Aus der Klinik der Urologie, Uro-Onkologie, spezielle urologischen und roboterassistierte Chirurgie der Universität zu Köln
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h.c. Axel Heidenreich

Ein neuer Signaltransduktionsweg für muskelinvasive Urothelkarzinome

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Julie Lina Kristin Brunner
aus Köln

promoviert am 17. Juli 2023

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
2023

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachterin: Privatdozentin Dr. rer. medic. M. Freifrau von Brandenstein
2. Gutachterin: Privatdozentin Dr. med. L. Nogová

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Frau Priv.-Doz. Dr. rer. medic. Melanie Freifrau von Brandenstein
Frau Barbara Köditz

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Frau von Brandenstein von mir selbst ausgeführt worden. Die Zelllinie wurde von mir zunächst unter Anleitung durch Frau von Brandenstein in Kultur genommen, später wurde die Kultivierung der Zellen von mir selbstständig durchgeführt. Die Behandlung der Zellen wurde von mir nach Erlernen der Methode selbstständig durchgeführt. Alle weiteren Experimente wurden im ersten Durchgang von mir unter Anleitung von Frau von Brandenstein durchgeführt und bei erneuter Durchführung des gleichen Experiments von mir selbstständig. Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau von Brandenstein und Frau Köditz.

Die Endversion ist nach den Vorgaben des Merkblattes Zulassung Promotionsverfahren Stand August 2022.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 11.01.2023

Unterschrift: Julie Brunner

Danksagung

Bei Klinikdirektor Prof. Heidenreich möchte ich mich für die Möglichkeit der Durchführung meiner Promotion und die Aufnahme in die Arbeitsgruppe bedanken. Ganz besonders danken möchte ich Frau PD Dr. von Brandenstein, die mich sowohl bei der Durchführung der Experimente als auch bei Anfertigung der Dissertation stets tatkräftig unterstützt hat. Zudem bedanke ich mich bei ihr für die gute Zusammenarbeit bei der Entwicklung und ständigen Evaluation meines Projekts. Die Betreuung wurde von mir als sehr kompetent und dennoch persönlich empfunden, was ich sehr wertschätze. Nur durch ihre Hilfe, Kritik und Verbesserungsvorschläge konnte ich dieses Projekt zu Ende führen. Außerdem bedanke ich mich bei ihr für die Toleranz und Nachsichtigkeit für unerfahrene Medizinstudierende, die das erste Mal in einem experimentellen Labor arbeiten. Außerdem bedanke ich mich beim gesamten Team des Labors für experimentelle Urologie, insbesondere bei Frau Köditz für die konstruktive Kritik und für all die Ratschläge und Hilfe, die ich erhalten habe.

Für die finanzielle Förderung durch das Köln Fortune Programm möchte ich mich ebenfalls sehr bedanken. Die Idee, Medizinstudierende zu experimentellen Promotionen zu motivieren und zu fördern, erscheint mir rückblickend sehr wichtig und ich bin froh, diesen Weg gegangen zu sein.

Des Weiteren möchte ich meinen Eltern und Großeltern für die moralische und finanzielle Unterstützung danken. Nicht einmal eine Pandemie und die damit verbundenen Schwierigkeiten konnte sie vom Glauben abbringen, dass ich diese Promotion zu Ende führen werde. Auch meiner Schwester möchte ich besonders danken, die mich so häufig mit motivierenden Worten und guten Ratschlägen bestärkt hat. Diese tiefe Überzeugung, die meine Familie mir gegenüber schon immer entgegenbringt, gibt mir Kraft und Motivation für die Herausforderungen im Leben.

Zuletzt möchte ich mich bei der Silvretta Montafon bedanken, in deren schneebedeckten Bergen ein Großteil meiner Dissertationsschrift entstanden ist. Die inspirierende Umgebung und der sportliche Ausgleich erleichterten die Anfertigung meiner Promotionsarbeit in hohem Maße.

Für alle Patient:innen mit Urothelkarzinomen, deren Diagnosen verspätet gestellt wurden.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 9

1. ZUSAMMENFASSUNG 11

2. EINLEITUNG 13

2.1. Das Urothelkarzinom 13
2.1.1. Urothel 13
2.1.2. Epidemiologie 14
2.1.3. Ätiologie und Risikofaktoren 15
2.1.4. Pathogenese 15
2.1.5. Symptomatik 15
2.1.6. Klassifikation 16
2.1.7. Diagnostik und Therapie 17
2.1.8. Prognose und ökonomische Relevanz des Urothelkarzinoms 17
2.1.9. Geschlechterspezifische Verteilung 18

2.2. Der Östrogenrezeptor 18
2.2.1. Die Funktionsweise des Östrogenrezeptors 19
2.2.2. Östrogenrezeptoren in Urothelkarzinomen 19
2.2.3. Östrogenrezeptoren in anderen Tumorerkrankungen 20
2.2.4. Zusammenhang mit Endothelin-1 21

2.3. Das Endothelin-System 22
2.3.1. Endothelin-1 22
2.3.2. Endothelin-Rezeptoren 23
2.3.3. Endothelin in der Karzinogenese 24
2.3.4. Endothelin in Urothelkarzinomen 24
2.3.5. Der Zusammenhang von ET-1 und dem Androgenrezeptor 24

2.4. Der Androgenrezeptor 25
2.4.1. Die Funktionsweise des Androgenrezeptors 25
2.4.2. Der Androgenrezeptor in der Karzinogenese 25
2.4.3. Der Androgenrezeptor in Urothelkarzinomen 26
2.4.4. Der Zusammenhang mit dem Östrogenrezeptor 26

2.5. MiRNA-708 27
2.5.1. Die Funktionsweise von Micro-RNAs 27
2.5.2. Micro-RNAs und Östrogenrezeptoren 27

2.5.3. Die miRNA-708 in der Karzinogenese 28
2.5.4. Die miRNA-708 in Urothelkarzinomen 28

2.6. E-Cadherin 29
2.6.1. Die Funktionsweise von E-Cadherin 29
2.6.2. Folgen des Verlusts von E-Cadherin 29
2.6.3. E-Cadherin in der Karzinogenese 30

2.7. Ein möglicher Signalweg zur Entstehung des Urothelkarzinoms 30

2.8. Fragestellungen und Ziel der Arbeit 32

3. MATERIAL UND METHODEN 33

3.1. Material 33
3.1.1. Zelllinien 33
3.1.2. Chemikalien und Lösungen für die Zellkultur 33
3.1.3. Stimulanzien 33
3.1.4. Geräte 34
3.1.5. Verbrauchsmaterialien 34
3.1.6. Chemikalien und Lösungen 35
3.1.7. Antikörper 36
3.1.8. Puffer und Lösungen 37
3.1.9. Kits 38
3.1.10. PCR 38
3.1.11. Primer 38

3.2. Methoden 38
3.2.1. Kulturbedingungen 38
3.2.2. Zählen der Zellen 39
3.2.3. Passagieren der Zellen 39
3.2.4. Zellstimulation 39
3.2.5. Scratch Assay 40
3.2.6. Totale Proteinextraktion 40
3.2.7. Bradford Assay 40
3.2.8. Immunopräzipitation (IP) 41
3.2.9. SDS-Polyacrylamid-Gelelektropherese (SDS-Page) 41
3.2.10. Western Blot 42
3.2.11. AR-Pulldown-ERß-Interaktion 43
3.2.12. Nukleäre und cytoplasmatische Isoloation von HTB-9-Zellen 43
3.2.13. DNA-Isolation 43
3.2.14. ERß-Pulldown-pri-miRNA-708 44

3.2.15. RNA-Isolation 44
3.2.16. miRNA-Isolation 45
3.2.17. Real time polymerase chain reaction (RT-PCR) 45
3.2.18. Quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) 46
3.2.19. Agarose Gel 46
3.2.20. Polyacrylamid Gel 46

3.3. Statistische Auswertung 47

4. ERGEBNISSE 48

4.1. Gesteigerte Zellmigration nach Behandlung mit ß-Estradiol und Withaferin 48

4.2. ET-1 bildet einen Komplex mit AR 48

4.3. AR bindet intranukleäre ERß-DNA 49

4.4. Behandlung mit ß-Estradiol und Withaferin steigert die Expression von ERß 50

4.5. Hochregulierung von ERß steigert die Expression der miRNA-708 50

4.6. ERß bindet die pri-miRNA-708 51

4.7. Hochregulierung von miRNA-708 vermindert die Bildung von E-Cadherin 51

5. DISKUSSION 53

5.1. ß-Estradiol und Withaferin erhöhen die Teilungsrate von HTB-9 53

5.2. Der Komplex aus ET-1 und AR 53

5.3. AR aktiviert ERß 54

5.4. ERß erhöht die Expression der miRNA-708 55

5.5. miRNA-708 verringert E-Cadherin 56

5.6. Ausblick 57

6. LITERATURVERZEICHNIS 59

7. ANHANG 69

7.1. Scratch Assay Fotos 69

7.2. Western Blot Originalbilder **72**

7.3. Abbildungsverzeichnis **72**

7.4. Tabellenverzeichnis **74**

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AR	Androgenrezeptor
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
DAPI	4′,6-diamidino-2-phenylindole
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Östrogenrezeptor
ERa	Östrogenrezeptor alpha
ERß	Östrogenrezeptor beta
ET-1	Endothelin-1
ET-2	Endothelin-2
ET-3	Endothelin-3
ETAR	Endothelinrezeptor A
ETBR	Endothelinrezeptor B
ETR	Endothelinrezeptor
FBS	Fetales bovines Serum
g	G-Zahl für Zentrifugen
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
G-Protein	Guanodintriphosphat-bindendes Protein
H2O	Wasser
HTB-9	Human bladder carcinoma cell line
IL-6	Interleukin-6
IP	Immunopräzipitation
LHRH	Luteinisierendes-Hormon-Releasing-Hormon
kDA	Kilodalton
mA	Milliampere
MIBC	Muscle-invasive bladder cancer
miRNA	MicroRNA

ml	Milliliter
nm	Nanometer
NMIBC	Non-muscle-invasive bladder cancer
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Pri-miRNA	Primäre MicroRNA
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Rounds per minute
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris-buffered saline with Tween20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
Tris	Tri(hydroxymethyl-)aminomethan
TUR	Transurethrale Resektion
U	Unit
V	Volt
v/v	Volume percentage
Vim3	Vimentin 3
w/v	Weight percentage
µ	Micro

1. Zusammenfassung

Das Urothelkarzinom ist die zweithäufigste urologische Tumorerkrankung und wird in den meisten Fällen durch das Leitsymptom schmerzlose Makrohämaturie auffällig. Die Diagnose erfolgt häufig erst sehr spät, da Schmerzen und Veränderungen des Urins erst in fortgeschrittenen Krankheitsstadien auftreten. Der Hauptrisikofaktor ist das Rauchen, die genaue Ätiologie und Pathogenese sind jedoch unklar. Sobald ein Tumor den Detrusormuskel der Harnblase infiltriert, wird er als muskelinvasiv bezeichnet. Davon unterschieden werden nicht-muskelinvasive Urothelkarzinome, die oft noch durch eine transurethrale Resektion entfernt werden können. Invasive Karzinome hingegen müssen durch eine radikale Zystektomie mit systemischer Therapie behandelt werden. Die lebenslange Nachsorge und die mögliche Progression von nicht-invasiven zu invasiven Tumoren machen das Urothelkarzinom ökonomisch relevant.

Männer sind von Urothelkarzinomen zwar viermal häufiger betroffen als Frauen, allerdings ist die Rate an muskelinvasiven Karzinomen bei Frauen höher. Darüber hinaus erfolgt die Prognose bei Frauen häufiger in bereits fortgeschrittenen Stadien, was die Prognose verschlechtert und mit einer erhöhten Mortalität einhergeht. Diese geschlechterspezifischen Unterschiede lassen mögliche Rückschlüsse auf den Einfluss von Hormonen auf die Pathogenese zu. Zusammenhänge zwischen Urothelkarzinomen und Östrogenrezeptoren wurden bereits in der Literatur beschrieben. Der prädominante Rezeptor ist hier der Östrogenrezeptor beta, der in ausschließlich allen Proben von radikal zystektomierten Urothelkarzinomen nachgewiesen werden konnte. Östrogenrezeptoren wirken als Transkriptionsfaktoren intranukleär und können die Produktion anderer Onkogene anregen. Ebenfalls konnte eine vermehrte Expression der miRNA-708 in Urothelkarzinomen beschrieben werden. Normalerweise kann diese im Urothel nur in geringen Mengen nachgewiesen werden. Außerdem bekannt ist eine Verminderung des Glykoproteins E-Cadherin bei Urothelkarzinomen, die mit einer erhöhten Metastasierungsrate und Invasivität einhergeht. Um aktiviert zu werden, benötigen Östrogenrezeptoren eine Stimulation. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde die Aktivierung von Östrogenrezeptoren durch Endothelin-1 bei Mammakarzinomen beschrieben. Die Translokalisation vom Cytoplasma in den Zellkern geschieht über einen weiteren Rezeptor. Bei Mammakarzinomen konnte eine vermehrte Expression von Östrogenrezeptoren nach Zugabe eines Androgenliganden beobachtet werden.

Dieses Projekt zielt darauf ab, die einzelnen Bausteine in Beziehung zueinander zu setzen und damit einen möglicherweise wichtigen Signaltransduktionsweg von muskelinvasiven Urothelkarzinomen zu entschlüsseln. Dafür wurde eine Zelllinie eines muskelinvasiven

Urothelkarzinoms in Kultur genommen und Behandlungen mit Endothelin-1, Endothelinrezeptorblockern, ß-Estradiol und Withaferin durchgeführt. Mit den behandelten Zellen wurden Experimente durchgeführt, um die oben genannten Mitspieler der Signalkaskade nachzuweisen und in Verbindung zu setzen. Dabei konnten wir den Androgenrezeptor in den mit ET-1 behandelten Zellen vermehrt nachweisen. Ebenfalls kam es in den behandelten Zellen zu einem Anstieg von ERß. Vor allem die Zellen, die mit ß-Estradiol und Withaferin behandelt wurden, zeigten eine erhöhte Expression von ERß. In diesen Behandlungen demonstrierten wir außerdem eine vermehrte Bildung der miRNA-708. Nach Zugabe eines ERß Antikörpers konnte die Bindung an die pri-miRNA-708 nachgewiesen werden. Zuletzt konnte eine verminderte Expression von E-Cadherin in den mit Withaferin und ß-Estradiol behandelten Zellen gezeigt werden.

Zusammenfassend konnten wir alle Rezeptoren und Proteine, bei denen wir einen Zusammenhang mit der Pathogenese des Urothelkarzinoms vermuteten, durch unsere Experimente nachweisen und einen möglicherweise wichtigen Signaltransduktionsweg analysieren. Dieser beginnt mit der Interaktion von ET-1 und dem AR. Dieser Komplex wandert in den Zellkern und ist für die Produktion von ERß mitverantwortlich. Die Überexpression von ERß ist wiederum für die Erhöhung der miRNA-708 verantwortlich. Aufgrund der vermehrten Expression der miRNA-708 wird E-Cadherin herunterreguliert. Niedrige Spiegel von E-Cadherin führen laut aktueller Literatur zu einem Verlust der Zellintegrität und zur Invasion des Urothelkarzinoms.

Diese Ergebnisse bieten Ansatzpunkte für zukünftige Forschungen hinsichtlich Diagnostik und Therapie von Urothelkarzinomen. Für die Entwicklung eines nichtinvasiven Tumormarkers ist geplant, E-Cadherin und die miRNA-708 in Urin nachzuweisen. Ein weiteres Projekt unserer Arbeitsgruppe sieht die Testung von Androgendeprivationstherapien bei Urothelkarzinomen vor. Ebenfalls von Interesse wären spezielle ERß-Blocker, insbesondere im Hinblick auf zukünftige mögliche Kombinationstherapien.

2. Einleitung

Das Urothelkarzinom ist sowohl durch die hohe Inzidenz und schlechte Prognose als auch durch die ökonomische Belastung klinisch und systemisch relevant. Die Möglichkeiten der Diagnose und Therapie sollen Gegenstand aktueller Forschungen sein und optimiert werden. Dabei stellt die Entschlüsselung des Signalwegs der Karzinogenese den ersten Schritt dar. In diesem Projekt verfolgt unsere Arbeitsgruppe das Ziel, insbesondere herauszufinden, welche Mitspieler in der Signalkaskade von Relevanz sind und wie sie sich gegenseitig beeinflussen. Weiterhin gilt es, herauszufinden, wie sie gegebenenfalls diagnostisch und therapeutisch von Nutzen sein können.

2.1. Das Urothelkarzinom

Harnblasenkarzinome sind maligne Entartungen, die in 95% der Fälle vom Urothel ausgehen [1]. Dabei ist das Urothelkarzinom die vierthäufigste bösartige Tumorentität des Mannes [2] und die häufigste Tumorerkrankung des Urogenitaltraktes [3]. Durch die steigende Inzidenz und die Notwendigkeit einer lebenslangen Nachsorge wird es auch in Zukunft ökonomisch immer relevanter [1,4]. Die maligne Entartung kann im gesamten, von Urothel ausgekleideten Harntrakt entstehen [1].

2.1.1. Urothel

Urothel bezeichnet dabei ein spezifisches Übergangsepithel, welches die Mukosa der ableitenden Harnwege vom Nierenkelchsystem bis zur Urethra bedeckt [5]. Es ist ein mehrschichtiges Epithel, dessen Höhe je nach Bereich der ableitenden Harnwege variiert. Im Nierenbecken sind somit 2-3, im Ureter 3-5 und in der Harnblase bis zu 7 Zelllagen zu finden [6]. Die zum Lumen gerichtete Schicht wird von sogenannten Deckzellen gebildet, welche eine basale und eine intermediäre Zellschicht schirmartig überdeckt [7]. Diese Deckzellen sind spezifisch für das Urothel der ableitenden Harnwege [7]. Sie sind luminal von einer sialinsäurehaltigen Mukopolysaccharidschicht überzogen [7]. Die Unversehrtheit der Deckzellen ist notwendig, um das Epithel vor Infektionen oder schädlichen Substanzen aus dem Urin zu schützen [6].

Das Urothel ist ein Übergangsepithel, welches sich je nach Füllungsstand der ableitenden Harnwege ausdehnen oder zusammenziehen kann [5]. Das geschieht einerseits durch die Abflachung der einzelnen Zellen in der basalen und intermediären Schicht bei Dehnung im Lumen [5] und andererseits auch durch die Anpassungsfähigkeit der Deckzellen [8]. Deckzellen besitzen in ihrer Zellmembran flexible Platten, die ebenfalls bei höherem Füllungsstand eingebaut und zurückverlagert werden können [8].

Die einzelnen Zellschichten sind unter normalen Umständen gut voneinander abzugrenzen [9]. Durch Inflammation oder durch maligne Prozesse und Entartungen kann sich das Urothel verändern [9]. In Folge dessen können Hyperplasien, Dysplasien und Karzinome entstehen [9].

2.1.2. Epidemiologie

Das Urothelkarzinom der Harnblase ist der häufigste maligne Tumor der ableitenden Harnwege [10] und die zweithäufigste urologische maligne Tumorentität [1]. Im Jahre 2012 konnten bei Männern 11.270 Neuerkrankungen mit einem Urothelkarzinom in Deutschland verzeichnet werden, bei Frauen waren es 4.140 [2]. Damit ist das Urothelkarzinom die vierthäufigste Tumorerkrankung des Mannes [2]. Bei Frauen steht es an vierzehnter Stelle [2]. Männer sind somit viermal häufiger betroffen als Frauen [3].

Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 74 (männlich) beziehungsweise 76 (weiblich) Jahren [2]. Die absolute 10-Jahres-Überlebensrate betrug zum Zeitpunkt dieser statistischen Erhebung 32% bei Männern und 28% bei Frauen [2]. Dabei ist zu beachten, dass bei diesen Messungen die nicht-invasiven Karzinome nicht mitberücksichtigt wurden [2]. Wenn man diese allerdings einbezöge, würde sich die Zahl der Neuerkrankungen und der Prävalenz nahezu verdoppeln [2]. Vor diesem Hintergrund könnte man vermuten, dass der prozentuale Anteil an Urothelkarzinomen bezogen auf alle Tumorerkrankungen höher sein müsste, als es statistisch dargestellt wird. Der hohe Anteil von Urothelkarzinomen der Harnblase an Tumorerkrankungen wird dadurch erklärt, dass die Progressionsrate von nicht-muskelinvasiven Karzinomen niedrig ist und sich der Krankheitsverlauf oft über viele Jahre zieht [1]. Außerdem ist die Todesrate mit 4,3 pro 100.000 Männern und Frauen im Vergleich mit anderen Tumorpathologien eher gering [11].

Die steigende Inzidenz lässt sich mitunter durch den demographischen Wandel erklären [1]. Das Urothelkarzinom ist eine Tumorerkrankung des hohen Alters [1]. Je älter die Gesellschaft wird, desto häufiger wird diese Erkrankung diagnostiziert. Zu berücksichtigen ist dabei die geographische Verteilung der Inzidenzentwicklung [1]. In Europa und den USA konnte in den letzten Jahren ein leichter Rückgang der Inzidenz beobachtet werden [1]. In Entwicklungsländern ist die Inzidenz zwar gegenüber Europa und den USA geringer, allerdings wird in diesen Ländern in den nächsten Jahren eine Progression zu erwarten sein [1]. Diese Beobachtung ist auf die sich ändernden Expositionsverhältnisse gegenüber Risikofaktoren zurückzuführen. [1] Außerdem ist davon auszugehen, dass in Entwicklungsländern viele Erkrankungen unerkannt bleiben, da die Versorgung unzureichend und die Datenerhebung lückenhaft ist. Dadurch ist ein Vergleich mit den westlichen Ländern schwierig.

2.1.3. Ätiologie und Risikofaktoren

Während die Ätiologie von 80% der Harnblasentumoren ungeklärt bleibt [12], sind jedoch einige Risikofaktoren bekannt, die zu der Entstehung einer Urothelkarzinoms beitragen können. Diese sind unter anderem eine erhöhte Exposition gegenüber einer Reihe von industriellen Noxen, wie bestimmten aromatischen Aminen und die Einnahme verschiedener Medikamente, unter anderem Cyclophosphamid [2]. Den wichtigsten Risikofaktor stellt allerdings eindeutig der Nikotinabusus dar [1,2,12]. Das Rauchen von Tabak wird dabei nicht nur als Risikofaktor, sondern als wesentliche Ursache für die Karzinogenese eingestuft [2]. Tabak enthält bekanntlich verschiedene karzinogene Substanzen, die zu Doppelstrangbrüchen in der DNA, zu einem Basenaustausch und zur Entstehung von DNA-Addukten führen können [13]. Raucher haben gegenüber Nichtrauchern ein etwa zwei- bis sechsfach höheres Risiko, an einem Urothelkarzinom zu erkranken [14]. Durch die Nikotinentwöhnung kann dieses Risiko nachweislich wieder gesenkt werden [15]. In Entwicklungsländern konnte man in den letzten Jahren einen Zuwachs der rauchenden Bevölkerung verzeichnen, während der Trend in Industrienationen eher abnahm [16]. Aus diesen Entwicklungen lässt sich möglicherweise die zu erwartende Veränderung in der geographischen Verteilung der Neuerkrankungen ableiten.

2.1.4. Pathogenese

Man geht davon aus, dass die Karzinogenese von Urothelkarzinomen multifaktoriell verläuft. Schlussendlich erhöhen die genannten Risikofaktoren die Wahrscheinlichkeit einer genetischen Mutation [13], die dann über einen mehrstufigen Prozess die Entstehung einer Epithelhyperplasie initiieren kann [17]. Diese bildet den Ursprung einer malignen Formation [17]. Die Transformation von gesunden Zellen zu malignen wird dabei maßgeblich von Umwelt- und/oder Erbfaktoren bestimmt [17]. Genetische Alterationen führen weiterhin zu einer erhöhten Expression bestimmter Zielgene, welche für Tumorinitiation und -progression verantwortlich sein können [17,18]. Da epigenetische Prozesse scheinbar eine ausschlaggebende Rolle bei der Entstehung des Urothelkarzinoms spielen, können und sollen Erkenntnisse über die Pathogenese die Grundlage für diagnostische und therapeutische Möglichkeiten zukünftig revolutionieren [19].

2.1.5. Symptomatik

Das klassische Leitsymptom des Urothelkarzinoms ist die schmerzlose Makrohämaturie [20]. Weiterhin können Symptome wie Oligurie, Dysurie und Pollakisurie auftreten [20]. Erst in fortgeschritteneren Stadien kommt es zu Inkontinenz, Harnstau mit einhergehenden Flankenschmerzen und B-Symptomatik [20,21]. Da die schmerzlose Hämaturie initial meist das einzige Symptom ist, besteht die Gefahr einer verspäteten Diagnose und somit einer erhöhten Mortalität [22,23].

