI	GIBCO, Waltham, MA USA
TAE-Puffer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Taq Polymerase	Thermo Scientific, Waltham, MA USA
TaqMan fast advanced Master Mix	Thermo Scientific, Waltham, MA USA
Trypsin-EDTA 0,25 %	GIBCO, Waltham, MA USA
Tryptanblau	GIBCO, Waltham, MA USA
β-Mercaptoethanol	Sigma, Darmstadt, D

2.1.4 Zelllinien und Medien

Die für den Hypoxieversuch verwendeten Zelllinien waren RT112, SCaBER und UROtsa. Ziel dabei war es, die molekularen Subtypen des luminalen (RT112) und basalen (SCaBER) BCa zu vergleichen. Des Weiteren ist RT112 urothelialen Ursprungs, während SCaBER von Plattenepithel abstammt. Die Zelllinie UROtsa diente als benigne Kontrolle.

Die Zellen wurden in dem vom Hersteller empfohlenen Medium kultiviert. Den Medien wurde vor Verwendung 10 % (DMEM) bzw. 5 % (RPMI) fötales Kälberserum (FBS) zugegeben (Tabelle 4).

Tabelle 4: Verwendete Zelllinien

Zelllinien	Firma	Medium
RT112	ECACC, Salisbury, GB	DMEM + 10 % FBS
SCaBER	ATCC, Wesel, D	DMEM + 10 % FBS
UROtsa	RWTH, Universität Aachen, D	RPMI + 5 % FBS

2.1.5 Software

Die verwendete Software ist in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Verwendete Software

Software	Firma
ImageLab software	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
ND 1000 Nanodrop software	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Prism 5	GraphPad Software LLC, US
Stepone software 2.2.2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.1.6 Primer und Sonden

Es wurden 12 Gene sowie die laborinternen Housekeeping-Gene Calmodulin (CALM) und β -Glucoronidase (GUS) als Referenzgene analysiert.⁸⁶ Der Fokus lag auf den ERV HERV-3, HERV-W und HERV-K. Um bei HERV-K die codierten Proteine Np9 und Rec vergleichen zu können, wurde HERV-Kpol aus einer Sequenz, die die 292 Basenpaare lange Deletion enthält, designed. Das Primerpaar für HERV-Kenv liegt im Bereich der Deletion und dient somit als Referenz für Rec. Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF1A) und der Glukosetransporter 1 (GLUT1) wurden als Kontrollen für die Hypoxie verwendet. Zur Differenzierung der molekularen Subtypen dienten GATA binding protein 3 (GATA3) und KRT20 für den luminalen sowie KRT5 für den basalen Subtyp. Der Interferon- γ Rezeptor (IFNGR) und PD-L1 sollten Aufschluss über den Einfluss auf das Immunsystem geben, und die receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3 (RIPK3) diene als Marker für die Nekroptose. Die Primer für CALM, GUS, KRT5 und KRT20 wurden vom Labor bereitgestellt. Alle weiteren Primer und Sonden wurden anhand von Gensequenzen der Datenbanken *ensembl.org* und *girinst.org/repbases* manuell oder mit Hilfe von NCBI Primer-Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) entworfen. Dabei wurde darauf geachtet, dass einer der Primer oder die Sonde auf einer Exon-Exon-

Grenze lag, um ausschließlich mRNA zu erfassen. Da bei den ERV der Fokus nicht auf dem Protein, sondern auf der generellen Expression lag, und zusätzlich Informationen über Exone in den Gensequenzen fehlen, wurde hier auf Exon-Exon-Grenzen verzichtet. Die jeweiligen Primer und Sonden durften eine Länge von 25 bzw. 40 Basenpaaren nicht überschreiten. Als Kriterium galt zusätzlich eine Schmelztemperatur (T_m) von 60 ± 2 °C für die Primer sowie eine ca. 10 °C höhere T_m für die zugehörige Sonde. Zur Validierung wurden sie mittels NCBI Primer-Blast kontrolliert und per qualitativer und quantitativer PCR überprüft. Die T_m ergeben sich aus den Berechnungen der Webseite *tmcalculator.neb.com*. Die Primerpaare und die Sonden wurden von Eurofins genomics (Eurofins genomics, Deutschland) synthetisiert und anschließend mit RNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 100 pmol/ μ l verdünnt. Die schon vorhandenen laborinternen Primerpaare und Sonden CALM und GUS wurden als Referenzgene verwendet und im Rahmen dieser Studie nicht nochmals validiert. Alle verwendeten Primer und Sonden sind in den Tabellen 6 und 7 zusammengefasst.

Tabelle 6: Verwendete Primer

Bezeichnung	Exon	Sequenz (5'-3')	Tm
CALM forward	1	GAGCGAGCTGAGTGGTTGTG	61 °C
CALM reverse	1/2	AGTCAGTTGGTCAGCCATGCT	60 °C
ERV-3 forward		CCATGGGAAGCAAGGGAAC	59 °C
ERV-3 reverse		CTTTCCCCAGCGAGCAATAC	59 °C
ERV-Kenv forward		GGGCACAACATAAAGAAGCTGACG	61 °C
ERV-Kenv reverse		GGCATAGGGGAGACTTACCACC	62 °C
ERV-Kpol forward		GGGCTGTAAACGCCGTAATTC	59 °C
ERV-Kpol reverse		CTGCTCTGCCAGAGGGATG	61 °C
ERV-W forward		GAGCCAGTTCTCATACTGGAC	60 °C
ERV-W reverse		GAAATTTAAGAGCGCTTGGGTGGC	62 °C
GATA3 forward	3/4	CCGGTCCAGCACAGAAGG	62 °C
GATA3 reverse	4	GTGTCCCGTGCCATCTCG	62 °C
GLUT1 forward	7/8	CTGTCGTGTCGCTGTTTGTG	60 °C
GLUT1 reverse	8	CTAGCGCGATGGTCATGAGT	60 °C
GUS forward	11	GAAAATAYRTGGTTGGAGAGCTCATT	60 °C
GUS reverse	12	CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA	58 °C
HIF1A forward	5/6	CATGGAAGGTATTGCACTGCAC	59 °C
HIF1A reverse	6	GGGTGAGGAATGGGTTTACA	60 °C
IFNGR forward	4/5	GAATGAACGGAAGTGAGATCCAGT	59 °C
IFNGR reverse	5	GTAAGACTCCTTCTGCTGAAACACAG	60 °C
KRT20 forward	1	GCGACTACAGTGCATATTACAGACAA	59 °C
KRT20 reverse	2	CACACCGAGCATTTTGCAGTT	59 °C
KRT5 forward	7	CGCCAATTACCGCAAGCT	61 °C
KRT5 reverse	8/9	ACAGAGATGTTGACTGGTCCAAC	61 °C
PD-L1 forward	3/4	CAATGCCCCATACAACAAATCAACC	60 °C
PD-L1 reverse	4	GGACTTGATGGTCACTGCTTGTC	61 °C
RIPK3 forward	7/8	TGCTGTCTCCACGGTAAAGG	60 °C
RIPK3 reverse	8	ATTTCTGTCCCTCCTTGCC	60 °C

Tabelle 7: Verwendete Sonden

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Tm
CALM Probe	[VIC]-TCGCGTCTCGGAAACCGGTAGC-[BHQ1]	66 °C
ERV-3 Probe	[FAM]- GCCCCAAGATAATTTCACTAACC GCCTCTTCCCTCG- [BHQ1]	70 °C
ERV-Kenv Probe	[FAM]- GATACAATCATCAAGGCTGCAAGCAGCATACTCTCTGGGG -[BHQ1]	70 °C
ERV-Kpol Probe	[FAM]-CCCATGGGGCCTCTCCAACCCG-[BHQ1]	72 °C
ERV-W Probe	[FAM]-GATGGCACAAGGTTTCTGAACGGGCGGC-[BHQ1]	71 °C
GATA3 Probe	[FAM]-CAGGGAGTGTGTGAACTGTGGGGCAACC-[BHQ1]	70 °C
GLUT1 Probe	[FAM]-TGGAGCGAGCAGGCCGGC-[BHQ1]	71 °C
GUS Probe	[VIC]-CCAGCACTCTCGTCGGTGACTGTTCA-[BHQ1]	68 °C
HIF1A Probe	[FAM]- CAGCACCAAGCAGGTCATAGGTGGTTTCTTATACCCAC- [BHQ1]	69 °C
IFNGR Probe	[FAM]- CTGAGAATTCAGTGAGGATACTGGAATCGCTAACTGGCAC- [BHQ1]	68 °C
KRT20 Probe	[FAM]-TTGAAGAGCTGCGAAGTCAGATTAAGGATGCT- [BHQ1]	65 °C
KRT5 Probe	[FAM]-TGGAGGGCGAGGAATGCAGACTCA-[BHQ1]	67 °C
PD-L1 Probe	[FAM]-CAGATGACTTCGGCCTTGGGGTAGCC-[BHQ1]	68 °C
RIPK3 Probe	[FAM]- GACTCTGGGATAGAAAATCTCCTATTGCTGCTCCTGAGC- [BHQ1]	68 °C

2.2 Zellkultur gemäß den laborinternen Protokollen

Für die Zellkultur wurden die BCa-Zelllinien RT112 und SCaBER, sowie die benigne Urothelzelllinie UROtsa verwendet. Die Zellen wurden in 75 cm² Flaschen mit 10-15 ml Medium oder in 25 cm² Flaschen mit 5 ml Medium kultiviert. Inkubiert wurden die Zellen im Brutschrank bei 37 °C mit 5 % CO₂. Die Medien wurden im Wasserbad bei 37 °C, das Trypsin-EDTA 0,25 % bei Raumtemperatur erwärmt.

2.2.1 Mediumwechsel

Das Medium (DMEM + FBS oder RPMI + FBS, siehe Tabelle 3 und Tabelle 4) wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Dafür wurde das alte Medium mit einer serologischen Pipette abgenommen, verworfen, und frisches Medium in die Flaschen gegeben.

2.2.2 Subkultur adhärenter Zellen

Eine Subkultur der Zellen erfolgte, sobald 80-90 % der Flasche konfluent waren. Hierfür wurde das Medium abpipettiert und verworfen. 2-3 ml (75 cm² Flaschen) bzw. 1 ml (25 cm² Flaschen) 0,25 % Trypsin-EDTA wurden hinzugegeben und die Flasche für 3-5 min im Brutschrank, bis alle Zellen gelöst waren, inkubiert. Die Trypsinreaktion wurde mit der gleichen Menge serumhaltigen Mediums gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml frischem Medium resuspendiert. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde in eine neue Flasche mit frischem Medium überführt.

2.2.3 Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden die Zellen vom Flaschenboden gelöst, wie in 3.2.2 beschrieben. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 700 oder 1400 µl Lysepuffer (1 ml RLT-Puffer und 10 µl β-Mercaptoethanol) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf jeweils 700 µl in 2 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Das Lysat wurde durch mehrmaliges Auf- und Abziehen durch eine 20 G Kanüle homogenisiert und anschließend bei -80 °C eingefroren oder zur RNA-Isolation weiterverwendet.

2.2.4 Herstellung von Zellstock

Für das Einfrieren von Zellstocks wurde das Kulturmedium mit 10 % DMSO versetzt. Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben aus der Flasche gelöst und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 5 ml 10 %-igem DMSO-versetzten Medium resuspendiert.

Jeweils 1 ml Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt, und bei -80 °C gelagert.

2.2.5 Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Die Suspension wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in eine Flasche mit frischem Medium überführt und im Brutschrank inkubiert. Nach einem Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

2.2.6 Zellzahlbestimmung

Zur automatischen Zellzahlbestimmung mit dem LUNA dual fluorescence cell counter (Logos Biosystems, KR) wurden die Zellen, wie in 3.2.2 beschrieben, vom Flaschenboden gelöst und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml Medium resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden 10 µl abgenommen und mit 10 µl Trypanblau versetzt. Danach wurden 10 µl der Trypanblau-Zellsuspension auf einen Träger für LUNA gegeben und vom Gerät automatisiert optisch ausgezählt.

2.2.7 Hypoxie

Um die Expression der ERV zu induzieren, wurden die benignen und malignen Urothelzelllinien einer Hypoxie ausgesetzt. Damit die Studie zusätzlich die Physiologie im Tumor widerspiegelt, war das Ziel den Sauerstoffgehalt an den im Tumor anzupassen. In der Literatur fanden sich Sauerstoffkonzentrationen im endkapillären Blut von 45-50 mmHg (ca. 6 %). Die benötigte Konzentration zur ATP Synthese liegt bei ca. 8 mmHg (1 %).⁸⁷ Da der Sauerstoffgehalt im Tumor variieren kann, und kein genauer Wert in der Literatur gefunden wurde, wurde in dieser Studie ein Wert zwischen den 6 % des endkapillären Blutes und dem 1 % als Minimum zur

ATP Synthese gewählt. Somit wurden die Zellen in 3 % O₂ (ca. 22 mmHg) inkubiert. Für die Induktion durch Hypoxie wurden die Zellen in 25 cm² Flaschen mit 5 ml Medium kultiviert. Die Versuchsflaschen wurden im Inkubator bei 37 °C mit einem Gasgemisch aus 3% O₂, 5 % CO₂ und 92 %N₂ kultiviert. Nach 48 h erfolgte ein Mediumwechsel und die Flaschen wurden in einen Inkubator mit einer O₂-Konzentration von 21 % überführt. Die Kontrollen wurden durchgehend bei einem O₂-Gehalt von 21 % kultiviert. Die Zellen wurden nach 3, 6, 12, 24, 48 und 72 h Reoxygenierung entsprechend des Protokolls aus 3.2.6. ausgezählt, in 350 µl Lysepuffer (siehe 3.2.3) lysiert und die Genexpression, wie in 3.3 beschrieben, analysiert. Zur Erhöhung der Datenmenge wurde der Versuch dreimal durchgeführt.

2.3 Expressionsanalysen gemäß den laborinternen Protokollen

Für die Expressionsanalysen wurden die in 2.1.6 genannten Primer und Sonden mit RNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 10 pmol/µl verdünnt.

2.3.1 RNA-Isolation und Quantifizierung

Die RNA wurde aus Zelllysate mit dem RNeasy mini Kit nach der Anleitung des Herstellers isoliert und in RNase-freiem Wasser eluiert. Die RNA-Konzentration wurde nach Kalibrierung des Geräts nanophotometrisch bestimmt. Dabei wurden jeweils 1,2 µl eluierte RNA eingesetzt und bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Zur Qualitätskontrolle wurde der Quotient der Messwerte bei 260 nm und 280 nm bestimmt, der bei ca. 2,0 lag. Die Konzentration wurde in ng/µl angegeben.

2.3.2 Synthese komplementärer DNA (cDNA)

Die cDNA-Synthese erfolgte mit einer M-MLV reverse Transkriptase und random priming. Es wurden 2 µg RNA verwendet, die mit RNase freiem Wasser auf ein Volumen von 10 µl verdünnt wurden. Bei jeder cDNA-Synthese wurde als Negativkontrolle RNase-freies Wasser statt RNA verwendet. Die RNA und die Kontrolle wurden für 10 min bei 65 °C denaturiert. Der Mastermix wurde, wie in Tabelle 8, beschrieben hergestellt. Zusätzlich wurde ein Mastermix ohne reverse Transkriptase als RT-negative Kontrolle angesetzt.

Tabelle 8: Mastermix der cDNA-Synthese gemäß dem laborinternen Protokoll

Reagenz	Menge 1x
5x First Strand (M-MLV)-Puffer	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
10 mM dNTP Mix	1 µl
5 mg/ml pdN ₆ Random primer	1 µl
RNaseOUT	1 µl
M-MLV RT	1 µl

Zu jeder RNA-Probe wurden 10 µl Mastermix hinzugegeben und der Ansatz im Thermocycler nach folgendem Protokoll inkubiert: 120 min bei 37 °C, 15 min bei 70 °C, kühlen auf 4 °C. Die cDNA wurde bei -20 °C eingefroren und gelagert.

2.3.3 Qualitative PCR und Gelelektrophorese

Die Reagenzien wurden im Kühlblock aufgetaut und der Mastermix (n + 1 Proben) nach dem Schema aus Tabelle 9 angesetzt.

Tabelle 9: Mastermix der qualitativen PCR gemäß dem laborinternen Protokoll

Reagenzien	1x
H ₂ O	17,65 µl
10xPCR Puffer ohne MgCl ₂	2,5 µl
MgCl ₂ 50 mM	1,5 µl
dNTPs (25 mM)	0,25 µl
Primer forward (10 pmol/µl)	0,5 µl
Primer reverse (10 pmol/µl)	0,5 µl
Taq Polymerase	0,1 µl

Zu jeweils 23 µl Mastermix wurden 2 µl cDNA-Template bzw. RNase-freies Wasser als Negativkontrolle hinzugefügt.

Die PCR lief im T100 Thermal Cycler nach dem in Tabelle 10 zusammengefassten Protokoll.

Tabelle 10: Laborinternes Protokoll der qualitativen PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	
1	95 °C	2 min	1x
2	95 °C	30 s	35 Zyklen
3	60 °C	45 s	
4	72 °C	60 s	
5	72 °C	5 min	1x
6	10 °C	∞	1x

Für die Gelelektrophorese wurde ein 2-4 % Agarosegel mit 1xTAE-Puffer hergestellt. Es wurden jeweils 1 µl Midori Green mit 5 µl DNA-Leiter bzw. 10 µl PCR-Produkt aufgetragen und für 30-60 min bei 90-100 V laufen gelassen. Das Gel wurde mit Geldoc (Biorad) und ImageLab ausgewertet.

2.3.4 TaqMan fast SYBR Green qPCR

Die Primer für die PCR wurden im Kühlblock aufgetaut. Der Mastermix (n + 1 Proben) wurde, wie in Tabelle 11 beschrieben, hergestellt:

Tabelle 11: Mastermix der SYBR Green gemäß dem laborinternen Protokoll

Reagenzien	1 x
Fast SYBR green Mastermix	5 µl
Nuklease-freies Wasser	1,25 µl
Primer Forward	0,375 µl
Primer Reverse	0,375 µl

In eine 96-Well Platte wurden pro Well 7 µl Mastermix und 3 µl cDNA pipettiert. Jede Probe wurde als Doppelbestimmung analysiert. Als Negativkontrollen wurden RNase-freies Wasser (PCR-negative Kontrolle) und die cDNA-Negativkontrolle in Doppelbestimmung verwendet.

Die Platte wurde mit Folie verschlossen und für 5 min bei 1600 g zentrifugiert.

Die PCR lief im StepOne Plus nach dem in Tabelle 12 zusammengefassten Protokoll. Nach den PCR-Zyklen folgte eine Schmelzkurve von 60 °C bis 90 °C (siehe Tabelle 12, Schritt 4).

Tabelle 12: Laborinternes Protokoll der SYBR Green

Schritt	Temperatur	Zeit	
1	95 °C	20 s	1x
2	95 °C	3 s	40 Zyklen
3	60 °C	30 s	
4	60 °C - 90 °C	0,5 °C/s	1x

2.3.5 TaqMan fast advanced qPCR

Die Primer und Sonden für die PCR wurden im Kühlblock aufgetaut und der Mastermix (n + 1 Proben) nach dem Schema aus Tabelle 13 angesetzt.

Tabelle 13: Mastermix der TaqMan gemäß dem laborinternen Protokoll

Reagenzien	1 x
TaqMan® Fast advanced PCR Master Mix	5 µl
Nuklease freies Wasser	1 µl
Primer Forward	0,375 µl
Primer Reverse	0,375 µl
Hydrolysis Probe	0,25 µl

In eine 96-Well Platte wurden pro Well 7 µl Mastermix und 3 µl Template pipettiert. Jede Probe wurde als Doppelbestimmung analysiert. Als Negativkontrollen wurden RNase-freies Wasser und die cDNA-Negativkontrolle in Doppelbestimmung verwendet. Die Platte wurde mit Folie verschlossen und für 5 min bei 1600 g zentrifugiert. Die PCR im StepOne Plus lief nach folgendem Protokoll (Tabelle 14).

Tabelle 14: Laborinternes Protokoll der TaqMan

Schritt	Temperatur	Zeit	
1	95 °C	20 s	1x
2	95 °C	3 s	40 Zyklen
3	60 °C	30 s	

2.4 Statistik

2.4.1 Effizienzbestimmung

Aus der Verdünnungsreihe wurde logarithmisch eine Gerade erstellt und die Steigung bestimmt. Daraus wurde die Effizienz anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{Effizienz} = 1 * (-1/\text{Steigung})$$

2.4.2 Normalisierung der Genexpression

Die Ct-Werte wurden mit folgender Formel normalisiert:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(x) - \text{Ct}(\text{CALM})$$

Damit ein höherer Wert eine höhere Expression anzeigt wurde der ΔCt -Wert vom maximalen Wert 40 subtrahiert und somit als $40 - \Delta\text{Ct}$ angegeben.

2.4.3 Fold Change

In der Auswertung wurden die Expressionen der Zellen, die unter Hypoxie wuchsen, direkt mit der Expression der Kontrollzellen verglichen und als fold change angegeben. Die Werte lassen sich wie folgt berechnen:

$$\text{Fold change} = 2^{-(\Delta\text{Ct}(\text{O}_2^-) - \Delta\text{Ct}(\text{O}_2^+))}$$

2.4.4 Korrelation

Zur Korrelationsanalyse wurde der Spearman-Koeffizient berechnet. Als Signifikanzniveau wurde ein Wert von $p < 0,05$ gewählt.

2.4.5 Signifikanz

Die Signifikanz der Ergebnisse wurde anhand des Mann-Whitney-Tests überprüft. Als Signifikanzniveau wurde ein Wert von $p < 0,05$ gewählt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Primeretablierung

Die Primeretablierung wurde mit der Zelllinie RT112 durchgeführt. Für die qualitative PCR wurde unverdünntes Template genutzt, für die Intra- und Interassayvariation wurde die cDNA auf 1:100 verdünnt. Die Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Effizienz und des Detektionslimits wurde von 1 bis 1:10⁵ durchgeführt. Alle Werte sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Tabelle 15: Zusammenfassung Primeretablierung

In der Tabelle sind die Ergebnisse aller Analysen der in dieser Studie verwendeten Primer zusammengefasst.

Primer	Amplikonlänge	Threshold	Detection Limit Ct	Effizienz	Slope	Intraassayvariation	Interassayvariation
ERV-3	144	0,2	38,44	100,98%	0,9903	0,3444	0,6506
ERV-W	112	0,2	38,27	100,68%	0,9932	0,2554	0,5455
ERV-Kenv	130	0,2	39,29	102,43%	0,9763	0,4099	1,027
ERV-Kpol	137	0,3	38,45	100,28%	0,9972	0,502	0,5669
HIF1A	127	0,3	37,14	100,77%	0,9924	0,1514	0,5346
GLUT1	105	0,3	39,02	100,31%	0,9969	0,1489	0,3776
GATA3	82	0,2	37,27	101,13%	0,9888	0,228	0,333
IFNGR	135	0,3	36,85	100,09%	0,9991	0,1942	0,4246
PDL1	134	0,3	37,06	100,69%	0,9931	0,2418	0,3632
KRT5	78	0,1	37,66	100,35%	0,9965	0,2306	0,2387
KRT20	81	0,1	37,78	102,74%	0,9733	0,3043	0,394
RIPK3	93	0,1	38,97	105,32%	0,9495	0,2417	0,9389

3.1.1 Qualitative PCR

Die qualitative PCR zeigte für jedes analysierte Gen eine Einfachbande auf der Höhe der Amplikongröße. Jedes Primerpaar zeigte in der RT-Negativkontrolle nur eine Bande, die den Primerdimeren entsprach. ERV-Kenv und KRT20 wiesen diese Bande auch beim Template auf (Abb. 6).

