

Untersuchungen zur Expression des immunmodulatorischen Proteins PD-L1 im Urothelkarzinom der Harnblase

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
im Fachbereich Biologie der Universität Hamburg

vorgelegt von

SONJA BERGMANN

geb. Mader
aus Duisburg

Hamburg
Januar 2019

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von April 2015 bis November 2018 am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf im Institut für Tumorbiologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Klaus Pantel und der Betreuung durch Frau PD Dr. Sabine Riethdorf angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Ganzhorn

2. Gutachter: Prof. Dr. Klaus Pantel

Datum der Disputation: 25.01.2019

Für meine Eltern und Kai ...

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Inzidenz, Mortalität und Therapie des Urothelkarzinoms der Harnblase.....	1
1.2	Immuntherapie mit Checkpoint-Inhibitoren beim UCB	2
1.3	Regulation der Expression des Immun-Checkpoint-Moleküls PD-L1	5
1.4	Bisher bekannte Tumorzell-intrinsische Funktionen von PD-L1	8
1.5	Potenzielle Assoziation der PD-L1-Expression mit der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT)	9
1.6	PD-L1-Expression auf zirkulierenden Tumorzellen (CTCs)	12
1.7	Fragestellung	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Material	15
2.1.1	Laborgeräte	15
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien	17
2.1.3	Vektoren und Expressionsplasmide	19
2.1.4	Oligonukleotide	20
2.1.5	Kits	23
2.1.6	Antikörper	24
2.1.7	Rekombinante Proteine, Zytokine, Enzyme, Inhibitoren und Antibiotika	26
2.1.8	Zelllinien	28
2.1.9	Analysesoftware und Datenbanken	29
2.1.10	Patientenproben	29
2.2	Zellkultur-Methoden	30
2.2.1	Standardkultivierung von humanen Zelllinien	30
2.2.2	Kryokonservierung von Zelllinien-Zellen	30
2.2.3	Test auf Mykoplasmen-Kontamination und Behandlung	30
2.2.4	Authentifizierung von Zelllinien	31
2.2.5	Retroviraler Gentransfer zur Überexpression von Genen in humanen Zelllinien	31
2.2.6	Lentiviraler Gentransfer zum <i>knockdown</i> der Expression von Genen in humanen Zelllinien	32
2.2.7	Nachweis der Proliferation mittels Zellzählung	32
2.2.8	MTT-Test zur Bestimmung der Zellviabilität	33
2.2.9	Herstellung von Zytospins	33
2.3	Molekularbiologische Methoden	33
2.3.1	Vermehrung von <i>E.coli</i>	33

2.3.2	Transformation von <i>E.coli</i>	34
2.3.3	Plasmid-Isolation im analytischen Maßstab	34
2.3.4	Plasmid-Isolation im präparativen Maßstab	34
2.3.5	Isolation von genomischer DNA (gDNA) aus kultivierten Zellen.....	35
2.3.6	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren	35
2.3.7	Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen	35
2.3.8	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA.....	35
2.3.9	Agarose-Gelelektrophorese	36
2.3.10	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und nach PCR	36
2.3.11	Ligation von DNA-Fragmenten.....	36
2.3.12	DNA-Sequenzierung	36
2.3.13	Isolation von Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen.....	37
2.3.14	cDNA-Synthese durch reverse Transkription von RNA	37
2.3.15	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von cDNA	38
2.3.16	Quantitative <i>Real Time</i> -PCR (qRT-PCR)	39
2.3.17	mRNA-Sequenzierung (RNA-Seq).....	40
2.4	Proteinbiochemische und immunologische Methoden	41
2.4.1	Herstellung von Zelllysaten	41
2.4.2	BCA-Test zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten.....	41
2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	42
2.4.4	Western-Blot-Analyse	43
2.4.5	Immunfluoreszenz (IF).....	44
2.5	Detektion und Einzelzellanalyse von CTCs aus peripherem Blut	44
2.5.1	Anreicherung und Detektion von CTCs im CellSearch®-System	44
2.5.2	Isolation von Einzelzellen durch Mikromanipulation.....	45
3	Ergebnisse	46
3.1	Klonierung von retroviralen Gen-Expressionsplasmiden	46
3.1.1	Generierung eines Expressionsplasmids zur Überexpression von PD-L1	46
3.1.2	Generierung eines Expressionsplasmids zur Überexpression von Slug	49
3.2	Analyse der PD-L1-Expression von UCB-Zelllinien im unstimulierten Zustand und Assoziation mit Eigenschaften der Zelllinien.....	51
3.2.1	Optimierung des Nachweises der PD-L1-Expression in UCB-Zelllinien.....	51
3.2.2	Einteilung von UCB-Zelllinien aufgrund ihrer epithelialen und mesenchymalen Eigenschaften	56
3.2.3	Untersuchung der PD-L1-Expression von UCB-Zelllinien in Korrelation zum molekularen Subtyp	60

3.2.4	Nachweis der Expression ausgewählter Proteine in UCB-Zelllinien	62
3.3	Einfluss des Zytokins IFN γ auf die Expression von PD-L1	65
3.4	Charakterisierung von UCB-Zelllinien mit experimentell modifizierter PD-L1-Expression.....	68
3.4.1	Charakterisierung von <i>epithelial-like</i> Zelllinien mit PD-L1- <i>knockdown</i>	69
3.4.2	Charakterisierung von <i>mesenchymal-like</i> Zelllinien mit PD-L1- <i>knockdown</i>	70
3.4.3	Charakterisierung von PD-L1-überexprimierenden UCB-Zelllinien	72
3.4.4	Transkriptom-Analyse von PD-L1-überexprimierenden Zelllinien.....	76
3.4.5	Interaktion von PD-L1 mit rekombinantem PD-1	77
3.5	Einfluss EMT-induzierender Faktoren auf die PD-L1-Expression von UCB-Zelllinien	80
3.5.1	Vorversuche zur EMT-Induktion und Selektion geeigneter Zelllinien	80
3.5.3	Induktion des EMT-Prozesses durch Behandlung mit TGF β	83
3.5.4	Induktion des EMT-Prozesses durch Herabregulation der GRHL2-Expression..	86
3.5.5	Induktion des EMT-Prozesses durch ZEB1-Überexpression	89
3.5.6	Induktion des EMT-Prozesses durch Slug-Überexpression.....	95
3.6	Untersuchungen zur potenziellen Regulation von PD-L1 durch GSK-3 β	101
3.7	Detektion von zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) im Blut von UCB-Patienten und Nachweis der Vimentin- und PD-L1-Expression von CTCs	104
4	Diskussion.....	111
4.1	Regulation der PD-L1-Expression im UCB.....	111
4.2	Tumorzell-intrinsische Funktion von PD-L1 im UCB.....	116
4.3	Regulation und Funktion von PD-L1 im Kontext der epithelialen-mesenchymalen Transition.....	118
4.4	Bedeutung der PD-L1-Expression auf CTCs von UCB-Patienten.....	127
4.5	Ausblick.....	130
5	Zusammenfassung.....	131
6	Summary	134
7	Literaturverzeichnis.....	136
8	Anhang.....	152
8.1	Abkürzungen.....	152
8.2	Abbildungsverzeichnis	157
8.3	Tabellenverzeichnis	160
	Danksagung	161
	Eidesstattliche Versicherung.....	163

1 Einleitung

Mit der klinischen Zulassung von Immun-Checkpoint-Inhibitoren stehen für das Harnblasenkarzinom nach vielen Jahren erstmals wieder neue Therapieoptionen zur Verfügung. Durch die Blockierung der Interaktion von PD-1 (*programmed death 1*) und PD-L1 (*programmed death-ligand 1*) mit therapeutischen Antikörpern soll die Suppression der gegen den Tumor gerichteten Immunreaktion aufgehoben werden. Bei Harnblasenkarzinom-Patienten können mit PD-1/PD-L1-Inhibitoren gute Ansprechraten erzielt werden [1, 2]. Allerdings gibt es bisher weder einen verlässlichen prädiktiven Biomarker für das Therapieansprechen, noch sind für das Harnblasenkarzinom die Regulation der PD-L1-Expression und potenzielle Tumorzell-intrinsische Funktionen von PD-L1 bekannt.

1.1 Inzidenz, Mortalität und Therapie des Urothelkarzinoms der Harnblase

Das humane Urothelkarzinom der Harnblase (UCB, *urinary carcinoma of the bladder*) zählt mit weltweit 430.000 Neuerkrankungen und 165.000 Sterbefällen pro Jahr zu den häufigen Krebserkrankungen [3]. Die Inzidenz ist bei Männern deutlich höher als bei Frauen und so ist das UCB die sechsthäufigste Tumorerkrankung der Männer. In Industrieländern stellt es sogar die vierthäufigste Tumorerkrankung der Männer dar, wodurch die hohe internationale Varianz ersichtlich wird [3]. Das UCB ist häufig auf Karzinogenexposition zurückzuführen, wobei der Tabakkonsum der größte Risikofaktor ist und vermutlich über 50% der Fälle durch das Rauchen verursacht werden. Weitere umweltbedingte Risikofaktoren sind unter anderem die Exposition mit aromatischen Aminen und polyzyklischen Kohlenwasserstoffen, Arsenkontaminiertes Wasser und die chronische Infektion mit *Schistosoma* spp. [4].

Das mediane Alter bei der Erstdiagnose beträgt 70 Jahre [4]. Das UCB wird in vier klinische Stadien eingeteilt. Zum Zeitpunkt der Diagnose sind etwa 60% der Tumoren nicht-muskelinvasive, papilläre Tumoren (Stadium Ta). Im Stadium T1 wird die Lamina propria infiltriert, ohne jedoch die Muscularis propria der Harnblase zu betreffen. Bei etwa 20% der Patienten wird ein muskelinvasives UCB mit Ausdehnung in das perivesikale Gewebe oder benachbarte Organe festgestellt (Stadium T2-4). Nur bei ca. 5% der Patienten wird das UCB im metastasierten Stadium diagnostiziert [4, 5].

Nicht-muskelinvasive Tumoren bilden zwar häufig Rezidive (50 – 70%), durchlaufen aber seltener einen Progress zu invasiven Tumoren (10 – 15%). Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt in dieser Gruppe etwa 90%. Patienten mit nicht-muskelinvasivem UCB werden durch regelmäßige Zystoskopien überwacht und können durch mehrfache transurethrale Resektionen über viele Jahre hinweg behandelt werden [4, 5]. Auch eine Immuntherapie mit Bacillus Calmette-Guérin (BCG) wird seit vier Jahrzehnten in diesem Stadium angewendet. Dazu wird der als Tuberkulose-Impfstoff entwickelte, attenuierte Stamm von *Mycobacterium bovis* durch Instillation in die Blase eingebracht, wodurch Ansprechraten von bis zu 70% erzielt

werden können, die auf eine lokale Immunreaktion gegen den Tumor zurückzuführen sind [6, 7].

Muskelinvasive Tumoren haben gegenüber nicht-muskelinvasiven Tumoren eine schlechtere Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von <50% und einer höheren Metastasierungsrate. Radikale Zystektomie gefolgt von Radio- und Chemotherapie waren über einen langen Zeitraum hinweg die einzigen Therapieoptionen für diese Patienten [4, 5]. In den letzten Jahren wurden jedoch neue Therapien entwickelt, die aktuell in klinischen Studien getestet werden, wobei besonders die Immun-Checkpoint-Inhibitoren hervorzuheben sind, von denen einige bereits klinische Zulassungen erlangt haben [5, 6, 8].

1.2 Immuntherapie mit Checkpoint-Inhibitoren beim UCB

Die mit der intravesikalen BCG-Therapie erzielten Erfolge zeigen, dass die Aktivierung des Immunsystems für die Therapie des UCB eine wichtige Rolle spielt. Neben dem Melanom und dem nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC, *non-small-cell lung carcinoma*) gehört das UCB zu den Tumoren mit den höchsten Raten an somatischen Mutationen, was vermutlich auf starke Karzinogenexposition (z.B. UV-Strahlung und Tabakrauch) zurückzuführen ist und zu verstärkter Neoantigen-Expression der Tumorzellen und somit zu erhöhter Immunogenität beiträgt [1, 9-11].

Während der Interaktion des Tumors mit dem Immunsystem kommt es zum sogenannten *immunoediting*, welches in drei Phasen unterteilt werden kann [12, 13]. In der Eliminierungsphase werden transformierte Zellen sowohl von der angeborenen als auch von der adaptiven Immunabwehr erkannt und angegriffen. Hierdurch werden aber auch Tumorzellen mit reduzierter Immunogenität selektiert, wodurch die Gleichgewichtsphase eingeleitet wird. Sie ist ein dynamischer Prozess aus der Erkennung und Eliminierung durch das Immunsystem einerseits und der Fähigkeit maligner Zellen, dieser Erkennung zu entkommen, andererseits. Diese Phase kann sich über viele Jahre erstrecken, in denen das Immunsystem einen konstanten Selektionsdruck auf die Tumorzellen ausübt. In der Phase des *immune escape* erlangen die selektierten Tumorzell-Klone dann die Fähigkeit in einem immunkompetenten Organismus zu wachsen und schließlich die Ausbildung und Expansion eines klinisch detektierbaren Tumors zu ermöglichen [12-14]. Die dem *immune escape* zugrunde liegenden Mechanismen beinhalten unter anderem die Generierung eines immunsuppressiven Tumormikromilieus, eine verminderte Neoantigen-Präsentation der Tumorzellen, den Verlust von MHC-Komponenten oder die Überexpression von T-Zell-inhibitorischen Signalen [12, 13, 15]. Zu letzteren gehören unter anderem die Immun-Checkpoint-Moleküle PD-L1, PD-1, CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*), LAG3 (*lymphocyte-activation gene 3*), TIM-3 (*T-cell membrane protein 3*) und HLA-G (*human leukocyte antigen G*), welche von Tumorzellen und/oder Leukozyten exprimiert werden können [16, 17]. Khandelwal *et al.* konnten durch ein RNAi-screening sogar eine Vielzahl von sowohl negativen als auch positiven

immunregulatorischen Molekülen auf Tumorzellen identifizieren [18]. Unter normalen physiologischen Bedingungen dient die Inhibition der T-Zell-Aktivität durch Immun-Checkpoint-Signalwege der Selbsttoleranz und der Modulation der Dauer und Intensität von herkömmlichen Immunantworten, um Kollateralschäden an gesundem Gewebe zu minimieren. Werden solche Immun-Checkpoint-Moleküle jedoch von Tumorzellen und/oder Tumor-infiltrierenden Leukozyten (TILs) überexprimiert, beeinflusst dies die Tumorspezifische T-Zell-Antwort im Tumormikromilieu. Die Tumorzellen werden nicht länger eliminiert, sondern können wachsen, sodass es zum Progress und zur Metastasierung kommen kann [16].

Eine Funktion des auf T-Lymphozyten exprimierten Rezeptors PD-1 besteht in der Beschränkung der Autoimmunität sowie der Limitierung der durch eine Infektion ausgelösten Entzündungsreaktion [19]. Erst wenn T-Zellen aktiviert werden, wird die Expression von PD-1 induziert [20]. Dies geschieht durch eine Kombination der Interaktionen des T-Zell-Rezeptors mit dem MHC-Komplex und des Ko-Stimulators CD28 mit B7-1 oder B7-2 [16]. Die gleichzeitige Interaktion zwischen PD-1 und seinen Liganden PD-L1 und PD-L2 während der Antigen-Erkennung wirkt inhibierend auf die Proliferation und Zytokinausschüttung durch die T-Zelle und führt zu verminderten zytotoxischen Effekten [21-23]. PD-1 kann darüber hinaus u.a. auch auf regulatorischen T-Zellen exprimiert werden, welche Effektor-T-Zellen aktiv supprimieren. Hier führt die PD-L1-Bindung allerdings zu verstärkter Proliferation und wirkt daher auch über diesen Weg immunsupprimierend [24]. Somit sind sowohl PD-L1 als auch PD-L2 auf Immun- sowie Tumorzellen signifikant an der Resistenz gegenüber T-Zell-Zytotoxizität beteiligt [16, 25]. Die Therapie mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren hat zum Ziel, T-Zell-inhibitorische Interaktionen von Rezeptor und Ligand zu blockieren und dadurch die gegen den Tumor gerichtete, T-Zell-vermittelte Immunantwort wiederherzustellen (Abbildung 1).

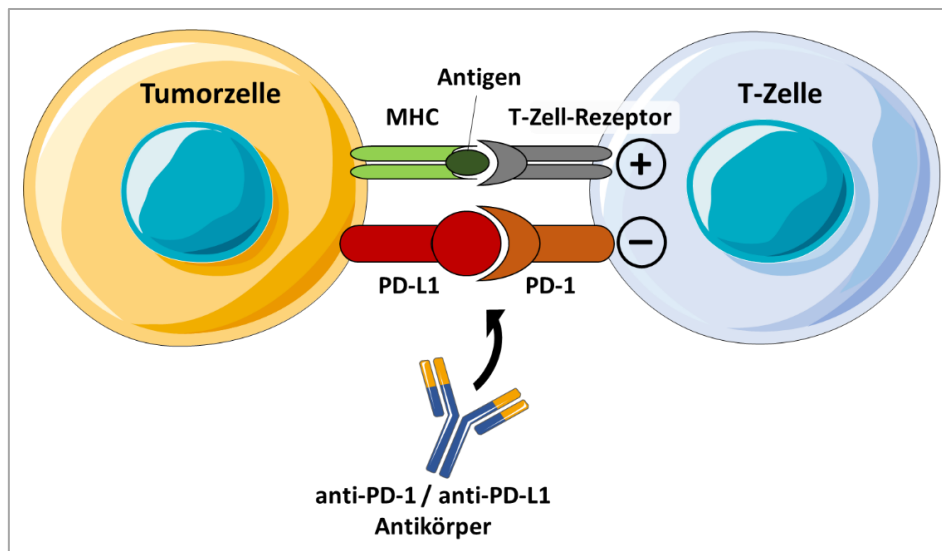


Abbildung 1: Negative Regulation der T-Zell-Aktivierung durch den PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoint

T-Zellen empfangen aktivierende Signale über die Bindung des T-Zell-Rezeptors an den Antigen-gekoppelten MHC-Komplex und inhibierende Signale über die Interaktion des Rezeptors PD-1 mit seinem Liganden PD-L1. Wenn PD-L1 auf Tumorzellen und/oder TILs exprimiert wird, kann es zum sogenannten *immune escape* kommen. Die Blockierung von PD-1 oder PD-L1 durch therapeutische Antikörper soll die Suppression der Immunantwort gegen den Tumor aufheben. Die Abbildung wurde modifiziert nach Pardoll *et al.* [26] und erstellt mit graphischen Elementen von SERVIER Medical Art (<https://www.servier.de/medical-art>).

Zur Blockierung des PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoints wurde bereits eine Vielzahl von therapeutischen Antikörpern entwickelt. So waren zu Beginn des Jahres 2018 der PD-L1-Inhibitor Atezolizumab sowie die PD-1-Inhibitoren Pembrolizumab und Nivolumab für die Behandlung des metastasierten UCB in Deutschland zugelassen. In den USA hatten zusätzlich die PD-L1-Inhibitoren Avelumab und Durvalumab klinische Zulassungen erlangt. In der Therapie des fortgeschrittenen oder metastasierten UCB konnte bei einem Teil der Patienten mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren im Vergleich zur Chemotherapie ein länger anhaltendes Ansprechen beobachtet werden [1, 2, 27, 28]. Dennoch fehlt weiterhin ein verlässlicher Biomarker zur Identifikation der Patienten, die von der Therapie profitieren. Als Kandidaten für prädiktive Faktoren werden z.B. die PD-L1-Expression sowohl auf Tumorzellen als auch auf TILs diskutiert [8, 29-32]. Unter anderem für das UCB und das NSCLC scheint die PD-L1-Expression von TILs gegenüber der von Tumorzellen sogar stärker mit dem Therapieansprechen assoziiert zu sein [8, 32, 33]. In einer Phase-2-Studie an Patienten mit metastasiertem UCB beispielsweise, die zur Zulassung von Atezolizumab durch die FDA (*food and drug administration*) führte, wurde eine Ansprechrates von 27% bei Patienten mit $\geq 5\%$ PD-L1-positiven TILs und eine Ansprechrates von 15% bei der gesamten Kohorte erzielt [34]. Jedoch finden sich auch in PD-L1-negativen Gruppen Patienten, die auf die Therapie ansprechen [1, 35]. Erschwerend kommt hinzu, dass die Analyse der PD-L1-Expression nicht standardisiert ist, weder entitätenübergreifend noch für einzelne Tumorentitäten. So sind für die unterschiedlichen therapeutischen Antikörper eigene komplementäre diagnostische

Antikörper etabliert worden. Zwischen diesen variieren die Schwellenwerte mit einer Spanne von 1% bis 50% in Tumorzellen und/oder TILs für die Definition eines PD-L1-positiven Tumors [2, 8, 31, 36]. Manche therapeutischen Antikörper, z.B. Pembrolizumab, dürfen nur basierend auf einer PD-L1-Detektion mit dem begleitenden diagnostischen Antikörper (*companion diagnostic*) verabreicht werden [31].

Als weitere mögliche Biomarker für das Ansprechen auf Immun-Checkpoint-Therapien werden außerdem der Verlust von MHC I (HLA Klasse I) [37], der Ausschluss von CD8-positiven T-Zellen aus dem Tumormikromilieu, hohe Mutationsraten mit dadurch bedingter, starker Neoantigen-Expression und die Aktivierung des TGF β -Signalwegs diskutiert [29, 38]. Da der Ausschluss der zytotoxischen T-Zellen aus der Tumormikroumgebung im UCB und im Kolonkarzinom durch erhöhte TGF β -Aktivität bewirkt werden kann, schlagen Mariathasan *et al.* und Tauriello *et al.* eine gleichzeitige Blockierung von PD-L1 und TGF β durch therapeutische Antikörper vor. Auch die Aktivierung des Interferon γ (IFN γ)-Signalwegs wurde mit der Resistenz gegenüber Immun-Checkpoint-Inhibitoren assoziiert [39]. Dabei ist die Rolle des Zytokins ambivalent. Zum einen ist IFN γ , welches im Tumormikromilieu durch Lymphozyten ausgeschüttet wird, ein zentrales immunaktivierendes Zytokin, das bereits zur Therapie verschiedener Tumoren, einschließlich des UCB, eingesetzt wurde [40, 41]. Zum anderen kann IFN γ in Tumorzellen gleichzeitig zur Induktion der PD-L1-Expression führen und somit die Suppression der Immunantwort begünstigen [22, 40].

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass die Frage nach einem geeigneten prädiktiven Biomarker für das Ansprechen auf die Therapie mit PD-1/PD-L1-Inhibitoren für das UCB bisher nicht hinreichend beantwortet werden kann. Des Weiteren kann die PD-L1-Expression innerhalb der Tumor- und Immunzellpopulationen eines Tumors heterogen sein, sich zwischen Primärtumor, Rezidiv und Metastase unterscheiden und sich darüber hinaus im Laufe der Tumorentstehung und -progression verändern [2, 8, 42, 43]. Deshalb ist es außerordentlich wichtig, die Mechanismen, die der Regulation der PD-L1-Expression im UCB zugrunde liegen, umfassend zu charakterisieren.

1.3 Regulation der Expression des Immun-Checkpoint-Moleküls PD-L1

Das humane PD-L1-Protein, alternativ auch als B7-H1 (*B7 homolog 1*) bezeichnet, gehört zur Immunglobulin-Superfamilie und wird vom Gen *CD274* kodiert, welches sich auf dem Genlocus 9p24.1 befindet. Die kanonische und am stärksten exprimierte Isoform umfasst 290 Aminosäuren (AS) und besitzt ein Molekulargewicht von 33,3 kDa. Sie besteht aus einer kurzen zytoplasmatischen Domäne (31 AS), einer Transmembran-Domäne (21 AS) und einem längeren extrazellulären Teil (220 AS). Letzterer ist aus den zwei Immunglobulin-artigen Domänen IgV (*Ig-like V-type*) und IgC2 (*Ig-like C2-type*) zusammengesetzt. N-terminal befindet sich ein Signalpeptid (18 AS). Neben der kanonischen Isoform existieren zwei weitere Isoformen, denen jeweils ein Teil des extrazellulären Bereichs fehlt. Die verschiedenen

Isoformen basieren auf vier verschiedenen Transkriptvarianten (v1 – v4), wobei das v3-Transkript nicht-kodierend ist. Die Glykosylierung von PD-L1 kann an den Stellen N35, N192, N200 und N219 im extrazellulären Teil erfolgen und ist für die Interaktion mit PD-1 erforderlich [44]. (Quellen: www.ncbi.nlm.nih.gov/gene, www.uniprot.org)

Die Expression von PD-L1 in Tumorzellen kann durch verschiedene Signaltransduktionswege und Mechanismen sowohl auf genomischer, transkriptioneller, posttranskriptioneller und posttranslationaler Ebene reguliert werden. Dabei ist die Regulation jedoch stark vom Zelltyp abhängig [45-48].

Auf genomischer Ebene kann die PD-L1-Expression durch Amplifikation oder Deletion der das PD-L1-Gen tragenden genomischen Region modifiziert sein. Budczies *et al.* zeigten in einer entitätenübergreifenden *in silico*-Analyse der Kopienzahländerung (CNA, *copy number alteration*) anhand des „*The Cancer Genome Atlas*“ (TCGA), dass Deletionen der Region 9p24.1 häufiger sind als Amplifikationen. Jedoch wurden die höchsten Amplifikationsraten unter anderem beim UCB nachgewiesen. Die CNAs korrelierten signifikant mit der PD-L1-Transkriptmenge [49]. In B-Zell-Lymphomen wurden durch Translokation eine erhöhte PD-L1-Transkriptionsrate und die Entstehung von Fusionstranskripten beobachtet [50].

Die PD-L1-Transkription kann durch eine Reihe von Transkriptionsfaktoren reguliert werden, deren Expression unter anderem durch Zytokine beeinflusst werden kann. So führt beispielsweise eine Stimulation mit IFN γ im Regelfall zu einer erhöhten PD-L1-mRNA-Expression, was über die Achse JAK1/JAK2/STAT1/IRF1 vermittelt wird [51-53]. Von Garcia-Diaz *et al.* wurden mögliche Bindestellen für IRF1, STAT1, STAT2, STAT3 und STAT5 im PD-L1-Promotor ermittelt [52]. Außerdem wurde postuliert, dass für den IFN γ -abhängigen Anstieg der PD-L1-Expression die Aktivierung von NF- κ B notwendig ist [54]. Auch eine Stimulation mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF, *epidermal growth factor*) kann, ähnlich zur Stimulation mit IFN γ , zu einem durch JAK2 und STAT1 vermittelten Anstieg der PD-L1-Expression führen [55]. Der Transkriptionsfaktor STAT3 scheint zwar ebenfalls an der Regulation von PD-L1 beteiligt zu sein, dennoch wird seine Bindung an den Promotor noch kontrovers diskutiert [45, 47]. Die Induktion der PD-L1-Transkription durch Aktivierung von STAT3 wurde beispielsweise für Melanom-Zellen [56] und murine pro-B-Zellen [57] beschrieben. Darüber hinaus wurde für den Transkriptionsfaktor MYC zum einen eine Korrelation mit der PD-L1-Expression in NSCLC-Tumoren [58] und zum anderen in murinen und humanen Leukämie-Zellen eine Induktion der PD-L1-Transkription durch Bindung von MYC an den PD-L1-Promotor [59] nachgewiesen. Weitere vermutlich an der Regulation der PD-L1-Expression beteiligte Transkriptionsfaktoren sind die mit Hypoxie bzw. EMT assoziierten Transkriptionsfaktoren HIF-1 α [60] und ZEB1 [61, 62] deren Rolle in Kapitel 1.5 näher beschrieben wird. Damit übereinstimmend wird PD-L1 inzwischen Tumorentitäten-übergreifend mit der EMT assoziiert [63] (siehe 1.5).

Die Regulation der PD-L1-Expression wurde darüber hinaus mit der Aktivierung von verschiedenen Signaltransduktionswegen in Verbindung gebracht. So wurde beispielsweise eine Beteiligung des PI3K-Signalwegs an einer erhöhten PD-L1-Expression in Kopf- und Halstumoren beschrieben [64]. Lastwika *et al.* zeigten, dass eine Onkogen-Aktivierung über den AKT/mTOR-Signalweg durch gesteigerte PD-L1-Expression zum *immune escape* von NSCLC-Zellen führt [65]. Chen *et al.* hingegen beschreiben, dass in NSCLC-Zellen die EGF-vermittelte Induktion der PD-L1-Expression nicht über den AKT-, sondern über den ERK1/2/c-JUN-Signalweg reguliert wird [66]. Weiterhin wurde eine Heraufregulation von PD-L1 durch Aktivierung des HIPPO-Signalwegs in Mammakarzinom-Zellen postuliert [67]. Ebenfalls der Verlust des Tumorsuppressors PTEN kann zum Anstieg der PD-L1-Expression in Gliom-Zellen führen [68].

Für die posttranskriptionelle Regulation der PD-L1-Expression wurde eine Vielzahl von mikroRNAs beschrieben, die an das PD-L1-Transkript binden und zu dessen Abbau führen bzw. die Translation der mRNA beeinflussen können [69-71]. Außerdem beobachteten Kataoka *et al.* in mehreren Tumorentitäten eine Disruption des 3' untranslatierten Bereichs (3'-UTR, 3'-*untranslated region*), die einerseits zu aberranten PD-L1-Transkripten führte, aber andererseits auch zu deren Stabilisierung. Die auf diese Weise überexprimierten PD-L1-Moleküle verfügten weiterhin über die extrazelluläre Domäne und die PD-1-Interaktion war nicht beeinträchtigt [72].

Des Weiteren wurden auch für die Regulation der PD-L1-Proteinstabilität auf posttranslationaler Ebene verschiedene Mechanismen beschrieben. Zum Beispiel kann PD-L1 in unterschiedlichen Tumorentitäten spezifisch von CMTM6, einem Transmembranprotein, dessen Funktion bisher nicht bekannt war, gebunden und so an der Plasmamembran gehalten werden. Durch die Verhinderung des lysosomalen Abbaus [73] oder durch die Reduktion der Ubiquitylierung [74] kann PD-L1 stabilisiert werden. Eine Deubiquitylierung von PD-L1 kann auch durch NF- κ B-induziertes CSN5 (*COP9 signalosome 5*) vermittelt werden [75]. Darüber hinaus kann die Stabilität von PD-L1 in Mammakarzinom-Zellen in Abhängigkeit vom Glykosylierungsgrad durch die Kinase GSK-3 β (Glykogensynthase-Kinase-3 β) beeinflusst werden. GSK-3 β ist in der Lage, PD-L1 zu phosphorylieren, sodass es nachfolgend durch Ubiquitylierung für den proteasomalen Abbau markiert werden kann [76].

Während die meisten Ergebnisse zur Regulation der PD-L1-Expression für das Bronchial- und das Mammakarzinom vorliegen, konnte für UCB-Zelllinien jedoch bisher lediglich die erhöhte Expression von PD-L1 über den ERK- und JNK-Signalweg durch TLR4-Aktivierung gezeigt werden [77]. Weiterhin gibt es erste Hinweise darauf, dass die PD-L1-Expression mit dem molekularen Subtyp von UCB-Tumoren korreliert [78, 79]. Für das UCB wurden verschiedene Einteilungen in molekulare Subtypen vorgeschlagen [80], die auf Mutationsprofilen und auf der Genexpression definierter Markerproteine basieren. Während eine übergeordnete Einteilung jeweils die Subtypen „luminal“ und „basal“ in Verbindung mit entweder „p53-artig“

[81] oder „Kein Typ“ [82] identifiziert, gibt es auch Einteilungen in vier (TCGA I-IV) [83] oder fünf Subgruppen („luminal“, „luminal-infiltriert“, „luminal-papillär“, „basal-squamös“ und „neuronal“) [78]. Generell zeichnen sich luminal Karzinome unter anderem durch die Expression von Uroplakinen und der Keratine 7, 19 und 20 aus. Basale Karzinome sind dagegen unter anderem durch die Expression der Keratine 5, 6, 14 und 16 charakterisiert [81, 82].

Zusammenfassend kann die PD-L1-Expression einerseits durch extrinsische Faktoren aus dem Tumormikromilieu induziert werden und andererseits zum Beispiel aufgrund von genetischen Veränderungen der Zellen konstitutiv vorhanden sein [47, 84]. Verschiedene Signaltransduktionswege, die an der Entstehung und Progression maligner Tumoren beteiligt sind, können die PD-L1-Expression beeinflussen [46, 84]. Im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten, wie dem Mamma- und dem Bronchialkarzinom sowie dem Melanom sind die Mechanismen, die zur Regulation der PD-L1-Expression im UCB führen, noch weitestgehend unbekannt.

1.4 Bisher bekannte Tumorzell-intrinsische Funktionen von PD-L1

Hinweise aus der Literatur lassen vermuten, dass PD-L1 über seine bekannte Immunfunktion der negativen Regulation der T-Zell-Aktivierung (siehe 1.2) hinaus auch intrinsische Funktionen in Tumorzellen ausübt. So wurde beispielsweise bereits für verschiedene Tumorentitäten ein Einfluss der PD-L1-Expression auf die Zellproliferation beschrieben, wobei ein Anstieg der PD-L1-Expression mit gesteigerter Proliferation [85] und eine Verminderung der Expression mit verringerter Proliferation [70, 71, 85, 86] einherging. Ghebeh *et al.* detektierten verstärkte Apoptoseraten in Mammakarzinom-Zelllinien mit herabregulierter PD-L1-Expression [87]. Damit übereinstimmend fanden Chen *et al.* erhöhte Zellviabilität und migratorische Kapazität in PD-L1-überexprimierenden Ösophaguskarzinom-Zellen [88]. Darüber hinaus wurde die PD-L1-Expression in Ovarialkarzinom-Zellen mit Chemotherapie-Resistenz assoziiert [89]. Außerdem wird für PD-L1 eine Funktion in der Karzinogenese des Pankreas- und des Zervixkarzinoms diskutiert [71, 85]. So postulierten Song *et al.*, dass PD-L1 die Zellzyklus-Progression von Pankreaskarzinom-Zellen über Cyclin D1 und CDK4/6 sowie die Phosphorylierung von Rb und JNK reguliert [85]. Clark *et al.* konnten zeigen, dass Ovarialkarzinom- und Melanom-Zellen mit herabregulierter PD-L1-Expression nicht nur in immunkompetenten sondern auch in immundefizienten Mäusen langsamer wuchsen, was ebenfalls für die Existenz einer immununabhängigen, intrinsischen Funktion von PD-L1 spricht. Gleichzeitig beobachteten sie in diesen Zellen eine Suppression der Autophagie sowie eine veränderte Expression von Genen, die mit Autophagie und dem mTOR-Signalweg assoziiert sind [86]. Auch Chang *et al.* zeigten, dass in murinen Sarkom-Zellen mit reduzierter PD-L1-Expression die Aktivität von mTOR und die Glykolyserate inhibiert wurden und sie schlussfolgerten, dass PD-L1 somit eine Rolle im Tumorzell-Metabolismus spielt [90].

Neben den beschriebenen Effekten, die durch das Expressionsniveau von PD-L1 vermittelt werden, gibt es auch Hinweise darauf, dass PD-L1 als Rezeptor fungieren kann und Tumorzellen durch die Interaktion von PD-L1 mit PD-1 Signale empfangen können. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass die zytoplasmatische Domäne von PD-L1 stark konserviert ist [19]. Außerdem wurden in Mammakarzinomen durch massenspektrometrische Analyse des PD-L1-Proteins zwei Phosphorylierungsstellen (S283 und T290) in der intrazellulären Domäne nachgewiesen [91], was nahe legt, dass über diese eine Signalweiterleitung erfolgen könnte [90, 92]. In diesem Kontext wurde ein Schutzmechanismus gegenüber IFN γ -vermittelter Zytotoxizität beschrieben, der durch konservierte Signaltransduktions-Motive der intrazytoplasmatischen PD-L1-Domäne vermittelt wird [92]. Azuma *et al.* postulierten für murines PD-L1 eine Rolle als anti-apoptotischer Rezeptor, da sie nach PD-1-Bindung Resistenz gegenüber Apoptose beobachteten. Sie leiteten daraus einen Mechanismus der Tumorzellen ab, einen Immunzell-Rezeptor (PD-1) als Liganden für die Induktion von Therapieresistenz zu nutzen [93].

In einer Studie von Black *et al.* bedingte die Interaktion von PD-L1 auf Mamma- und Prostatakarzinom-Zellen mit PD-1 eine Steigerung der Zellproliferation sowie Resistenz gegenüber Chemotherapeutika. In Mammakarzinom-Zellen wurde außerdem eine Aktivierung des mTOR- und des ERK-Signalwegs beobachtet [94]. Des Weiteren wurde für PD-L1-exprimierende Magenkarzinom-Zellen eine gesteigerte Zellproliferation nach PD-1-Bindung gezeigt [95]. Interessanterweise wurde die PD-1/PD-L1-Interaktion in Ösophaguskarzinom-Zellen auch mit dem EMT-Prozess in Verbindung gebracht [88].

Zusammenfassend scheint die Expression von PD-L1 in verschiedenen Tumorentitäten die Tumorzell-Proliferation und -Viabilität zu fördern, wobei die Interaktion mit PD-1 diese Effekte vermutlich noch verstärkt. Für das UCB wurden bisher keine Ergebnisse zu Tumorzell-intrinsischen Funktionen von PD-L1 publiziert.

1.5 Potenzielle Assoziation der PD-L1-Expression mit der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT)

Für die Progression von Karzinomen spielt der Prozess der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT), in welchem epitheliale Zellen mesenchymale Eigenschaften erlangen, eine wichtige Rolle [96]. Epitheliale Zellen weisen ausgeprägte Zell-Zell-Kontakte und häufig auch Polarität auf, wodurch das Epithel als Barriere fungieren und Absorptionsfunktionen erfüllen kann. Mesenchymale Zellen oder Stromazellen hingegen sind lose in einer dreidimensionalen extrazellulären Matrix organisiert und bilden die Vorläufer des Bindegewebes [97]. Die EMT ist ein notwendiger Prozess in der Embryogenese und Morphogenese, ohne den die Differenzierung von Geweben und Organen nicht möglich wäre [97, 98]. EMT kann durch die Erhöhung der Mobilität von Zellen einerseits zur Wundheilung und andererseits beispielsweise zur Entstehung von Fibrosen beitragen [97, 99]. In der Tumorprogression kann

die EMT epithelialen Tumorzellen Plastizität und damit migratorische sowie invasive Eigenschaften verleihen, Stammzeleigenschaften induzieren, Apoptose und Seneszenz unterdrücken und sogar zur Immunsuppression beitragen. Dadurch, dass die Zellen Ähnlichkeiten zu mesenchymalen Zellen entwickeln, erlangen sie die Fähigkeit, in entfernte Gewebe zu migrieren, wo sie anschließend durch MET (mesenchymale-epitheliale Transition) wieder epitheliale Eigenschaften annehmen und Metastasen initiieren können [97, 100]. Die Veränderungen während EMT und MET sind schematisch in Abbildung 2 dargestellt.

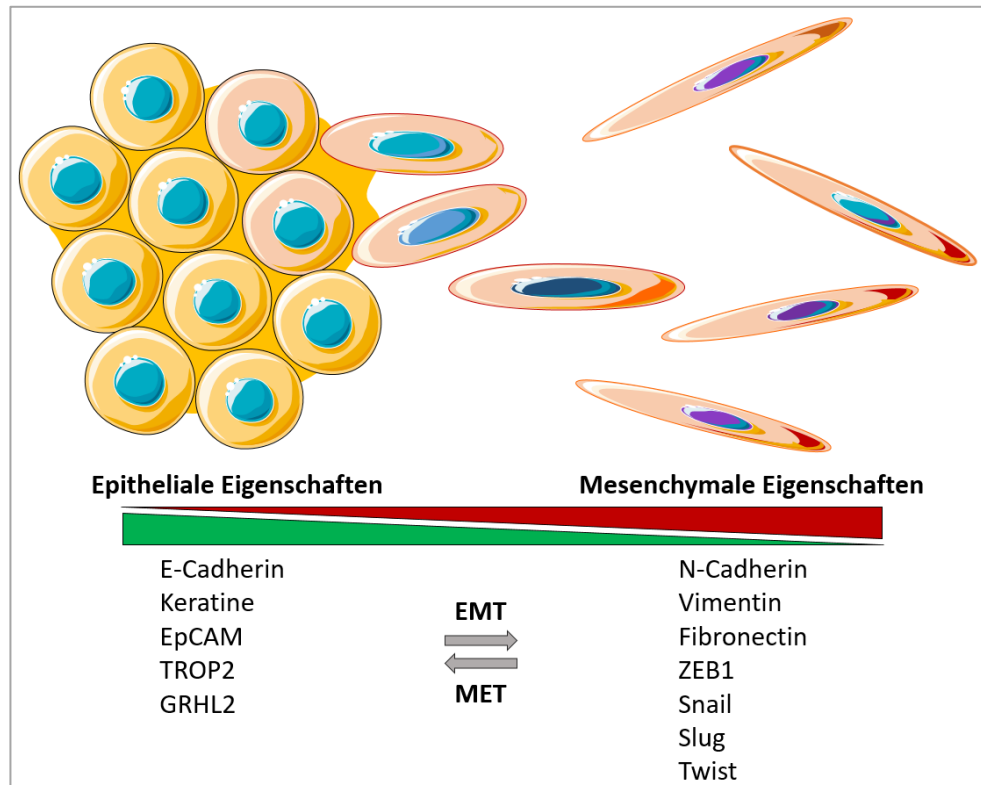


Abbildung 2: Epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) und mesenchymale-epitheliale Transition (MET)

Während der EMT verlieren die Zellen ihre Zell-Zell-Kontakte und nehmen eine eher spindelförmige Morphologie an. Epitheliale Zellen sind durch die Expression von u.a. E-Cadherin, Keratinen, EpCAM und TROP2 gekennzeichnet. Eher mesenchymale Zellen zeichnen sich durch die Expression von z.B. N-Cadherin, Vimentin und Fibronectin aus. Während der Transkriptionsfaktor GRHL2 als EMT-Suppressor fungiert, sind ZEB1, Snail, Slug und Twist mit eher mesenchymalen Eigenschaften assoziiert. Der EMT-Prozess kann auch nur teilweise durchlaufen werden (partielle EMT) und ist außerdem reversibel (MET). Die Abbildung wurde modifiziert nach Kalluri und Weinberg [99] und erstellt mit graphischen Elementen von SERVIER Medical Art (<https://www.servier.de/medical-art>).