2.1.6. Klassifikation

Tumoren des Urothels können entweder klassisch nach der TNM-Klassifikation eingeteilt werden [2]. Gebräuchlicher ist jedoch die WHO-Klassifikation nach dem Differenzierungsgrad [2]. Die Einteilung erfolgt dabei in invasive (muscle-invasive bladder cancer, MIBC) und nicht-invasive (non-muscle-invasive bladder cancer, NMIBC) urotheliale Läsionen [2]. Dringt der Tumor bereits in die Muskelschicht der Harnblase ein, wird er als muskelinvasiv bezeichnet [2]. Weiterhin kann man invasive Karzinome noch in verschiedene Untergruppen zuordnen, beispielsweise in gering differenzierte, mikropapilläre und diffuse Karzinome [2]. Zu den nicht-invasiven Tumoren gehören unter anderem das Carcinoma in situ, das nicht invasive papilläre Urothelkarzinom und das urotheliale Papillom [2]. Invasive Tumore können aus papillären Läsionen oder aus einem Carcinoma in situ entstehen [1] und dringen im Verlauf tiefer in das Gewebe des Urothels ein [2]. Die Differenzierung in invasiv und nicht-invasiv ist insbesondere bezüglich der Therapie von enormer Bedeutung [2].

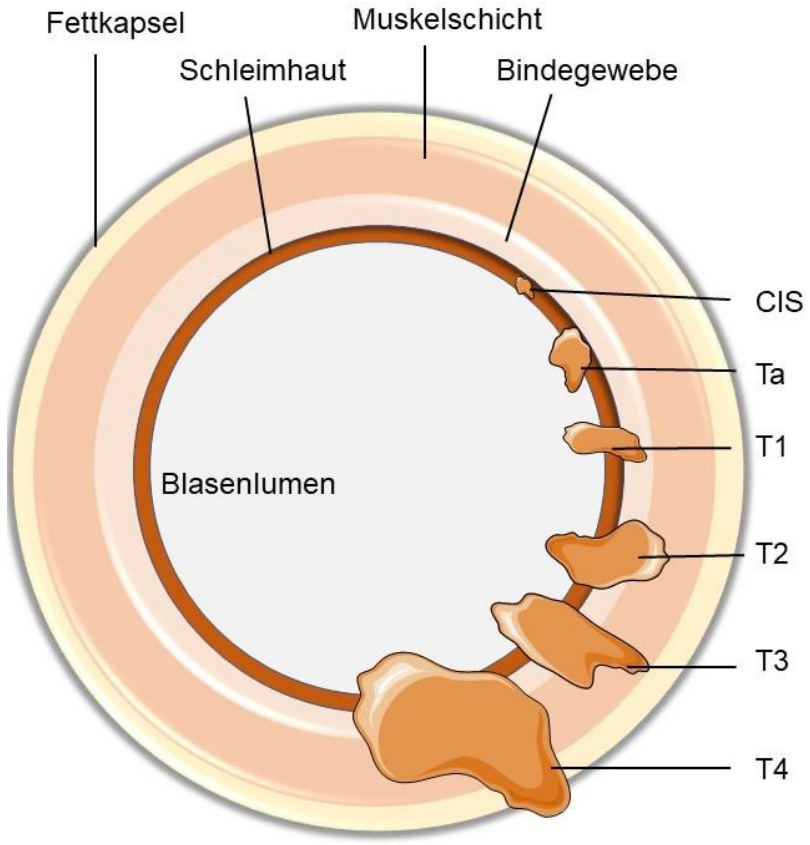

Abbildung 1: Die Infiltrationstiefe des Urothelkarzinoms bestimmt die Klassifikation. Dringt der Tumor in die Muskelschicht ein, wird das Karzinom nach WHO als muskelinvasiv bezeichnet. Erstellt mit SMART Servier Medical Art [24].

Die Graduierung von Urothelkarzinomen beschränkt sich auf Low-Grade- und High-Grade-Neoplasien [1]. Low-Grade-Neoplasien ähneln hierbei noch der Ursprungszelle, während die Zellen der High-Grade-Neoplasien bereits Malignitätskriterien und genetische Veränderungen

aufweisen [1]. Sobald das Karzinom das Stroma überschritten und den Detrusormuskel infiltriert, ist es immer eine High-Grade-Neoplasie [1].

2.1.7. Diagnostik und Therapie

Bei Verdacht auf ein Harnblasenkarzinom erfolgt standardmäßig eine Zystoskopie und eine histologische Sicherung mittels Zytologie [2]. Zum Ausschluss von Harnstau sollte außerdem eine Sonographie durchgeführt werden [2]. Bei muskelinvasiven Karzinomen, Rezidiven oder zur weiteren Abklärung bei fehlendem Nachweis in der Zystoskopie kann die Diagnostik mittels Computertomographie erweitert werden [2]. Bisher besteht noch keine Empfehlung für die Anwendung bestimmter Tumormarker in Urin oder Serum [2,20].

Nicht-invasive Läsionen können zunächst mithilfe einer transurethralen Resektion (TUR) und folgender Nachresektion nach vier bis sechs Wochen behandelt werden [2]. Invasive Karzinome benötigen zur kurativen Therapie jedoch eine radikale Zystektomie [2]. Diese schließt neben der kompletten Entfernung der Blasenmanschette mit pelviner Lymphadenektomie beim Mann noch eine Prostatektomie und bei der Frau eine Hysterektomie, Salpingektomie und eine Oophorektomie mit ein [2]. Dieser Eingriff ist aufwändig und mit vielen Komplikationen verbunden, sodass die 5-Jahres krankheitsspezifische Überlebensrate bei maximal 66% liegt [2]. Im Anschluss erfolgt in den meisten Fällen bei nicht-invasiven Karzinomen eine Instillation mit Mitomycin oder BCG, die in regelmäßigen Abständen wiederholt wird [14,25]. Beim invasiven Karzinom folgt eine Chemotherapie mit Gemcitabin und Cisplatin, welche neoadjuvant oder adjuvant durchgeführt wird und mit einer Radiotherapie kombiniert werden kann [25].

2.1.8. Prognose und ökonomische Relevanz des Urothelkarzinoms

Urothelkarzinome der Harnblase bringen eine ungünstige Prognose mit sich [26]. Dabei spielen Faktoren wie Lokalisation, Infiltrationstiefe und Lymphknotenstatus eine Rolle [26]. Daher variiert die 5-Jahres-Überlebensrate bei den unterschiedlichen Karzinomen stark [26]. Sie beträgt bei NMIBC über 90% und bei MIBC unter 10% [26].

Invasive Urothelkarzinome zeigen zum Diagnosezeitpunkt eine hohe Rate an früher systemischer Metastasierung [1]. Zusätzlich wird die Diagnose oft erst in lokal fortgeschrittenen Stadien gestellt [27]. In 20-30% aller Fälle liegt bei Erstdiagnose schon ein muskelinvasives Karzinom vor [27]. Etwa die Hälfte der Patient:innen entwickeln außerdem ein Lokalrezidiv oder eine systemische Erkrankung nach erfolgter radikaler Zystektomie [1]. Patient:innen, die bei Diagnosestellung bereits Fernmetastasen aufweisen, erreichen trotz systemischer kombinierter Chemotherapie nur in 20% der Behandlungen eine vollständige Remission [1]. Schließt man Fälle mit partieller Remission, das heißt mit einer unvollständigen Rückbildung des Tumors mit ein, kann ein therapeutisches Ansprechen von 70% erreicht werden [1]. Die

Polychemotherapie steigert die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patient:innen zwar signifikant, dennoch liegt das mediane Gesamtüberleben immer noch bei nur 14 Monaten [1]. Ohne Behandlung sterben Patient:innen mit systemischen Metastasen im Schnitt innerhalb von sechs Monaten [1].

Sowohl die hohe Rate an Rezidiven und Metastasierungen von invasiven Urothelkarzinomen als auch die vergleichsweise geringe Letalität und das längere Überleben der Patient:innen mit NMIBC machen eine lebenslange Nachsorge notwendig [4]. Dadurch entsteht eine enorme ökonomische Belastung des Gesundheitssystems [4]. Das Urothelkarzinom der Harnblase wird somit als die kostenintensivste aller Tumorerkrankungen beschrieben [1,4]. In den USA fließen jährlich über eine Milliarde Dollar in die Behandlung von Urothelkarzinomen (Stand der Erhebung 2005) [1,4]. Die finanzielle Belastung des Gesundheitssystems durch die Behandlung des Urothelkarzinoms ist in den letzten Jahren vermehrt Gegenstand in der Literatur geworden und fordert verbesserte Diagnosemöglichkeiten, um die Erkrankung bereits in früheren Stadien zu erkennen [28].

2.1.9. Geschlechterspezifische Verteilung

Auffällig im Hinblick auf die Epidemiologie des Urothelkarzinoms der Harnblase ist die geschlechterspezifische Verteilung. Männer sind drei- bis viermal so häufig betroffen wie Frauen [29,30]. Das kann unter anderem dadurch erklärt werden, dass insgesamt auf der Welt mehr Männer als Frauen rauchen [16]. Allerdings fällt auf, dass die Rate an MIBC bei Frauen höher ist als bei Männern [31,32] und die Diagnose bei Frauen eher später gestellt wird und sie somit eine höhere Mortalität aufweisen [30,33].

Diese unterschiedliche Ausprägungsweise suggeriert, dass Steroidhormone eine Rolle in der Entwicklung und Progression von Urothelkarzinomen spielen. Besonders zu erwähnen sind dabei Androgen- und Östrogen-Signalwege, da eine verminderte oder übermäßige Expression dieser Hormone den Krankheitsverlauf nachweislich beeinflussen [34]. Der Zusammenhang zwischen Blasentumoren und Östrogenrezeptoren wurde in der Literatur bereits mehrfach thematisiert. Eine Dysregulation des Östrogen-Signalwegs ist mit verstärktem Tumorwachstum und Progression der Krankheit assoziiert [34,35].

2.2. Der Östrogenrezeptor

Der genaue Mechanismus und die Folgen der Aktivierung des Östrogenrezeptors im Urothelkarzinom sind dabei noch nicht vollständig geklärt. Außerdem muss genauer bezüglich seiner Isoformen differenziert werden.

2.2.1. Die Funktionsweise des Östrogenrezeptors

Östrogenrezeptoren gehören zu der Familie der Steroidhormonrezeptoren und sind nukleäre Rezeptoren [36]. Sie sind in der Lage, die Genexpression als Transkriptionsfaktor zu beeinflussen. Bekannt sind zwei Isoformen des Rezeptors [36]. Östrogenrezeptor alpha (im Folgenden ERa genannt) befindet sich vor allem im Uterus, Ovar, Brust, Niere, Leber und Knochen, während der Östrogenrezeptor beta (im Folgenden ERß genannt) eher im Ovar, Zentralen Nervensystem, männlichen Geschlechtsorganen, sowie Kolon, Prostata und Immunsystem zu finden sind [36]. Der Östrogenrezeptor wird durch die Bindung von Östrogenen in den aktiven Zustand überführt und kann in dieser Form als Transkriptionsfaktor wirken [37]. Auch durch unabhängige Mechanismen, die keine DNA-Bindung einschließen, kann der Östrogenrezeptor die Genexpression beeinflussen [37,38].

Bekannt ist schon lange, dass ERa und ERß durch Stimulation von Estradiol für die Modulation sowohl physiologischer Prozesse als auch für das Wachstum von Tumoren verantwortlich ist [31]. Steroidrezeptoren besitzen die Fähigkeit, als Transkriptionsfaktor die Genexpression zu beeinflussen. Dies legt nahe, dass auch Östrogenrezeptoren an Signalwegen beteiligt sind, die zur Entstehung des Tumors und dessen Progression führen können. In der Literatur sind Zusammenhänge des ER vor allem mit Brustkrebs, aber auch mit Karzinomen der Prostata, des Ovars und des Kolons bekannt [36]. Dabei ist wahrscheinlich, dass die beiden Isoformen alpha und beta unterschiedliche Wirkungen auf die Tumorinitiation und -progression haben [31].

2.2.2. Östrogenrezeptoren in Urothelkarzinomen

Die Wirkung von Östrogenen auf die Tumorinitiation von Urothelkarzinomen bei Frauen ist bereits Gegenstand einiger Studien der letzten Jahre [39–43]. Dabei wurde die Inzidenz von Urothelkarzinomen bei Frauen unter anderem hinsichtlich des Zeitpunkts der Menopause [41], Parität [40–42] und Einnahme von Hormonpräparaten [39] skizziert. Die Ergebnisse sind dabei kontrovers. Einigkeit besteht allerdings in der Annahme, dass Sexualhormone eine Rolle in der Entstehung von Urothelkarzinomen spielen [39–43].

Der prädominante Rezeptor in Urothelkarzinomen ist der ERß [44]. Eine ERß-Expression konnte in einer Studie in allen eingeschlossenen Fällen von radikal zystektomierten Urothelkarzinomen nachgewiesen werden, während nur in 10% der Fälle eine ERa-Überexpression nachgewiesen werden konnte [13,32,45]. Zudem ist eine Korrelation zwischen Grad der ERß-Expression und steigendem Krankheitsstadium wahrscheinlich, da die Expression von ERß in MIBC höher ist als in NMIBC [45,46]. Der Nachweis einer hohen Expression des ERß ist zusätzlich mit dem Auftreten von Rezidiven assoziiert [44]. Zwei weitere Studien beschreiben eine protektive Wirkung des ERa auf Urothelkarzinomzellen durch Inhibierung der Initiation und des Wachstums, während ERß das Zellwachstum und die

Invasivität fördern soll [47,48]. Die beiden Rezeptoren haben hier also unterschiedliche Wirkungen in der Karzinogenese.

2.2.3. Östrogenrezeptoren in anderen Tumorerkrankungen

Die Rolle der Östrogenrezeptoren wurde zuvor schon in anderen Tumorerkrankungen untersucht und beschrieben [34,35]. In einer Publikation unserer Arbeitsgruppe wurde die Korrelation zwischen Endothelin-1 (ET-1) und ERß in Hinblick auf die Entwicklung von Lymphknotenmetastasen in Adenokarzinomen der Brust untersucht [49]. Einige Experimente zeigten, dass ein Komplex aus Tamoxifen, ERß und ET-1 durch Migration in den Zellkern zu einer Aktivierung verschiedener Zielgene und schlussendlich zu einer Resistenz gegenüber Tamoxifen führen kann [49]. Ziel dieser Arbeit war es, auf die Wichtigkeit der Rolle des ERß in der Tumorprogression aufmerksam zu machen, da dieser in der Therapie bisher kaum Beachtung geschenkt wurde [49]. So werden Adenokarzinome der Brust auf ihren ER-Status getestet und damit wird entschieden, ob eine Behandlung mit Tamoxifen erfolgen soll [49]. Tamoxifen wird als selektiver Östrogenrezeptor-Modulator bei Mammakarzinomen seit vielen Jahren angewendet [50]. Zwar revolutionierte die Hormontherapie die Behandlung von Mammakarzinomen, jedoch entwickeln etwa 40% der behandelten Patientinnen Resistenzen [51]. In der Therapieplanung wird meist nur der ERa getestet und außer Acht gelassen, dass ERa-negative Karzinome ERß-positiv sein können [49]. Diese Fokussierung auf ERa in der Wahl der Therapie rührt daher, dass der ERß erst 30 Jahre nach dem ERa erstmalig beschrieben wurde und Tamoxifen schon lange vorher entwickelt und in der Behandlung von Mammakarzinomen eingesetzt wurde [49].

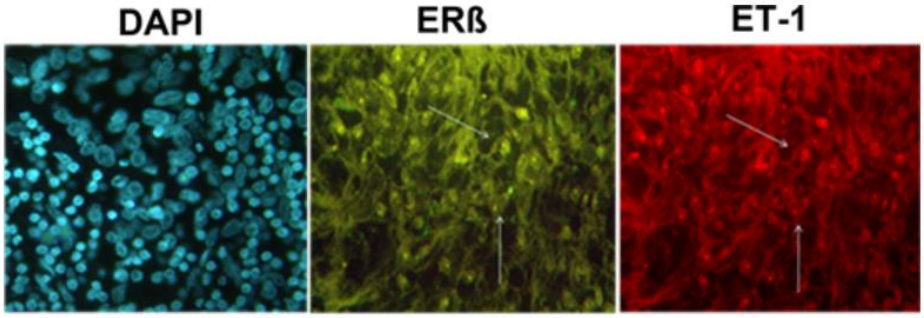

Abbildung 2: EMSA (electrophoretic mobility shift assay) aus der Publikation unserer Arbeitsgruppe. DAPI als Fluoreszenzfarbstoff lagert sich an die DNA im Zellkern an und dient als Referenz. MCF-7-Zellen wurden mit ET-1 behandelt. ERß und ET-1 konnten nukleär nachgewiesen werden [49].

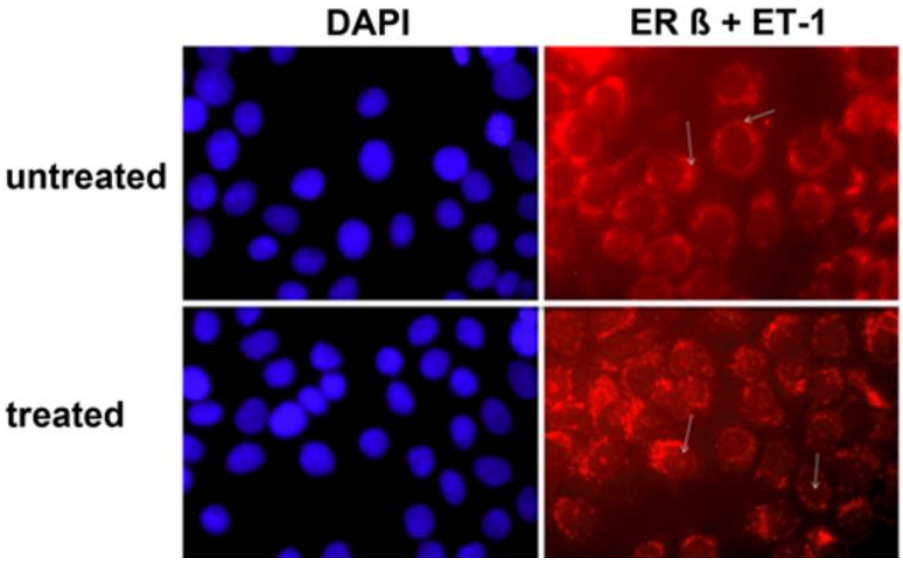

Abbildung 3: PLA-Assay aus der Publikation unserer Arbeitsgruppe. In unbehandelten Zellen zeichnet sich ein Signal aus einem Komplex zwischen ET-1 und ERß in einer perinukleären Lage ab. Nach ET-1-Behandlung ist dieser Komplex in das Kernkompartiment eingewandert [49].

Bereits in einer anderen Studie konnte in Proben von Brustkrebspatientinnen, die ERa-negativ und ERß-positiv waren, gezeigt werden, dass Tamoxifen die Proliferation nicht stoppen konnte [52]. Somit kann von einer erhöhten Resistenzbildung gegenüber Tamoxifen bei ERß-Positivität der Mammakarzinome ausgegangen werden [52,53]. In der Studie der Arbeitsgruppe von Brandenstein et al (2018) konnte ebenfalls ERß in allen ERa-negativen Biopsien aus Mammakarzinomen nachgewiesen werden [49]. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass das Vorhandensein von ERß den positiven Effekt von Tamoxifen auf ERa-positive Brustkarzinome unterdrückt [49]. Daher sollte man Patienten mit Mammakarzinom, welches ERa- und ß-positiv sind, nicht mit Tamoxifen behandeln [49].

Die Differenzierung zwischen den beiden Östrogenrezeptoren scheint also diagnostisch und therapeutisch von Relevanz zu sein. Deswegen nahmen wir in unseren Experimenten Withaferin A, einen Auszug aus der Pflanze Withania somnifera, hinzu. Der Inhaltsstoff dieser Pflanze findet schon lange in der indigenen Medizin Verwendung [54]. Seit der Entdeckung der antiinflammatorischen und krebsbekämpfenden Aktivität wird er aber auch in kombinierten Therapien des Prostatakarzinoms, Mammakarzinoms und anderen Tumorerkrankungen angewendet [55]. Aus der Literatur ist bekannt, dass Withaferin A die Funktion des ERa inhibiert [56–58], jedoch ist kein Effekt auf den ERß bekannt. Daher untersuchten wir den Effekt von Withaferin A auf Urothelkarzinomzellen, um herauszufinden, ob diese Patient:innen ebenfalls von einer kombinierten Therapie profitieren könnten.

2.2.4. Zusammenhang mit Endothelin-1

Die bereits veröffentlichten Experimente unserer Arbeitsgruppe [49] zeigten, dass eine Behandlung von Adenokarzinomzellen mit Tamoxifen bei Koexistenz von ET-1 und ß-Östradiol

zu einer Hochregulierung der Genexpression von bestimmten Zielgenen (IL-6, Wnt11 und Vim3) führt. Diese sind mit erhöhtem Tumorwachstum, Invasivität und einer schlechteren Prognose verknüpft [49]. Die Stimulation mit Tamoxifen und ET-1 führte also zu einer Herunterregulierung von ERa und zu einer Hochregulierung von intrazellulärem ET-1 und ERß [49]. ERß und ET-1 konnten dabei in den untersuchten Zellen nukleär nachgewiesen werden [49]. Eine erhöhte Expression von ET-1 in Gewebe von Mammakarzinomen scheint zudem mit einer erhöhten Rezidivrate assoziiert zu sein [59].

Die genaue Rolle des Östrogensignalwegs in Urothelkarzinomen ist bisher noch unklar. Der Literatur ist zu entnehmen, dass der ERß vermehrt exprimiert wird [13,32,45]. Nun gilt es, herauszufinden, welcher Mechanismus für die erhöhte Expression des ERß verantwortlich ist und was diese Hochregulierung im Anschluss auslöst. Die vorigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe bieten Hinweise auf einen Zusammenhang mit ET-1. Aus diesem Grund wird dieses Peptidhormon nun weiter erörtert.

2.3. Das Endothelin-System

2.3.1. Endothelin-1

Endothelin-1 (im Folgenden ET-1 genannt) ist eines von drei Isoformen des Endothelinsystems, welches 1988 zum ersten Mal beschrieben wurde [60]. Die drei Isoformen ET-1, ET-2 und ET-3 werden jeweils von unterschiedlichen Genen kodiert und ihre Ausdifferenzierung ist gewebeabhängig [61]. Von den drei Isoformen besitzt ET-1 das größte vasokonstriktorische Potential [60]. Es wird vor allem von Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Epithelzellen verschiedener Gewebe, wie Lunge, Prostata und Endometrium, produziert [60]. Trigger für die Produktion und die Ausschüttung von ET-1 sind Hypoxie, Ischämie oder erhöhte Scherkräfte in Gefäßen [62]. Außerdem wird die Bildung von der Ausschüttung verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren stimuliert, darunter Tumornekrosefaktoren und Interleukin 1 [62]. Durch die Funktion von ET-1 als potenter Vasokonstriktor ist das Endothelin-System besonders relevant für die Regulation des kardiovaskulären Systems [63]. Somit konnten unter anderem erhöhte ET-1-Spiegel bei Patient:innen mit verschiedenen Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie Arterieller Hypertonie, Koronarer Herzerkrankung, Myokardinfarkten, kardialen Arrhythmien und vielen anderen nachgewiesen werden [63]. Da das Peptid von unterschiedlichen Geweben gebildet wird und im gesamten Körper vorkommt [60], hat es auch Einfluss auf viele andere Organsysteme. Beispielhaft zu nennen sind hier noch die Pathogenese der Pulmonalen Hypertonie [64] und der chronischen Niereninsuffizienz [65,66] , in der ET-1 ebenfalls von Bedeutung ist.

2.3.2. Endothelin-Rezeptoren

Die systemische Wirkung entfaltet ET-1 mit Bindung an die Endothelin-Rezeptoren [67]. Es gibt zwei verschiedene Endothelin Rezeptoren, Endothelin Rezeptor A und Endothelin Rezeptor B (im Folgenden ETAR und ETBR genannt) [67]. Die Rezeptoren folgen einem G-Protein gekoppelten Signalweg und kommen ausschließlich bei Vertebraten vor [67]. Das lässt auf eine evolutionäre Entwicklung zur Regulation des kardiovaskulären Systems schließen [67]. Zudem unterscheiden sich die Rezeptoren in ihrer Bindungsaffinität [68]. ETAR bindet bevorzugt ET-1 und ET-2 und weniger ET-3. ETBR bindet alle Isoformen gleichermaßen [68].