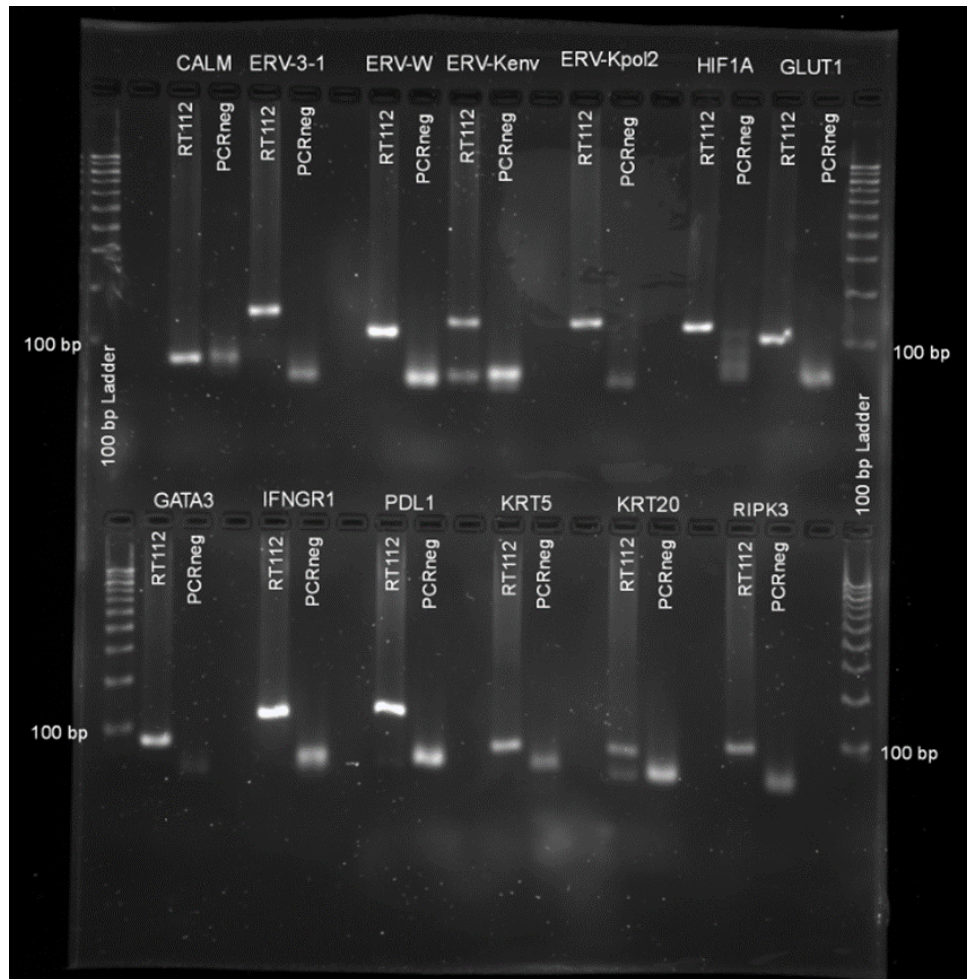


Abbildung 5: qualitative PCR

Die Abbildung zeigt die qualitative PCR zur Kontrolle der verwendeten Primerpaare. Die linke Spalte jedes Gens stellt die PCR in RT112 Zellen dar, die rechte Spalte ist die PCR negative Kontrolle mit RNase freiem Wasser. Jeweils zu den Seiten ist eine DNA-Leiter zur Kontrolle der Amplikonlängen

3.1.2 Verdünnungsreihe zur Effizienzbestimmung

Je nach Gen wurden unterschiedliche Verdünnungen erreicht, bevor es nicht mehr detektierbar war. Für die ERV, sowie PD-L1 und KRT20 betrug das eine Verdünnung von $1:10^3$. IFNGR und RIPK3 wurden bis zu einer $1:10^4$ Verdünnung detektiert, GATA3, HIF1A, GLUT1 und KRT5 zeigten bis zu einer Verdünnung von $1:10^5$ ein Signal.

Die Effizienzen der Primerpaare lagen zwischen 100,09 % (IFNGR) und 105,32 % (RIPK3). Es wurden Effizienzen von 90 - 110 % akzeptiert.

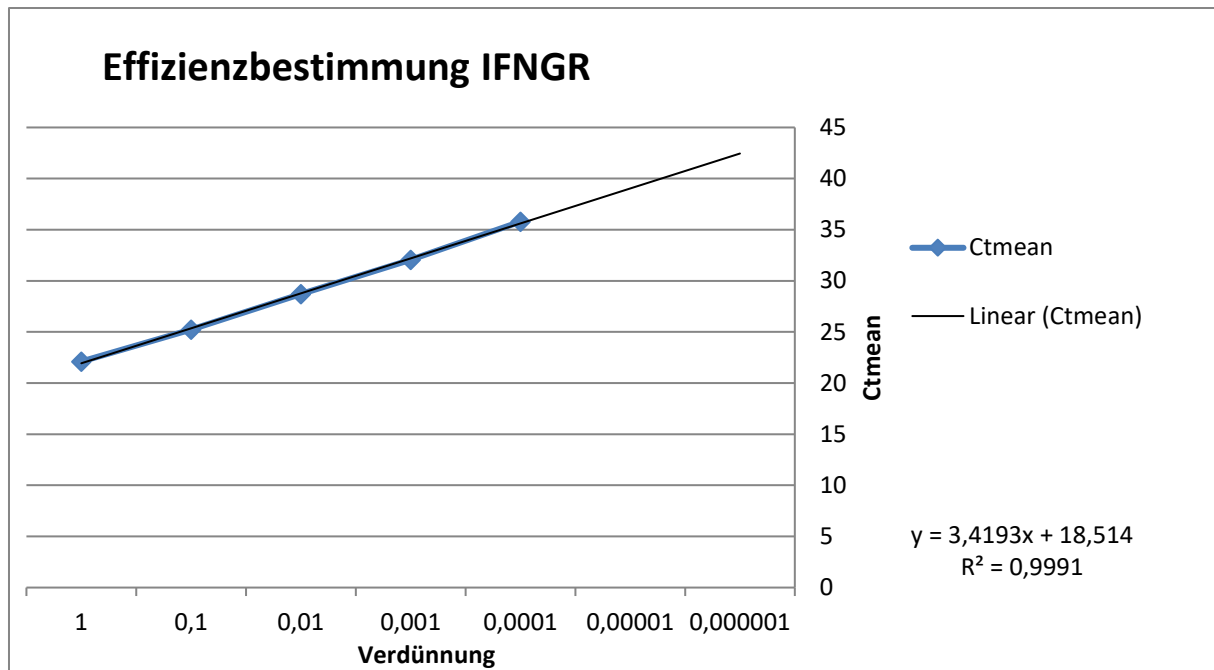


Abbildung 6: Effizienzbestimmung am Bsp. IFNGR

Die Effizienz der Primerpaare wurde anhand einer Verdünnungsreihe berechnet. Die Ct-Werte wurden logarithmisch aufgetragen und die Effizienz anhand der Steigung berechnet.

3.1.3 Detektionslimit

Für jedes Primerpaar wurde mit der größtmöglichen Verdünnung eine 10-fach Bestimmung durchgeführt, um das Detektionslimit zu ermitteln. Aus den Ct-Werten wurde der Median berechnet und als Detektionslimit festgelegt. Die Werte waren zwischen 36,85 (IFNGR1) und 39,29 (ERV-Kenv). Die Ct-Werte, die oberhalb des Detektionslimits lagen, wurden aus den Expressionsanalysen ausgeschlossen.

3.1.4 Intra- und Interassayvariation

Zur Ermittlung der Variation der Primerpaare wurde zum einem eine 10-fach Bestimmung (Intraassay) und zum anderen 5 Läufe mit einer Doppelbestimmung (Interassay) durchgeführt. Aus den Ct-Werten wurden jeweils der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet. Die folgenden Werte beziehen sich auf die Standardabweichungen.

Die mittlere Intraassayvariation betrug $SD = 0,271 \pm 0,104$. Die größte Variation zeigte ERV-Kpol mit $SD = \pm 0,502$, die Geringste hatte GLUT1 mit $SD = \pm 0,1489$.

Die Interassayvariation zeigte bei jedem Primerpaar einen größeren Wert als die Intraassayvariation. Sie belief sich im Mittel auf $SD = 0,533 \pm 0,24$. Die größte

Abweichung hatte hier ERV-Kenv mit $SD = \pm 1,027$, die Geringste zeigte KRT5 mit $SD = \pm 0,2387$.

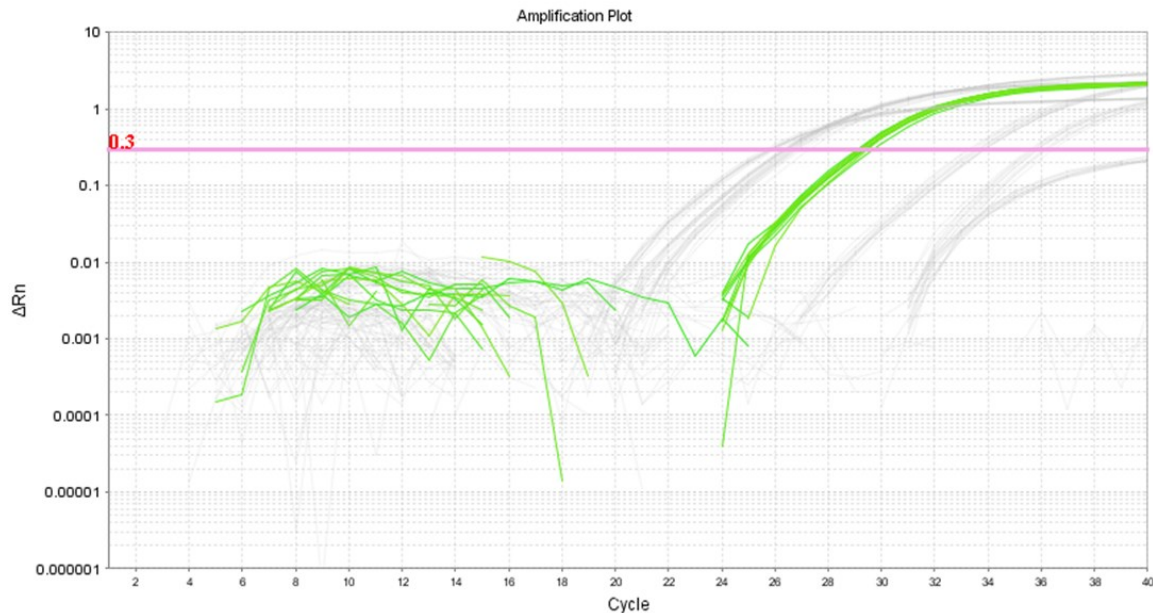


Abbildung 7: Amplification Plot am Bsp. IFNGR zur Bestimmung der Intraassayvariation. Die Intraassayvariation wurde mittels einer 10-fach Bestimmung der Primerpaare berechnet. In Grün hervorgehoben ist die Bestimmung des IFNGR. Die grauen Kurven sind den anderen in dieser PCR untersuchten Genen zugehörig.

3.2 Expressionsanalysen

Alle Expressionsanalysen des Hypoxieversuchs wurden bei einer 1:10 Verdünnung der jeweiligen cDNA durchgeführt.

3.2.1 Expression der verschiedenen Gene

Bei Betrachtung der Expression aller analysierten Gene in allen Zelllinien lagen die Ct-Werten zwischen 15,20 (KRT5) und 38,82 (RIPK3). Die SD variierten zwischen $\pm 0,515$ (CALM) und $\pm 3,356$ (KRT20). Die ERV wiesen mit einem mittlerem Ct-Wert von 30,30 eine niedrige Expression auf. Dabei wurde ERV-Kpol signifikant höher exprimiert als die restlichen ERV ($p < 0,0001$). ERV-Kenv zeigte die niedrigste Expressionsrate auf (Abb. 8). Alle ERV zeigten jedoch mit Standardabweichungen zwischen $SD = \pm 0,916$ (ERV-W) und $SD = \pm 1,239$ (ERV-Kenv) eine ähnlich konstante Expression über die drei Zelllinien.

Die molekularen Marker GATA3, KRT5 und KRT20 zeigten die stärksten Variationen in der Expression ($SD = \pm 1,993$ bis $\pm 3,356$).

CALM und GUS unterschieden sich deutlich in ihrer mittleren Expression und SD ($20,07 \pm SD = 0,515$ bei CALM vs. $24,51 \pm SD = 1,187$ bei GUS) (Abb. 8). Da die Expression von CALM über die Versuche konstanter war, wurde es in den folgenden Analysen als Referenzgen zur Normalisierung verwendet.

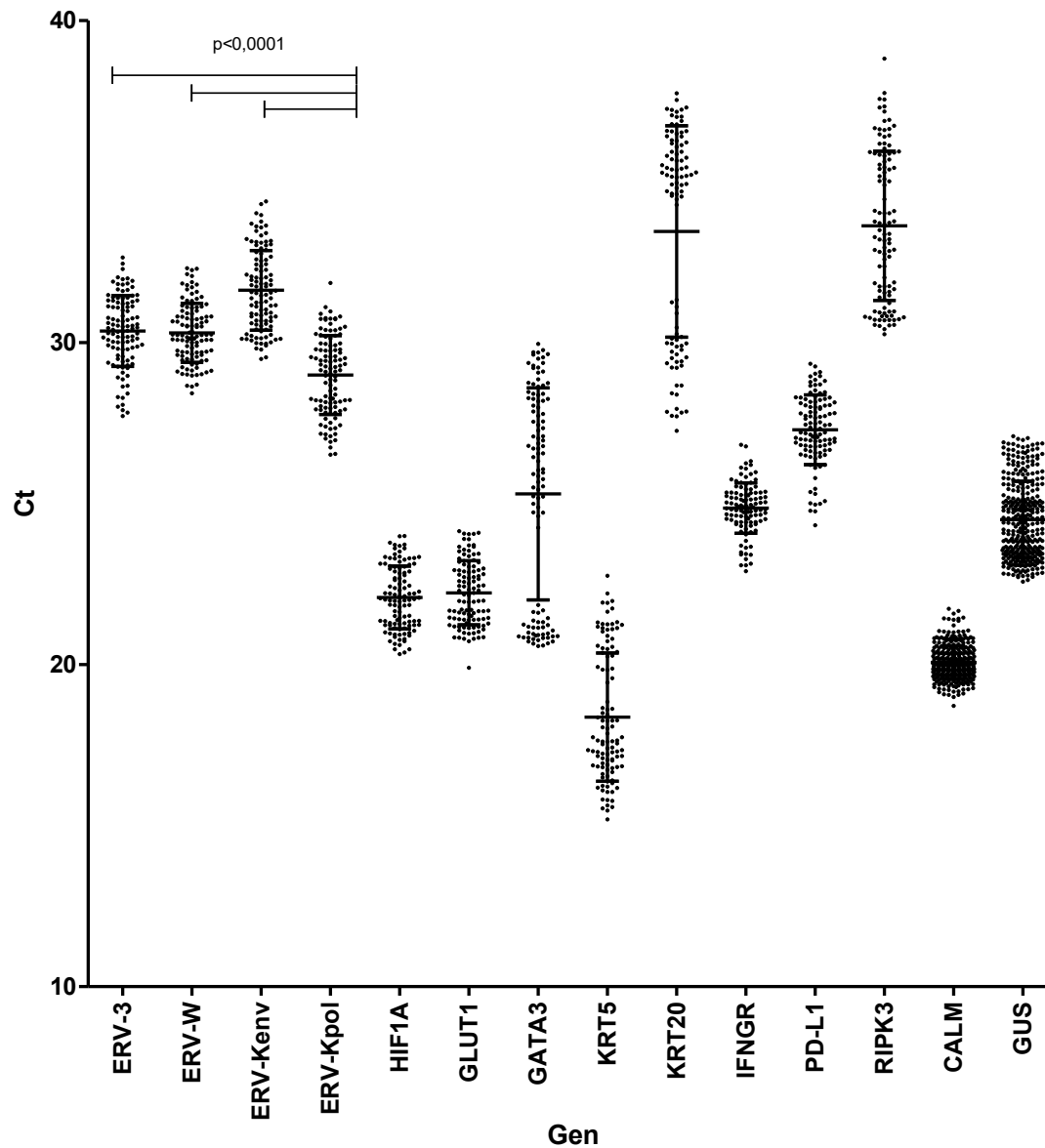


Abbildung 8: Expression aller Gene in allen untersuchten Zellen
Zu sehen sind die einzelnen Messwerte sowie MW \pm SD.
Unter den ERV zeigt ERV-Kpol das signifikant stärkste Expressionsmuster. Im Vergleich zu allen Genen wurde KRT5 um stärksten und RIPK3 am schwächsten exprimiert. Die SD von GUS war mit $SD = \pm 1,19$ höher als die von CALM mit $SD = \pm 0,52$.

3.2.2 Expression in den verschiedenen Zelllinien

Zur Analyse der Expressionen in den verschiedenen Zelllinien wurden die Werte mit der in 3.4.1. beschriebenen $40\text{-}\Delta\text{Ct}$ Methode normalisiert.

ERV

Bei Betrachtung der ERV war zu sehen, dass alle ERV sowohl in SCaBER als auch in der benignen Zelllinie UROtsa eine signifikant höhere Expression aufwiesen als in RT112 ($p < 0,0001$, Abb. 9). Wurde SCaBER mit UROtsa verglichen, konnte gezeigt werden, dass ERV-3 in UROtsa ($p = 0,0091$) und ERV-Kenv ($p = 0,0038$), sowie ERV-Kpol ($p < 0,0001$) in SCaBER höher exprimiert wurden. In ERV-W war kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Zelllinien festzustellen.

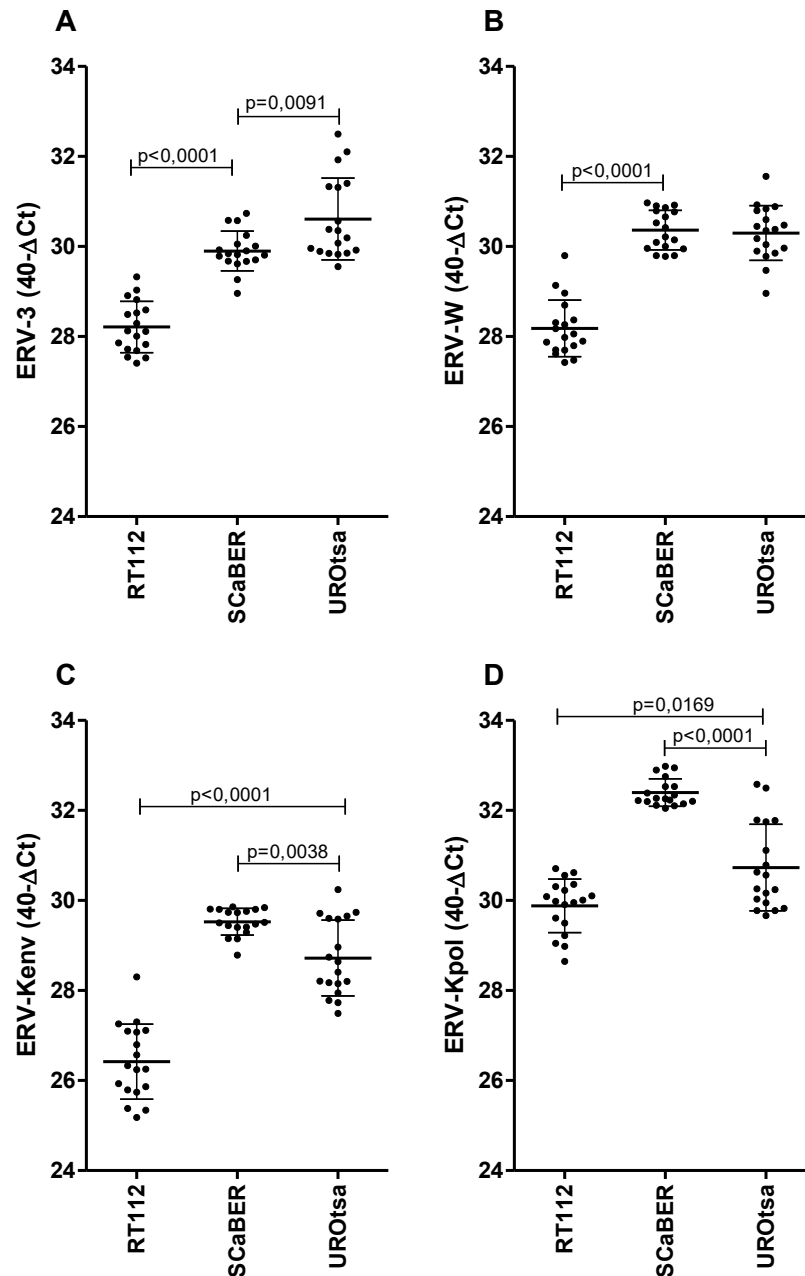


Abbildung 9: Vergleich der Genexpression von ERV-3 (A), ERV-W (B), ERV-Kenv (C) und ERV-Kpol (D) unter normalen Bedingungen in den Blasenzelllinien RT112, SCaBER und UROtsa. Zu sehen sind die einzelnen Messwerte sowie MW \pm SD. Alle ERV zeigten in RT112 geringere Expressionsmuster als in SCaBER und UROtsa. Diese zwei Zelllinien zeigten Unterschiede in der Expression der ERV. A: ERV-3 wies eine signifikant höhere Expression in UROtsa als in SCaBER auf. B: Zwischen den zwei Zelllinien war kein Unterschied zu sehen. C/D: In SCaBER zeigten ERV-Kenv und ERV-Kpol stärkere Expressionsmuster als in UROtsa.

Hypoxiemarker

HIF1A und GLUT1 zeigten in den malignen Zelllinien eine signifikant stärkere Expression ($p < 0,0001$). Zwischen RT112 und SCaBER war dabei bei HIF1A kein

signifikanter Unterschied zu sehen, während GLUT1 in RT112 stärker exprimiert wurde (Abb. 10).

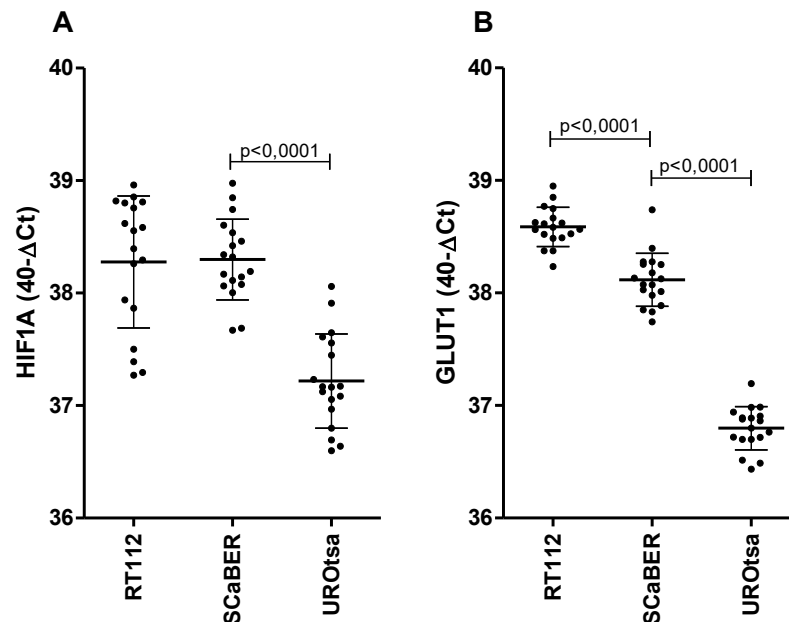


Abbildung 10: Vergleich der Genexpression von HIF1A (A) und GLUT1 (B) unter normalen Bedingungen in den Blasenzelllinien RT112, SCaBER und UROtsa. Zu sehen sind die einzelnen Messwerte sowie MW \pm SD.

HIF1A und GLUT1 zeigten beide ein stärkeres Expressionsmuster in den malignen RT112 und SCaBER Zellen als in UROtsa. Zwischen den malignen Zelllinien zeigte HIF1A keine Unterschiede, GLUT1 wurde in RT112 stärker exprimiert.

Molekulare Subtypen

Die Expression der molekularen Marker stimmte mit den in der Literatur genannten Zuordnungen der Zelllinien überein (Abb. 11). So war die Expression der luminalen Marker GATA3 und KRT20 in RT112 signifikant höher als in den anderen Zelllinien ($p < 0,0001$, Abb. 11A + B). Ebenfalls war zu sehen, dass beide Marker in UROtsa höher exprimiert wurden als in der basalen Zelllinie SCaBER (GATA3: $p < 0,0001$; KRT20: $p = 0,002$). Die Expression von KRT20 lag in den SCaBER Zellen nahe dem Detektionslimit, sodass in dieser Zelllinie keine verlässlichen Aussagen zu dem Gen getroffen werden konnten. Der basale Marker KRT5 war dem molekularen Subtyp entsprechend in RT112 am geringsten exprimiert (Abb. 11C). Interessanterweise zeigte UROtsa jedoch eine höhere Expression des Markers auf als SCaBER ($p = 0,0142$).