Für epitheliale Zellen typische Proteine sind unter anderem E-Cadherin, Keratine, EpCAM (TROP1), TROP2, Claudine oder Occludine. Die Expression dieser Proteine kann während der EMT herabreguliert werden. Zu den für mesenchymale Zellen charakteristischen Eigenschaften wird u.a. die Expression von N-Cadherin, Vimentin oder Fibronectin gezählt, die durch EMT erhöht werden kann [98, 99]. Die EMT muss nicht vollständig ablaufen und es gibt Hinweise darauf, dass eine partielle EMT, die in einem Intermediärphänotyp mit sehr hoher Plastizität resultieren kann, sogar besonders stark mit der Aggressivität von Tumorzellen

assoziiert ist [101]. Der EMT-Regulation liegen komplexe Signaltransduktionswege zugrunde [98, 102], welche beispielsweise durch verschiedene Zytokine induziert werden können. Eine zentrale Rolle nimmt hierbei der transformierende Wachstumsfaktor β (TGF β , *transforming growth factor* β) ein [102]. TGF β kann die Genexpression der Zellen einerseits über die Aktivierung von SMAD2 und SMAD3 und andererseits über eine Vielzahl weiterer Signalwege, darunter die Aktivierung der TGF β -aktivierten Kinase 1 (TAK1), beeinflussen [102-105]. Auch hypoxische Bedingungen im Tumormikromilieu können über den Transkriptionsfaktor HIF-1 α eine EMT induzieren [97, 102]. Die Transkriptionsfaktoren ZEB1, Snail (SNAI1), Slug (SNAI2) und Twist besitzen die Fähigkeit, eine EMT zu induzieren [98, 102, 105], wohingegen der Transkriptionsfaktor GRHL2 als EMT-Repressor fungiert [106, 107]. Für Mammakarzinom-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass ZEB1 und GRHL2 einem reziproken negativen *feedback*-Mechanismus unterliegen [107, 108]. Weiterhin bildet ZEB1 mit der EMT-supprimierenden mikro-RNA-200 (miR-200)-Familie (u.a. miR-200a/miR-200b/miR-200c) ebenfalls einen reziproken negativen *feedback*-Mechanismus, sodass auch über diese Achse EMT reguliert wird [109-111].

In Karzinomen der Kopf-/Hals-Region und pulmonalen Adenokarzinomen wurde mittels Immunhistochemie eine Korrelation der Expression mesenchymaler Proteine mit der Expression von PD-L1 beobachtet [112, 113]. Außerdem wurde entitätenübergreifend, unter anderem für das UCB, eine erhöhte Transkription von PD-L1 und weiterer Immun-Checkpoint-Moleküle in Tumoren mit einem erhöhtem, auf Transkriptomanalysen beruhenden EMT-score detektiert [63]. So fanden auch Chen *et al.* in Bronchialkarzinomen eine Assoziation des EMT-scores mit der PD-L1-Expression. Sie zeigten für NSCLC-Zellen eine Regulation von PD-L1 durch ZEB1, welche über die Repression der miR-200-Familie vermittelt war. Hierbei konnten sie nachweisen, dass PD-L1-mRNA eine direkte Zielstruktur der miR-200-Familie ist [61]. Diese Daten werden unterstützt durch die Arbeit von Noman *et al.*, die ebenfalls auf eine Regulation von PD-L1 durch die ZEB1/miR-200-Achse hindeutet. Diese Autoren beobachteten sowohl einen durch ZEB1 als auch einen durch Snail vermittelten Anstieg der PD-L1-Expression in EMT-aktivierten Mammakarzinom-Zelllinien [62]. Übereinstimmend zeigen weitere Publikationen für NSCLC- [114, 115] und Mammakarzinom-Zellen [116] einen PD-L1-Anstieg, der über TGF β -induzierte EMT vermittelt wird. Hsu *et al.* postulieren, dass die Induktion von EMT auch in Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften die PD-L1-Expression erhöht [117].

Darüber hinaus gibt es erste Hinweise darauf, dass auch umgekehrt die PD-L1-Expression den EMT-Prozess induzieren kann. So wurden durch experimentelle Beeinflussung der PD-L1-Expression beispielsweise in Mamma-, Nierenzell- und Ösophaguskarzinom-Zellen für EMT charakteristische Veränderungen induziert [88, 116, 118].

Zusammenfassend kann man daher festhalten, dass eine Reihe experimenteller Daten einen Zusammenhang zwischen PD-L1-Expression und EMT vermuten lässt, der jedoch bisher für das UCB noch nicht in dieser Weise gezeigt wurde.

1.6 PD-L1-Expression auf zirkulierenden Tumorzellen (CTCs)

Die Metastasierung ist die häufigste Ursache für krebsbedingte Mortalität. Der Metastasierungsprozess läuft in mehreren Schritten in Form einer Kaskade ab, während derer sich Tumorzellen aus dem Verband des Primärtumors ablösen, in das Blutsystem oder auch das Lymphsystem einwandern und schließlich entfernte Organe oder Gewebe besiedeln [119]. Tumorzellen können entweder passiv in den Blutkreislauf gelangen oder durch aktive Intravasation, die durch den EMT-Prozess unterstützt werden kann [100, 120], da die Zellen dadurch an Plastizität und Invasivität gewinnen können (siehe 1.5). Als zirkulierende Tumorzellen (CTCs, *circulating tumor cells*) sind sie Scherkräften, Anoikis und der Einwirkung von Immunzellen ausgesetzt [14, 100]. Nach der Extravasation in entfernte Gewebe, zum Beispiel in das Knochenmark, werden sie als disseminierte Tumorzellen (DTCs, *disseminated tumor cells*) bezeichnet. Diese können entweder zunächst in die Dormanz eintreten oder früh die Proliferation wieder aufnehmen und möglicherweise durch MET zu Metastasen auswachsen [100, 121-123]. Die Streuung von Tumorzellen kann bereits in einem frühen Stadium der Tumorentstehung beginnen [120-122]. Allerdings gelingt es nur sehr wenigen Zellen des Primärtumors, tatsächlich die komplexe Metastasierungskaskade zu durchlaufen und klinisch detektierbare Metastasen zu generieren [14, 120]. Der Nachweis und die molekulare Analyse von CTCs ermöglichen es, ein umfassendes Bild des aktuellen Tumorstatus eines Patienten zu erhalten, da sie nicht nur vom Primärtumor, sondern auch von Metastasen abstammen können. Somit werden potenziell viele Tumorzell-Subklone repräsentiert [120, 124]. Diese sogenannte Flüssigbiopsie (*liquid biopsy*) ist außerdem besonders dann von Vorteil, wenn der Tumor beispielsweise aufgrund seines fortgeschrittenen Status oder seiner Lokalisation nicht oder nur schwer biopsierbar ist [125]. In den Flüssigbiopsien von Krebspatienten können neben CTCs unter anderem auch zirkulierende Tumor-DNA, zellfreie (mikro-)RNA, Exosomen und Tumor-assoziierte Thrombozyten analysiert werden [124, 126, 127].

Für die Detektion von CTCs in Patientenblut wurde eine Vielzahl von Technologien entwickelt, wobei die Anreicherung der Zellen entweder auf ihren physiologischen oder biologischen Merkmalen basiert. Zu ersteren gehören die Zellgröße und -dichte; zu letzteren die Expression spezifischer Markerproteine [128]. Das bisher einzige Gerät zum Nachweis von CTCs in Patientenproben, das eine Zulassung von der FDA (*food and drug administration*) zur Anwendung an ausgewählten Tumorentitäten erlangen konnte, ist das CellSearch®-System. Es ermöglicht die automatische Anreicherung von EpCAM-positiven Zellen über magnetische Partikel mit nachfolgender Immunfärbung und halb-automatisierter, Fluoreszenz-mikroskopischer Auswertung. CTCs werden als Keratin-positiv, kernhaltige Zellen identifiziert, die keine Expression des Leukozyten-Markers CD45 aufweisen. Im Institut für Tumorbiologie (ITB) konnte bereits gezeigt werden, dass CTCs bei UCB-Patienten von prognostischer Bedeutung sind. Hierbei waren etwa 22 – 30% der Patienten mit nicht-

metastasierter Erkrankung und etwa 50% der metastasierten Patienten CTC-positiv [129-132]. Das Vorhandensein von CTCs konnte als unabhängiger Risikofaktor für einen ungünstigen Krankheitsverlauf des UCB etabliert werden [130, 133]. Über die reine Ermittlung der Anzahl hinaus können die CTCs auch weiter phänotypisch oder molekular analysiert werden. Besonderes Augenmerk wird dabei auf die Charakterisierung therapeutisch relevanter Zielstrukturen gelegt. So konnte in der Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass die Expression des therapeutisch relevanten Wachstumsfaktor-Rezeptors HER2 auf CTCs detektiert werden kann [130].

In diesem Kontext könnte auch die Analyse der PD-L1-Expression auf CTCs wertvolle Informationen als Biomarker für das Ansprechen auf Immun-Checkpoint-Therapien liefern [14, 134]. Obwohl im UCB die dokumentierten PD-L1-Positivitätsraten im Primärtumorgewebe in Abhängigkeit des eingesetzten diagnostischen Antikörpers und des zugrunde gelegten Schwellenwertes (siehe 1.2) stark variieren [1, 2, 8, 135, 136], konnte eine Korrelation der PD-L1-Expression mit erhöhter Aggressivität und verkürzten Überlebensraten beobachtet werden [137, 138]. Tretiakova *et al.* fanden in einer Kohorte von 235 UCB-Patienten eine höhere Inzidenz starker PD-L1-Expression (in >50% der Zellen) in Metastasen- als in Primärtumorgewebe unter Einsatz von vier verschiedenen diagnostischen anti-PD-L1-Antikörpern [139]. Da nur selten Metastasengewebe verfügbar ist, bieten sich zur Evaluation der PD-L1-Expression in der metastasierten Situation Flüssigbiopsien an. Bisher wurde nur eine Studie zur Untersuchung der PD-L1-Expression von CTCs von UCB-Patienten durchgeführt. In dieser fanden Anantharaman *et al.* unter Verwendung des Epic-Sciences-Systems, welches ebenfalls auf Immunfluoreszenz-Detektion der CTCs beruht, PD-L1-positive CTCs in 33% (7/21) der Patienten mit metastasiertem UCB und in keinem von vier nicht-metastasierten Patienten [140].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die prognostische Relevanz der CTCs für UCB-Patienten in verschiedenen Studien demonstriert werden konnte. Für die Charakterisierung des PD-L1-Status der CTCs bei UCB-Patienten ist jedoch bisher noch kein klinisch validierter Assay verfügbar.

1.7 Fragestellung

Für Patienten mit fortgeschrittenem UCB steht mit der Immun-Checkpoint-Therapie eine wichtige neue Option zur Verfügung; jedoch fehlt ein verlässlicher Biomarker für das Ansprechen auf PD-1/PD-L1-Inhibitoren und außerdem ist bisher wenig über die Regulation der PD-L1-Expression beim UCB bekannt. Das vorrangige Ziel des vorliegenden Promotionsvorhabens bestand deshalb darin, (a) zum Verständnis der Regulation sowie (b) der Tumorzell-intrinsischen Funktion von PD-L1 im UCB beizutragen. Außerdem sollte (c) ein Assay zum Nachweis der PD-L1-Expression auf CTCs etabliert werden.

(a) Um zu evaluieren, auf welche Weise die PD-L1-Expression in UCB-Tumorzellen reguliert ist, sollte ein Set von 13 verschiedenen UCB-Zelllinien analysiert werden. Diese sollten zunächst anhand ihrer Proteinexpressions-Profile molekularen Subtypen zugeordnet werden und außerdem entsprechend ihren *epithelial-like* (EL)- und *mesenchymal-like* (ML)-Eigenschaften in Subgruppen eingeteilt werden, um eine mögliche Assoziation mit der PD-L1-Expression festzustellen. Außerdem sollten der Einfluss des Zytokins IFN γ sowie der Effekt der Induktion einer EMT auf die PD-L1-Expression untersucht werden. Die EMT-Induktion sollte an geeigneten Zelllinien mittels TGF β -Behandlung und/oder Modifikation des Expressionsniveaus von EMT-assoziierten Transkriptionsfaktoren (GRHL2, ZEB1 und Slug) vorgenommen werden.

(b) Zur Identifikation von immununabhängigen Funktionen der PD-L1-Expression im UCB sollten Modellsysteme mit *knockdown* sowie Überexpression von PD-L1 erstellt werden. Hierzu sollten Zelllinien gewählt werden, die unterschiedliche molekulare Subtypen und EL-/ML-Eigenschaften repräsentieren. Die phänotypische Analyse dieser Zellen sollte anhand der Proliferation, des Transkriptom und der Proteinexpression erfolgen. Darüber hinaus sollte der Einfluss einer Interaktion von PD-L1 mit PD-1 auf die Tumorzellen evaluiert werden.

(c) Im translationalen Teil des Projekts sollte für das UCB ein Assay zur Detektion der PD-L1-Expression auf CTCs im CellSearch[®]-System etabliert werden und anhand von Blutproben von UCB-Patienten validiert werden. Außerdem sollte zum Nachweis von CTCs mit einem EMT-intermediären Phänotyp die Analyse der Vimentin-Expression von CTCs etabliert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Tabelle 1: Verwendete allgemeine Laborgeräte

Gerätebezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Analysenwaage BP610	Sartorius	Göttingen, DE
Analysenwaage BP6100	Sartorius	Göttingen, DE
Analysenwaage CP224S-OCE	Sartorius	Göttingen, DE
BioPhotometer mit Thermal Printer DPU-414	Eppendorf	Hamburg, DE
CellSave Preservative Tubes	Menarini Silicon Biosystems	Bologna, IT
CellSearch® Celltracks Analyzer II	Menarini Silicon Biosystems	Bologna, IT
CellSearch® Celltracks Autoprep System	Menarini Silicon Biosystems	Bologna, IT
DNA Engine PTC-200	MJ Research	Waltham, MA, US
EasyPhor Gelkammer	Biozym Scientific	Hessisch Oldendorf, DE
Filmentwickler Curix 60	AGFA HealthCare	Bonn, DE
Fluorometer Qubit 2.0	Invitrogen by Life Technologies	Carlsbad, CA, US
Geldokumentationssystem GeneGenius	Syngene	Cambridge, UK
Hybridisierungsöfen	Techne	Staffordshire, UK
Inkubator Hera cell 150	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, US
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Instruments	Schwabach, DE
Mikromanipulator TransferMan NK2	Eppendorf	Hamburg, DE
Millex Filter, Porengröße 0,45 µm, steril	Merck Millipore	Darmstadt, DE
Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories	Hercules, CA, US
Mini-Protean System Casting Stand	Bio-Rad Laboratories	Hercules, CA, US
Mini-Protean Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories	Hercules, CA, US
MultiFlex-Pipettenspitzen (0,5 – 200 µL)	PeqLab	Erlangen, DE
Multipette M4	Eppendorf	Hamburg, DE
Nanodrop ND100 Spectrometer	PeqLab	Erlangen, DE
pH-Meter inoLab	WTW	Heidelberg, DE

Platereader NanoQuant infinite M200Pro	Tecan	Männedorf, CH
Power Pac Basic	Bio-Rad Laboratories	Hercules, CA, US
Power Pac HC	Bio-Rad Laboratories	Hercules, CA, US
Rollmischer Stuart SRT1	Bibby Sterilin	Staffordshire, UK
Röntgenfilme Super RX	Fujifilm	Tokio, JP
Sterilbank Herasafe HS12	Heraeus Kendro	Langselbold, DE
Thermocycler C1000 Touch CFX96	Bio-Rad Laboratories	Hercules, CA, US
Thermocycler peqSTAR PeqLab 96 universal gradient	PeqLab	Erlangen, DE
Thermomixer compact	Eppendorf	Hamburg, DE
Vortex Genie 2	Scientific Industries GmbH für Labortechnik	New York, NY, US
Wasserbad GFL-1002/03		Burgwedel, DE
Zellzählautomat Vi-cell XR	Beckman Coulter	Krefeld, DE

Tabelle 2: Verwendete Mikroskope

Gerätebezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Durchlichtmikroskop Axiovert 25 mit AxioCam MRc	Cars Zeiss	Jena, DE
Durchlichtmikroskop Primovert	Carl Zeiss	Jena, DE
Durchlichtmikroskop Wilovert S	Helmut Hund	Wetzlar, DE
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 imaging mit AxioCam MRm mit Lichtquelle HXP 120 V	Cars Zeiss	Jena, DE
Inversmikroskop Axiovert 200 mit AxioCam HRc	Carl Zeiss	Jena, DE

Tabelle 3: Verwendete Zentrifugen

Gerätebezeichnung	Hersteller	Firmensitz
Heraeus Megafuge 40R	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, US
Heraeus Megafuge 8	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, US
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf	Hamburg, DE
Tischzentrifuge Biozym	Heathrow Scientific	Vernon Hills, IL, US
Zentrifuge Rotofix 32	Hettich	Villingen-Schwenningen, DE

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Hersteller	Firmensitz
AB-Serum	Bio-Rad Laboratories	Hercules, CA, US
Acrylamid (30%)	Serva	Heidelberg, DE
Agarose LE	Genaxxon Bioscience	Ulm, DE
Antarctic Phosphatase-Reaktionspuffer	New England BioLabs	Ipswich, MA, US
APS (Ammoniumpersulfat)	AppliChem	Darmstadt, DE
Aqua	B. Braun Melsungen	Melsungen, DE
Bacto-Agar	BD Biosciences	Franklin Lakes NJ, US
Bacto-Trypton	BD Biosciences	Franklin Lakes NJ, US
Bromphenolblau	Merck	Darmstadt, DE
BSA Fraction V (Bovines Serum Albumin)	Biomol	Hamburg, DE
Dako REAL Antibody Diluent	Dako	Glostrup, DK
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Carl Roth	Karlsruhe, DE
DMEM High Glucose-Medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	PAN Biotech	Aidenbach, DE
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Serva	Heidelberg, DE
DNA-Marker GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, US
DNA-Marker GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, US
DNA-Marker HyperLadder I	Bioline	London, UK
DNA-Probenpuffer (DNA <i>loading dye</i>)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, US
dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate Set)	Roche Diagnostics	Mannheim, DE
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, US
Dulbecco's PBS (<i>phosphate buffered saline</i> , 1%)	Gibco	Eggenstein, DE
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, US
EMEM (Minimal Essential Medium Eagle)	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, US
Essigsäure	J.T. Baker	Deventer, NL
Ethanol absolut	Merck	Darmstadt, DE
Ethanol vergällt	Chemsolute/TH Geyer	Renningen, DE
FCS (<i>fetal calf serum</i>)	PAA Laboratories	Pasching, A
GelRed Nucleic Acid Gel Stain	Biotium	Fremont, CA, US

Glycin Pufferan	Carl Roth	Karlsruhe, DE
Harnstoff (Urea)	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, US
Hefeextrakt	BD Biosciences	Franklin Lakes NJ, US
Isopropanol	Carl Roth	Karlsruhe, DE
L-Glutamin	PAA Laboratories	Pasching, A
Lipofectamine3000 Transfection Reagent und P3000	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, US
Luminol	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, US
Magnesiumchlorid-Lösung (MgCl ₂)	Applied Biosystems	Foster City, CA, US
Methanol	J.T. Baker	Deventer, NL
Milchpulver	Carl Roth	Karlsruhe, DE
Mowiol	Merck (Calbiochem)	Darmstadt, DE
MTT (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazoliumbromid)	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, US
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth	Karlsruhe, DE
Natrium-Desoxycholat	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, US
Natronlauge (NaOH)	Merck	Darmstadt, DE
NEAA (MEM <i>non-essential amino acid solution</i>)	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, US
Normales Ziegen Serum	Dako	Glostrup, DK
NP40 (Nonidet P-40)	Roche Diagnostics	Mannheim, DE
Nukleasefreies Wasser	Qiagen	Hilden, DE
OptiMEM Medium	Gibco	Eggenstein, DE
PCR Gold Buffer 10x	Applied Biosystems	Foster City, CA, US
p-Cumarinsäure	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, US
PFA (Paraformaldehyd)	Merck	Darmstadt, DE
Polybrene (Hexadimethrinbromid)	Fluka (Thermo Fisher)	Waltham, MA, US
Proteinmarker Page Ruler Prestained Protein Ladder 10 – 180 kDa	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, US
Restriktionsverdau-Puffer	New England BioLabs	Ipswich, MA, US
RPMI 1640 Medium (Rosewell Park Memorial Institute)	PAN Biotech	Aidenbach, DE
Salzsäure 1 N (HCl)	Carl Roth	Karlsruhe, DE
SDS-Lösung 20% (Natriumdodecylsulfat)	AppliChem	Darmstadt, DE
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Fluka (Thermo Fisher)	Waltham, MA, US
Tris-Acetat	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, US
Tris-EDTA (TE) Puffer; pH 8,0	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, US
Triton X-100	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, US

Trizma base	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, US
Trypanblau	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, US
Trypsin-EDTA-Lösung 0,25% (w/v)	Gibco	Eggenstein, DE
Tween-20	Fluka (Thermo Fisher)	Waltham, MA, US
Vectashield Mounting Medium <i>with</i> DAPI	Vector Laboratories	Burlingame, CA, US
Vectashield Mounting Medium <i>without</i> DAPI	Vector Laboratories	Burlingame, CA, US
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck	Darmstadt, DE
β-Mercaptoethanol	Merck	Darmstadt, DE

2.1.3 Vektoren und Expressionsplasmide

Tabelle 5: Verwendete Vektoren und Gen-Expressionsplasmide

Vektor/Expressionsplasmid	Bezugsquelle
pLKO.1 (TRC Klonierungsvektor), 7.032 bp	Addgene, Cambridge, MA, US
psPAX2 (Verpackungsplasmid), 10.703 bp	Addgene, Cambridge, MA, US
pMD2.G (Hüllplasmid), 5.824 bp	Addgene, Cambridge, MA, US
pMXs-IP (pMXs-IRES-Puro), 5.847 bp	Cell Biolabs, San Diego, CA, US
pMXs-IP-C-HA (C-terminaler HA-tag)	Dr. V. Assmann (ITB)
pMXs-IP-ZEB1	Dr. V. Assmann (ITB)

Tabelle 6: Neu generierte Gen-Expressionsplasmide

Expressionsplasmid	Ausgangsvektor/-plasmid
pMXs-IP-C-HA-Slug	pMXs-IP-C-HA
pMXs-IP-PD-L1	pMXs-IP

Tabelle 7: Verwendete shRNA-Expressionsplasmide

Bezeichnung	TRC-Referenz	Zielgen	Vektor
NTC (<i>non-targeting control</i>)		-	pLKO.1
shGRHL2 #1	TRCN0000015812	GRHL2	pLKO.1
shGRHL2 #2	TRCN0000015810	GRHL2	pLKO.1
shPDL1 #1	TRCN0000056913	PD-L1	pLKO.1
shPDL1 #2	TRCN0000056916	PD-L1	pLKO.1
shPDL1 #3	TRCN0000056914	PD-L1	pLKO.1
shPDL1 #4	TRCN0000056915	PD-L1	pLKO.1

Sämtliche verwendete shRNA-Expressionsplasmide wurden von Dharmacon (Lafayette, CO, US) bezogen.

2.1.4 Oligonukleotide

Sämtliche verwendete Oligonukleotide wurden von Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US) bezogen.

Tabelle 8: Für Klonierungen und Sequenzierungen verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Zielgen	Sequenz (5' – 3')
PD-L1 for (<i>EcoRI</i>)	PD-L1	GCGCATCGAATCCCAATGCTGGATTACGTCTCCTCC
PD-L1 rev (<i>EcoRI</i>)	PD-L1	GCGCATCGAATTCCTGTCCGCCTGCAGGGCATTCC
PD-L1 Seq	PD-L1	GGTTGTGGATCCAGTCACCTC
pMXs-3	pMXs-IRES-Puro	GTAGACGGCATCGCAGCTTGG
Slug for (<i>EcoRI</i>)	Slug	GCGCATCGAATTCGCCAGACCCGCTGGCAAGATGC
Slug rev (<i>BamHI</i>)	Slug	GCGCATCGGATCCTGCTACACAGCAGCCAGATTCC

Tabelle 9: Für quantitative *Real Time*-PCR verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Zielgen	Sequenz (5' – 3')
ALOX5 for	ALOX5	TGGCGCGGTGGATTCATAC
ALOX5 rev	ALOX5	CCAGTCGTCATTCAGCCAGT
BCAT1 for	BCAT1	AATCTTCGGGCTGGGAGAGA
BCAT1 rev	BCAT1	CTGCAATCCTTCATTGTTCCGT
CDH3 for	Cadherin 3 (CDH3)	GGGAGGCTGAAGTGACCTTG
CDH3 rev	Cadherin 3 (CDH3)	GCAGCCCATGAATACTTTCCC
Ceruloplasmin for	Ceruloplasmin (CP)	TTTCACGGCCATAGCTTCCA
Ceruloplasmin rev	Ceruloplasmin (CP)	TTTGGTGTCTTCATTTGTAGAACG
CMTM6 for	CMTM6	TGCTGCAATTGTGTTGGATTTAT
CMTM6 rev	CMTM6	CACCACAATGCAGGGTCACT
CTSH for	Pro-Cathepsin H (CTSH)	TCATGGATGTCTAAGCACCGT
CTSH rev	Pro-Cathepsin H (CTSH)	GTGGTTCCCATTTGTTGTGGG
D53 for	Tumor Protein D53 (TPD52L1)	ACATGCAGACTACCACTGCC
D53 rev	Tumor Protein D53 (TPD52L1)	GGAGTAACTCATGTCTCCGAACT
DDIT4 for	DDIT4	CATGCCTAGCCTTTGGGACC
DDIT4 rev	DDIT4	GGTAAGCCGTGTCTTCTCCCG
E-Cadherin for [107]	E-Cadherin (CDH1)	CAGGAACCTCTGTGATGGAG
E-Cadherin rev [107]	E-Cadherin (CDH1)	CACTGATGACTCCTGTGTTCTCTG

ELN for	Elastin (ELN)	GAGTTGGCATTTCCTCCCGAA
ELN rev	Elastin (ELN)	TAACCCAAACTGGGCGGC
Fibronectin for	Fibronectin (FN1)	CACCATCCAACCTGCGTTTC
Fibronectin rev	Fibronectin (FN1)	AGTTGGGGAAGCTCGTCTGT
GJA1 for	Connexin 43 (GJA1)	TACCAAACAGCAGCGGAGTT
GJA1 rev	Connexin 43 (GJA1)	TGGGCACCACTCTTTTGCTT
GRHL2 for	GRHL2	GCCACCAAATCTCTCCGTCA
GRHL2 rev	GRHL2	CCACCATCACCACTCCTG
IGFBP5 for	IGFBP5	ACCCAGTCCAAGTTTGTCGG
IGFBP5 rev	IGFBP5	AGGTTTGCCTGCTTTCTCTTG
IRF6 for	IRF6	GTAGCGACGGGTGATCTTCG
IRF6 rev	IRF6	TTGTCTTCCCTTGACCGCT
KLF5 for	KLF5	CAGGACGAGCCGGTGTT
KLF5 rev	KLF5	CTTCTCCATTTACATCTTGTCTGG
KRT13 for	Keratin 13	AATGGTTCCACGCCAAGAGT
KRT13 rev	Keratin 13	GCCCCGCTTTCATGCTCAG
KRT19 for	Keratin 19	TGAGGAGGAAATCAGTACGCT
KRT19 rev	Keratin 19	CGACCTCCCGGTTCAATTCT
KRT6A for	Keratin 6A	TGGACAAGTCAACATCTCTGTG
KRT6A rev	Keratin 6A	AGAGCTAGCAGACGCACTT
KRT7 for	Keratin 7	AACATCAAGAACCAGCGTGCC
KRT7 rev	Keratin 7	ACTCCATCTCCAGCCAACCG
MAP1LC3B2 for	MAP1LC3B2	TGCCAGCGGCCTTACAC
MAP1LC3B2 rev	MAP1LC3B2	CCGGGATTTTGGTTGGATGC
MEST for	MEST	ATCCGCAACAATGACGGGAA
MEST rev	MEST	CCTCTAGCTGTGGATAGTGGC
MMP2 for	Matrix Metalloprotease 2 (MMP2)	CGACCACAGCCAACTACGAT
MMP2 rev	Matrix Metalloprotease 2 (MMP2)	ATGTCAGGAGAGGCCCCATA
MMP9 for	Matrix Metalloprotease 9 (MMP9)	GTACTCGACCTGTACCAGCG
MMP9 rev	Matrix Metalloprotease 9 (MMP9)	TTCAGGGCGAGGACCATAGA
NDRG1 v1 for	NDRG1 v1	AAGGGACTAGGCAGGTGACAG
NDRG1 v1 rev	NDRG1 v1	AGCGTGACGTGAACAGAGC
NDRG1 v1-3 for	NDRG1 v1-3	CTGTTACGTCACGCTGTGT
NDRG1 v1-3 rev	NDRG1 v1-3	CATCCTGAGATCTTGGAGGCG

NTS for	Neurotensin (NTS)	GAACAGCCCAGCTGAGGAAA
NTS rev	Neurotensin (NTS)	CCTGGATTA ACTCCCAGTGTGTA
PD-1 for [141]	PD-1	GACAGCGGCACCTACCTCTGTG
PD-1 rev [141]	PD-1	GACCCAGACTAGCAGCACCAGG
PD-L1 A for	PD-L1 v1+2	TGCCTTGGTGTAGCACTGAC
PD-L1 A rev	PD-L1 v1+2	CGTCTCCTCCAAATGTGTATCACT
PD-L1 B for	PD-L1 v1+2	ATGCCTTGGTGTAGCACTGA
PD-L1 B rev	PD-L1 v1+2	CCTCCAAATGTGTATCACTTTGCTT
PD-L1 C for	PD-L1 v1+2	AAGAAAAGGGAGAATGATGGATG TG
PD-L1 C rev	PD-L1 v1+2	GCTGGATTACGTCTCCTCCAA
PD-L1 v1+4 for	PD-L1 v1+4	TGTGAAAGTCAATGCCCCATAC
PD-L1 v1+4 rev [142]	PD-L1 v1+4	GGAATTGGTGGTGGTGGTCT
PD-L1 v2 for [142]	PD-L1 v2	TTGCTGAACGCCCATACAA
PD-L1 v2 rev [142]	PD-L1 v2	TCCAGATGACTTCGGCCTTG
PD-L2 for	PD-L2	ACTTTGGCCAGCATTGACCT
PD-L2 rev	PD-L2	ACCACAGGTT CAGATAGCACTG
S100A14 for	S100A14	TGATGTGGAGAGGGCCATTG
S100A14 rev	S100A14	CCACAGTTGCTCGGCATGAG
SERPINA1 for	SERPINA1	TCCTCCGATAACTGGGGTGA
SERPINA1 rev	SERPINA1	GCATTGTGATTCACTGTCCC
SERPINE1 for	SERPINE1	GTCATAGTCTCAGCCGCAT
SERPINE1 rev	SERPINE1	GACTGTTCTGTGGGGTTGTG
Slug for	Slug (SNAI2)	CAGACCCCCATGCCATTGAA
Slug rev	Slug (SNAI2)	TTCTCCCCCGTGTGAGTTCTA
Snail for	Snail (SNAI1)	GGTTCTTCTGCGCTACTGCT
Snail rev	Snail (SNAI1)	TGCTGGAAGGTAACTCTGGAT
SPINT2 for	SPINT2	GACTTCTGCCTGGTGTGCAA
SPINT2 rev	SPINT2	CTTCTGGGAGCACTTGGGAC
THBS1 for	THBS1	GGAGGAGGGGTACAGAAACG
THBS1 rev	THBS1	CAGGCACTTCTTTGCACTCAT
TINAGL1 for	TINAGL1	TGGGAGGCCAGAGAGATACC
TINAGL1 rev	TINAGL1	TGGCCGAGTCCAGTATTTG
Twist for	Twist1	ATTCAGACCCTCAAGCTGGC
Twist rev	Twist1	TTCTCTGGAACAATGACATCTAGG
UPK 1A for	Uroplakin 1A	GGACGGGAAACTTCATCCCC
UPK 1A rev	Uroplakin 1A	AAGCAGCCCTTGGTGAACAG
UPK 2 for	Uroplakin 2	AGCCAATGACAGCAAAGTGGT

UPK 2 rev	Uroplakin 2	CTGAGCCGAGTGACTGTGAA
UPK 3A for	Uroplakin 3A	GTGTGACTTTTCGCCACCAAC
UPK 3A rev	Uroplakin 3A	TCCTGGAAATGGCTGAGTCG
Vimentin for	Vimentin (VIM)	AGGCGAGGAGAGCAGGATT
Vimentin rev	Vimentin (VIM)	AGTGGGTATCAACCAGAGGGA
WNT4 for	WNT4	CATGAGTCCCCGCTCGTG
WNT4 rev	WNT4	TCCATGACTTCCAGGTTCCG
ZEB1 for	ZEB1	TTACCAGGGAGGAGCAGTGA
ZEB1 rev	ZEB1	CCTTCCTTTCCTGTGTCATCCT
β -Actin for	β -Actin	CCAACCGCGAGAAGATGA
β -Actin rev	β -Actin	CCAGAGGCGTACAGGGATAG

2.1.5 Kits

Tabelle 10: Verwendete kommerzielle Kits

Kit	Hersteller	Firmensitz
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems	Foster City, CA, US
CellSearch [®] -CTC-Kit	Menarini Silicon Biosystems	Bologna, IT
CellSearch [®] -CXC-Kit	Menarini Silicon Biosystems	Bologna, IT
First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, US
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, US
Mynox Gold	Biochrom	Berlin, DE
NucleoBond Xtra Midi	Macherey-Nagel	Düren, DE
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel	Düren, DE
NucleoSpin Plasmid (No Lid)	Macherey-Nagel	Düren, DE
NucleoSpin RNA	Macherey-Nagel	Düren, DE
NucleoSpin RNA Plus	Macherey-Nagel	Düren, DE
NucleoSpin Tissue (gDNA Isolation)	Macherey-Nagel	Düren, DE
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, US
Qubit dsDNA BR Assay Kit	Invitrogen by Life Technologies	Carlsbad, CA, US
Qubit dsDNA HS Assay Kit	Invitrogen by Life Technologies	Carlsbad, CA, US
Qubit RNA BR Assay Kit	Invitrogen by Life Technologies	Carlsbad, CA, US
Venor GeM Classic Mycoplasma Detection Kit	Minerva Biolabs	Berlin, DE

2.1.6 Antikörper

Tabelle 11: Unkonjugierte Antikörper

Antigen	Klon	Spezies	Hersteller	Firmensitz
AKT (pan)	11E7	Kaninchen	CST	Danvers, MA, US
ALDH1	44	Maus	BD Biosciences	Franklin Lakes NJ, US
CD44	polyklonal	Kaninchen	CST	Danvers, MA, US
CK14	polyklonal	Kaninchen	Proteintech	Rosemont, IL, US
CK20	D9Z1Z	Kaninchen	CST	Danvers, MA, US
CK5	XM26	Maus	Abcam	Cambridge, UK
c-MYC	D84C12	Kaninchen	CST	Danvers, MA, US
E-Cadherin	36	Maus	BD Biosciences	Franklin Lakes NJ, US
EpCAM	VU-1D9	Maus	Novocastra/Leica Biosystems Dr. V. Assmann (ITB), hergestellt von Davids Biotechnol.	Nussloch, DE
GRHL2	polyklonal	Kaninchen		Regensburg, DE
GSK-3 β	27C10	Kaninchen	CST	Danvers, MA, US
HLA <i>class I</i> (MHC I)	W6/32	Maus	Abcam	Cambridge, UK
Hsc70	B-6	Maus	Santa Cruz Biotech.	Dallas, TX, US
MAPK (ERK1/2)	polyklonal	Kaninchen	CST	Danvers, MA, US
N-Cadherin	D4R1H	Kaninchen	CST	Danvers, MA, US
p4E-BP1 Thr37/46	236B4	Kaninchen	CST	Danvers, MA, US
pAKT Ser473	D9E	Kaninchen	CST	Danvers, MA, US
panCK	AE1/AE3	Maus	Merck Millipore	Darmstadt, DE
pc-JUN Ser63	polyklonal	Kaninchen	CST	Danvers, MA, US
PD-L1	E1L3N (XP)	Kaninchen	CST	Danvers, MA, US
PD-L1	130021	Maus	R&D Systems	Minneapolis, MN, US
PD-L1	polyklonal	Kaninchen	Abcam	Cambridge, UK
PD-L2	D7U8C	Kaninchen	CST	Danvers, MA, US
pGSK-3 β Ser9	D85E12	Kaninchen	CST	Danvers, MA, US
pMAPK (p-ERK1/2) Thr202/Tyr204	polyklonal	Kaninchen	CST	Danvers, MA, US
pS6 Ser240/244	polyklonal	Kaninchen	CST	Danvers, MA, US

pSMAD2 Ser465/467 / pSMAD3 Ser423/425	D27F4	Kaninchen	CST		Danvers, MA, US
pSTAT1 Tyr701	58D6	Kaninchen	CST		Danvers, MA, US
pSTAT3 Tyr705	D3A7	Kaninchen	CST		Danvers, MA, US
Slug	A-7	Maus	Santa Cruz Biotech.		Dallas, TX, US
STAT3	F-2	Maus	Santa Cruz Biotech.		Dallas, TX, US
TROP2	polyklonal	Ziege	R&D Systems		Minneapolis, MN, US
Vimentin	RV202	Maus	BD Biosciences		Franklin Lakes NJ, US
ZEB1	polyklonal	Kaninchen	Sigma-Aldrich		St. Louis, MO, US
β -Catenin	polyklonal	Kaninchen	Sigma-Aldrich		St. Louis, MO, US

Tabelle 12: Konjugierte Antikörper

Antigen	Klon	Spezies	Konjugat	Hersteller	Firmensitz
CD45	HI30	Maus	AlexaFluor647	Biolegend	San Diego, CA, US
Pan- Zytokeratin	AE1/AE3	Maus	eFluor570	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, US
PD-L1	E1L3N	Kaninchen	AlexaFluor488	CST	Danvers, MA, US
PD-L1	E1L3N	Kaninchen	PE	CST	Danvers, MA, US
PD-L1	D8T4X	Kaninchen	AlexaFluor488	CST	Danvers, MA, US
PD-L1	D8T4X	Kaninchen	AlexaFluor647	CST	Danvers, MA, US
Vimentin	V9	Maus	AlexaFluor488	Santa Cruz Biotech.	Dallas, TX, US

Tabelle 13: Sekundäre Antikörper

Antigen	Klon	Spezies	Konjugat	Hersteller	Firmensitz
Human-IgG	polyklonal	Ziege	AlexaFluor488	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, US
Kaninchen-IgG	polyklonal	Ziege	AlexaFluor488	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, US
Kaninchen-IgG	polyklonal	Ziege	HRP	CST	Danvers, MA, US
Maus-IgG	polyklonal	Kaninchen	HRP	Dako	Glostrup, DK
Ziege-IgG	polyklonal	Kaninchen	HRP	Dako	Glostrup, DK

Tabelle 14: Therapeutische Antikörper

Handelsname	Antigen	Isoform	Hersteller	Firmensitz
Nivolumab (Opdivo®)	PD-1	IgG4κ	Bristol-Myers Squibb	New York, NY, US
Pembrolizumab (Keytruda®)	PD-1	IgG4κ	Merck Sharp & Dohme	Kenilworth, NJ, US

2.1.7 Rekombinante Proteine, Zytokine, Enzyme, Inhibitoren und Antibiotika

Tabelle 15: In der Zellkultur eingesetzte humane, rekombinante Proteine und Zytokine

Protein/Zytokin	Spezifikation	Hersteller	Firmensitz
IFN γ	aus <i>E. coli</i>	R&D Systems	Minneapolis, MN, US
IgG1 Fc	aus NS0-Zellen	R&D Systems	Minneapolis, MN, US
PD-1 Fc-Chimera	aus NS0-Zellen	R&D Systems	Minneapolis, MN, US
TGF β 1	aus CHO-Zellen, mit <i>carrier</i>	R&D Systems	Minneapolis, MN, US

Tabelle 16: Zur Klonierung verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller	Firmensitz
ALLin HiFi DNA Polymerase (2 U/ μ L)	HighQu	Kraichtal, DE
AmpliTaQ Gold DNA Polymerase (5 U/ μ L)	Life Technologies	Carlsbad, CA, US
Antarctic Phosphatase (5 U/ μ L)	New England BioLabs	Ipswich, MA, US
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/ μ L)	New England BioLabs	Ipswich, MA, US
Restriktionsenzym <i>Bam</i> HI	New England BioLabs	Ipswich, MA, US
Restriktionsenzym <i>Eco</i> RI	New England BioLabs	Ipswich, MA, US
Restriktionsenzym <i>Hind</i> III	New England BioLabs	Ipswich, MA, US
T4 DNA-Ligase (400 U/ μ L)	New England BioLabs	Ipswich, MA, US

Tabelle 17: Inhibitoren und Antibiotika

Inhibitor/Antibiotikum	Hersteller	Firmensitz
AKT-Inhibitor MK-2206	Selleckchem	Houston, TX, US
ALK5-Inhibitor SB-431542	Cayman Chemical	Ann Arbor, MI, US
Ampicillin	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, US
Ciprofloxacin-Hydrochlorid	Fährhaus Pharma	Hamburg, DE
GSK-3-Inhibitor CHIR99021	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, US
mTOR-Inhibitor RAD001 (Everolimus)	Selleckchem	Houston, TX, US
Penicillin-Streptomycin-Mix	Gibco	Eggenstein, DE
Protease-/Phosphatase-Inhibitor Cocktail (100x)	CST	Danvers, MA, US
Proteasom-Inhibitor MG132	Merck (Calbiochem)	Darmstadt, DE
Puromycin Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, US
TAK1-Inhibitor 5Z7O ((5Z)-7-Oxo Zeaenol)	Cayman Chemical	Ann Arbor, MI, US

2.1.8 Zelllinien

Tabelle 18: Verwendete humane Zelllinien

Bezeichnung	Gewebetyp	Kultur- medium	Bezugsquelle
MCF7	Adeno-CA der Brust, Pleuraeffusion	DMEM	ITB, UKE
MDA-MB-231	Adeno-CA der Brust, Pleuraeffusion	DMEM	ITB, UKE
SK-BR-3	Adeno-CA der Brust, Pleuraeffusion	DMEM	ITB, UKE
Jurkat	Akute T-Zell-Leukämie	RPMI	AG Jücker (Inst. f. Biochemie u. Signaltransduktion, UKE)
HEK-293T	embryonale Nierenzellen	DMEM	AG Assmann (ITB)
ψNX-ampho	embryonale Nierenzellen	DMEM	AG Assmann (ITB)
PC-3	Prostata-CA, Knochenmet.	DMEM	ITB, UKE
5637	UCB	RPMI	Klinik für Urologie, UKE
647V	UCB	DMEM	Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, UKD
BFTC-905	UCB	RPMI	Klinik für Urologie, UKE
HT-1376	UCB	EMEM	Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, UKD
J82	UCB	DMEM	Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, UKD
RT-112	UCB	DMEM	Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, UKD
RT-4	UCB	DMEM	Universitätsklinik Erlangen
SW1710	UCB	DMEM	Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, UKD
T24	UCB	DMEM	Klinik für Urologie, UKE
TCC-SUP	UCB	DMEM	Klinik für Urologie, UKE
UM-UC-3	UCB	DMEM	Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, UKD
253J	UCB, Lymphknotenmet.	DMEM	Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, UKD
HT-1197	UCB, Rezidiv	EMEM	Klinik für Dermatologie, UMM

Die verwendeten Zusätze für die angegebenen Zellkultur-Basismedien sowie die Kulturbedingungen der einzelnen Zelllinien können den Methoden entnommen werden (2.2.1).