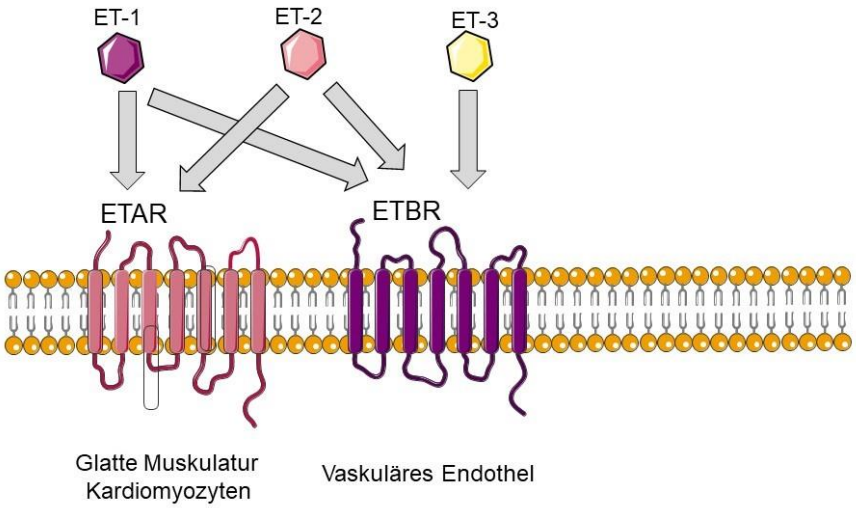

Abbildung 4: Bindungsaffinitäten der Endothelinrezeptoren; der ETAR kommt bevorzugt in glatter Muskulatur und Kardiomyozyten vor und wird vor allem von ET-1 und ET-2 gebunden. ETBR kommt eher in Gefäßendothel, Niere, Lunge und Gehirn vor und wird von ET-2 und ET-3 gebunden [69]. Erstellt mit SMART Servier Medical Art [24].

Die Aktivierung des ETAR führt in erster Linie zu einer Vasokonstriktion, Inflammation und Zellproliferation, während die Aktivierung des ETBR diese Effekte wieder aufhebt [63]. Die beiden Rezeptoren können also als endogene Antagonisten bezeichnet werden [63]. Die Bindung von ET-1 an den ETBR führt zur Ausschüttung von vasodilatatorischen Substanzen und dient somit als Feedback-Mechanismus der Aufrechterhaltung der Homöostase des kardiovaskulären Systems [70]. Außerdem besitzt ETBR eine sogenannte Clearance-Funktion. Das heißt, dass der Rezeptor zur Eliminierung von ET-1 beiträgt [70].

Durch die Relevanz von ET-1 in der Entstehung unterschiedlicher Krankheiten, zielten viele Forschungen in den letzten 20 Jahren auf die Entwicklung von Blockern und Aktivatoren von Endothelin Rezeptoren ab [70]. Mittlerweile wurde eine Reihe von Endothelin-Rezeptor-Antagonisten und -Agonisten entwickelt [63,70]. Besonders in klinischer Anwendung befindet sich dabei der nicht selektive ETAR-/ETBR-Antagonist Bosentan zur Behandlung der Pulmonal-arteriellen Hypertonie [63,71].

2.3.3. Endothelin in der Karzinogenese

Das aus 21 Aminosäuren bestehende Peptid wird darüber hinaus mit der Pathophysiologie verschiedener maligner Tumoren in Verbindung gebracht [60]. In der Literatur wird die Rolle von ET-1 bezüglich des Wachstumes und der Progression von einigen Karzinomen beschrieben [69,72] Dazu zählen unter anderem Karzinomen der Prostata [73], des Ovars [74], der Lunge [75] und des Kolons [76]. Scheinbar ist ET-1 an Prozessen beteiligt, die zur Aggressivität im Wachstumsverhalten der Karzinome beiträgt und die Tumorprogression fördert [77]. Außerdem scheint eine erhöhte Expression von ET-1 mit einem erhöhten Metastasierungspotential bei Prostatakarzinomen verknüpft zu sein [78]. Der Endothelin-Signalweg steht aus diesen Gründen im Fokus aktueller Forschungen zur Entwicklung von therapeutischen Targets [79]. Die Blockade von ET-1 oder ER bildet dabei einen vielversprechenden Ansatz [79,80].

2.3.4. Endothelin in Urothelkarzinomen

Auch in Urothelkarzinomen scheint das Endothelin-System zur Tumorgenese beizutragen [81–83]. Eine Überexpression von ET-1 und ETAR in Urothelkarzinomzellen konnte bereits in einer experimentellen Studie nachgewiesen werden [81]. Der ETBR wurde dabei nicht übermäßig exprimiert [81]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass erhöhte ET-1- und ETAR-Spiegel in Urothelkarzinomen mit vermehrtem Auftreten von Lungenmetastasen verknüpft sind [82]. Der Nachweis einer Überexpression von ET-1 in NMIBC wurde bereits als potentieller Biomarker diskutiert [83].

Der bereits oben beschriebene nukleäre Nachweis von ERß und gleichzeitig ET-1 [49] lässt vermuten, dass die Translokalisation von ET-1 in den Kern rezeptorabhängig ist. Durch den Nachweis von ERß und ET-1 im Kern kann man schließen, dass ET-1 durch Komplexierung mit einem Rezeptor zu einer vermehrten Expression von ERß führt. ERß ist wiederum im nächsten Schritt für die vermehrte Expression von Zielgenen verantwortlich, welche im Weiteren zu einer erhöhten Tumorprogressionsrate führen können. Die Aktivierung des Endothelin-Signalwegs geht also der erhöhten Expression des ERß voraus. Durch welchen Rezeptor ET-1 in den Kern gelangt, ist allerdings noch unklar.

2.3.5. Der Zusammenhang von ET-1 und dem Androgenrezeptor

Eine weitere der vielen Funktionen von ET-1 ist scheinbar auch die Regulation des Steroidhormonhaushaltes. Nach Blockierung des ETAR und ETBR konnte in Prostatakarzinomzellen eine verminderte Synthese des Androgenrezeptors nachgewiesen werden [73]. Dies lässt vermuten, dass die durch ET-1 vermittelte Überexpression des Androgenrezeptors einen wichtigen Schritt in der Karzinogenese von Prostatakarzinomen, aber auch in anderen Tumoren darstellt [73]. Wie schon erwähnt, scheinen Sexualhormone in der Pathogenese von Urothelkarzinomen eine Rolle zu spielen [34]. Der Androgenrezeptor

könnte also ebenfalls an der Signalkaskade beteiligt sein und das Bindeglied zwischen der Aktivierung von ET-1 und der erhöhten Expression von ERß darstellen.

2.4. Der Androgenrezeptor

Der Androgenrezeptor ist, genau wie der Östrogenrezeptor, ein Steroidhormonrezeptor und wird der Superfamilie der nuklären Rezeptoren zugeordnet [84].

2.4.1. Die Funktionsweise des Androgenrezeptors

Die wichtigsten endogenen Liganden, welche den Rezeptor aktivieren, sind die Androgene Testosteron und Dihydrotestosteron [85]. Durch diese beiden Agonisten wird die Expression von Sexualhormonen und die männliche Geschlechtsdifferenzierung aktiviert und reguliert [85]. Der Rezeptor besitzt eine DNA-bindenden Domäne, eine C-Terminale Liganden-bindenden Domäne und eine N-Terminale Domäne [86]. Die Bindung von Hormonen an die Liganden-bindende Domäne bewirkt eine Konformationsänderung des AR [86]. Der Komplex aus Rezeptor und Hormon wandert anschließend in den Zellkern und löst dort weitere Prozesse auf transkriptionaler Ebene aus [84,86,87]. In Prostatazellen beispielsweise bindet Dihydrotestosteron im Cytoplasma an den AR und führt durch eine Bindung von Importin-alpha zu einer Translokation des AR in den Zellkern [87]. Dort bindet der AR dann an die sogenannten Androgen Response Elements (ASE), unter anderem gehört das Prostataspezifische Antigen (PSA) dazu [87]. Diese Zielgene aktivieren dann weitere regulatorische Proteine, welche Wachstum und Überleben der Zellen fördern [87]. Die Translokation von Proteinen vom Cytoplasma in den Zellkern konnte schon früh in Studien mithilfe von fluoreszierenden Proteinen nachgewiesen werden [88]. Hierbei konnten verschiedene Hormone ohne das Vorhandensein des AR im Cytoplasma lokalisiert werden, während sie nach Zugabe des markierten AR nukleär nachgewiesen werden konnten [88].

2.4.2. Der Androgenrezeptor in der Karzinogenese

Der AR erfüllt jedoch neben der Regulation des Sexualhormonhaushaltes noch viele weitere Funktionen [89]. Durch das Vorkommen in unterschiedlichen Organen und Geweben, spielt der Rezeptor ebenfalls eine Rolle im kardiovaskulären, neuralen und hämatopoetischen System, sowie im Immunsystem [89]. Die Fähigkeit, nukleär die Genexpression von Zellen zu beeinflussen, impliziert, dass der AR auch in der Karzinogenese eine Rolle spielen kann. Besonders relevant und bereits viel beschrieben ist diese Eigenschaft in der Pathogenese von Prostatakarzinomen [90,91]. Die Expression und Mutation des AR konnte in Primärtumoren und auch in Metastasen von Prostatakarzinomen nachgewiesen werden [90]. Bei Erstdiagnose sind 80-90% der Prostatakarzinome abhängig von Androgenen, weshalb die Deprivation dieser eine der wichtigsten Therapiesäulen darstellt [91]. Die Androgendeprivationstherapie basiert auf einem Hormonentzug, welcher eine Apoptose der Zellen hervorruft [92]. Dieser Entzug kann entweder medikamentös oder durch eine Orchiektomie erfolgen. Die medikamentöse Therapie

erfolgt durch LHRH-Agonisten, GnRH-Antagonisten und/oder Östrogene bzw. Diethylstilbestrol [92]. In manchen Fällen können für eine komplette Androgenblockade auch Präparate kombiniert eingesetzt werden [92]. In 20-30% der Fälle entwickeln die Patienten jedoch eine Kastrationsresistenz, das heißt, der Hormonentzug wird unwirksam und der AR wird im Verlauf der Therapie wieder übermäßig exprimiert [93]. Hier scheint die Veränderung des AR selbst eine ausschlaggebende Rolle zu spielen [87,91,93]. In einer Studie konnten genetische Veränderungen des AR durch Punktmutationen, Genamplifikationen oder Spleißvarianten in 62% der metastasierten, kastrationsresistenten Prostatakarzinomen nachgewiesen werden [94]. Damit stellt es das am häufigsten veränderte Gen bei Patienten mit kastrationsresistenten Prostatakarzinomen dar [94].

2.4.3. Der Androgenrezeptor in Urothelkarzinomen

Der AR wird genau wie der ERß in der Literatur auch oft in Zusammenhang mit der Tumorgenese und -entwicklung von Urothelkarzinomen gebracht [95]. Der Androgen-Signalweg scheint wesentlich an der Tumorentstehung und -progression von Urothelkarzinomen beteiligt zu sein [96,97]. Der genaue Mechanismus ist bisher noch nicht vollständig geklärt [96]. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die medikamentöse Deprivation von Androgenen, beispielsweise im Rahmen der Therapie eines Prostatakarzinoms, zu einem verminderten Auftreten und Rezidiven von Blasenkarzinomen führt [73,98–100]. Seither ist die Blockade des AR als therapeutische Option des Urothelkarzinoms Gegenstand aktueller Forschungen [96,101,102].

Die Studienlage bezüglich der Expression des AR in Urothelkarzinomen wird allerdings auch kontrovers diskutiert. Verschiedene Studien zeigen sehr unterschiedliche Ergebnisse in der Fragestellung, ob der AR in malignem Urothel vermehrt exprimiert wird oder nicht [103,104]. Auf der anderen Seite verweisen einige Studien auf das vermehrte Auftreten von Resistenzen gegen Chemotherapie und Radiotherapie bei erhöhten Spiegeln von AR und ER in Urothelkarzinomen [105]. Erst kürzlich konnte eine Isoform des AR nachgewiesen werden, die vom Großteil der Urothelkarzinome exprimiert wird und scheinbar Einfluss auf die Tumorgenese nimmt [106].

2.4.4. Der Zusammenhang mit dem Östrogenrezeptor

Scheinbar beeinflussen sich Androgen- und Östrogen-Signalwege gegenseitig. In verschiedenen Studien konnten erhöhte Expressionen des AR in ER-positiven Mammakarzinomen nachgewiesen werden [107,108]. Weiterhin konnte in einer Studie über den Zusammenhang des AR und des ERß in einer Kultur von Zellen eines Mammakarzinoms durch die Zugabe eines Androgenliganden die Expression des ERß gesteigert werden [109]. Durch Behandlung mit einem Androgen-Inhibitor konnte die Expression des ERß wiederum blockiert

werden [109]. Dieser Nachweis wurde in zwei verschiedenen Zellkulturen durchgeführt [109]. Dies suggeriert, dass der Zusammenhang zwischen AR und ER nicht nur für Zellen des Mammakarzinoms gilt, sondern auch übertragbar auf andere Zellformen sein könnte [109].

AR und ER sind demnach scheinbar wichtige Mitspieler im Signalweg des Urothelkarzinoms. Dabei ist anzunehmen, dass der AR im Kern die Transkription des ERß steigert. Die Folge der erhöhten Expression des ERß und wie genau es dadurch zur Karzinogenese kommt, ist allerdings immer noch fraglich. Wie schon bereits erwähnt, können Östrogenrezeptoren als Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren wirken [37,38]. Dabei konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass Micro-RNAs an der Signalkaskade, die zur Veränderung der Genexpression führen, beteiligt sind [110–112]. Deshalb wird an dieser Stelle näher auf diese Regulatoren eingegangen.

2.5. MiRNA-708

2.5.1. Die Funktionsweise von Micro-RNAs

Micro-RNAs (miRNAs) bestehen aus 22 Nucleotiden und sind kleine, einsträngige, nicht-kodierende RNAs, die posttranskriptionell die Genexpression beeinflussen [113]. Sie können durch Bindung an das 3‘-Ende von mRNAs die Translation blockieren oder auch die Degradation der mRNA stimulieren [113]. MiRNAs sind daher wichtig für die Zellhomöostase und die Regulierung von Immunantworten [114]. Dysregulationen von miRNA-vermittelten Mechanismen führen zu unterschiedlichen Pathologien, insbesondere zu Karzinomen. Sie können somit als Onkogene oder aber als Tumorsuppressoren wirken [114,115]. Die Anzahl der miRNAs im menschlichen Körper variiert in der Literatur zwischen 1500 und 2500 [116,117]. Durch die Erkenntnis, dass miRNAs in die Zellhomöstase und Immunmodulation eingreifen können, sind sie zunehmend Gegenstand von Forschungen zu Immunmodulator-Therapien geworden [114,118].

2.5.2. Micro-RNAs und Östrogenrezeptoren

Der Zusammenhang zwischen ER und miRNAs wurde bereits in Studien des Mammakarzinoms untersucht [119]. Beschrieben werden unterschiedliche miRNAs, die in Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinomen herunterreguliert sind [119]. Auf der anderen Seite konnten miRNAs identifiziert werden, die in Hormontherapie-resistenten Karzinomen hochreguliert sind [119]. Insgesamt handelt es sich um einen komplexen Signalweg, in dem sich ER und miRNA gegenseitig modulieren [119]. Es werden miRNAs beschrieben, die durch Bindung an das 3‘-Ende des ER dessen Expression supprimieren [119]. Auf der anderen Seite kann die Aktivierung des ER bzw. des Östrogensignalwegs die Expression einiger miRNAs modulieren, was wiederum zu einer gesteigerten Karzinogenese führen kann [119]. In den letzten Jahren konnten immer mehr Auswirkungen von Dysregulationen bestimmter miRNAs

identifiziert werden [115]. Dabei konnte eine fehlerhaft exprimierte miRNA-708 in verschiedenen Karzinomen, aber auch bei kardialen oder neuronalen Erkrankungen nachgewiesen werden [115].

2.5.3. Die miRNA-708 in der Karzinogenese

Seither konnte eine Dysregulation der miRNA-708 in zahlreichen hämatologischen Erkrankungen, aber auch in soliden Tumoren gezeigt werden [115,120]. Dazu gehören unter anderem Karzinome des Urothels, der Mamma, des Kolons, des Ovars, der Prostata und viele mehr [115]. Dabei kann die miRNA-708 je nach Gewebe und Zelltyp als Onkogen und/oder als Tumorsuppressor wirken [115,120].

Es konnten schon zahlreiche direkte und indirekte Zielgene identifiziert werden, die nach Modulation durch miRNAs unterschiedliche Effekte im Gewebe hervorrufen [115]. Es wird zwischen direkten und indirekten Zielgenen unterschieden [115]. Die direkten Zielgene, wie z.B. Caspase-2 bei Urothelkarzinomen, werden direkt durch Bindung der miRNA-708 an ihrer 3‘-UTR-Bindungsstelle beeinflusst [115]. Indirekte Zielgene, wie z.B. E-Cadherin bei Nierenzellkarzinomen, werden hingegen durch vermehrte oder verminderte Expression von mRNA und Proteinen beeinflusst, was durch die miRNA-708 reguliert wird [115].

2.5.4. Die miRNA-708 in Urothelkarzinomen

Während die miRNA-708 in Urothelzellen normalerweise in sehr geringen Mengen exprimiert wird, konnte in Urothelkarzinomen eine Überexpression nachgewiesen werden [121]. Als direktes Zielgen wurde bereits Caspase-2 identifiziert [122]. Caspase-2 ist ein Enzym, welches die Zellapoptose induzieren kann und in Karzinomen apoptotisch wirkt [122]. Die Hochregulierung der miRNA-708 in Urothelkarzinomen führt somit zu einer Herunterregulierung von Caspase-2 und schließlich zu einer vermehrten Zellproliferation [122]. In einem Mausmodell konnte durch Inhibition der miRNA-708 zudem ein vermindertes Tumorwachstum verzeichnet werden [122]. Daher wird die miRNA-708 bereits in der Literatur als eine anti-apoptotische miRNA in Urothelkarzinomen eingeordnet [115].

Der Mechanismus, welcher zu einer erhöhten Invasivität und Metastasierung von Urothelkarzinomen führt, ist damit allerdings noch nicht erklärt. Bei Betrachtung des Einflusses der miRNA-708 auf das Nierenzellkarzinom konnte E-Cadherin als direktes Zielgen identifiziert werden. Es konnte eine miRNA-708-vermittelte Hochregulierung dieses Proteins in Nierenzellkarzinomen nachgewiesen werden. Hier wirkt die miRNA-708 über E-Cadherin als Tumorsuppressor. Dies führt zu einer Inhibierung der Invasion der Karzinomzellen. Wie schon erwähnt, wirken miRNAs in unterschiedlichen Geweben onkogen oder tumorsuppressiv [115].

2.6. E-Cadherin

Diese Erkenntnisse erlauben daher die Untersuchung von E-Cadherin in Zusammenhang mit Urothelkarzinomen. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass die Expression des Moleküls E-Cadherin in Zusammenhang mit der Invasivität und der Metastasierungsrate von Urothelkarzinomen steht [123].

2.6.1. Die Funktionsweise von E-Cadherin

Cadherine sind eine Familie von Glykoproteinen, die als calciumabhängige Adhäsionsmoleküle fungieren [124]. E-Cadherin bezeichnet hier die prädominante Form der Cadherine, die in Epithelien vorkommt [125]. Cadherine besitzen mehrere extrazelluläre, calciumbindende Domänen, eine transmembranäre und eine cytoplasmatische Domäne, mit denen sie direkte Signalkaskaden auslösen können [125]. Mit der intrazellulären Domäne stehen sie in Kontakt mit verschiedenen cytoplasmatischen Molekülen sowie über eine Verbindung durch Catenine mit dem Aktin des Cytoskelettes [125]. Dadurch sind Cadherine wichtig für die Stabilität und Polarität der Zelle und ebenso essentiell für die Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Kontakte von Epithelzellen [126].

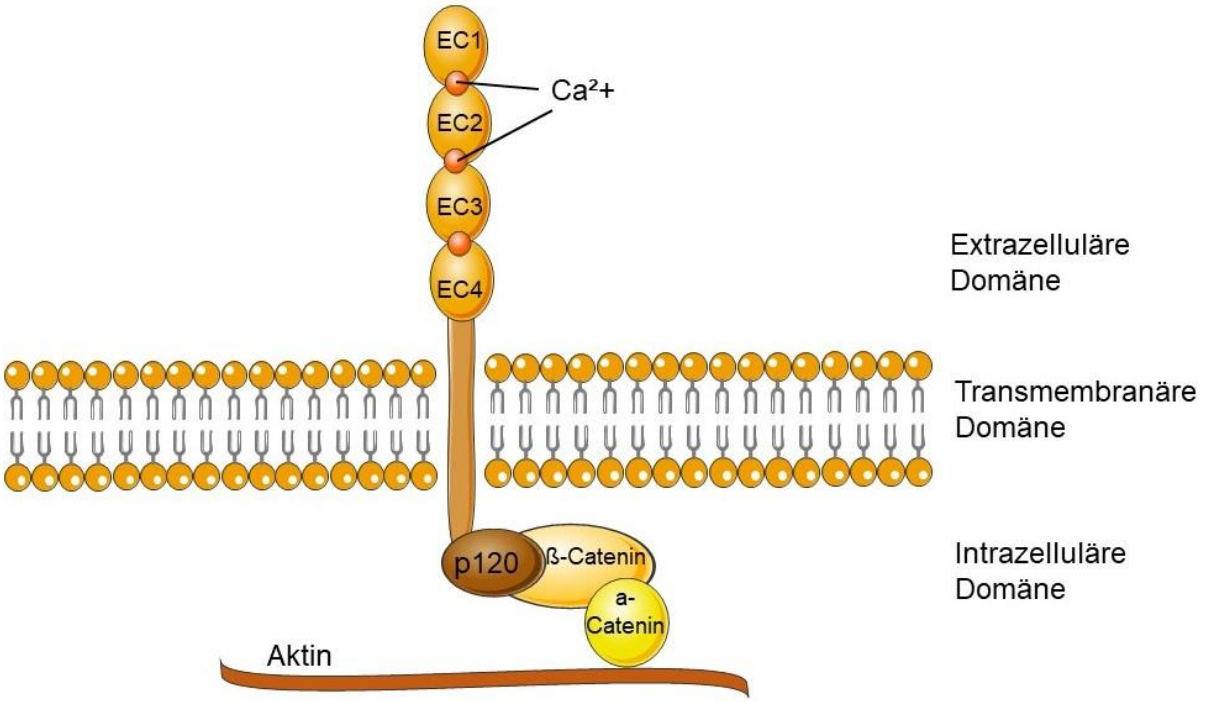

Abbildung 5: Grafische Darstellung von E-Cadherin. Die extrazelluläre Domäne besteht aus mehreren Komponenten und bindet Calcium. Die transmembranäre Domäne ist in die Zellmembran eingebettet. Die intrazelluläre Domäne steht über verschiedene Catenine in Verbindung mit Aktin. Erstellt mit SMART Servier Medical Art [24].

2.6.2. Folgen des Verlusts von E-Cadherin

Eine Herunterregulierung oder Veränderung von E-Cadherin führt folglich zum Verlust der Zellintegrität, das heißt die Zell-Zell-Kontakte gehen verloren [127]. Dadurch können sich Zellen unkontrolliert ausbreiten [127]. Der Verlust von E-Cadherin kann weiterhin dazu führen, dass sich

Epithelzellen zu Mesenchymzellen wandeln, was Epithelial-Mesenchymale Transition genannt wird [127]. Das unterstützt wiederum die Progression und Ausbreitung der Zellen [127]. Eine verminderte Expression von E-Cadherin ist daher mit einer Förderung von Invasion und Metastasierung von Karzinomen assoziiert [127,128].

2.6.3. E-Cadherin in der Karzinogenese

Die Verminderung oder der Verlust von E-Cadherin wurde in der Vergangenheit schon bei Karzinomen des Kolons, des Magens und der Brust beobachtet und konnte mit einer schlechteren Prognose und einem verminderten Gesamtüberleben in Verbindung gebracht werden [129,130]. Auch in Studien über die Bedeutung von E-Cadherin in Urothelkarzinomen konnte die Verminderung des Adhäsionsmoleküls mit einer stärkeren Progression des Karzinoms und einer schlechteren Prognose verknüpft werden [127,131]. In einer Metaanalyse wurden Daten aus 15 Studien zum NMIBC zusammengenommen [132]. Es konnte gezeigt werden, dass eine verminderte Expression von E-Cadherin mit einem schlechteren progressions- und rezidivfreien Überleben dieser Patient:innen verknüpft ist [132]. E-Cadherin sollte daher als prognostischer Faktor diskutiert werden [132].

Zudem konnten experimentelle Studien zeigen, dass sich die Herunterregulierung von E-Cadherin in Urothelkarzinomzellen proportional zur Invasivität der Karzinome verhält [133]. Verminderte E-Cadherin-Level konnten vor allem bei Karzinomen, die die Basalmembran durchbrachen, nachgewiesen werden [133]. Somit steht eine geringe Expression von E-Cadherin auch in Zusammenhang mit der Infiltrationstiefe und somit der Muskelinvasivität der Urothelkarzinome [133].