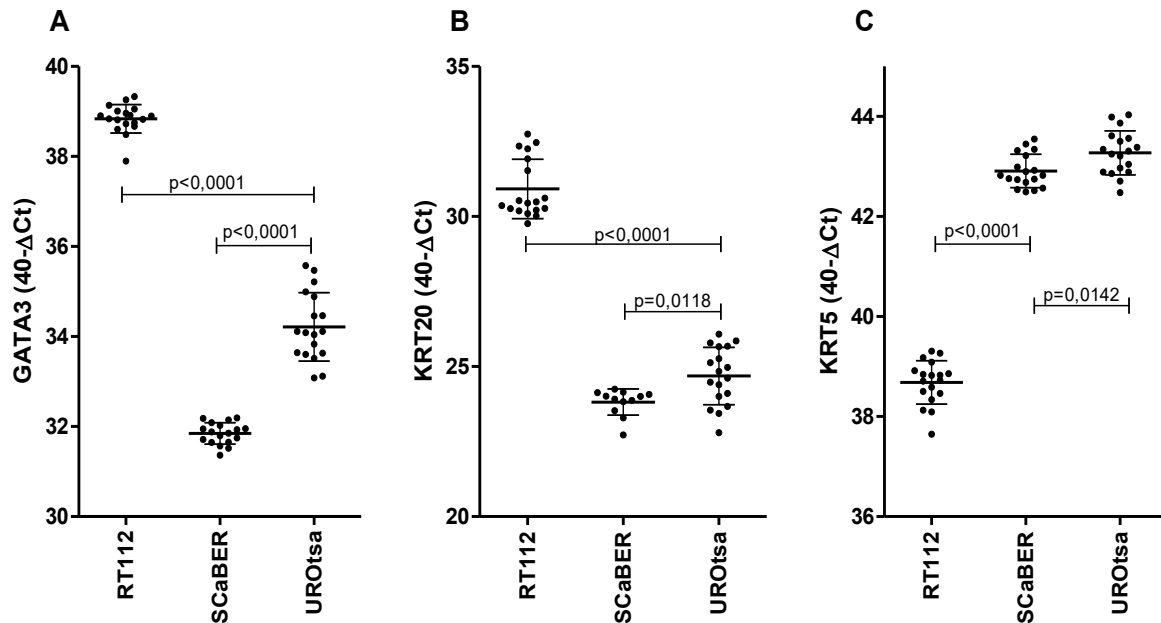


Abbildung 11: Vergleich der Genexpression von GATA3 (A), KRT20 (B) und KRT 5 (C) unter normalen Bedingungen in den Blasenzelllinien RT112, SCaBER und UROtsa. Zu sehen sind die einzelnen Messwerte sowie MW \pm SD.

Die Marker für den luminalen Subtyp GATA3 und KRT20 wiesen in RT112 ein stärkeres Expressionsmuster auf als in den anderen Zelllinien. Beide Marker zeigten in UROtsa-Zellen ebenfalls eine stärkere Expression als in SCaBER Zellen (A und B). KRT5 wies in RT112 die geringste Expression auf. In UROtsa zeigte der Marker eine Tendenz zum höheren Expressionsmuster als in SCaBER (C).

Immungene

In UROtsa zeigte IFNGR1 eine signifikant höhere Expression als in RT112 ($p < 0,0001$) und SCaBER ($p = 0,0119$). Die Expression war in SCaBER auch höher als in RT112, jedoch war der Unterschied nicht signifikant ($p = 0,0721$, Abb. 12A).

Im Gegensatz dazu zeigte PD-L1 sowohl eine erniedrigte Expression in der benignen Zelllinie als auch eine signifikant höhere Expression in SCaBER im Vergleich zu RT112 ($p = 0,0333$, Abb. 12B).

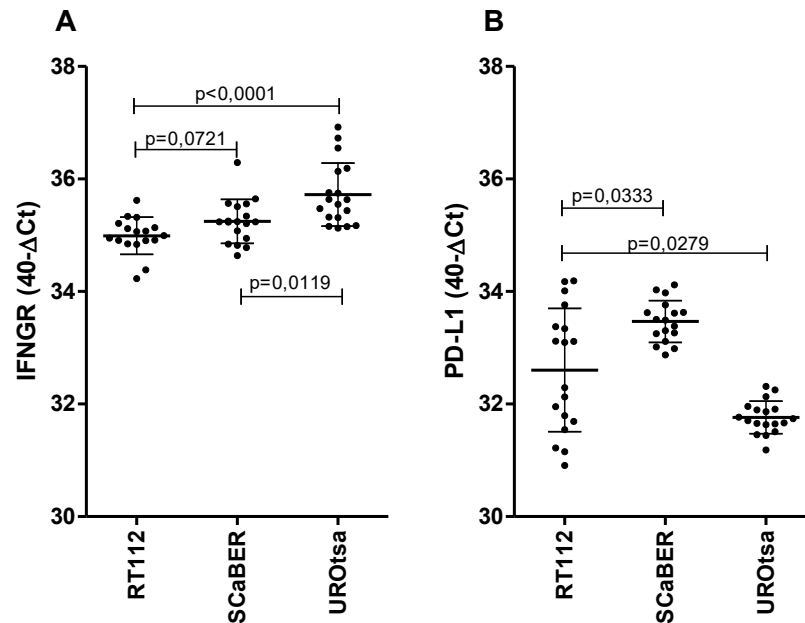


Abbildung 12: Vergleich der Genexpression von IFNGR (A) und PD-L1 (B) unter normalen Bedingungen in den Blasenzelllinien RT112, SCaBER und UROtsa. Zu sehen sind die einzelnen Messwerte sowie MW ± SD.

A: IFNGR wies in UROtsa Zellen das stärkste Expressionsmuster auf. In SCaBER hatte das Gen eine Tendenz zur stärkeren Expression als in RT112, der Unterschied war jedoch nicht signifikant. B: PD-L1 zeigte in SCaBER ein signifikant höheres Expressionsmuster als in RT112 und UROtsa. Die Expression in UROtsa war schwächer als in RT112.

RIPK3

Der Marker für den programmierten Zelltod, RIPK3, zeigte in allen Zelllinien signifikante Unterschiede ($p < 0,0001$). Die höchste Expression war in RT112 zu sehen, die geringste in SCaBER (Abb. 13).

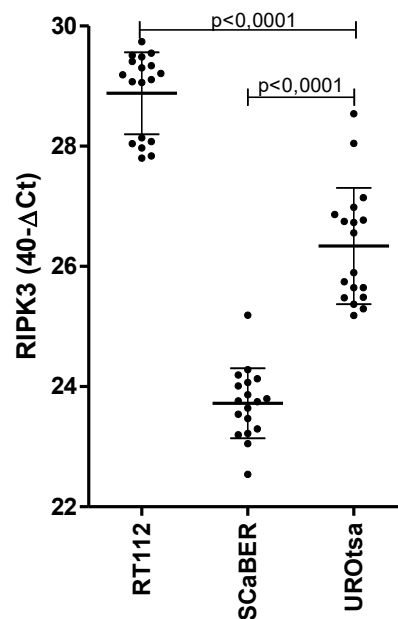


Abbildung 13: Vergleich der Genexpression von RIPK3 unter normalen Bedingungen in den Blasenzelllinien RT112, SCaBER und UROtsa. Zu sehen sind die einzelnen Messwerte sowie MW ± SD.

Das Expressionsmuster von RIPK3 war in allen Zelllinien signifikant unterschiedlich. Die stärkste Expression zeigte sich in RT112, die schwächste in SCaBER.

3.2.3 Veränderung der Expression unter Hypoxie

ERV

Beim Vergleich der Expression unter Norm- und Hypoxie fiel auf, dass die Zelllinien unterschiedlich auf den Sauerstoffmangel reagierten.

Unter Hypoxie schienen SCaBER Zellen die Expression von ERV-3 zu steigern ($p = 0,1329$), während bei RT112 und UROtsa Zellen keine Änderung zu sehen war (Abb. 14A). Im Gegensatz dazu wurde ERV-W in RT112 verstärkt exprimiert ($p = 0,0155$) und in UROtsa herunterreguliert ($p = 0,0556$). In SCaBER war kein Unterschied zwischen den Sauerstoffkonzentrationen zu sehen (Abb. 14B).

Sowohl ERV-Kenv als auch ERV-Kpol zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Norm- und Hypoxie. RT112 zeigte eine Steigerung von ERV-Kenv unter Hypoxie, diese war aber nicht signifikant ($p = 0,0847$) (Abb. 14C + D).

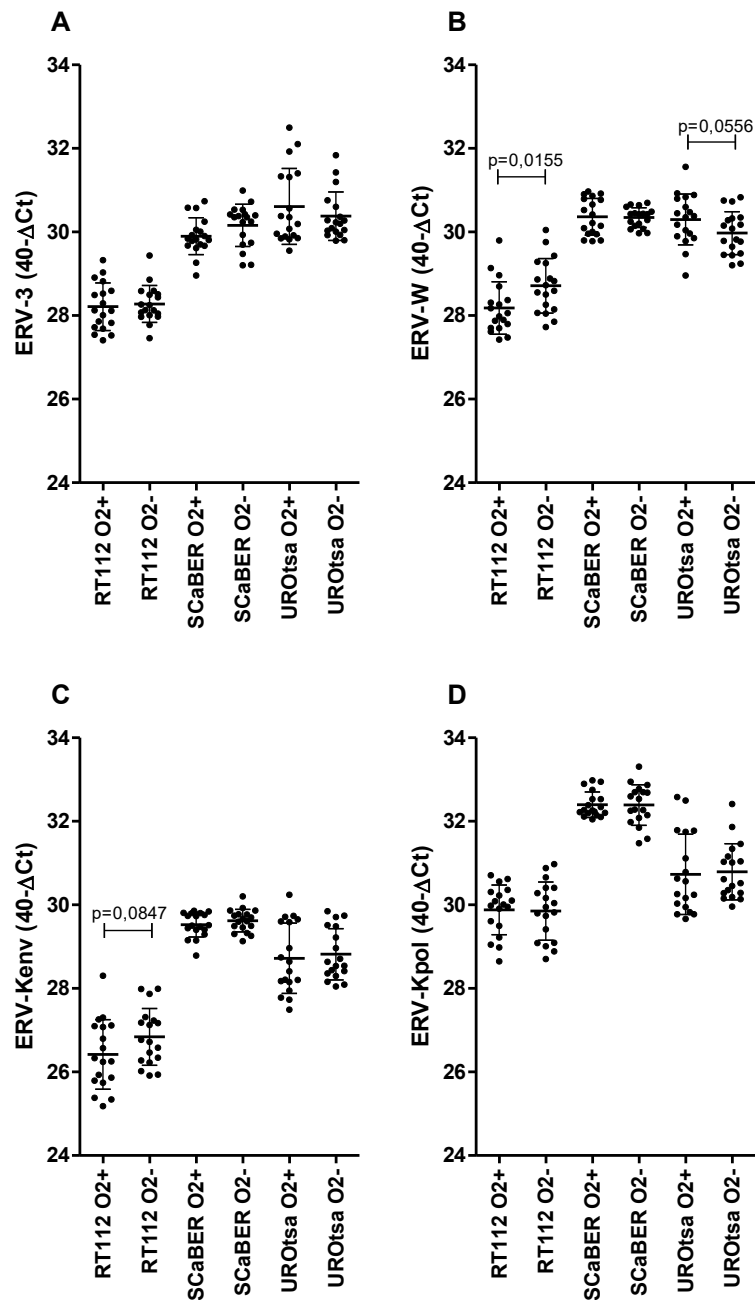


Abbildung 14: Vergleich der Genexpression von ERV-3 (A), ERV-W (B), ERV-Kenv (C) und ERV-Kpol (D) unter normalen (O₂⁺) und hypoxischen (O₂⁻) Bedingungen in den Blasenzelllinien RT112, SCaBER und UROtsa. Zu sehen sind die einzelnen Messwerte sowie MW ± SD.

A: ERV-3 zeigte in SCaBER-Zellen unter hypoxischen Bedingungen eine Tendenz zur Expressionssteigerung. B: In Hypoxie wurde ERV-W in RT112 verstärkt und in UROtsa vermindert exprimiert. C: ERV-Kenv zeigte in RT112 verstärkte Expression unter Hypoxie. D: Zwischen den Kontroll- und Versuchszellen war kein Unterschied in der Expression von ERV-Kpol zu sehen.

Hypoxiemarker

Auch die Marker der Hypoxie HIF1A und GLUT1 unterschieden sich zwischen den Zelllinien in ihrer Expression. HIF1A wurde durch die Hypoxie in RT112 verstärkt exprimiert, blieb in SCaBER jedoch unverändert (Abb. 15A). GLUT1 hingegen wurde

in SCaBER stärker exprimiert, während es in RT112 keine Veränderung zeigte (Abb. 15B). In UROtsa waren beide Marker gleichbleibend.

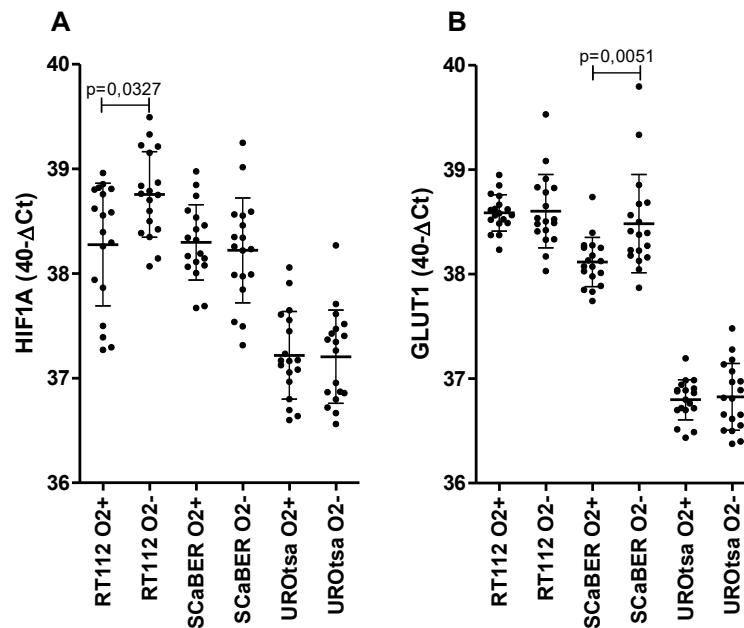


Abbildung 15: Vergleich der Genexpression von HIF1A (A) und GLUT1 (B) unter normalen (O₂⁺) und hypoxischen (O₂⁻) Bedingungen in den Blasenzelllinien RT112, SCaBER und UROtsa. Zu sehen sind die einzelnen Messwerte sowie MW ± SD. A: HIF1A zeigte unter Hypoxie eine signifikante Steigerung des Expressionsmusters in RT112 Zellen. GLUT1 zeigte ähnliche Veränderungen in SCaBER-Zellen (B).

Molekulare Subtypen

Die Marker zur Unterscheidung des molekularen Subtyps wurden durch den Sauerstoffmangel unterschiedlich beeinflusst. RT112 zeigte unter Hypoxie einen Rückgang der Expression von GATA3 und KRT20 (GATA3: $p = 0,0642$; KRT20: $p = 0,0302$) und eine Steigerung von KRT5 ($p < 0,0001$, Abb. 16).

In SCaBER ($p = 0,0480$) und UROtsa ($p = 0,0382$) wurde GATA3 unter Hypoxie signifikant vermindert exprimiert (Abb. 16A). KRT5 und KRT20 hingegen zeigten bei beiden Zelllinien keinen Unterschied (Abb. 16 B + C).

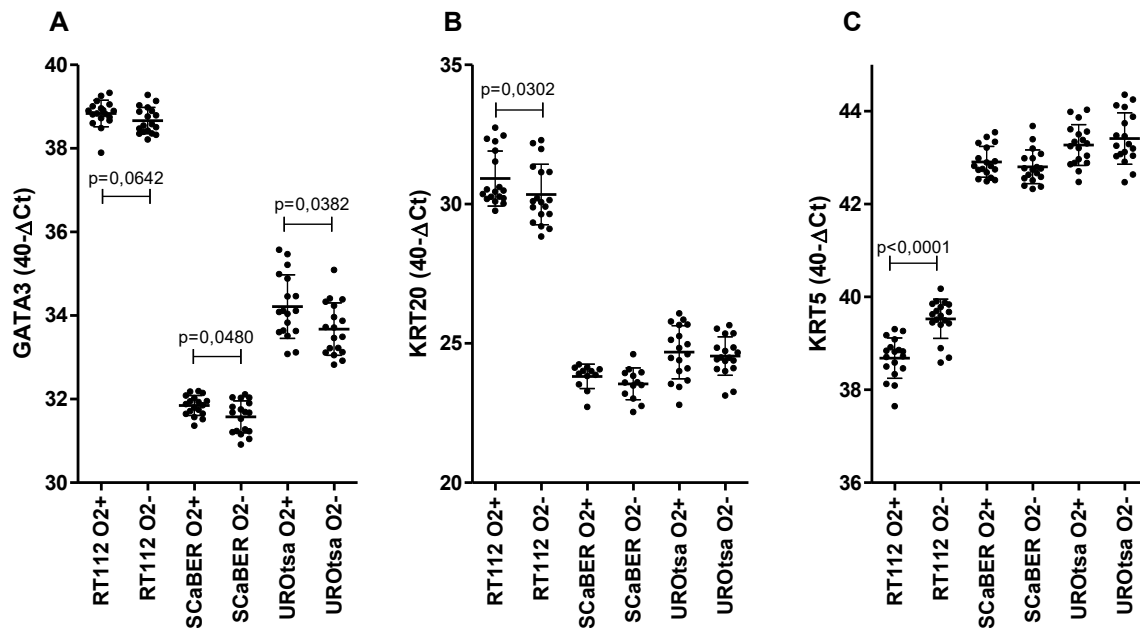


Abbildung 16: Vergleich der Genexpression von GATA3 (A), KRT20 (B) und KRT5 (C) unter normalen (O₂⁺) und hypoxischen (O₂⁻) Bedingungen in den Blasenzelllinien RT112, SCaBER und UROtsa. Zu sehen sind die einzelnen Messwerte sowie MW ± SD.

A: GATA3 zeigte in allen Zelllinien unter hypoxischen Bedingungen ein vermindertes Expressionsmuster. KRT20 wies in hypoxisch kultivierten RT112 Zellen eine signifikant verminderte Expression auf (B). C: In RT112 wies KRT5 unter hypoxischen Bedingungen eine verstärkte Expression auf.

Immungene

Das im Vergleich zu den benignen UROtsa Zellen schon geringere Expressionsmuster vom IFNGR schien unter hypoxischen Bedingungen sowohl in RT112 als auch in SCaBER weiter vermindert, der Unterschied war jedoch nicht signifikant (RT112: $p = 0,1419$; SCaBER: $p = 0,0905$) (Abb. 17A). In UROtsa war sie unverändert. PD-L1 zeigte im Gegensatz dazu unter hypoxischen Bedingungen eine signifikante Steigerung in UROtsa ($p = 0,0020$), während das Gen in RT112 und SCaBER keine veränderte Expression aufzeigte (Abb. 17B).

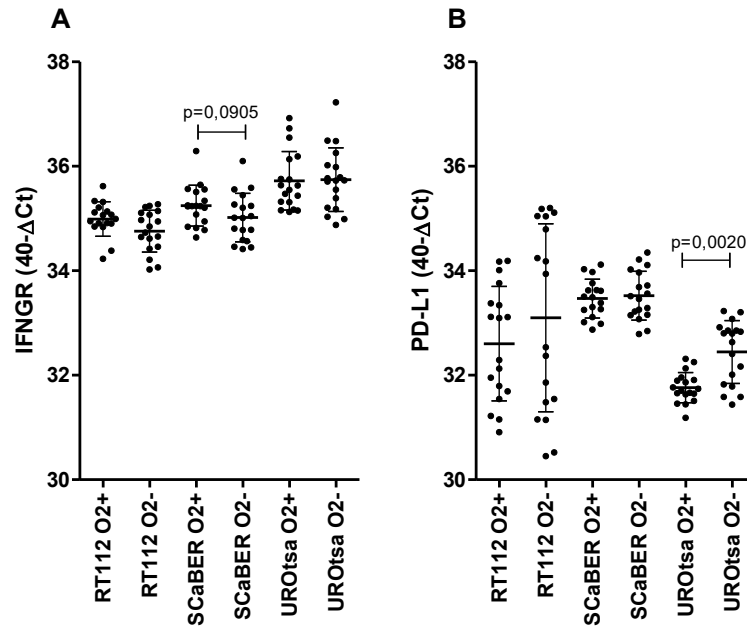


Abbildung 17: Vergleich der Genexpression von IFNGR (A) und PD-L1 (B) unter normalen (O₂⁺) und hypoxischen (O₂⁻) Bedingungen in den Blasenzelllinien RT112, SCaBER und UROtsa. Zu sehen sind die einzelnen Messwerte sowie MW ± SD. A: Während IFNGR in RT112 und SCaBER unter hypoxischen Bedingungen eine Tendenz zur verminderten Expression zeigte, war keine Veränderung in UROtsa-Zellen zu sehen. In dieser Zelllinie zeigte PD-L1 in den Versuchszellen eine Expressionssteigerung (B).

RIPK3

Bezogen auf RIPK3 war der programmierte Zelltod unter Hypoxie in SCaBER Zellen gesteigert ($p < 0,0001$). In RT112 und UROtsa blieb die Expression auf dem gleichen Level (Abb. 18).

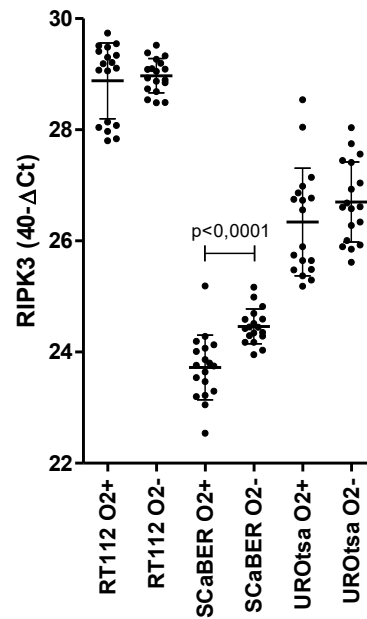


Abbildung 18: Vergleich der Genexpression von RIPK3 unter normalen (O₂⁺) und hypoxischen (O₂⁻) Bedingungen in den Blasenzelllinien RT112, SCaBER und UROtsa. Zu sehen sind die einzelnen Messwerte sowie MW ± SD. RIPK3 wies nur in SCaBER eine verstärkte Expression unter Hypoxie auf.

3.2.4 Beobachtung der Expressionsveränderung im Zeitverlauf

ERV

In den RT112 Zellen fiel auf, dass unter hypoxischen Bedingungen alle ERV bis auf ERV-Kpol im Zeitverlauf eine Tendenz zur Expressionssteigerung aufwiesen (Abb. 19A-D).