ITB: Institut für Tumorbiologie (UKE)

UKD: Universitätsklinikum Düsseldorf

UKE: Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

UMM: Universitätsmedizin Mannheim der Universität Heidelberg

2.1.9 Analysesoftware und Datenbanken

Tabelle 19: Verwendete Analysesoftware und Datenbanken

Software/Datenbank	Verwendungszweck	Bezugsquelle
Bio-Rad CFX Manager (3.1)	Auswertung von qRT-PCR	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, US
CellTracks Analyzer II (2.7)	Fluoreszenzmikroskopische Analyse von CTCs	Menarini Silicon Biosystems, Bologna, IT
FinchTV (1.4)	Analyse von DNA-Sequenzierungen	Geospiza Inc. www.geospiza.com/finchtv
GIMP (2.8)	Bildbearbeitung	www.gimp.org
ImageJ (1.52a)	Bildbearbeitung	https://imagej.nih.gov/ij/
NCBI	Datenbank für Literatur (PubMed), Proteine, DNA, RNA	www.ncbi.nlm.nih.gov
NCBI Primer Blast	Design von Primern	www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast
Oncomine	Datenbank für Genexpression	www.oncomine.org/resource/login.html
Serial Cloner (2.6)	Analyse von DNA-Sequenzen, Planung von Klonierung	serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html
SPSS Statistics	Statistische Auswertung	IBM, Armonk, NY, US
UniProt	Datenbank für Proteine	www.uniprot.org

2.1.10 Patientenproben

Für alle Patienten liegt eine schriftliche Einwilligungserklärung zur Teilnahme an der Studie vor. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Hamburger Ärztekammer (PV3779, PV5392) genehmigt.

2.2 Zellkultur-Methoden

2.2.1 Standardkultivierung von humanen Zelllinien

Die Kultivierung der humanen Zelllinien erfolgte in den in 2.1.8 angegebenen Basis-Kulturmedien mit folgenden Zusätzen:

- DMEM mit 10% (v/v) FCS, 2 mM L-Glutamin und 1% Penicillin-Streptomycin-Mix
- RPMI mit 10% (v/v) FCS, 2 mM L-Glutamin und 1% Penicillin-Streptomycin-Mix
- EMEM mit 10% (v/v) FCS, 2 mM L-Glutamin, 1% Penicillin-Streptomycin-Mix und 1% NEAA

Alle Zelllinien wurden stets unter sterilen Bedingungen und konstant bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Kultivierungen in DMEM-basiertem Medium und in RPMI- oder EMEM-basiertem Medium erfolgten bei 10% CO₂ bzw. bei 5% CO₂. In regelmäßigen Abständen, abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit, wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden adhärente Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA vom Boden des Zellkulturgefäßes abgelöst. Die Zellsuspension wurde in serumhaltigem Kulturmedium aufgenommen, wodurch die enzymatische Reaktion gestoppt wurde, und bei 244 x g für 3 min zentrifugiert. Nach Resuspension des Pellets wurden die Zellen in neue Zellkulturflaschen überführt.

2.2.2 Kryokonservierung von Zelllinien-Zellen

Zur Lagerung von humanen Zelllinien wurde in Kryokonservierungs-Röhrchen jeweils 1 mL Zellsuspension (2.2.1) mit 100 µL DMSO als Gefrierschutz versetzt und bei -20°C gelagert. Um die Lagerungsdauer zu verlängern, wurden die gefrorenen Zellen gegebenenfalls in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur erneuten Kultivierung der kryokonservierten Zellen wurden diese bei 37°C aufgetaut, in ca. 5 mL Kulturmedium aufgenommen und bei 244 x g für 3 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in frischem Kulturmedium resuspendiert und die Zellen in einem neuen Kulturgefäß kultiviert.

2.2.3 Test auf Mykoplasmen-Kontamination und Behandlung

In regelmäßigen Abständen wurden Überstände der kultivierten Zellen mithilfe des PCR-basierten „Venor GeM Classic Mycoplasma Detection“ Kits auf Mykoplasmen-Kontamination getestet. Hierbei wurde das durch den Hersteller angegebene Reaktionsvolumen halbiert. Die Auswertung erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.3.9).

Im Falle eines positiven Nachweises von Mykoplasmen-DNA wurden die Zellen entweder mit Ciprofloxacin-Hydrochlorid oder mit „Mynox Gold“ nach Herstellerangaben behandelt und

anschließend erneut getestet. Die Behandlung mit 10 µg/mL Ciprofloxacin-Hydrochlorid erfolgte über einen Zeitraum von zwei Wochen mit einer anschließenden zweiwöchigen Phase ohne Behandlung.

2.2.4 Authentifizierung von Zelllinien

Der Nachweis der Authentizität und Reinheit der Zelllinien wurde an isolierter DNA (2.3.5) durchgeführt. Die Authentifizierung erfolgte entweder mittels *SNP-profiling* durch die Firma Multiplexion (Friedrichshafen, DE) oder Mikrosatelliten-basiert durch den CLS Cell Lines Service (Eppelheim, DE).

2.2.5 Retroviraler Gentransfer zur Überexpression von Genen in humanen Zelllinien

Zur stabilen Überexpression ausgewählter Genprodukte in Zelllinien wurden zunächst mittels Transfektion der amphotropen Verpackungszelllinie ψ NX-ampho mit einem Gen-Expressionsplasmid replikationsinkompetente Retroviren erzeugt. Diese wurden zur Infektion humaner Urothelkarzinom-Zelllinien eingesetzt, wodurch das Plasmid in das Genom proliferierender Zielzellen integrieren konnte. Eine Selektion mit Puromycin führte zur Anreicherung überexprimierender Zellen.

Am Tag vor der transienten Transfektion wurden $2,5 \times 10^6$ ψ NX-ampho-Zellen in einer 60 mm-Schale ausgesät. Der Transfektionsansatz wurde aus zwei Komponenten hergestellt, wovon die erste aus 250 µL OptiMEM, 16 µL P3000 und 8 µg isolierter Plasmid-DNA (2.3.4) bestand. Die zweite Komponente enthielt 250 µL OptiMEM und 20 µL Lipofectamine3000. Beide Komponenten wurden vereint und nach einer fünfminütigen Inkubation auf die inzwischen zu etwa 80% konfluenten ψ NX-ampho-Zellen getropft. Am Folgetag wurde das Kulturmedium erneuert.

48 Stunden nach der Transfektion wurden die im Überstand befindlichen retroviralen Partikel geerntet und durch Zentrifugation bei 244 x g für 5 min und Filtration mit Millex Filtern (Porengröße 0,45 µm) von Zellen und Zellfragmenten getrennt. Es wurde erneut Kulturmedium auf die Zellen gegeben und die zweite Ernte wurde am Folgetag auf dieselbe Weise durchgeführt. 1 mL-Aliquots wurden direkt zur Infektion von Zielzellen verwendet oder auf Trockeneis schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Am Tag vor der Infektion wurden 2×10^5 Zielzellen in einer T25-Zellkulturflasche ausgesät. Diese wurden am Folgetag mit dem Infektionscocktail, bestehend aus 1 mL Virusüberstand, 1 mL Kulturmedium und 4 µL Polybrene, versetzt. Nach sechs Stunden wurden weitere 3 mL Kulturmedium hinzugefügt. Am Folgetag wurde der Überstand durch frisches Medium ersetzt. Die Selektion erfolgte über mehrere Passagen und mit bis zu 3 µg/mL Puromycin, wobei die Konzentration schrittweise erhöht wurde und nicht infizierte Zellen als Selektionskontrolle

mitgeführt wurden. Die stabile Expression des Transgens wurde mittels qRT-PCR (2.3.16) und Western-Blot-Analyse (2.4.4) nachgewiesen.

2.2.6 Lentiviraler Gentransfer zum *knockdown* der Expression von Genen in humanen Zelllinien

Zur stabilen Herabregulation (*knockdown*) der Expression ausgewählter Gene in Zelllinien mittels RNA-Interferenz wurden zunächst durch Transfektion von HEK-293T-Zellen mit einem shRNA-Expressionsplasmid Lentiviren erzeugt. Diese wurden zur Infektion humaner Urothelkarzinom-Zelllinien eingesetzt, wodurch das Plasmid in das Genom der Zielzellen integrierte und durch Expression der shRNA der Abbau der spezifischen mRNA vermittelt wurde. Eine Selektion mit Puromycin führte zur Anreicherung der herunterregulierenden Zellen.

Am Tag vor der transienten Transfektion wurden $2,5 \times 10^6$ HEK-293T-Zellen in einer 60 mm-Schale ausgesät. Der Transfektionsansatz wurde aus zwei Komponenten hergestellt, wovon die erste aus 250 μ L OptiMEM, 16 μ L P3000, 4 μ g isolierter pLKO.1 Plasmid-DNA (2.3.4), 3 μ g psPAX2 Plasmid-DNA und 1 μ g pMD2.G Plasmid-DNA bestand. Die zweite Komponente enthielt 250 μ L OptiMEM und 20 μ L Lipofectamine3000. Beide Komponenten wurden vereint und nach einer fünfminütigen Inkubation auf die inzwischen zu etwa 70% konfluenten HEK-293T-Zellen getropft. Am Folgetag wurde das Kulturmedium erneuert.

48 Stunden nach der Transfektion wurden die im Überstand befindlichen lentiviralen Partikel geerntet und durch Zentrifugation bei $244 \times g$ für 5 min und Filtration mit Millex Filtern (Porengröße 0,45 μ m) von Zellen und Zellfragmenten getrennt. Es wurde erneut Kulturmedium auf die Zellen gegeben und die zweite Ernte wurde am Folgetag auf dieselbe Weise durchgeführt. Der Virusüberstand wurde sofort zur Infektion von Zielzellen verwendet oder als Aliquots à 1 mL auf Trockeneis schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Am Tag vor der Infektion wurden die Zielzellen in einer T25-Zellkulturflasche ausgesät. Diese sollten am Folgetag zu etwa 70% konfluent sein. Sie wurden mit frischem, mit 8 μ g/mL Polybrene supplementiertem Kulturmedium versetzt und es wurde 0,5 mL Virusüberstand zugefügt. Am Folgetag wurde der Überstand durch frisches Medium ersetzt. Die Selektion erfolgte über mehrere Passagen und mit bis zu 3 μ g/mL Puromycin, wobei die Konzentration schrittweise erhöht wurde und nicht infizierte Zellen als Selektionskontrolle mitgeführt wurden. Der *knockdown* wurde mittels qRT-PCR (2.3.16) und Western-Blot-Analyse (2.4.4) nachgewiesen.

2.2.7 Nachweis der Proliferation mittels Zellzählung

Zur Bestimmung der Zellproliferation wurden Zelllinien-Zellen mit definierter Zellzahl in 12-well-Platten in Triplikaten ausgesät. In Abhängigkeit von der Zelllinie wurde an den Tagen 2, 3 und 4 oder an den Tagen 3, 4 und 5 die Zellzahl bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit Trypsin-

EDTA abgelöst und mit Kulturmedium in einem Endvolumen von 1 mL aufgenommen. Die Zellzählung erfolgte entweder manuell mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer oder im Zellzählautomat „Vi-cell XR“. Aus den ermittelten Werten wurden Wachstumskurven erstellt.

2.2.8 MTT-Test zur Bestimmung der Zellviabilität

Der MTT-Test basiert auf der Annahme, dass die gemessene metabolische Aktivität der Zellen mit der Zellviabilität korreliert. In der vorliegenden Arbeit diente diese als Surrogat für die Wachstumsgeschwindigkeit. Der gelbe Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) wird von den Zellen in das blau-violette, wasserunlösliche Formazan umgesetzt, welches im Anschluss per Extinktionsmessung quantifiziert wird.

Die Zellen wurden in 96-*well*-Platten in Triplikaten mit einem Volumen von 100 μ L pro *well* ausgesät, gegebenenfalls einer Behandlung unterzogen und entweder als Endpunktbestimmung an einem einzelnen Tag oder als Kinetik an mehreren Tagen analysiert. Dazu wurden 10 μ L MTT der Konzentration 5 mg/mL zu jedem *well* gegeben und für 0,5 – 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Die optimale Inkubationsdauer war abhängig von der Zelllinie und wurde empirisch ermittelt. Anschließend wurden die Überstände abgekippt und jedes *well* wurde mit 100 μ L DMSO befüllt. Nach 30 Sekunden Schütteln wurde die Absorption im „Platereader NanoQuant infinite M200Pro“ bei einer Mess-Wellenlänge von 570 nm und einer Referenz-Wellenlänge von 630 nm gemessen.

2.2.9 Herstellung von Zytospins

Für immunzytochemische Analysen (2.4.5) wurde eine Suspension von Zellkultur-Zellen in PBS mit geeigneter Zelldichte durch Zentrifugation bei 244 x g für 3 min mit Hilfe eines Trichters auf Objektträger gebracht. Die Zytospins wurden über Nacht getrocknet und bei -80°C gelagert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Vermehrung von *E.coli*

Für Klonierungsexperimente und zur Plasmidproduktion wurde der *E.coli*-Stamm DH5 α verwendet. Dieser wurde zur Vermehrung in LB-Medium unter Schütteln bei 180 rpm bei 37°C kultiviert. Einzelkolonien wurden durch Ausstreichen auf Agar-Platten generiert.

LB-Medium

1% (w/v) Bacto-Trypton

0,5% (w/v) Hefeextrakt

1% (w/v) NaCl

pH 7,5

Zusatz für feste Nährböden

1,5% (w/v) Bacto-Agar

Das LB-Medium wurde durch Autoklavieren sterilisiert. Nach dem Abkühlen auf 56°C konnte 100 µg/mL Ampicillin für die Selektion resistenter Bakterien zugesetzt werden. Antibiotikahaltige Platten wurden bei 4°C gelagert.

2.3.2 Transformation von *E.coli*

Transformationskompetente *E.coli* DH5α (erhalten von der AG Assmann, ITB) wurden auf Eis aufgetaut. Zu 50 µL Bakteriensuspension wurden < 0,1 µg isolierte Plasmid-DNA (2.3.3 und 2.3.4) oder 1 µL Ligationsansatz (2.3.11) gegeben und die Inkubation des Ansatzes erfolgte für 30 Minuten auf Eis. Nach der Hitzeschock-Transformation für 30 Sekunden bei 42°C wurde der Ansatz sofort für zwei Minuten auf Eis gekühlt. Im Anschluss erfolgte die Regeneration unter Zusatz von 450 mL LB-Medium bei 37°C und 180 rpm für 45 Minuten. 100 und 400 µL der Zellsuspension wurden auf LB-Agar plattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Bis zur Inokulation von Flüssigkulturen wurden die Platten bei 4°C gehalten. Alternativ wurde der gesamte Transformationsansatz direkt für die Inokulation einer 100 mL-Flüssigkultur verwendet.

2.3.3 Plasmid-Isolation im analytischen Maßstab

Transformierte *E.coli*-Zellen wurden in 5 mL Ampicillin-haltigem LB-Medium über Nacht bei 37°C und unter Schütteln bei 180 rpm vermehrt. Die Plasmid-Isolation erfolgte mit dem „NucleoSpin Plasmid Kit“ entsprechend den Herstellerangaben. Nach Konzentrationsbestimmung (2.3.6) wurde das klonierte DNA-Fragment durch Spaltung mit Restriktionsendonukleasen (2.3.7) oder Sequenzierung (2.3.12) überprüft. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.3.4 Plasmid-Isolation im präparativen Maßstab

Transformierte *E.coli*-Zellen wurden in 100 mL Ampicillin-haltigem LB-Medium über Nacht bei 37°C und unter Schütteln bei 180 rpm vermehrt und die Plasmid-Isolation erfolgte mit Hilfe

des „NucleoBond Xtra Midi“ Kits entsprechend den Herstellerangaben. Die DNA wurde in 200 µL TE-Puffer resuspendiert und zum vollständigen Lösen über Nacht bei 4°C gelagert. Nach Zentrifugation für fünf Minuten bei 15.600 x g zur Abscheidung von unlöslichen Partikeln wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Konzentration wurde bestimmt (2.3.6). Die so aufgereinigte Plasmid-DNA erfüllt die quantitativen und qualitativen Kriterien für die Transfektion von humanen ψNX-ampho-Zellen (2.2.5) und für Klonierungsexperimente. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei -20°C.

2.3.5 Isolation von genomischer DNA (gDNA) aus kultivierten Zellen

Genomische DNA (gDNA) aus humanen Zellkultur-Zellen wurde mit dem „NucleoSpin Tissue“ Kit nach Herstellerangaben isoliert. Nach einer Konzentrationsbestimmung (2.3.6) wurde die gDNA für die Authentifizierung von Zelllinien (2.2.4) verwendet. Die Lagerung der gDNA erfolgte bei -20°C.

2.3.6 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Konzentrationen und Reinheit der Nukleinsäure-Präparationen wurden standardmäßig mit dem „Nanodrop ND100 Spectrometer“ photometrisch bestimmt. Dazu wurden 1,5 µL DNA oder RNA analysiert. Die Beurteilung der Reinheit erfolgte über den Quotienten der Absorptionen bei 260 und 280 nm, welcher für DNA etwa 1,8 für RNA etwa 2,0 betragen sollte. Optional, beispielsweise einer mRNA-Sequenzierung (2.3.17) vorausgehend, wurden DNA- oder RNA-Konzentrationen zusätzlich mit dem „Qubit Fluorometer“ unter Anwendung des entsprechenden „Qubit Assay“ Kits nach Herstellerangaben bestimmt.

2.3.7 Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen

Der Reaktionsansatz (z.B. 10 µL) bestand aus folgenden Komponenten:

- 1 µL 10x Puffer für das entsprechende Restriktionsenzym
- 1 µL Restriktionsenzym(e)
- 1/8 µL DNA-Suspension (präparativer/analytischer Maßstab)
- auffüllen auf 10 µL mit Aqua bidest.

Die enzymatische Reaktion erfolgte für eine oder drei Stunden bei 37°C.

2.3.8 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Um die Religation des linearisierten Vektors (2.3.7) zu verhindern, wurden einem Restriktionsansatz von 20 µL 1 µL Antarctic Phosphatase, 3 µL zugehöriger Puffer sowie 6 µL nukleasefreies Wasser zugesetzt. Auf eine Inkubation bei 37°C für 15 Minuten folgte die

Inaktivierung des Enzyms bei 65°C für zehn Minuten. Durch eine nachfolgende Agarose-Gelelektrophorese (2.3.9) mit anschließender Gelextraktion (2.3.10) wurde das dephosphorylierte Vektor-Fragment für die Ligation (2.3.11) vorbereitet.

2.3.9 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden zu analytischen und präparativen Zwecken mittels Agarose-Gelelektrophorese (1-2% Agarose in TAE-Puffer, 0,001% (v/v) GelRed) in horizontalen Elektrophoreseapparaturen aufgetrennt. Mit dem Geldokumentationssystem wurde das Gel ausgewertet und dokumentiert.

TAE-Laufpuffer

40 mM Tris-Acetat

1 mM EDTA

1% (v/v) Essigsäure

pH 8,3

2.3.10 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und nach PCR

DNA-Fragmente wurden mit dem „NucleoSpin Gel and PCR Clean-up“ Kit den Herstellerangaben entsprechend entweder direkt nach einer PCR aufgereinigt oder aus einem Agarosegel extrahiert. Letzteres erforderte zunächst das Ausschneiden der gewünschten DNA-Bande aus dem Gel unter UV-Licht. Die gereinigte DNA wurde mit Restriktionsenzymen geschnitten (2.3.7), zur Ligation eingesetzt (2.3.11) oder bei -20°C gelagert.

2.3.11 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von Vektor- und Insert-DNA-Fragmenten wurden die DNA-Konzentrationen etwa im Verhältnis 1:3 eingesetzt und in einem Gesamtvolumen von 10 µL mit 1 µL T4 DNA-Ligase und 1 µL zugehörigem Puffer versetzt. Der Ansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zur Transformation von *E.coli* (2.3.2) verwendet.

2.3.12 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten zur Kontrolle von Klonierungsprodukten oder zur Mutationsanalyse wurde nach der Didesoxy-Methode nach Sanger [143] unter Einsatz des „BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing“ Kits durchgeführt. In einem 20 µL-Reaktionsansatz wurden 500 ng DNA, 1 µL Primer (3,2 pmol/µL), 2 µL BigDye-Mix und das entsprechende

Volumen Reaktionspuffer eingesetzt. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte im „DNA Engine PTC-200 Thermocycler“ wie folgt:

Sequenzierungs-Programm:

Denaturierung	96°C	30 sec	} 26 x
Annealing	50°C	15 sec	
Elongation	60°C	2 min	

Im Anschluss wurde der Ansatz mit 16 µL H₂O versetzt und die DNA wurde durch die Zugabe von 64 µL Ethanol (100%) für 15 Minuten gefällt. Nach einer Zentrifugation mit 25.000 x g für 30 Minuten wurde das Pellet mit 250 µL Ethanol (70%) gewaschen und erneut für weitere fünf Minuten zentrifugiert. Nach Trocknen des DNA-Pellets wurde eine Kapillarelektrophorese im Institut für Pathologie des UKE durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm „FinchTV“ ausgewertet.

2.3.13 Isolation von Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen

Gesamt-RNA aus humanen Zellkultur-Zellen wurde mit dem „NucleoSpin RNA“ Kit oder dem „NucleoSpin RNA Plus“ Kit den Herstellerangaben entsprechend isoliert. Nach Konzentrationsbestimmung (2.3.6) wurde die RNA für die Synthese von cDNA (2.3.14) oder zur mRNA-Sequenzierung (2.3.17) eingesetzt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.3.14 cDNA-Synthese durch reverse Transkription von RNA

Zur Verwendung als Matrize in PCR-Reaktionen (2.3.15) oder in der qRT-PCR-Analyse (2.3.16) wurde RNA mittels reverser Transkription mit Hilfe des „First Strand cDNA Synthesis“ Kits in komplementäre DNA (cDNA, *complementary* DNA) umgeschrieben. 500 ng isolierte Gesamt-RNA (2.3.13) aus Zelllinien-Zellen wurde gemäß der Herstellerangaben unter Verwendung von Random Hexamer Primern und M-MuLV Reverser Transkriptase wie folgt im „DNA Engine PTC-200 Thermocycler“ transkribiert.

Programm zur reversen Transkription:

Annealing	25°C	5 min
Reverse Transkription	37°C	60 min
Inaktivierung der Transkriptase	70°C	5 min

Anschließend wurde die cDNA mit nukleasefreiem Wasser 1:10 verdünnt und direkt verwendet oder bei -20°C gelagert.

2.3.15 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von cDNA

Ausgehend von cDNA (2.3.14) wurden in Abhängigkeit vom Verwendungszweck spezifische DNA-Fragmente mit verschiedenen Polymerasen amplifiziert. Für ausschließlich analytische Zwecke wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) mit der „AmpliTag Gold DNA Polymerase“ durchgeführt. Bei nachfolgender Verwendung des Amplifikats zur Klonierung in einen Expressionsvektor wurden die „Q5 High-Fidelity DNA Polymerase“ oder die „ALLin HiFi DNA Polymerase“ eingesetzt, da diese über erhöhte *proofreading*-Aktivität verfügen. Die Reaktionen erfolgten mit den unten angegebenen Komponenten und PCR-Programmen im „DNA Engine PTC-200 Thermocycler“. Anschließend wurden die PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.3.9) analysiert und gegebenenfalls für die weitere Verwendung extrahiert (2.3.10).

PCR mit der AmpliTag Gold DNA Polymerase

cDNA	ca. 50 ng
Primer (10 µM)	je 0,75 µL
Puffer (10x)	2,5 µL
MgCl ₂ (25mM)	1,5 µL
dNTPs (10 mM)	0,5 µL
AmpliTag Gold DNA Polymerase	0,125 µL
H ₂ O	ad 25 µL

PCR-Programm:

Initiale Denaturierung	94°C	10 min	
Denaturierung	94°C	30 sec	} 35 x
Annealing	60°C	30 sec	
Elongation	72°C	45 sec	
Finale Elongation	72°C	5 min	

PCR mit der Q5 High-Fidelity DNA Polymerase

cDNA	0,2 µg
Primer (10 µM)	je 2,5 µL
Puffer (5x)	10 µL
dNTPs (10 mM)	1 µL
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	0,5 µL
H ₂ O	ad 50 µL

PCR-Programm:

Initiale Denaturierung	98°C	3 min	
Denaturierung	98°C	10 sec	} 30 x
Annealing	63°C	30 sec	
Elongation	72°C	40 sec	
Finale Elongation	72°C	2 min	

PCR mit der ALLin HiFi DNA Polymerase

cDNA	10/25 ng
Primer (10 µM)	je 2 µL
Puffer (5x, enthält dNTPs)	10 µL
ALLin HiFi DNA Polymerase	0,5 µL
H ₂ O	ad 50 µL

PCR-Programm:

Initiale Denaturierung	95°C	1 min	
Denaturierung	95°C	15 sec	} 30 x
Annealing	63°C	30 sec	
Elongation	72°C	30 sec	
Finale Elongation	72°C	2 min	

2.3.16 Quantitative *Real Time*-PCR (qRT-PCR)

Mit der quantitativen *Real Time*-PCR (qRT-PCR) lässt sich die Genexpression spezifischer Zielgene über die PCR-basierte, relative Quantifizierung von mRNA bestimmen, welche zuvor in cDNA umgeschrieben wurde (2.3.14). Hierbei wird über einen unspezifisch in doppelsträngige DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, hier SYBR-Green, in Echtzeit (*real time*) die Zunahme der DNA-Menge während der PCR gemessen. Durch Ermittlung des PCR-Zyklus, in dem das gemessene Signal zum ersten Mal signifikant die Hintergrund-Fluoreszenz übersteigt (*quantitative cycle*, c_q oder auch *threshold cycle*, c_t), kann die zu Grunde liegende Menge der mRNA relativ zu einem Referenzgen, hier β -Actin, bestimmt werden. Für die Amplifikation wurden genspezifische Primer designt, die stets eine Exon-Exon-Grenze überspannten, um so die das Ergebnis beeinflussende Amplifikation von gegebenenfalls vorhandener gDNA zu verhindern.

Die qRT-PCR erfolgte mithilfe des „Maxima SYBR Green“ Kits in einer 96-*well*-Mikrotiterplatte in Triplikat-Messung. Das Volumen wurde in Bezug auf die Herstellerangaben auf 10 µL halbiert. Es wurden 5 µL SYBR Green/ROX qPCR Master Mix eingesetzt, in dem bereits der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I, der Referenzfarbstoff ROX, Reaktionspuffer, dNTPs, dUTP sowie Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase enthalten waren. Es wurden zusätzlich 1 µL der

1:10 verdünnten cDNA (2.3.14) und je 0,3 µL genspezifische Primer (10 µM) eingesetzt. Die Amplifikation wurde mit dem nachfolgenden Programm im „Thermocycler C1000 Touch CFX96“ vorgenommen. Dabei betrug die Annealing-Temperatur 59°C für die Amplifikation von PD-L1 und 60°C für alle weiteren Zielgene. Im Anschluss wurde eine automatische Schmelzkurvenanalyse zur Kontrolle der Primerspezifität durchgeführt.

qRT-PCR-Programm:

Initiale Denaturierung	95°C	10 min			
Denaturierung	95°C	15 sec	}	41 x	
Annealing	59/60°C	30 sec			
Elongation	72°C	30 sec			Fluoreszenzmessung
Schmelzkurvenanalyse	65 - 95°C, Intervalle 0,5°C	je 5 sec			Fluoreszenzmessung

Die Rohdaten wurden mit dem Programm „Bio-Rad CFX Manager“ basierend auf der komparativen c_t -Methode ausgewertet. Dazu wurde zunächst auf das Referenzgen normalisiert: $\Delta c_t = c_t (\text{Zielgen}) - c_t (\text{Referenzgen})$. Im nächsten Schritt wurde die Differenz aus der Messung der Probe und der Kontrolle gebildet, beispielsweise im Vergleich von behandelten und unbehandelten Zellen: $\Delta \Delta c_t = \Delta c_t (\text{Probe}) - \Delta c_t (\text{Kontrolle})$. Die Ratio gibt den relativen Expressionsunterschied an: $\text{Ratio} = 2^{-\Delta \Delta c_t}$. Eine Ratio über 1 indiziert eine Heraufregulation und eine Ratio unter 1 eine Herabregulation eines Gens.

2.3.17 mRNA-Sequenzierung (RNA-Seq)

Zur umfassenden Analyse des gesamten Transkriptoms von PD-L1-überexprimierenden Zellen (2.2.5) wurde eine mRNA-Sequenzierung (RNA-Seq) durchgeführt. Dazu wurde isolierte Gesamt-RNA (2.3.13) in Triplikaten (je $\geq 2 \mu\text{g}$ mit $\geq 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$) an die Firma Novogene (Peking, CN) übersendet, die die RNA-Seq extern durchführte. Hierbei wurde nach einer weiteren Qualitäts- und Konzentrationsbestimmung die mRNA über magnetische Poly-T-Oligo-gekoppelte *beads* angereichert und anschließend fragmentiert. Daraus wurde doppelsträngige cDNA synthetisiert. Die Einzelstrang-Überhänge wurden entfernt und Adapter wurden angefügt. Mittels PCR wurde eine *library* generiert. Diese wurde nach einer Konzentrationsbestimmung mit *next-generation-sequencing* (NGS) sequenziert.

Auch die bioinformatische Auswertung erfolgte durch die Firma Novogene. Nach einer Qualitätskontrolle und dem Filtern der Rohdaten wurden die gelesenen Fragmente (*reads*) Genen des humanen Referenzgenoms (GRCh37/hg19) zugeordnet. Basierend darauf wurden eine differenzielle Genexpressionsanalyse und eine Genstrukturanalyse vorgenommen. Die

Genexpressionsanalyse wurde mit dem Programm „edgeR“ durchgeführt und unter Anwendung der Benjamini-Hochberg-Prozedur statistisch ausgewertet.

2.4 Proteinbiochemische und immunologische Methoden

2.4.1 Herstellung von Zelllysaten

Zur Generierung von Gesamtproteinextrakten wurden kultivierte Zellen zunächst dreimal mit PBS gewaschen und dann in 0,5 – 1 mL PBS mit Hilfe eines Zellschabers aus der Zellkulturflasche entnommen. Nach einer Zentrifugation mit 600 x g für 3 min bei 4°C wurde das Zellpellet in einem geeigneten Volumen des auf 4°C vorgekühlten Lysispuffers aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Zelltrümmer wurden durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 15.682 x g für 10 min bei 4°C abgetrennt. Der Überstand wurde im Anschluss an die Bestimmung der Proteinkonzentration (2.4.2) mit 3x-SDS-Probenpuffer versetzt und direkt für die Analyse mittels SDS-PAGE (2.4.3) und Western-Blot-Analyse (2.4.4) eingesetzt oder bei -20°C bzw. -80°C gelagert.

RIPA-Lysispuffer

50 mM Tris-HCl
150 mM NaCl
5 mM EDTA
1% (w/v) NP40
0,1% SDS
0,1% (w/v) Triton X-100
0,5% Natrium-Desoxycholat
pH 8,0
Protease-/Phosphatase-Inhibitor

NP40-Lysispuffer

50 mM Tris-HCl
150 mM NaCl
1% (w/v) NP40
pH 7,4
Protease-/Phosphatase-Inhibitor

3x-SDS-Probenpuffer

180 mM Tris-HCl pH 6,8
30% (w/v) Glycerol
3% (w/v) SDS
0,01% (w/v) Bromphenolblau

Harnstoff-Lysispuffer

9,8 M Harnstoff
30 mM Tris-HCl
15 mM EDTA

2.4.2 BCA-Test zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten

Die Proteinkonzentration der Gesamtzellextrakte (2.4.1) wurde mit dem „Pierce BCA Protein Assay“ Kit ermittelt. Dazu wurden je 2,5 µL Lysat in einem Probenvolumen von 25 µL verdünnt. Außerdem wurde in einem Probenvolumen von 25 µL eine Standardkurve mit BSA-Lösungen

der Konzentrationen 0, 100, 200, 400, 600 und 1000 µg/mL erstellt. Die Standardlösungen enthielten 2,5 µL des verwendeten Lysis-Puffers. Zu den Ansätzen wurden jeweils 500 µL des Reaktionsansatzes aus Reagenzien A und B im Verhältnis 1:50 gegeben und für 2 min bei 55°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt und die Absorption wurde bei 562 nm photometrisch bestimmt.

2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen aus Zelllysaten (2.4.1) nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mittels denaturierender SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [144]. Polyacrylamid-Gele, bestehend aus einem Trenngel von geeigneter Acrylamid-Konzentration und einem Sammelgel mit Probentaschen, wurden im „Mini-Protean System Casting Stand“ manuell gegossen. Die Proteinlysate wurden bei 95°C für 5 min aufgekocht und 20 – 30 µg Protein in maximal 25 µL wurden neben dem Proteinmarker auf das Gel aufgetragen. Um reduzierende Bedingungen zu erzielen, wurden die Proben optional vor dem Aufkochen mit DTT versetzt. Die Gelelektrophorese wurde in der „Mini-Protean Tetra Cell“ Apparatur in Laemmli-Laufpuffer bei 20 mA pro Gel durchgeführt. Der spezifische Nachweis ausgewählter Proteine erfolgte mit dem Western Blot-Verfahren (2.4.4).

<u>Trenngel</u> (5 mL)	<u>8%</u>	<u>10%</u>	<u>12%</u>
H ₂ O	2,3 mL	2,0 mL	1,7 mL
30% Acrylamid	1,3 mL	1,7 mL	2,0 mL
1,5 M Tris (pH 8,8)	1,3 mL	1,3 mL	1,3 mL
10% SDS	0,05 mL	0,05 mL	0,05 mL
10% APS	0,05 mL	0,05 mL	0,05 mL
TEMED	0,003 mL	0,002 mL	0,002 mL

<u>Sammelgel</u> (2mL)	
H ₂ O	1,4 mL
30% Acrylamid	0,33 mL
1,0 M Tris (pH 6,8)	0,25 mL
10% SDS	0,02 mL
10% APS	0,02 mL
TEMED	0,002 mL

Laemmli-Laufpuffer

25 mM Tris-HCl
192 mM Glycin
0,1% (w/v) SDS

2.4.4 Western-Blot-Analyse

Die mittels SDS-PAGE (2.4.3) aufgetrennten Proteine wurden im Tank-Blot-System vom Acrylamid-Gel auf eine PSQ-Membran der Porengröße 0,2 µm übertragen. Hierzu wurden ein Schwamm, drei Filterpapiere, das Gel, die für fünf Minuten in Methanol aktivierte Membran, drei weitere Filterpapiere und abschließend ein weiterer Schwamm übereinander geschichtet. Alle Komponenten wurden vorab in Transferpuffer äquilibriert. Der Aufbau wurde in die mit Transferpuffer gefüllte „Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell“ Apparatur eingesetzt. Der Elektrotransfer der Proteine auf die Membran erfolgte unter Kühlung bei 100 V mit maximal 175 mA für eine Stunde.

Transferpuffer

48 mM Tris-HCl

39 mM Glycin

0,015% (w/v) SDS

10% (v/v) Ethanol (99%)

Die Membran wurde mit TBS-T gewaschen und für eine Stunde in einer Blockierlösung aus 5% (w/v) Milchpulver in TBS-T auf dem Rollmischer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die anschließende Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper erfolgte in geeigneter Verdünnung in 5% (w/v) Milchpulver oder 5% (w/v) BSA in TBS-T unter ständiger Rotation bei 4°C über Nacht. Am Folgetag wurde die Membran dreimal für zehn Minuten mit TBS-T gewaschen und im Anschluss für eine Stunde mit einer 1:2.000-Verdünnung des entsprechenden HRP-konjugierten Sekundärantikörpers in 5% (w/v) Milchpulver in TBS-T bei Raumtemperatur auf dem Rollmischer inkubiert. Danach wurde erneut dreimal für zehn Minuten in TBS-T gewaschen. Als Peroxidase-Substrat wurden ECL-Lösungen 1 und 2 frisch angesetzt und zu gleichen Teilen vereint. Darin wurde die Membran für drei bis fünf Minuten geschwenkt. Die chemilumineszenten Signale wurden sofort in Dunkelheit auf Röntgenfilm mit Expositionszeiten von drei Sekunden bis zehn Minuten detektiert und im Filmentwickler „Curix 60“ entwickelt. Ausgewählte Western-Blot-Analysen wurden mittels densitometrischer Auswertung mit dem Programm „ImageJ“ quantifiziert und auf die Expression von Hsc70 normalisiert.

TBS-T

20 mM Tris-HCl

150 mM NaCl

0,05% (v/v) Tween-20

pH 7,6

ECL-Lösung 1

0,1 M Tris-HCl (pH 8,5)

2,5 mM Luminol

0,396 mM p-Cumarinsäure

ECL-Lösung 2

0,1 M Tris-HCl (pH 8,5)

0,018% (v/v) H₂O₂

2.4.5 Immunfluoreszenz (IF)

Mittels Immunfluoreszenz (IF) wurde PD-L1, optional in Kombination mit Zytokeratinen und CD45, auf Zellen detektiert. Als Präparate wurden auf *chamber slides* gewachsene oder auf Zytospins (2.2.9) gebrachte Zellkultur-Zellen verwendet. Bei letzteren waren die Zellen gegebenenfalls zur Simulation von Patientenproben auch in Spenderblut eingebracht worden (*spiking*). Die Objektträger wurden für 15 Minuten mit 4% PFA in PBS fixiert und anschließend für drei Minuten mit PBS gewaschen. Um unspezifische Bindestellen abzusättigen, wurde für eine Stunde mit 0,1% Tween in PBS mit 3% normalem Ziegenerum blockiert. Die Inkubation mit unkonjugiertem PD-L1-Antikörper (Klon E1L3N), 1:100 in 10% AB-Serum verdünnt, erfolgte über Nacht bei 4°C. Danach wurden die Objektträger dreimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen und anschließend für 45 Minuten mit AlexaFluor488-konjugiertem Ziege-anti-Kaninchen-IgG Sekundärantikörper, verdünnt 1:200 in PBS, inkubiert. Es wurde erneut dreimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen. Optional wurde zusätzlich für 45 Minuten mit eFluor570-konjugiertem Pan-Zytokeratin-Antikörper, AlexaFluor647-konjugiertem CD45-Antikörper und DAPI (Verdünnungen jeweils 1:80, 1:150 und 1:1.000 in PBS) gefärbt und dreimal für drei Minuten mit PBS gewaschen. Die Präparate wurden mit Mowiol oder „Vectashield Antifade Mounting Medium“ eingedeckelt und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet.

2.5 Detektion und Einzelzellanalyse von CTCs aus peripherem Blut

2.5.1 Anreicherung und Detektion von CTCs im CellSearch®-System

Ein Verfahren zur Analyse von Flüssigbiopsien von Tumorpatienten ist die Anreicherung und Detektion von zirkulierenden Tumorzellen (CTCs, *circulating tumor cells*) epithelialen Ursprungs im CellSearch®-System. Den Patienten wurde 7,5 mL Blut direkt in CellSave Preservative Tubes abgenommen, in welchen sich ein vom Hersteller vorgelegtes Fixativ zur Zellstabilisation befand. Die Blutproben konnten daher bis zu 96 Stunden nach der Blutentnahme analysiert werden. Sie wurden gemäß der Protokolle des CellSearch®-CTC- und CellSearch®-CXC-Kits mit Verdünnungspuffer versetzt und für zehn Minuten bei 800 x g und abgeschalteter Bremse zentrifugiert. EpCAM-positive Zellen wurden automatisch im „CellSearch® Autoprep System“ über ein Ferrofluid mit gekoppeltem anti-EpCAM-Antikörper immunomagnetisch angereichert. Anschließend wurden die Zellen mit Antikörpern gegen Keratine (8, 18 und 19) und den Leukozyten-Marker CD45 gefärbt sowie mit DAPI zur

Zellkernfärbung. Hierbei waren im „CellSearch®-CTC-Kit“ der anti-Keratin-Antikörper mit Phycoerythrin (PE) und der anti-CD45-Antikörper mit Allophycocyanin (APC) gekoppelt. Zur optionalen Analyse eines weiteren, vom Benutzer gewählten Antigens konnte ein AlexaFluor488-konjugierter Antikörper eingesetzt werden. Im „CellSearch®-CXC-Kit“ war stattdessen der anti-Keratin-Antikörper an AlexaFluor488 gekoppelt, sodass hier der Einsatz eines ausgewählten PE-konjugierten Antikörpers möglich war.

Schließlich wurde die Probe in eine Kartusche dispensiert und automatisch im „Celltracks Analyzer II“ mikroskopisch analysiert. Bilder von Keratin-positiven Ereignissen wurden dem erfahrenen Betrachter zur finalen Analyse über die Identifikation von Keratin-positiven und CD45-negativen CTCs präsentiert. Gegebenenfalls wurde eine Mikromanipulation (2.5.2) zur Einzelzellanalyse von individuellen CTCs angeschlossen.