2.7. Ein möglicher Signalweg zur Entstehung des Urothelkarzinoms

Der nukleäre Nachweis von ET-1 und ERß in Verbindung mit der nachgewiesenen Herunterregulierung von E-Cadherin in muskelinvasiven Urothelkarzinomen lässt einen Zusammenhang vermuten. Möglich ist folgender Signalweg: ET-1 bindet im Cytoplasma an den AR. Sie bilden einen Komplex, der in den Kern transloziert. Nukleär wird die Transkription des ERß gesteigert. Die folgende Expression von ERß führt zu einer vermehrten Bildung von miRNA-708. Diese wirkt als Onkogen und führt wiederum zur Herunterregulierung von E-Cadherin. Die einzelnen Mitspieler dieser Kaskade sollen mit unseren Experimenten nachgewiesen und in Beziehung zueinander gesetzt werden. Die folgenden Abbildungen skizzieren diesen Signalweg und sollen die verschiedenen Schritte übersichtlicher darstellen.

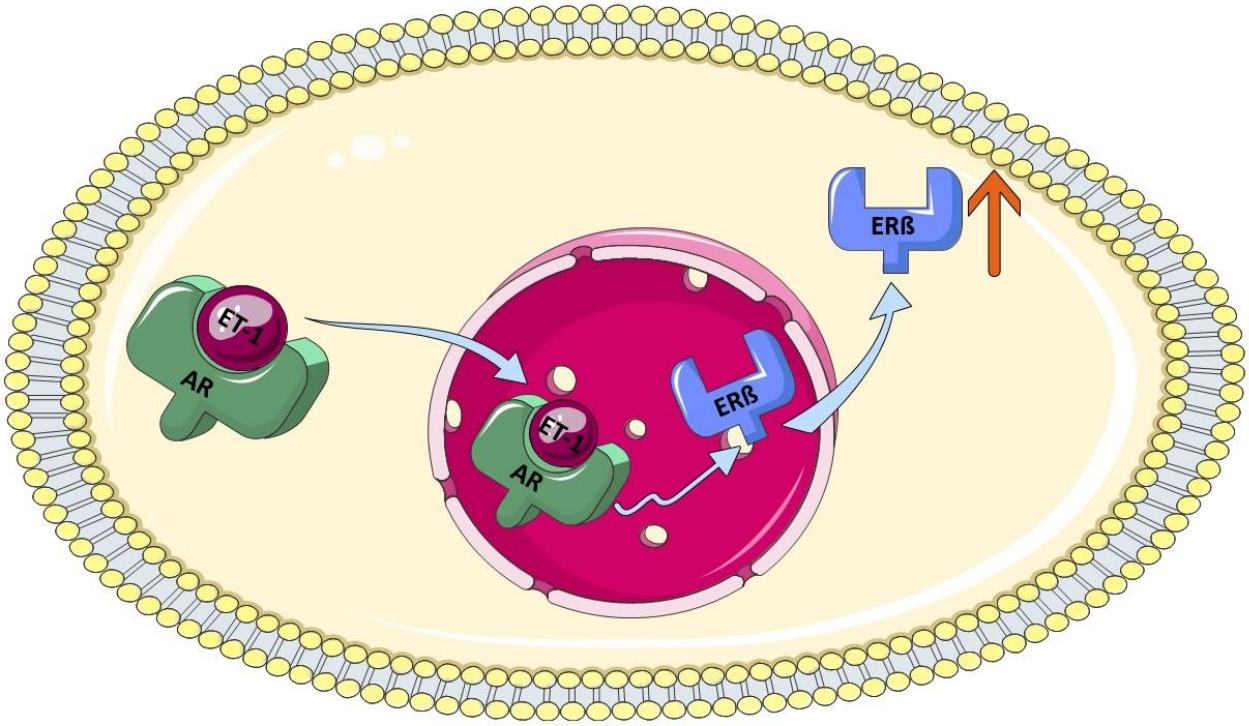

Abbildung 6: Schema einer Zelle mit Zellkern. Der Komplex aus AR und ET-1 transloziert in den Zellkern. Intranukleär bindet der Komplex ERß und führt zu einer erhöhten Exprimierung von ERß. Erstellt mit SMART Servier Medical Art [24].

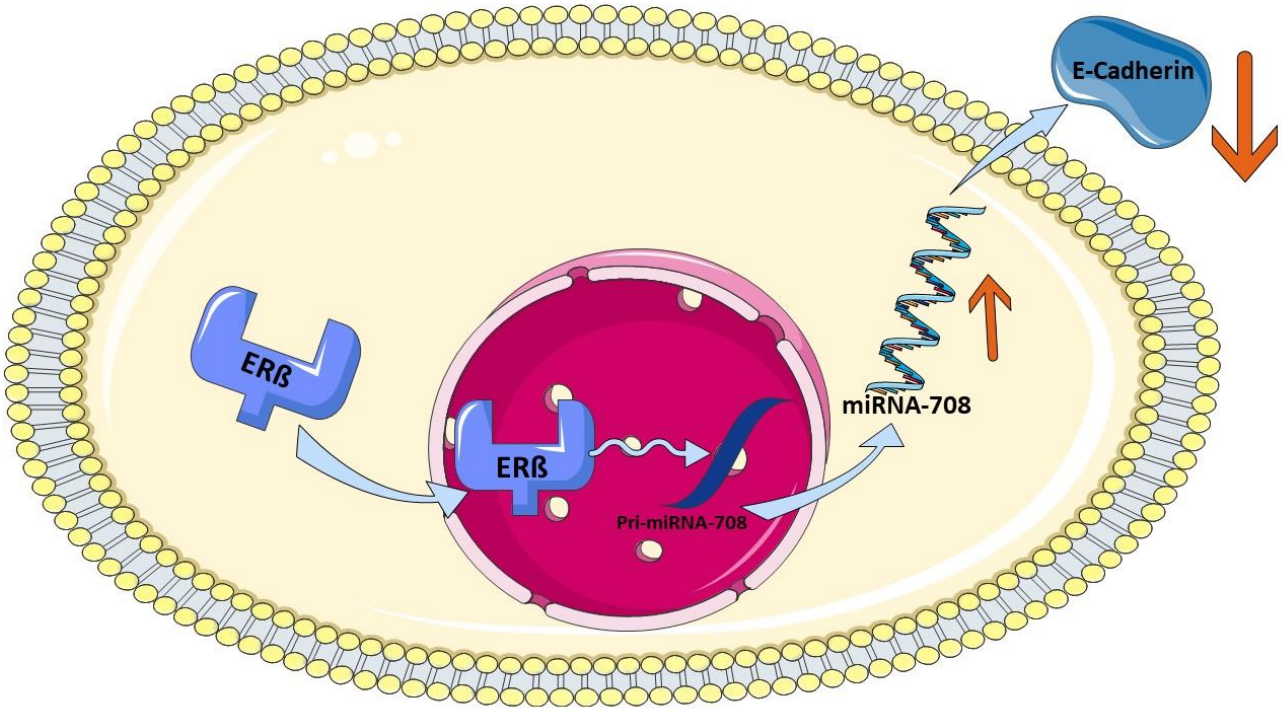

Abbildung 7: ERß führt zu einer erhöhten intranukleären Produktion der Pri-miRNA-708, welche dann im Cytoplasma zu einer erhöhten Konzentration der miRNA-708 führt. Eine erhöhte miRNA-708 führt zu einer Herunterregulierung von E-Cadherin. Erstellt mit SMART Servier Medical Art [24].

2.8. Fragestellungen und Ziel der Arbeit

Das Ziel unseres Projekts ist,

1. einen Signalweg zu analysieren, der möglicherweise zu einem muskelinvasiven Wachstum von Urothelkarzinomen führen könnte
2. einzelne Zielgene dieses Signalwegs zu identifizieren und ihren Einfluss aufeinander zu untersuchen
3. mögliche Angriffspunkte in dieser Signalkaskade zu finden, die in der Diagnostik und Therapie der Karzinome genutzt werden könnten

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Zelllinien

HTB-9 (ATCC 5637)

Die HTB-9 Zelllinie wurde aus epithelialen Blasenkrebszellen eines 68-Jährigen männlichen Patienten mit einem Urothelkarzinom Grad II gewonnen.

3.1.2. Chemikalien und Lösungen für die Zellkultur

Material	Hersteller	Herstellernummer
DMSO	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach	H160603
FBS	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach	P161206 P170203
PBS	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach	394117
Penicillin/Streptomycin mix (10000U/mL)	Invitrogen Corporation, Karlsruhe	7180417
Trypan Blau	Gibco, Invitrogen Corporation, Karlsruhe	1834791
Trypsin-EDTA (0,25%), Phenolrot	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford	2520056
Trypsin-EDTA (0,5%), ohne Phenolrot	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford	150054

Tabelle 1: Chemikalien und Lösungen für die Zellkultur.

3.1.3. Stimulanzien

Material	Hersteller	Herstellernummer
ß-Estradiol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	E2758
Endothelin-1	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	102M4762V
Endothelin B Receptor Antagonist IRL 1038	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	SCP0136
Endothelin A Receptor Antagonist W7338	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	SCP0137
Withaferin A, Withania somnifera	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	681535

Tabelle 2: Stimulanzien.

3.1.4. Geräte

Gerät	Hersteller
Analysewaage	Kern, Balingen
Chemostar	Intas Science Imaging, Göttingen
Zentrifuge Fresco 21	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford
Zentrifuge Biofuge Primo	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford
Gefrierschrank 20 Grad	Liebherr, Biberach an der Riß
Gefrierschrank 80 Grad	Sanyo, Moriguchi, Japan
Gel Power Supply	Bio Rad, Munich
Glasware	Duran Group GmbH, Wertheim
Eismaschine	Scotsman, Sprockhövel
E-Gel Precast Agarose Electrophoresis System	Thermo Fisher Scientific inc., Rockford
Mikroskop	Olympus, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Bender and Hobein, Bruchsal
PCR Thermocycler (Biometra)	Analytik Jena AG, Jena
pH-Meter	Hanna Instruments, Kehl
Pipetboy	IBS Integra Biosciences, Fernwald
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Real Time Cycler	Life Technologies, Darmstadt
Thermo-Heizblock	Grant Instruments, Cambridge UK

Tabelle 3: Geräte.

3.1.5. Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
E-Gel EX 2% Agarose	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford
Falcon konische Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nürnberg
MicroAMP Fast Optical 96 Well Reaktionsplatte	Life Technologies, Darmstadt
Mikrozentrifugenröhrchen 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
PCR-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Peha Nitrilhandschuhe, weiß	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Plastikpipietten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Corning Incorporated, New York, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
Pipetten 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Protran Nitrocellulose Transfer Membran	Whatman GmbH, Dassel

Twin.Tec PCR Plates 96	Eppendorf, Hamburg
Whatmann Gel Blottingpapier	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Zellkulturgefäße	Sarstedt, Nürnberg
Zellkulturinkubator	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford
Zellkulturplatten (100 mm)	Starlab GmbH (Cyto One), Hamburg
96 Well ELISA Mikroplatten	Brand GmbH + Co KG, Wertheim

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien.

3.1.6. Chemikalien und Lösungen

Chemikalie	**Hersteller**	**Herstellernummer**
Acrylamide/ Bis – Acrylamide (29:1), 30% Lösung	AppliChem GmbH, Darmstadt	7N012286
APS	AppliChem GmbH, Darmstadt	104K0456
Aurora (Western Blotting Substrat)	Inats Science Imaging, Göttingen	HM29A-LB
Beta-Mercaptoethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt	6F014046
Blue Ladepuffer 3X	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main	22
Bradford Lösung	AppliChem GmbH, Darmstadt	7B012248
BSA	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford	NC168682
Clarity Western ECL Substrat	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA	170-5060
DMSO	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach	H169603
DTT 30x	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main	22
E-Gel 50bp DNA Leiter	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford	10488099
Ethanol	Honeywell, Bucharest Hungary	SZBG2090
ELISA Stop Lösung	Bethyl Laboratories, Inc., Mongomery, USA	180130
Laemmli Probenpuffer 4x	Bio Rad, Munich	L004133A
Methanol	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen	25.6942610
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	01724629
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	048266899
Phenol-Chloroform-Isoamyl	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	1337614

Gefärbter Proteinmarker	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford	00565178
QIAzolR Lyse Reagenz	Qiagen GmbH, Hilden	55709615
RIPA Lysepuffer	Rockland Immunochemicals, Inc. (Rockland)	MB-030-0050
SDS	AppliChem GmbH, Darmstadt	7R011484
TBS (Tris buffered saline)	Bio Rad, Munich	64135791 64170411
TEMED	AppliChem GmbH, Darmstadt	5G013657
TMB Substrate Solution	Invitrogen Corporation, Karlsruhe	183657000
Tween R 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	487263603
Xylene	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	057254048

Tabelle 5: Chemikalien und Lösungen.

3.1.7. Antikörper

Primärantikörper	**Hersteller**	**Katalognummer**	**Lot**	**Verdünnung**
Androgen Receptor Antibody	Cell Signaling Technology	54653S	1	1:100
A/G PLUS Agarose Antikörper	Santa Cruz, Heidelberg	Sc-2003	/	/
ß- Actin (13E5), Rabbit monoklonal IgG, 45 kDa	Cell Signaling Technology	Sc-4970L	11	1:1000
ER-ß (B-1), Mouse monoklonal IgG, 46 kDa	Santa Cruz Biotechnology Heidelberg	Sc-3902243	B0813	1:100
GAPDH (FL-335), Rabbit polyklonal IgG, 37 kDa	Santa Cruz Biotechnology Heidelberg	Sc-25778	D1613	1:500
Vim3 Klon 52 Mouse monoklonal, 43 kDa	Davids Biolab (19.04.2018)	/	/	1:500

Tabelle 6: Primärantikörper.

Sekundärantikörper	**Hersteller**	**Katalognummer**	**Lot**	**Verdünnung**
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling Technology	7076S	36	1:10000
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP	Cell Signaling Technology	7074S	24	1:10000

Tabelle 7: Sekundärantikörper.

3.1.8. Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit destilliertem Wasser bis zur benötigten Menge aufgefüllt. pH-Wert Anpassungen wurden mit Hilfe des pH-Meters durchgeführt und mit konzentriertem HCl oder NaCl korrigiert.

Puffer / Lösung	**Zusammensetzung**
APS	10% (w/v) in Wasser Gelagert bei -20 Grad
Blocking Lösung (Western Blot): TBST-Milch	1x TBST, pH 7,6 3% (w/v) Milchpulver
Laemmli Puffer, 10x (SDS-page)	1% (w/v) SDS 1,9 M (w/v) Glycine 250 mM (w/v) Tris
SDS	10% (w/v) SDS in Wasser
SDS-Page, 3% (Stacking Gel)	0,5 M Tris pH 6.8 30% (v/v) Acrylamide (29:1) 10% (v/v) SDS 10% (v/v) APS TEMED
SDS-Page, 10% (Separation Gel)	1,5 M TRIS pH 8,8 HCl 30% (v/v) Acrylamide (29:1) 10% (v/v) SDS 10% (v/v) APS TEMED
TBE Puffer	89 mM Tris 89 mM Borat 2 mM EDTA
Towin Puffer 10x (Western Blot)	3,03% (w/v) Tris 14,4% (w/v) Glycine 1% (v/v) SDS
Tris	pH 6,8 0,5M (w/v) pH 8,8 1,5M (w/v)
Western Blot Puffer 4x	62,5 mM Tris – HCl, pH 6,8 10% Glycerol 1% LDS 0,005% Bromphenol Blue
Western Blot Puffer 3x	187,5 mM Tris – HCl (pH 6,8) 6% (w/v) SDS

	30% Glycerol 0,03% Bromophenol Blue

Tabelle 8: Puffer und Lösungen.

3.1.9. Kits

Kit	Hersteller	Katalognr.
QIAamp DNA Mini Kit (50)	Qiagen GmbH, Hilden	51304
Nuclear Extraction Kit	Active Motif	40010
RNeasy-Kit	Qiagen	74004
miRNEasy-Micro-Kit	Qiagen	217084

Tabelle 9: Kits

3.1.10. PCR

Reagenz	Hersteller	Katalognummer
Universeller Primer	Thermo Fisher Scientific, Invitrogen Corporation	831506
RNase freies H_2O	Qiagen GmbH, Hilden	145041286
SuperScript II Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford	18064022
SYBR® Green	Thermo Fisher Scientific Inc., Applied Biosystem, Invitrogen Corporation	4385612

Tabelle 10: PCR.

3.1.11. Primer

Ziel	Vorwärts Primer	Rückwärts Primer
ß-Actin	TTGGCAATGAGCGGTTCCGCTG	GACAGCACTGTGTTGGCGTA
miR-708	AAGGAGCTTACAATCTAGCTGGG	Universeller Primer
ERß	CAGCATTCCCAGCAATGTCA	ATCTTGCTTCACACCAGGGA

Tabelle 11: Primer.

3.2. Methoden

3.2.1. Kulturbedingungen

Die Arbeit mit der Zellkultur wurde in der Laminaflow unter sterilen Arbeitsbedingungen durchgeführt. Die Zelllinie HTB-9 wurde in 100 mm Zellkulturplatten in 10 ml RPMI Medium, welches mit 10% FBS (v/v) und 1% Penicillin/Streptomycin supplementiert wurde, kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, 5% CO_2, 100% relativer Luftfeuchte und 95% Luft. Das Hydrogenkarbonatpuffersystem und die CO2-Begasung des Mediums dienten der Konstanthaltung des pH-Wertes des Mediums. Um eine Verdampfung des Mediums zu verhindern, wurde die Luftfeuchtigkeit hochgehalten.

3.2.2. Zählen der Zellen

Um eine Zellzählung durchzuführen, wurden die Zellen zunächst mit 1 ml Trypsin vom Boden der Platte gelöst und dann in ein 15 ml Falcon überführt. Anschließend wurden die Zellen für fünf Minuten bei 1500 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das nun vorhandene Zellpellet wurde in eine zuvor definierte Menge an Medium gegeben. Dann erfolgte für das eigentliche Zählen der Zellen eine Verdünnung im Verhältnis 1:2 mit Trypanblau. In einer Neubauerkammer wurden die lebendigen Zellen dann gezählt. Die Berechnung der Anzahl an Zellen pro ml erfolgte anhand folgender Formel:

$$Zellen\ pro\ ml = Durchschnittliche\ Anzahl\ gezählter\ Zellen \times 10^4 \times Verdünnungsfaktor$$

3.2.3. Passagieren der Zellen

Unter täglicher Beobachtung erfolgte stets bei 70-80% Konfluenz eine Passagierung der Zellen. Das alte Medium wurde dafür abgetragen und die Zellen zweimal mit 5 ml PBS gewaschen. Danach wurden die zur Zelladhäsion nötigen Proteine in den Zellen durch die Zugabe von 1 ml Trypsin gespalten. Da die Zelllinie HTB-9 von einem hochmalignen Karzinom stammt, wiesen die Zellen eine äußerst hohe Adhärenz auf. Daher wurde hier konzentriertere Trypsin-EDTA (0,5%) verwendet. Die Zellkulturschalen wurden so lange inkubiert, bis sich die Zellen vollständig vom Schalenboden gelöst hatten. Für die Durchführung eines 1:2 Split wurden dann 3 ml Medium hinzugegeben und analog 5 ml bei einem 1:3 Split. Davon wurden im Anschluss 2 ml in eine neue Zellkulturschale gegeben und mit 8 ml Medium aufgefüllt. Trypsin wird im Verlauf inaktiv durch das dem Medium zugesetzte FBS und die Inkubation bei 37°C.

3.2.4. Zellstimulation

Als ausreichend Zellkulturschalen vorhanden waren, konnte die Zellstimulation beginnen. Dafür wurden zunächst die Zellen in 35 mm Zellkulturschalen in 2 ml entsprechendem Medium kultiviert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte für 24 Stunden, bis eine Konfluenz von mindestens 70% erreicht wurde. Danach wurde das Medium entfernt, die Platten mit PBS gewaschen und mit Medium ohne FBS aufgefüllt. Durch das fehlende FBS wurden die Zellen in der G0 Phase des Zellzyklus fixiert. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubationszeit von 24 Stunden. Danach konnten die Zellen mit ET-1, ETAR, ETBR, ß-Estradiol, Withaferin A und in Kombinationen stimuliert werden. Der nachstehenden Tabelle 12 sind die verwendeten Mengen an Reagenz für die Stimulation zu entnehmen.

Reagenz	Stammlsg.	Verdünnung	Finale Konzentration	µl/ml Medium
ET-1	400 µM	1:8	50 nM	2,5 µl/ml
ETAR	100 nM	1:1	100 nM	1 µl/ml
ETBR	10 µM	10:1	100 nM	10 µl/ml

Withaferin A	1 µM	1:1	1 nM	1 µl/ml
ß-Estradiol	1 mg	1:49	20 µg	20 µg/ml

Tabelle 12: Liste der Reagenzien und des Verdünnungsschemas für die Stimulation der Urothelkarzinomzellen.

3.2.5. Scratch Assay

Um das Migrationsverhalten der Tumorzellen zu untersuchen, wurde ein Scratch Assay durchgeführt. Die behandelten Zellen wurden in je 1 ml Medium auf zwei 6 Well Platten ausgesät. Das Medium wurde nach 24h abgenommen und durch FCS-freies Medium ersetzt, um die Zellen alle im selben Zellzyklus zu fixieren. Sobald ein geschlossener Zellrasen entstanden war, wurde mit einer Pipettenspitze jeweils ein Kreuz (= Scratch) in die Platten gekratzt. Die Dokumentation erfolgte nach 0h, 3h, 6h und 24h mit Hilfe des Mikroskops. Um einen klaren Überblick zu erhalten, verwendeten wir als direkten Vergleich für die Auswertung nur die Fotos bei 0h und nach 24h. Mit ImageJ wurden die Abstände des Zellrasens zueinander bzw. der zellfreie Bereich dreimal ausgemessen und der Mittelwert gebildet. Aus den Mittelwerten aus dem Foto von 0h und von 24h wurde der prozentuale Zuwachs mit der Formel (M0-M24)x100/M0 berechnet. Dabei ist M0 der Mittelwert der zellfreien Zone im Foto bei 0h und M24 entsprechend im Foto nach 24h. Der prozentuale Zuwachs wurde mit GraphPrism graphisch dargestellt und auf Signifikanz geprüft.

3.2.6. Totale Proteinextraktion

Es erfolgte zunächst eine Stimulation der Zellen wie zuvor beschrieben. Nach Abnahme des Mediums wurde die Zellen zweimal mit 3 ml PBS gewaschen. Danach wurden erneut 2 ml PBS hinzugegeben und die Zelle mit einem Zellschaber von der Zellkulturplatte gelöst. Die Zellen wurden anschließend in einem 15 ml Falcon für fünf Minuten bei 1500 rpm und 4°C zentrifugiert. Der abgenommene Überstand wurde durch 500 µl RIPA-Puffer ersetzt. Es folgte eine Durchmischung mittels Vortexmischer für 1h auf Eis. Die Zellen wurden anschließend bei 4°C und 4000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Der Zelldetritus konnte sich dadurch als Pellet ablagern. Proteine, welche sich im Überstand befanden, wurden in ein neues Eppendorffgefäß umgefüllt. Die Lagerung dieser Proteine erfolgte bei -80°C.

3.2.7. Bradford Assay

Um die totale Proteinmenge der behandelten Zellen zu bestimmen, wurde der Bradford Assay verwendet. Es wurde zunächst eine BSA-Standardkurve generiert, indem 1, 2, 4, 6, 10 µl der Proben zu jeweils 200 µl Bradford Lösung hinzugegeben wurden. 3 µl der Proben wurde dann mit je 200 µl Bradford Lösung versetzt. Mittels ELISA konnten die jeweiligen Absorptionen der Proben bei 595 nm Wellenlänge analysiert werden. Daraus erfolgte die Berechnung der totalen Proteinkonzentration.

3.2.8. Immunopräzipitation (IP)

Mittels Bradford Assay wurde bereits die totale Proteinmenge ermittelt. Von jeder Probe wurde dann für die Immunopräzipitation 500 µg totales Protein in ein neues Eppendorffgefäß gefüllt. Zu den Proben wurde im Anschluss eine Mischung aus dem jeweiligen Antikörper und A/G Plus Agarose beads gegeben und eine Stunde auf Eis inkubiert. Mit Agarose beads erreicht man grundsätzlich eine Beschwerung von Protein-AK-Komplexen. Durch die Zentrifugation für fünf Minuten bei 8000 rpm und 4°C trennten sich die Protein-AK-Komplexe durch die Beschwerung vom Zelllysat ab. Der Überschuss wurde abpipettiert. Nach einer Waschung mit PBS wurden die Proben erneut zentrifugiert, der Überschuss wurde abpipettiert und anschließend wurden die Proben nochmals mit PBS gewaschen. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation, danach wurden die Proben in Laemmli loading dye (20 µl: 16 µl destilliertes H2O + 4 µl dye) resuspendiert. Die Proben wurden für 5 Minuten bei 98°C erhitzt und anschließend wieder zentrifugiert. Nun konnten die Proteine mittels SDS-Page analysiert werden.