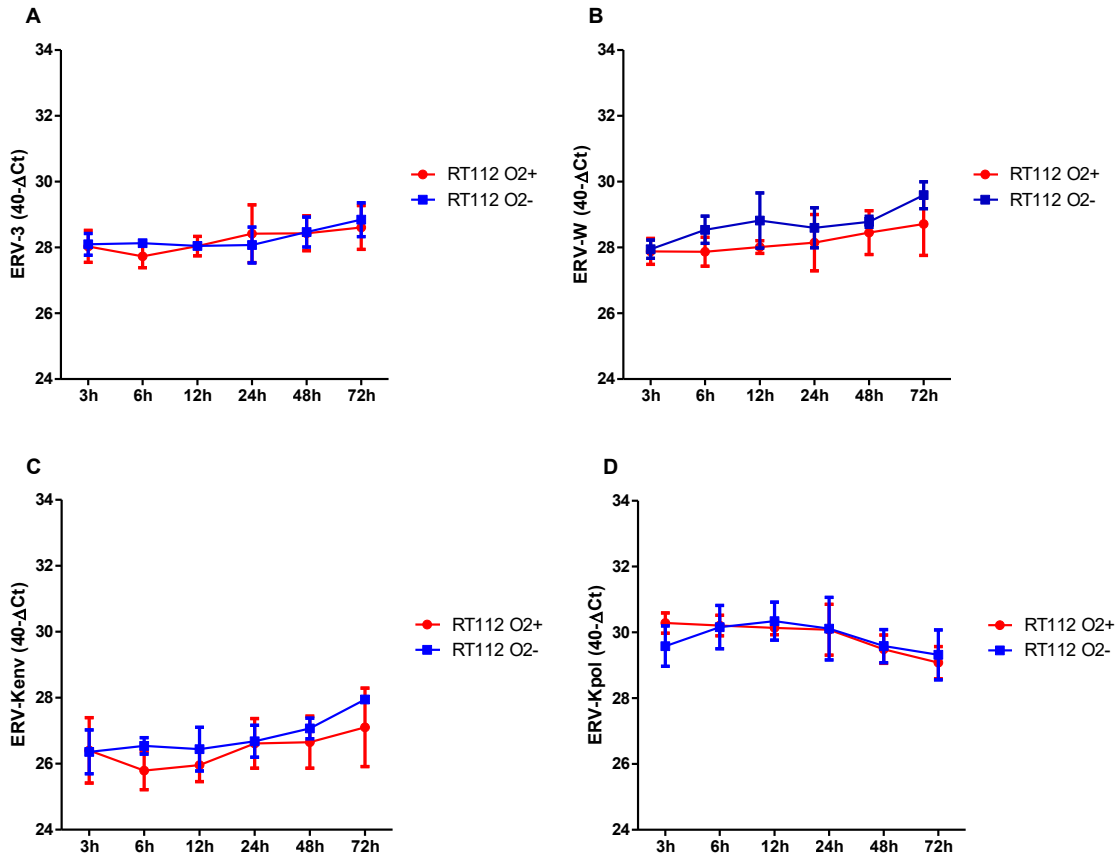


Abbildung 19: Zeitlicher Verlauf der Genexpression von ERV-3 (A), ERV-W (B), ERV-Kenv (C) und ERV-Kpol (D) unter normalen (O₂⁺) und hypoxischen (O₂⁻) Bedingungen in RT112 Zellen, aufgetragen als MW ± SD
 Außer ERV-Kpol zeigten alle ERV in RT112 Zellen unter hypoxischen Bedingungen eine Tendenz zur Expressionssteigerung nach Reoxygenierung.

Besonders bei Betrachtung der Expressionsunterschiede zwischen 24 h und 72 h nach Reoxygenierung wurde dies deutlich (Hypoxie: p = 0,1 vs. Normoxie: p = 1,0 (ERV3) und p = 0,7 (ERV-Kenv), Abb. 20)).

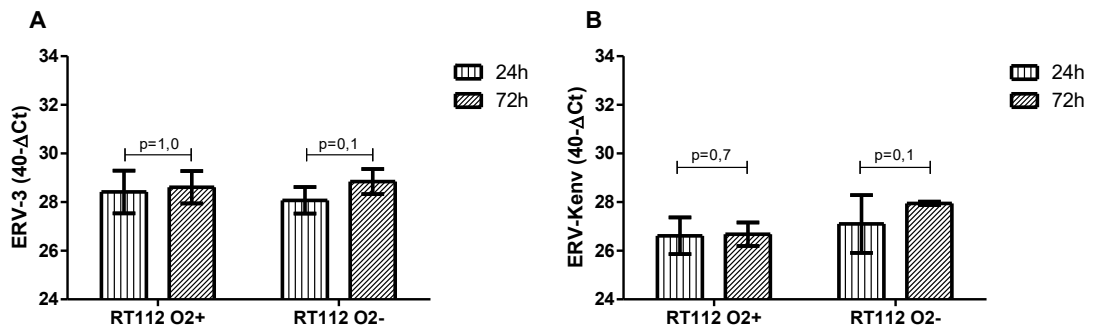


Abbildung 20: Dynamik der Genexpression von ERV-3 (A), und ERV-Kenv (B) unter normalen (O₂⁺) und hypoxischen (O₂⁻) Bedingungen in RT112 Zellen bei 24 und 72 h nach Reoxygenierung, aufgetragen als MW ± SD
 ERV-3 und ERV-Kenv zeigten beim Zeitvergleich unter hypoxischen Bedingungen eine gesteigerte Expression.

In den SCaBER Zellen waren bei Beobachtung des Zeitverlaufs bei den ERV keine Unterschiede zu sehen. Die Expression von ERV-Kpol stieg in den Zellen sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen an ($p = 0,1$), die Kurven verliefen jedoch nahezu parallel (Daten nicht gezeigt).

Auch in den UROtsa Zellen bot die Inbezugnahme der Zeit bei den ERV keine Unterschiede. Alle ERV schienen im Zeitverlauf sowohl in Normoxie als auch in Hypoxie eine Expressionssteigerung zu zeigen (Abb. 21). Bei 72 h nach Reoxygenierung wirkte diese unter Hypoxie weniger ausgeprägt als bei normalen Bedingungen, jedoch war diese Tendenz nur bei ERV-3 und ERV-W im Signifikanztest nach Mann-Whitney ersichtlich ($p = 0,1$). Zu den früheren Auswertungszeitpunkten war kein Unterschied zwischen den hypoxischen und den normoxischen Zellen zu sehen.

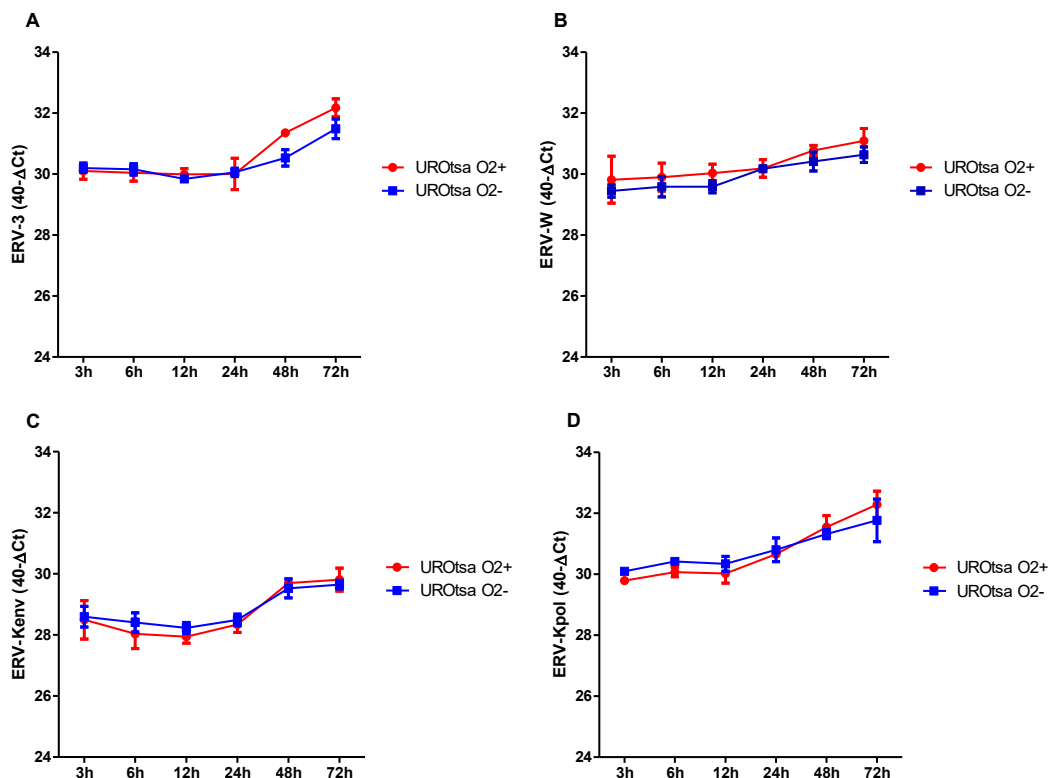


Abbildung 21: Zeitlicher Verlauf der Genexpression von ERV-3 (A), ERV-W (B), ERV-Kenv (C) und ERV-Kpol (D) unter normalen (O₂⁺) und hypoxischen (O₂⁻) Bedingungen in UROtsa Zellen, aufgetragen als MW ± SD
In UROtsa zeigten alle ERV in den Kontroll- und Versuchszellen über die Zeit einen Anstieg der Expressionsmuster.

Hypoxiemarker

In RT112 nahm die Expression von HIF1A unter Hypoxie bis 12 h nach Reoxygenierung ab, stieg im weiteren Verlauf jedoch wieder deutlich an. Die

Kontrollzellen zeigten einen ähnlichen, aber weniger starken Verlauf (Abb. 22A). Bei GLUT1 war in der Zelllinie über die Zeit keine Veränderung zu sehen.

Im Gegensatz dazu war wie zuvor beschrieben in SCaBER unter Hypoxie eine Änderung der GLUT1 Expression zu sehen. Zu Beginn der Analysen zeigten die hypoxischen Zellen eine verstärkte Expression ($p = 0,1$), die sich im Zeitverlauf der Expression der Kontrollzellen anpasste (Abb. 22B + C).

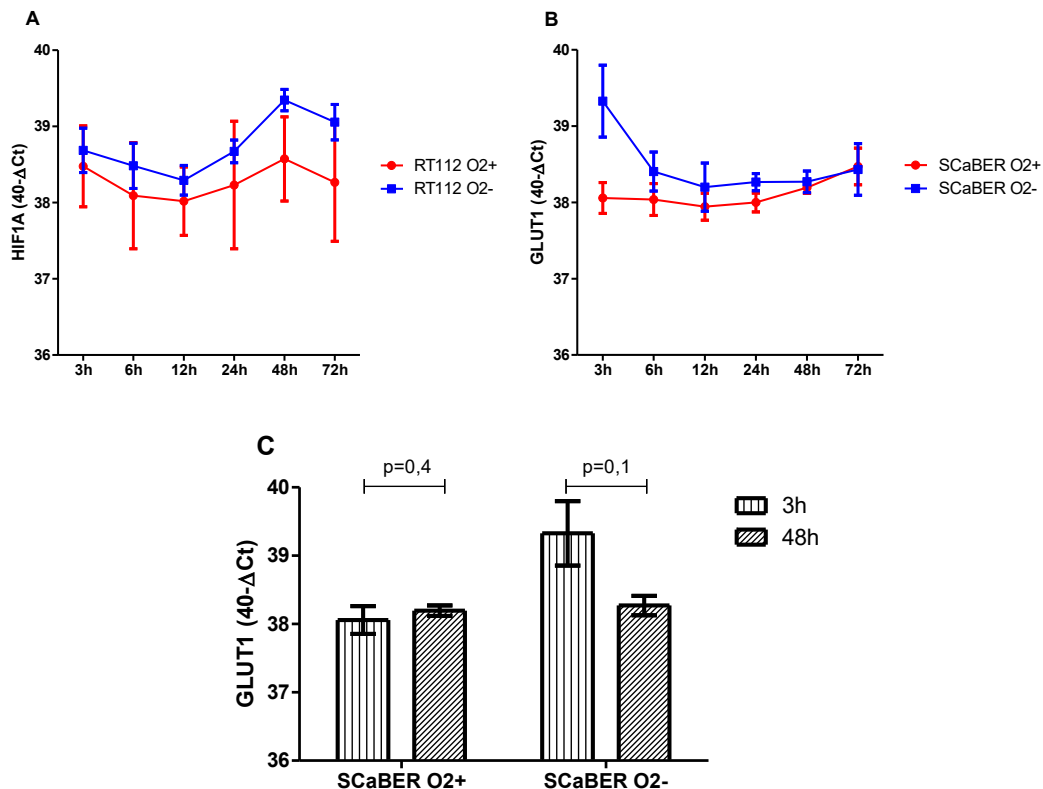


Abbildung 22: Dynamik der Genexpression von HIF1A in RT112 Zellen (A) und GLUT1 in SCaBER Zellen (B+C) unter normalen (O₂⁺) und hypoxischen (O₂⁻) Bedingungen in Abhängigkeit des Zeitpunktes nach Reoxygenierung, aufgetragen als MW ± SD

A: HIF1A zeigte in RT112-Zellen im Zeitverlauf zuerst einen Abfall, dann eine Steigerung des Expressionsmusters. B: In hypoxischen SCaBER-Zellen wies GLUT1 zu Beginn der Analysen ein stärkeres Expressionsmuster auf als nach 48h. In den Kontrollzellen war zwischen den Zeitpunkten kein signifikanter Unterschied zu sehen (C).

Molekulare Subtypen

Bei Betrachtung des zeitlichen Verlaufs zeigte die Expression von KRT5 in keiner der Zelllinien eine signifikante Veränderung. In RT112 tendierte KRT20 im Zeitverlauf zu steigen, jedoch verliefen die Kurven der hypoxisch und normoxisch kultivierten Zellen nahezu parallel (Abb. 23A).

GATA3 zeigte in UROtsa unter Hypoxie im Zeitverlauf eine Zunahme der Expressionsminderung. Zu Beginn der Analysen, insbesondere bei 6 h nach Reoxygenierung war kein Unterschied zwischen den Zellen unter hypoxischen, und denen unter Normalbedingungen zu sehen. Die Expression stieg über die Zeit jedoch bei beiden an (Abb. 23C). In den malignen Zelllinien tendierte das Gen ebenfalls zu einer verminderten Expression unter Hypoxie (Abb. 23B).

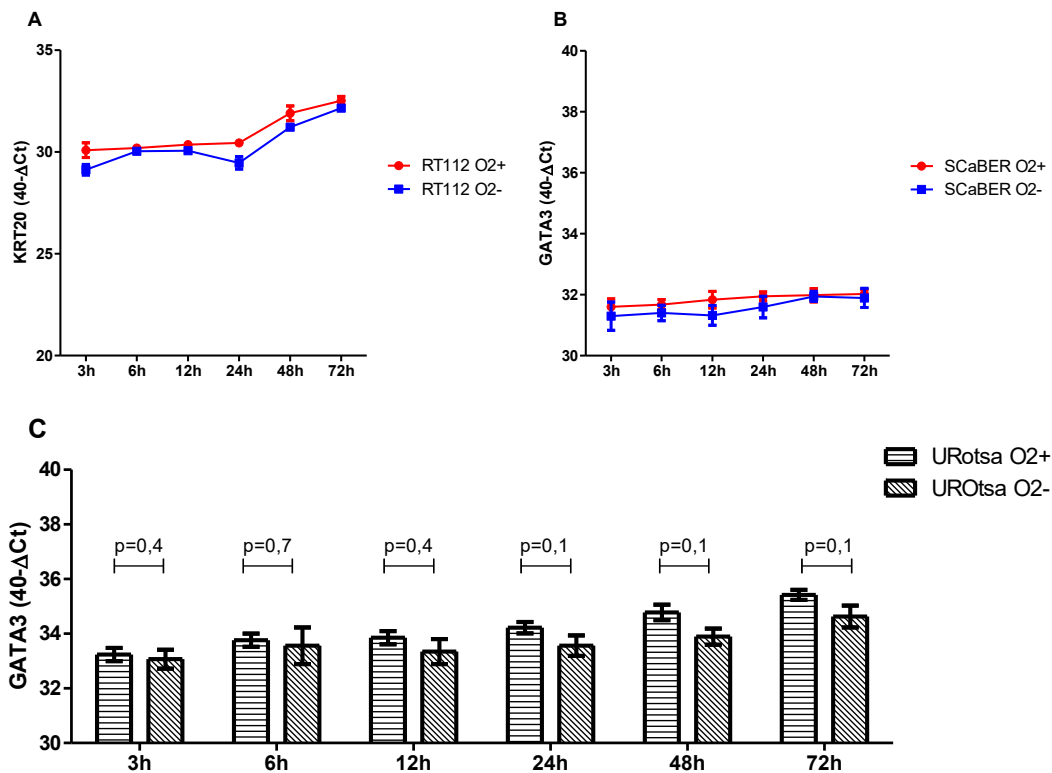


Abbildung 23 Zeitlicher Verlauf der Genexpression von KRT20 in RT112 Zellen (A) und GATA3 in SCaBER (B) und UROtsa (C) Zellen unter normalen (O₂+) und hypoxischen (O₂-) Bedingungen, aufgetragen als MW ± SD

A: KRT20 wies in Versuchs- und Kontrollzellen der Zelllinie RT112 im Zeitverlauf eine Expressionssteigerung auf. GATA3 zeigte unter hypoxischen Bedingungen in UROtsa und SCaBER Zellen eine Tendenz zur verminderten Expression (B, C).

PD-L1

Bei Betrachtung von PD-L1 war zu Beginn der Analysen eine vermehrte Expression in den hypoxisch kultivierten RT112 Zellen zu sehen. Diese nahm über die Zeit ab und glich sich der Expression in den Kontrollzellen an (Abb. 24A).

Auch in UROtsa waren bei dem Gen Unterschiede abhängig von den Kultivierungsbedingungen zu sehen. Während die Kontrollzellen das Gen im Zeitverlauf unverändert exprimierten, sah man bei den Zellen unter hypoxischen Bedingungen zu Beginn der Analyse eine Tendenz zur verstärkten Expression ($p =$

0,1, Abb. 24B). Diese nahm stetig ab, bis die Expression sich der in den Kontrollen angleich.

In SCaBER Zellen sah man sowohl in Norm- als auch in Hypoxie im zeitlichen Verlauf einen schwachen Rückgang der Genexpression, zwischen den Kultivierungsbedingungen zeigte sich jedoch kein Unterschied (Abb. 24C).

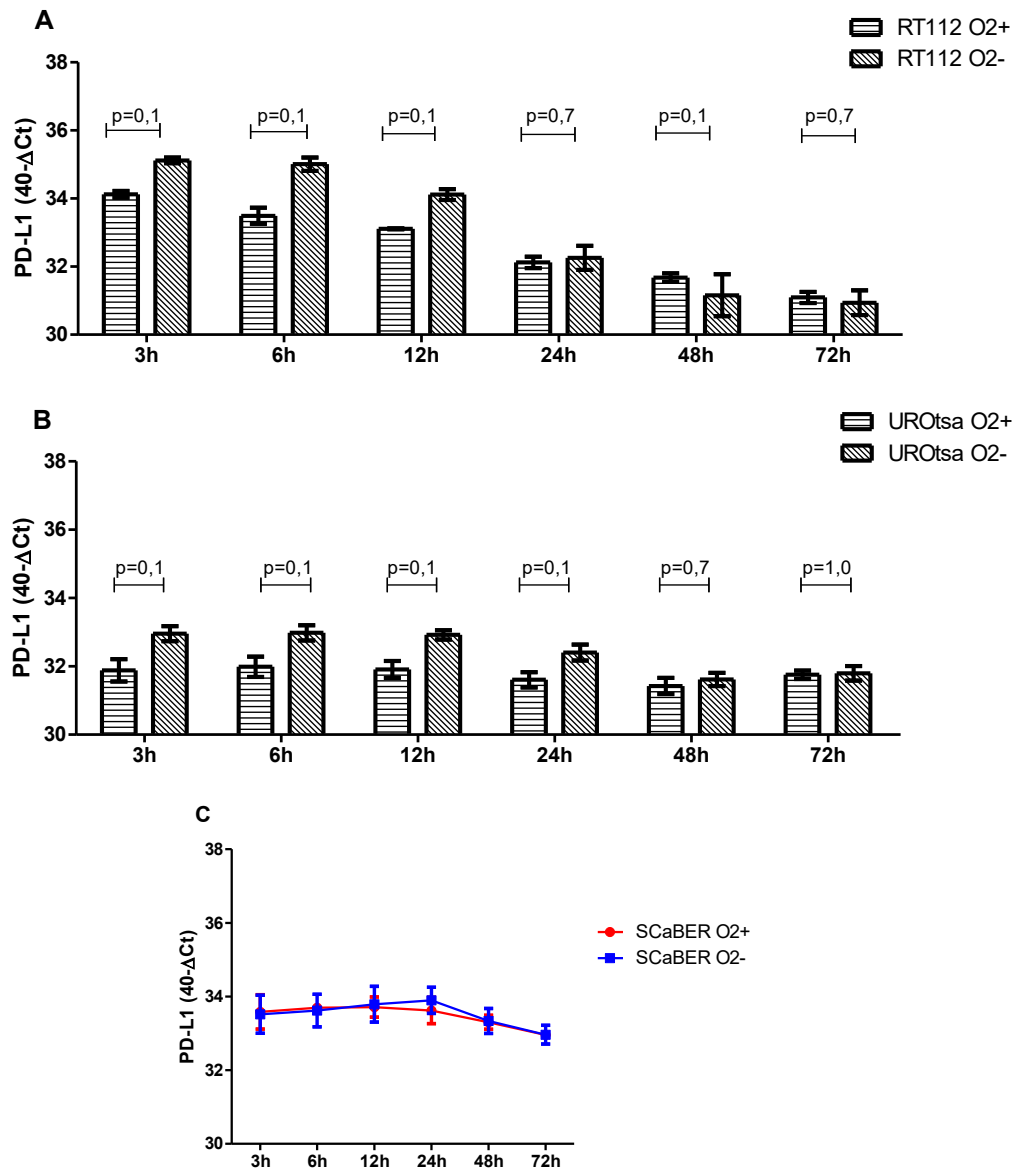


Abbildung 24: Zeitlicher Verlauf der Genexpression von PD-L1 in RT112 Zellen (A), UROtsa Zellen (B) und SCaBER Zellen (C) unter normoxischen (O₂⁺) und hypoxischen (O₂⁻) Bedingungen, aufgetragen als MW ± SD

PD-L1 wies unter hypoxischen Bedingungen in RT112 und UROtsa eine verstärkte Expression auf, welche sich im Zeitverlauf den Kontrollzellen angleich (A, B). In SCaBER zeigte das Gen in Norm- und Hypoxie eine parallele Expressionsminderung (C).

RIPK3

RIPK3 zeigte in hypoxischen SCaBER Zellen eine Tendenz zur verstärkten Expression ($p = 0,1$). Diese wies einen Peak zwischen 6 und 12 h nach Reoxygenierung auf und nahm im weiteren Zeitverlauf ab. Bei 72 h nach Reoxygenierung gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den hypoxischen und den Kontrollzellen (Abb. 25).

In RT112 und UROtsa zeigte das Gen keine signifikanten Veränderungen.

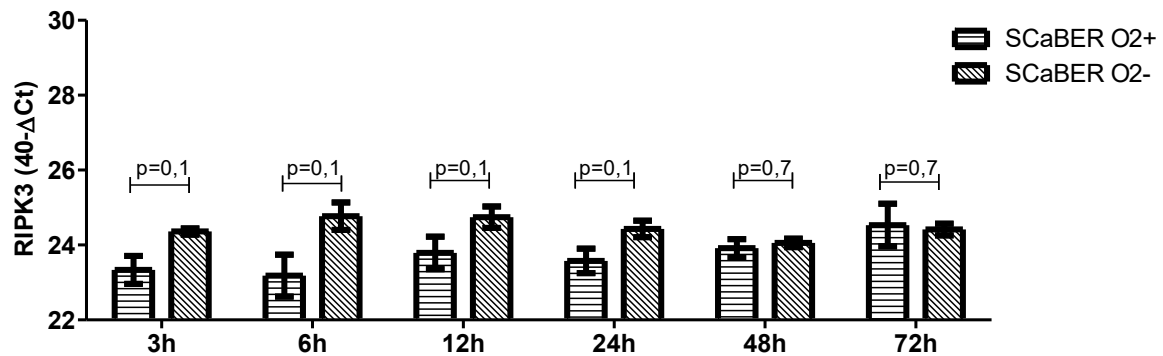


Abbildung 25: Zeitlicher Verlauf der Genexpression von RIPK3 in SCaBER Zellen unter normoxischen (O₂⁺) und hypoxischen (O₂⁻) Bedingungen, aufgetragen als MW ± SD

Zu Beginn der Analysen zeigte RIPK3 eine verstärkte Expression unter hypoxischen Bedingungen, die Expressionsmuster glichen sich ab 48 h nach Reoxygenierung denen der Kontrollzellen an.

3.2.5 Vergleich Normoxie und Hypoxie

Im nächsten Schritt wurden die Expressionen wie in 3.4.2. beschrieben als fold change angegeben. Berechnet wurden alle Zeitpunkte (siehe Abb. 26A). Zur Übersicht wurden in den folgenden Graphen nur die Zeitpunkt 3, 24 und 72 h nach Reoxygenierung angegeben.

ERV

Die Expression von ERV-3 in UROtsa weist, im Vergleich zu den Kontrollen, in den Zellen unter hypoxischen Bedingungen eine Expressionsminderung von ca. 40 % auf. Zu Beginn der Analysen lag der fold change bei 1,07. Er sank im Verlauf bis auf 0,62 bei 72 h nach Reoxygenierung. Auch in den SCaBER Zellen zeigte das Gen einen Abfall des Expressionsmusters von einer zu Beginn der Untersuchung ca. 30 % erhöhten Expression auf ein gleiches Expressionsmuster in Versuchs- und Kontrollzellen bei 72 h nach Reoxygenierung. In RT112 zeigte das Gen eine leichte Expressionssteigerung (Abb. 26B).