2.5.2 Isolation von Einzelzellen durch Mikromanipulation

Zur molekularen Einzelzellanalyse von CTCs, die mittels CellSearch®-System (2.5.1) isoliert worden waren, oder von Zellkultur-Zellen in Suspension wurden einzelne Zellen durch Mikromanipulation in individuelle Eppendorf-Reaktionsgefäße transferiert. Proben aus CellSearch®-Kartuschen wurden dazu zunächst mit MultiFlex-Pipettenspitzen resuspendiert und auf Objektträger überführt. Aufgrund der hohen Verlustrate von Zellen bei diesem Verfahren wurden nur Patientenproben mit mindestens 5 CTCs/7,5 mL Blut verwendet.

Die zu isolierende Zelle wurde anhand ausgewählter Fluoreszenzmarker (bei CellSearch®-Proben hauptsächlich Keratin) im entsprechenden Fluoreszenzkanal des inversen Mikroskops „Axiovert 200“ ausgewählt. Unter Betrachtung im DAPI-Fluoreszenzkanal wurde sie unter Ausschluss von anderen Zellen, wie zum Beispiel Leukozyten, in die im Mikromanipulator eingespannte Glaskapillare (40µM, Kapillartyp III mit Anschliff, Spezialanfertigung) eingesaugt. Nachfolgend wurde sie in einen Tropfen nukleasefreien Wassers (1 µL) im Deckel eines Reaktionsgefäßes abgesetzt. Nach kurzer Zentrifugation wurden die gepickten Zellen bei -20°C gelagert.

3 Ergebnisse

Das vorliegende Promotionsprojekt zur Untersuchung der Regulation, Funktion sowie klinischen Relevanz von PD-L1 im UCB besteht aus einem funktionellen sowie einem klinisch-translationalen Teil. Der funktionelle Teil (3.1 – 3.6) beinhaltet Experimente an 13 unterschiedlichen UCB-Zelllinien und verfolgt das Ziel, Aufschluss über Regulationsmechanismen und Tumorzell-intrinsische Funktionen der PD-L1-Expression zu geben. Mit dem translationalen Teil (3.7) sollen Voraussetzungen für die Evaluierung der PD-L1-Expression auf CTCs geschaffen werden.

3.1 Klonierung von retroviralen Gen-Expressionsplasmiden

In der vorliegenden Arbeit wurden die Gene PD-L1, ZEB1 und Slug experimentell überexprimiert. Das Plasmid zur Überexpression von ZEB1 sowie die zur Klonierung verwendeten Ausgangsvektoren wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Volker Aßmann (Institut für Tumorbilogie) zur Verfügung gestellt. Zur Generierung von PD-L1-überexprimierenden UCB-Zellen (RT-112-PD-L1, UM-UC-3-PD-L1, 5637-PD-L1 und 647V-PD-L1, siehe 3.4.3 und 3.4.4) und Slug-überexprimierenden UCB-Zellen (5637-Slug und BFTC-905-Slug, siehe 3.5.6) wurden die Plasmide pMXs-IP-PD-L1 (3.1.1) und pMXs-IP-C-HA-Slug (3.1.2) durch Klonierung hergestellt.

3.1.1 Generierung eines Expressionsplasmids zur Überexpression von PD-L1

Zur stabilen Überexpression von PD-L1 in humanen UCB-Zelllinien wurde das PD-L1-Gen in den retroviralen Ausgangsvektor pMXs-IRES-Puro kloniert. Dieser verfügt über ein Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion von Bakterienzellen und über ein Puromycin-Resistenzgen zur Selektion von Säugerzellen.

Das für PD-L1 kodierende Gen (*CD274*) ohne Introns wurde parallel aus den UCB-Zelllinien 5637, 647V und HT-1197 durch Isolation von RNA (2.3.13) und anschließender cDNA-Synthese (2.3.14) gewonnen. Es wurde in einer PCR mit einem Gesamtvolumen von 50 µL unter Verwendung von Q5 High-Fidelity DNA Polymerase und den Primern PD-L1 for (*EcoRI*) und PD-L1 rev (*EcoRI*) amplifiziert (2.3.15), wodurch an beiden Enden des 938 bp großen Fragments *EcoRI*-Schnittstellen eingebracht wurden. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.3.9) analysiert (Abbildung 3).

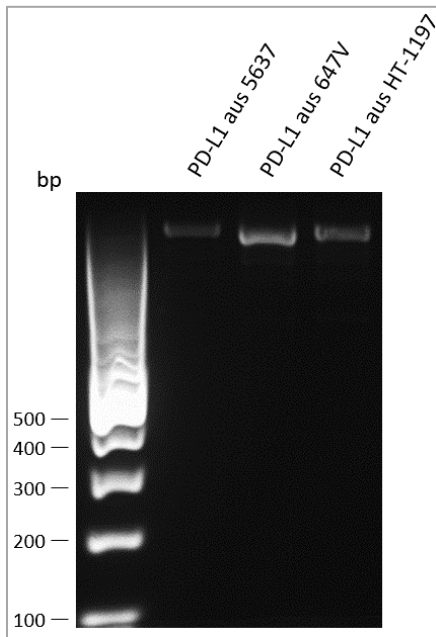


Abbildung 3: Amplifikation der PD-L1-cDNA aus verschiedenen Zelllinien

Aus UCB-Zelllinien isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben. Aus 200 ng cDNA wurde das *CD274*-Gen mittels PCR mit Q5 High-Fidelity DNA Polymerase und den Primern PD-L1 for (*EcoRI*) und PD-L1 rev (*EcoRI*) amplifiziert. 5 μ L (10%) der PCR-Produkte wurden auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen.

Die PCR-Produkte aus 5637 und 647V wurden aufgereinigt (2.3.10) und mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* verdaut (2.3.7). Ebenso wurde 1 μ g des Vektors pMXs-IRES-Puro mit *EcoRI* verdaut. Eine Dephosphorylierung der linearisierten Vektor-DNA (2.3.8) verhinderte eine Religation. Mittels Agarose-Gelelektrophorese und Gel-Extraktion (2.3.10) aufgereinigte DNA-Fragmente sind in Abbildung 4 dargestellt.

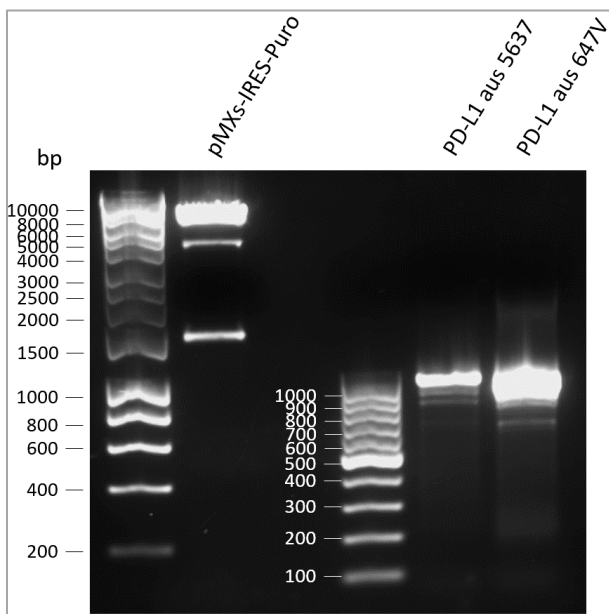


Abbildung 4: Gelextraktion von *EcoRI*-verdauten Vektor- und PD-L1-Insert-Fragmenten

1 μ g *EcoRI*-verdauter und dephosphorylierter Vektor pMXs-IRES-Puro sowie *EcoRI*-verdautes PD-L1-Insert aus 200 ng cDNA der Zelllinien 5637 und 647V wurden auf einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt. Die jeweils größte Bande wurde unter UV-Licht ausgeschnitten und die DNA wurde extrahiert.

Die gereinigten Vektor- und Insert-Fragmente wurden über Nacht ligiert (2.3.11) und jeweils 1 μ L Ligationsansatz wurde zur Hitzeschock-Transformation von *E.coli* (2.3.2) verwendet. Je Konstrukt wurden sechs Klone von den LB-Agar-Platten gepickt und unter Ampicillin-Selektion in Flüssigkulturen über Nacht vermehrt (2.3.1). Es folgten eine Plasmid-Isolation im analytischen Maßstab (2.3.3) und ein Restriktionsverdau zur Kontrolle der durch ungerichtete

Klonierung generierten Plasmid-DNA. Die Restriktion mit *EcoRI* zeigte im Konstrukt vorhandenes Insert an, wobei das kleinere Fragment eine Größe von 938 bp aufweisen sollte. Durch die Restriktion mit *HindIII* wurde anhand der Fragmentgröße der kleineren Bande in der Agarose-Gelelektrophorese (Abbildung 5) die korrekte Orientierung (608 bp) des Inserts ermittelt.

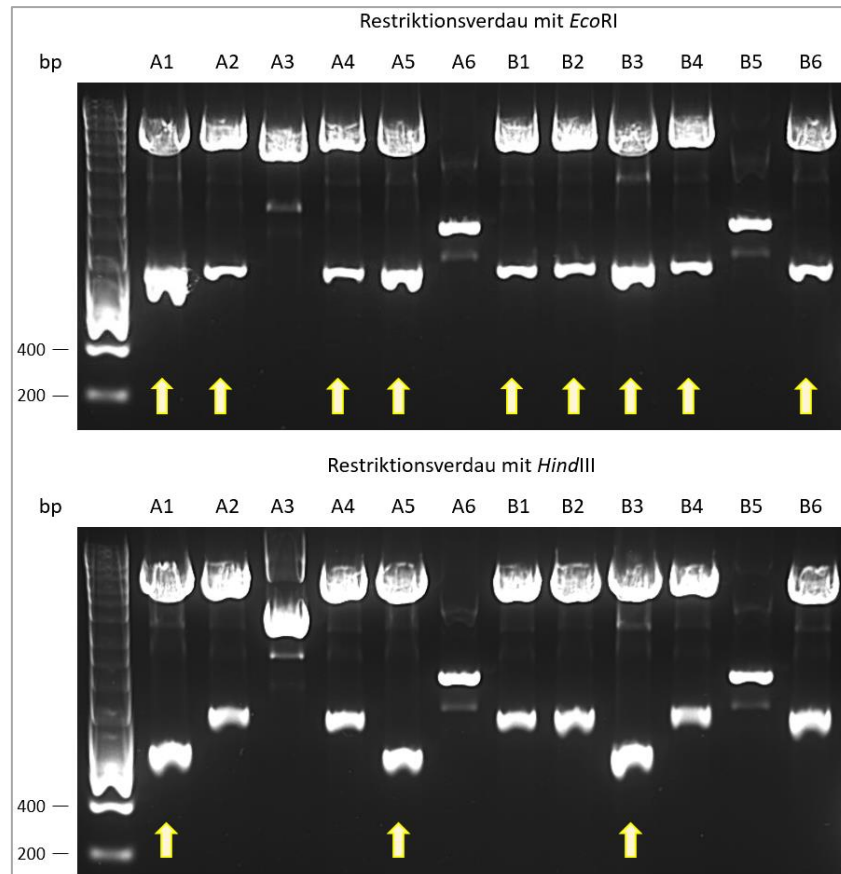


Abbildung 5: Restriktionsverdau des ungerichtet klonierten Konstrukts pMXs-IP-PD-L1

Zur Überprüfung des klonierten Plasmids pMXs-IP-PD-L1 wurden je Ausgangszelllinie (A: 5637, B: 647V) sechs durch Transformation entstandene Klone per Restriktionsverdau analysiert. Es wurden je 8 μL Plasmid-DNA mit *EcoRI* oder *HindIII* für 1 h bei 37°C verdaut und danach auf einem 1%-igen Agarosegel durch Elektrophorese aufgetrennt. Pfeile indizieren den Erwartungen entsprechende Bandenmuster.

Klone 1 und 5 basierend auf der Zelllinie 5637 sowie Klon 3 basierend auf der Zelllinie 647V zeigten die erwarteten Bandenmuster. Mit der BigDye-Sequenzierung (2.3.12) von 500 ng Plasmid-DNA dieser drei Klone mit den Primern PD-L1 Seq und p-MX3 wurden keine Mutationen in den Sequenzen detektiert. Für das weitere Vorgehen wurde Klon 5 gewählt, da lediglich für das Transgen aus diesem Klon die Sequenz lückenlos vorlag. Mit diesem Konstrukt wurde eine weitere Transformation von *E.coli* durchgeführt, um Plasmid-DNA im präparativen Maßstab zu isolieren (2.3.4). Das Plasmid pMXs-IP-PD-L1 mit einer Konzentration von 1,314 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (2.3.6) stand somit für die Produktion von Retroviren zur Überexpression von PD-L1 in humanen Zelllinien (2.2.5) zur Verfügung.

3.1.2 Generierung eines Expressionsplasmids zur Überexpression von Slug

Zur stabilen Überexpression von Slug in humanen UCB-Zelllinien wurde das Slug-Gen in den retroviralen Ausgangsvektor pMXs-IP-C-HA kloniert. Dieser wurde in der AG Assmann auf Grundlage des pMXs-IRES-Puro generiert, in welchen die Sequenz für einen C-terminalen HA-tag des Transgens eingebracht wurde.

Das für Slug kodierende Gen *SNAI2* ohne Introns wurde parallel aus den UCB-Zelllinien HT-1197 und 5637 durch Isolation von RNA und anschließender cDNA-Synthese gewonnen. Von der Zelllinie 5637 wurde ebenfalls eine RNA-Probe nach Behandlung mit IFN γ (200 IU/mL, 48 h) verwendet, da hierin eine erhöhte Anzahl an Slug-Transkripten vorlag. Es wurde in einer PCR mit einem Gesamtvolumen von 50 μ L unter Verwendung von ALLin HiFi DNA Polymerase und den Primern Slug for (*Eco*RI) und Slug rev (*Bam*HI) amplifiziert, wobei am 5'-Ende des etwa 845 bp großen Fragments eine *Eco*RI-Schnittstelle eingebracht wurde und am 3'-Ende eine *Bam*HI-Schnittstelle. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert und sind in Abbildung 6 dargestellt.

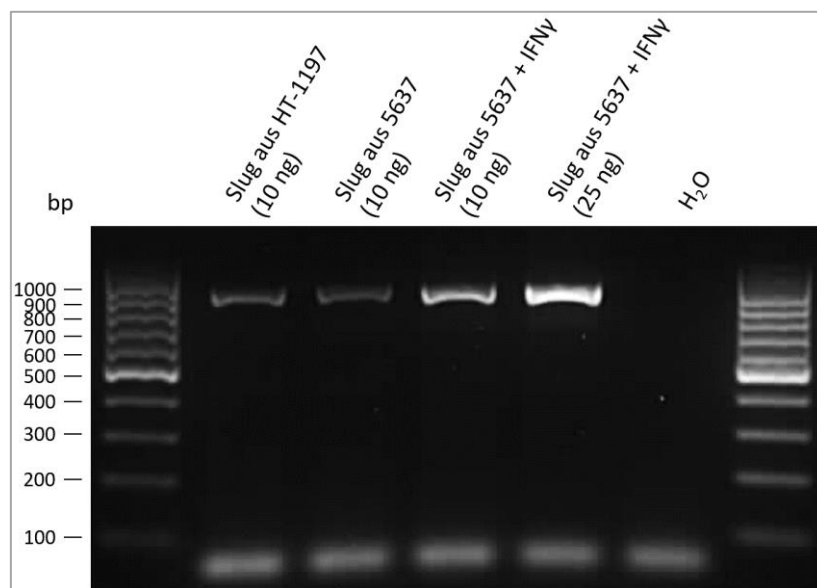


Abbildung 6: Amplifikation des für Slug kodierenden Gens *SNAI2* aus cDNA

Aus UCB-Zelllinien isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben. Aus 10 bzw. 25 ng cDNA wurde das *SNAI2*-Gen mittels PCR mit ALLin HiFi DNA Polymerase und den Primern Slug for (*Eco*RI) und Slug rev (*Bam*HI) amplifiziert. 5 μ L (10%) der PCR-Produkte wurden auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen.

Aus den verwendeten cDNA-Proben wurde jeweils ein einzelnes Fragment der erwarteten Größe amplifiziert. Es wurde aufgereinigt und mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Bam*HI verdaut. Ebenso wurde 1 μ g des Vektors pMXs-IP-C-HA mit *Eco*RI und *Bam*HI verdaut. Die DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese und Gel-Extraktion aufgereinigt (Abbildung 7).

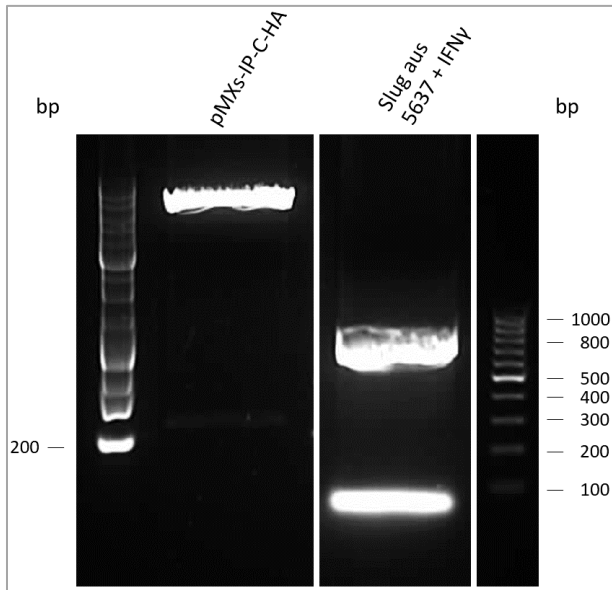


Abbildung 7: Gelextraktion von *EcoRI*- und *BamHI*-verdauten Vektor- und Slug-Insert-Fragmenten

1 µg *EcoRI*- und *BamHI*-verdauter Vektor pMXs-IP-C-HA sowie *EcoRI*- und *BamHI*-verdautes Slug-Insert aus 25 ng cDNA der IFN γ -behandelten Zelllinie 5637 wurden auf einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt. Die jeweiligen Banden wurden unter UV-Licht ausgeschnitten und die DNA wurde extrahiert.

Die gereinigten Vektor- und Insert-Fragmente wurden über Nacht ligiert und 1 µL wurde zur Hitzeschock-Transformation von *E.coli* verwendet. Es wurden alle fünf gewachsenen Klone von den LB-Agar-Platten gepickt und unter Ampicillin-Selektion in Flüssigkulturen über Nacht vermehrt. Es folgten eine Plasmid-Isolation im analytischen Maßstab und ein Restriktionsverdau zur Kontrolle der generierten Plasmid-DNA. Für das Restriktionsenzym *HindIII* sollte es eine Schnittstelle im Vektor sowie eine im Insert geben, sodass zwei Banden von ca. 5920 und 740 bp erwartet wurden. Die Restriktion mit *EcoRI* und *BamHI* zeigte im Konstrukt vorhandenes Insert an, wobei Fragmente von ca. 5820 und 840 bp erwartet wurden. Die Identifikation von Klonen mit erfolgreich kloniertem Plasmid erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese (Abbildung 8).

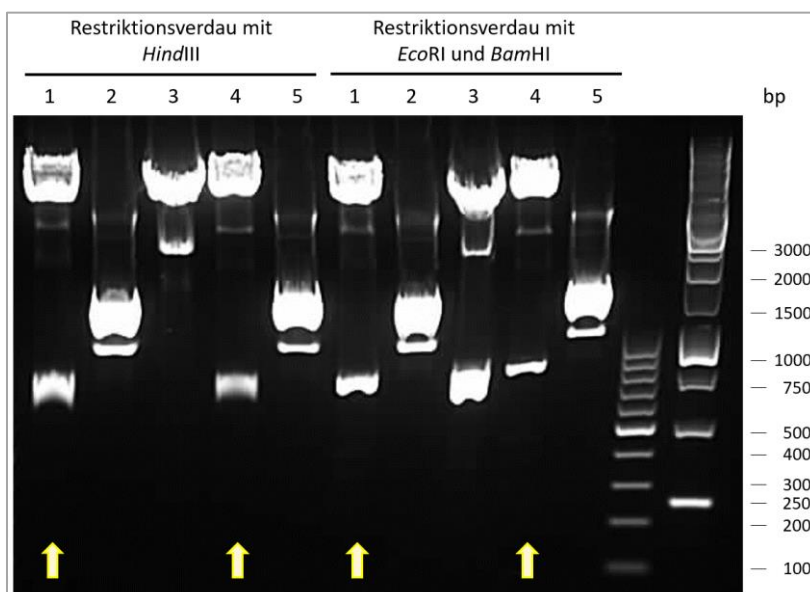


Abbildung 8: Restriktionsverdau des klonierten Konstrukts pMXs-IP-C-HA-Slug

Zur Überprüfung des klonierten Plasmids pMXs-IP-C-HA-Slug wurden fünf durch Transformation entstandene Klone per Restriktionsverdau analysiert. Es wurden je 8 µL Plasmid-DNA mit *HindIII* oder *EcoRI* und *BamHI* für 1 h bei 37°C verdaut und auf einem 1%-igen Agarosegel durch Elektrophorese aufgetrennt. Pfeile indizieren den Erwartungen entsprechende Bandenmuster.

Klone 1 und 4 zeigten die erwarteten Bandenmuster und wurden mittels BigDye-Sequenzierung von 500 ng Plasmid-DNA mit dem Primer p-MX3 und dem qRT-PCR-Primer Slug for überprüft. Bei Klon 1 wurden keine Mutationen in der Sequenz detektiert. Klon 4 wies im Bereich des Klonierungsprimers eine A/T-Mutation auf und wurde daher nicht verwendet. Mit dem Konstrukt aus Klon 1 wurde eine weitere Transformation von *E.coli* durchgeführt, um Plasmid-DNA im präparativen Maßstab zu isolieren. Das Plasmid pMXs-IP-C-HA-Slug mit einer Konzentration von 1,033 µg/µL stand somit für die Produktion von Retroviren zur Überexpression von Slug zur Verfügung.

3.2 Analyse der PD-L1-Expression von UCB-Zelllinien im unstimulierten Zustand und Assoziation mit Eigenschaften der Zelllinien

Als Modellsysteme für die Untersuchung der PD-L1-Expression, ihrer Regulation sowie ihrer Funktion im Harnblasenkarzinom dienten 13 UCB-Zelllinien. Zum spezifischen Nachweis der PD-L1-Expression wurde im ersten Schritt ein geeigneter Antikörper ermittelt. Anschließend wurden die Zelllinien auf Proteinebene durch Western-Blot-Analyse charakterisiert und dadurch einerseits in verschiedene molekulare Subtypen [82] sowie andererseits in Subgruppen mit stärker epithelialen oder mesenchymalen Eigenschaften eingeteilt. Das PD-L1-Expressionsniveau wurde diesen Gruppierungen zugeordnet.

3.2.1 Optimierung des Nachweises der PD-L1-Expression in UCB-Zelllinien

Zur Etablierung der Detektion der PD-L1-Expression wurden drei verschiedene Antikörper-Klone in der Western-Blot-Analyse (2.4.4) getestet. Während der Klon 130021 und der polyklonale Antikörper jeweils ein extrazelluläres Epitop von PD-L1 erkennen, befindet sich das Epitop für Klon E1L3N in der intrazellulären Domäne des PD-L1-Proteins. PD-L1 hat ein berechnetes Molekulargewicht von 33 kDa und liegt als Glykoprotein vor, sodass eine diffuse Bande von mehr als 33 kDa erwartet wurde. Die humane Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 wurde als PD-L1-positiv beschrieben [62, 76] (CST Datenblatt E1L3N, GeneTex Datenblatt GTX104763) und die humane Prostatakarzinom-Zelllinie PC-3 als PD-L1-negativ (CST Datenblatt E1L3N, GeneTex Datenblatt GTX104763). Die Western-Blot-Analyse ist in Abbildung 9 gezeigt.

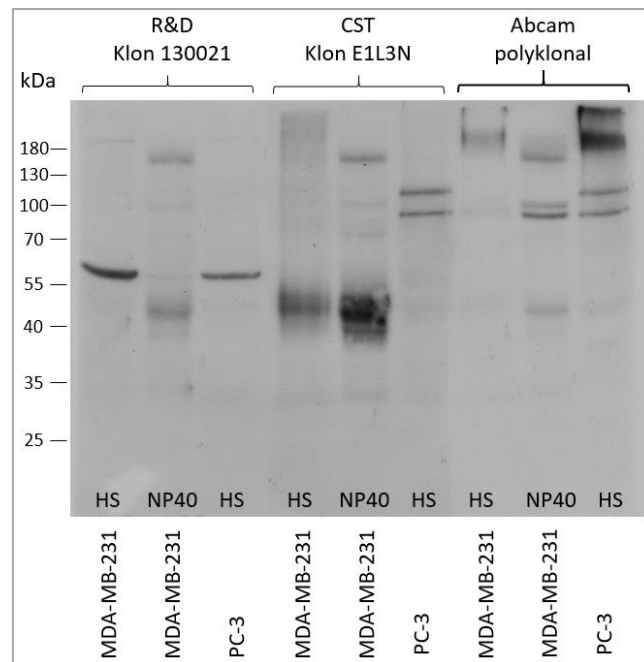


Abbildung 9: Testung von drei verschiedenen anti-PD-L1-Antikörpern in der Western-Blot-Analyse

MDA-MB-231- und PC-3-Zellen wurden mit NP40- oder Harnstoff (HS)-Lysispuffer lysiert. HS-Lysate wurden vor der SDS-PAGE sonifiziert. Es wurden 20 µg Protein pro Bahn in einem 10%-igen Polyacrylamid-Gel unter nicht reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend bei 160 mA auf eine PSQ-Membran transferiert. PD-L1-Protein wurde im Immunoblot mit den jeweils 1:1.000 in 5% Milchpulver/TBS-T verdünnten anti-PD-L1-Antikörpern der Firmen R&D (130021), CST (E1L3N) und Abcam (polyklonal) detektiert.

Eine den Erwartungen für MDA-MB-231 entsprechende, diffuse Bande bei 40 – 50 kDa wurde nur durch den anti-PD-L1-Antikörper Klon E1L3N detektiert. Gleichzeitig wurde wie erwartet bei PC-3 keine Bande generiert. Das Signal für MDA-MB-231 war bei Verwendung des NP40-Lysates stärker als bei Einsatz des Harnstoff-Lysates, sodass im Folgenden NP40-Lysate weiterer Zelllinien mit dem Antikörper-Klon E1L3N analysiert wurden (Abbildung 10).

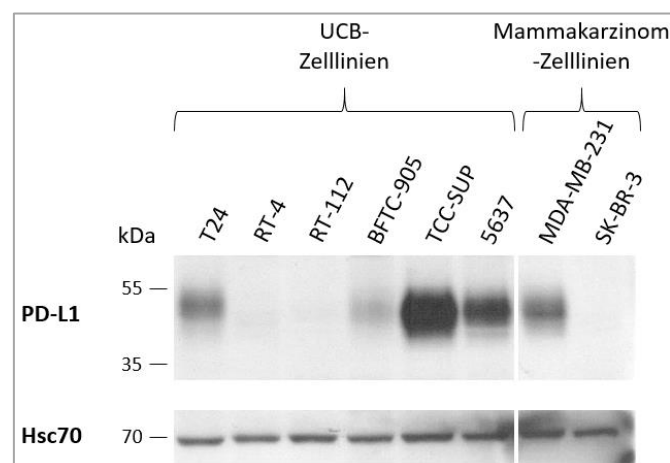


Abbildung 10: Detektion der PD-L1-Expression mittels Western-Blot-Analyse mit dem Antikörper-Klon E1L3N

Die PD-L1-Expression von Mammakarzinom- und UCB-Zelllinien (NP40-Lysate, 30 µg Protein, nicht reduzierende Bedingungen) wurde mittels Western-Blot-Analyse mit dem Antikörper-Klon E1L3N (1:1.000 verdünnt in 5% Milchpulver/TBS-T) nachgewiesen. Die Detektion der konstitutiv exprimierten Form des Hitzeschockproteins 70 (Hsc70) diente als Kontrolle für die Beladung mit gleichen Proteinmengen.

Die PD-L1-Expression in humanen Zelllinien kann in der Western-Blot-Analyse mit dem Antikörper-Klon E1L3N spezifisch detektiert werden. Der Nachweis kann sowohl in NP40- als auch in RIPA-Lysaten unter nicht reduzierenden Bedingungen erfolgen. PD-L1-positive (MDA-MB-231) und -negative (SK-BR-3, [145]) Zelllinien konnten mit diesem Antikörper eindeutig unterschieden werden. Mit Hilfe des etablierten Protokolls wurden dann die 13 UCB-Zelllinien auf ihre PD-L1-Expression untersucht. Die Western-Blot-Analysen mit den Antikörper-Klonen E1L3N und D8T4X sind in Abbildung 11 dargestellt.

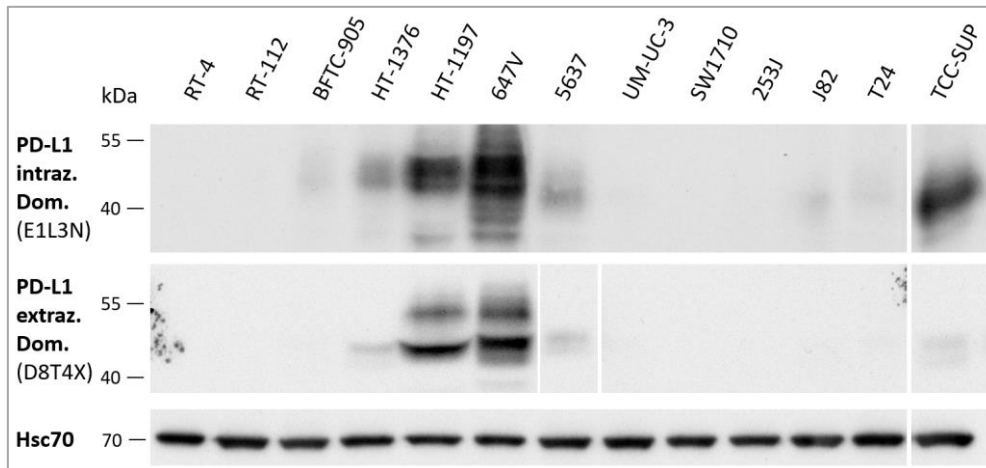


Abbildung 11: Western-Blot-Analyse der PD-L1-Expression in UCB-Zelllinien

Die PD-L1-Expression von UCB-Zelllinien (RIPA-Lysate, 20 µg Protein) wurde mittels Western-Blot-Analyse mit dem Antikörper-Klon E1L3N sowie zum Vergleich mit dem gegen die extrazelluläre Domäne gerichteten Antikörper-Klon D8T4X (AlexaFluor647-Konjugat) analysiert. Die Detektion von Hsc70 diente als Kontrolle für die Beladung mit gleichen Proteinmengen.

Die 13 UCB-Zelllinien unterschieden sich im PD-L1-Expressionsniveau, wobei 647V die stärkste PD-L1-Expression aufwies (Abbildung 11). Dieses Ergebnis wurde mit beiden Antikörperklonen (E1L3N und D8T4X) erzielt, wodurch die Spezifität der Antikörper bestätigt wurde. Bei vergleichbarer Antikörper-Konzentration war die Intensität der Proteinbanden jedoch bei Einsatz des Antikörper-Klons E1L3N stärker als bei Detektion mit dem Klon D8T4X. Daher wird nachfolgend die Expression von PD-L1 standardmäßig mit dem Antikörper-Klon E1L3N nachgewiesen. Zur eindeutigen Bestimmung des relativen PD-L1-Expressionsniveaus in TCC-SUP, welches in der Western-Blot-Analyse mit den beiden Antikörper-Klonen unterschiedlich war, könnte eine zusätzliche Fluoreszenzfärbung der Zellen durchgeführt werden.

Zur *in situ*-Detektion von PD-L1 in Tumorzellen wurde außerdem ein Immunfluoreszenz (IF) - Protokoll (2.4.5) mit dem Antikörper-Klon E1L3N etabliert. Abbildung 12 veranschaulicht die erwartete starke PD-L1-Expression der Zelllinie 647V (Abbildung 11) sowie PD-L1-Negativität in Zellen der Zelllinie RT112.

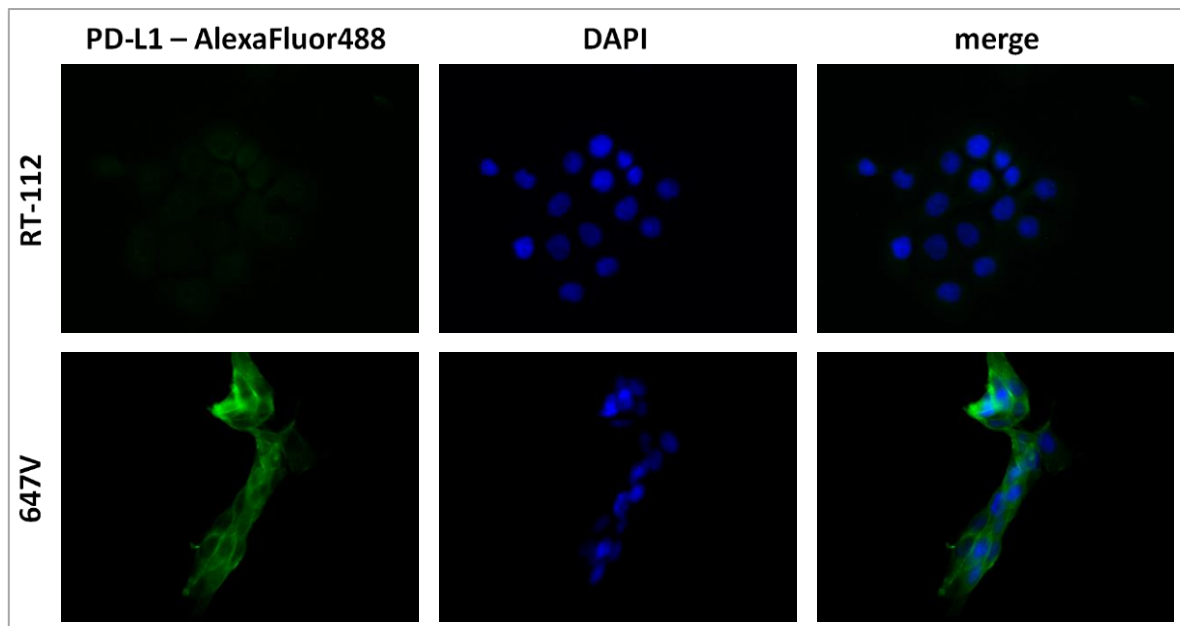


Abbildung 12: Detektion der PD-L1-Expression durch Immunfluoreszenz (Antikörper-Klon E1L3N)

Auf *chamber slides* gewachsene RT-112- und 647V-Zellen wurden über Nacht bei 4°C mit dem anti-PD-L1-Antikörper (Klon E1L3N, 1:100 in 10% AB-Serum) inkubiert, welcher mit AlexaFluor488-konjugiertem Sekundärantikörper (1:200 in PBS) detektiert wurde. Die Zellkerne wurden mit DAPI visualisiert.

Des Weiteren wurde ein Protokoll zur Analyse von relativen PD-L1-Genexpressionsunterschieden (Gen: *CD274*) mittels qRT-PCR (2.3.16) etabliert. Hierzu wurde zunächst die cDNA-Synthese (2.3.14) unter Einsatz von Oligo(dT)₁₈-Primern und Random-Hexamer-Primern verglichen. Die nachfolgende Analyse der PCR-Produkte im Agarosegel ergab keinen Unterschied in der Intensität der PD-L1-spezifischen Banden zwischen beiden Primern. Die Verwendung von Random-Hexamer-Primern wurde als Standard für die cDNA-Synthese ausgewählt, um einer unvollständigen Transkription von langen Nukleotidsequenzen vorzubeugen. Gleichzeitig wurden drei Primerpaare für das PD-L1-Transkript („PD-L1 A, B, C for/rev“) verglichen. Alle drei Paare wurden zur spezifischen Amplifikation von PD-L1-mRNA der Varianten 1 und 2 designt. Das Primerpaar „PD-L1 C for/rev“ wurde jedoch aufgrund der stärksten Bandenintensität und der in Relation zum Referenzgen β -Actin gleichen Produktgröße (beide 97 bp) ausgewählt. Über eine Temperaturgradienten-PCR wurde eine optimale Annealing-Temperatur von 59°C ermittelt. Schließlich wurde β -Actin mit GAPDH, RPLP0 und Hsc70 als alternative Referenzgene verglichen, wobei innerhalb von Proben derselben Zelllinie die stabilsten c_t -Werte mit β -Actin erzielt wurden, sodass die Expression des β -Actin-Gens als Standard zur Normalisierung der Zielgene gewählt wurde. Mit dem etablierten Protokoll wurde die relative PD-L1-mRNA-Expression der UCB-Zelllinien mittels qRT-PCR analysiert. Abbildung 13 zeigt den Vergleich der Protein- mit der relativen mRNA-Produktion der Zelllinien.

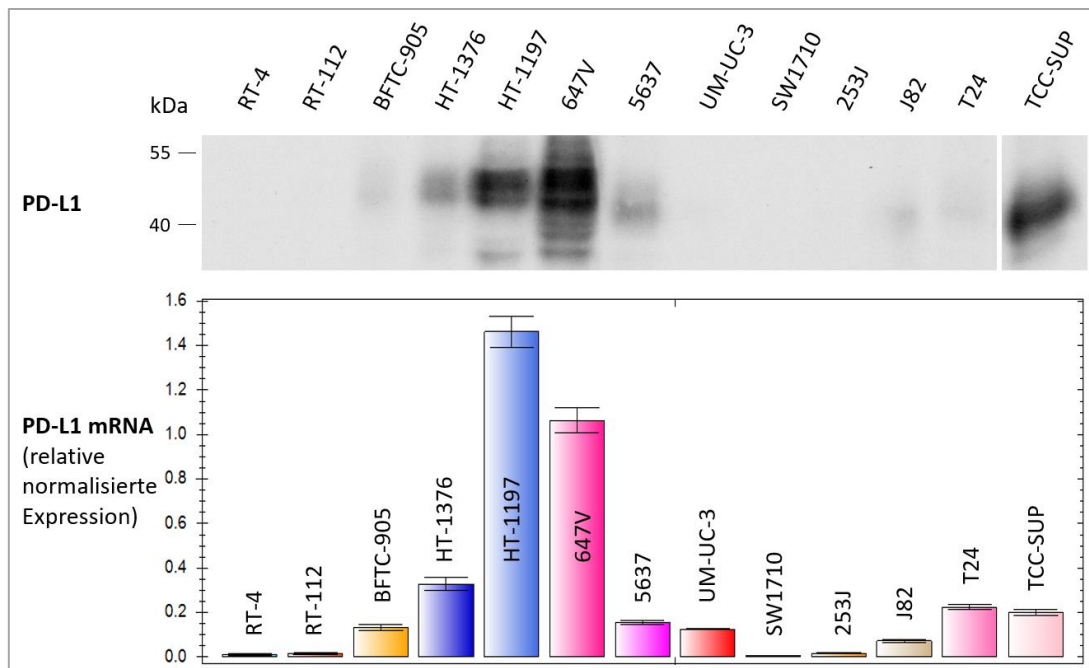


Abbildung 13: Vergleich der relativen PD-L1-Protein- und -mRNA-Expression

Die PD-L1-Proteinexpression von 13 UCB-Zelllinien (siehe Abbildung 11) wurde verglichen mit der mittels qRT-PCR analysierten relativen PD-L1-Genexpression (Primer: PD-L1 C for/rev), welche auf die Expression des β -Actin-Gens normalisiert wurde.

Die für die UCB-Zelllinien auf Transkriptebene ermittelten Unterschiede in der PD-L1-Genexpression entsprachen weitgehend denen der Proteinexpression. So waren beispielsweise in RT-4, RT-112, SW1710 und 253J keine oder nur geringe Mengen von PD-L1-mRNA und -Protein zu detektieren, während HT-1197 und 647V starke Expression zeigten. Abweichungen fanden sich zum Beispiel bei der Zelllinie TCC-SUP, in welcher verglichen mit der Transkriptmenge viel Protein detektiert wurde. Andererseits war die ermittelte Proteinmenge für HT-1197 und UM-UC-3 geringer als aufgrund der relativen Transkriptmenge erwartet.

Die detektierten Unterschiede in der PD-L1-Genexpression betrafen die Transkriptvarianten 1 + 2 in Kombination. Eine Auswahl der UCB-Zelllinien (RT-4, RT-112, HT-1376, HT-1197, 647V, 5637, UM-UC-3, J82, T24 und TCC-SUP) wurde ebenfalls auf die Varianten 1 + 4 in Kombination sowie auf die Variante 2 untersucht. Das Designen von Primern zur unabhängigen Detektion von Variante 1 war aufgrund zu starker Überlappung mit den anderen Isoformen nicht möglich. Während in den Western-Blot-Analysen ausschließlich die größte Isoform 1 des Proteins nachgewiesen wurde (keine zusätzlichen Banden mit geringerem Molekulargewicht), konnten mittels qRT-PCR unterschiedliche Transkriptvarianten detektiert werden. Variante 2 war hierbei jedoch durch sehr schwache Expression gekennzeichnet. Das Expressionsniveau der unterschiedlichen Transkriptvarianten korrelierte miteinander (Abbildung 14).