3.2.9. SDS-Polyacrylamid-Gelelektropherese (SDS-Page)

Durch eine SDS-Gelelektrophorese lassen sich Proteine nach Ihrem Molekulargewicht auftrennen. Die Auftrennung im Gel ist ladungs- und strukturabhängig. Der Mechanismus basiert auf einer Anlagerung von SDS-Molekülen (1,4g SDS/g Protein) an die Proteine proportional zum Molekulargewicht. Das SDS ist negativ geladen und gleicht somit die Eigenladung der Proteine aus. Diese muss daher nicht weiter berücksichtigt werden. Das Gel wurde in die Apparatur und gegeben und unter Hinzugabe des Laemmli Puffers lief der Prozess der Elektrophorese für ca. 30 Minuten bei 15 mA und dann weitere 30-60 Minuten bei 30 mA. Das Proteingemisch durchlief zunächst ein niederprozentiges Sammelgel und anschließend das höherprozentige Trenngel. Die genaue Zusammensetzung der Gele ist in den Tabellen 13 und 14 aufgeführt. Laemmli Puffer enthält Bromphenolblau, welches vor der Proteinfront lief. Dies sorgte für den Fortgang der Elektrophorese. Zusätzlich zu den Proteinproben wurde immer ein Molekulargewichtsstandard (Proteinmarker) beladen (Abb. 8).

Seperating Gel	
1,5 M TRIS pH 8,8 HCl	1,88 ml
10% SDS	50 µl
30% Acrylamide (29:1)	1,67 ml
10% APS (10 mg/100 ml)	25 µl
TEMED	3 µl
H2O	1,37 ml

Tabelle 13: Seperating Gel Zusammensetzung.

Stacking Gel	
0,5 M TRIS pH 6,8	630 µl
10% SDS	25 µl
30% Acrylamide (29:1)	250 µl
10% APS (10 mg/100 ml)	125 µl
TEMED	3 µl
H2O	1,58 ml

Tabelle 14: Stacking Gel Zusammensetzung.

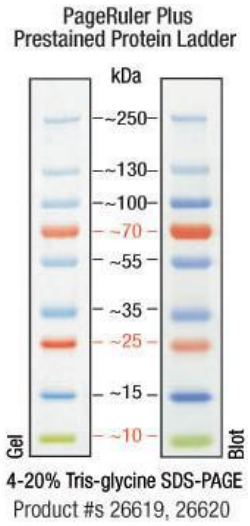

Abbildung 8: PageRuler Plus Pertained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford).

3.2.10. Western Blot

Ein Western Blot ist eine Methode, mit der sich Proteinbanden aus der angefertigten SDS-Page mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachweisen lassen. Für die Durchführung wurden die Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran überführt. In unseren Western Blots wurden immer jeweils 25 µg Protein verwendet. Die Proben wurden mit 4 µl Laemmli dye (Ladepuffer) versetzt und danach auf 20 µl mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Anschließend erfolgte eine Erhitzung für 5 Minuten bei 98°C. Das Laemmli Ladepuffer enthält das Reduktionsmittel beta-Mercaptoethanol, welches bei Erhitzung zu einer Spaltung von intra- und intermolekularen Disulfidbrücken führt. Dadurch geht die räumliche Proteinstruktur verloren. Im Anschluss wurde das Gel mit den Proben und einer Proteinleiter beladen. Dann erfolgte die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE und danach die eigentliche Western Blot Analyse. Für die Durchführung wurde ein sogenanntes Sandwich erstellt, welches oben und unten aus je zwei Whatman-Papieren und dem Gel besteht, in deren Mitte wir die Nitrocellulosemembran einbetteten. Zuvor tränkten wir die Membran und die Filterpapiere in Towin Puffer und 20% Methanol. Die Durchführung des Blottingprozesses erfolgte dann bei 360 mA für eine Stunde auf Eis. Die Nitrocellulosemembran wurde nach dem Blotten für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler in Blockingpuffer (3% Milchpulver in TBST)

geschwenkt, um freie Bindungsstellen abzusättigen. Im Anschluss konnte der erste Antikörper hinzugegeben werden. Die Inkubation erfolgte dann für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach zweimaligem Waschen in TBST für fünf Minuten konnte der zweite Antikörper dann appliziert werden. Dieser wurde wieder für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Alternativ kann man die Antikörper auch über Nacht bei 4°C inkubieren. Es erfolgte eine erneute Waschung mit TBST und danach die Applikation der Clarity Western Blot Lösung. Dann konnte die Auswertung durchgeführt werden, wofür wir den Intas Reader verwendeten. Den Tabellen 6 und 7 sind die verwendeten Antikörper zu entnehmen.

3.2.11. AR-Pulldown-ERß-Interaktion

Der AR-Antikörper wurde mit A/G Plus Agarose Antikörper auf Eis für zwei Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden die nukleären Extrakte von unserer Zelllinie HTB-9 Zellen isoliert und für eine Stunde auf Eis mit dem gekoppelten A/G Plus Agarose AR Antikörper inkubiert. Danach wurde die isolierte DNA von behandelten Zellen oder den unbehandelten Kontrollzellen auf Eis, wie weiter unten beschrieben, inkubiert. Die Proben wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend eine PCR durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden Agarose beads verwendet. Das PCR-Produkt wurde auf 2% Agarosegel geladen.

3.2.12. Nukleäre und cytoplasmatische Isoloation von HTB-9-Zellen

Aus den behandelten und den unbehandelten Kontrollproben der HTB-9-Zellen sollten die nukleären und cytoplasmatischen Extrakte gewonnen werden. Dafür wurde nach Anleitung und Protokoll des Nuclear Extraction Kit vorgegangen. Hierbei wurden alle Zentrifugationen bei 4°C durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen. Das PBS enthielt einen Phosphataseinhibitor. Die Zellsuspension wurde anschließend in 1 ml der PBS/Phosphataseinhibitor-Mischung geschabt und fünf Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert. Es erfolgte eine Verdünnung in hypotonischem Puffer mit anschließender Inkubation für 15 Minuten auf Eis. Danach wurde jeder Probe ein Detergenz zugesetzt und die Mischung wurde bei 5500 U/min zentrifugiert. Die Suspension enthielt nun die zytoplasmatische Fraktion, welche nun auf Eis oder bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden konnte. Es erfolgte eine Resuspension des Pellets in vollständigem Lysepuffer mit anschließender 30-minütigen Inkubation auf einer Schüttelplatte (150 U/min). Im Anschluss wurde auf höchster Stufe gevortext und bei 14.000 U/min für zehn Minuten zentrifugiert. Die entstandene Suspension enthielt nun den Kernextrakt und konnte bei -80°C gelagert werden.

3.2.13. DNA-Isolation

Die DNA-Isolation wurde mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Dabei wurden nach Protokoll des Herstellers vorgegangen [134]. Dazu verwendeten wir die Proteine, die wir, wie in Abschnitt 3.2.6 beschrieben, aus den Zellen isoliert hatten. Zunächst

wurden die Proben in 200 µl PBS suspendiert und 20 µl Qiagen Proteinase K und 200 µl Lysepuffer wurden hinzugefügt. Die Proben wurden gevortext und für zehn Minuten bei 56°C inkubiert. 200 µl Ethanol (96%) wurden hinzugegeben. Im Anschluss konnte das Gemisch auf die im Kit enthaltenen QIAamp Mini spin column gegeben werden. Das Gemisch wurde eine Minute bei 6000 g zentrifugiert und dann wurde die QIAamp Mini spin column in ein neues 2 ml collection tube überführt. Ungebundene Moleküle von der Säulenmatrix wurden entfernt, indem in zwei aufeinanderfolgenden Schritten mit jeweils 500 µl AW1 bzw. AW2 Waschpuffer gewaschen und für eine bzw. drei Minute/n bei 6000 g zentrifugiert wurde. Im letzten Schritt wurde die Säule mit der gebundenen DNA in ein neues Eppendorff Gefäß gestellt. Nach Zugabe von 200 µl Elutionspuffer AE wurde diese erneut eine Minute bei 6000 g zentrifugiert. Das Eluat wurde bei -20°C gelagert.

3.2.14. ERß-Pulldown-pri-miRNA-708

Um die Interaktion zwischen ERß und der pri-miRNA-708 darzustellen, wurden folgende Schritte durchgeführt. Ein ERß-Antikörper wurde zunächst mit A/G PLUS Agarose Antikörper für zwei Stunden auf Eis inkubiert. Von den HTB-9-Zellen wurden nukleäre Extrakte isoliert (s.o.) und auf Eis für eine Stunde mit dem A/G PLUS-Agarose gekoppelten ERß-Antikörper inkubiert. Im Anschluss wurde die totale RNA von den behandelten Proben der Zellen und den unbehandelten Proben als Kontrollen auf Eis unter den unten beschriebenen Bedingungen inkubiert. Es folgte eine zweimalige Waschung mit PBS und die RNA wurde isoliert. Für die Negativkontrolle wurden Agarose beads verwendet. Das PCR-Produkt wurde auf ein 3% Agarosegel geladen.

3.2.15. RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation wurde das RNeasy-Kit von Qiagen verwendet und gemäß des Herstellerprotokolls [135] vorgegangen. Die Puffer enthalten Guanidin-Isothiocynat, damit ein RNAse-freies Arbeiten gewährleisten werden kann. Zunächst wurden unsere Proben mit absolutem Ethanol, RPE-Puffer und beta-Mercaptoethanol versetzt. Diese Mischung wurde anschließend auf eine RNeasy-Kit-Säule transferiert und für 15 Sekunden bei 10.000 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Ein Waschpuffer (RW1-Puffer) wurde hinzugegeben und die Mischung wurde erneut für 15 Sekunden bei 10.000 U/min zentrifugiert. Es folgte eine zweimalige Waschung mit RPE-Puffer und eine Zentrifugation unter oben genannten Bedingungen. Nur im letzten Schritt wurde zwei Minuten lang zentrifugiert, um die Säule zu trocknen. Um die RNA schlussendlich herauszulösen, wurden 25 µl DEPC-Wasser in die Mitte der Säule gegeben und eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der RNA-Extrakt wurde bei -80°C gelagert.

Anschließend sollte die RNA quantifiziert werden. Dafür wurde der NanoDrop1000 (Thermo Scientific) verwendet. 1 µl jeder Probe wurde auf den Messsockel pipettiert und gemäß Herstellerangaben gemessen.

3.2.16. miRNA-Isolation

Für die Isolation der miRNA-708 verwendeten wir das miRNeasy Micro Kit von Qiagen und führten alle Arbeitsschritte nach Protokoll [136] durch. Zunächst wurden die Zellen im Pellet bei 300 x g für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Dabei wurden 700 µl QIAzol Lysis Reagent zu den Proben hinzugegeben, um die Zellstruktur aufzubrechen. Die Zellen wurden für eine Minute gevortext und im Anschluss bei Raumtemperatur für fünf Minuten stehengelassen. In dieser Phase wird eine Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe hervorgerufen. Danach wurde 140 µl Chloroform hinzugegeben und 15 Sekunden geschüttelt. Nach einer weiteren Ruhephase bei Raumtemperatur für zwei Minuten wurde das Röhrchen für 15 Minuten bei 12.000 x g bei 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase sollte nun die RNA enthalten. Diese wurde in ein neues Röhrchen überführt und mit dem 1,5fachen Volumen Ethanol pipettiert. 700 µl davon wurden unverzüglich auf die RNEasy MinElute spin Säule in ein 2 ml Röhrchen gegeben. Dieses wurde dann zweimal bei 8000 x g für 15 Sekunden zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es folgte eine Waschung mit 700 µl RWT Buffer und 500 µl RPE Buffer mit anschließender Zentrifugation für 15 Sekunden bei 8000 x g. Anschließend wurden 500 µl RNAse freies 80%iges Ethanol auf die RNEasy MinElute spin column pipettiert und für 2 Minuten bei 8000 x g zentrifugiert. Nach Zentrifugation mit geöffnetem Deckel bei 5 min auf höchster Geschwindigkeit wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Sammelröhrchen gesetzt und 14 µl RNAse freies Wasser auf die Säule gegeben. Mit geschlossenem Deckel wurde bei höchster Geschwindigkeit für eine Minute zentrifugiert.

3.2.17. Real time polymerase chain reaction (RT-PCR)

Für die RT-PCR verwendeten wir die SuperScript II Reverse Transkriptase und gingen nach Protokoll des Herstellers [137] vor. 50 ng RNA wurden mit mit 0,2 µg zufälligen Primern vermischt und mit DEPC-Wasser auf 12,5 µl aufgefüllt. Dann erhitzten wir die Mischung zunächst zehn Minuten lang auf 70°C, dann erfolgte eine Abkühlung drei Minuten lang auf Eis und schließlich eine Zentrifugation für 30 Sekunden lang bei 12.000 rpm. Aus 5 x reversem Transkriptionspuffer, 100 mM DTT und 10 mM dNTPs wurde ein Mastermix hergestellt, von dem 7 µl zu den Proben gegeben und 10 Minuten bei 25° inkubiert wurden. Danach wurden 100 U Reverse Transkriptase SuperScript II hinzugefügt und 50 Minuten bei 42°C für die Synthese des ersten cDNA-Strangs inkubiert. Die entstandene cDNA wurde 15 Minuten lang auf 70 °C erhitzt und danach auf Eis gekühlt. Nach einer Zentrifugation bei 13.000 U/min für 30 Sekunden konnten die Proben bei -20°C zur weiteren Verwendung gelagert werden. Für die PCR wurde ein Gemisch hergestellt, dessen Zusammensetzung der Tabelle 15 zu

entnehmen ist. Das Endvolumen der Proben für die Durchführung des Experiments betrug 25 µl. Die PCR-Reaktionen wurden in 35 Zyklen durchgeführt. Die endgültigen Amplifikationsprodukte luden wir auf 2,5%igen Agarose Gele in 1x TAE-Puffer bei 120 V.

cDNA	2,5 µl
Fertigmischung RedTaq	12,5 µl
Sense-Primer	0,5 µl
Antisense-Grundierung	0,5 µl
H2O	9,0 µl
Endvolumen	25 µl

Tabelle 15: Zusammensetzung des Gemischs für die PCR.

3.2.18. Quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Um die qRT-PCR durchzuführen, verwendeten wir Twin.tec PCR Platten 96. Alle Proben wurden in Triplikaten angelegt. Dafür wurde ein Mastermix aus je 10 µl SYBR Green, 1 µl Primer und 9 µl RNAse freies H2O pro Probe angefertigt. 1 µl der DNA-Probe wurde mit 19µl des Mastermixes versetzt. Das Programm lief in den in der Tabelle 16 dargestellten Zyklen.

Anzahl der Zyklen	**Zeit**	**Temperatur in °C**
1	20 sec	95
65	15 sec	95
	30 sec	50
	30 sec	72
1	15 sec	70

Tabelle 16: PCR-Programm.

3.2.19. Agarose Gel

Zur Visualisierung von größeren PCR-Produkten, wie z.B. von AR und ERß, wurde ein fertiges 2%iges Agarose Gel verwendet. Wir versetzten 5 µl DNA-Marker mit jeweils 10 µl der PCR-Proben und fertigten Duplikaten an. Nach einer Laufzeit von 20 Minuten in dem E-Gel Precast Agarose Electrophoresis System (Thermo Fisher Scientific) konnten die PCR-Produkte visualisiert werden.

3.2.20. Polyacrylamid Gel

Zur Visualisierung kleinerer PCR-Produkte, wie z.B. von miRNAs, verwendeten wir ein 10% Polyacrylamidgel, dessen Zusammensetzung der Tabelle 17 zu entnehmen ist. Da ohne Isopropanol gearbeitet wird, musste das Gel zunächst für 30 Minuten bei 120 V laufen, um eine Normalisierung zu generieren. Danach konnten die Proben beladen werden und das Gel

lief für weitere 30 Minuten bei 120 V. Dieser Teil erfolgte aufgrund des SYBR Greens in den PCR-Proben im Dunkeln. TBE wurde als Running Buffer verwendet. Für die Auswertung wurde der Intas Reader genutzt.

Reagenz	**Benötigtes Volumen**
TEMED	6 µl
APS (10%)	50 µl
Acrylamid (30%)	5 ml
TBE	1 ml
H2O	5,6 ml

Tabelle 17: Zusammensetzung des 10% Polyacrylamidgels.

3.3. Statistische Auswertung

Für die statistische Analyse wurde das Programm GraphPrism5 (Graphpad Software, La Jolla, USA) verwendet. Dabei wurde eine ANOVA und ein unpaired t-test durchgeführt und die Signifikanz berechnet (*p<0,05,**p<0,01,***p<0,001, ****<0,0001).

4. Ergebnisse

4.1. Gesteigerte Zellmigration nach Behandlung mit ß-Estradiol und Withaferin

Die verwendete Zellkultur HTB-9 stammt von einem Grad II Urothelkarzinom. Grundsätzlich konnte von einer schnellen Zellteilung ausgegangen werden. Um das zu visualisieren, führten wir nach Stimulation der Zellen ein Scratch Assay durch. In der Analyse konnte grundsätzlich bei allen Stimulationen und der unbehandelten Kontrolle eine zunehmende Schließung des eingekratzten Kreuzes erkannt werden. Vor allem die Behandlungen mit ß-Estradiol und Withaferin zeigten eine starke Zellmigration mit Schließung des Zellrasens.

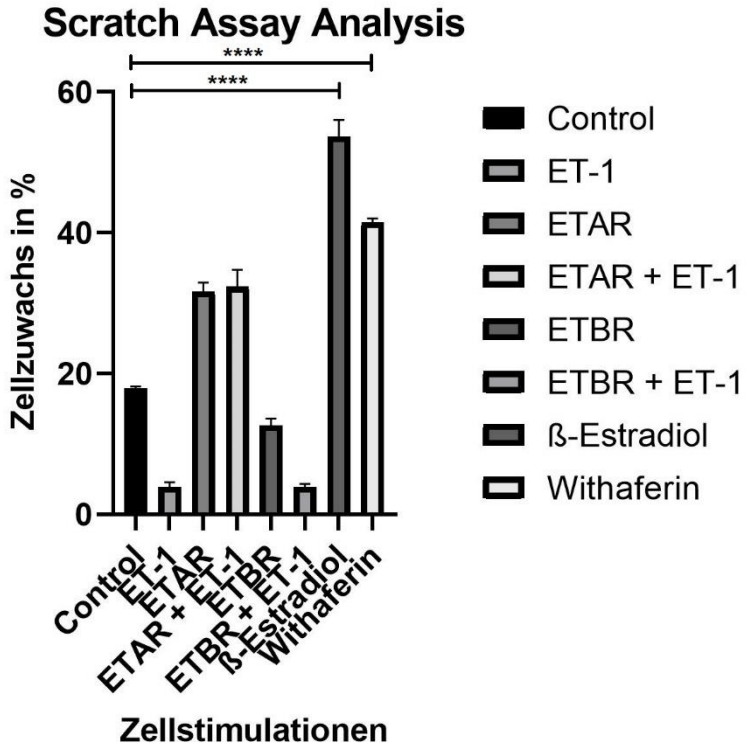

*Abbildung 9: Scratch Assay Analysis der behandelten Zellen. Es konnte eine signifikante Zunahme des Zellwachstums nach 24 Stunden bei den mit ß-Estradiol und Withaferin behandelten Zellen gezeigt werden (*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001, ****p<0,0001).*

4.2. ET-1 bildet einen Komplex mit AR

Bekannt ist, dass ET-1 und der AR an der Entstehung von Urothelkarzinomen beteiligt sind [81,82,96,97]. Daher führten wir eine ET-1-AR-Ko-Immunopräzipitation durch. Dafür erfolgte eine Behandlung der HTB-9-Zellen mit ET-1. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde das Gesamtprotein isoliert. Im Anschluss wurde das isolierte Protein mit einem ET-1 Agarose-Beads gekoppelten Antikörper inkubiert. In Abbildung 1 ist die Interaktion zwischen AR und ET-1 dargestellt. Die Zellen, die mit ET-1 behandelt wurden, zeigen im Vergleich zu der HTB-9 Kontrolle ein stärkeres Signal.

Abbildung 10:: ET-1 Co-Immunopräzipitation. HTB-9-Zellen wurden behandelt und eine Immunpräzipitation wurde durchgeführt. Die Interaktion zwischen ET-1 und AR wurde mittels SDS-PAGE ermittelt.

4.3. AR bindet intranukleäre ERß-DNA

Außerdem wurde bereits beschrieben, dass der AR als Transkriptionsfaktor wirken kann und dabei ERß als Target nutzt [109]. Sobald der AR in den Zellkern geschleust wird, bindet er an die ERß-DNA, wie wir hier in unserem AR-ERß-DNA-Pulldown-Assay darstellen konnten. Abbildung 11 zeigt, dass bei den mit dem AR inkubierten Zellen ein deutliches Signal bei der berechneten PCR-Produktgröße von ERß erkennbar ist.

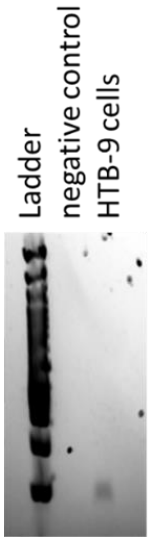

Abbildung 11: AR-ERß-DNA-Pulldown-Assay und PCR mit ERß spezifischen Primern wurden durchgeführt, das PCR-Produkt wurde auf ein 2%iges Agarosegel geladen. Als Negativkontrolle wurden nur mit Wasser inkubierte Agarose-Beads verwendet. Es war ein deutliches Signal bei der berechneten PCR-Produktgröße zu erkennen.

4.4. Behandlung mit ß-Estradiol und Withaferin steigert die Expression von ERß

Die HTB-9-Zellen wurden mit ET-1, den Endothelinrezeptorblockern, ß-Estradiol, Withaferin und in Kombinationen behandelt. Ein Western Blot wurde durchgeführt. Ein deutlicher Anstieg des ERß-Proteinspiegels wurde nach der Behandlung mit ß-Estradiol und Withaferin festgestellt. Die Proben, die mit ET-1 und den Rezeptorblockern behandelt wurden, verzeichneten einen weniger ausgeprägten Anstieg der ERß-Spiegel.

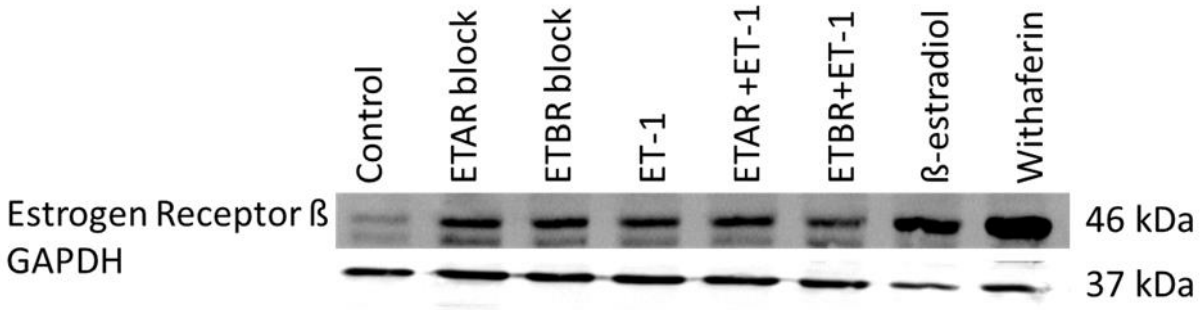

Abbildung 12: Western Blot von behandelten HTB-9-Zellen: es kann ein deutlicher Anstieg der ERß Level nach Behandlung mit ß-Estradiol und Withaferin.erkannt werden.

4.5. Hochregulierung von ERß steigert die Expression der miRNA-708

Aus den behandelten Zellen wurde die miRNA-708 isoliert. Es konnte in allen Behandlungen eine miRNA-708-Expression nachgewiesen werden. Besonders die Zellen, die mit Withaferin A behandelt wurden, wiesen eine signifikante Hochregulierung der miRNA-708 auf.

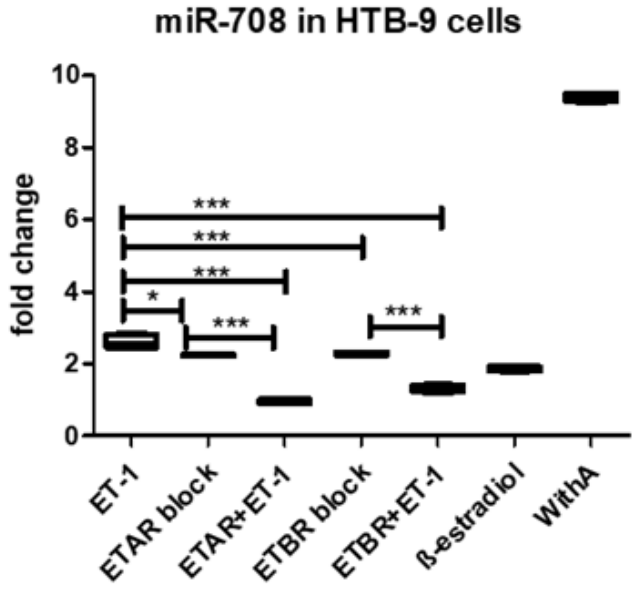

Abbildung 13: Signifikante Hochregulierung der miR-708 in mit Withaferin A behandelten Zellen.