Im Gegensatz dazu veränderte sich ERV-W in RT112 von einer anfänglichen gleichen Expression in Versuchs- und Kontrollzellen (fold change = 1,1) über die Zeit zu einer Verdopplung der Expression in den Zellen unter hypoxischen Bedingungen (fold change = 2,3). In SCaBER und UROtsa blieben die Expressionen des Genes in Hypoxie und Normoxie nahezu gleich (Abb. 26A). Ähnliches war auch bei ERV-Kenv zu beobachten (RT112: fold change = 1,0 bei 3 h; fold change = 2,2 bei 72 h, Abb. 26C).

ERV-Kpol wurde in RT112 zu Beginn unter hypoxischen Bedingungen zu ca. 35 % vermindert exprimiert. Im Verlauf nahm dies bis zu einem 1,3-fachen der Expression der Kontrollzellen zu. In UROtsa Zellen zeigte das Gen einen Wandel von einer anfänglich 20 % erhöhten auf eine 30 % reduzierte Expression am Ende der Analysen (Abb. 26D). In SCaBER hatte das Gen, passend zu den in 4.2.4. beschriebenen parallelen Kurven eine gleichbleibende Expression in Norm und Hypoxie (MW + SD = 1,03±0,09).

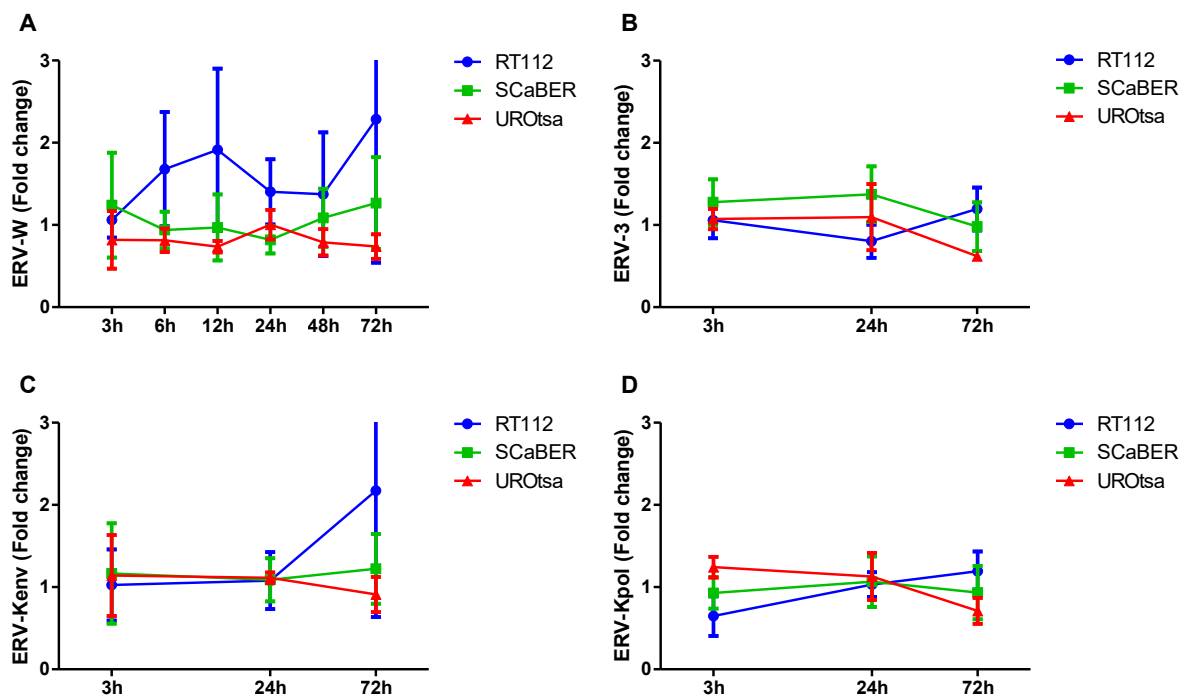


Abbildung 26: Dynamik der Expression von ERV-W (A), ERV-3 (B), ERV-Kenv (C) und ERV-Kpol (D) in unter hypoxischen Bedingungen kultivierten RT112, SCaBER und UROtsa Zellen als fold change zu unter Normalbedingungen kultivierten Kontrollzellen, aufgetragen als MW ± SD

ERV-W und ERV-Kenv zeigten in RT112-Zellen zum Ende der Versuche eine doppelte Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen (A, C). ERV-3 zeigte im Zeitverlauf in SCaBER und UROtsa unter hypoxischen Bedingungen einen relativen Abfall der Expression um ca. 30 % (B). ERV-Kpol wies in hypoxisch kultivierten RT112 Zellen eine relative Expressionssteigerung, in UROtsa eine -verminderung auf(D)

Hypoxiemarker

Die Betrachtung der hypoxischen Marker HIF1A und GLUT1 bestätigte die bisherigen Ergebnisse. Die Expression beider Gene blieben in UROtsa nahezu unverändert.

HIF1A zeigte in hypoxisch kultivierten RT112 Zellen einen Anstieg von einer 17 % erhöhten Expression zu Beginn der Analysen auf eine Erhöhung von über 80 % bei der Auswertung nach 72 h (Abb. 27A).

GLUT1 wurde in SCaBER Zellen unter Hypoxie im Vergleich zu normoxischen Bedingungen ca. 2,5-fach stärker exprimiert. Diese Induktion ließ im Zeitverlauf nach, sodass am Ende der Versuchsreihe die Expression in Hypoxie und Normoxie nahezu identisch waren (Abb. 27B). In RT112 zeigte das Gen unter hypoxischen Bedingungen in der letzten Auswertung eine Steigerung um 40 % im Gegensatz zu den unter normoxischen Bedingungen kultivierten Kontrollzellen.

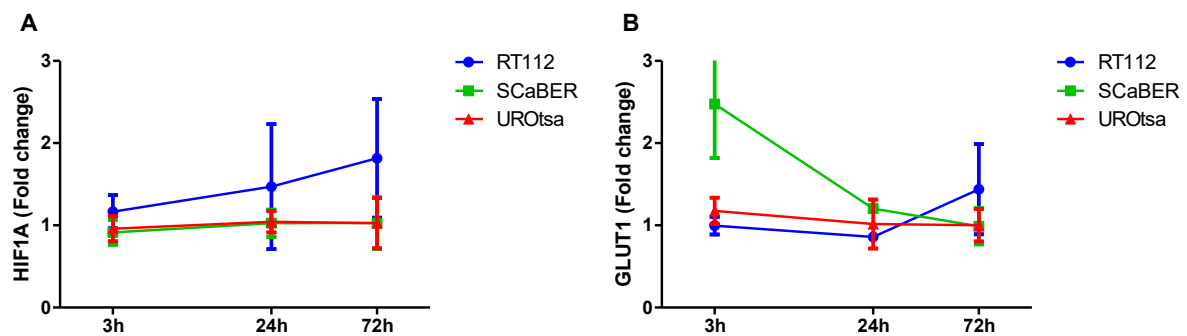


Abbildung 27: Dynamik der Expression von HIF1A (A) und GLUT1 (B) in unter hypoxischen Bedingungen kultivierten RT112, SCaBER und UROtsa Zellen als fold change zu unter Normalbedingungen kultivierten Kontrollzellen, aufgetragen als MW \pm SD

A: Die hypoxisch kultivierten RT112 Zellen zeigten im Zeitverlauf Expressionssteigerung von HIF1A. B: Die Expression von GLUT1 in SCaBER nahm von einem 2,5-fachen in den Versuchszellen zu Beginn auf gleiche Expressionsmuster zum Ende der Versuche ab.

KRT5

Beim Fold change zeigte sich eine Expressionssteigerung von KRT5 in RT112 Zellen unter hypoxischen Bedingungen (Abb. 28). Das Gen wurde durch die Hypoxie bis zu einer Verdoppelung der Expression induziert (MW + SD = 1,81 \pm 0,06). Wie zuvor beobachtet zeigte der basale Marker sehr geringe Veränderungen in SCaBER und UROtsa (SCaBER: MW + SD = 0,94 \pm 0,08; UROtsa: MW + SD = 1,12 \pm 0,13).

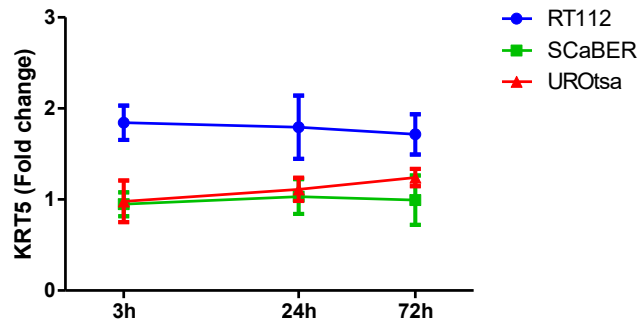


Abbildung 28: Dynamik der Expression von KRT5 in unter hypoxischen Bedingungen kultivierten RT112, SCaBER und UROtsa Zellen als fold change zu unter Normalbedingungen kultivierten Kontrollzellen, aufgetragen als MW \pm SD. KRT5 zeigte in RT112 Zellen unter hypoxischen Bedingungen konstant eine fast 2-fache Expression.

PD-L1

PD-L1 wurde unter hypoxischen Bedingungen vermehrt exprimiert. Sowohl in RT112 als auch in UROtsa war die cDNA-Menge zu Beginn der Analysen ca. doppelt so hoch wie in den Kontrollzellen. Im Verlauf des Versuchs passte sich diese wieder der Kontrolle an, sodass nach 72 h Reoxygenierung eine gleiche Expression in Hypoxie und Normoxie zu beobachten war (Abb. 29). In SCaBER schien die Genexpression durch die Hypoxie nahezu unbeeinflusst.

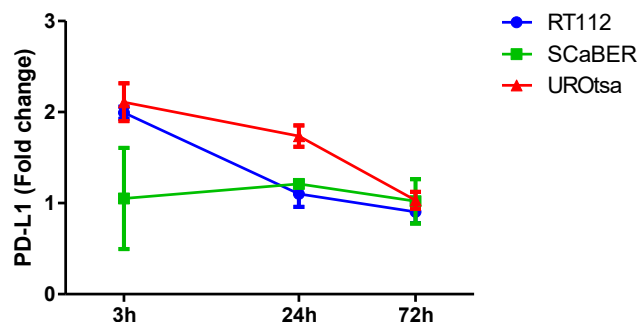


Abbildung 29: Dynamik der Expression von PD-L1 in unter hypoxischen Bedingungen kultivierten RT112, SCaBER und UROtsa Zellen als fold change zu unter Normalbedingungen kultivierten Kontrollzellen, aufgetragen als MW \pm SD. Die zweifach verstärkten Expressionsmuster von PD-L1 in hypoxisch kultivierten RT112 und UROtsa Zellen normalisierten sich im Zeitverlauf.

RIPK3

Bei Betrachtung des Fold change schien RIPK3 in diesem Versuch in allen Zelllinien Unterschiede zwischen den Kultivierungsbedingungen zu zeigen. In SCaBER nahm das Gen von einer anfangs verdoppelten Expression und einem Peak von 345 % bei 6 h (Daten nicht gezeigt) nach Reoxygenierung auf das Level der Kontrollzellen ab (Abb. 30). Auch in UROtsa war die Expression unter Hypoxie zu Beginn der

Analysen erhöht. Von einer 70 % -igen Steigerung glich sich die cDNA-Menge ebenfalls den Kontrollzellen an. In RT112 zeigte die Expression kleine Schwankungen, im Mittel zeigte sich jedoch eine leicht verstärkte Expression unter Hypoxie (MW + SD = $1,24 \pm 0,18$).

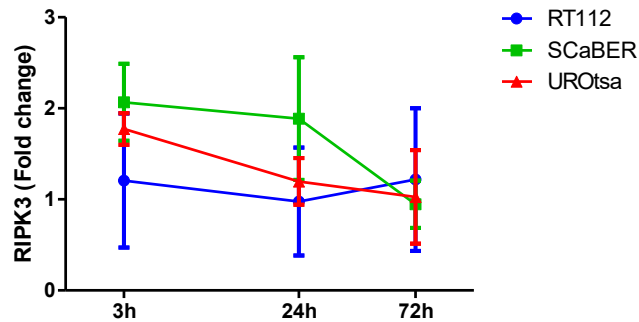


Abbildung 30: Vergleich der Expression von RIPK3 in unter hypoxischen Bedingungen kultivierten RT112, SCaBER und UROtsa Zellen als Fold change zu unter Normalbedingungen kultivierten Kontrollzellen, aufgetragen als MW \pm SD. RIPK3 zeigte zu Beginn der Analysen neben SCaBER auch in UROtsa Zellen eine verstärkte Expression im Vergleich zu den unter Normalbedingungen kultivierten Kontrollzellen.

3.2.6 Korrelationen der Expressionsveränderung

Zur Analyse der Korrelationen wurden die $40\text{-}\Delta\text{Ct}$ Werte verschiedener Gene gegeneinander in einem Graphen aufgetragen und der Spearman-Koeffizient berechnet. Dabei wurden die Expressionsveränderungen der ERV mit allen untersuchten Genen verglichen.

Molekulare Subtypen

Wurden alle Zelllinien in einem Graphen aufgetragen kam es zur Bildung von Subgruppen (Abb. 31). Dies zeigte sich insbesondere bei den Markern des luminalen und des basalen Subtyps. Die Korrelation der ERV mit GATA3 zeigte in allen untersuchten Zelllinien Spearman-Koeffizienten von $\rho = -0,52$ (ERV-3, Abb. 31A) bis $\rho = -0,74$ (ERV-Kenv, Abb. 31C).

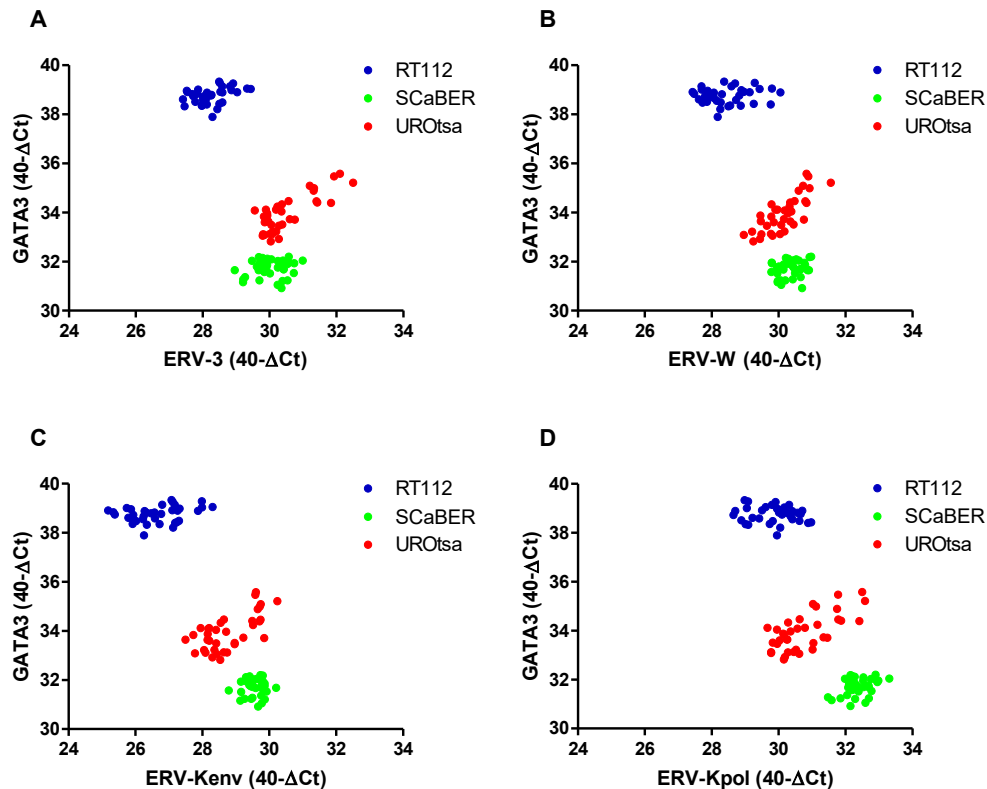


Abbildung 31: Korrelationen der 40- Δ Ct Werte von ERV-3 (A), ERV-W (B), ERV-Kenv (C) und ERV-Kpol (D) mit GATA3 in den Zelllinien RT112, SCaBER und UROtsa. Zu sehen sind die einzelnen Messwerte.

Zur Differenzierung wurden die unterschiedlichen Zelllinien farblich markiert. Bei Betrachtung aller Zelllinien zusammen ergaben sich ausschließlich negative Korrelationskoeffizienten. Bei Untersuchung der einzelnen Zelllinien zeigten sich auch positive Korrelationen.

RT112 zeigte bei der Analyse von ERV-3 zu GATA3 einen Spearman-Koeffizienten von $\rho = 0,43$ (Tabelle 16). Die Korrelationen von GATA3 mit ERV-W und beiden ERV-K zeigten niedrigere Koeffizienten und waren nicht signifikant (ERV-W: $\rho = 0,095$, ERV-Kenv: $\rho = 0,274$, ERV-Kpol: $\rho = -0,133$, Tabelle 16).

Die Korrelationen in SCaBER zeigten, dass in dieser Zelllinie nur ERV-Kpol mit einem Spearman-Koeffizienten von $\rho = 0,33$ eine signifikante Korrelation aufwies ($p = 0,0492$).

Die stärkste Korrelation der ERV mit GATA3 war in UROtsa zu erkennen. Die Spearman-Koeffizienten lagen in dieser Zelllinie zwischen $\rho = 0,56$ (ERV-Kenv) und $\rho = 0,78$ (ERV-W, Tabelle 16).

Bei KRT 5 und KRT20 zeigte sich ein ähnliches Bild. In SCaBER zeigte keines der ERV mit den KRT eine signifikante Korrelation. In RT112 zeigte ERV-3 eine signifikant positive Korrelation mit KRT20 auf ($\rho = 0,439$, $p = 0,0074$), während ERV-Kpol eine signifikant positive Korrelation mit KRT5 ($\rho = 0,429$, $p = 0,0091$) und

eine negative mit KRT20 ($\rho = 0,367$, $p = 0,0279$, Tabelle 16) hatte. ERV-Kenv zeigte eine geringe, jedoch signifikante Korrelation mit KRT20 ($\rho = 0,354$, $p = 0,0343$). In UROtsa zeigten außer ERV-Kpol mit KRT5 alle ERV mit den KRT eine signifikante Korrelation auf, wobei KRT5 positiv und KRT20 negativ war (Tabelle 16).

Tabelle 16: Korrelationskoeffizienten ρ und zugehörige p-Werte der $40\text{-}\Delta\text{Ct}$ Werte der ERV mit den Markern für den molekularen Subtyp
Signifikante Korrelationen sind markiert.

Korrelation		GATA3		KRT5		KRT20	
		ρ	p	ρ	p	ρ	p
RT112	ERV-3	$\rho = 0,429$	$p = 0,0089$	$\rho = 0,055$	$p = 0,7480$	$\rho = 0,439$	$p = 0,0074$
	ERV-W	$\rho = 0,095$	$p = 0,5806$	$\rho = 0,196$	$p = 0,2529$	$\rho = 0,313$	$p = 0,0635$
	ERV-Kenv	$\rho = 0,274$	$p = 0,1053$	$\rho = 0,170$	$p = 0,3204$	$\rho = 0,354$	$p = 0,0343$
	ERV-Kpol	$\rho = -0,133$	$p = 0,4391$	$\rho = 0,429$	$p = 0,0091$	$\rho = -0,367$	$p = 0,0279$
SCaBER	ERV-3	$\rho = 0,180$	$p = 0,2923$	$\rho = 0,292$	$p = 0,0841$	$\rho = 0,251$	$p = 0,2508$
	ERV-W	$\rho = 0,254$	$p = 0,1353$	$\rho = -0,295$	$p = 0,0813$	$\rho = -0,212$	$p = 0,3083$
	ERV-Kenv	$\rho = -0,042$	$p = 0,8057$	$\rho = -0,229$	$p = 0,1785$	$\rho = -0,098$	$p = 0,6422$
	ERV-Kpol	$\rho = 0,330$	$p = 0,492$	$\rho = 0,297$	$p = 0,0788$	$\rho = 0,197$	$p = 0,3454$
UROtsa	ERV-3	$\rho = 0,658$	$p < 0,0001$	$\rho = 0,727$	$p < 0,0001$	$\rho = -0,536$	$p = 0,0008$
	ERV-W	$\rho = 0,775$	$p < 0,0001$	$\rho = 0,728$	$p < 0,0001$	$\rho = -0,476$	$p = 0,0033$
	ERV-Kenv	$\rho = 0,559$	$p = 0,0004$	$\rho = 0,913$	$p < 0,0001$	$\rho = -0,578$	$p = 0,0002$
	ERV-Kpol	$\rho = 0,625$	$p < 0,0001$	$\rho = 0,648$	$p < 0,0001$	$\rho = -0,754$	$p < 0,0001$

Hypoxiemarker

In RT112 ergaben sich signifikante Korrelationen zwischen den ERV und HIF1A bis auf ERV-Kpol (ERV-3, ERV-W und ERV-Kenv: $p < 0,0001$, ERV-Kpol: $p = 0,9063$, Tabelle 17). In SCaBER war bei ERV-W und ERV-Kenv keine signifikante Korrelation zum Hypoxiemarker zu erkennen. Bei UROtsa Zellen hingegen zeigten alle ERV mit HIF1A einen signifikant positiven Spearman-Koeffizienten ($p \leq 0,0001$, Tabelle 17).

Mit GLUT1 korrelierte in der benignen Zelllinie keines der ERV signifikant. Dieser Hypoxiemarker hatte in RT112 mit ERV-3 ($\rho = 0,61$, $p < 0,0001$) und ERV-Kenv ($\rho = 0,571$, $p = 0,0003$) und in SCaBER mit ERV-3 ($\rho = 0,633$, $p < 0,0001$) und ERV-Kpol ($\rho = 0,445$, $p = 0,0066$) signifikante Korrelationskoeffizienten.

Tabelle 17: Korrelationskoeffizienten rho und zugehörige p-Werte der 40-ΔCt Werte der ERV mit den Markern für Hypoxie
Signifikante Korrelationen sind markiert.

Korrelationen		HIF1A		GLUT1	
		rho	p	rho	p
RT112	ERV-3	rho = 0,683	p < 0,0001	rho = 0,610	p < 0,0001
	ERV-W	rho = 0,604	p < 0,0001	rho = 0,327	p = 0,0514
	ERV-Kenv	rho = 0,789	p < 0,0001	rho = 0,571	p = 0,0003
	ERV-Kpol	rho = 0,020	p = 0,9063	rho = -0,135	p = 0,4333
SCaBER	ERV-3	rho = 0,690	p < 0,0001	rho = 0,633	p < 0,0001
	ERV-W	rho = 0,058	p = 0,7361	rho = 0,143	p = 0,4050
	ERV-Kenv	rho = 0,133	p = 0,4409	rho = 0,179	p = 0,2972
	ERV-Kpol	rho = 0,691	p < 0,0001	rho = 0,445	p = 0,0066
UROtsa	ERV-3	rho = 0,694	p < 0,0001	rho = 0,234	p = 0,1696
	ERV-W	rho = 0,591	p = 0,0001	rho = 0,188	p = 0,2725
	ERV-Kenv	rho = 0,613	p < 0,0001	rho = 0,267	p = 0,1148
	ERV-Kpol	rho = 0,472	p = 0,0037	rho = 0,102	p = 0,5552

Immungene

Die Spearman-Koeffizienten von IFNGR und PD-L1 mit den ERV unterschieden sich stark. IFNGR zeigte hauptsächlich positive Korrelationen (Tabelle 18). In UROtsa korrelierte IFNGR mit jedem der ERV signifikant und hatte Korrelationskoeffizienten von rho = 0,477 (ERV-Kpol) bis rho = 0,758 (ERV-3). ERV-3 zeigte auch in beiden malignen Zelllinien eine signifikante Korrelation, jedoch mit geringeren Werten (RT112: rho = 0,368, p = 0,0295, SCaBER: rho = 0,636, p < 0,0001). In SCaBER korrelierte IFNGR zusätzlich noch mit ERV-Kpol signifikant positiv (p < 0,0001, rho = 0,619, Tabelle 18).