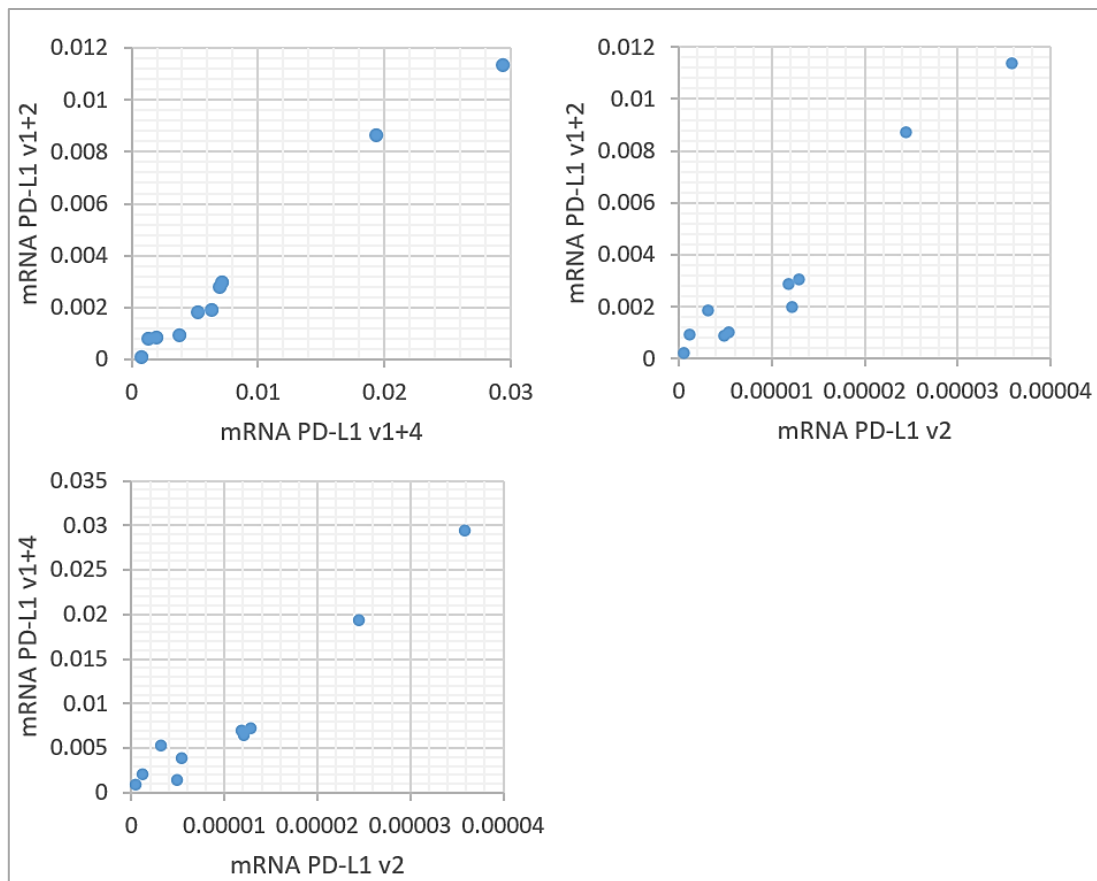


Abbildung 14: Korrelation der relativen Expression von PD-L1-Transkriptvarianten

Die relative Expression der PD-L1-Transkriptvarianten v1+2 in Kombination (Primer: PD-L1 C for/rev), v1+4 in Kombination (Primer: PD-L1 v1+4 for/rev) und v2 (Primer: PD-L1 v2 for/rev) wurden mittels qRT-PCR in 10 UCB-Zelllinien analysiert, auf die Genexpression von β -Actin normalisiert und in Abhängigkeit voneinander dargestellt.

3.2.2 Einteilung von UCB-Zelllinien aufgrund ihrer epithelialen und mesenchymalen Eigenschaften

In der Literatur wird die PD-L1-Expression in unterschiedlichen Tumorentitäten mit der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) in Zusammenhang gebracht [63]. Es gibt sowohl Angaben darüber, dass die EMT in Mamma- und nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen zur erhöhten PD-L1-Expression beiträgt [61, 62] als auch Berichte, die postulieren, dass erhöhte PD-L1-Expression im Mamma-, Ösophagus- und Nierenzellkarzinom sogar EMT bedingt [88, 116, 118]. Untersuchungen über einen möglichen Zusammenhang zwischen EMT und PD-L1-Expression in UCB-Zelllinien liegen bisher nicht vor. Deshalb wurde die Frage, ob auch beim Harnblasenkarzinom eine Assoziation zwischen EMT und PD-L1-Expression nachzuweisen ist, untersucht. Zunächst einmal wurden dafür die 13 UCB-Zelllinien auf die Expression verschiedener epithelialer und mesenchymaler Eigenschaften analysiert. Western-Blot-Analysen typischer EMT-assoziiierter Proteine im Vergleich mit der PD-L1-Expression sind in Abbildung 15 dargestellt.

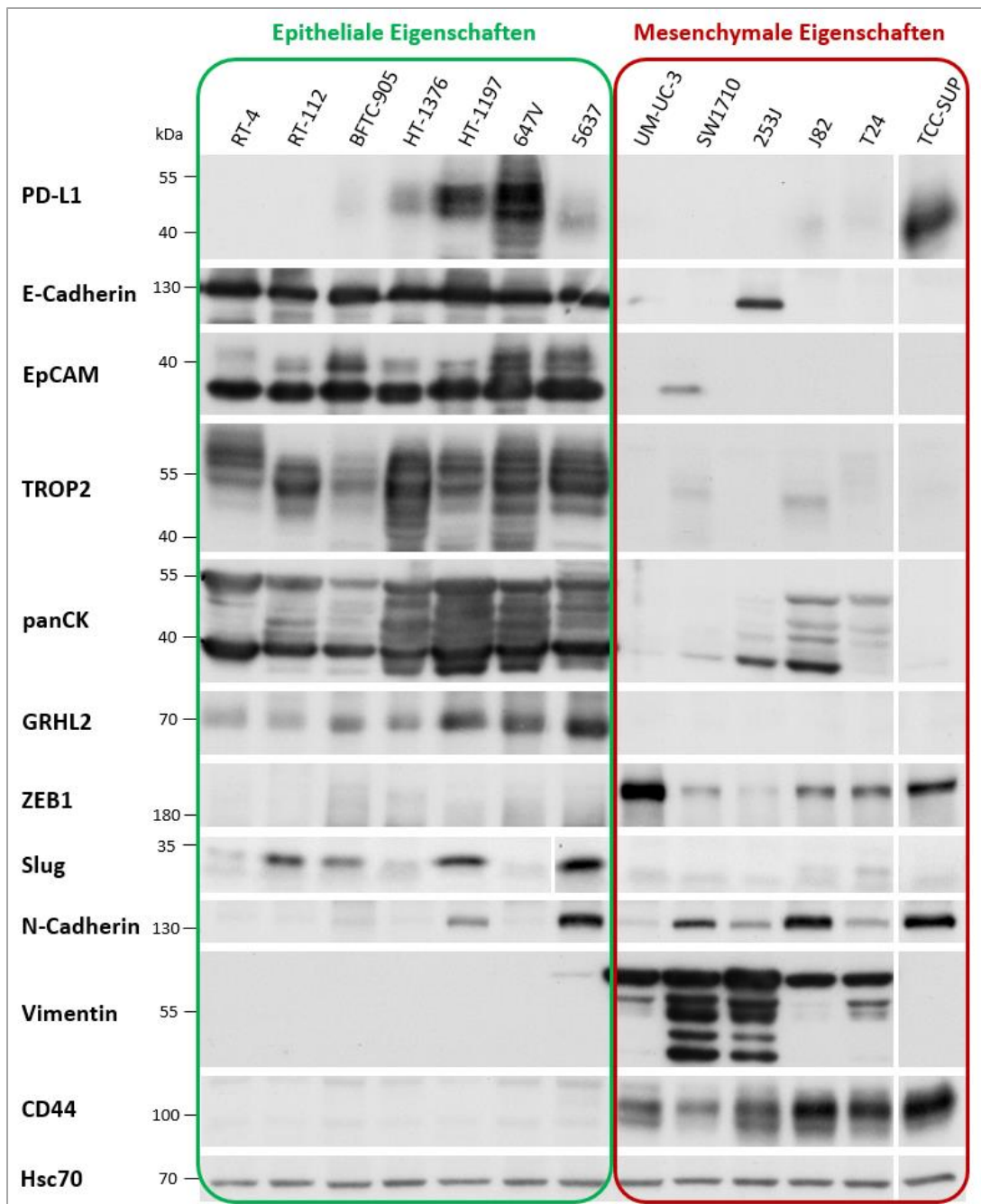


Abbildung 15: Western-Blot-Analyse der Expression von EMT-indikativen Proteinen in UCB-Zelllinien

Die Expression von PD-L1 und EMT-assoziierten Proteinen in UCB-Zelllinien (RIPA-Lysate, 20 µg Protein) wurde mittels Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen PD-L1, E-Cadherin, EpCAM, TROP2, panKeratine (Antikörper-Klone AE1/AE3), GRHL2, ZEB1, Slug, N-Cadherin, Vimentin und CD44 analysiert. Die Detektion von Hsc70 diente als Kontrolle für die Beladung mit gleichen Proteinmengen.

Anhand der epithelialen Marker E-Cadherin, EpCAM, TROP2, Keratin und GRHL2 sowie der mesenchymalen Marker ZEB1, N-Cadherin und Vimentin sowie des Stammzellmarkers CD44 konnten die 13 UCB-Zelllinien in sieben Zelllinien mit überwiegend epithelialen Eigenschaften (RT-4, RT-112, BFTC-905, HT-1376, HT-1197, 647V und 5637) und sechs Zelllinien mit stärker mesenchymalen Eigenschaften (UM-UC-3, SW1710, 253J, J82, T24 und TCC-SUP) eingeteilt werden. Epitheliale Eigenschaften werden fortan mit EL (*epithelial-like*) und mesenchymale

Eigenschaften mit ML (*mesenchymal-like*) bezeichnet. Interessanterweise konnte die Expression des eher mit mesenchymalen Eigenschaften assoziierten Transkriptionsfaktors Slug [96] den ML-Zelllinien nicht zugeordnet werden. Die Zelllinien 5637 (Expression von epithelialen Markern sowie N-Cadherin und Vimentin), SW1710 (Expression von mesenchymalen Markern und EpCAM), 253J (Expression von mesenchymalen Markern sowie E-Cadherin und Keratinen), und J82 (Expression von mesenchymalen Markern und Keratinen) zeigten einen zum Teil intermediären Phänotyp. In beiden Gruppen (EL und ML) fanden sich PD-L1-exprimierende und PD-L1-negative Zelllinien, sodass keine eindeutige Assoziation der PD-L1-Expression mit ausschließlich epithelialen oder mesenchymalen Proteinen festgestellt werden konnte.

Zur Einteilung der Zelllinien wurde außerdem ihre Morphologie herangezogen, welche durchlichtmikroskopisch analysiert wurde und in Abbildung 16 dargestellt ist.

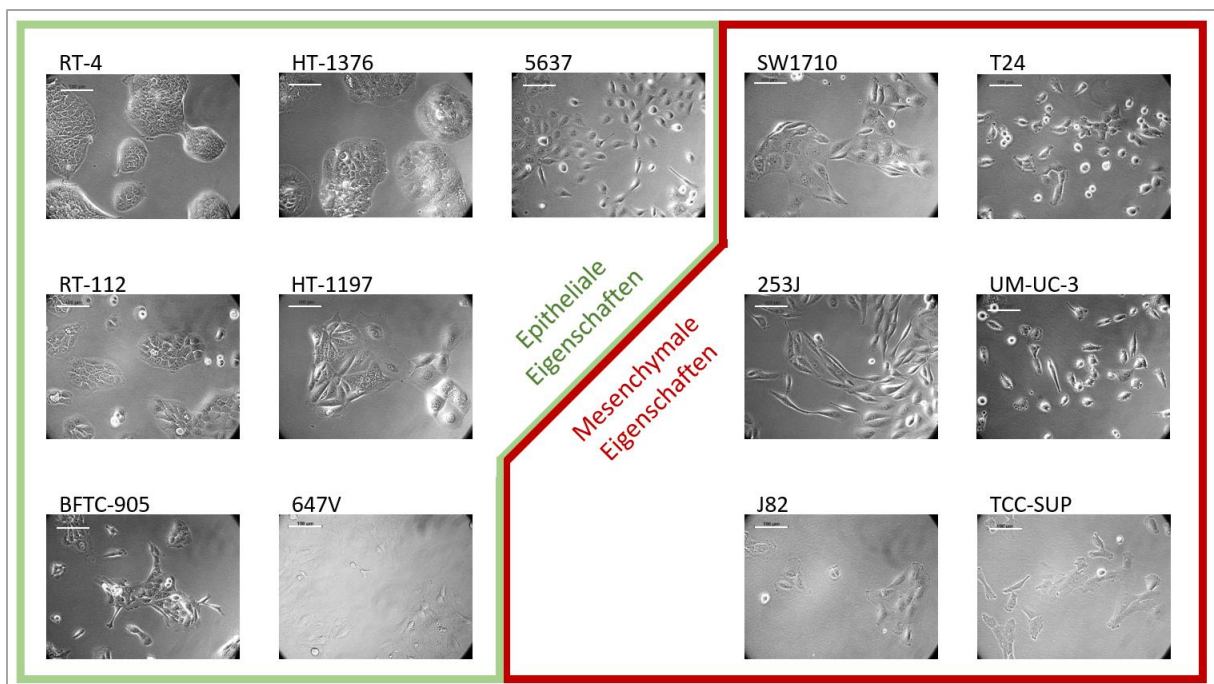


Abbildung 16: Morphologie der UCB-Zelllinien

Die Morphologie der 13 UCB-Zelllinien in Zellkulturflaschen wurde durchlichtmikroskopisch mit 32-facher Vergrößerung dokumentiert. Die Maßstabskala entspricht 100 µm.

Die anhand ihrer Proteinexpression dem EL-Phänotyp zugeordneten Zelllinien präsentierten sich hauptsächlich in Zellverbänden und wuchsen zum Teil in klar abgegrenzten, inselförmigen Strukturen. Die ML-Zelllinien hingegen hatten eine eher undifferenzierte und spindelförmige Morphologie und bildeten deutlich weniger Zell-Zell-Kontakte aus. Die intermediäre Zelllinie 5637 wies eher rundliche und somit zum EL-Phänotyp passende Zellen auf, die jedoch dem ML-Phänotyp entsprechend relativ unabhängig voneinander wuchsen.

Da auch von Tan *et al.* eine Einteilung von UCB-Zelllinien gemäß ihrer epithelialen und mesenchymalen Eigenschaften vorgenommen wurde [146], wurde diese zum Vergleich

herangezogen und ebenfalls bezüglich einer Assoziation mit der Expression von PD-L1 untersucht (Abbildung 17).

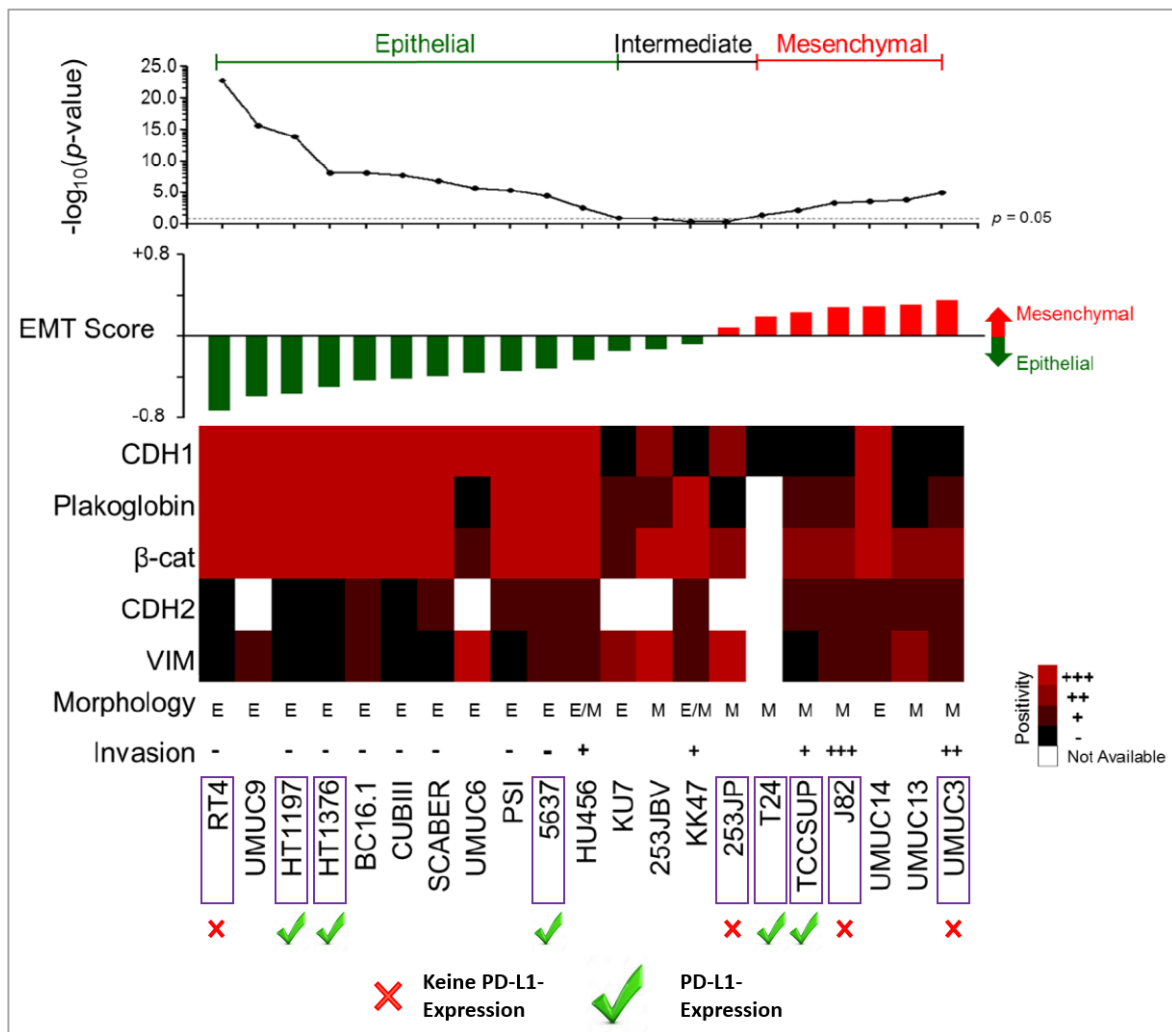


Abbildung 17: Keine Korrelation der PD-L1-Expression mit epithelialen und mesenchymalen Eigenschaften (Abbildung nach Tan *et al.* modifiziert)

Eine Einteilung von UCB-Zelllinien in „epithelial“, „intermediate“ und „mesenchymal“ wurde von Tan *et al.* anhand eines aus Genexpressionen aus Datenbanken (BLA-40, CCLE) errechneten, UCB-spezifischen EMT-scores vorgenommen. Das Punktdiagramm zeigt den $-\log_{10}$ p-Wert des Kolmogorov-Smirnov-Tests. Zur Definition der Zelllinien als „epithelial“, „intermediate“ und „mesenchymal“ wurde ein Schwellenwert von $p < 0,05$ festgelegt. Außerdem wurden eine Immunfluoreszenz-Analyse von EMT-indikativen Proteinen, die Zellmorphologie sowie das Invasionsverhalten eingeschlossen [146]. In der vorliegenden Arbeit untersuchte Zelllinien wurden hervorgehoben und die Expression von PD-L1 wurde auf Basis der Western-Blot-Analysen (3.2.1, rote und grüne Symbole) angegeben. 253JP = parentale 253J

Die Zuordnung der UCB-Zelllinien aufgrund epithelialer und mesenchymaler Eigenschaften durch Tan *et al.* stimmte mit der im Promotionsprojekt vorgenommenen Einteilung weitestgehend überein. Eine eindeutige Assoziation des berechneten, UCB-spezifischen EMT-scores mit der PD-L1-Expression bestand jedoch nicht. Sowohl in der Zelllinie mit dem am stärksten epithelialen Phänotyp, also geringsten EMT-Score (RT-4), als auch in der mit dem höchsten EMT-score (UM-UC-3) wurde keine PD-L1-Expression detektiert.

Zusammenfassend konnte die PD-L1-Expression in den 13 analysierten UCB-Zelllinien weder über die Expression von EMT-indikativen Proteinen noch über die Morphologie eindeutig mit den epithelialen oder mesenchymalen Eigenschaften assoziiert werden.

3.2.3 Untersuchung der PD-L1-Expression von UCB-Zelllinien in Korrelation zum molekularen Subtyp

Es gibt verschiedene Einteilungen von UCB-Tumoren und -Zelllinien in molekulare Subtypen, die auf Mutationsprofilen und auf der Genexpression definierter Marker basieren [78, 81, 147, 148]. So definierten beispielsweise Warrick *et al.* für das UCB die Subtypen „Luminal“, „Basal“ und „Kein Typ“ und nahmen eine Einteilung der Zelllinien in diese Subtypen vor [82]. Die „heatmap“-Darstellung der mRNA (modifiziert aus [82]) mit Angaben zur mittels Western-Blot-Analyse ermittelten PD-L1-Expression ist in Abbildung 18 zu sehen.

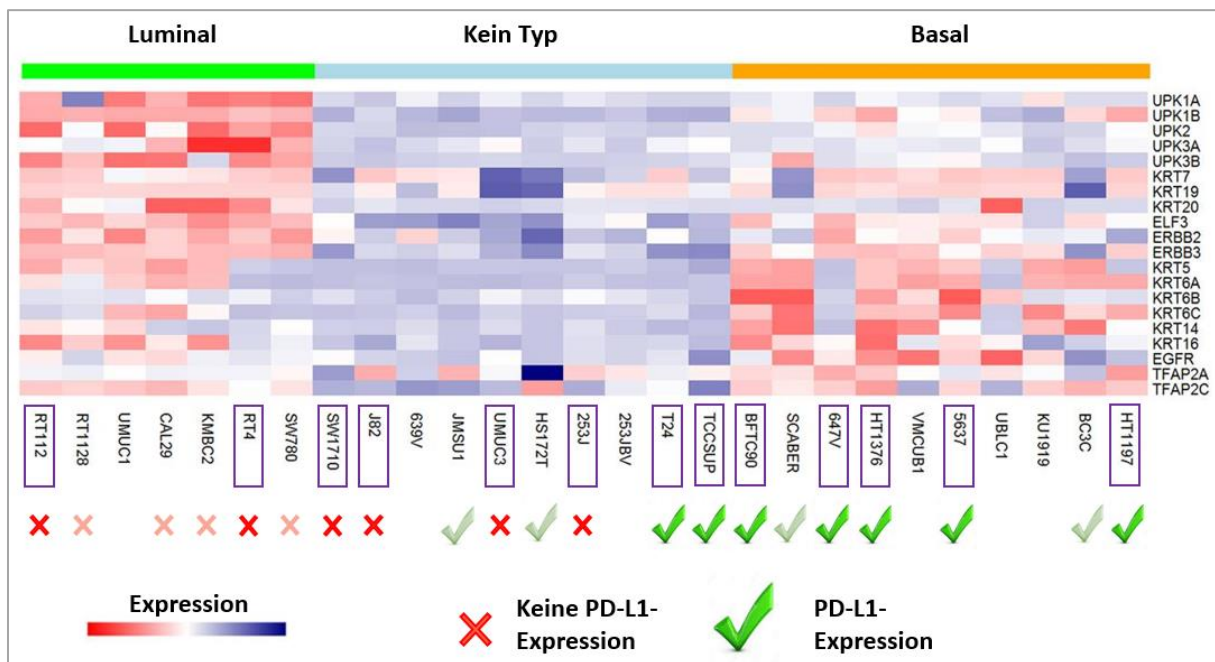


Abbildung 18: Korrelation der PD-L1-Expression mit den Subtypen der UCB-Zelllinien (Abbildung modifiziert nach Warrick *et al.*)

Eine Einteilung von UCB-Zelllinien in die Subtypen „Luminal“, „Basal“ und „Kein Typ“ wurde von Warrick *et al.* anhand der Expression ausgewählter Gene vorgenommen. Hierzu wurden Daten aus der „Cancer Cell Line Encyclopedia“ [149] mit agglomerativen Methoden ausgewertet [82]. In der vorliegenden Arbeit untersuchte Zelllinien wurden hervorgehoben und die Expression von PD-L1 wurde auf Basis der Western-Blot-Analysen (3.2.1, intensive rote und grüne Färbung) angegeben. Die Angaben für nicht verfügbare Zelllinien wurden mit Daten der Plattform „Oncomine“ (blasse rote und grüne Färbung) ergänzt, sofern vorhanden.

Die Einteilung der UCB-Zelllinien aufgrund ihres molekularen Subtyps stand im Bezug zu ihren epithelialen und mesenchymalen Eigenschaften (vgl. 3.2.2). Während die EL-Zelllinien in die Subtypen „Luminal“ und „Basal“ eingeteilt wurden, entsprachen die ML-Zelllinien dem von Warrick *et al.* definierten Subtyp „Kein Typ“. Während PD-L1-Expression in keiner der als

luminal definierten Zelllinien detektiert wurde, exprimierten alle dem basalen Subtyp zugeordneten Zelllinien PD-L1. Innerhalb des Subtyps „Kein Typ“ wurden sowohl PD-L1-positive als auch -negative Zelllinien identifiziert. Die PD-L1-Expression von UCB-Zelllinien korrelierte demnach vorrangig mit dem basalen Subtyp.

Die durch Warrick *et al.* vorgenommene Einteilung der Zelllinien wurde mit der Proteinexpression ausgewählter Keratine verglichen (Abbildung 19).

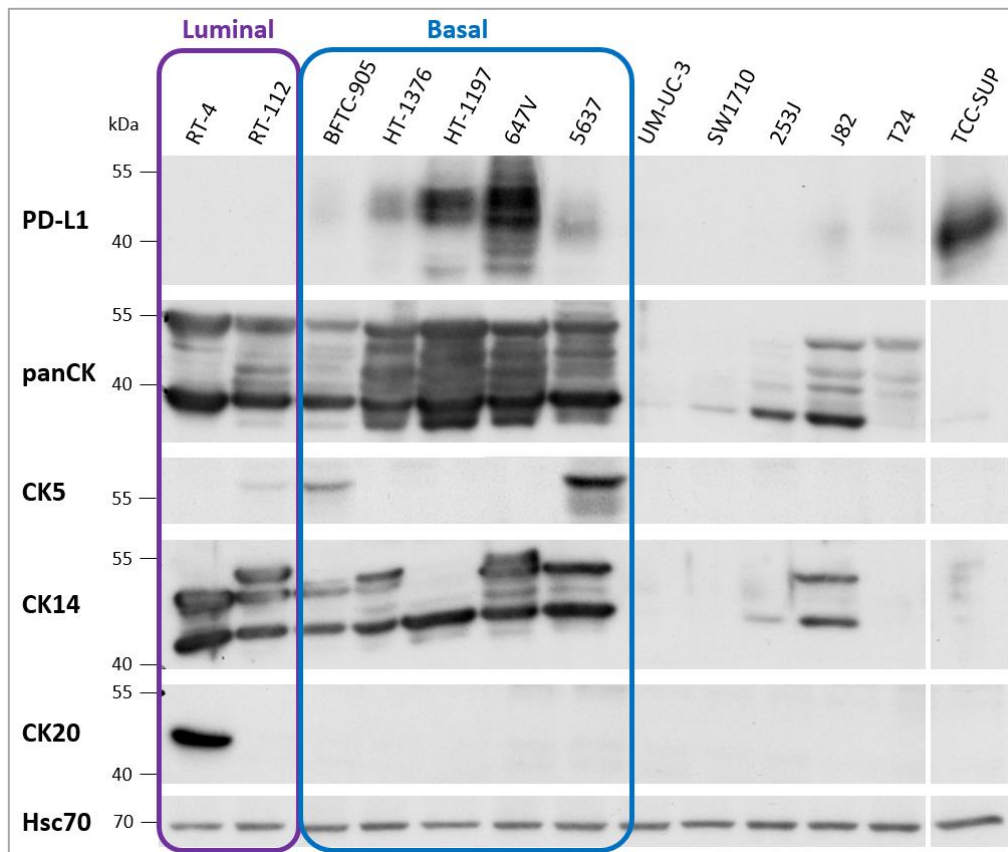


Abbildung 19: Western-Blot-Analyse der Keratin-Expression in UCB-Zelllinien

Die Expression von PD-L1 und Keratinen (CK, *cytokeratins*) in UCB-Zelllinien (RIPA-Lysate, 20 µg Protein) wurde mittels Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen PD-L1, panKeratine, Keratin 5, 14 und 20 analysiert. Die Detektion von Hsc70 diente als Kontrolle für die Beladung mit gleichen Proteinmengen.

Sowohl die als luminal als auch die als basal definierten Zelllinien waren gekennzeichnet durch eine starke Keratin-Expression, wodurch sie sich von den Zelllinien des Subtyps „Kein Typ“ unterschieden. Da die Keratine 5 und 14 eher mit dem basalen und Keratin 20 mit dem luminalen Subtyp assoziiert sind [82], wurden diese exemplarisch in den vorhandenen UCB-Zelllinien analysiert. Die Western-Blot-Analyse zeigte, dass diese Expressionsmuster jedoch nicht zur verlässlichen Identifikation des Subtyps ausreichten. Anders als aus den mRNA-basierten Daten von Warrick *et al.* zu erwarten (Abbildung 18), wurde im vorliegenden RT-112-Zellklon keine Expression von Keratin 20 nachgewiesen. Auch die Western-Blot-Analyse

der mit dem luminalen Subtyp assoziierten Keratine 8, 18 und 19 (nicht abgebildet) ließ keine Unterscheidung zwischen luminalen und basalen Zelllinien zu.

Im nächsten Schritt sollte deshalb die Genexpression von Uroplakinen als Unterscheidungsmerkmal für luminalen und basalen UCB-Zellen untersucht werden (Abbildung 20).

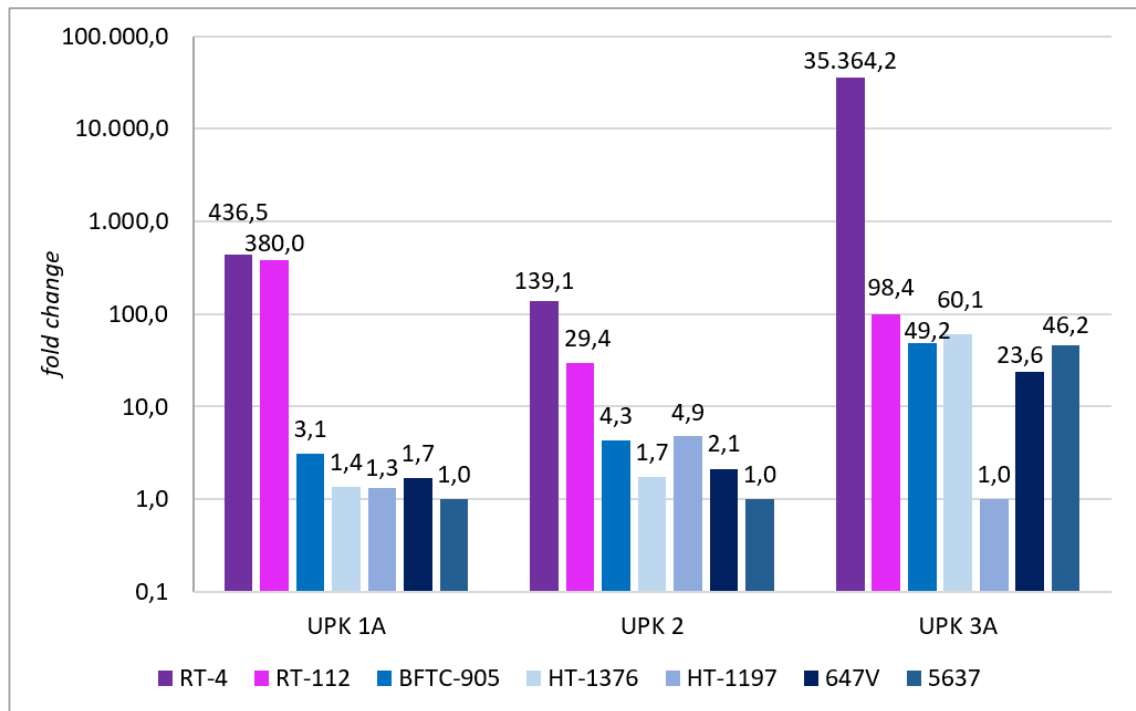


Abbildung 20: Genexpression der Uroplakine 1A, 2 und 3A in luminalen und basalen UCB-Zelllinien

Mittels qRT-PCR wurde die mRNA-Expression von Uroplakin 1A, 2 und 3A bestimmt (Primer: UPK 1A for/rev, UPK 2 for/rev, UPK 3A for/rev) und auf die Transkription von β -Actin normalisiert. Dargestellt ist die Änderung (*fold change*) der relativen Transkriptmenge bezogen auf die Zelllinie mit der jeweils geringsten Expression.

Durch die erhöhte Genexpression der Uroplakine 1A, 2 und 3A wurden die luminalen Zelllinien RT-4 und RT-112 eindeutig von den basalen Zelllinien BFTC-905, HT-1376, HT-1197, 647V und 5637 unterschieden. Hierbei wiesen die RT-4-Zellen eine noch stärkere Uroplakin-Expression auf als die RT-112-Zellen. Für das vorliegende Zelllinien-Set war die Uroplakin 1A-Expression am besten geeignet, um zwischen luminalen und basalem Subtyp zu differenzieren.

Zusammenfassend ist in UCB-Zelllinien die PD-L1-Expression mit einem basalen Subtyp assoziiert, während PD-L1 in luminalen Zellen nicht detektierbar ist. Eine Subtypen-Zuordnung kann nicht anhand der Proteinexpression von Keratinen, jedoch anhand der Genexpression von Uroplakinen vorgenommen werden.

3.2.4 Nachweis der Expression ausgewählter Proteine in UCB-Zelllinien

Um herauszufinden, ob die PD-L1-Expression in UCB-Zelllinien mit der Expression und Aktivierung ausgewählter Proteine assoziiert ist, wurden Western-Blot-Analysen für die entsprechenden Proteine durchgeführt. Da die Expression des Haupthistokompatibilitäts-

komplexes Klasse I (MHC I, *major histocompatibility complex*, oder menschliches Leukozytenantigen Klasse I, HLA Klasse I, *human leukocyte antigen*) mit der Expression von PD-L1 und dem Ansprechen von PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoint-Therapien im Ovarial- und Bronchialkarzinom in Verbindung gebracht wurde [37, 150], wurde zunächst die MHC I-Expression in den UCB-Zelllinien analysiert (Abbildung 21). Obwohl die MHC I-Expression in den Zelllinien ebenfalls variierte, konnte nicht in allen Zelllinien eine Korrelation mit der PD-L1-Expression festgestellt werden.

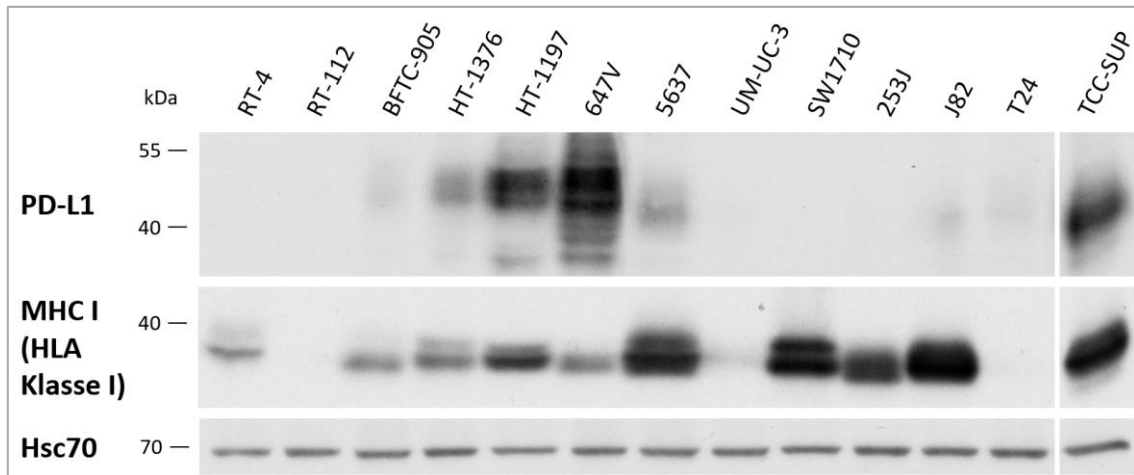


Abbildung 21: Western-Blot-Analyse der MHC I-Expression in UCB-Zelllinien

Die Expression von PD-L1 und MHC I in UCB-Zelllinien (RIPA-Lysate, 20 µg Protein) wurde mittels Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen PD-L1 und MHC I analysiert. Die Detektion von Hsc70 diente als Kontrolle für die Beladung mit gleichen Proteinmengen.

Weiterführend wurden die Zelllinien auf die Expression und Phosphorylierung ausgewählter Proteine, die Rückschlüsse auf die Aktivität an der Regulation der PD-L1-Expression potenziell beteiligter Signaltransduktionswege zulassen, untersucht. Die Ergebnisse der Western-Blot-Analysen sind in Abbildung 22 dargestellt.

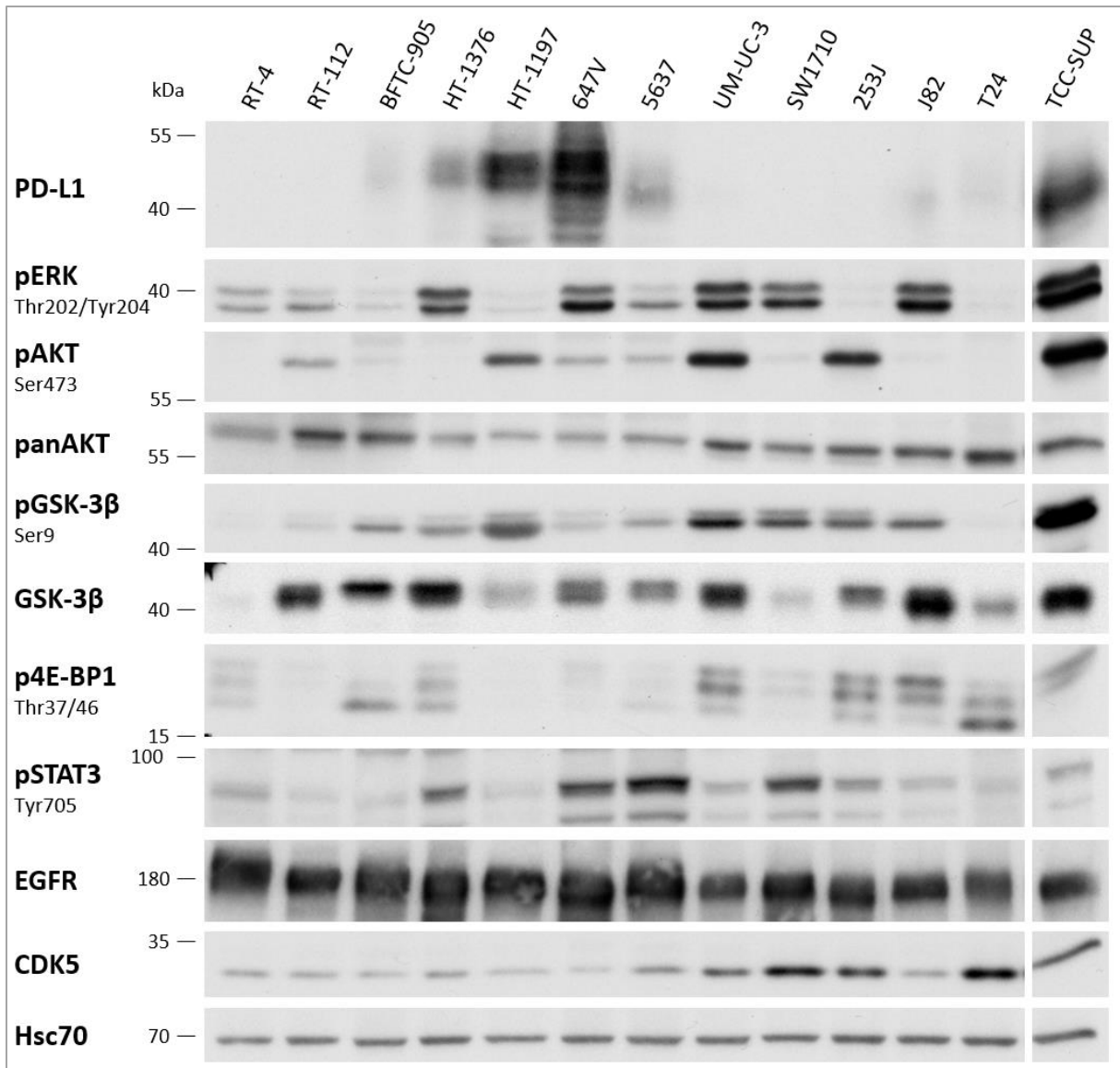


Abbildung 22: Western-Blot-Analysen ausgewählter nicht-phosphorylierter und phosphorylierter Proteine in UCB-Zelllinien

UCB-Zelllinien (RIPA-Lysate, 20 µg Protein) wurden mittels Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen PD-L1, pERK, pAKT, panAKT, pGSK-3β, GSK-3β, p4E-BP1, pSTAT3, EGFR und CDK5 analysiert. Die Detektion von Hsc70 diente als Kontrolle für die Beladung mit gleichen Proteinnengen.

Die 13 UCB-Zelllinien wiesen sehr unterschiedliche Muster bezüglich der Expression und Phosphorylierung der ausgewählten Proteine auf. Um einen ersten Eindruck darüber zu gewinnen, ob die PD-L1-Expression in allen UCB-Zelllinien durch einen der bereits in der Literatur beschriebenen Signaltransduktionswege reguliert wird, wurde die PD-L1-Expression mit den Mengen phosphorylierter ERK, AKT, GSK-3β, 4E-BP1 (als Indikator für den mTOR-Signalweg) und STAT3 korreliert [45, 46]. Außerdem wurde die Expression der Kinase CDK5 und des EGF-Rezeptors (EGFR) untersucht [66, 151]. Es konnte jedoch keine generelle Assoziation der Intensität der PD-L1-Expression mit einem der analysierten Marker identifiziert werden. Auffällig ist allerdings, dass in RT-4 deutlich geringere Mengen phosphorylierter Kinasen nachgewiesen wurden als in den restlichen Zelllinien. In TCC-SUP

hingegen ließen die erhöhten Mengen von phosphoryliertem ERK, AKT und GSK-3 β auf eine verstärkte Aktivität der entsprechenden Signaltransduktionswege schließen. EGFR-Protein wurde in allen 13 Zelllinien detektiert, wobei die Expression in EL-Zelllinien etwas stärker war als in ML-Zelllinien (vgl. 3.2.2).

3.3 Einfluss des Zytokins IFN γ auf die Expression von PD-L1

Nachfolgend sollte untersucht werden, ob die basale PD-L1-Expression der UCB-Zelllinien durch extrinsische Faktoren beeinflusst werden kann und ob auch PD-L1-negative Zellen zur PD-L1-Expression angeregt werden können. In der Literatur wurde für Zelllinien verschiedener Tumorentitäten bei Stimulation mit Interferon gamma (IFN γ) ein Anstieg der Expression von PD-L1 sowie des zweiten PD-1-Liganden, PD-L2, beschrieben [40, 51, 52, 152]. Dieser basierte auf einer verstärkten Phosphorylierung von STAT1 und einer erhöhten Expression des Transkriptionsfaktors IRF1 [51, 52]. Zur Analyse der Effekte von IFN γ auf die UCB-Zelllinien wurde eine Auswahl davon mit dem Zytokin behandelt und mittels Western-Blot-Analyse und qRT-PCR untersucht (Abbildung 23). Das Set war so gewählt, dass sowohl EL- (darunter luminale und basale) als auch ML-Zelllinien vertreten waren.