4.6. ERß bindet die pri-miRNA-708

Die Interaktion zwischen ERß und der pri-miR-708 wurde durch ein ERß-Pulldown-Assay untersucht. Dazu wurden Kernextrakte isoliert und mit einem Agarose-Bead-gekoppelten ERß-Antikörper inkubiert. Nach der Inkubation wurde die DNA isoliert und eine PCR durchgeführt. Bei der berechneten PCR-Produktgröße für die miRNA-708 konnte ein deutliches Signal verzeichnet werden. Das deutet auf eine Bindung des ERß an die pri-miR-708 hin. Abbildung 14 zeigt die Interaktion zwischen ERß und dem pri-miR-708.

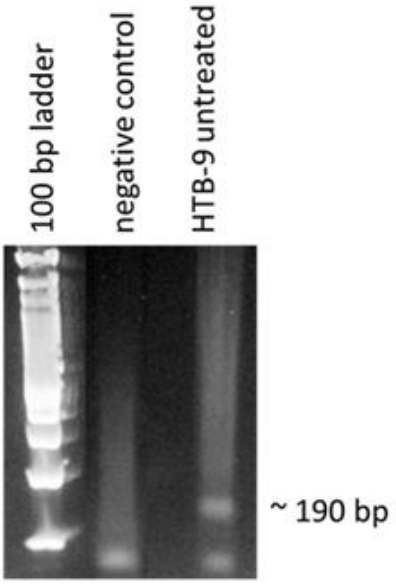

Abbildung 14: ERß-Pulldown von nukleären Extrakten. Isolierte Kernextrakte wurden mit ERß-AK inkubiert. Bei der berechneten PCR-Produktgröße für die miRNA-708 ist ein deutliches Signal zu erkennen.

4.7. Hochregulierung von miRNA-708 vermindert die Bildung von E-Cadherin

Ein Zielgen der miR-708 ist bekanntlich E-Cadherin [115]. Daher analysierten wir die Level von E-Cadherin in den behandelten HTB-9-Zellen mittels qRT-PCR. Es konnte eine signifikante Herunterregulierung (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001) von E-Cadherin in den Proben gezeigt werden, die mit Withaferin A behandelt wurden. Das waren auch genau die Proben, in denen wir bereits eine erhöhte miR-708 detektieren konnten. Weiterhin konnte eine herabgesetzte Expression von E-Cadherin in den mit ß-Estradiol behandelten Zellen verzeichnet werden. Die E-Cadherin Level dieser beiden Behandlungen waren besonders auffällig niedrig im Vergleich zu den anderen Behandlungen. Die E-Cadherin Level in den mit ETAR und ETBR behandelten Zellen waren außerdem niedriger als in den Zellen, die mit ET-1 und den Rezeptorblockern in Kombination mit ET-1 behandelt wurden. Abbildung 15 zeigt die qRT-PCR-Ergebnisse.

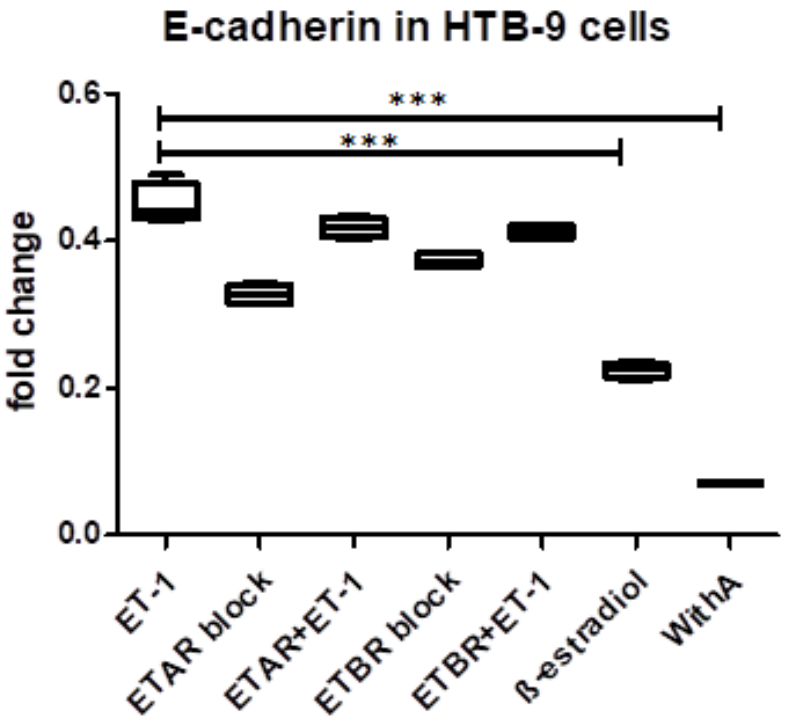

*Abbildung 15: qRT-PCR-Ergebnisse der E-Cadherin-Expression in HTB-9 behandelten Zellen. Die Expression von E-Cadherin ist in den mit Withaferin A und ß-Estradiol behandelten Zellen sowie nach der ET-1-Rezeptorblockade signifikant herunterreguliert. (*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001).*

5. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit ist es, den hypothetisierten Signalweg, der zur Entstehung von Urothelkarzinomen führt, weiter zu entschlüsseln. Durch unsere Experimente sollten einzelne Mitspieler dieser Signalkaskade identifiziert und der Einfluss, den sie aufeinander nehmen, genauer untersucht werden. Diese Erkenntnisse können in Zukunft gegebenenfalls Anhaltspunkte für die Diagnostik und Therapie von Urothelkarzinomen bieten. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte der Signalkaskade aufgegriffen, mit unseren Ergebnissen verknüpft und diskutiert.

5.1. ß-Estradiol und Withaferin erhöhen die Teilungsrate von HTB-9

Bevor der Signalweg Stück für Stück entschlüsselt werden sollte, wurde das Zellmigrationsverhalten der behandelten HTB-9-Zellen im Vergleich mit den unbehandelten Kontrollen untersucht. In der Literatur ist vielfach beschrieben, dass der Östrogensignalweg in Verbindung mit der Entstehung und Progression von Urothelkarzinomen steht [45,46]. Nach Behandlung unserer Zellen mit ß-Estradiol und Durchführung eines Scratch Assays konnte eine signifikante Steigerung des Zellwachstums und der Zellmigration gezeigt werden. Dies bestätigt die Datenlage und gibt Anlass, weitere Experimente zur Untersuchung des Östrogensignalwegs durchzuführen.

Auch die Behandlungen mit Withaferin A führte im Scratch Assay zu einem signifikanten Anstieg von Zellwachstum und -Migration. In der Literatur wird eine inhibitorische Wirkung von Withaferin A auf den ERa beschrieben. Daher findet der Wirkstoff Anwendung in der Therapie unterschiedlicher Tumorerkrankungen [56–58]. Der Einfluss von Withaferin auf den ERß ist jedoch unbekannt. In unserem Scratch Assay konnten wir also zeigen, dass Withaferin die Zellteilung und damit die Tumorprogression von Urothelkarzinomen noch weiter steigert. Somit hat Withaferin also eine gegensätzliche Wirkung auf die beiden ER und bestätigt damit die Relevanz der Differenzierung zwischen den Rezeptoren.

5.2. Der Komplex aus ET-1 und AR

Die weiteren Experimente zielten darauf ab, den Signaltransduktionsweg zu entschlüsseln und die einzelnen Mitspieler in Relation zu setzen. Zunächst bindet ET-1 an den AR und geht einen Komplex mit ihm ein. Erhöhte Spiegel von ET-1 in Urothelkarzinomen wurden in der Literatur bereits beschrieben [81]. Außerdem scheint eine Erhöhung von ET-1 mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf verknüpft zu sein, da erhöhte ET-1 Spiegel sowohl bei Prostatakarzinomen [78] als auch bei Urothelkarzinomen [82] mit einem erhöhten Metastasierungspotenzial einhergeht. Weiterhin ist die Entwicklung von zielgerichteten Therapien durch Blockade des Endothelin-Signalwegs schon in anderen Tumorerkrankungen Gegenstand aktueller Forschungen [79,80].

Auch der Einfluss des AR auf die Tumorgenese von Urothelkarzinomen wurde bereits mehrfach beschrieben [96,97]. Die Datenlage bezüglich der Rolle des AR in Urothelkarzinomen ist jedoch auch kontrovers [103,104]. Während einige Studien dem AR eine klare Rolle in der Tumorgenese zuschreiben [95–97], sprechen sich andere Autoren dagegen aus [138,139]. Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten damit erklärt werden, dass es viele Spleißvarianten des AR gibt [106,140]. Beim in vitro Nachweis des AR ist daher wichtig, an welcher Stelle am AR der Antikörper binden soll. Der Antikörper, der in der Studie der Arbeitsgruppe von Zhai, Wang et al. (2012) verwendet wurde, bindet am N-Terminus des AR, an dem normalerweise nicht gespleißt wird. In dieser Studie konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass Zellen des Urothelkarzinoms den AR replizieren [140]. Weiterhin wurde der Zusammenhang zwischen ET-1 und AR bereits in Prostatakarzinomen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung von ET-1 mit einer gesteigerten Expression des AR einhergeht [73].

Zum Nachweis dieses Komplexes als Initiator unserer hypothetisierten Kaskade führten wir Experimente mit der Zellkultur aus HTB-9 Zellen durch. Diese Zellen stammen aus einem menschlichen Urothelkarzinom Grad II. Das heißt, das Karzinom wuchs muskelinvasiv. Für die Zellkultur eigneten sich diese Zellen gut, da sie sich schnell teilten und wir somit alle Experimente mindestens in Duplikaten durchführen konnten. Allerdings lassen sich unsere Ergebnisse dann nur auf muskelinvasive und somit schon weiter fortgeschrittene Karzinome beziehen. Interessant wäre ebenfalls ein Vergleich mit Zellen eines nicht-muskelinvasiven Urothelkarzinoms. Dieser Vergleich könnte Gegenstand folgender Arbeiten sein.

Die Zellen wurden mit ET-1 behandelt und anschließend das Totale Protein isoliert. Nach Zugabe des ET-1 Antikörpers zeigte die Immunpräzipitation einen Zusammenhang zwischen ET-1 und AR in den Zellen. Der Nachweis des AR erfolgte auf einer SDS-Page. Die Zellen, die mit ET-1 vorbehandelt waren, wiesen ein viel deutlicheres Signal des AR auf als die unbehandelten Zellen. In diesem Experiment konnten wir also zum einen zeigen, dass Zellen des Urothelkarzinoms ET-1 und den AR verstärkt exprimieren und somit die Studienlage bestätigen [81,82,96,97,140]. Die beiden Mitspieler des Signalwegs bieten also potenzielle Angriffspunkte für die Entwicklung therapeutischer Targets. Zum anderen lassen sich unsere Ergebnisse auch mit unserer Annahme vereinbaren, dass ET-1 und AR einen Komplex im Cytoplasma eingehen.

5.3. AR aktiviert ERß

Der Komplex aus ET-1 und AR wandert unserer Annahme nach im Anschluss in den Kern und erhöht die Transkription des ERß. Dass Urothelkarzinome eine erhöhte Expression des ERß aufweisen, ist in der Literatur bereits mehrfach beschrieben. Dabei ist ERß vermehrt vor allem in muskelinvasiven Karzinomen nachweisbar und ebenfalls mit Rezidiven assoziiert [44–46].

Außerdem konnte in experimentellen Studien zu Mammakarzinomen gezeigt werden, dass Androgen- und Östrogen-Signalweg in Verbindung stehen. Durch Zugabe eines Androgenliganden konnte dabei die Expression des ERß gesteigert werden [107–109].

Um den Zusammenhang zwischen AR und ERß darzustellen, führten wir ein AR-ERß-Pulldown-Assay mit nachfolgender PCR durch. Das PCR-Produkt zeigte auf einem Agarosegel im Gegensatz zur Kontrolle mit Wasser ein deutliches Signal. Dieses Ergebnis bestätigt, dass ERß und AR in muskelinvasiven Karzinomen vermehrt exprimiert werden und zeigt auch, dass die beiden Rezeptoren eine Protein-Protein-Verbindung eingehen. Der AR nimmt also auch in Urothelkarzinomen Einfluss auf den ERß und die erhöhte Expression des ERß ist abhängig vom AR.

5.4. ERß erhöht die Expression der miRNA-708

Weiterhin führt die erhöhte Expression von ERß zu einer vermehrten Bildung der miRNA-708. Howard et al (2018) legten bereits das komplexe Zusammenwirken des Östrogenrezeptors mit miRNAs dar. Unter anderem wurde beschrieben, dass die Aktivierung des Östrogensignalwegs die Expression von miRNAs steigern kann [119]. In der Karzinogenese verschiedener Tumorerkrankungen konnte die Beteiligung der miRNA-708 nachgewiesen werden [115,120]. Auch Urothelkarzinome scheinen die miRNA-708 vermehrt zu exprimieren [121,122].

Zum Nachweis des Einflusses des ERß auf die miRNA-708 wurden die HTB-9 Zellen mit ET-1, Blockern des ETAR und ETBR, Withaferin A und ß-Estradiol behandelt. Im Anschluss sollte der ERß nachgewiesen werden. Mittels Western Blot konnte eine deutliche Hochregulierung des ERß in den mit ß-Estradiol und Withaferin A behandelten Zellen gezeigt werden. Der Nachweis des ERß in den HTB-9 Zellen konnte hier zunächst wie auch im Pulldown-Assay bestätigen, dass Urothelkarzinome diesen Rezeptor vermehrt exprimieren. Besonders stark erhöht war der ERß in den mit Withaferin A und mit ß-Estradiol behandelten Zellen. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass die Behandlung mit ß-Estradiol zu einer Erhöhung von ERß führt [141]. Die Untersuchung der Zellen, die mit den ETR-Blockern behandelt wurden, zeigten weniger starke Nachweise der ERß. Die Blockade der ETR verhindert also den Ablauf unserer hypothetisierten Signalkaskade. Dies bestätigt wiederum, dass der Endothelin-Signalweg die Voraussetzung für die erhöhte Expression von ERß bildet.

Durch Behandlung der Zellen mit Withaferin A sollte getestet werden, ob sich dieser Wirkstoff wie auch in anderen Tumortherapien [55] für eine kombinierte Therapie eignet. Der prädominante ER in Urothelkarzinomen ist der ERß [44]. Withaferin hemmt die Funktion des ERa [56–58], jedoch sind keine Effekte auf den ERß bekannt. Nach Behandlung konnte eine starke

Hochregulierung des ERß detektiert werden. Dies zeigt, dass Withaferin A die Expression des ERß und somit die Karzinogenese nicht stoppt, sondern eher triggert. Somit eignet sich dieser Wirkstoff nicht zur antitumoralen Therapie. Auch die mit ß-Estradiol behandelten Zellen verzeichneten eine starke Expression des ERß. Damit konnte die Studienlage bezüglich des Einflusses des Östrogensignalwegs auf die Tumorgenese von Urothelkarzinomen bestätigt werden. Auch in unseren Scratch Assays konnten wir zeigen, dass die Behandlung der Zellen mit ß-Estradiol und Withaferin verglichen mit den unbehandelten Kontrollzellen zu einer sehr starken Zellteilung und Zellmigration führt.

Anschließend wurde mit den behandelten Zellen eine miRNA-Isolation durchgeführt. Diese zeigte eine Hochregulierung der miRNA-708 in den mit Withaferin A behandelten Zellen. Weiterhin wurden aus den behandelten Zellen mittels Zellkernextraktion die Kernbestandteile extrahiert und mit ERß-Antikörper versetzt. Nach Inkubation wurde die DNA isoliert und eine PCR durchgeführt. Auf der SDS-Page konnte im Vergleich zu den unbehandelten Zellen und der Kontrolle ein deutliches Signal detektiert werden, was auf eine Verbindung zwischen ERß und pri-miRNA-708 hinweist. Diese Ergebnisse belegen, dass die Aktivierung des Östrogensignalwegs die Expression von miRNAs, genauer gesagt der miRNA-708, steigert. Wir konnten also bestätigen, dass die miRNA-708 in Urothelkarzinomen erhöht ist und somit zeigen, dass sie in die Karzinogenese involviert ist. Im Zellkernextrakt wurde eine Verbindung des ERß und der pri-miRNA-708, der Vorstufe der miRNA-708, nachgewiesen. Das zeigt ebenfalls, dass die Aktivierung des ERß für die Bildung der miRNA-708 verantwortlich ist.

Die Blockade der ETR in den Zellen führte zu einer verminderten Expression der miRNA-708 verglichen mit der Blockade von ET-1. Die Rolle der ETR als auch der miRNA-708 in der Pathogenese von Urothelkarzinomen wird dadurch ebenfalls erneut belegt, da durch Blockade der ETR die ganze Signalkaskade nicht ablaufen kann.

5.5. miRNA-708 verringert E-Cadherin

Im nächsten Schritt in unserem Signalweg führt die miRNA-708 zu einer Herunterregulierung von E-Cadherin. Bekannt ist bereits, dass E-Cadherin eines der Zielgene der miRNA-708 ist [115]. Die Verminderung dieses Moleküls wurde schon in verschiedenen Tumorentitäten beobachtet und ist mit einem geringerem progressions- und rezidivfreien Überleben assoziiert [129,130]. Auch in Urothelkarzinomen spricht vermindertes E-Cadherin für eine schlechtere Prognose und einen aggressiveren Krankheitsverlauf [127,131], da es vor allem in muskelinvasiven Karzinomen herunterreguliert ist [133].

Um das nachzuweisen, wurden die E-Cadherin-Level in den behandelten Zellen mittels qT-PCR ermittelt. Dabei konnte eine Herunterregulierung von E-Cadherin in den Zellen, die mit

Withaferin A und ß-Estradiol behandelt wurden, gezeigt werden. In den Zellen, die mit ETR-Blockern behandelt wurden, wurde E-Cadherin leicht vermindert nachgewiesen. Im Vergleich dazu wurde in den Zellen, die mit ET-1 und der Kombination aus ET-1 und ETR behandelt wurden, E-Cadherin nicht vermindert nachgewiesen. Auffällig ist, dass in genau diesen Zellen, die E-Cadherin vermindert exprimieren, die miRNA-708 vermehrt gebildet wurde. Dies deutet darauf hin, dass die miRNA-708 zu einer Herunterregulierung von E-Cadherin führt. Diese Beobachtung verknüpft somit zwei Schritte in der Signalkaskade. Wir konnten also bestätigen, dass E-Cadherin als prognostischer Marker analysiert werden sollte.

Die Zellen, die mit den ETR-Blockern behandelt wurden, zeigten eine leichte Herunterregulierung von E-Cadherin. Die Blockade der ETR sollte in der Theorie dazu führen, dass die Signalkaskade nicht abläuft. Dies wird einerseits in der Literatur und andererseits durch unsere vorigen Experimente bestätigt. Studien beschreiben, dass die Blockade der ETR die Herunterregulierung von E-Cadherin stoppen und somit die mesotheliale-mesenchymale Transition verhindern [142–144]. Auch unsere vorigen Experimente zeigen eine geringere Expression von ERß und der miRNA-708 in den ETR-blockierten Zellen im Gegensatz zu den mit Withaferin A und ß-Estradiol behandelten Zellen. Das spricht ebenfalls dafür, dass die Signalkaskade durch die Blockade des Endothelin-Signalwegs nicht abläuft. Allerdings ist immer nur ein ETR in den Behandlungen blockiert worden. Wenn der eine ETR blockiert ist, kann die Signalkaskade immer noch über den anderen ETR ablaufen. Das erklärt, warum E-Cadherin nicht so stark herunterreguliert ist wie in den Behandlungen mit ß-Estradiol und Withaferin. Für weitere Experimente wäre es daher interessant, eine Behandlung mit beiden Blockern durchzuführen, um zu sehen, ob der E-Cadherin-Spiegel gar nicht vermindert ist.

5.6. Ausblick

Wir konnten also mit unseren Experimenten die einzelnen Mitspieler unserer hypothetisierten Signalkaskade nachweisen und auch einige Zusammenhänge der Moleküle untereinander skizzieren. Diese Signalkaskade bietet Anhaltspunkte für diagnostische und therapeutische Entwicklungen.

Die weitere Planung dieses Projekts sieht vor, verschiedene Proteine aus dieser Signalkaskade im Urin und Blut von Patient:innen nachzuweisen. Diese könnten als Biomarker zur Detektion von Urothelkarzinomen, aber auch als Verlaufskontrolle und Nachweis des Therapieerfolgs dienen. Beispielsweise könnte man in diesem Zusammenhang E-Cadherin, die miRNA-708 und weitere Mitspieler unserer Signalkaskade durch ein ELISA in Serum und Urin nachweisen. Ein großer Vorteil bei Durchsetzung einer Detektionsmethode mit Biomarkern im Urin wäre die fehlende Invasivität. Bevor das weiterverfolgt wird, müssen zunächst weitere Analysen erfolgen und der Signalweg noch genauer entschlüsselt werden.

Dafür könnten die Experimente beispielsweise mit einer weiteren Zellkultur aus einem NMIBC durchgeführt werden.

Therapeutisch interessant ist basierend auf unseren Ergebnissen die Rolle des Androgenrezeptors in der Karzinogenese von Urothelkarzinomen. Die Androgendeprivationstherapie wird seit vielen Jahren bei Prostatakarzinomen angewendet und bietet daher schon viel klinische Erfahrung. Auf dem Markt sind bereits verschiedene Präparate mit unterschiedlichen Wirkmechanismen, die man in klinischen Studien bei Patient:innen mit Urothelkarzinomen erproben könnte. Problematisch könnte in dieser Therapie allerdings eine mögliche Resistenzbildung sein. Dies ist auch eine wichtige Therapielimitation bei der Androgendeprivation von Prostatakarzinomen [93]. Dennoch verzeichnet diese Therapie seit Jahrzehnten Erfolge und eine klinische Testung auf die Wirkung auf Urothelkarzinome wäre von großem wissenschaftlichem Interesse.

Außerdem könnte die Nutzung eines ERß-Blockers Gegenstand zukünftiger Forschungen sein. Wie bereits beschrieben, ist die Differenzierung der beiden ER von therapeutischer Relevanz. Aus der Therapie des Mammakarzinoms ist bereits der selektive Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen bekannt. Dabei fokussierte sich die Therapie allerdings eher auf den ERa, obwohl es für den Therapieerfolg wichtig wäre, die Rezeptoren getrennt voneinander zu betrachten und Mammakarzinome entsprechend zu behandeln [49]. Für die zukünftige Therapie sowohl von Mammakarzinomen, als auch von Urothelkarzinomen wäre es von besonderem Interesse, einen ERß-Blocker zu entwickeln und dessen Wirksamkeit zu erproben.

6. Literaturverzeichnis

1 Michel MS, Thüroff JW, Janetschek G, Wirth M, eds. Die Urologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2016.

2 Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe. S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms. https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/harnblasenkarzinom/.

3 Cheung G, Sahai A, Billia M, Dasgupta P, Khan MS. Recent advances in the diagnosis and treatment of bladder cancer. *BMC Med* 2013; 11: 13. https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-13.

4 Svatek RS, Hollenbeck BK, Holmäng S, et al. The economics of bladder cancer: costs and considerations of caring for this disease. *Eur Urol* 2014; 66: 253–62. https://doi.org/10.1016/j.eururo.2014.01.006.

5 Kühnel W. Taschenatlas Histologie. Stuttgart: Thieme, 2014.

6 Amann K, Kain R, Klöppel G, eds. Pathologie. Urogenitale und Endokrine Organe, Gelenke und Skelett. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2016.

7 Böcking A. Urinzytologie. Praxis und Atlas. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin / Heidelberg, 2013.

8 Aumüller G, Aust G, Conrad A, Engele J, Kirsch J, Maio G. Duale Reihe Anatomie. Stuttgart: Thieme, 2020.

9 Lerner SP, Schoenberg MP, Sternberg CN, eds. Bladder cancer. Diagnosis and clinical management. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2015.

10 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 2018; 68: 7–30. https://doi.org/10.3322/caac.21442.

11 Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al., eds. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2011. Basierend auf der November 2013 SEER Datenerhebung und veröffentlicht auf der SEER Website im April 2014. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2011/.

12 Hofstetter AG. Urologie Für Die Praxis. Munich: J. F. Bergmann Verlag GmbH & Company KG, 2013.

13 Cumberbatch MGK, Jubber I, Black PC, et al. Epidemiology of Bladder Cancer: A Systematic Review and Contemporary Update of Risk Factors in 2018. *Eur Urol* 2018; 74: 784–95. https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.09.001.