PD-L1 hingegen wies größtenteils negative Korrelation auf. Die einzige signifikante Ausnahme war ERV-Kpol in RT112 Zellen (p = 0,0032, Tabelle 18). Hier berechnete sich ein Spearman-Koeffizient von rho = 0,478. In dieser Zelllinie wiesen auch die anderen ERV eine signifikante Korrelation auf. Diese lagen zwischen rho = -0,346 (ERV-3, p = 0,0391) und rho = -0,38 (ERV-W, p = 0,0223). In UROtsa korrelierte PD-L1 mit ERV-W und beiden ERV-K signifikant negativ. In SCaBER Zellen zeigte das Immungen keinen signifikanten Zusammenhang mit den ERV.

Tabelle 18: Korrelationskoeffizienten rho und zugehörige p-Werte der 40-ΔCt Werte der ERV mit IFNGR und PD-L1
Signifikante Korrelationen sind markiert.

Korrelation		IFNGR		PD-L1	
		rho	p	rho	p
RT112	ERV-3	rho = 0,368	p = 0,0295	rho = -0,346	p = 0,0391
	ERV-W	rho = 0,065	p = 0,7119	rho = -0,379	p = 0,0223
	ERV-Kenv	rho = 0,261	p = 0,1303	rho = -0,375	p = 0,0242
	ERV-Kpol	rho = 0,167	p = 0,3370	rho = 0,478	p = 0,0032
SCaBER	ERV-3	rho = 0,636	p < 0,0001	rho = -0,165	p = 0,3436
	ERV-W	rho = 0,035	p = 0,8417	rho = 0,144	p = 0,4093
	ERV-Kenv	rho = -0,048	p = 0,7816	rho = 0,219	p = 0,2067
	ERV-Kpol	rho = 0,619	p < 0,0001	rho = -0,156	p = 0,3716
UROtsa	ERV-3	rho = 0,758	p < 0,0001	rho = -0,293	p = 0,0824
	ERV-W	rho = 0,567	p = 0,0003	rho = -0,557	p = 0,0004
	ERV-Kenv	rho = 0,714	p < 0,0001	rho = -0,349	p = 0,0366
	ERV-Kpol	rho = 0,477	p = 0,0033	rho = -0,475	p = 0,0034

RIPK3

Das Gen für die programmierte Nekroptose zeigte besonders in RT112 und UROtsa signifikante Korrelationskoeffizienten. In UROtsa wies das RIPK3 mit jedem ERV eine signifikante Korrelation auf (ERV-3: $p < 0,0001$, ERV-W: $p = 0,0009$, ERV-Kenv: $p < 0,0001$, ERV-Kpol: $p = 0,0356$, Tabelle 19). In den RT112 Zellen war nur der Zusammenhang mit ERV-Kpol nicht signifikant ($\rho = 0,073$, $p = 0,6729$). Für die anderen ERV berechneten sich signifikante Spearman-Koeffizienten zwischen $\rho = 0,427$ (ERV-Kenv, $p = 0,0094$) und $\rho = 0,442$ (ERV-3, $p = 0,0069$).

In SCaBER zeigte sich lediglich mit ERV-3 eine signifikante Korrelation. Der Koeffizient hierbei lag bei $\rho = 0,438$.

Tabelle 19: Korrelationskoeffizienten rho und zugehörige p-Werte der 40-ΔCt-Werte der ERV mit RIPK3

Signifikante Korrelationen sind markiert.

Korrelation		RIPK3	
		rho	p
RT112	ERV-3	rho = 0,442	p = 0,0069
	ERV-W	rho = 0,410	p = 0,0130
	ERV-Kenv	rho = 0,427	p = 0,0094
	ERV-Kpol	rho = 0,073	p = 0,6729
SCaBER	ERV-3	rho = 0,438	p = 0,0076
	ERV-W	rho = -0,212	p = 0,2137
	ERV-Kenv	rho = -0,081	p = 0,6372
	ERV-Kpol	rho = 0,187	p = 0,2745
UROtsa	ERV-3	rho = 0,681	p < 0,0001
	ERV-W	rho = 0,528	p = 0,0009
	ERV-Kenv	rho = 0,664	p < 0,0001
	ERV-Kpol	rho = 0,351	p = 0,0356

ERV-K

Bei Betrachtung der Korrelationen von ERV-Kenv und ERV-Kpol fallen starke Unterschiede zwischen den Zelllinien auf.

Alle Zelllinien zusammengenommen zeigte sich ein Korrelationskoeffizient von rho = 0,807 (Abb. 32A). Wurde jedoch jede Zelllinie einzeln analysiert, zeigten die zwei viralen Genomabschnitte in RT112 und in SCaBER einen Spearman-Koeffizient von rho = 0,101 und rho = 0,263 (Abb. 32B/C). Nur UROtsa Zellen wiesen einen signifikanten positiven Zusammenhang auf (rho = 0,684, p < 0,0001, Abb. 32D).

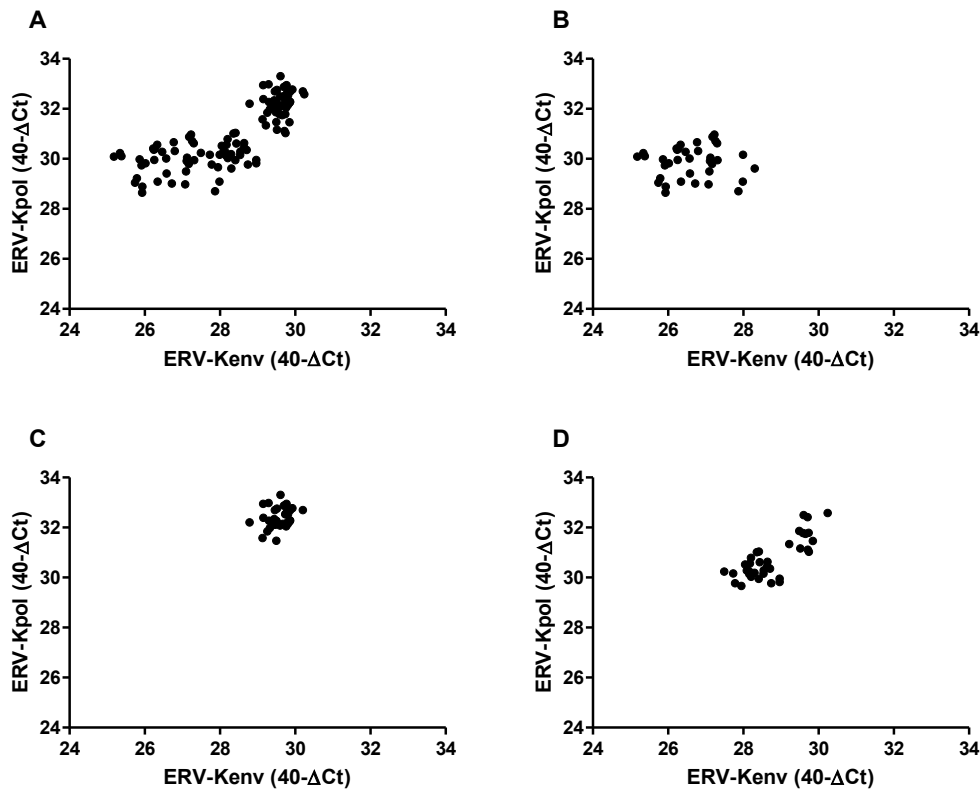


Abbildung 32: Korrelationen der 40- Δ Ct-Werte von ERV-Kenv mit ERV-Kpol als Übersicht (A) und in den Zelllinien RT112 (B), SCaBER (C) und UROtsa (D). Zu sehen sind die einzelnen Messwerte.

ERV-Kenv und ERV-Kpol zeigten in den malignen Zelllinien keinen signifikanten Zusammenhang (B, C). Der Korrelationskoeffizient in UROtsa Zellen lag bei $\rho = 0,684$.

3.3 Proliferationsassay

In einem Vorversuch wurden für die Zelllinien die Zellzahl zum Versuchsstart ermittelt. Diese betragen für RT112 300.000, für SCaBER 200.000 und für UROtsa 100.000 Zellen. Die folgenden Versuche wurden mit diesen Zellzahlen durchgeführt.

3.3.1 Vergleich der Zelllinien

Beim Vergleich der Zellen unter normoxischen Bedingungen der jeweiligen Zelllinien war bei RT112 eine stärkere Proliferation im Vergleich zu SCaBER und UROtsa zu sehen (Abb. 33). Nach 72 h ab Versuchsstart lagen die Zellzahlen bei $3,47 \times 10^6$ (RT112), $1,27 \times 10^6$ (SCaBER) und $2,03 \times 10^6$ (UROtsa). Somit wies UROtsa ebenfalls eine stärkere Proliferation als SCaBER auf.

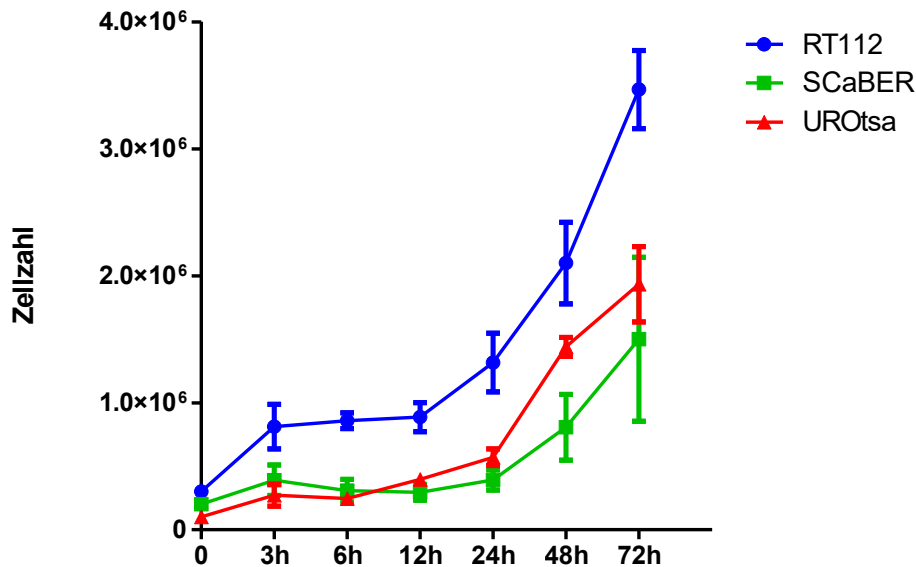


Abbildung 33: Vergleich der Proliferation von RT112, SCaBER und UROtsa Zellen unter normoxischen Bedingungen anhand der gemessenen Zellzahlen, aufgetragen als MW \pm SD
RT112 zeigte die stärkste Proliferation auf.

3.3.2 Vergleich von Norm- und Hypoxie

Im nächsten Schritt wurden die Zelllinien separat auf Proliferation unter Norm- und Hypoxie verglichen.

Die Unterschiede waren in keiner der Zelllinien signifikant, jedoch war in RT112 und UROtsa eine Tendenz zur Proliferationssteigerung unter hypoxischen Bedingungen zu erkennen (Abb. 34). In RT112 betrug die letzte ausgewertete Zellzahl unter hypoxischen Bedingungen im Mittel $3,71 \times 10^6$, während die Zellen unter normoxischen Bedingungen im Mittel $3,47 \times 10^6$ zählten (Abb. 35A). In UROtsa zeigte sich ein ähnliches Bild, jedoch war der Unterschied geringer ($2,06 \times 10^6$ vs. $1,93 \times 10^6$, Abb. 34B).

SCaBER Zellen hingegen schienen unter Hypoxie eine verminderte Zellteilungsrate aufzuweisen. Hier betrug die finale Zellzahl bei 72 h nach Reoxygenierung unter Normbedingungen $1,5 \times 10^6$ und in hypoxisch kultivierten Zellen $1,34 \times 10^6$ (Abb. 35B). Auffällig in dieser Zelllinie war der Unterschied der Zellzahlen zwischen 24 und 48 h nach Reoxygenierung. Unter Normalbedingungen zeigte sich hier ein stärkerer Unterschied als unter hypoxischen Bedingungen ($p=0,100$ vs. $p=0,400$).

Alle Proliferationsassays wiesen vor allem zum Ende der Analysen hin eine starke SD auf. Die stärkste Abweichung errechnete sich für hypoxische RT112 Zellen bei 72 h nach Reoxygenierung mit ca. SD = 718000.

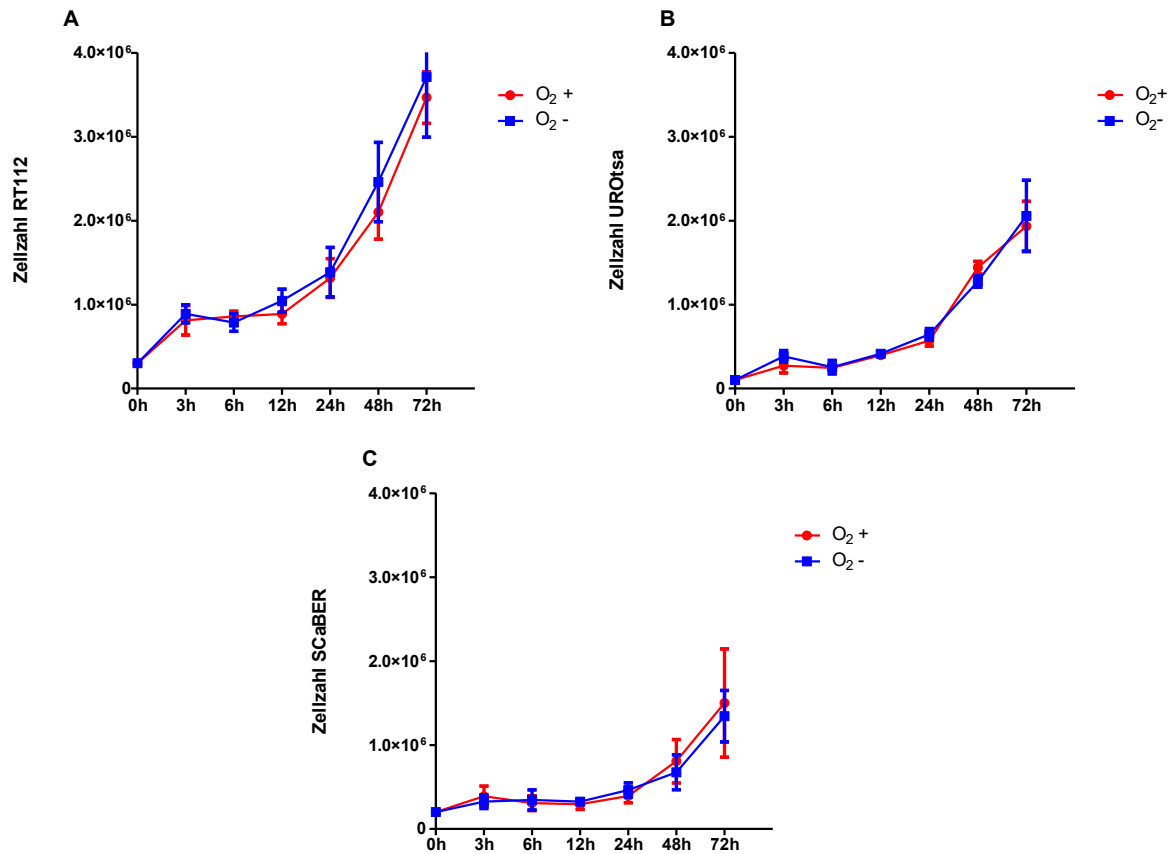


Abbildung 34: Vergleich der Proliferation von RT112 (A), UROtsa (B) und SCaBER (C) Zellen unter normoxischen (O₂⁺) und hypoxischen (O₂⁻) Bedingungen anhand der gemessenen Zellzahlen, aufgetragen als MW ± SD. Während RT112 und UROtsa unter hypoxischen Bedingungen eine leicht verstärkte Proliferation aufzeigten (A+B), war das Zellwachstum in SCaBER durch den Sauerstoffmangel vermindert (C).

4 DISKUSSION

4.1 Oxygenierungsabhängige Veränderung urologischer Tumorzellen

Um den Einfluss der ERV auf die Expression anderer Gene zu untersuchen, muss die Expression der ERV selbst verändert werden. Verändern sich die Expressionsmuster der anderen Gene ebenfalls, können eventuelle Zusammenhänge zwischen ERV und anderen Genen evaluiert werden. Dazu haben verschiedene Forschungsgruppen wie zuvor in 1.2.2 beschrieben in der Vergangenheit Methoden untersucht, um die Expression der ERV zu induzieren.⁴³⁻⁴⁵ Als eine Möglichkeit konnte das Kultivieren der Zelllinien unter hypoxischen Bedingungen gezeigt werden.⁵⁰ Das unter Sauerstoffmangel stabilisierte Protein HIF1 α dient mit HIF1 β als Transkriptionsfaktor um das Überleben der Zelle unter hypoxischen Bedingungen zu gewährleisten. Dadurch verstärkt exprimierte Gene sind unter anderem VEGF und GLUT1. Aber auch ERV zeigten unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen eine erhöhte Expression. So wurden die in dieser Studie untersuchten Blasenzelllinien unter hypoxischen Bedingungen kultiviert. Um zu verifizieren, dass die untersuchten Zelllinien auf die Hypoxie reagieren, wurden die Expressionsmuster von HIF1 α und GLUT1 ebenfalls untersucht.

Hierbei zeigten sich große Diskrepanzen zwischen den Zelllinien. Während die benignen UROtsa Zellen keine Veränderung in den Hypoxiemarkern zeigten, änderte sich das Expressionsmuster von GLUT1 in den ScaBER Zellen signifikant. RT112 hingegen wies keine Veränderung bei GLUT1 auf, aber die Expression von HIF1 α verdoppelte sich in den Versuchszellen. Interessanterweise kam die Veränderung im Expressionsmuster erst im Verlauf der Reoxygenierung und hatte ihren Höhepunkt am Ende des Versuchs. Wang et al. untersuchten 1995 in Leberzellkarzinomzellen die RNA- und Protein-Level von HIF1 α und HIF1 β unter 1 % Sauerstoff und nach Reoxygenierung mit 20 % Sauerstoff. Hierbei zeigte sich, im Gegensatz zu dieser Studie, eine Normalisierung sowohl der RNA als auch des Proteins innerhalb von 15 min nach Reoxygenierung.⁵¹

Im Rahmen der in dieser Studie durchgeführten Hypoxieversuche zeigten zusätzlich zur Expressionssteigerung von HIF1 α in der Tumorzelllinie RT112 bis auf ERV-Kpol alle endogenen Retroviren eine signifikante positive Korrelation mit dem Hypoxiemarker. Zusätzlich war in dieser Zelllinie eine Verdopplung der Expression von HERV-W und HERV-Kenv gegenüber den Kontrollen zu sehen. Während ERV-

Kernv erst zum Ende des Versuches eine Expressionssteigerung aufzeigte, war bei HERV-W schon nach 12h Reoxygenierung ein erster Peak zu sehen. Ein zweiter Anstieg war nach 72h Reoxygenierung zu erkennen. In einer Studie von Hu et al. von 2016 wurde die Expressionsänderung von HERV-W in hypoxisch kultivierten Neuroblastomzelllinien untersucht. Hier zeigte sich ebenfalls ein Anstieg der Expression, jedoch war der Höhepunkt schon nach 8h Reoxygenierung erreicht und danach normalisierte sich die Expression schnell und erreichte nach 48h Reoxygenierung wieder das ursprüngliche Level.⁵⁰ Die Unterschiede zwischen den Studien könnten durch die verschiedenen untersuchten Gewebe erklärt werden. Eine gewebsspezifische Expression der ERV wurde schon in der Vergangenheit aufgezeigt.⁶⁶

Die benigne Zelllinie UROtsa wies ebenfalls signifikante Korrelationen zwischen den ERV und HIF1 α auf. Ein ähnliches Ergebnis war in SCaBER anhand der Expressionssteigerung von GLUT1 und den signifikant positiven Korrelationen mit ERV-3 und ERV-Kpol zu sehen. Als Schlussfolgerung scheint es nahezuliegen, dass die Induktion per Hypoxie erfolgreich war.

4.2 Die Expressionsmuster der ERV korrelierten mit dem Subtyp

In früheren Studien wurde in verschiedenen Geweben die Aktivität von HERV nachgewiesen. Insbesondere in der Plazenta zeigten u.a. ERV-3 und ERV-W ein starkes Expressionsmuster.^{66, 67, 88} Auch in anderen Geweben, wie z.B. dem zentralen Nervensystem, verschiedenen sekretorischen Organen, wie der Schilddrüse, der Prostata oder den Brustdrüsen, und reproduktiven Organen, wie den Eierstöcken und den Hoden, wurde die Aktivität endogener Retroviren festgestellt.⁶⁵ Laut verschiedenen Forschungsgruppen zeigen demnach ca. 7 bis 30 % aller ERV ein Expressionsmuster in menschlichen Geweben.^{89, 90} Zusätzlich zeigte sich, dass im Vergleich zum Normalgewebe die Expression in Tumoren oftmals erhöht ist.^{91, 92} Insbesondere HERV-K scheint in Tumoren, wie dem Mammakarzinom, dem Ovariakarzinom und dem Melanom aktiv zu sein.^{92, 93} Da bisher wenig Informationen zum Expressionsmuster der HERV im BCa erhoben wurden, wurde dies in dieser Studie untersucht. Hierbei zeigte sich generell eine schwache Expression der retroviralen Elemente. Interessanterweise war das niedrigste Expressionsmuster nicht in der benignen Zelllinie UROtsa, sondern zeigte sich in der malignen Zelllinie RT112. In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass der luminaire Subtyp häufig einen höheren Grad der Differenzierung und oftmals niedrige

TNM-Stadien aufweist.⁹⁴ In Anbetracht dieser Tatsache kann dieses Ergebnis der Expressionsanalysen darauf hindeuten, dass die Expression der ERV mit der Entdifferenzierung und dem Progress des Tumors zunimmt. Im Gegensatz zu der luminalen Zelllinie zeigte die basale Zelllinie SCaBER dementsprechend eine signifikant höhere Aktivität aller untersuchten ERV. Auch die Analysen von Kreimer et al. zur HERV-K Expression in verschiedenen urologischen Tumorzelllinien zeigten bei den meisten HERV-K Stämmen ebenfalls ein höheres Expressionsmuster in SCaBER als in RT112.⁸⁵ Zusätzlich wurde in dieser Studie beobachtet, dass RT112 im Hypoxieversuch eine Veränderung der molekularen Marker aufwies. Während die Marker für den luminalen Subtyp herunterreguliert wurden, zeigte KRT 5 als Marker für den basalen Subtyp eine Verstärkung des Expressionsmusters. Außerdem war insbesondere im Zeitverlauf in den RT112-Zellen unter hypoxischen Bedingungen eine Tendenz zur Expressionssteigerung der ERV zu erkennen. Dies deutet ebenfalls daraufhin, dass die Expression der ERV im basalen Subtyp des BCa stärker ist als bei den luminalen Tumoren. Es wäre sogar denkbar, dass eine verstärkte Expression der ERV die Ausprägung des basalen Subtyps fördert.

4.3 ERV-Kpol (Np9) war aktiver als ERV-Kenv (Rec)

Auch zwischen den HERV-Stämmen waren Expressionsunterschiede zu sehen. ERV-Kpol wies die stärkste und ERV-Kenv die schwächste Expression auf. Dies kann mit den jeweils exprimierten Proteinen zusammenhängen. Das von ERV-Kpol abgebildete Np9 zeigte in Expressionsanalysen in der Vergangenheit im Tumor eine vermehrte Aktivität im Gegensatz zu dem von ERV-Kenv kodiertem Rec.⁶²

In mehreren Studien wurde bisher der Einfluss von Np9 auf die Tumorgenese untersucht. Hierbei zeigte sich, dass onkogene Signalkaskaden wie ERK, Notch1, β -catenin, und Ark durch Np9 aktiviert werden.^{63, 95} Zudem kann durch die Interaktion von Np9 mit als Tumorsuppressor agierenden Zinkfingerproteinen die Hemmung des Protoonkogens c-myc aufgehoben werden.⁶⁴ Zusätzlich zeigten Teratokarzinomzellen unter einer Suppression von Np9 eine verstärkte Chemosensitivität für Bleomycin und Cisplatin. Auch die Migration der Tumorzellen wurde durch das Fehlen des Proteins gehemmt.⁹⁶

Bei Betrachtung der in dieser Studie analysierten Expressionsmuster von ERV-Kpol in den unterschiedlichen molekularen Subtypen des BCa finden sich einige Parallelen. Der basale Typ weist oftmals eine stärkere Infiltration auf und ist aggressiver als der luminaler Typ.³⁴ In den basalen Zellen wurde in dieser Studie eine

deutlich höhere Expression von ERV-Kpol nachgewiesen. Im Gegensatz dazu steht jedoch die Chemosensitivität der basalen Karzinome. Diese sprechen meist besser auf eine Cisplatin-basierte Chemotherapie an.²⁹ Inwieweit diese Merkmale tatsächlich mit der Aktivität von Np9 als von ERV-Kpol kodiertes Protein zusammenhängen bleibt noch ungeklärt. Dazu wäre ein Knockdown des Proteins eine mögliche Untersuchungsmethode.