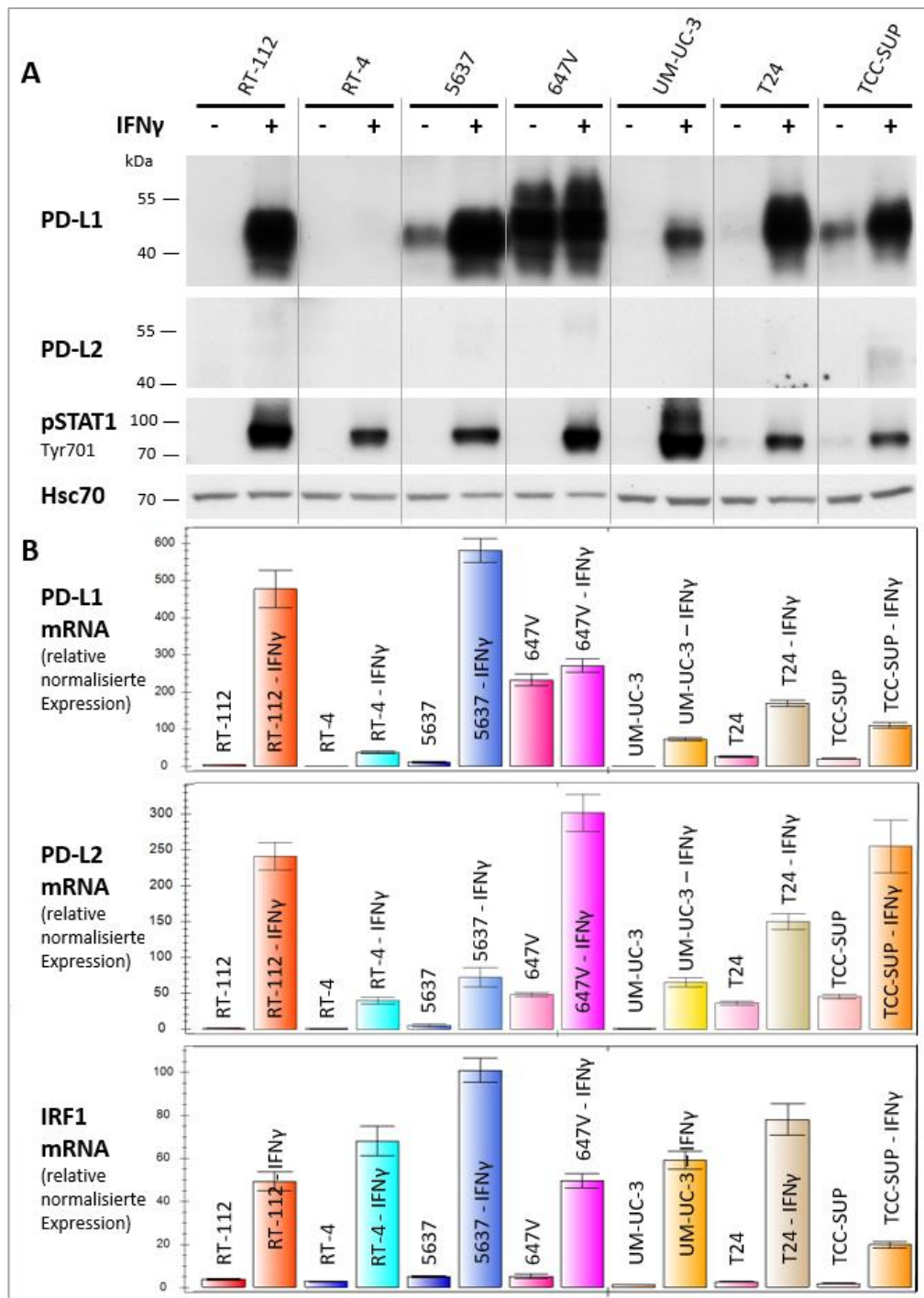


Abbildung 23: Induktion der PD-L1- und PD-L2-Expression in UCB-Zelllinien durch Stimulation mit IFN γ

UCB-Zelllinien wurden mit IFN γ behandelt (200 IU/mL, 48 h) und (A) mittels Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen PD-L1, PD-L2 und pSTAT1 analysiert. Die Detektion von Hsc70 diente als Kontrolle für die Beladung mit gleichen Proteinmengen. (B) Mittels qRT-PCR wurde zusätzlich die mRNA-Expression von PD-L1, PD-L2 und IRF1 bestimmt (Primer: PD-L1 C for/rev, PD-L2 for/rev, IRF1 for/rev) und auf die Transkription von β -Actin normalisiert.

Nach der zweitägigen Stimulation mit IFN γ wurde ein deutlicher Anstieg der PD-L1-Expression in den Zelllinien RT112, 5637, UM-UC-3, T24 und TCC-SUP detektiert. In RT-4 und 647V stieg die PD-L1-Expression nicht oder nur schwach an. Auch die Expression von PD-L2 wurde durch IFN γ induziert und somit überhaupt erst in der Western-Blot-Analyse detektierbar. Die

stärkste Heraufregulation von PD-L2 wurde bei den Zelllinien RT-112, TCC-SUP und, anders als für PD-L1 gezeigt, bei 647V beobachtet. Die jeweiligen Verhältnisse der Transkript- und Proteinmengen korrelierten miteinander, sodass auf eine transkriptionelle Regulation von PD-L1 und PD-L2 geschlossen werden konnte. In allen untersuchten Zelllinien wurden durch die IFN γ -Behandlung eine erhöhte Phosphorylierung von STAT1 sowie ein transkriptioneller Anstieg von IRF1 induziert.

Nachdem gezeigt wurde, dass die PD-L1-Expression nicht mit den epithelialen und mesenchymalen Eigenschaften der UCB-Zelllinien assoziiert ist (3.2.2), wurde anhand der durch IFN γ induzierten PD-L1-Hochregulation untersucht, ob eine erhöhte PD-L1-Expression im umgekehrten Weg mit EMT-Merkmalen in den behandelten Zelllinien (Abbildung 23) korreliert. Die Western-Blot-Analysen von EMT-assoziierten Proteinen sowie der Aktivierung potenziell beteiligter Signalwege in Abhängigkeit von IFN γ sind in Abbildung 24 dargestellt.

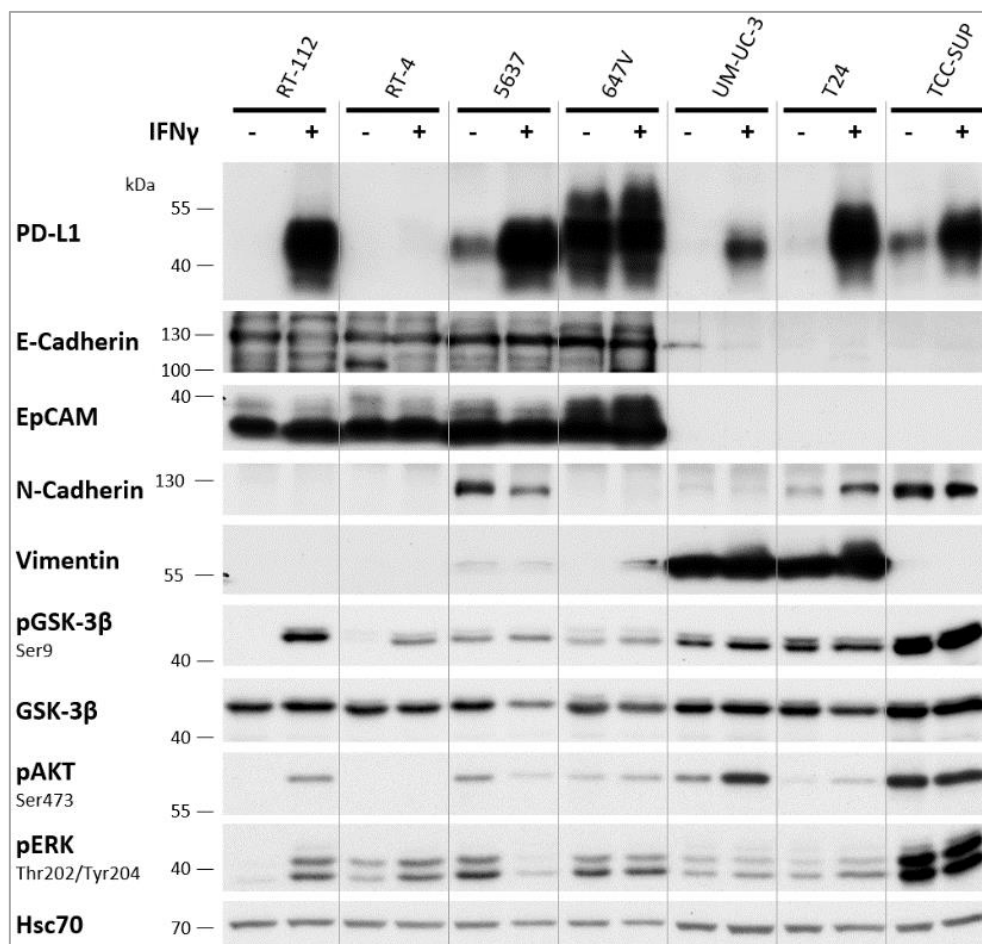


Abbildung 24: Western-Blot-Analyse von EMT-indikativen und phosphorylierten Proteinen nach IFN γ -Stimulation

Sieben UCB-Zelllinien wurden mit IFN γ behandelt (200 IU/mL, 48 h) und mittels Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen PD-L1, E-Cadherin, EpCAM, N-Cadherin, Vimentin, pGSK-3 β , GSK-3 β , pAKT und pERK untersucht. Die Detektion von Hsc70 diente als Kontrolle für die Beladung mit gleichen Proteinmengen. Die vermeintlichen Änderungen der Vimentin-Expression in 647V und der E-Cadherin-Expression in UM-UC-3 waren vermutlich auf die hohe Bandenintensität in den benachbarten Bahnen zurückzuführen.

Die durch IFN γ -Stimulation gesteigerte PD-L1-Expression löste in den untersuchten UCB-Zelllinien nahezu keine Veränderungen, die auf EMT schließen lassen, aus. Lediglich in T24, einer Zelllinie mit bereits ML-Phänotyp, nahm die N-Cadherin- und Vimentin-Expression zu und in UM-UC-3, welche ebenfalls einen ML-Phänotyp aufwies, wurde gleichermaßen eine schwache Zunahme der Vimentin-Expression beobachtet. Die phosphorylierte Form der Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK-3 β) nahm in den luminalen Zelllinien (RT-112 und RT-4) durch IFN γ -Stimulation zu. Gleichzeitig wurde in RT-112 eine stärkere Phosphorylierung von AKT (Proteinkinase B) und ERK (*extracellular signal-regulated kinase*/MAPK) beobachtet. Veränderungen in der Phosphorylierung von AKT und/oder ERK konnten ebenfalls in RT-4, 5637, UM-UC-3 und T24 detektiert werden.

Zusammenfassend wurde durch die Stimulation mit IFN γ die PD-L1-Expression der meisten getesteten UCB-Zelllinien erhöht, wobei sich der Anstieg durch eine erhöhte Transkriptionsrate erklären lässt. Diese wird wahrscheinlich hauptsächlich durch die Transkriptionsfaktoren STAT1 und IRF1 vermittelt. Die verstärkte PD-L1-Expression führte in EL-Zelllinien nicht zu Veränderungen der epithelialen Eigenschaften der Zellen.

3.4 Charakterisierung von UCB-Zelllinien mit experimentell modifizierter PD-L1-Expression

In diesem Teilprojekt sollten einerseits potenzielle Tumorzell-intrinsische und immununabhängige Funktionen von PD-L1 untersucht werden und andererseits sollte der mögliche Einfluss der PD-L1-Expression auf die EMT-Merkmale der Zellen evaluiert werden. Die funktionelle Analyse von PD-L1 im Harnblasenkarzinom erfolgte durch die experimentelle Modifikation der PD-L1-Expression mittels *knockdown* und Überexpression in ausgewählten Zelllinien. Der *knockdown* der PD-L1-Genexpression durch lentiviralen Gentransfer von spezifischen shRNA-Konstrukten (2.2.6) wurde in drei EL-Zelllinien (5637, 647V, HT-1197) sowie zwei ML-Zelllinien (T24, TCC-SUP) mit unterschiedlich starker basaler PD-L1-Expression vorgenommen. Zu diesem Zweck wurden in Vorversuchen mit 5637-Zellen aus vier Expressionsplasmiden (shRNAs #1-4) die shRNAs #1 und #2 für weitere Experimente ausgewählt, da diese in der Western-Blot-Analyse den stärksten PD-L1-*knockdown* zeigten. Die mittels retroviralem Gentransfer (2.2.5) vermittelte Überexpression von PD-L1 wurde in drei Zelllinien mit EL-Phänotyp (RT-112, BFTC-905, 5637) sowie einer mit ML-Phänotyp (UM-UC-3) durchgeführt.

3.4.1 Charakterisierung von *epithelial-like* Zelllinien mit PD-L1-*knockdown*

In den EL-Zelllinien 5637, 647V und HT-1197 wurde ein shRNA-vermittelter, schwacher PD-L1-*knockdown* (PD-L1-kd) mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen (Abbildung 25A). Die Restexpression von PD-L1 betrug je nach Zelllinie und verwendeter shRNA zwischen 38% und 98%. Trotz erfolgreicher Selektion der manipulierten Zellen über den Selektionsmarker Puromycin war der *knockdown* nicht stabil und die PD-L1-Expression erreichte nach einigen Passagen (ca. 5 – 12) der Zellen wieder das Ausgangsniveau. In der Analyse ausgewählter EMT-indikativer Proteine ließ sich keine PD-L1-bedingte Veränderung feststellen, was auf Grund des ohnehin EL-Phänotyps der Zelllinien nicht überraschend war. Während durch den PD-L1-kd die Proteinmenge an phosphoryliertem ERK nicht beeinflusst war, war die Proteinmenge an phosphoryliertem AKT in HT-1197-shPD-L1 erhöht und in 647V-shPD-L1 erniedrigt (Abbildung 25A).

Da bei der Kultivierung der Zelllinien mit PD-L1-kd eine verlangsamte Wachstumsgeschwindigkeit beobachtet wurde, sollte die Zellproliferation anhand eines Proliferationsassays (2.2.7) untersucht werden (Abbildung 25B). Die auf diese Weise in 647V und HT-1197 festgestellte verringerte Zellproliferation konnte in 5637 nur bedingt gezeigt werden und glich sich in allen drei Zelllinien in Assoziation mit der PD-L1-Expression nach einigen Passagen (ca. 5 – 12) wieder dem Ausgangszustand an.

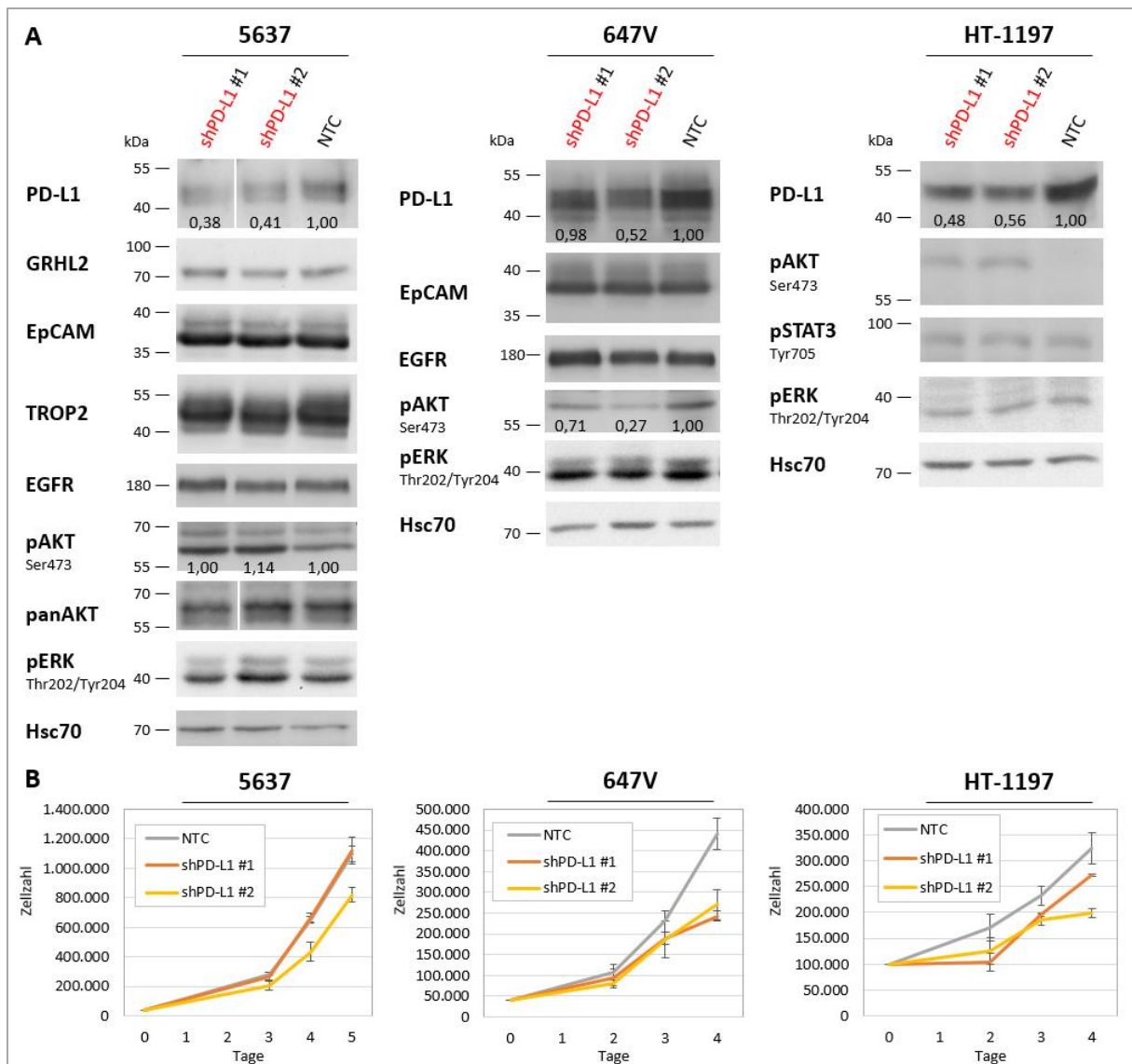


Abbildung 25: Effekte des PD-L1-kd in drei UCB-Zelllinien mit EL-Phänotyp

Die Expression von PD-L1 wurde mittels lentiviralem Gentransfer in den UCB-Zelllinien 5637, 647V und HT-1197 herabreguliert. (A) Western-Blot-Analyse des PD-L1-kd sowie ausgewählter Markerproteine in frühen Passagen der Puromycin-selektierten Zellen. Für ausgewählte Western-Blot-Analysen wurde die relative Änderung der Proteinmenge densitometrisch quantifiziert und auf die Expression von Hsc70 normalisiert. (B) Proliferationsassay anhand von Zellzahlbestimmung in einer Kinetik über 4 bis 5 Tage. Abgebildet sind Mittelwerte aus Triplikaten mit Standardabweichung. NTC = *non-target control*

3.4.2 Charakterisierung von *mesenchymal-like* Zelllinien mit PD-L1-knockdown

Ein shRNA-vermittelter *knockdown* der PD-L1-Expression sollte zum Vergleich mit EL-Zelllinien ebenfalls in den ML-Zelllinien T24 und TCC-SUP vorgenommen werden. Die verringerte PD-L1-Expression wurde mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen (Abbildung 26). Auch hier glichen sich die PD-L1-Expression und die als erniedrigt beobachtete, jedoch im Proliferationsassay nicht zu verifizierende Zellproliferation nach einigen Passagen (ca. 5 – 12) wieder dem Ausgangszustand an. Da die beiden Zelllinien einen ML-Phänotyp aufwiesen,

wurde untersucht, ob die verminderte PD-L1-Expression Veränderungen hin zur Verstärkung von EL-Eigenschaften begünstigte. Es konnten jedoch anhand der analysierten EMT-assoziierten Proteine (ZEB1, GRHL2, Slug und Vimentin) keine Hinweise auf erhöhte EL-Merkmale beobachtet werden. Während durch den PD-L1-kd in TCC-SUP ein schwacher Anstieg der Proteinmenge an phosphoryliertem AKT detektiert wurde, war in T24 eine deutliche Zunahme der Proteinmenge an phosphoryliertem ERK sichtbar.

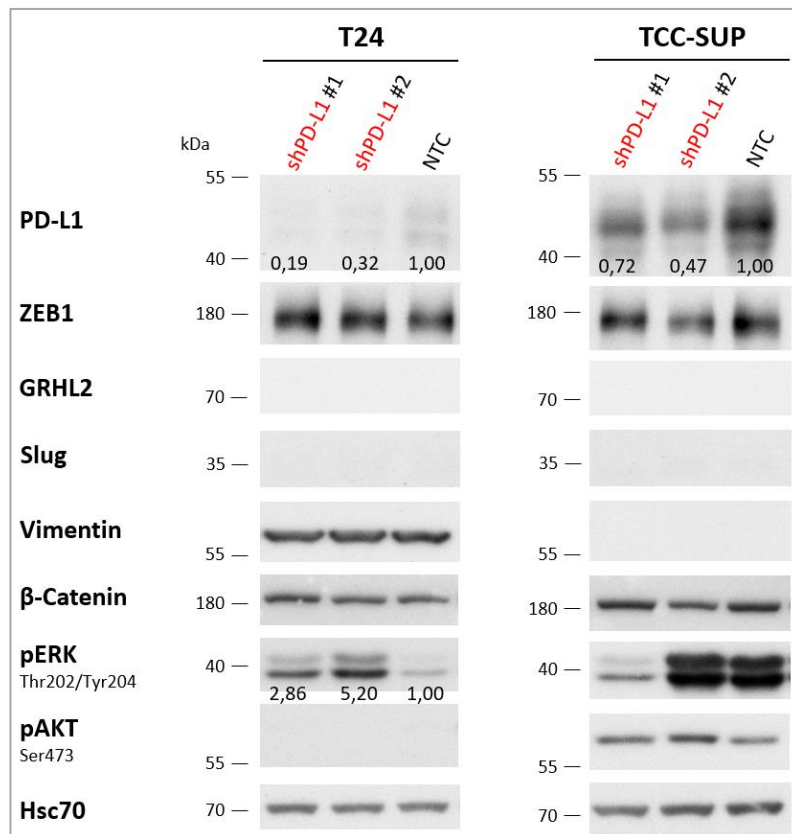


Abbildung 26: Effekte des PD-L1-kd in zwei UCB-Zelllinien mit ML-Phänotyp

Die Expression von PD-L1 wurde mittels lentiviralem Gentransfer in den UCB-Zelllinien T24 und TCC-SUP herabreguliert. Der PD-L1-kd sowie ausgewählte EMT-indizierende und mit Signalwegen assoziierte Proteine wurden in frühen Passagen der Puromycin-selektierten Zellen mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Für ausgewählte Western-Blot-Analysen wurde die relative Änderung der Proteinmenge densitometrisch quantifiziert und auf die Expression von Hsc70 normalisiert. NTC = *non-target control*

Die Versuche zum PD-L1-kd in UCB-Zelllinien lassen sich wie folgt zusammenfassen: Durch spezifische shRNA-Konstrukte in fünf UCB-Zelllinien wurde ein nachweisbarer PD-L1-kd induziert, der jedoch im zeitlichen Verlauf der Kultivierung nicht stabil war. Trotz relativ hoher Restexpression zeichneten sich Effekte auf die Zellproliferation und die Aktivität mit zentralen Signalwegen assoziierter Kinasen ab. Letztere Effekte waren zelllinienabhängig, wobei die durch PD-L1-kd erhöhte Proteinmenge an phosphoryliertem AKT in HT-1197 und an phosphoryliertem ERK in T24 hervorzuheben sind. Hinweise auf durch PD-L1 vermittelte Veränderungen in der Expression ausgewählter EMT-anzeigender Proteine wurden nicht beobachtet.

3.4.3 Charakterisierung von PD-L1-überexprimierenden UCB-Zelllinien

Zur Analyse der intrinsischen Funktion von PD-L1 in UCB-Zelllinien erfolgte eine durch retroviralen Gentransfer vermittelte Überexpression von PD-L1 unter Verwendung des Plasmids pMXs-IP-PD-L1 (3.1.1). Dabei sollten Systeme mit und ohne endogene PD-L1-Expression verglichen werden, daher wurden zwei in der Western-Blot-Analyse PD-L1-negative Zelllinien sowie zwei Zelllinien mit detektierbarer PD-L1-Expression gewählt. Im Falle der PD-L1-negativen Zelllinien wurden EL-Zellen (RT-112) mit ML-Zellen (UM-UC-3) verglichen, um die Funktion von PD-L1 in beiden Subgruppen vergleichen zu können. Um exogenes PD-L1 vergleichend auch in solche Zellsysteme einzubringen, in denen aufgrund der endogenen Expression anzunehmen war, dass alle für eine korrekte Proteinfunktion von PD-L1 erforderlichen Faktoren ebenfalls bereits vorhanden waren, wurden zwei EL-Zelllinien mit moderater PD-L1-Expression (5637, BFTC-905) ebenfalls einer PD-L1-Überexpression unterzogen. Die modifizierten Zellen wurden über den Selektionsmarker Puromycin selektioniert. Die Zunahme der Genexpression in Bezug auf die Kontrollzellen ist in Abbildung 27 dargestellt. In allen vier Zelllinien wurde eine starke Induktion der PD-L1-Transkriptmenge erzielt. In den Zelllinien mit endogen vorhandenem PD-L1 war der Faktor des Anstiegs geringer, was vermutlich auf die höhere basale Genexpression in diesen Zellen zurückzuführen war.

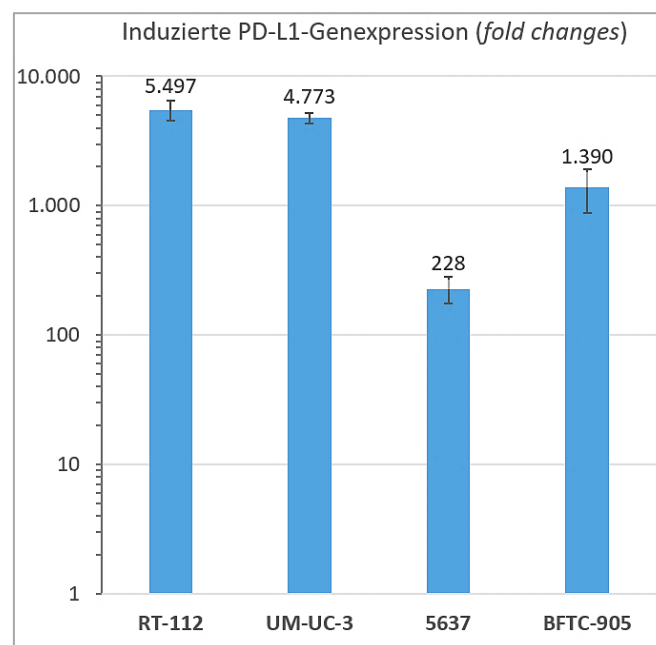


Abbildung 27: Durch PD-L1-Überexpression induzierter Anstieg der PD-L1-Genexpression

qRT-PCR-Analyse des Anstiegs (*fold change*) der relativen PD-L1-Genexpression (Primer: PD-L1 C for/rev) in vier UCB-Zelllinien (RT-112, UM-UC-3, 5637, BFTC-905) mit PD-L1-Überexpression. Die Expression der PD-L1-mRNA wurde auf die Expression von β -Actin normalisiert und in Relation zu Kontrollzellen dargestellt. Abgebildet sind Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten mit Standardabweichung.

Mittels Western-Blot-Analyse wurde auch auf Proteinebene ein sehr starker Anstieg der PD-L1-Expression in allen vier Zelllinien nachgewiesen (Abbildung 28, nicht quantifizierbar aufgrund zu großer bzw. fehlender Signalintensität), welcher im Gegensatz zum PD-L1-kd über die gesamte Kultivierungsdauer stabil detektierbar war. Die Analyse ausgewählter EMT-assoziiierter Proteine ließ keine Rückschlüsse auf EMT-Veränderungen der Zellen zu. Der einzige detektierte Unterschied bestand überraschenderweise in einer verminderten Vimentin-Expression in 5637-PD-L1. Die Analyse der Phosphorylierungsprofile der modifizierten Zellen zeigte verminderte Proteinmengen an phosphoryliertem AKT in RT-112-PD-L1. Um zu untersuchen, ob die PD-L1-Expression möglicherweise einen Einfluss auf die Stammzeleigenschaften von UCB-Zellen besitzt, wurde der Stammzellmarker Aldehyd-Dehydrogenase 1 (ALDH1) analysiert. Seine in UM-UC-3 detektierte Expression blieb jedoch unverändert.

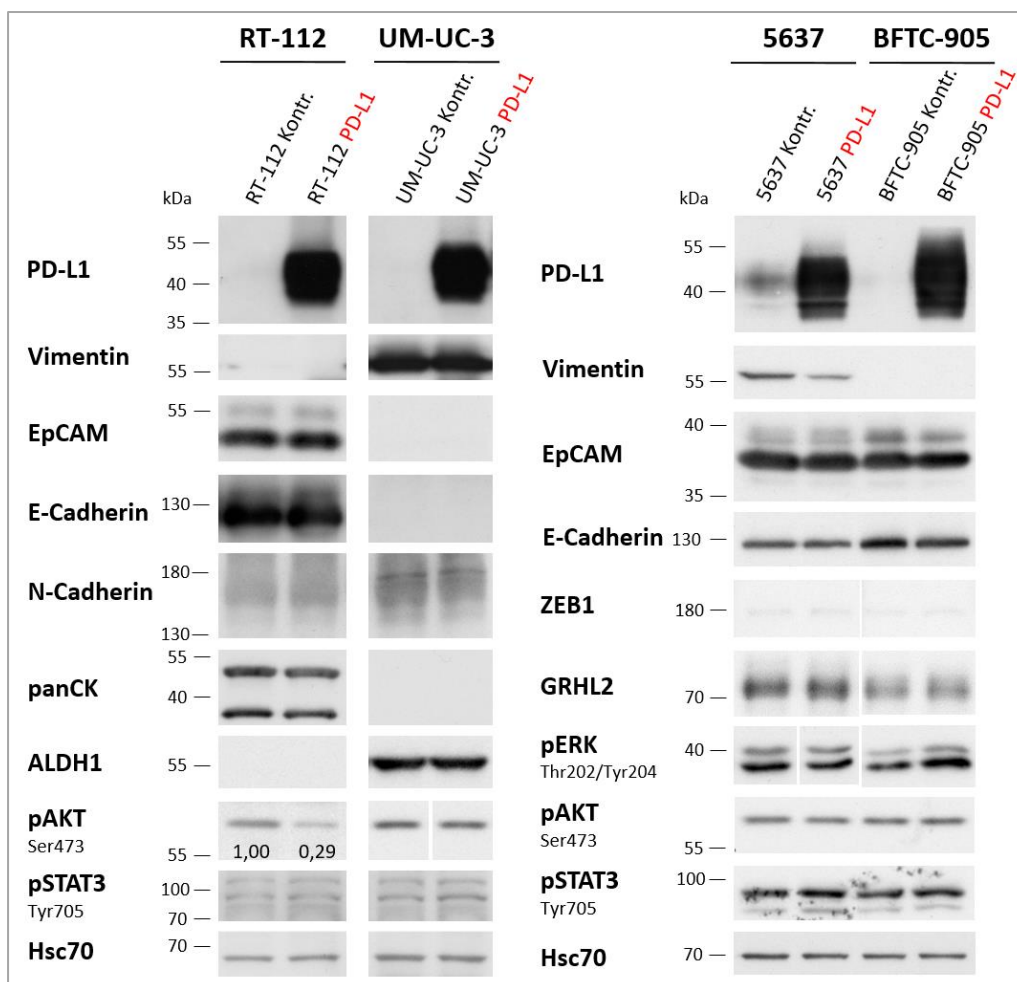


Abbildung 28: Effekte der Überexpression von PD-L1 in vier UCB-Zelllinien

Durch retroviralen Gentransfer wurde PD-L1 in den UCB-Zelllinien RT-112, UM-UC-3, 5637 und BFTC-905 stabil überexprimiert und mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen. Die Effekte auf ausgewählte EMT-indikative Proteine sowie auf die Phosphorylierung von mit Signalwegen assoziierten Kinasen wurden untersucht. Abgebildet sind repräsentative Ergebnisse aus 3 biologischen Replikaten. Für ausgewählte Western-Blot-Analysen wurde die relative Änderung der Proteinmenge densitometrisch quantifiziert und auf die Expression von Hsc70 normalisiert.

Analog zu den Beobachtungen der verminderten Proliferation in Zelllinien mit PD-L1-kd wurde in Zellen mit PD-L1-Überexpression eine Zunahme der Zellproliferation beobachtet. Dieser manifestierte sich am stärksten in frühen Passagen der manipulierten Zellen. Der Effekt wurde in jeweils drei unabhängigen Experimenten mittels MTT-Test (2.2.8) in RT-112 und UM-UC-3 quantifiziert, doch überraschenderweise wurden nur ein geringer Anstieg der Proliferation in RT-112-PD-L1 sowie keine Veränderung bzw. sogar eine geringe Verminderung in UM-UC-3-PD-L1 detektiert (Abbildung 29).

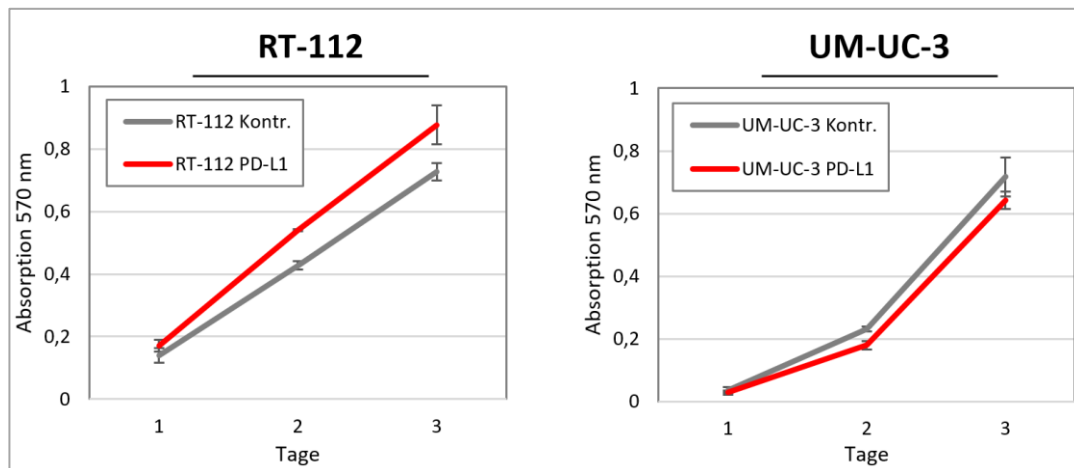


Abbildung 29: MTT-Test zur Abbildung der Zellproliferation von zwei PD-L1-überexprimierenden Zelllinien

Darstellung der Zellproliferation von RT-112-PD-L1 und UM-UC-3-PD-L1 im Vergleich zu den jeweiligen mit Leervektor transfizierten Kontrollzellen mittels MTT-Test über 3 Tage. Abgebildet sind Mittelwerte aus 3 Assays à 8 wells pro Messung mit Standardabweichung.

Weiterhin wurde exogenes PD-L1-Protein in RT-112- und UM-UC-3-Zellen mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen (Abbildung 30). Die subzelluläre Lokalisation war bei RT112-PD-L1-Zellen weitgehend zytoplasmatisch, wohingegen UM-UC3-PD-L1-Zellen eher eine perinukleäre Akkumulation von PD-L1 aufwiesen.

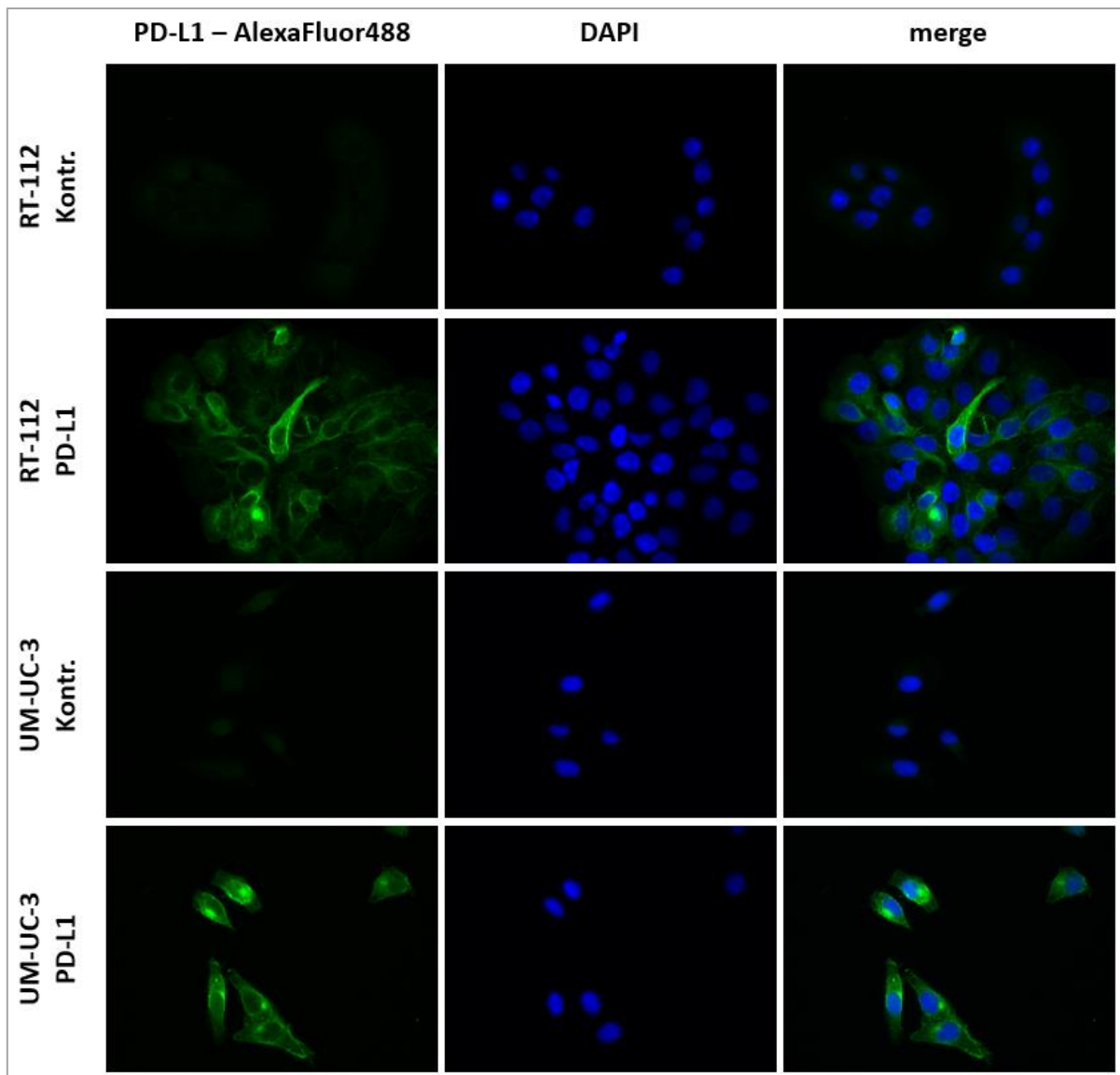


Abbildung 30: Nachweis der PD-L1-Überexpression durch Immunfluoreszenz

Auf *chamber slides* gewachsene RT-112- und UM-UC-3-Zellen mit PD-L1-Überexpression sowie Kontrollzellen wurden über Nacht bei 4°C mit anti-PD-L1-Antikörper (Klon E1L3N, 1:100 in 10% AB-Serum) inkubiert, welcher mit AlexaFluor488-konjugiertem Sekundärantikörper (1:200 in PBS) detektiert wurde. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt.

Zusammenfassend wurde PD-L1 in vier UCB-Zelllinien überexprimiert, was sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene nachgewiesen wurde. Der bei der Kultivierung beobachtete Proliferationsanstieg war nicht stabil. In RT-112-PD-L1 wurde eine geringere Proteinmenge an Serin 473-phosphoryliertem AKT detektiert. In keiner von drei EL-Zelllinien mit PD-L1-Überexpression wurden EMT-Veränderungen ausgelöst. Diese Ergebnisse zusammen mit den ausbleibenden EMT-Veränderungen durch den PD-L1-kd (3.4.1, 3.4.2) sowie durch den PD-L1-Anstieg nach Stimulation mit IFN γ (3.3) zeigen, dass die Erhöhung der PD-L1-Expression in den untersuchten UCB-Zelllinien keine EMT induziert.

3.4.4 Transkriptom-Analyse von PD-L1-überexprimierenden Zelllinien

Nachdem mittels Western-Blot-Analysen der Expression ausgewählter Proteine kein eindeutiger Phänotyp der PD-L1-Überexpression gefunden wurde, wurde aufgrund der beobachteten Veränderungen in der Zellproliferation (3.4.3), auch wenn diese nur temporär waren, ein Einfluss auf transkriptioneller Ebene vermutet. Zur Identifikation von Genen, die durch die Expression von PD-L1 beeinflusst werden, wurde aus den PD-L1-überexprimierenden RT-112- und UM-UC-3-Zellen RNA isoliert und diese durch mRNA-Sequenzierung (RNA-Seq) analysiert. In der anschließenden bioinformatischen Datenanalyse mit dem „edgeR“-Programm (2.3.17) durch die Firma Novogene wurden überraschenderweise lediglich zwei (in RT-112) und fünf (in UM-UC-3) nach PD-L1-Überexpression transkriptionell veränderte Gene ermittelt (Tabelle 20). Für die jeweiligen Gene sind die aus biologischen Triplikaten gebildeten Mittelwerte der gemessenen *readcounts* angegeben. Diese wurden auf die Sequenziertiefe und die Länge der Gene normalisiert (RPKM, *reads per kilobase million*). Der Logarithmus zur Basis 2 des Quotienten der RPKM-Werte ist als \log_2 *fold change* angegeben. Hierbei indizieren positive Werte einen Anstieg und negative Werte eine Herabregulation der Genexpression. Der p-Wert und der q-Wert (auch ‚korrigierter p-Wert‘, angepasst für Mehrfachvergleiche mittels Benjamini-Hochberg-Prozedur) geben die Irrtumswahrscheinlichkeit an. \log_2 *fold changes* mit einem q-Wert < 0,05 wurden als statistisch signifikant definiert.