14 Schmelz H-U, Leyh H, eds. Facharztprüfung Urologie. 1000 kommentierte Prüfungsfragen. Stuttgart: Thieme, 2014.

15 Cumberbatch MG, Rota M, Catto JWF, La Vecchia C. The Role of Tobacco Smoke in Bladder and Kidney Carcinogenesis: A Comparison of Exposures and Meta-analysis of Incidence and Mortality Risks. *Eur Urol* 2016; 70: 458–66. https://doi.org/10.1016/j.eururo.2015.06.042.

16 Drope J. The Tobacco Atlas. https://tobaccoatlas.org/topic/consumption/# (accessed Dec 02, 2020).

17 Jocham D, ed. [Spezielle Urologie. Tumoren, Blasenentleerungsstörungen im Erwachsenenalter, Blasenentleerungsstörungen im Kindesalter, Harnableitung, Gynäkologische Urologie, Andrologie, Nierentransplantation, Notfälle. Stuttgart, New York: Thieme, 2007.

18 Fernández MI. Urothelkarzinom der Harnblase: Epidemiologie, Ätiologie und Risikofaktoren. In: Michel MS, Thüroff JW, Janetschek G, Wirth M, eds. Die Urologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2016: 695–702.

19 Niegisch G, Hoffmann MJ, Koutsogiannouli EA, Schulz WA. Epigenetik des Urothelkarzinoms : Pathogenese, verbesserte Diagnostik und neue Therapieansätze. *Urologe A* 2015; 54: 526–32. https://doi.org/10.1007/s00120-014-3756-1.

20 Maas M, Rausch S. Urothelkarzinom der Harnblase. *Uro-News* 2021; 25: 34–43. https://doi.org/10.1007/s00092-021-4686-z.

21 DeSouza K, Chowdhury S, Hughes S. Prompt diagnosis key in bladder cancer. *Practitioner* 2014; 258: 23-7, 3.

22 Schmidt-Hansen M, Berendse S, Hamilton W. The association between symptoms and bladder or renal tract cancer in primary care: a systematic review. *Br J Gen Pract* 2015; 65: e769-75. https://doi.org/10.3399/bjgp15X687421.

23 Chu AT, Holt SK, Wright JL, et al. Delays in radical cystectomy for muscle-invasive bladder cancer. *Cancer* 2019; 125: 2011–17. https://doi.org/10.1002/cncr.32048.

24 SMART - Servier Medical ART, https://smart.servier.com/.

25 Schmelz HU, Sparwasser C, Weidner W, eds. Facharztwissen Urologie. Differenzierte Diagnostik und Therapie. Heidelberg: SpringerMedizin, 2014.

26 Hautmann R, Gschwend JE, eds. Urologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014.

27 Rübben H, ed. Uroonkologie. Mit 273 Tabellen. Heidelberg: Springer-Medizin-Verl., 2007.

28 Yeung C, Dinh T, Lee J. The health economics of bladder cancer: an updated review of the published literature. *Pharmacoeconomics* 2014; 32: 1093–104. https://doi.org/10.1007/s40273-014-0194-2.

29 Droller MJ. Bladder cancer: state-of-the-art care. *CA Cancer J Clin* 1998; 48: 269–84. https://doi.org/10.3322/canjclin.48.5.269.

30 Viswambaram P, Hayne D. Gender discrepancies in bladder cancer: potential explanations. *Expert Rev Anticancer Ther* 2020; 20: 841–49. https://doi.org/10.1080/14737140.2020.1813029.

31 Hsu I, Vitkus S, Da J, Yeh S. Role of oestrogen receptors in bladder cancer development. *Nat Rev Urol* 2013; 10: 317–26. https://doi.org/10.1038/nrurol.2013.53.

32 Albers P, Heidenreich A, eds. Standardoperationen in der Urologie. Stuttgart: Thieme, 2014.

33 Cohn JA, Vekhter B, Lyttle C, Steinberg GD, Large MC. Sex disparities in diagnosis of bladder cancer after initial presentation with hematuria: a nationwide claims-based investigation. *Cancer* 2014; 120: 555–61. https://doi.org/10.1002/cncr.28416.

34 Moorthy HK, Prabhu GGL, Venugopal P. Clinical and therapeutic implications of sex steroid hormone receptor status in urothelial bladder cancer. *Indian J Urol* 2020; 36: 171–78. https://doi.org/10.4103/iju.IJU_320_19.

35 Koti M, Ingersoll MA, Gupta S, et al. Sex Differences in Bladder Cancer Immunobiology and Outcomes: A Collaborative Review with Implications for Treatment. *Eur Urol Oncol* 2020; 3: 622–30. https://doi.org/10.1016/j.euo.2020.08.013.

36 Jia M, Dahlman-Wright K, Gustafsson J-Å. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2015; 29: 557–68. https://doi.org/10.1016/j.beem.2015.04.008.

37 Ganten D, Ruckpaul K. Grundlagen der Molekularen Medizin. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013.

38 Fuentes N, Silveyra P. Estrogen receptor signaling mechanisms. *Adv Protein Chem Struct Biol* 2019; 116: 135–70. https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.01.001.

39 McGrath M, Michaud DS, Vivo I de. Hormonal and reproductive factors and the risk of bladder cancer in women. *Am J Epidemiol* 2006; 163: 236–44. https://doi.org/10.1093/aje/kwj028.

40 Cantor KP, Lynch CF, Johnson D. Bladder cancer, parity, and age at first birth. *Cancer Causes Control* 1992; 3: 57–62. https://doi.org/10.1007/BF00051913.

41 Dietrich K, Demidenko E, Schned A, Zens MS, Heaney J, Karagas MR. Parity, early menopause and the incidence of bladder cancer in women: a case-control study and meta-analysis. *Eur J Cancer* 2011; 47: 592–99. https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.10.007.

42 Davis-Dao CA, Henderson KD, Sullivan-Halley J, et al. Lower risk in parous women suggests that hormonal factors are important in bladder cancer etiology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 20: 1156–70. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-11-0017.

43 Prizment AE, Anderson KE, Harlow BL, Folsom AR. Reproductive risk factors for incident bladder cancer: Iowa Women's Health Study. *Int J Cancer* 2007; 120: 1093–98. https://doi.org/10.1002/ijc.22418.

44 Kauffman EC, Robinson BD, Downes M, et al. Estrogen receptor-β expression and pharmacological targeting in bladder cancer. *Oncol Rep* 2013; 30: 131–38. https://doi.org/10.3892/or.2013.2416.

45 Tan W, Boorjian S, Advani P, et al. The Estrogen Pathway: Estrogen Receptor-α, Progesterone Receptor, and Estrogen Receptor-β Expression in Radical Cystectomy Urothelial Cell Carcinoma Specimens. *Clin Genitourin Cancer* 2015; 13: 476–84. https://doi.org/10.1016/j.clgc.2015.04.001.

46 Ide H, Inoue S, Miyamoto H. Histopathological and prognostic significance of the expression of sex hormone receptors in bladder cancer: A meta-analysis of immunohistochemical studies. *PLoS One* 2017; 12: e0174746. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174746.

47 Hsu I, Yeh C-R, Slavin S, et al. Estrogen receptor alpha prevents bladder cancer via INPP4B inhibited akt pathway in vitro and in vivo. *Oncotarget* 2014; 5: 7917–35. https://doi.org/10.18632/oncotarget.1421.

48 Hsu I, Chuang K-L, Slavin S, et al. Suppression of ERβ signaling via ERβ knockout or antagonist protects against bladder cancer development. *Carcinogenesis* 2014; 35: 651–61. https://doi.org/10.1093/carcin/bgt348.

49 Brandenstein M von, Straube J, Geisbüsch C-M, et al. Tamoxifen Treatment in Correlation with Increased ET-1 Levels Is Associated with the Development of Breast Cancer Metastases. *JCT* 2018; 09: 438–63. https://doi.org/10.4236/jct.2018.95038.

50 Shagufta, Ahmad I. Tamoxifen a pioneering drug: An update on the therapeutic potential of tamoxifen derivatives. *Eur J Med Chem* 2018; 143: 515–31. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.056.

51 Mishra A, Srivastava A, Pateriya A, Tomar MS, Mishra AK, Shrivastava A. Metabolic reprograming confers tamoxifen resistance in breast cancer. *Chemico-biological interactions* 2021; 347: 109602. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109602.

52 Murphy LC, Leygue E, Niu Y, Snell L, Ho S-M, Watson PH. Relationship of coregulator and oestrogen receptor isoform expression to de novo tamoxifen resistance in human breast cancer. *Br J Cancer* 2002; 87: 1411–16. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600654.

53 Ma R, Karthik G-M, Lövrot J, et al. Estrogen Receptor β as a Therapeutic Target in Breast Cancer Stem Cells. *J Natl Cancer Inst* 2017; 109: 1–14. https://doi.org/10.1093/jnci/djw236.

54 Hassannia B, Logie E, Vandenabeele P, Vanden Berghe T, Vanden Berghe W. Withaferin A: From ayurvedic folk medicine to preclinical anti-cancer drug. *Biochem Pharmacol* 2020; 173: 113602. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.08.004.

55 Sivasankarapillai VS, Madhu Kumar Nair R, Rahdar A, et al. Overview of the anticancer activity of withaferin A, an active constituent of the Indian ginseng Withania somnifera. *Environ Sci Pollut Res Int* 2020; 27: 26025–35. https://doi.org/10.1007/s11356-020-09028-0.

56 Hahm E-R, Lee J, Huang Y, Singh SV. Withaferin a suppresses estrogen receptor-α expression in human breast cancer cells. *Mol Carcinog* 2011; 50: 614–24. https://doi.org/10.1002/mc.20760.

57 Hahm E-R, Kim S-H, Singh KB, Singh K, Singh SV. A Comprehensive Review and Perspective on Anticancer Mechanisms of Withaferin A in Breast Cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 2020; 13: 721–34. https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-20-0259.

58 Zhang X, Mukerji R, Samadi AK, Cohen MS. Down-regulation of estrogen receptor-alpha and rearranged during transfection tyrosine kinase is associated with withaferin a-induced apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *BMC Complement Altern Med* 2011; 11: 84. https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-84.

59 Tamkus D, Sikorskii A, Gallo KA, et al. Endothelin-1 enriched tumor phenotype predicts breast cancer recurrence. *ISRN Oncol* 2013; 2013: 385398. https://doi.org/10.1155/2013/385398.

60 Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332: 411–15. https://doi.org/10.1038/332411a0.

61 Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 2863–67. https://doi.org/10.1073/pnas.86.8.2863.

62 Turgeon ML. Clinical Hematology. Burlington: Jones & Bartlett Learning LLC, 2020.

63 Barton M, Yanagisawa M. Endothelin: 30 Years From Discovery to Therapy. *Hypertension* 2019; 74: 1232–65. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.12105.

64 Thenappan T, Ormiston ML, Ryan JJ, Archer SL. Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management. *BMJ* 2018; 360: j5492. https://doi.org/10.1136/bmj.j5492.

65 Kohan DE, Pollock DM. Endothelin antagonists for diabetic and non-diabetic chronic kidney disease. *Br J Clin Pharmacol* 2013; 76: 573–79. https://doi.org/10.1111/bcp.12064.

66 Maguire JJ, Davenport AP. Endothelin receptors and their antagonists. *Semin Nephrol* 2015; 35: 125–36. https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2015.02.002.

67 Braasch I, Schartl M. Evolution of endothelin receptors in vertebrates. *Gen Comp Endocrinol* 2014; 209: 21–34. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.06.028.

68 Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K, eds. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker. München: Elsevier, 2017.

69 Kowalczyk A, Kleniewska P, Kolodziejczyk M, Skibska B, Goraca A. The role of endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in inflammatory response and sepsis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2015; 63: 41–52. https://doi.org/10.1007/s00005-014-0310-1.

70 Davenport AP, Hyndman KA, Dhaun N, et al. Endothelin. *Pharmacol Rev* 2016; 68: 357–418. https://doi.org/10.1124/pr.115.011833.

71 Burki TK. Pharmacotherapy for pulmonary arterial hypertension. *The Lancet Respiratory Medicine* 2020; 8: e81. https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30394-5.
72 Rosanò L, Spinella F, Bagnato A. Endothelin 1 in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2013; 13: 637–51. https://doi.org/10.1038/nrc3546.
73 Torres MJ, López-Moncada F, Herrera D, et al. Endothelin-1 induces changes in the expression levels of steroidogenic enzymes and increases androgen receptor and testosterone production in the PC3 prostate cancer cell line. *Oncol Rep* 2021; 46. https://doi.org/10.3892/or.2021.8122.
74 Tocci P, Rosanò L, Bagnato A. Targeting Endothelin-1 Receptor/β-Arrestin-1 Axis in Ovarian Cancer: From Basic Research to a Therapeutic Approach. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019; 10: 609. https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00609.
75 Zhang Z-Y, Chen L-L, Xu W, Sigdel K, Jiang X-T. Effects of silencing endothelin-1 on invasion and vascular formation in lung cancer. *Oncol Lett* 2017; 13: 4390–96. https://doi.org/10.3892/ol.2017.6027.
76 Niechi I, Silva E, Cabello P, et al. Colon cancer cell invasion is promoted by protein kinase CK2 through increase of endothelin-converting enzyme-1c protein stability. *Oncotarget* 2015; 6: 42749–60. https://doi.org/10.18632/oncotarget.5722.
77 Tapia JC, Niechi I. Endothelin-converting enzyme-1 in cancer aggressiveness. *Cancer Lett* 2019; 452: 152–57. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.03.033.
78 Papanikolaou S, Bravou V, Papadaki H, Gyftopoulos K. The role of the endothelin axis in promoting epithelial to mesenchymal transition and lymph node metastasis in prostate adenocarcinoma. *Urol Ann* 2017; 9: 372–79. https://doi.org/10.4103/ua.ua_43_17.
79 Enevoldsen FC, Sahana J, Wehland M, Grimm D, Infanger M, Krüger M. Endothelin Receptor Antagonists: Status Quo and Future Perspectives for Targeted Therapy. *J Clin Med* 2020; 9. https://doi.org/10.3390/jcm9030824.
80 Gu X, Han S, Cui M, et al. Knockdown of endothelin receptor B inhibits the progression of triple-negative breast cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2019; 1448: 5–18. https://doi.org/10.1111/nyas.14039.
81 Wülfing C, Eltze E, Piechota H, et al. Expression of endothelin-1 and endothelin-A and -B receptors in invasive bladder cancer. *Oncol Rep* 2005; 13: 223–28.
82 Said N, Smith S, Sanchez-Carbayo M, Theodorescu D. Tumor endothelin-1 enhances metastatic colonization of the lung in mouse xenograft models of bladder cancer. *J Clin Invest* 2011; 121: 132–47. https://doi.org/10.1172/JCI42912.
83 Mitrakas L, Gravas S, Karasavvidou F, et al. Endothelin-1 overexpression: a potential biomarker of unfavorable prognosis in non-metastatic muscle-invasive bladder cancer. *Tumour Biol* 2015; 36: 4699–705. https://doi.org/10.1007/s13277-015-3118-7.

84 Fujita K, Nonomura N. Role of Androgen Receptor in Prostate Cancer: A Review. *World J Mens Health* 2019; 37: 288–95. https://doi.org/10.5534/wjmh.180040.

85 Heinrich PC, Müller M, Graeve L. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014.

86 Rübben H. Uroonkologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014.

87 Tan MHE, Li J, Xu HE, Melcher K, Yong E. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin* 2015; 36: 3–23. https://doi.org/10.1038/aps.2014.18.

88 Georget V, Lobaccaro JM, Terouanne B, Mangeat P, Nicolas J-C, Sultan C. Trafficking of the androgen receptor in living cells with fused green fluorescent protein–androgen receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1997; 129: 17–26. https://doi.org/10.1016/S0303-7207(97)04034-3.

89 Davey RA, Grossmann M. Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. *Clin Biochem Rev* 2016; 37: 3–15.

90 Culig Z, Santer FR. Androgen receptor signaling in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2014; 33: 413–27. https://doi.org/10.1007/s10555-013-9474-0.

91 Aurilio G, Cimadamore A, Mazzucchelli R, et al. Androgen Receptor Signaling Pathway in Prostate Cancer: From Genetics to Clinical Applications. *Cells* 2020; 9. https://doi.org/10.3390/cells9122653.

92 Deutsche Krebsgesellschaft e.V. Urologische Tumoren. München: Elsevier, Urban & Fischer, 2018.

93 Shafi AA, Yen AE, Weigel NL. Androgen receptors in hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer. *Pharmacol Ther* 2013; 140: 223–38. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.07.003.

94 Robinson D, van Allen EM, Wu Y-M, et al. Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell* 2015; 161: 1215–28. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.001.

95 Ide H, Miyamoto H. The Role of Steroid Hormone Receptors in Urothelial Tumorigenesis. *Cancers (Basel)* 2020; 12. https://doi.org/10.3390/cancers12082155.

96 Li P, Chen J, Miyamoto H. Androgen Receptor Signaling in Bladder Cancer. *Cancers (Basel)* 2017; 9. https://doi.org/10.3390/cancers9020020.

97 Inoue S, Mizushima T, Miyamoto H. Role of the androgen receptor in urothelial cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2018; 465: 73–81. https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.06.021.

98 Izumi K, Taguri M, Miyamoto H, et al. Androgen deprivation therapy prevents bladder cancer recurrence. *Oncotarget* 2014; 5: 12665–74. https://doi.org/10.18632/oncotarget.2851.

99 Shiota M, Yokomizo A, Takeuchi A, et al. Secondary bladder cancer after anticancer therapy for prostate cancer: reduced comorbidity after androgen-deprivation therapy. *Oncotarget* 2015; 6: 14710–19. https://doi.org/10.18632/oncotarget.3817.

100 Shiota M, Kiyoshima K, Yokomizo A, et al. Suppressed Recurrent Bladder Cancer after Androgen Suppression with Androgen Deprivation Therapy or 5α-Reductase Inhibitor. *J Urol* 2017; 197: 308–13. https://doi.org/10.1016/j.juro.2016.08.006.

101 Tripathi A, Gupta S. Androgen receptor in bladder cancer: A promising therapeutic target. *Asian J Urol* 2020; 7: 284–90. https://doi.org/10.1016/j.ajur.2020.05.011.

102 Mizushima T, Tirador KA, Miyamoto H. Androgen receptor activation: a prospective therapeutic target for bladder cancer? *Expert Opin Ther Targets* 2017; 21: 249–57. https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1280468.

103 Gil D, Zarzycka M, Dulińska-Litewka J, Ciołczyk-Wierzbicka D, Lekka M, Laidler P. Dihydrotestosterone increases the risk of bladder cancer in men. *Hum Cell* 2019; 32: 379–89. https://doi.org/10.1007/s13577-019-00255-3.

104 Godoy G, Gakis G, Smith CL, Fahmy O. Effects of Androgen and Estrogen Receptor Signaling Pathways on Bladder Cancer Initiation and Progression. *Bladder Cancer* 2016; 2: 127–37. https://doi.org/10.3233/BLC-160052.

105 Ide H, Miyamoto H. Sex Hormone Receptor Signaling in Bladder Cancer: A Potential Target for Enhancing the Efficacy of Conventional Non-Surgical Therapy. *Cells* 2021; 10. https://doi.org/10.3390/cells10051169.

106 Katleba K, Lombard AP, Tsamouri M-M, et al. Depletion of androgen receptor low molecular weight isoform reduces bladder tumor cell viability and induces apoptosis. *Cancer Lett* 2021; 504: 49–57. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.01.029.

107 Basile D, Cinausero M, Iacono D, et al. Androgen receptor in estrogen receptor positive breast cancer: Beyond expression. *Cancer Treat Rev* 2017; 61: 15–22. https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.09.006.

108 Kono M, Fujii T, Lim B, Karuturi MS, Tripathy D, Ueno NT. Androgen Receptor Function and Androgen Receptor-Targeted Therapies in Breast Cancer: A Review. *JAMA Oncol* 2017; 3: 1266–73. https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.4975.

109 Rizza P, Barone I, Zito D, et al. Estrogen receptor beta as a novel target of androgen receptor action in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res* 2014; 16: R21. https://doi.org/10.1186/bcr3619.

110 Klinge CM. Estrogen Regulation of MicroRNA Expression. *Curr Genomics* 2009; 10: 169–83. https://doi.org/10.2174/138920209788185289.

111 Vrtačnik P, Ostanek B, Mencej-Bedrač S, Marc J. The many faces of estrogen signaling. *Biochem Med (Zagreb)* 2014; 24: 329–42. https://doi.org/10.11613/BM.2014.035.

112 Petri BJ, Klinge CM. Regulation of breast cancer metastasis signaling by miRNAs. *Cancer Metastasis Rev* 2020; 39: 837–86. https://doi.org/10.1007/s10555-020-09905-7.

113 Klinge CM. miRNAs regulated by estrogens, tamoxifen, and endocrine disruptors and their downstream gene targets. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2015; 418 Pt 3: 273–97. https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.01.035.

114 Cortez MA, Anfossi S, Ramapriyan R, et al. Role of miRNAs in immune responses and immunotherapy in cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2019; 58: 244–53. https://doi.org/10.1002/gcc.22725.

115 Monteleone NJ, Lutz CS. miR-708-5p: a microRNA with emerging roles in cancer. *Oncotarget* 2017; 8: 71292–316. https://doi.org/10.18632/oncotarget.19772.

116 Ameres SL, Zamore PD. Diversifying microRNA sequence and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; 14: 475–88. https://doi.org/10.1038/nrm3611.

117 Friedländer MR, Lizano E, Houben AJS, et al. Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs. *Genome Biol* 2014; 15: R57. https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-4-r57.

118 Iqbal MA, Arora S, Prakasam G, Calin GA, Syed MA. MicroRNA in lung cancer: role, mechanisms, pathways and therapeutic relevance. *Mol Aspects Med* 2019; 70: 3–20. https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.07.003.

119 Howard EW, Yang X. microRNA Regulation in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer and Endocrine Therapy. *Biol Proced Online* 2018; 20: 17. https://doi.org/10.1186/s12575-018-0082-9.

120 Sun S-N, Hu S, Shang Y-P, et al. Relevance function of microRNA-708 in the pathogenesis of cancer. *Cellular Signalling* 2019; 63: 109390. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109390.

121 The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat Genet* 2013; 45: 580–85. https://doi.org/10.1038/ng.2653.

122 Song T, Zhang X, Zhang L, et al. miR-708 promotes the development of bladder carcinoma via direct repression of Caspase-2. *J Cancer Res Clin Oncol* 2013; 139: 1189–98. https://doi.org/10.1007/s00432-013-1392-6.

123 Droller MJ. Urothelial tumors. Hamilton, Ont., London: BC Decker, 2004.

124 Semb H, Christofori G. The tumor-suppressor function of E-cadherin. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 1588–93. https://doi.org/10.1086/302173.

125 Daulagala AC, Bridges MC, Kourtidis A. E-cadherin Beyond Structure: A Signaling Hub in Colon Homeostasis and Disease. *Int J Mol Sci* 2019; 20. https://doi.org/10.3390/ijms20112756.

126 Li Z, Yin S, Zhang L, Liu W, Chen B. Prognostic value of reduced E-cadherin expression in breast cancer: a meta-analysis. *Oncotarget* 2017; 8: 16445–55. https://doi.org/10.18632/oncotarget.14860.

127 Ziaran S, Harsanyi S, Bevizova K, et al. Expression of E-cadherin, Ki-67, and p53 in urinary bladder cancer in relation to progression, survival, and recurrence. *Eur J Histochem* 2020; 64. https://doi.org/10.4081/ejh.2020.3098.

128 Mendonsa AM, Na T-Y, Gumbiner BM. E-cadherin in contact inhibition and cancer. *Oncogene* 2018; 37: 4769–80. https://doi.org/10.1038/s41388-018-0304-2.

129 Wong SHM, Fang CM, Chuah L-H, Leong CO, Ngai SC. E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications. *Crit Rev Oncol Hematol* 2018; 121: 11–22. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.11.010.

130 Corso G, Figueiredo J, Angelis SP de, et al. E-cadherin deregulation in breast cancer. *J Cell Mol Med* 2020; 24: 5930–36. https://doi.org/10.1111/jcmm.15140.

131 Breyer J, Gierth M, Shalekenov S, et al. Epithelial-mesenchymal transformation markers E-cadherin and survivin predict progression of stage pTa urothelial bladder carcinoma. *World J Urol* 2016; 34: 709–16. https://doi.org/10.1007/s00345-015-1690-5.

132 Yang T, Fan J, Liang H, He D, Zeng X, Wu K. Reduced E-cadherin expression as a prognostic factor in non-muscle-invasive bladder cancer: A systematic review and meta-analysis. *Prog Urol* 2020; 30: 66–74. https://doi.org/10.1016/j.purol.2019.12.004.

133 Sun W, Herrera GA. E-cadherin expression in invasive urothelial carcinoma. *Ann Diagn Pathol* 2004; 8: 17–22. https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2003.11.007.