4.4 IFNGR und PD-L1 waren in malignen urologischen Zelllinien verändert

In den untersuchten Zelllinien waren veränderte Expressionen von PD-L1 und IFNGR zu sehen. IFNGR zeigte in den malignen Zelllinien eine signifikant verminderte Aktivität, während PD-L1 ein verstärktes Expressionsmuster aufwies. Wie in der Literatur beschrieben, zeigte auch in dieser Studie PD-L1 in der Zelllinie des basalen BCa ein stärkeres Expressionsmuster als in der des luminalen Subtyps.³²

Sowohl der IFNGR als auch PD-L1 sind wichtige Bestandteile der Immunevasion von Tumoren. Bindet Interferon- γ (IFN- γ) an den Rezeptor werden über JAK und STAT Signalkaskaden aktiviert.^{97, 98} Dies führt zu einer Präsentation von zellulären Antigenen und zur Erkennung des Tumors durch das Immunsystem. PD-L1 wirkt durch die Bindung an PD-1 hemmend auf T-Zellen und fördert somit die Immunevasion des Tumors.^{27, 99} Um dem Immunsystem zu entgehen, verändern viele Karzinome die Expressionsmuster von IFNGR und PD-L1.¹⁰⁰ So zeigen sie oftmals eine verstärkte Expression von PD-L1 sowie eine Inaktivität des IFNGR Signalweges.

Unter hypoxischen Bedingungen wurde PD-L1 im Vergleich mit den Kontrollzellen zusätzlich in den RT112 Zellen vermehrt exprimiert. Dies passte sich im Verlauf der Reoxygenierung wieder an die Kontrollen an. Um zu erörtern, ob diese Veränderung auf die ERV zurückzuführen war, wurde jeweils der Spearman-Koeffizient berechnet. Dieser zeigte nur eine signifikant positive Korrelation von ERV-Kpol und PD-L1 in den RT112 Zellen. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen den anderen untersuchten ERV und PD-L1 konnte nicht gezeigt werden. Interessanterweise zeigten in UROtsa alle ERV eine signifikant positive Korrelation mit dem IFNGR. Dies sollte nicht als Einfluss der ERV auf den IFNGR gewertet werden, sondern könnte auf eine IFN- γ abhängige Induktion der ERV hindeuten. Wie zuvor beschrieben können über die Interferon- γ getriggerte JAK-STAT-Signalkaskade retrovirale LTRs aktiviert werden.⁴⁹

In der Vergangenheit zeigten Morozov et al. hingegen, dass HERV-K die Expression von Interleukin-10 (IL-10) aktiviert.¹⁰¹ Das Zytokin wirkt antiinflammatorisch und wird oft in Tumoren überexprimiert.¹⁰² Im Lungenkarzinom ist eine hohe Expression von IL-10 mit einem schlechteren krankheitsspezifischen Überleben assoziiert.¹⁰³ Auch im Serum von Urothelkarzinomzellen konnte IL-10 nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte die IL-10 Produktion eine Hemmung des Immunsystems. In Anwesenheit des Zytokins zeigten Makrophagen eine verstärkte Expression von PD-L1.¹⁰⁴ IL-10 kann über eine PD-L1 Produktion auf den Zellen des Immunsystems diese hemmen. Zusätzlich hemmt das Zytokin die durch IFN- γ gesteuerte Rekrutierung von T-Zellen.¹⁰³ Dies kann darauf hindeuten, dass ERV das Immunsystem nicht durch den IFNGR und PD-L1 direkt beeinflussen, sondern sich eine IL-10 vermittelte Immunsuppression zunutze machen.

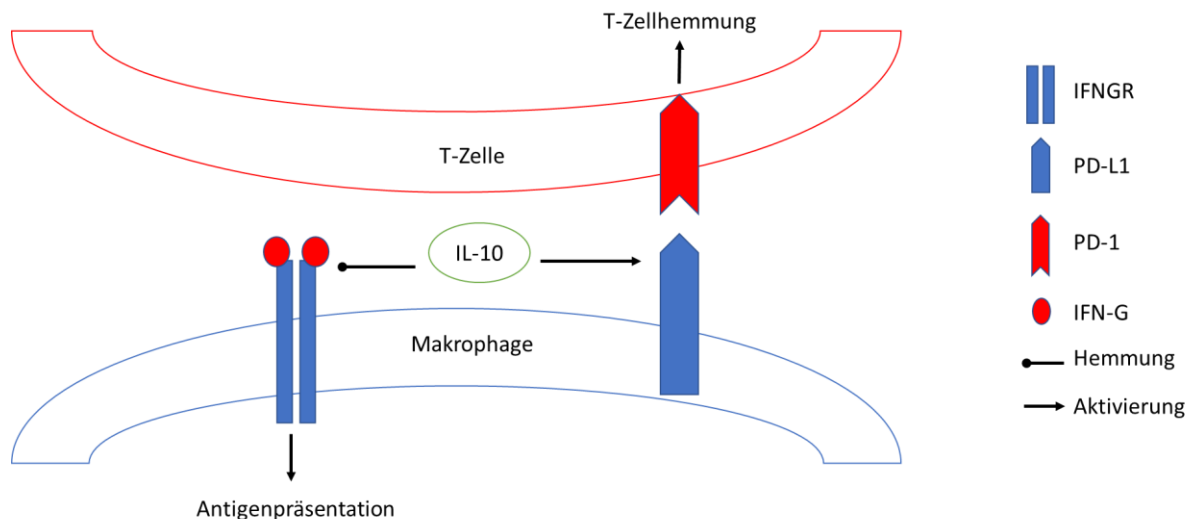


Abbildung 35: Der Einfluss von IL-10 auf PD-L1 und IFN- γ

Die Bindung von PD-L1 an PD-1 führt zur Hemmung der T-Zellen. Bindet Interferon- γ an den Rezeptor, werden die Makrophagen zur Antigenpräsentation angeregt und somit die T-Zellen aktiviert.

IL-10 führt zu einer vermehrten PD-L1 Expression auf Makrophagen und hemmt die IFN-G gesteuerte Rekrutierung der T-Zellen.

4.5 RIPK3 hemmte die Proliferation in SCaBER-Zellen

Die Analyse der Proliferationsassays zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zelllinien. Auffällig war jedoch, dass RT112 und UROtsa unter hypoxischen Bedingungen eine Verstärkung der Proliferation aufwiesen. Der niedrige Sauerstoffgehalt im Tumor fördert dessen Wachstum.¹⁰⁵ Wie zuvor erwähnt wird durch die Hypoxie der Transkriptionsfaktor HIF1 aktiviert. Dadurch werden Wachstumsfaktoren und andere Gene, wie z.B. GLUT1 aktiviert. Diese fördern

wiederum das Überleben der Tumorzellen, die Angiogenese, sowie den Glukosemetabolismus der Zellen.⁵⁴

SCaBER hingegen wies als einzige Zelllinie eine Tendenz zu reduzierter Proliferation unter Hypoxie auf. Gleichzeitig war es die Einzige unter den untersuchten Zelllinien, die unter hypoxischen Bedingungen ein verstärktes Expressionsmuster des Nekroptoseaktivators RIPK3 aufweist. Durch RIPK3 scheinen vermehrt Zellen in die Nekroptose zu gehen und somit der Proliferation entgegensetzen. Ein Zusammenhang zwischen RIPK3 und den ERV ist jedoch fraglich, da eine Korrelationsanalyse zwischen den ERV und RIPK3 in SCaBER nur bei ERV-3 ein signifikant positives Ergebnis hervorgebracht hat. Interessanterweise waren in RT112 bei ERV-3, ERV-W und ERV-Kenv signifikant positive Korrelationen mit RIPK3 zu sehen. In UROtsa zeigten alle ERV einen signifikant positiven Koeffizienten mit dem Nekroptoseaktivator. In allen drei Zelllinien wies ERV-3 den größten Korrelationskoeffizienten auf. Da die ERV das Tumorstadium jedoch begünstigen wäre eine retroviral gesteuerte Induktion der Nekroptose abwegig. Ein möglicher Zusammenhang zwischen RIPK3 und ERV-3 sollte aber weiter untersucht werden. Hierfür wären andere Arten der Induktion der retroviralen Expression, z.B. Demethylierung oder mittels Vektors, möglich. Auch ein Knock-down des ERV und die Untersuchung der RIPK3 Expression in diesem Zusammenhang wäre denkbar.

4.6 Ausblick: ERV im Kontext klinischer Anwendungen

Unter Betrachtung der Ergebnisse dieser Studie, kann man davon ausgehen, dass HERV-K unter den ERV den größten Einfluss auf das Tumorgeschehen hat. Dies entspricht auch den Ergebnissen der Forschungsgruppe von Wang-Johanning et al., die HERV-K im Mammakarzinom untersucht hat. Studien der Gruppe zeigten, dass HERV-K im Brustkrebs signifikant aktiver ist als im benignen Mammagewebe.^{76, 77, 106} Zusätzlich scheint das kodierte envelope Protein das Immunsystem zu triggern, sodass neben einer verstärkten T-Zellantwort auch Antikörper gegen das Protein gebildet werden. Diese Antikörper könnten als früher Marker zum Screening des Mammakarzinoms genutzt werden.⁷⁸ Außerdem zeigte die Forschungsgruppe *in vitro* und an Mäusen, dass eine Therapie mit HERV-K spezifischen Antikörpern das Tumorstadium reduzieren und die Apoptose der Tumorzellen induzieren kann.¹⁰⁶ Diese Ergebnisse könnten auch genutzt werden, um eine Impfung als Prävention gegen das Mammakarzinom zu entwickeln.⁷⁷

In dieser Studie zeigten alle untersuchten ERV in der basalen Urothelkarzinomzelllinie ein signifikant stärkeres Expressionsmuster als in der luminalen Zelllinie und der benignen Kontrollzelllinie. Dass das basale BCa aggressiver zu sein scheint, und oft höheren TNM-Stadien vorzufinden ist, deutet darauf hin, dass die Expression der ERV mit dem Progress des Tumors korreliert. Im Einklang dazu deutete sich bei den luminalen RT112 Zellen mit einer verstärkten Expression der ERV ein Wechsel zum basalen Subtyp an. Dies könnte man sich zu Nutze machen, und die Expressionsmuster der ERV als Verlaufsparemeter verwenden, und somit einen Progress des Karzinoms rechtzeitig zu identifizieren.

Auch eine Hemmung der ERV könnte eine erfolgsversprechende Therapieergänzung darstellen. Insbesondere das von HERV-K codierte Np9 scheint einen Einfluss auf das Tumorgeschehen zu nehmen. Bisherige Erkenntnisse zeigen, dass das Protein onkogene Signalkaskaden aktiviert, und sogar die Chemosensitivität gegenüber Cisplatin reduziert.^{63, 64, 96} In dieser Studie lässt sich eine positive Korrelation zwischen ERV-Kpol als Referenz für Np9 und PD-L1 erahnen. Gelingt es in der Zukunft, das retrovirale Protein zu inhibieren, könnte die PD-L1 Synthese des Karzinoms ebenfalls reduziert werden. Dies könnte die schon etablierte Therapie mit PD-L1 bzw. PD-1-Inhibitoren zusätzlich unterstützen.

Im präklinischen Zellkulturmodell dieser Studie wurde ein potenzieller Einfluss der ERV auf das BCa aufgezeigt. Die ERV scheinen das Potential zu haben, die Ausprägung des molekularen Subtyps und damit auch die Progression der Tumoren zu beeinflussen und zusätzlich die Immunantwort im Tumor insbesondere durch PD-L1 zu modifizieren. Um den Einfluss zu verifizieren, sollte diese Thematik in Zukunft weiterhin untersucht werden. Hierfür wären *in silico* Analysen, z.B. der Datensätze der TCGA, hilfreich. Auch weitere Expressionsanalysen in Verbindung mit einem Knockdown der retroviralen Elemente könnten neue Erkenntnisse aufdecken, die zu einem besseren Verständnis der Thematik beitragen und gegebenenfalls neue Ansatzpunkte zur Therapieoptimierung des BCa liefern.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Urothelkarzinom der Harnblase gehört zu den fünf häufigsten malignen Tumoren weltweit. Unterteilt wird es klinisch in nicht-muskelinvasive und muskelinvasive Urothelkarzinome. Anhand der Einteilung unterscheidet sich auch die Therapie. Während bei nicht-muskelinvasiven Stadien eine lokale Therapie möglich ist, ist ab einer Infiltration der Blasenmuskulatur eine radikale Zystektomie die Therapie der Wahl. In Abhängigkeit des Tumorstadiums ist eine systemische chemotherapeutische und/oder immunmodulatorische Behandlung angezeigt. Bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem BCa beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate trotz leitlinienkonformer Therapie je nach Risikoprofil 0 - 33 %.

Das Urothelkarzinom der Harnblase wird je nach Expressionsmuster molekulargenetisch in verschiedene Subtypen unterteilt werden. Hierzu zählen insbesondere der basale und der luminale Subtyp. Der luminale Subtyp tritt häufiger in niedrigen TNM-Stadien auf und weist seltener eine Progression auf. Der basale Subtyp zeigt sich wiederum häufiger in höheren TNM-Stadien und hat eine schlechtere Prognose.

Molekulargenetisch weist das Urothelkarzinom einige Parallelen zum Mammakarzinom auf, bei dem humane endogene Retroviren eine prognostische Relevanz zu haben scheinen.

Humane endogene Retroviren sind Retroviren, die sich im Laufe der Evolution durch Infektion von Keimzellen und darauffolgender Vererbung in das menschliche Genom integriert haben. Bis dato sind ca. 8 % des menschlichen Genoms viralen Ursprungs. Viele dieser viralen Genabschnitte sind mittlerweile nicht mehr funktional, jedoch zeigen einige noch Aktivität und codieren zum Teil noch Proteine. In den letzten Jahren zeigten Studien, dass endogene Retroviren in malignen Zellen eine verstärkte Aktivität aufweisen. Die reaktivierten Genabschnitte können onkogene Signalkaskaden aktivieren und Tumorsuppressorgene inhibieren und somit unter anderem die Proliferation und Migration des Tumors fördern.

Ziel dieser Studie war es, die Expressionsmuster verschiedener retroviraler Elemente, sowie deren Assoziation mit dem Urothelkarzinom unter den im Tumor bestehenden hypoxischen Bedingungen zu untersuchen. Hierfür wurden zwei maligne (RT112, SCaBER) und eine benigne (UROtsa) Urothelzelllinie für 48 Stunden einer Hypoxie (3 % Sauerstoff) ausgesetzt und anschließend die zelluläre

RNA nach 3, 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden Reoxygenierung mittels Real-Time PCR untersucht. Als Kontrolle wurden die gleichen Zelllinien in Normoxie (21 % Sauerstoff) kultiviert. Neben vier verschiedenen retroviralen Genabschnitten (ERV-3, ERV-W, ERV-Kenv und ERV-Kpol) wurden Marker für eine erfolgreiche Hypoxie (HIF1 α , GLUT1), Marker für den molekularen Subtyp (Keratin 5, Keratin 20, GATA3), immunmodulatorische Gene (PD-L1, Interferon- γ Rezeptor) und der Marker für die Nekroptose RIPK3 analysiert.

Hierbei zeigte sich in allen Zelllinien ein schwaches Expressionsmuster der endogenen Retroviren. Dabei wies ERV-Kpol die stärkste Expression auf.

Bei den hypoxisch kultivierten Zellen war nur in RT112 bei ERV-W und ERV-Kenv eine signifikanter Expressionssteigerung zu erkennen. HIF1A und GLUT1 bestätigten durch ein verändertes Expressionsmuster jedoch eine gelungene hypoxische Kultivierung.

Durch die Marker für den molekularen Subtyp konnten die Zelllinien den in der Literatur vorgeschriebenen Subtypen zugeordnet werden. Hierbei zeigte sich, dass alle endogenen Retroviren eine signifikant stärkere Expression im basalen als im luminalen Subtyp aufwiesen. Zusätzlich wies die hypoxisch kultivierte, luminale Zelllinie eine verstärkte Expression der basalen Marker auf. Hierbei zeigten sich signifikant positive Korrelationen zwischen dem Marker für den basalen Subtyp und den endogenen Retroviren. Dies könnte auf einen retroviral getriggerten Progress des Karzinoms hindeuten.

Die malignen Zelllinien zeigten im Vergleich zu den benignen Zellen eine verminderte Expression des Immunantwort fördernden Interferon- γ Rezeptors und eine verstärkte Expression des T-Zell hemmenden PD-L1. In den RT112 Zellen wies PD-L1 unter hypoxischen Bedingungen eine Steigerung des Expressionsmusters auf. In dieser Zelllinie wies das Protein zusätzlich eine signifikant positive Korrelation mit ERV-Kpol auf.

Die vorliegenden Daten sprechen für eine mögliche Involvierung der endogenen Retroviren in die urotheliale Tumorgenese. Sie scheinen in höheren Tumorstadien verstärkt exprimiert zu werden. So könnten sie durch eine Induktion der PD-L1 Expression zur Immunevasion und Tumorprogression beitragen. Als Umkehrschluss ist es möglich, dass eine Hemmung der ERV die Expression von PD-L1 vermindert. Antiretrovirale Medikamente könnten so im Rahmen eines multimodalen Ansatzes aktuelle Therapiekonzepte möglicherweise sinnvoll ergänzen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Earl, J, Rico, D, Carrillo-de-Santa-Pau, E, Rodriguez-Santiago, B, Mendez-Pertuz, M, Auer, H, Gomez, G, Grossman, HB, Pisano, DG, Schulz, WA, Perez-Jurado, LA, Carrato, A, Theodorescu, D, Chanock, S, Valencia, A, Real, FX: The UBC-40 Urothelial Bladder Cancer cell line index: a genomic resource for functional studies. *BMC genomics*, 16: 403, 2015.
2. Cumberbatch, MGK, Jubber, I, Black, PC, Esperto, F, Figueroa, JD, Kamat, AM, Kiemeny, L, Lotan, Y, Pang, K, Silverman, DT, Znaor, A, Catto, JWF: Epidemiology of Bladder Cancer: A Systematic Review and Contemporary Update of Risk Factors in 2018. *European urology*, 74: 784-795, 2018.
3. Wong, MCS, Fung, FDH, Leung, C, Cheung, WWL, Goggins, WB, Ng, CF: The global epidemiology of bladder cancer: a joinpoint regression analysis of its incidence and mortality trends and projection. *Scientific reports*, 8: 1129, 2018.
4. Richters, A, Aben, KKH, Kiemeny, L: The global burden of urinary bladder cancer: an update. *World J Urol*, 38: 1895-1904, 2020.
5. Dy, GW, Gore, JL, Forouzanfar, MH, Naghavi, M, Fitzmaurice, C: Global Burden of Urologic Cancers, 1990-2013. *European urology*, 71: 437-446, 2017.
6. Bertz, S, Hartmann, A, Knuchel-Clarke, R, Gaisa, NT: [Specific types of bladder cancer]. *Der Pathologe*, 37: 40-51, 2016.
7. Kujtan, L, Hussain, A, Subramanian, J, Masood, A: The evolving genomic landscape in urothelial cancer. *Curr Opin Oncol*, 2018.
8. Omorphos, NP, Piedad, JCP, Vasdev, N: Guideline of guidelines: Muscle-invasive bladder cancer. *Turk J Urol*, 47: S71-S78, 2021.
9. Kirkali, Z, Chan, T, Manoharan, M, Algaba, F, Busch, C, Cheng, L, Kiemeny, L, Kriegmair, M, Montironi, R, Murphy, WM, Sesterhenn, IA, Tachibana, M, Weider, J: Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology*, 66: 4-34, 2005.
10. Comperat, EM, Burger, M, Gontero, P, Mostafid, AH, Palou, J, Roupret, M, van Rhijn, BWG, Shariat, SF, Sylvester, RJ, Zigeuner, R, Babjuk, M: Grading of Urothelial Carcinoma and The New "World Health Organisation Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs 2016". *Eur Urol Focus*, 2018.
11. Babjuk, M, Burger, M, Comperat, EM, Gontero, P, Mostafid, AH, Palou, J, van Rhijn, BWG, Roupret, M, Shariat, SF, Sylvester, R, Zigeuner, R, Capoun, O, Cohen, D, Escrig, JLD, Hernandez, V, Peyronnet, B, Seisen, T, Soukup, V: European Association of Urology Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (TaT1 and Carcinoma In Situ) - 2019 Update. *European urology*, 76: 639-657, 2019.
12. Humphrey, PA, Moch, H, Cubilla, AL, Ulbright, TM, Reuter, VE: The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *European urology*, 70: 106-119, 2016.
13. Woldu, SL, Bagrodia, A, Lotan, Y: Guideline of guidelines: non-muscle-invasive bladder cancer. *BJU Int*, 119: 371-380, 2017.
14. Sylvester, RJ, van der Meijden, AP, Oosterlinck, W, Witjes, JA, Bouffoux, C, Denis, L, Newling, DW, Kurth, K: 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: 466-465; discussion 475-467, 2006.
15. Cao, R, Yuan, L, Ma, B, Wang, G, Qiu, W, Tian, Y: An EMT-related gene signature for the prognosis of human bladder cancer. *J Cell Mol Med*, 24: 605-617, 2020.
 16. Abdollah, F, Gandaglia, G, Thuret, R, Schmitges, J, Tian, Z, Jeldres, C, Passoni, NM, Briganti, A, Shariat, SF, Perrotte, P, Montorsi, F, Karakiewicz, PI, Sun, M: Incidence, survival and mortality rates of stage-specific bladder cancer in United States: a trend analysis. *Cancer Epidemiol*, 37: 219-225, 2013.
 17. Leal, J, Luengo-Fernandez, R, Sullivan, R, Witjes, JA: Economic Burden of Bladder Cancer Across the European Union. *European urology*, 69: 438-447, 2016.
 18. Taylor, J, Becher, E, Steinberg, GD: Update on the guideline of guidelines: non-muscle-invasive bladder cancer. *BJU Int*, 125: 197-205, 2020.
 19. Power, NE, Izawa, J: Comparison of Guidelines on Non-Muscle Invasive Bladder Cancer (EAU, CUA, AUA, NCCN, NICE). *Bladder Cancer*, 2: 27-36, 2016.
 20. Chang, SS, Bochner, BH, Chou, R, Dreicer, R, Kamat, AM, Lerner, SP, Lotan, Y, Meeks, JJ, Michalski, JM, Morgan, TM, Quale, DZ, Rosenberg, JE, Zietman, AL, Holzbeierlein, JM: Treatment of Non-Metastatic Muscle-Invasive Bladder Cancer: AUA/ASCO/ASTRO/SUO Guideline. *J Urol*, 198: 552-559, 2017.
 21. Lazaro, M, Gallardo, E, Domenech, M, Pinto, A, Gonzalez-del-Alba, A, Del Alba, AG, Puente, J, Fernandez, O, Font, A, Lainez, N, Vazquez, S: SEOM Clinical Guideline for treatment of muscle-invasive and metastatic urothelial bladder cancer (2016). *Clin Transl Oncol*, 18: 1197-1205, 2016.
 22. Alfred Witjes, J, Lebet, T, Comperat, EM, Cowan, NC, De Santis, M, Bruins, HM, Hernandez, V, Espinos, EL, Dunn, J, Rouanne, M, Neuzillet, Y, Veskimae, E, van der Heijden, AG, Gakis, G, Ribal, MJ: Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer. *European urology*, 71: 462-475, 2017.
 23. Witjes, JA, Bruins, HM, Cathomas, R, Comperat, EM, Cowan, NC, Gakis, G, Hernandez, V, Linares Espinos, E, Lorch, A, Neuzillet, Y, Rouanne, M, Thalmann, GN, Veskimae, E, Ribal, MJ, van der Heijden, AG: European Association of Urology Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer: Summary of the 2020 Guidelines. *European urology*, 79: 82-104, 2021.
 24. Witjes, JA, Comperat, E, Cowan, NC, De Santis, M, Gakis, G, Lebet, T, Ribal, MJ, Van der Heijden, AG, Sherif, A, European Association of, U: EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer: summary of the 2013 guidelines. *European urology*, 65: 778-792, 2014.
 25. Powles, T, Park, SH, Voog, E, Caserta, C, Valderrama, BP, Gurney, H, Kalofonos, H, Radulovic, S, Demey, W, Ullen, A, Loriot, Y, Sridhar, SS, Tsuchiya, N, Kopyltsov, E, Sternberg, CN, Bellmunt, J, Aragon-Ching, JB, Petrylak, DP, Laliberte, R, Wang, J, Huang, B, Davis, C, Fowst, C, Costa, N, Blake-Haskins, JA, di Pietro, A, Grivas, P: Avelumab Maintenance Therapy for Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med*, 383: 1218-1230, 2020.
 26. Bellmunt, J, de Wit, R, Vaughn, DJ, Fradet, Y, Lee, JL, Fong, L, Vogelzang, NJ, Climent, MA, Petrylak, DP, Choueiri, TK, Necchi, A, Gerritsen, W, Gurney, H, Quinn, DI, Culine, S, Sternberg, CN, Mai, Y, Poehlein, CH, Perini, RF, Bajorin, DF, Investigators, K-: Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med*, 376: 1015-1026, 2017.