Tabelle 20: Differenziell exprimierte Gene in zwei PD-L1-überexprimierenden Zelllinien

Zelllinie	Gen-ID	Gen	<i>readcount</i> PD-L1	<i>readcount</i> Kontr.	<i>fold change</i>	\log_2 <i>fold change</i>	p-Wert	q-Wert
RT-112	ENSG00000120217	PD-L1	1.328,024	3,441	433,240	8,788	4,79E-80	2,31E-75
	ENSG00000259001	lncRNA	0,602	16,671	0,044	-4,466	6,04E-08	0,001
	ENSG00000060982	BCAT1	0,767	0,260	3,575	1,817	1,01E-06	0,016
UM-UC-3	ENSG00000120217	PD-L1	1.094,589	4,994	220,071	7,781	0,00E+00	0,000
	ENSG00000012779	ALOX5	0,344	0,033	10,324	3,281	5,95E-07	0,010
	ENSG00000133636	NTS	0,671	0,139	4,945	2,259	6,36E-07	0,010
	ENSG00000115461	IGFBP5	0,230	0,000	nd.	5,891	1,99E-06	0,024
	ENSG00000111907	TPD52L1	23,705	16,869	1,415	0,497	3,56E-06	0,030
	ENSG00000117595	IRF6	0,498	0,098	4,992	2,336	3,72E-06	0,030

In RT-112-PD-L1 wurden über PD-L1 hinaus lediglich zwei Gene mit veränderter Expression identifiziert. Eine bisher in der Literatur nicht spezifizierte *long non-coding* RNA (lncRNA) war herabreguliert und das Gen *BCAT1* (*branched chain amino acid transaminase 1*) heraufreguliert. In UM-UC-3-PD-L1 wurden neben PD-L1 fünf Gene mit gegenüber der Kontrolle erhöhten Transkriptmengen identifiziert. Es handelte sich um die Gene *ALOX5* (*arachidonate 5-lipoxygenase*), *NTS* (Neurotensin), *IGFBP5* (*insulin like growth factor binding protein 5*), *TPD52L1* (*tumor protein D52-like 1/D53*) und *IRF6* (*interferon regulatory factor 6*).

Mittels qRT-PCR konnte lediglich *NTS* als beeinflusstes Transkript verifiziert werden, wie in Abbildung 31 dargestellt. Für *TPD52L1*- und *IGFBP5*-Transkripte konnte jeweils nur eine schwache Erhöhung der Genexpression nachgewiesen werden. Die Genexpression von *BCAT1*, *ALOX5* und *IRF6* lag für die entsprechenden Zelllinien unterhalb des Detektionslimits, sodass diese nicht weiter analysiert werden konnte. Die Spezifität der jeweiligen Primerpaare wurde anhand von Zelllinien mit höherer Expression dieser Gene bestätigt, wodurch die technische Durchführbarkeit der Detektion von *BCAT1*, *ALOX5* und *IRF6* gegeben war.

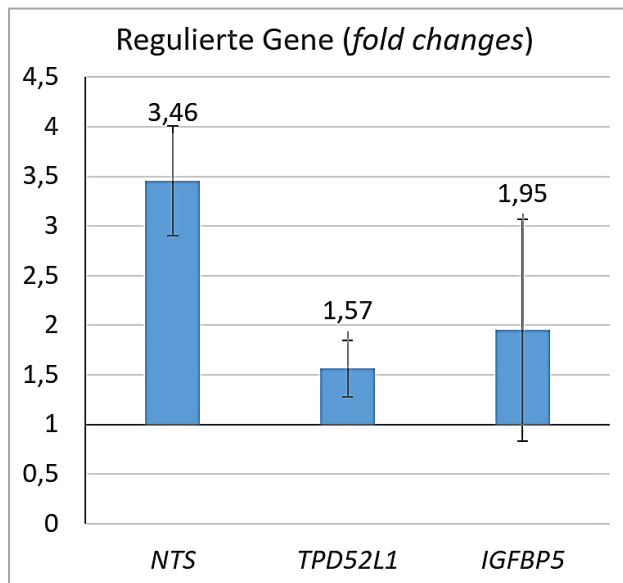


Abbildung 31: qRT-PCR-basierte Verifikation differenziell regulierter Gene in PD-L1-überexprimierenden UM-UC-3-Zellen

qRT-PCR-Analyse der Änderung (*fold change*) der relativen Genexpressionen von *NTS*, *TPD52L1* und *IGFBP5* (Primer: *NTS*, *D53*, *IGFBP5* for/rev). Diese wurden auf die Expression von β -Actin normalisiert und als Änderung gegenüber der Leervektor-enthaltenden Zellen dargestellt. Abgebildet sind Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten mit Standardabweichung.

Zusammenfassend wurden mittels RNA-Seq trotz starker PD-L1-Überexpression in RT-112- und UM-UC-3-Zellen unerwartet wenige regulierte Gene identifiziert. Durch nachfolgende Analysen der Genexpression dieser Kandidaten-Gene mittels qRT-PCR wurde lediglich der etwa 3,5-fache Anstieg der Neurotensin-Transkriptmenge in UM-UC-3-PD-L1 gegenüber Leervektor-enthaltenden UM-UC-3-Zellen bestätigt.

Die Proteinexpression des Neuropeptids *NTS* wurde mittels Western-Blot-Analyse in dieser und in weiteren UCB-Zelllinien untersucht, jedoch konnten keine Signale generiert werden. Vermutlich war die Expression zu gering oder die Sensitivität des Antikörpers war nicht ausreichend. Weiterführende funktionelle Analysen zum Neurotensin-Gen wurden bisher nicht durchgeführt.

3.4.5 Interaktion von PD-L1 mit rekombinantem PD-1

Ob das in den Zelllinien RT-112 und UM-UC3 nach Überexpression des PD-L1-Gens produzierte PD-L1 in der Lage ist, spezifisch mit dem Rezeptor PD-1 zu interagieren und ob diese Bindung durch Immun-Checkpoint-Inhibitoren blockiert werden kann, sollte mit dem folgenden Ansatz untersucht werden. Die PD-L1-positive Zelllinie 647V sowie RT-112-Kontr. und RT-112-PD-L1 wurden mit rekombinantem humanen PD-1, an welches die humane IgG-Fc-Domäne

fusioniert war (PD-1-Fc), oder mit der ungekoppelten Fc-Domäne als Kontrollsubstanz (IgG-Fc) inkubiert. Mittels Immunfluoreszenz wurde die Interaktion von endogenem (647V) sowie experimentell überexprimiertem (RT-112-PD-L1) PD-L1 mit PD-1 gezeigt (Abbildung 32). Dabei war die Fluoreszenzintensität bei überexprimiertem PD-L1 deutlich stärker als bei endogenem, was der mittels Western-Blot-Analyse ermittelten PD-L1-Expression entsprach (Abbildung 48). Durch Zugabe der therapeutischen Antikörper Pembrolizumab oder Nivolumab wurde die Wechselwirkung jeweils effizient unterbunden.

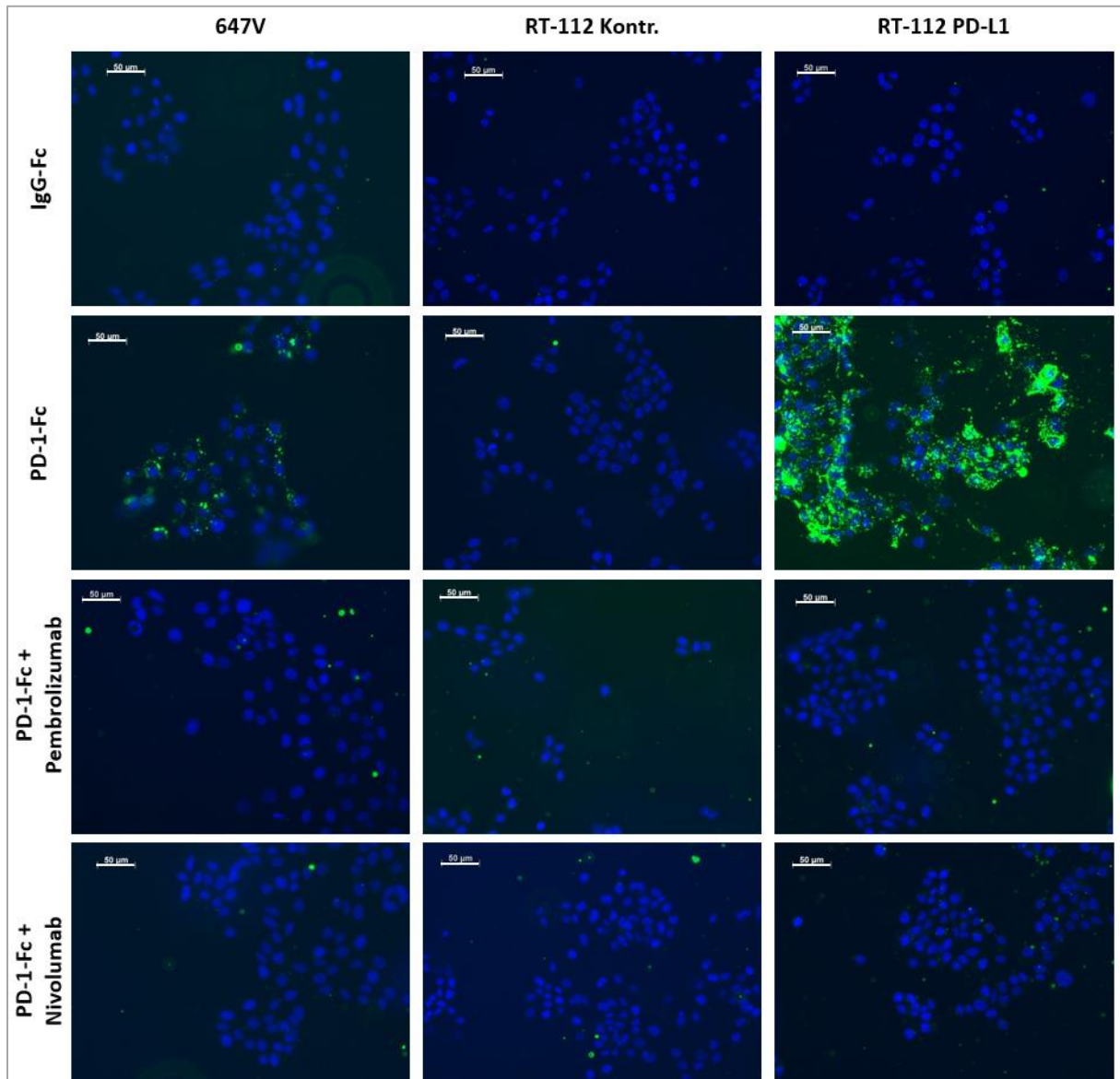


Abbildung 32: Visualisierung der PD-1/PD-L1-Interaktion sowie ihrer Blockierung durch Immun-Checkpoint-Inhibitoren unter Anwendung von Immunfluoreszenz

Auf Objektträgern adhärenzte 647V und RT-112 \pm PD-L1-Überexpression wurden mit 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rPD-1-Fc/IgG-Fc, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AlexaFluor488-konjugiertem anti-human-IgG sekundärem Antikörper und \pm 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ therapeutischem anti-PD-1-Antikörper (Pembrolizumab, Nivolumab) in serumfreiem DMEM-Medium für 6,5 h bei 37°C inkubiert. Nach einem PBS-Waschschritt wurden die Präparate mit Vectashield Mounting Medium mit DAPI eingedeckelt und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Die Maßstabsleiste entspricht 50 μm .

Um herauszufinden, ob für eine potenzielle intrinsische Funktion von PD-L1 die Wechselwirkung mit PD-1 erforderlich ist und ob PD-L1 somit eine Rolle als Rezeptor auf Tumorzellen übernehmen kann, wurden Effekte der Interaktion von PD-L1 mit rekombinantem PD-1 auf die Tumorzellen untersucht. Dazu wurden die Tumorzellen nach PD-1-Kontakt im Vergleich zur Inkubation mit IgG-Fc mittels MTT-Assay hinsichtlich der Zellproliferation untersucht. In 96-well Platten wurden 5637, HT-1197, RT-112-Kontr., RT-112-PD-L1, UM-UC-3-Kontr. und UM-UC-3-PD-L1 für ein bis vier Tage mit 0,2/1/5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PD-1-Fc bzw. IgG-Fc kultiviert. Es wurden keine PD-1-spezifischen Änderungen der Zellviabilität und damit verbunden der Zellproliferation detektiert. Im nächsten Schritt sollte der Einfluss der PD-1/PD-L1-Interaktion auf die Expression und Phosphorylierung ausgewählter Proteine, die Rückschlüsse auf die Aktivität von potenziell beeinflussten Signaltransduktionswegen zulassen, untersucht werden. Die Western-Blot-Analyse von mit PD-1 stimulierten RT-112-PD-L1 sind in Abbildung 33 dargestellt.

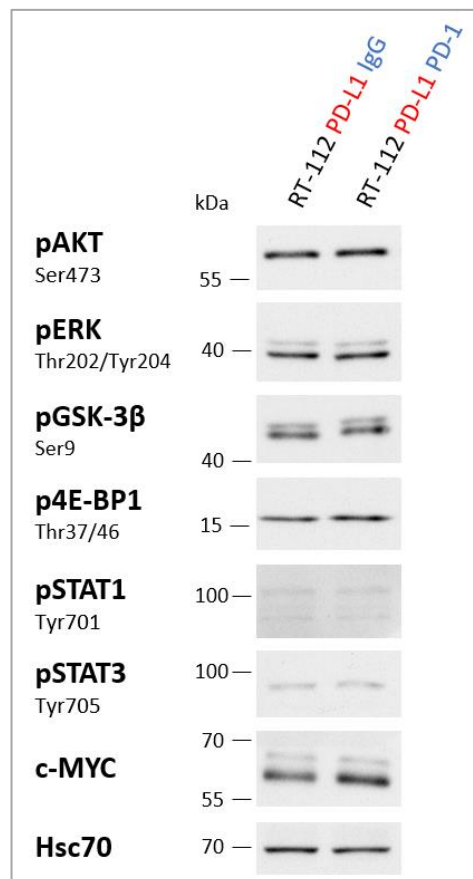


Abbildung 33: Einfluss der Interaktion von PD-L1 mit rekombinantem PD-1 auf Signaltransduktionswege in RT-112-Zellen mit PD-L1-Überexpression

RT-112-PD-L1-Zellen wurden mit PD-1-Fc vs. IgG-Fc (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 h) behandelt. Mittels Western-Blot-Analyse wurden Effekte auf die Phosphorylierung von mit Signalwegen assoziierten Kinasen/Transkriptionsfaktoren sowie die Expression von c-MYC untersucht. Die Detektion von Hsc70 diente als Kontrolle für die Beladung mit gleichen Proteinmengen.

Die Analyse der Phosphorylierung von AKT, ERK, GSK-3 β , 4E-BP1, STAT1 und STAT3 sowie der Expression von c-MYC ließ keine Rückschlüsse auf Effekte zu, die durch eine einstündige PD-1/PD-L1-Interaktion in RT-112-Zellen mit PD-L1-Überexpression vermittelt wurden. Auch nach sechsständiger Inkubation und auch in 647V-Zellen konnten keine entsprechenden Tumorzell-intrinsischen Effekte nachgewiesen werden (hier nicht gezeigt). Darüber hinaus wurde in 5637-Zellen durch PD-1-Stimulation (1/5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PD-1-Fc vs. IgG-Fc, ein bis drei Tage) keine EMT ausgelöst, wie anhand des fehlenden Anstiegs von Vimentin- und Fibronectin-mRNA festgestellt wurde (hier nicht gezeigt). Es wurden hierbei keine Unterschiede zwischen 5637-Kontr. und 5637-PD-L1 detektiert.

3.5 Einfluss EMT-induzierender Faktoren auf die PD-L1-Expression von UCB-Zelllinien

Nachdem gezeigt wurde, dass weder die endogene Expression von PD-L1 mit dem EMT-Phänotyp von UCB-Zelllinien korreliert, noch die Modifikation der PD-L1-Expression in diesen Zelllinien EMT-Veränderungen auslöst, sollte nun der Einfluss einer EMT-Induktion auf die PD-L1-Expression untersucht werden. EMT kann durch verschiedene externe Faktoren ausgelöst werden. Für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten UCB-Zelllinien mussten die experimentellen Bedingungen jedoch zunächst etabliert und geeignete Zelllinien selektiert werden.

3.5.1 Vorversuche zur EMT-Induktion und Selektion geeigneter Zelllinien

Zur Untersuchung der PD-L1-Expression im EMT-Kontext sollten zunächst geeignete UCB-Zelllinien ermittelt werden, in denen EMT ausgelöst werden kann. Als EMT-Veränderungen werden die Verminderung der Expression von epithelialen Markern (z.B. E-Cadherin, EpCAM, GRHL2) und/oder der Anstieg der Expression von mesenchymalen Markern (z.B. Vimentin, N-Cadherin, ZEB1) beschrieben.

Im ersten Experiment zur Induktion des EMT-Prozesses in epithelialen UCB-Zelllinien wurden die Zellen unter hypoxischen Bedingungen (1% pO₂) kultiviert. Hypoxie kann durch die Stabilisierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 α (*hypoxia-inducible factor 1 α*) zu einer EMT führen [97, 153]. Die unter Hypoxie kultivierten Zelllinien RT-4, RT-112, 5637 und 647V wurden mittels Western-Blot-Analyse untersucht (Abbildung 34A). Lediglich in 5637 wurde ein 3,7-facher Anstieg des mesenchymalen Markers Vimentin nachgewiesen. RT-4, RT-112 und 647V wiesen weder im unbehandelten Zustand noch unter hypoxischen Bedingungen detektierbare Vimentin-Expression auf. Die PD-L1-Expression war in keiner der vier Zelllinien verändert.

Ein weiterer Versuch EMT zu induzieren wurde über den shRNA-vermittelten *knockdown* (2.2.6) des Transkriptionsfaktors GRHL2 (*grainyhead-like 2*) vorgenommen. Der Verlust von GRHL2 kann in bestimmten Mamma- und Ovarialkarzinomzellen EMT über einen negativen

feedback-Mechanismus mit dem mesenchymalen Transkriptionsfaktor ZEB1 (*zinc finger enhancer-binding protein 1*) auslösen [107, 154]. Die Western-Blot-Analyse der Zelllinien RT-4, RT-112 und 5637 mit GRHL2-*knockdown* (GRHL2-kd) ist in Abbildung 34B dargestellt. In RT-112 und 5637 wurde eine deutlich verringerte GRHL2-Expression im Vergleich zur Vektorkontrolle nachgewiesen. Jedoch wurde bei der Untersuchung des Einflusses auf verschiedene EMT-anzeigende Proteine (E-Cadherin, N-Cadherin, EpCAM, Vimentin, ZEB1) lediglich, wie auch im Hypoxie-Ansatz beobachtet, ein Anstieg von Vimentin in 5637 (21-fach) gefunden. Die PD-L1-Expression wurde auch hierdurch nicht beeinflusst.

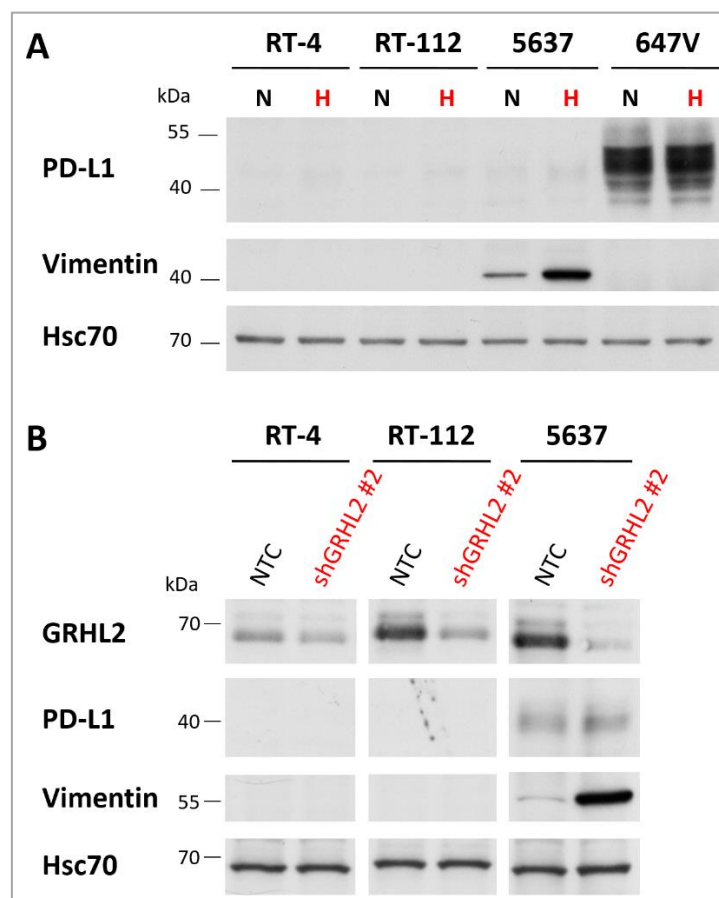


Abbildung 34: Evaluation der Eignung von Hypoxie und GRHL2-kd zur Induktion einer EMT

(A): Die Zelllinien RT-4, RT-112, 5637 und 647V wurden für 4 Tage unter hypoxischen Bedingungen (1% pO₂) (H) kultiviert und mit unter Normoxie (N) gewachsenen Zellen verglichen. Mittels Western-Blot-Analyse wurde die Expression von PD-L1 und Vimentin untersucht. Die Detektion von Hsc70 diente als Kontrolle für die Beladung mit gleichen Proteinmengen. (B): In den Zelllinien RT-4, RT-112 und 5637 wurde die Expression von GRHL2 mittels lentiviralem Gentransfer herabreguliert. Die verringerte GRHL2-Expression sowie die PD-L1- und Vimentin-Expression wurden mittels Western-Blot-Analyse untersucht. NTC = *non-target control*

In Zelllinien verschiedener Tumorentitäten kann EMT durch TGFβ (*transforming growth factor β*) induziert werden [97, 155]. Ob das auch in UCB-Zelllinien gelingt und ob TGFβ die PD-L1-Expression beeinflussen kann, sollte an einer Auswahl von UCB-Zelllinien mit EL- und ML-Phänotyp getestet werden (Abbildung 35). Dabei blieb die Expression des PD-L1-Gens in den Zelllinien RT-4, HT-1376, HT-1197, 647V, UM-UC-3, SW1710, J82, T24, TCC-SUP nahezu

unverändert, wohingegen in den Zelllinien 5637 und BFTC-905 ein deutlicher Anstieg der PD-L1-Transkriptmenge verzeichnet werden konnte.

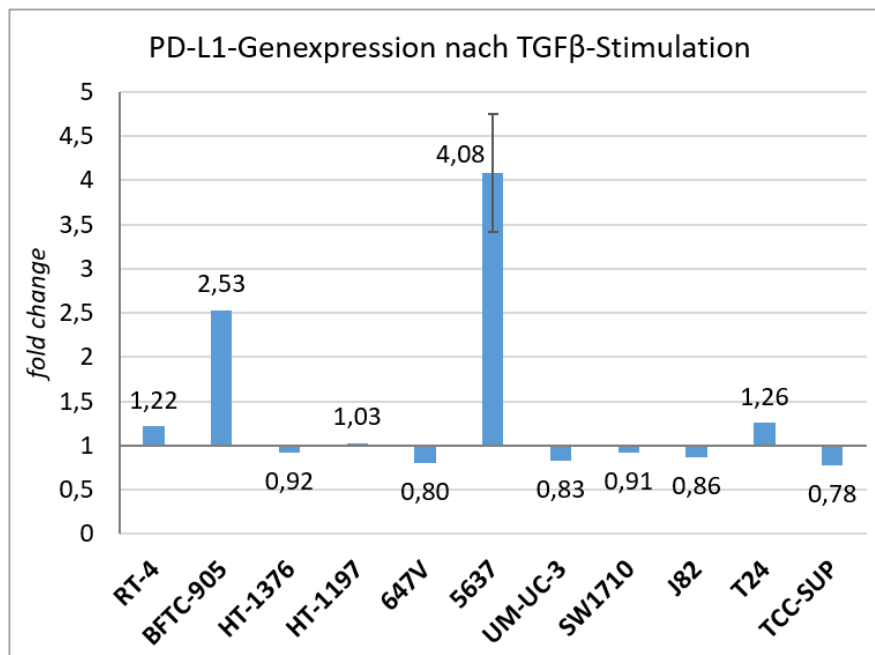


Abbildung 35: Einfluss der Behandlung mit TGFβ auf die PD-L1-Genexpression

qRT-PCR-Analyse der Änderung (*fold change*) der relativen PD-L1-Genexpression (Primer: PD-L1 C for/rev) in ausgewählten UCB-Zelllinien nach Behandlung mit TGFβ1 (10 ng/mL, 3 Tage). Die Expression der PD-L1 mRNA wurde auf die Expression von β-Actin normalisiert und in Relation zu unbehandelten Zellen dargestellt. Abgebildet sind Einzelbestimmungen sowie bei 5637 Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten mit Standardabweichung.

Die Zelllinie 5637 wurde aufgrund der erhöhten Vimentin-Expression bei Kultivierung unter Hypoxie sowie bei GRHL2-kd für weitere Experimente zur EMT-Induktion ausgewählt. Sie wies wie unter 3.2.2 gezeigt bereits einen EL-ML-intermediären Phänotyp auf, der durch die simultane Expression von epithelialen (z.B. EpCAM, Keratin, E-Cadherin) sowie mesenchymalen (z.B. N-Cadherin und Vimentin) Proteinen gekennzeichnet ist (Abbildung 15). Die Zelllinie 5637 wies den stärksten Anstieg der PD-L1-Expression unter TGFβ-Stimulation auf. Des Weiteren wurde die Zelllinie BFTC-905 für weitere Untersuchungen im EMT-Kontext ausgewählt. Auch sie zeigte durch ihre schwache basale Expression von N-Cadherin einen Hinweis auf einen epithelial/mesenchymal-intermediären Phänotyp (Abbildung 15).

3.5.3 Induktion des EMT-Prozesses durch Behandlung mit TGF β

Nachdem der *knockdown* des Transkriptionsfaktors GRHL2 und die Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen nur schwache Veränderungen in Richtung einer EMT (Anstieg der Vimentin-Expression) bewirkten, wurden die 5637- und BFTC-905-Zellen im nächsten Schritt für drei Tage mit TGF β behandelt.

Mit TGF β stimulierte 5637-Zellen wiesen eine veränderte Morphologie mit einem höheren Anteil spindelförmiger Zellen sowie verminderte Zellproliferation auf und wurden auf Änderungen in der Protein- und mRNA-Expression etablierter EMT-Marker untersucht (Abbildung 36).

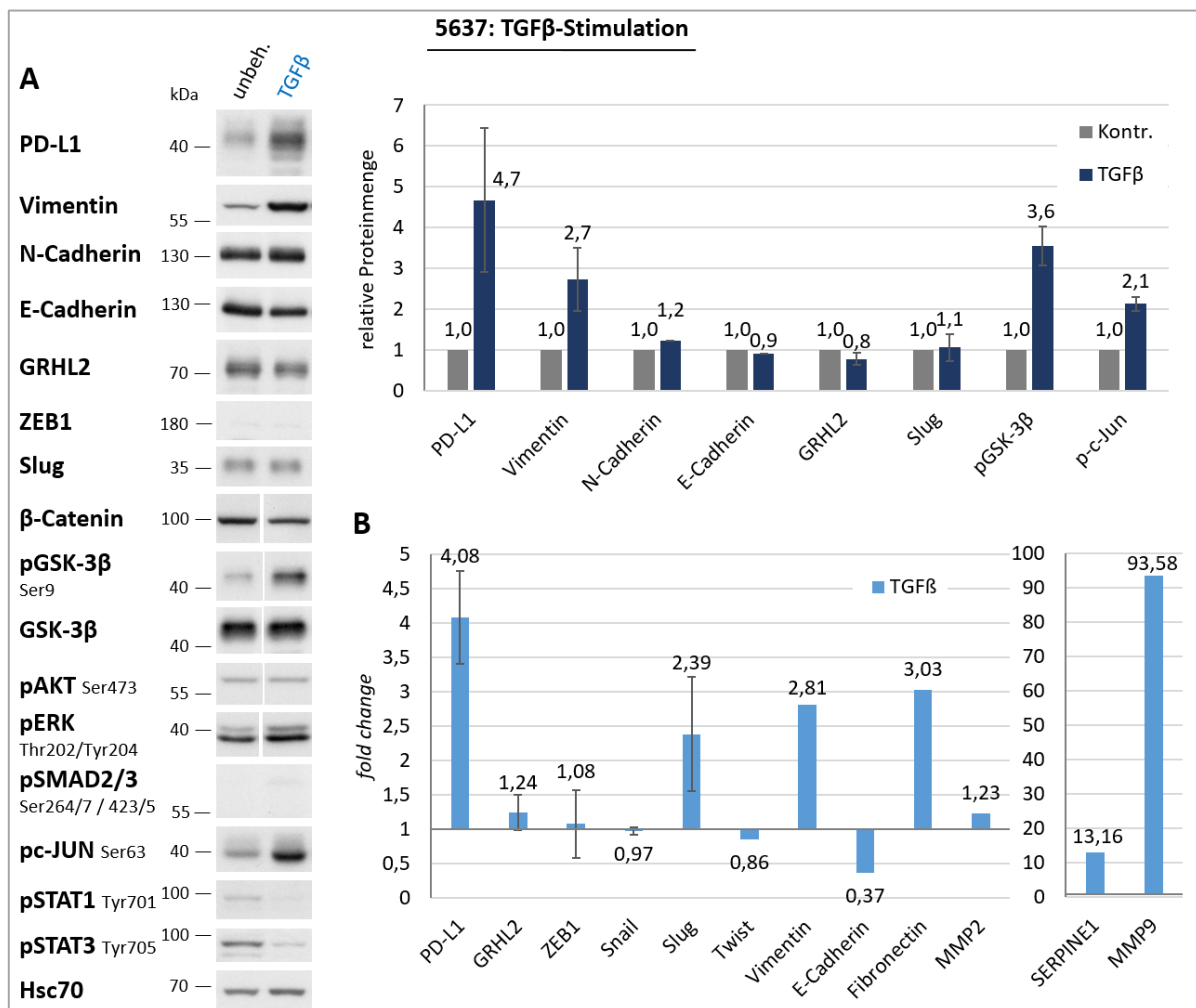


Abbildung 36: Durch TGF β -Stimulation induzierte EMT-Veränderungen (Zelllinie 5637)

(A) Die Zelllinie 5637 wurde für 3 Tage mit 10 ng/mL TGF β 1 behandelt. Mittels Western-Blot-Analyse wurden die Expression von PD-L1 und EMT-indikativen Proteinen sowie Phosphorylierungsprofile untersucht. Die Detektion von Hsc70 diente als Kontrolle für die Beladung mit gleichen Proteinmengen. Abgebildet sind repräsentative Bandenmuster aus 3 biologischen Replikaten. Für ausgewählte Western-Blot-Analysen wurde die relative Änderung der Proteinmenge denistometrisch quantifiziert und auf die Expression von Hsc70 normalisiert.

(B) qRT-PCR-Analyse der Änderung (*fold change*) der relativen Transkriptmengen von PD-L1 und EMT-Markern in 5637-Zellen nach Behandlung mit TGF β (10 ng/mL, 3 Tage). Die jeweilige Genexpression wurde auf die Expression von β -Actin normalisiert und in Relation zu unbehandelten Zellen dargestellt. Fehlerbalken indizieren die Standardabweichung der Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten.

Die dreitägige TGF β -Stimulation führte zu einem deutlichen Anstieg der PD-L1-Proteinexpression in 5637-Zellen (4,7-fach). In Bezug auf EMT-assoziierte Proteine wurde neben einer Erhöhung der Vimentin-Expression auch eine Verminderung der E-Cadherin- und GRHL2-Expression detektiert. Die bekannte TGF β -vermittelte Phosphorylierung von SMAD2 und SMAD3 [156, 157] konnte mit schwachem Signal gezeigt werden. Außerdem wurden eine erhöhte Proteinmenge an phosphorylierter Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK-3 β) und c-JUN sowie eine geringere Proteinmenge an phosphoryliertem ERK/MAPK, STAT1 und STAT3 ermittelt. Die beobachteten Änderungen der Proteinexpression von PD-L1, Vimentin und E-Cadherin konnten auch auf transkriptioneller Ebene bestätigt werden. Die Genexpression der Transkriptionsfaktoren GRHL2, ZEB1, Snail und Twist war nahezu unbeeinflusst. Lediglich bei Slug wurde eine Zunahme der mRNA detektiert, die sich jedoch nicht auf Proteinebene widerspiegelte (Abbildung 36). Außerdem wurde ein Anstieg von Fibronectin-, SerpinE1- und Matrix-Metalloprotease 9 (MMP9)-Transkripten beobachtet.

In 5637 führte die Stimulation mit TGF β somit zu EMT-Veränderungen sowohl in der Morphologie der Zellen als auch in der Expression von EMT-anzeigenden Proteinen. Gleichzeitig wurde die PD-L1-Expression auf mRNA- sowie Proteinebene verstärkt.

Da auch in der Zelllinie BFTC-905 nach TGF β -Stimulation ein transkriptioneller PD-L1-Anstieg beobachtet wurde (siehe 3.5.1), wurde sie analog zu 5637 als Modellsystem für EMT-Induktionsversuche genutzt und die Effekte der TGF β -Behandlung auf die PD-L1-Expression wurden analysiert. Der Einfluss einer dreitägigen Behandlung mit TGF β auf die Protein- und mRNA-Expression von BFTC-905 wurde untersucht und ist in Abbildung 37 dargestellt.

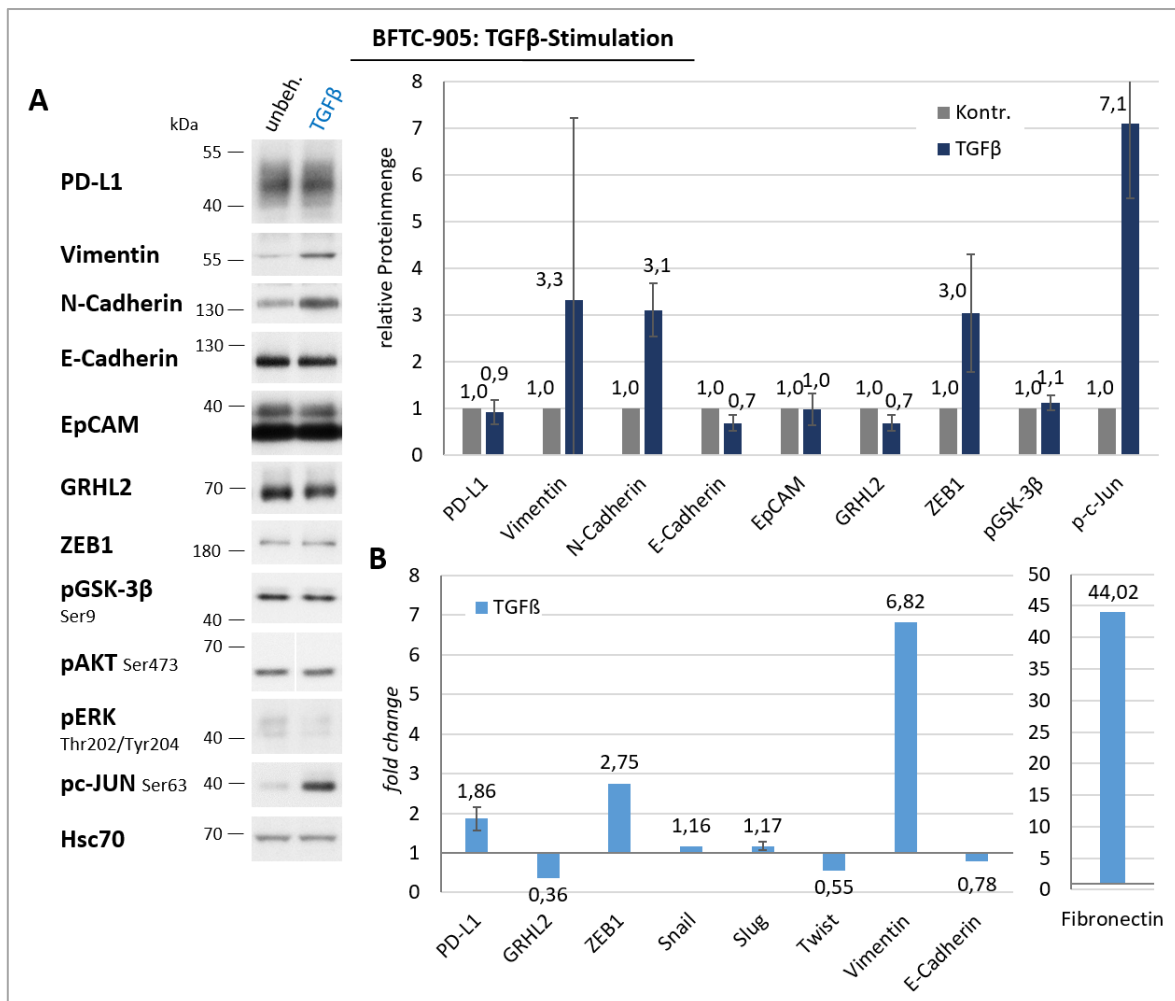


Abbildung 37: Durch TGF β -Stimulation induzierte EMT-Veränderungen (Zelllinie BFTC-905)

Die Zelllinie BFTC-905 wurde für 3 Tage mit 10 ng/mL TGF β behandelt. (A) Mittels Western-Blot-Analyse wurden die Expression von PD-L1 und EMT-indikativen Proteinen sowie Phosphorylierungsprofile untersucht. Die Detektion von Hsc70 diente als Kontrolle für die Beladung mit gleichen Proteinmengen. Abgebildet sind repräsentative Bandenmuster aus 3 biologischen Replikaten. Für ausgewählte Western-Blot-Analysen wurde die relative Änderung der Proteinmenge densitometrisch quantifiziert und auf die Expression von Hsc70 normalisiert. (B) qRT-PCR-Analyse der Änderung (*fold change*) der relativen Transkriptmengen von PD-L1 und EMT-Markern. Die jeweilige Genexpression wurde auf die Expression von β -Actin normalisiert und in Relation zu unbehandelten Zellen dargestellt. Fehlerbalken indizieren die Standardabweichung der Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten.

Die PD-L1-Transkription wurde in BFTC-905-Zellen durch TGF β -Behandlung erhöht, wie auch in 3.5.1 gezeigt. Überraschenderweise ließ sich auf Proteinebene kein PD-L1-Anstieg feststellen. Indikatoren für EMT-assoziierte Veränderungen waren die Heraufregulation von Vimentin und ZEB1 (mRNA und Protein), N-Cadherin (Protein) und Fibronectin (mRNA) sowie die Herabregulation von GRHL2 und in geringem Maße von E-Cadherin (mRNA und Protein). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus 5637-Zellen stieg auch in BFTC-905-Zellen die Menge an pc-JUN durch TGF β -Behandlung deutlich an. Phosphorylierte GSK-3 β jedoch nahm nicht zu. Wie auch bei 5637-Zellen beobachtet (Abbildung 36), korrelierten somit die Proteinmengen von pGSK-3 β und PD-L1, denn beide blieben bei TGF β -Stimulation der BFTC-905-Zellen unverändert.

3.5.4 Induktion des EMT-Prozesses durch Herabregulation der GRHL2-Expression

Da die EMT ein multifaktoriell bedingter Prozess ist, sollte eine weitere Erhöhung der Expression von mesenchymalen Proteinen über eine Kombination von EMT-auslösenden Faktoren induziert werden. Außerdem sollte hierbei ermittelt werden, welche molekularen Veränderungen mit dem PD-L1-Anstieg korrelieren oder diesen kausal bedingen. Dazu wurden 5637-shGRHL2-Zellen mit TGF β behandelt.

Die Veränderungen der Morphologie und Proteinexpression von 5637-Zellen mit GRHL2-kd mit und ohne TGF β -Behandlung sind in Abbildung 38 dargestellt.