134 QIAamp. QIAamp® DNA Mini andBlood Mini Handbook (accessed Oct 31, 2022).

135 Qiagen. Isolation of total RNA from ejectable buccal swabs using the RNeasy® Micro Kit - (EN). Qiagen (accessed Oct 31, 2022).

136 Qiagen. miRNeasy MicroHandbook (accessed Oct 31, 2022).

137 ThermoFisher. SuperScript™ II Reverse Transcriptase (accessed Oct 31, 2022).

138 Mir C, Shariat SF, van der Kwast TH, et al. Loss of androgen receptor expression is not associated with pathological stage, grade, gender or outcome in bladder cancer: a large multi-institutional study. *BJU Int* 2011; 108: 24–30. https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2010.09834.x.

139 Waliszewski P, Waliszewska MK, Hemstreet GP, Hurst RE. Expression of sex steroid receptor genes and comodulation with retinoid signaling in normal human uroepithelial cells and bladder cancer cell lines. *Urologic oncology* 1997; 3: 141–47. https://doi.org/10.1016/s1078-1439(98)00011-8.

140 Zhai Z, Wang Z, Fu S, et al. Antitumor effects of bladder cancer-specific adenovirus carrying E1A-androgen receptor in bladder cancer. *Gene Ther* 2012; 19: 1065–74. https://doi.org/10.1038/gt.2011.180.

141 Vera-Arzave C, Pacheco-Yepez J, Mejía-Barradas CM, Cárdenas-Jaramillo LM, Campos-Rodríguez R, Abarca-Rojano E. 17β-estradiol replacement therapy induces eNOS, nNOS and estrogen receptor β in hypophysectomized rats with inflamed footpads. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* 2019; 33: 1395–403. https://doi.org/10.23812/19-64A.

142 Del Rio D, Masi I, Caprara V, et al. Ovarian Cancer-Driven Mesothelial-to-Mesenchymal Transition is Triggered by the Endothelin-1/β-arr1 Axis. *Front Cell Dev Biol* 2021; 9: 764375. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.764375.

143 Jamal S, Schneider RJ. UV-induction of keratinocyte endothelin-1 downregulates E-cadherin in melanocytes and melanoma cells. *J Clin Invest* 2002; 110: 443–52. https://doi.org/10.1172/JCI13729.

144 Wu Z-H, Tsai J-H, Hsieh C-Y, Chen W-L, Chung C-L. Endothelin-1 Induces Mesothelial Mesenchymal Transition and Correlates with Pleural Fibrosis in Tuberculous Pleural Effusions. J Clin Med 2019; 8. https://doi.org/10.3390/jcm8040426.

7. Anhang

7.1. Scratch Assay Fotos

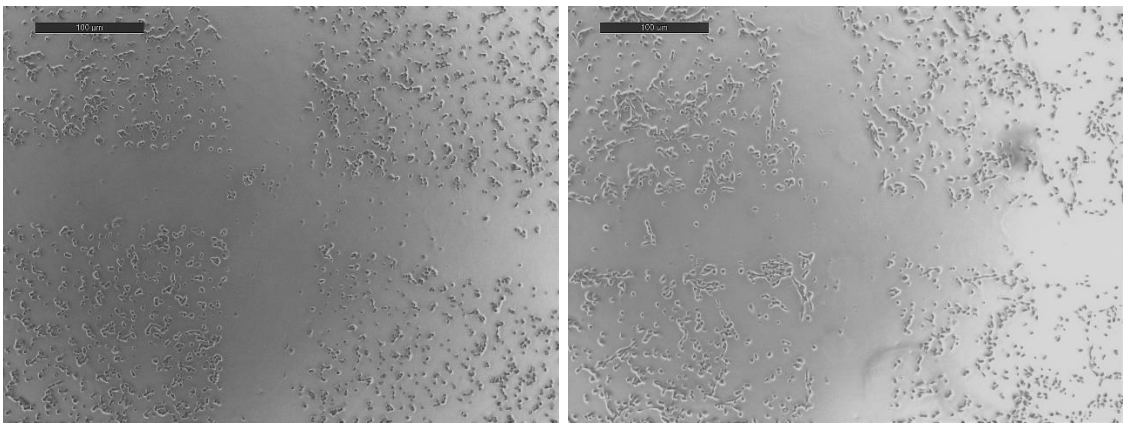

Abbildung 16: Kontrolle nach 0h und 24h.

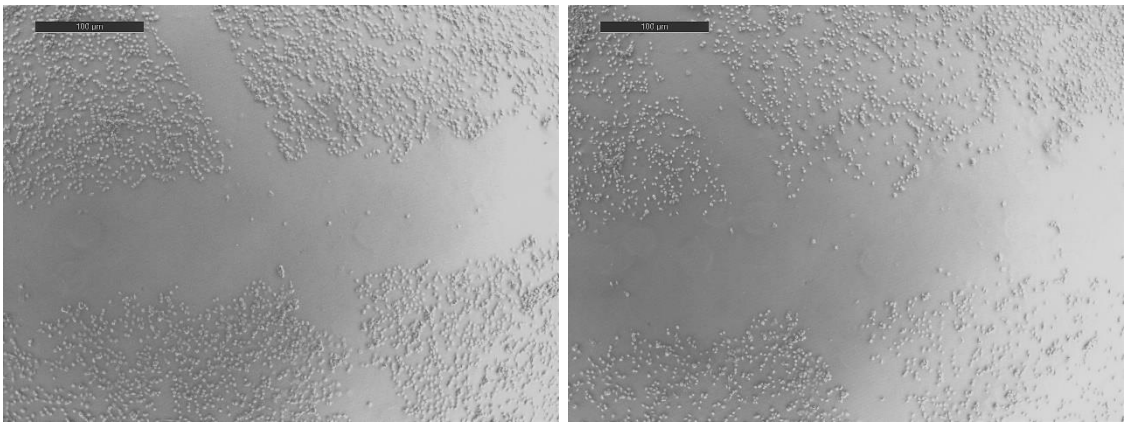

Abbildung 17: ET-1 nach 0h und 24h.

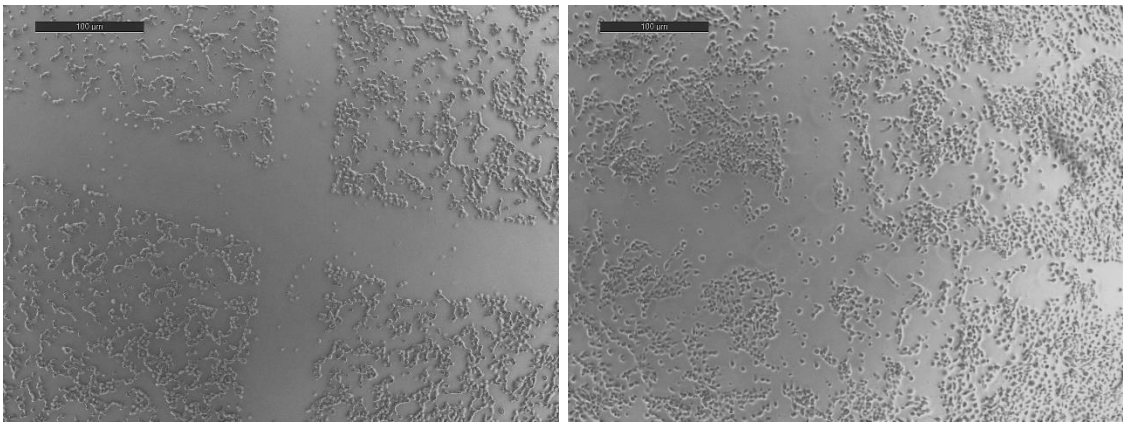

Abbildung 18: ETAR nach 0h und 24h.

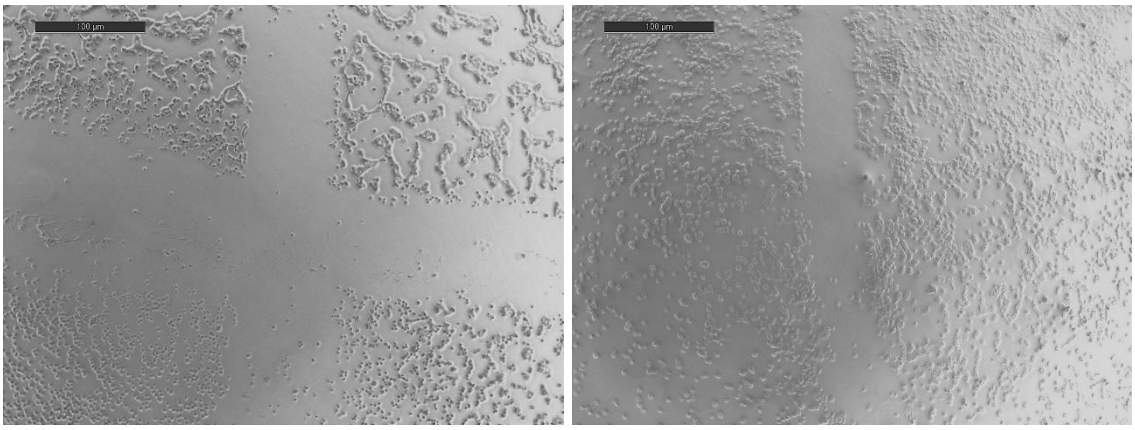

Abbildung 19: ETAR + ET-1 nach 0h und 24h.

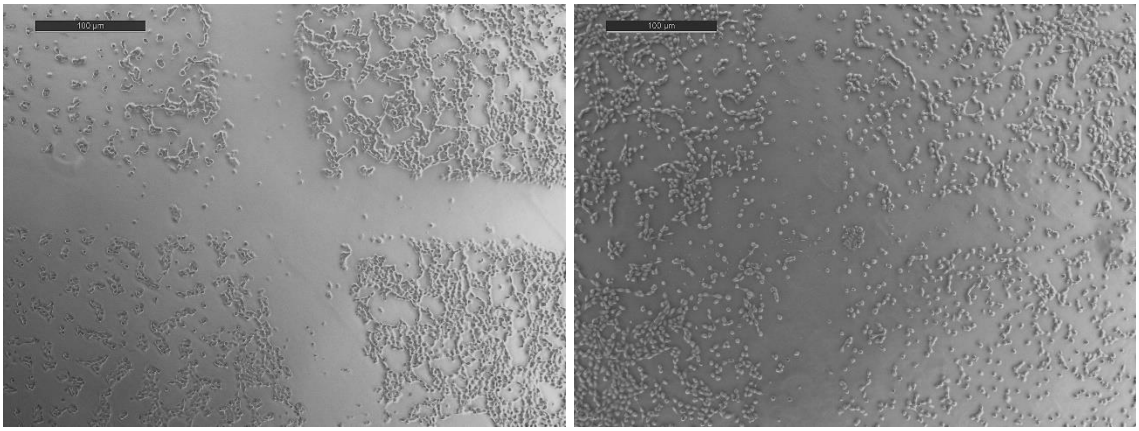

Abbildung 20: ETBR nach 0h und 24h.

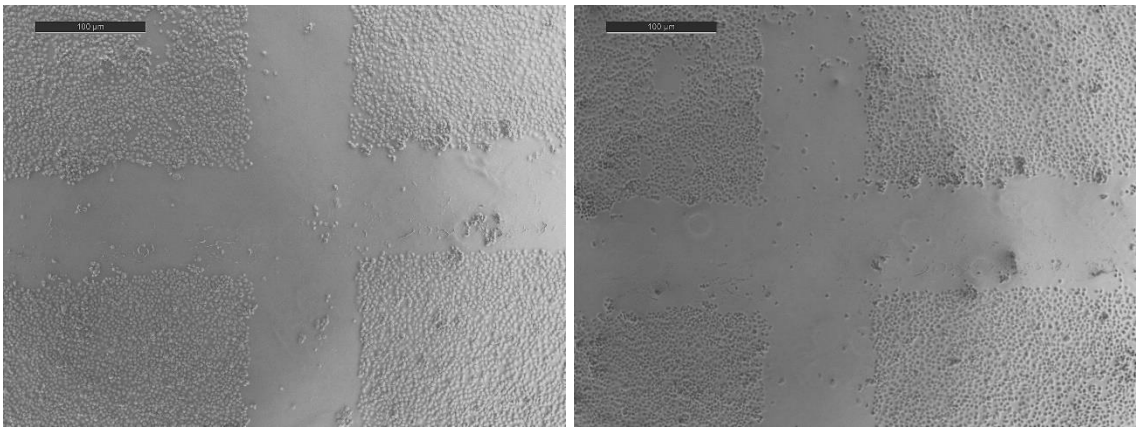

Abbildung 21: ETBR + ET-1 nach 0h und 24h.

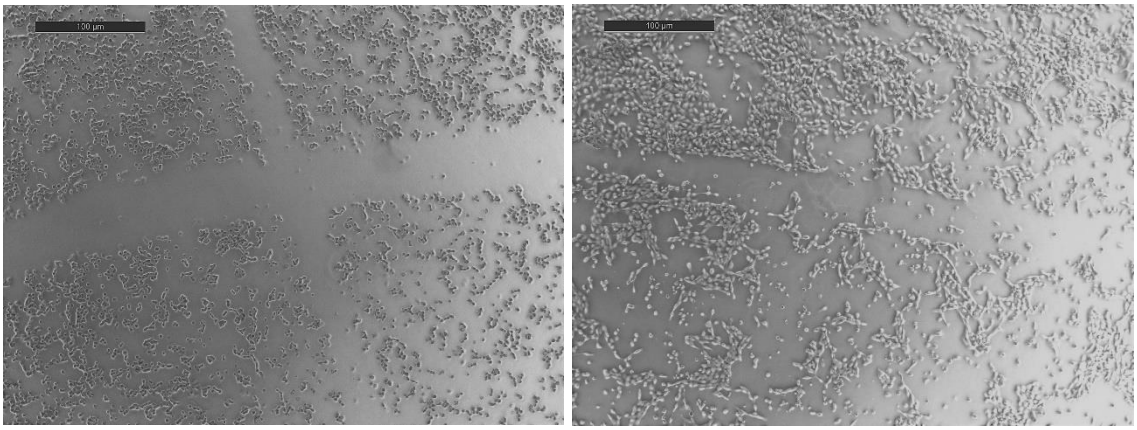

Abbildung 22: ß-Estradiol nach 0h und 24h.

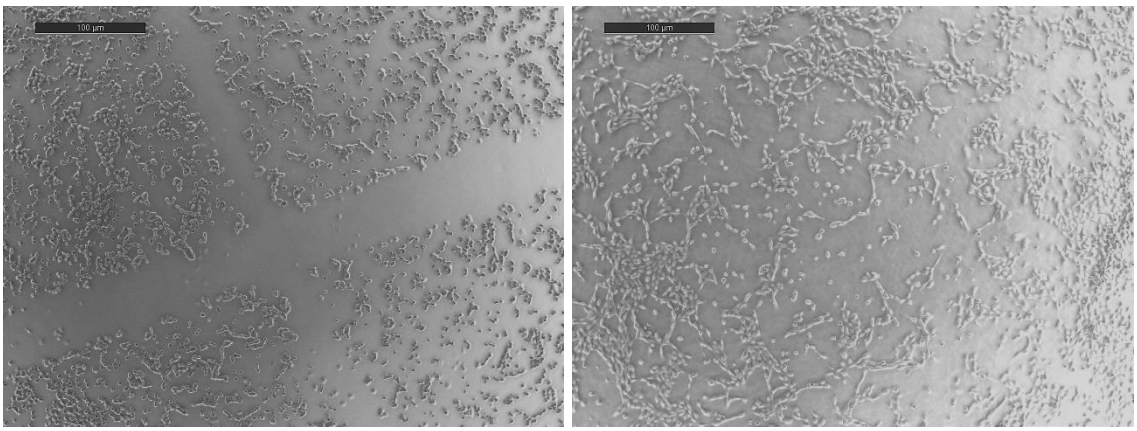

Abbildung 23: Withaferin nach 0h und 24h.

7.2. Western Blot Originalbilder

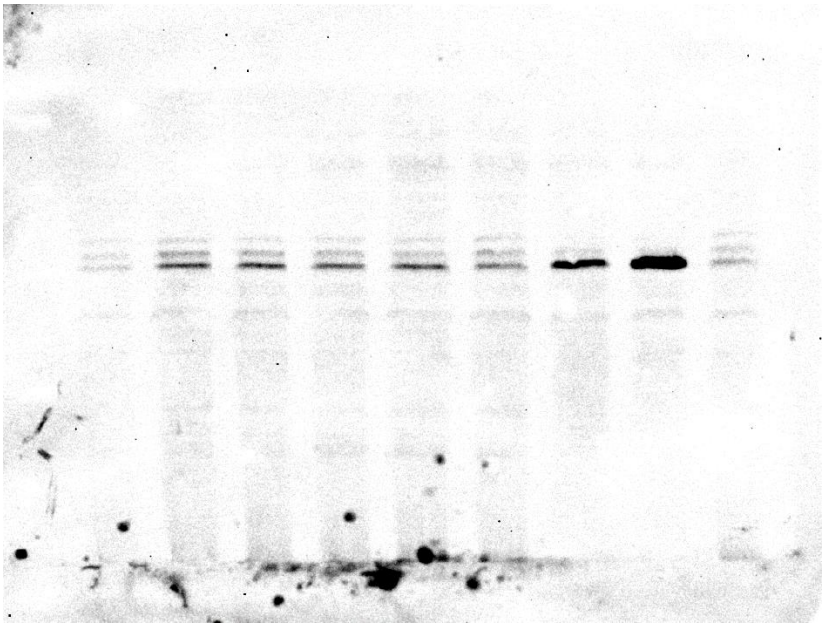

Abbildung 24: Ungeschnittenes Abbild des WB mit ERß.

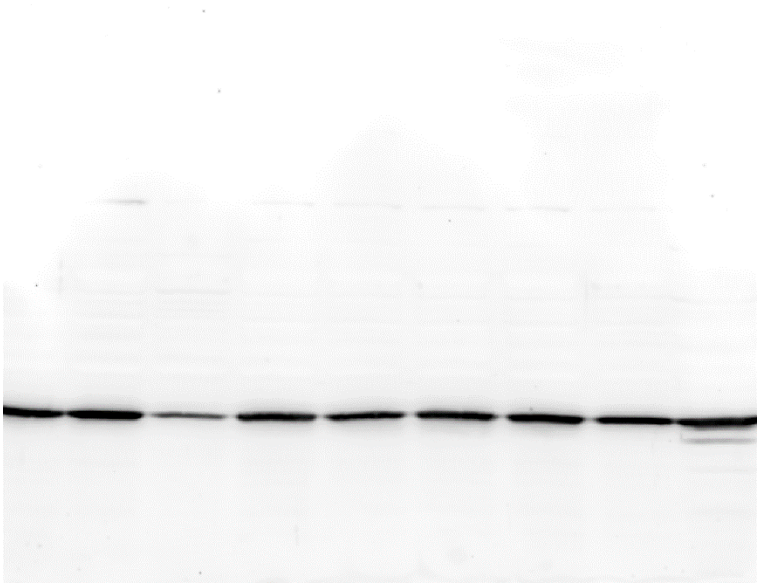

Abbildung 25: Ungeschnittenes Abbild des WB mit GAPDH.

7.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Infiltrationstiefe des Urothelkarzinoms bestimmt die Klassifikation. Dringt der Tumor in die Muskelschicht ein, wird das Karzinom nach WHO als muskelinvasiv bezeichnet. Erstellt mit SMART Servier Medical Art [24].....16
Abbildung 2: EMSA (electrophoretic mobility shift assay) aus der Publikation unserer Arbeitsgruppe. DAPI als Fluoreszenzfarbstoff lagert sich an die DNA im Zellkern an und dient als Referenz. MCF-7-Zellen wurden mit ET-1 behandelt. ERß und ET-1 konnten nukleär nachgewiesen werden [50]. 20

Abbildung 3: PLA-Assay aus der Publikation unserer Arbeitsgruppe. In unbehandelten Zellen zeichnet sich ein Signal aus einem Komplex zwischen ET-1 und ERß in einer perinukleären Lage ab. Nach ET-1-Behandlung ist dieser Komplex in das Kernkompartiment eingewandert [50]. 21
Abbildung 4: Bindungsaffinitäten der Endothelinrezeptoren; der ETAR kommt bevorzugt in glatter Muskulatur und Kardiomyozyten vor und wird vor allem von ET-1 und ET-2 gebunden. ETBR kommt eher in Gefäßendothel, Niere, Lunge und Gehirn vor und wird von ET-2 und ET-3 gebunden [68]. Erstellt mit SMART Servier Medical Art [24].....23
Abbildung 5: Grafische Darstellung von E-Cadherin. Die extrazelluläre Domäne besteht aus mehreren Komponenten und bindet Calcium. Die transmembranäre Domäne ist in die Zellmembran eingebettet. Die intrazelluläre Domäne steht über verschiedene Catenine in Verbindung mit Aktin. Erstellt mit SMART Servier Medical Art [24]. 29
Abbildung 6: Schema einer Zelle mit Zellkern. Der Komplex aus AR und ET-1 transloziert in den Zellkern. Intranukleär bindet der Komplex ERß und führt zu einer erhöhten Exprimierung von ERß. Erstellt mit SMART Servier Medical Art [24]. 31
Abbildung 7: ERß führt zu einer erhöhten intranukleären Produktion der Pri-miRNA-708, welche dann im Cytoplasma zu einer erhöhten Konzentration der miRNA-708 führt. Eine erhöhte miRNA-708 führt zu einer Herunterregulierung von E-Cadherin. Erstellt mit SMART Servier Medical Art [24].....31
Abbildung 8: PageRuler Plus Pertained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford).....42
Abbildung 9: Scratch Assay Analysis der behandelten Zellen. Es konnte eine signifikante Zunahme des Zellwachstums nach 24 Stunden bei den mit ß-Estradiol und Withaferin behandelten Zellen gezeigt werden (*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001, ****p<0,0001).....48
Abbildung 10:: ET-1 Co-Immunopräzipitation. HTB-9-Zellen wurden behandelt und eine Immunpräzipitation wurde durchgeführt. Die Interaktion zwischen ET-1 und AR wurde mittels SDS-PAGE ermittelt. 49
Abbildung 11: AR-ERß-DNA-Pulldown-Assay und PCR mit ERß spezifischen Primern wurden durchgeführt, das PCR-Produkt wurde auf ein 2%iges Agarosegel geladen. Als Negativkontrolle wurden nur mit Wasser inkubierte Agarose-Beads verwendet. Es war ein deutliches Signal bei der berechneten PCR-Produktgröße zu erkennen.....49
Abbildung 12: Western Blot von behandelten HTB-9-Zellen: signifikante Hochregulierung der ERß Level nach Behandlung mit ß-Estradiol und Withaferin.....50
Abbildung 13: Signifikante Hochregulierung der miR-708 in mit Withaferin A behandelten Zellen. 50

Abbildung 14: ERß-Pulldown von nukleären Extrakten. Isolierte Kernextrakte wurden mit ERß-AK inkubiert. Bei der berechneten PCR-Produktgröße für die miRNA-708 ist ein deutliches Signal zu erkennen. 51
Abbildung 15: qRT-PCR-Ergebnisse der E-Cadherin-Expression in HTB-9 behandelten Zellen. Die Expression von E-Cadherin ist in den mit Withaferin A und ß-Estradiol behandelten Zellen sowie nach der ET-1-Rezeptorblockade signifikant herunterreguliert. (*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001). 52
Abbildung 16: Kontrolle nach 0h und 24h. 69
Abbildung 17: ET-1 nach 0h und 24h. 69
Abbildung 18: ETAR nach 0h und 24h. 70
Abbildung 19: ETAR + ET-1 nach 0h und 24h. 70
Abbildung 20: ETBR nach 0h und 24h. 70
Abbildung 21: ETBR + ET-1 nach 0h und 24h. 71
Abbildung 22: ß-Estradiol nach 0h und 24h. 71
Abbildung 23: Withaferin nach 0h und 24h. 71
Abbildung 24: Ungeschnittenes Abbild des WB mit ERß. 72
Abbildung 25: Ungeschnittenes Abbild des WB mit GAPDH. 72

7.4. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien und Lösungen für die Zellkultur. 33
Tabelle 2: Stimulanzien. 33
Tabelle 3: Geräte. 34
Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien. 35
Tabelle 5: Chemikalien und Lösungen. 36
Tabelle 6: Primärantikörper. 36
Tabelle 7: Sekundärantikörper. 36
Tabelle 8: Puffer und Lösungen. 38
Tabelle 9: Kits 38
Tabelle 10: PCR. 38
Tabelle 11: Primer. 38
Tabelle 12: Liste der Reagenzien und des Verdünnungsschemas für die Stimulation der Urothelkarzinomzellen. 40
Tabelle 13: Seperating Gel Zusammensetzung. 41
Tabelle 14: Stacking Gel Zusammensetzung. 42
Tabelle 15: Zusammensetzung des Gemischs für die PCR. 46
Tabelle 16: PCR-Programm. 46
Tabelle 17: Zusammensetzung des 10% Polyacrylamidgels. 47