27. Keir, ME, Butte, MJ, Freeman, GJ, Sharpe, AH: PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*, 26: 677-704, 2008.
28. Zhang, X, Zhang, Y: Bladder Cancer and Genetic Mutations. *Cell Biochem Biophys*, 73: 65-69, 2015.
29. Jalanko, T, de Jong, JJ, Gibb, EA, Seiler, R, Black, PC: Genomic Subtyping in Bladder Cancer. *Curr Urol Rep*, 21: 9, 2020.
30. Cooley, LF, McLaughlin, KA, Meeks, JJ: Genomic and Therapeutic Landscape of Non-muscle-invasive Bladder Cancer. *Urol Clin North Am*, 47: 35-46, 2020.
31. Cancer Genome Atlas Research, N: Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*, 507: 315-322, 2014.
32. Robertson, AG, Kim, J, Al-Ahmadie, H, Bellmunt, J, Guo, G, Cherniack, AD, Hinoue, T, Laird, PW, Hoadley, KA, Akbani, R, Castro, MAA, Gibb, EA, Kanchi, RS, Gordenin, DA, Shukla, SA, Sanchez-Vega, F, Hansel, DE, Czerniak, BA, Reuter, VE, Su, X, de Sa Carvalho, B, Chagas, VS, Mungall, KL, Sadeghi, S, Pedamallu, CS, Lu, Y, Klimczak, LJ, Zhang, J, Choo, C, Ojesina, AI, Bullman, S, Leraas, KM, Lichtenberg, TM, Wu, CJ, Schultz, N, Getz, G, Meyerson, M, Mills, GB, McConkey, DJ, Network, TR, Weinstein, JN, Kwiatkowski, DJ, Lerner, SP: Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cell*, 171: 540-556 e525, 2017.
33. Warrick, JI, Walter, V, Yamashita, H, Chung, E, Shuman, L, Amponsa, VO, Zheng, Z, Chan, W, Whitcomb, TL, Yue, F, Iyyanki, T, Kawasawa, YI, Kaag, M, Guo, W, Raman, JD, Park, JS, DeGraff, DJ: FOXA1, GATA3 and PPAR Cooperate to Drive Luminal Subtype in Bladder Cancer: A Molecular Analysis of Established Human Cell Lines. *Scientific reports*, 6: 38531, 2016.
34. Choi, W, Porten, S, Kim, S, Willis, D, Plimack, ER, Hoffman-Censits, J, Roth, B, Cheng, T, Tran, M, Lee, IL, Melquist, J, Bondaruk, J, Majewski, T, Zhang, S, Pretzsch, S, Baggerly, K, Siefker-Radtke, A, Czerniak, B, Dinney, CP, McConkey, DJ: Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer Cell*, 25: 152-165, 2014.
35. Kriegmair, MC, Wirtz, RM, Worst, TS, Breyer, J, Ritter, M, Keck, B, Boehmer, C, Otto, W, Eckstein, M, Weis, CA, Hartmann, A, Bolenz, C, Erben, P: Prognostic Value of Molecular Breast Cancer Subtypes based on Her2, ESR1, PGR and Ki67 mRNA-Expression in Muscle Invasive Bladder Cancer. *Translational oncology*, 11: 467-476, 2018.
36. Meyer, TJ, Rosenkrantz, JL, Carbone, L, Chavez, SL: Endogenous Retroviruses: With Us and against Us. *Frontiers in chemistry*, 5: 23, 2017.
37. Johnson, WE: Endogenous Retroviruses in the Genomics Era. *Annual review of virology*, 2: 135-159, 2015.
38. Seifarth, W, Baust, C, Murr, A, Skladny, H, Krieg-Schneider, F, Blusch, J, Werner, T, Heilmann, R, Leib-Mosch, C: Proviral structure, chromosomal location, and expression of HERV-K-T47D, a novel human endogenous retrovirus derived from T47D particles. *Journal of virology*, 72: 8384-8391, 1998.
39. Gonzalez-Cao, M, Iduma, P, Karachaliou, N, Santarpia, M, Blanco, J, Rosell, R: Human endogenous retroviruses and cancer. *Cancer biology & medicine*, 13: 483-488, 2016.
40. de Parseval, N, Lazar, V, Casella, JF, Benit, L, Heidmann, T: Survey of human genes of retroviral origin: identification and transcriptome of the genes with coding capacity for complete envelope proteins. *Journal of virology*, 77: 10414-10422, 2003.

41. Kassiotis, G: Endogenous retroviruses and the development of cancer. *Journal of immunology*, 192: 1343-1349, 2014.
42. Weiss, RA: Human endogenous retroviruses: friend or foe? *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 124: 4-10, 2016.
43. Lavie, L, Kitova, M, Maldener, E, Meese, E, Mayer, J: CpG methylation directly regulates transcriptional activity of the human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2). *Journal of virology*, 79: 876-883, 2005.
44. Walsh, CP, Chaillet, JR, Bestor, TH: Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat Genet*, 20: 116-117, 1998.
45. Mager, DL, Lorincz, MC: Epigenetic modifier drugs trigger widespread transcription of endogenous retroviruses. *Nat Genet*, 49: 974-975, 2017.
46. Hsu, K, Lee, YK, Chew, A, Chiu, S, Lim, D, Greenhalgh, DG, Cho, K: Inherently variable responses to glucocorticoid stress among endogenous retroviruses isolated from 23 mouse strains. *Biochimica et biophysica acta*, 1863: 2594-2600, 2017.
47. Manghera, M, Ferguson-Parry, J, Lin, R, Douville, RN: NF-kappaB and IRF1 Induce Endogenous Retrovirus K Expression via Interferon-Stimulated Response Elements in Its 5' Long Terminal Repeat. *Journal of virology*, 90: 9338-9349, 2016.
48. Canadas, I, Thummalapalli, R, Kim, JW, Kitajima, S, Jenkins, RW, Christensen, CL, Campisi, M, Kuang, Y, Zhang, Y, Gjini, E, Zhang, G, Tian, T, Sen, DR, Miao, D, Imamura, Y, Thai, T, Piel, B, Terai, H, Aref, AR, Hagan, T, Koyama, S, Watanabe, M, Baba, H, Adeni, AE, Lydon, CA, Tamayo, P, Wei, Z, Herlyn, M, Barbie, TU, Uppaluri, R, Sholl, LM, Sicinska, E, Sands, J, Rodig, S, Wong, KK, Paweletz, CP, Watanabe, H, Barbie, DA: Tumor innate immunity primed by specific interferon-stimulated endogenous retroviruses. *Nat Med*, 24: 1143-1150, 2018.
49. Manghera, M: Endogenous retrovirus-K promoter: a landing strip for inflammatory transcription factors? ,
50. Hu, L, Uzhameckis, D, Hedborg, F, Blomberg, J: Dynamic and selective HERV RNA expression in neuroblastoma cells subjected to variation in oxygen tension and demethylation. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 124: 140-149, 2016.
51. Wang, GL, Jiang, BH, Rue, EA, Semenza, GL: Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 5510-5514, 1995.
52. Marxsen, JH, Stengel, P, Doege, K, Heikkinen, P, Jokilehto, T, Wagner, T, Jelkmann, W, Jaakkola, P, Metzen, E: Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) promotes its degradation by induction of HIF-alpha-prolyl-4-hydroxylases. *Biochem J*, 381: 761-767, 2004.
53. Jiang, BH, Semenza, GL, Bauer, C, Marti, HH: Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol*, 271: C1172-1180, 1996.
54. Jou, YC, Tsai, YS, Lin, CT, Tung, CL, Shen, CH, Tsai, HT, Yang, WH, Chang, HI, Chen, SY, Tzai, TS: Foxp3 enhances HIF-1alpha target gene expression in human bladder cancer through decreasing its ubiquitin-proteasomal degradation. *Oncotarget*, 7: 65403-65417, 2016.
55. Theodoropoulos, VE, Lazaris, A, Sofras, F, Gerzelis, I, Tsoukala, V, Ghikonti, I, Manikas, K, Kastriotis, I: Hypoxia-inducible factor 1 alpha expression

- correlates with angiogenesis and unfavorable prognosis in bladder cancer. *European urology*, 46: 200-208, 2004.
56. Kondo, Y, Hamada, J, Kobayashi, C, Nakamura, R, Suzuki, Y, Kimata, R, Nishimura, T, Kitagawa, T, Kunimoto, M, Imura, N, Hara, S: Over expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in renal and bladder cancer cells increases tumorigenic potency. *J Urol*, 173: 1762-1766, 2005.
57. Gifford, RJ, Blomberg, J, Coffin, JM, Fan, H, Heidmann, T, Mayer, J, Stoye, J, Tristem, M, Johnson, WE: Nomenclature for endogenous retrovirus (ERV) loci. *Retrovirology*, 15: 59, 2018.
58. Garcia-Montojo, M, Doucet-O'Hare, T, Henderson, L, Nath, A: Human endogenous retrovirus-K (HML-2): a comprehensive review. *Crit Rev Microbiol*, 44: 715-738, 2018.
59. Schmitt, K, Heyne, K, Roemer, K, Meese, E, Mayer, J: HERV-K(HML-2) rec and np9 transcripts not restricted to disease but present in many normal human tissues. *Mobile DNA*, 6: 4, 2015.
60. Hanke, K, Hohn, O, Bannert, N: HERV-K(HML-2), a seemingly silent subtenant - but still waters run deep. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 124: 67-87, 2016.
61. Magin-Lachmann, C, Hahn, S, Strobel, H, Held, U, Lower, J, Lower, R: Rec (formerly Corf) function requires interaction with a complex, folded RNA structure within its responsive element rather than binding to a discrete specific binding site. *Journal of virology*, 75: 10359-10371, 2001.
62. Armbruester, V, Sauter, M, Krautkraemer, E, Meese, E, Kleiman, A, Best, B, Roemer, K, Mueller-Lantzsch, N: A novel gene from the human endogenous retrovirus K expressed in transformed cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 8: 1800-1807, 2002.
63. Chen, T, Meng, Z, Gan, Y, Wang, X, Xu, F, Gu, Y, Xu, X, Tang, J, Zhou, H, Zhang, X, Gan, X, Van Ness, C, Xu, G, Huang, L, Zhang, X, Fang, Y, Wu, J, Zheng, S, Jin, J, Huang, W, Xu, R: The viral oncogene Np9 acts as a critical molecular switch for co-activating beta-catenin, ERK, Akt and Notch1 and promoting the growth of human leukemia stem/progenitor cells. *Leukemia*, 27: 1469-1478, 2013.
64. Denne, M, Sauter, M, Armbruester, V, Licht, JD, Roemer, K, Mueller-Lantzsch, N: Physical and functional interactions of human endogenous retrovirus proteins Np9 and rec with the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Journal of virology*, 81: 5607-5616, 2007.
65. Seifarth, W, Frank, O, Zeilfelder, U, Spiess, B, Greenwood, AD, Hehlmann, R, Leib-Mosch, C: Comprehensive analysis of human endogenous retrovirus transcriptional activity in human tissues with a retrovirus-specific microarray. *Journal of virology*, 79: 341-352, 2005.
66. Andersson, AC, Venables, PJ, Tonjes, RR, Scherer, J, Eriksson, L, Larsson, E: Developmental expression of HERV-R (ERV3) and HERV-K in human tissue. *Virology*, 297: 220-225, 2002.
67. Andersson, AC, Yun, Z, Sperber, GO, Larsson, E, Blomberg, J: ERV3 and related sequences in humans: structure and RNA expression. *Journal of virology*, 79: 9270-9284, 2005.
68. Hohn, O, Hanke, K, Bannert, N: HERV-K(HML-2), the Best Preserved Family of HERVs: Endogenization, Expression, and Implications in Health and Disease. *Frontiers in oncology*, 3: 246, 2013.

69. Jern, P, Coffin, JM: Effects of retroviruses on host genome function. *Annual review of genetics*, 42: 709-732, 2008.
70. Lin, L, Xu, B, Rote, NS: The cellular mechanism by which the human endogenous retrovirus ERV-3 env gene affects proliferation and differentiation in a human placental trophoblast model, *BeWo. Placenta*, 21: 73-78, 2000.
71. Ting, CN, Rosenberg, MP, Snow, CM, Samuelson, LC, Meisler, MH: Endogenous retroviral sequences are required for tissue-specific expression of a human salivary amylase gene. *Genes Dev*, 6: 1457-1465, 1992.
72. Douville, RN, Nath, A: Human endogenous retroviruses and the nervous system. *Handb Clin Neurol*, 123: 465-485, 2014.
73. Christensen, T: Human endogenous retroviruses in neurologic disease. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 124: 116-126, 2016.
74. Schiavetti, F, Thonnard, J, Colau, D, Boon, T, Coulie, PG: A human endogenous retroviral sequence encoding an antigen recognized on melanoma by cytolytic T lymphocytes. *Cancer research*, 62: 5510-5516, 2002.
75. Cegolon, L, Salata, C, Weiderpass, E, Vineis, P, Palu, G, Mastrangelo, G: Human endogenous retroviruses and cancer prevention: evidence and prospects. *BMC cancer*, 13: 4, 2013.
76. Wang-Johanning, F, Frost, AR, Johanning, GL, Khazaeli, MB, LoBuglio, AF, Shaw, DR, Strong, TV: Expression of human endogenous retrovirus k envelope transcripts in human breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 7: 1553-1560, 2001.
77. Wang-Johanning, F, Radvanyi, L, Rycaj, K, Plummer, JB, Yan, P, Sastry, KJ, Piyathilake, CJ, Hunt, KK, Johanning, GL: Human endogenous retrovirus K triggers an antigen-specific immune response in breast cancer patients. *Cancer research*, 68: 5869-5877, 2008.
78. Wang-Johanning, F, Li, M, Esteva, FJ, Hess, KR, Yin, B, Rycaj, K, Plummer, JB, Garza, JG, Ambs, S, Johanning, GL: Human endogenous retrovirus type K antibodies and mRNA as serum biomarkers of early-stage breast cancer. *International journal of cancer*, 134: 587-595, 2014.
79. Buslei, R, Strissel, PL, Henke, C, Schey, R, Lang, N, Ruebner, M, Stolt, CC, Fabry, B, Buchfelder, M, Strick, R: Activation and regulation of endogenous retroviral genes in the human pituitary gland and related endocrine tumours. *Neuropathology and applied neurobiology*, 41: 180-200, 2015.
80. Strissel, PL, Ruebner, M, Thiel, F, Wachter, D, Ekici, AB, Wolf, F, Thieme, F, Ruprecht, K, Beckmann, MW, Strick, R: Reactivation of codogenic endogenous retroviral (ERV) envelope genes in human endometrial carcinoma and prestages: Emergence of new molecular targets. *Oncotarget*, 3: 1204-1219, 2012.
81. Zhou, F, Li, M, Wei, Y, Lin, K, Lu, Y, Shen, J, Johanning, GL, Wang-Johanning, F: Activation of HERV-K Env protein is essential for tumorigenesis and metastasis of breast cancer cells. *Oncotarget*, 7: 84093-84117, 2016.
82. Li, M, Radvanyi, L, Yin, B, Rycaj, K, Li, J, Chivukula, R, Lin, K, Lu, Y, Shen, J, Chang, DZ, Li, D, Johanning, GL, Wang-Johanning, F: Downregulation of Human Endogenous Retrovirus Type K (HERV-K) Viral env RNA in Pancreatic Cancer Cells Decreases Cell Proliferation and Tumor Growth. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 23: 5892-5911, 2017.

83. Giebler, M, Staeger, MS, Blauschmidt, S, Ohm, LI, Kraus, M, Wurl, P, Taubert, H, Greither, T: Elevated HERV-K Expression in Soft Tissue Sarcoma Is Associated with Worsened Relapse-Free Survival. *Front Microbiol*, 9: 211, 2018.
84. Gosenca, D, Gabriel, U, Steidler, A, Mayer, J, Diem, O, Erben, P, Fabarius, A, Leib-Mosch, C, Hofmann, WK, Seifarth, W: HERV-E-mediated modulation of PLA2G4A transcription in urothelial carcinoma. *PLoS one*, 7: e49341, 2012.
85. Kreimer, U, Schulz, WA, Koch, A, Niegisch, G, Goering, W: HERV-K and LINE-1 DNA Methylation and Reexpression in Urothelial Carcinoma. *Frontiers in oncology*, 3: 255, 2013.
86. Nientiedt, M, Muller, K, Nitschke, K, Erben, P, Steidler, A, Porubsky, S, Popovic, ZV, Waldbillig, F, Muhlbauer, J, Kriegmair, MC: B-MYB-p53-related relevant regulator for the progression of clear cell renal cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 147: 129-138, 2021.
87. Hockel, M, Vaupel, P: Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *Journal of the National Cancer Institute*, 93: 266-276, 2001.
88. Blond, JL, Beseme, F, Duret, L, Bouton, O, Bedin, F, Perron, H, Mandrand, B, Mallet, F: Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family. *Journal of virology*, 73: 1175-1185, 1999.
89. Oja, M, Peltonen, J, Blomberg, J, Kaski, S: Methods for estimating human endogenous retrovirus activities from EST databases. *BMC Bioinformatics*, 8 Suppl 2: S11, 2007.
90. Perot, P, Mugnier, N, Montgiraud, C, Gimenez, J, Jaillard, M, Bonnaud, B, Mallet, F: Microarray-based sketches of the HERV transcriptome landscape. *PLoS one*, 7: e40194, 2012.
91. Buscher, K, Trefzer, U, Hofmann, M, Sterry, W, Kurth, R, Denner, J: Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines. *Cancer research*, 65: 4172-4180, 2005.
92. Wang-Johanning, F, Liu, J, Rycaj, K, Huang, M, Tsai, K, Rosen, DG, Chen, DT, Lu, DW, Barnhart, KF, Johanning, GL: Expression of multiple human endogenous retrovirus surface envelope proteins in ovarian cancer. *International journal of cancer*, 120: 81-90, 2007.
93. Reis, BS, Jungbluth, AA, Frosina, D, Holz, M, Ritter, E, Nakayama, E, Ishida, T, Obata, Y, Carver, B, Scher, H, Scardino, PT, Slovin, S, Subudhi, SK, Reuter, VE, Savage, C, Allison, JP, Melamed, J, Jager, E, Ritter, G, Old, LJ, Gnjatic, S: Prostate cancer progression correlates with increased humoral immune response to a human endogenous retrovirus GAG protein. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 19: 6112-6125, 2013.
94. Biton, A, Bernard-Pierrot, I, Lou, Y, Krucker, C, Chapeaublanc, E, Rubio-Perez, C, Lopez-Bigas, N, Kamoun, A, Neuzillet, Y, Gestraud, P, Grieco, L, Rebouissou, S, de Reynies, A, Benhamou, S, Leuret, T, Southgate, J, Barillot, E, Allory, Y, Zinovyev, A, Radvanyi, F: Independent component analysis uncovers the landscape of the bladder tumor transcriptome and reveals insights into luminal and basal subtypes. *Cell Rep*, 9: 1235-1245, 2014.
95. Armbruster, V, Sauter, M, Roemer, K, Best, B, Hahn, S, Nty, A, Schmid, A, Philipp, S, Mueller, A, Mueller-Lantzsch, N: Np9 protein of human endogenous retrovirus K interacts with ligand of numb protein X. *Journal of virology*, 78: 10310-10319, 2004.

96. Chan, SM, Sapir, T, Park, SS, Rual, JF, Contreras-Galindo, R, Reiner, O, Markovitz, DM: The HERV-K accessory protein Np9 controls viability and migration of teratocarcinoma cells. *PloS one*, 14: e0212970, 2019.
97. Alspach, E, Lussier, DM, Schreiber, RD: Interferon gamma and Its Important Roles in Promoting and Inhibiting Spontaneous and Therapeutic Cancer Immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 11, 2019.
98. Darnell, JE, Jr., Kerr, IM, Stark, GR: Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, 264: 1415-1421, 1994.
99. Said, EA, Dupuy, FP, Trautmann, L, Zhang, Y, Shi, Y, El-Far, M, Hill, BJ, Noto, A, Ancuta, P, Peretz, Y, Fonseca, SG, Van Grevenynghe, J, Boulassel, MR, Bruneau, J, Shoukry, NH, Routy, JP, Douek, DC, Haddad, EK, Sekaly, RP: Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection. *Nat Med*, 16: 452-459, 2010.
100. Yu, Y: Molecular classification and precision therapy of cancer: immune checkpoint inhibitors. *Front Med*, 2017.
101. Morozov, VA, Dao Thi, VL, Denner, J: The transmembrane protein of the human endogenous retrovirus--K (HERV-K) modulates cytokine release and gene expression. *PloS one*, 8: e70399, 2013.
102. Dummer, W, Becker, JC, Schwaaf, A, Leverkus, M, Moll, T, Brocker, EB: Elevated serum levels of interleukin-10 in patients with metastatic malignant melanoma. *Melanoma Res*, 5: 67-68, 1995.
103. Gao, Y, Lu, J, Zeng, C, Yang, J, Huang, B, Zhang, N, Li, L, Fu, X: IL-10 suppresses IFN-gamma-mediated signaling in lung adenocarcinoma. *Clin Exp Med*, 20: 449-459, 2020.
104. Wang, X, Ni, S, Chen, Q, Ma, L, Jiao, Z, Wang, C, Jia, G: Bladder cancer cells induce immunosuppression of T cells by supporting PD-L1 expression in tumour macrophages partially through interleukin 10. *Cell Biol Int*, 41: 177-186, 2017.
105. Fechner, G, Muller, G, Schmidt, D, Garbe, S, Hauser, S, Vaupel, P, Muller, SC: Evaluation of hypoxia-mediated growth factors in a novel bladder cancer animal model. *Anticancer research*, 27: 4225-4231, 2007.
106. Wang-Johanning, F, Rycaj, K, Plummer, JB, Li, M, Yin, B, Frerich, K, Garza, JG, Shen, J, Lin, K, Yan, P, Glynn, SA, Dorsey, TH, Hunt, KK, Ambs, S, Johanning, GL: Immunotherapeutic potential of anti-human endogenous retrovirus-K envelope protein antibodies in targeting breast tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, 104: 189-210, 2012.

7 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname:	Höfflin, Florian Alexander
Geburtsdatum:	05.09.1993
Geburtsort:	Freiburg im Breisgau
Familienstand:	ledig
Vater:	Dr. med. Johannes Höfflin
Mutter:	Silke Höfflin

SCHULISCHER WERDEGANG

1999-2003	Otto-Raup-Schule Denzlingen
2003-2012	Erasmus-Gymnasium Denzlingen
27.06.2012	Abitur

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS2013/14	Beginn des Studiums der Humanmedizin An der medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg
02.09.2015	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)
2015 – 2021	Hauptstudium
13.04.-15.04.2021	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)
07.06.2021	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M3)

8 DANKSAGUNG

Ich danke Prof. Philipp Erben für die Möglichkeit diese Thematik zu untersuchen und ich hoffe ich konnte damit einen Grundstein für weitere Forschungen an den ERV im urologischen Forschungslabor Mannheim legen.

Ausdrücklich dankbar bin ich allen Mitarbeitern des Forschungslabors für ihre unendliche Geduld und Hilfsbereitschaft während meiner Forschungsphase und Versuche dort.

Ebenso danke ich Dr. med. Jonas Jarczyk für die mehrmalige Durchsicht meiner Arbeit und die vielen Hinweise bei etlichen Treffen, die bis zur Vollendung derselben notwendig waren.