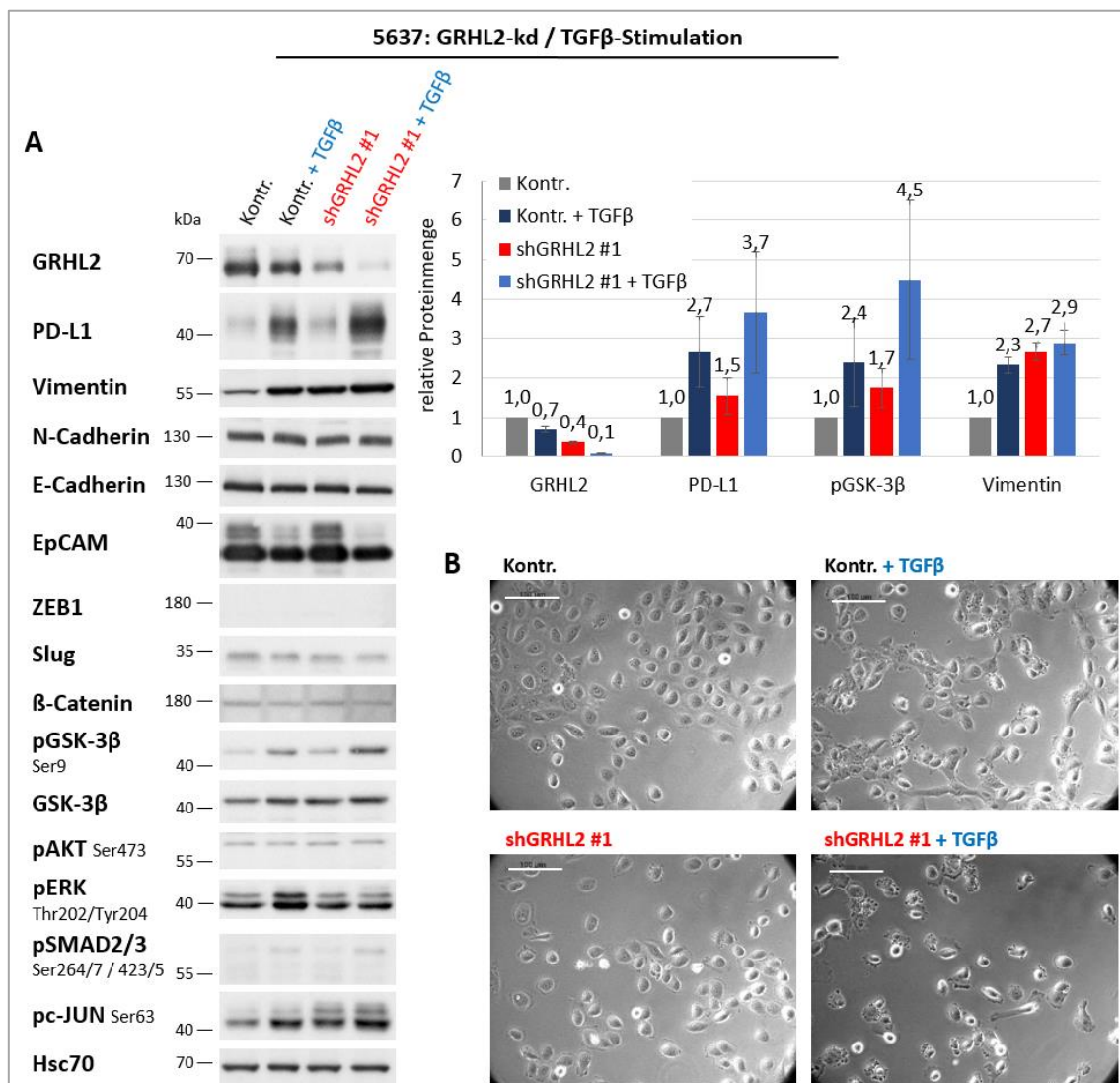


Abbildung 38: Durch GRHL2-kd sowie TGF β -Stimulation induzierte EMT-Veränderungen der Zellmorphologie und Proteinexpression (Zelllinie 5637)

Analyse von 5637-Zellen nach GRHL2-kd sowie nach zusätzlicher TGF β -Stimulation (10 ng/mL, 3 Tage) (A) Mittels Western-Blot-Analyse wurden die Expression von PD-L1 und EMT-indikativen Proteinen sowie Phosphorylierungsprofile untersucht. Die Detektion von Hsc70 diente als Kontrolle für die Beladung mit gleichen Proteinmengen. Abgebildet sind repräsentative Bandenmuster aus 3 biologischen Replikaten. Für ausgewählte Western-Blot-Analysen wurde die relative Änderung der Proteinmenge densitometrisch quantifiziert und auf die Expression von Hsc70 normalisiert. (B) Mikroskopische Dokumentation der Zellmorphologie. Die Maßstabsleiste entspricht 100 μ m.

Die Behandlung der eher runden und in Zellverbänden wachsenden 5637-Kontrollzellen (*non-target control*, NTC) mit TGF β führte zu einer spindelförmig veränderten Morphologie der Zellen. Der *knockdown* der GRHL2-Expression bewirkte eine Verminderung der Zell-Zell-Kontakte. Eine Kombination beider Ansätze führte zu einem noch deutlicheren EMT-Phänotyp mit einzeln wachsenden Zellen und teilweise spindelförmiger Morphologie. Diese in der Zellmorphologie beobachteten Veränderungen spiegelten sich auch in der Proteinexpression wider. Die GRHL2-Expression war durch den *knockdown* deutlich vermindert und durch die zusätzliche TGF β -Behandlung sogar noch weiter gesenkt. PD-L1 wurde nicht nur durch TGF β induziert (ca. 2,7-fach), sondern in geringem Maße auch durch den GRHL2-kd (ca. 1,5-fach), was zuvor nicht beobachtet wurde (siehe 3.5.1, verwendete shRNA nicht identisch). Interessanterweise stieg die PD-L1-Expression weiter an, wenn beide Ansätze kombiniert wurden (ca. 3,7-fach). Die Vimentin-Expression wurde bereits durch beide Ansätze separat (ca. 2,3 – 2,7-fach) und durch die TGF β -Behandlung von 5637-shGRHL2 etwas stärker (ca. 2,9-fach) erhöht. Die Expression von EpCAM und E-Cadherin hingegen wurde nur durch die Stimulation mit TGF β vermindert, ohne zusätzlichen Einfluss des GRHL2-kd, wobei der Effekt auf E-Cadherin weniger deutlich war als der auf EpCAM. Der Transkriptionsfaktor ZEB1 war auf Proteinebene nicht detektierbar.

Eine erhöhte Proteinmenge an phosphoryliertem ERK wurde nur in TGF β -stimulierten Zellen detektiert, wobei die biologischen Replikate hier kein einheitliches Bild zeigten. Höhere Proteinmengen an phosphorylierter GSK-3 β -Kinase waren bei GRHL2-kd (1,7-fach) und stärker noch bei TGF β -Behandlung (2,4-fach) zu detektieren und waren am stärksten bei TGF β -Stimulation von 5637-shGRHL2-Zellen (4,5-fach). Damit korrelierte die Menge von pGSK-3 β mit den relativen Anstiegen der Proteinexpression von PD-L1. Auch die Proteinmenge an phosphoryliertem c-JUN wurde sowohl durch TGF β als auch durch GRHL2-kd erhöht und war am höchsten bei TGF β -Behandlung der 5637-shGRHL2-Zellen. Ein Anstieg der Proteinmenge von pSMAD2 und pSMAD3 hingegen erfolgte ausschließlich in Zellen, die mit TGF β behandelt wurden.

Darüber hinaus wurde die Genexpression von PD-L1 und bekannten EMT-anzeigenden Proteinen mittels qRT-PCR untersucht (Abbildung 39).

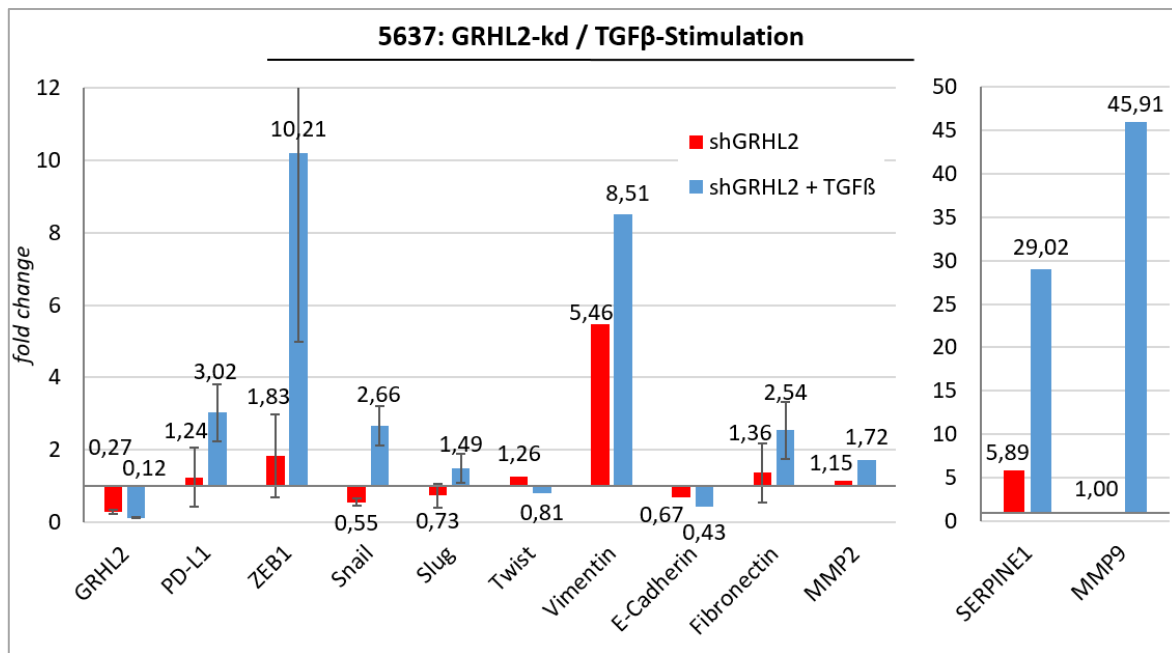


Abbildung 39: Durch GRHL2-kd sowie TGFβ-Stimulation induzierte EMT-Veränderungen in der Genexpression (Zelllinie 5637)

qRT-PCR-Analyse der Änderung (*fold change*) der relativen Transkriptmengen von PD-L1 und EMT-Markern in 5637-Zellen nach GRHL2-kd sowie nach zusätzlicher TGFβ-Stimulation (10 ng/mL, 3 Tage). Die jeweilige Genexpression wurde auf die Expression von β-Actin normalisiert und in Relation zu unbehandelten Kontrollzellen dargestellt. Fehlerbalken indizieren die Standardabweichung der Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten.

Der shRNA-vermittelte GRHL2-kd konnte auch auf transkriptioneller Ebene nachgewiesen werden (0,27-fach) und in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Western-Blot-Analyse (Abbildung 38) wurde die Menge der GRHL2-mRNA durch zusätzliche TGFβ-Behandlung noch weiter vermindert (0,12-fach). Die auf Proteinebene beobachtete PD-L1-Zunahme durch GRHL2-kd ließ sich auf Transkriptebene nicht nachweisen, wohl aber der Anstieg durch die TGFβ-Behandlung der 5637-shGRHL2-Zellen.

Während auf Proteinebene trotz GRHL2-kd kein ZEB1-Protein nachgewiesen werden konnte (Abbildung 38), wurde durch die TGFβ-Behandlung der 5637-shGRHL2-Zellen ein Anstieg von ZEB1-Transkript (ca. 10-fach) detektiert. Die Transkriptmenge war dabei jedoch so gering, dass die Bestimmung Schwankungen unterlag, welche zu erhöhten Standardabweichungen führten. Das Expressionsniveau von ZEB1 blieb trotz transkriptionellem Anstieg unter der Detektionsgrenze im Western-Blot (Abbildung 38A). Die Expression der Snail-Gentranskripte war nach GRHL2-kd erniedrigt (0,55-fach), jedoch durch die zusätzliche TGFβ-Stimulation erhöht (2,7-fach). Die Transkription von Slug und Twist hingegen wurde durch GRHL2-kd und TGFβ nicht eindeutig beeinflusst.

Weitere EMT-anzeigende Veränderungen auf Transkriptionsebene waren der Anstieg der Vimentin-, Fibronectin-, SerpinE1-, MMP2- und MMP9-Expression sowie die verringerte Expression des E-Cadherin-Gens. Die TGFβ-Behandlung der 5637-shGRHL2-Zellen zeigte hierbei jeweils stärkere Effekte als der alleinige GRHL2-kd.

Zusammengefasst lässt sich schlussfolgern, dass sowohl die Stimulation mit TGF β als auch der GRHL2-kd in 5637-Zellen zu EMT-Veränderungen führten und diese durch die Kombination beider experimenteller Ansätze zusätzlich verstärkt werden konnten. Die Änderungen manifestierten sich in der Zellmorphologie und auf Transkript- sowie Proteinebene, wobei die verschiedenen analysierten EMT-anzeigenden Proteine abhängig vom experimentellen Ansatz in unterschiedlichem Maße beeinflusst wurden. Der Anstieg der PD-L1-Expression korrelierte mit dem Grad der Veränderungen hin zu mesenchymalen Eigenschaften. Während die TGF β -Stimulation bereits die Transkription des PD-L1-Gens induzieren konnte (Abbildung 36), führte der GRHL2-kd erst auf Proteinebene zu einem Anstieg der PD-L1-Expression. Im Vergleich zur alleinigen TGF β -Behandlung wurde die PD-L1-Proteinexpression durch zusätzlichen *knockdown* von GRHL2 noch gesteigert.

3.5.5 Induktion des EMT-Prozesses durch ZEB1-Überexpression

Im Folgenden sollte herausgefunden werden, welche weiteren, mit der EMT-Induktion assoziierten Faktoren die PD-L1-Expression beeinflussen können. Da der Transkriptionsfaktor ZEB1 in 5637-Zellen trotz GRHL2-kd kein detektierbares Proteinniveau erreichte (Abbildung 38), aber eine Regulation von PD-L1 über die Achse ZEB1/miR-200 postuliert wurde [61, 62], wurde das ZEB1-Gen im nächsten Schritt in den Zelllinien 5637 und BFTC-905 überexprimiert. Zunächst wurde das Plasmid mithilfe des kationischen Detergenz Polyethylenimin (PEI) in verschiedene UCB-Zelllinien eingebracht. Die Selektion von ZEB1-überexprimierenden Zellen blieb jedoch erfolglos. Aus der anschließenden Überexpression in 5637-Zellen mittels retroviralem Gentransfer ließen sich zwar puromycinresistente Zellen selektionieren, jedoch waren diese in der Western-Blot-Analyse weiterhin negativ für ZEB1. Erst durch eine transiente, retroviral vermittelte Überexpression ohne Selektion wurden 5637-Zellen generiert, die in der unmittelbar folgenden Analyse detektierbares ZEB1-Protein aufwiesen. Außerdem wurden diese ZEB1-überexprimierenden Zellen zusätzlich mit TGF β stimuliert. Die Morphologie sowie die Proteinexpression sind in Abbildung 40 dargestellt.

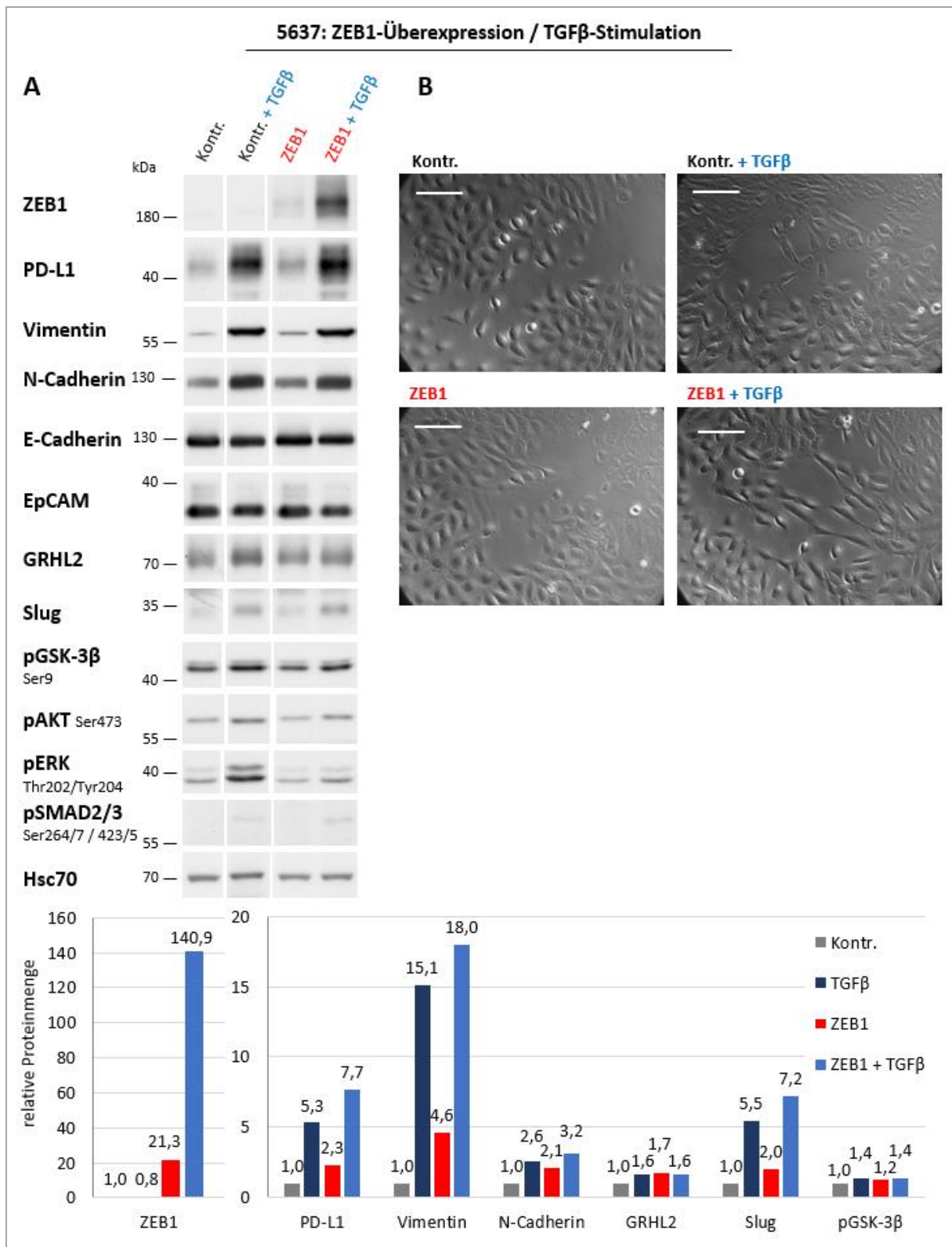


Abbildung 40: Durch ZEB1-Überexpression sowie TGFβ-Stimulation induzierte EMT-Veränderungen der Zellmorphologie und Proteinexpression (Zelllinie 5637)

Analyse von 5637-Zellen nach ZEB1-Überexpression sowie nach zusätzlicher TGFβ-Stimulation (10 ng/mL, 2 Tage) (A) Mittels Western-Blot-Analyse wurden die Expression von PD-L1 und EMT-indikativen Proteinen sowie Phosphorylierungsprofile zentraler Signalwege untersucht. Die Detektion von Hsc70 diente als Kontrolle für die Beladung mit gleichen Proteinmengen. Für ausgewählte Western-Blot-Analysen wurde die relative Änderung der Proteinmenge densitometrisch quantifiziert und auf die Expression von Hsc70 normalisiert. (B) Mikroskopische Dokumentation der Zellmorphologie. Die Maßstabsleiste entspricht 100 μm.

EMT-ähnliche Eigenschaften der 5637-Zellen ließen sich kaum durch die alleinige Überexpression von ZEB1, aber durch TGF β -Behandlung von 5637-ZEB1-Zellen erzielen. Hierbei muss bedacht werden, dass ZEB1 nur transient überexprimiert werden konnte. Außerdem konnten die Zellen lediglich zwei Tage mit TGF β behandelt werden. Dennoch war eine Überexpression von ZEB1-Protein nachweisbar (21-fach), die durch TGF β noch deutlich gesteigert wurde (141-fach). Die PD-L1-Expression wurde hauptsächlich durch TGF β -Behandlung (5,3-facher Anstieg) und in geringerem Maße von ZEB1 (2,3-facher Anstieg) beeinflusst. Unter den analysierten Markern konnten kaum durch ZEB1 vermittelte EMT-Effekte detektiert werden, lediglich ein Vimentin-Anstieg (4,6-fach) und ein schwacher Anstieg (ca. 2-fach) der Expression von N-Cadherin und Slug. Auch die Expression von GRHL2 wurde nicht erniedrigt. Der Anstieg der N-Cadherin- und Slug-Proteinexpression sowie die Senkung der E-Cadherin- und EpCAM-Expression wurden ausschließlich nach TGF β -Stimulation beobachtet. Ebenso wurden die Proteinmengen von pAKT, pSMAD2 und pSMAD3 nur durch TGF β -Behandlung gesteigert. Interessanterweise waren die Proteinmengen von pAKT und Slug in den vorausgegangenen Versuchen nicht von TGF β beeinflusst, wohl aber die Transkription von Slug (Abbildung 36). Die bereits zuvor bei alleiniger TGF β -Stimulation beobachtete Erhöhung der Menge an phosphoryliertem ERK (Abbildung 36) zeigte sich auch in diesem Versuch. Allerdings traten auch hier Schwankungen in der detektierten Proteinmenge unter den drei Replikaten trotz gleichmäßiger Beladung mit Gesamtprotein auf. Obwohl die Änderungen in der Proteinmenge von pGSK-3 β sehr gering waren, gab es dennoch eine Tendenz zu einer Korrelation mit der PD-L1-Expression.

Die PD-L1-mRNA-Expression wurde über qRT-PCR ermittelt und ist zusammen mit der Genexpression ausgewählter EMT-anzeigender Transkripte in Abbildung 41 dargestellt.

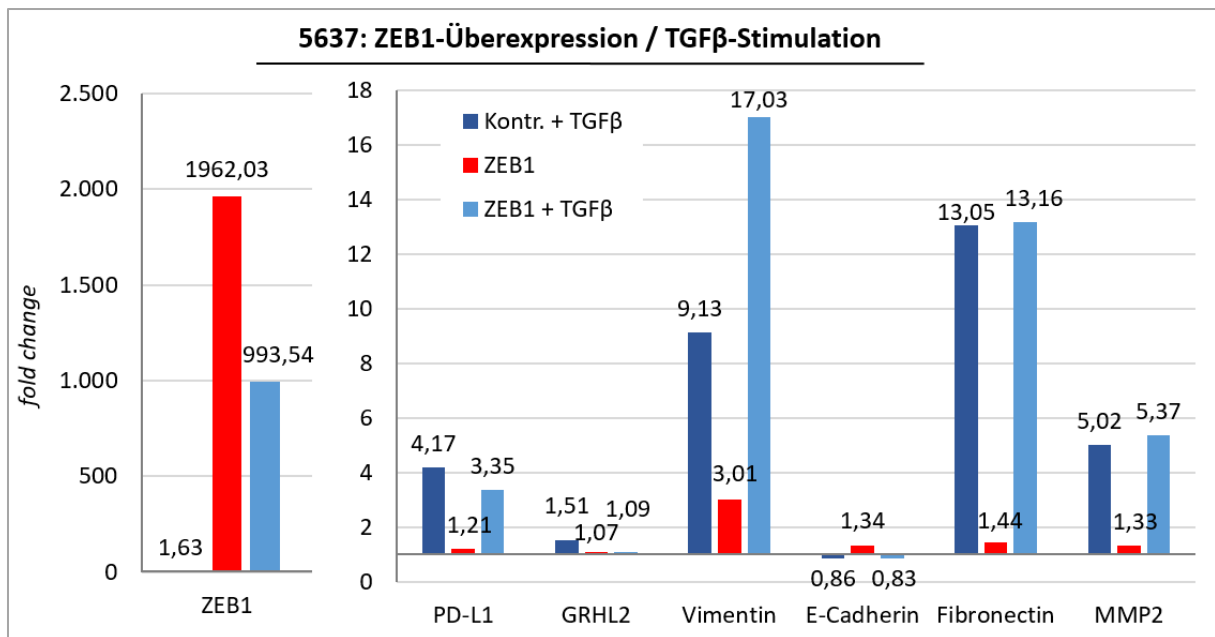


Abbildung 41: Durch ZEB1-Überexpression sowie TGFβ-Stimulation induzierte EMT-Veränderungen in der Genexpression (Zelllinie 5637)

qRT-PCR-Analyse der Änderung (*fold change*) der relativen Transkriptmengen von PD-L1 und EMT-Markern in 5637-Zellen nach ZEB1-Überexpression sowie nach zusätzlicher TGFβ-Stimulation (10 ng/mL, 2 Tage). Die jeweilige Genexpression wurde auf die Expression von β-Actin normalisiert und in Relation zu unbehandelten Kontrollzellen dargestellt.

Die Überexpression von ZEB1 konnte auch auf transkriptioneller Ebene nachgewiesen werden. Durch TGFβ-Behandlung wurde die ZEB1-Transkriptmenge deutlich verringert, obwohl im gleichen Ansatz in der Western Blot-Analyse ein weiterer starker Anstieg der ZEB1-Proteinexpression (um Faktor 6,7) detektiert wurde (Abbildung 40). Lediglich die Vimentin-mRNA-Expression wurde durch alleinige ZEB1-Überexpression erhöht, während die Expression von PD-L1, GRHL2, E-Cadherin, Fibronectin und MMP2 unbeeinflusst blieb. Änderungen dieser Transkripte wurden ausschließlich in TGFβ-stimulierten Zellen detektiert. Eine MMP9-Genexpression war in diesem Versuch nicht detektierbar.

Zusammenfassend konnten durch die alleinige ZEB1-Überexpression also nur schwache Veränderungen in 5637-Zellen detektiert werden, darunter ein geringer Anstieg der Vimentin- und der PD-L1-Expression. Unter zusätzlicher TGFβ-Behandlung reagierten jedoch einige 5637-ZEB1-Zellen mit spindelförmigen morphologischen Veränderungen.

Mit der Zelllinie BFTC-905 konnten, im Gegensatz zu 5637, Zellen mit stabiler ZEB1-Überexpression generiert werden. Die Analyse der Morphologie und Proteinexpression der Zellen ist Abbildung 42 dargestellt.

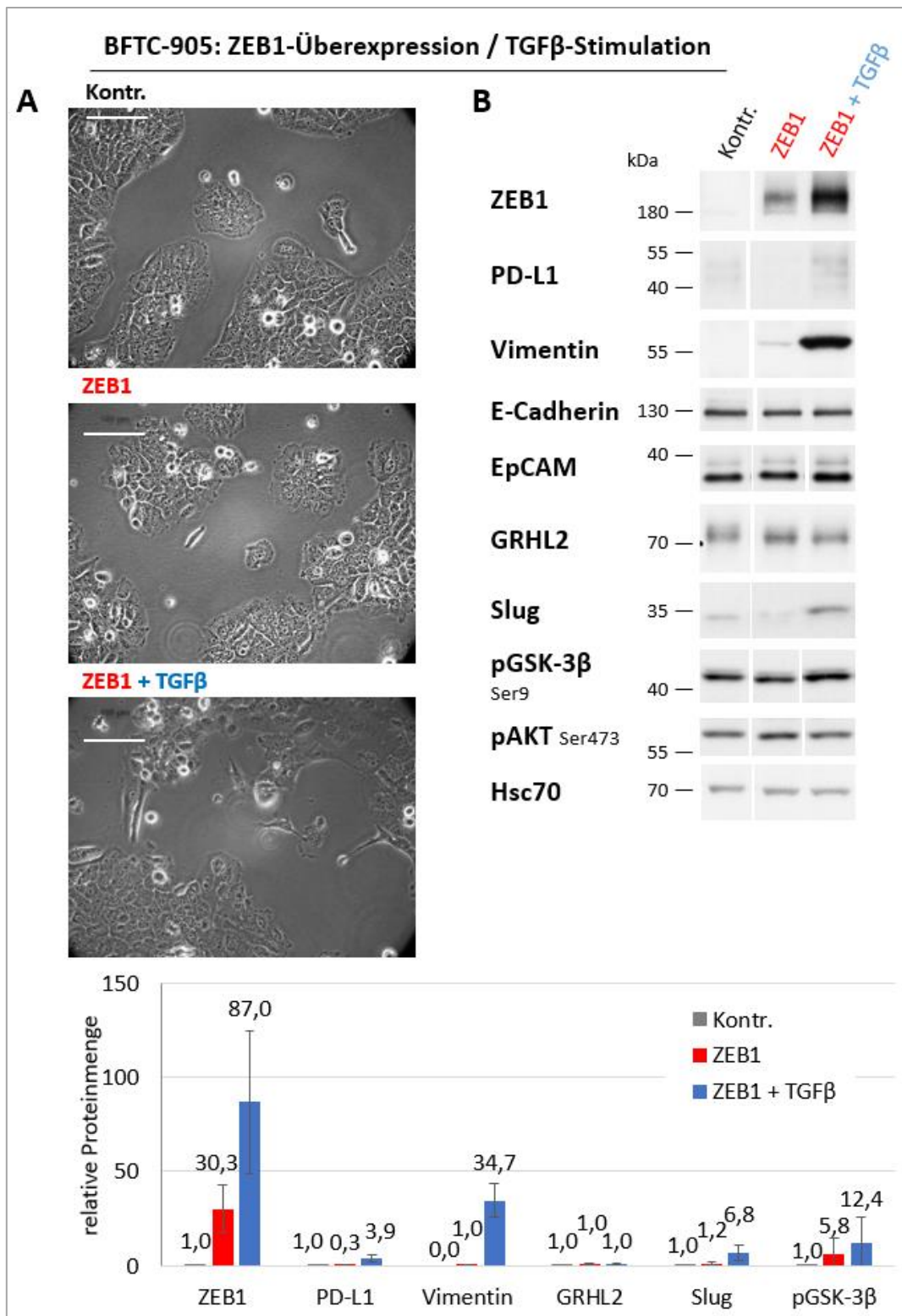


Abbildung 42: Durch ZEB1-Überexpression sowie TGFβ-Stimulation induzierte EMT-Veränderungen der Zellmorphologie und Proteinexpression (Zelllinie BFTC-905)

BFTC-905-Zellen wurden einer ZEB1-Überexpression und einer Stimulation mit TGFβ (10 ng/mL, 3 Tage) unterzogen. (A) Mikroskopische Dokumentation der Zellmorphologie. Die Maßstabsleiste entspricht 100 µm. (B) Mittels Western-Blot-Analyse wurden die Expression von PD-L1 und EMT-indikativen Proteinen sowie Phosphorylierungsprofile untersucht. Die Detektion von Hsc70 diente als Kontrolle für die Beladung mit gleichen Proteinmengen. Abgebildet sind repräsentative Bandenmuster aus 3 biologischen Replikaten. Für ausgewählte Western-Blot-Analysen wurde die relative Änderung der Proteinmenge densitometrisch quantifiziert und auf die Expression von Hsc70 normalisiert.

Die Überexpression von ZEB1 bewirkte keine auffälligen morphologischen Veränderungen in BFTC-905. Erst die zusätzliche Behandlung mit TGF β führte dazu, dass einige Zellen eine spindelförmige Morphologie und weniger Zell-Zell-Kontakte aufwiesen. Generell bestand jedoch weiterhin die Gruppierung in inselförmigen Zellverbänden. Die Überexpression von ZEB1-Protein wurde nachgewiesen (30-fach) und, wie auch bei 5637 beobachtet, durch TGF β noch deutlich gesteigert (87-fach). Die ZEB1-Überexpression bewirkte jedoch keine Heraufregulation von PD-L1, sondern sogar eher eine Herabregulation. Ein schwacher Anstieg von Vimentin deutete auf EMT-Veränderungen der Zellen hin. Die zusätzliche Behandlung mit TGF β hingegen bewirkte einen deutlichen Vimentin-Anstieg (34,7-fach) sowie eine Heraufregulation der PD-L1- (3,9-fach) und Slug-Proteinexpression (6,8-fach).

Die mRNA-Expression ausgewählter Gene in ZEB1-überexprimierenden BFTC-905 mittels qRT-PCR ist in Abbildung 43 dargestellt.

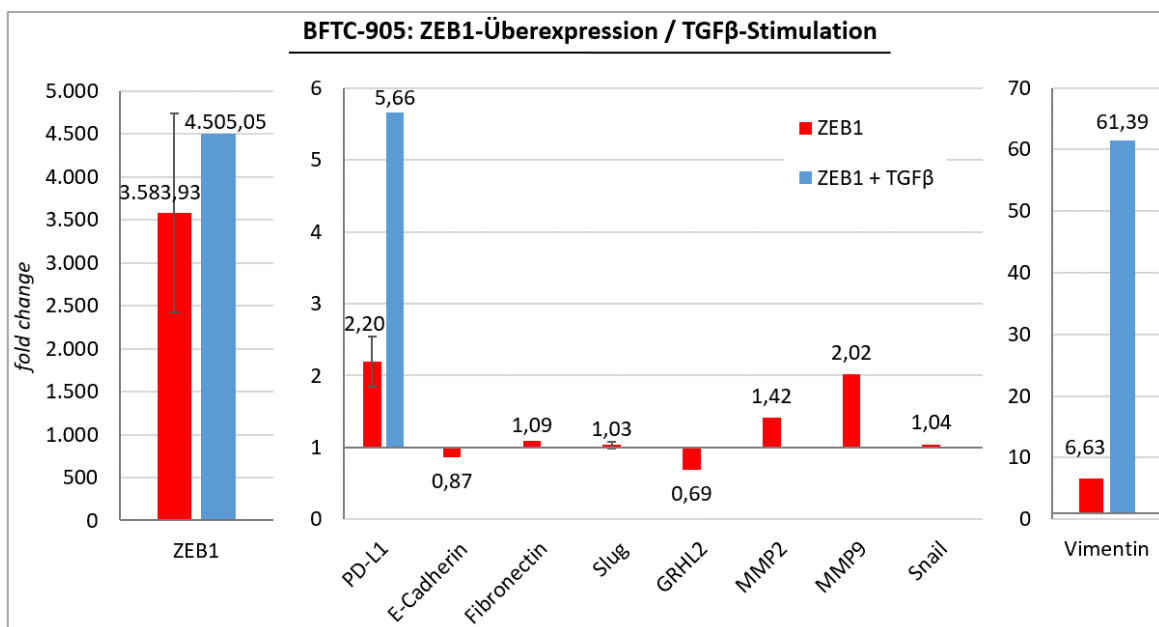


Abbildung 43: Durch ZEB1-Überexpression sowie TGF β -Stimulation induzierte EMT-Veränderungen in der Genexpression (Zelllinie BFTC-905)

qRT-PCR-Analyse der Änderung (*fold change*) der relativen Transkriptmengen von PD-L1 und EMT-Markern in BFTC-905-Zellen nach ZEB1-Überexpression sowie nach zusätzlicher TGF β -Stimulation (10 ng/mL, 3 Tage). Die jeweilige Genexpression wurde auf die Expression von β -Actin normalisiert und in Relation zu unbehandelten Kontrollzellen dargestellt. Fehlerbalken indizieren die Standardabweichung der Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten.

In BFTC-905-ZEB1 wurde ein starker Anstieg der ZEB1-mRNA (ca. 3.580-fach) nachgewiesen. Im Gegensatz zu den Beobachtungen in 5637-Zellen wurde die ZEB1-Transkriptmenge durch die zusätzliche Behandlung mit TGF β nicht gemindert (Abbildung 41), sondern erhöht. Obwohl die PD-L1-Proteinmenge durch ZEB1-Überexpression vermindert wurde (Abbildung 42), konnte ein Anstieg der Transkriptmenge detektiert werden (2,2-fach). Dieser wurde durch TGF β weiter verstärkt (5,7-fach), was dann mit der detektierten Proteinzunahme (Abbildung

42) übereinstimmte. Die Transkription von Vimentin zeigte übereinstimmend mit den Ergebnissen der Western-Blot-Analyse einen Anstieg durch ZEB1-Überexpression (6,6-fach) und eine Verstärkung des Effekts durch TGF β -Stimulation (61,4-fach). Die Überexpression von ZEB1 bewirkte eine Herabregulation von GRHL2- sowie einen Anstieg von MMP9-Transkripten, was schwache EMT-Veränderungen anzeigte.

Zusammengefasst löste die Überexpression von ZEB1 in BFTC-905, ähnlich zu 5637, nur geringe EMT-Veränderungen aus. Ein in BFTC-905 auf Transkriptionsebene beobachteter Anstieg der PD-L1-Expression führte nicht durch die alleinige Überexpression von ZEB1, sondern nur in Kombination mit TGF β auch zu einem Anstieg der PD-L1-Proteinexpression. Dies lässt vermuten, dass synergistische Effekte zwischen der ZEB1-Überexpression und der TGF β -Behandlung vorliegen und dass die Proteinstabilität an der Regulation von PD-L1 beteiligt ist.

3.5.6 Induktion des EMT-Prozesses durch Slug-Überexpression

In der Zelllinie 5637 kam es durch TGF β -Behandlung zum Anstieg der Slug-spezifischen Transkriptmenge; im Gegensatz zur mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren ZEB1, Snail und Twist, die durch eine TGF β -Stimulation nicht beeinflusst wurde (Abbildung 36). Deshalb sollte im nächsten Schritt der Einfluss einer Überexpression des Slug-Gens auf die PD-L1-Expression in den Zelllinien 5637 und BFTC-905 getestet werden. Die durch retroviralen Gentransfer vermittelte Überexpression erfolgte unter Verwendung des Plasmids pMXs-IP-C-HA-Slug (3.1.2). Die Analyse der Morphologie sowie der Proteinexpression von Slug-überexprimierenden 5637-Zellen ist in Abbildung 44 dargestellt.

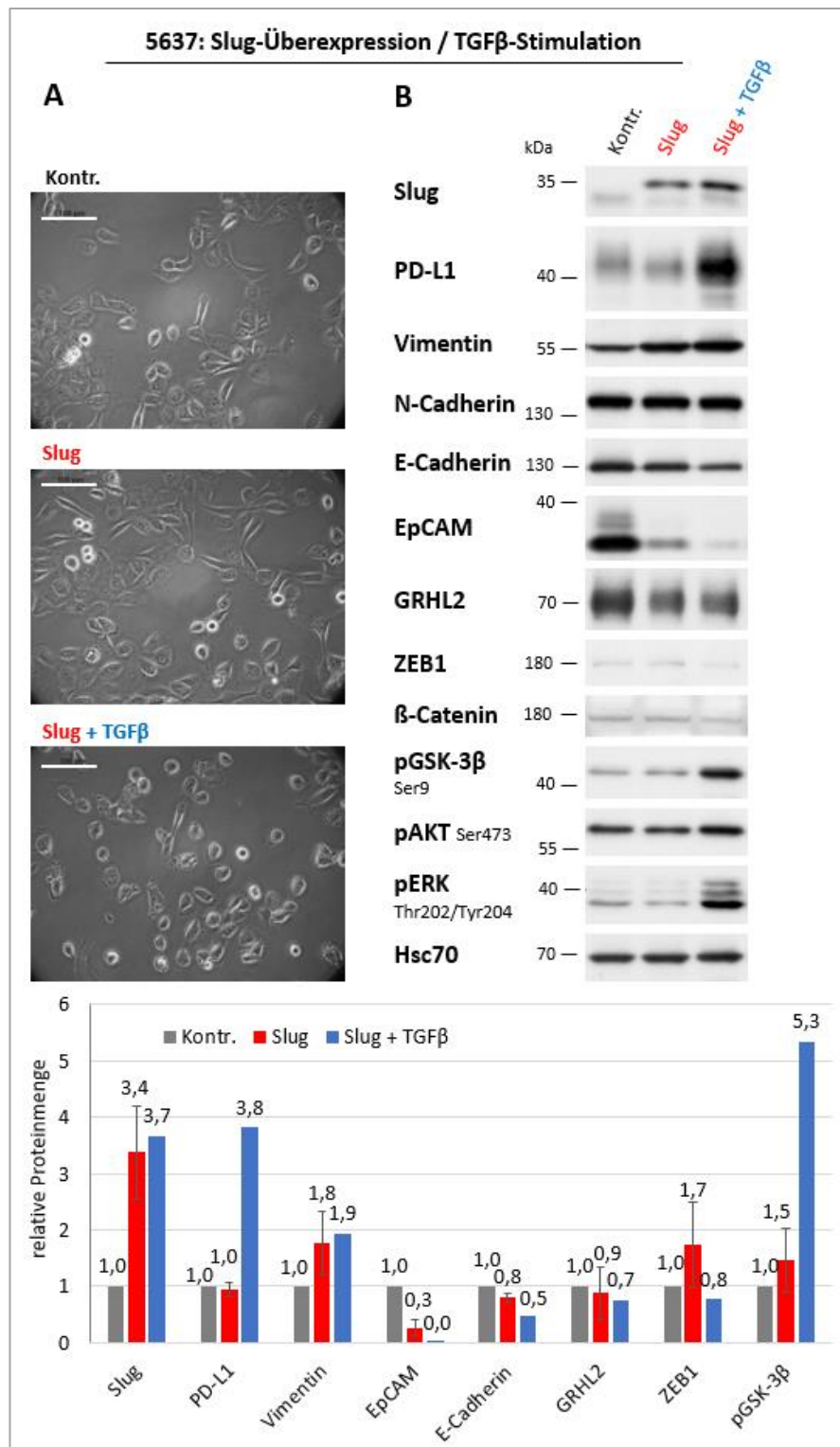


Abbildung 44: Durch Slug-Überexpression sowie TGF β -Stimulation induzierte EMT-Veränderungen der Zellmorphologie und Proteinexpression (Zelllinie 5637)

Analyse von 5637-Zellen nach Slug-Überexpression sowie nach zusätzlicher TGF β -Stimulation (10 ng/mL, 3 Tage) (A) Mikroskopische Dokumentation der Zellmorphologie. Die Maßstabsleiste entspricht 100 μ m. (B) Mittels Western-Blot-Analyse wurden die Expression von PD-L1 und EMT-indikativen Proteinen sowie Phosphorylierungsprofile untersucht. Exogenes Slug wurde aufgrund des HA-tags mit höherem Molekulargewicht detektiert als das endogene Protein. Die Detektion von Hsc70 diente als Kontrolle für die Beladung mit gleichen Proteinmengen. Abgebildet sind repräsentative Bandenmuster aus 3 biologischen Replikaten. Für ausgewählte Western-Blot-Analysen wurde die relative Änderung der Proteinmenge densitometrisch quantifiziert und auf die Expression von Hsc70 normalisiert.

Während die Slug-Überexpression keine auffälligen morphologischen Veränderungen bewirkte, führte die TGF β -Stimulation von 5637-Slug-Zellen zu einem Rückgang der Zell-Zell-Kontakte als Merkmal für EMT, jedoch auch zu eher runden Zellen (Abbildung 44A). Die Überexpression des Slug-Proteins (3,4-fach) konnte durch Western-Blot-Analyse bestätigt werden. Die alleinige Slug-Überexpression führte nicht zur Heraufregulation von PD-L1, jedoch zu einem Anstieg der Vimentin-Proteinexpression (1,8-fach) und zu einer Herabregulation der Expression von EpCAM (0,3-fach) als Hinweise auf eine EMT-Induktion. Die TGF β -Behandlung von 5637-Slug-Zellen führte nicht zu einer weiteren Erhöhung der Slug-Expression. Es wurde jedoch ein zusätzlicher Effekt auf die Expression von E-Cadherin und EpCAM beobachtet. Die EpCAM-Expression wurde deutlich stärker von der Slug-Überexpression beeinflusst als vom GRHL2-kd oder von der ZEB1-Überexpression (Abbildung 38 und Abbildung 40). In TGF β -behandelten 5637-Slug-Zellen wurde eine verstärkte Phosphorylierung von GSK-3 β (5,3-fach) und ERK detektiert, was mit dem Anstieg der PD-L1-Expression in diesen Zellen korrelierte.

Die Ergebnisse der qRT-PCR zur Analyse der PD-L1-mRNA-Expression sowie von ausgewählten EMT-anzeigenden Transkripten ist in Abbildung 45 dargestellt.

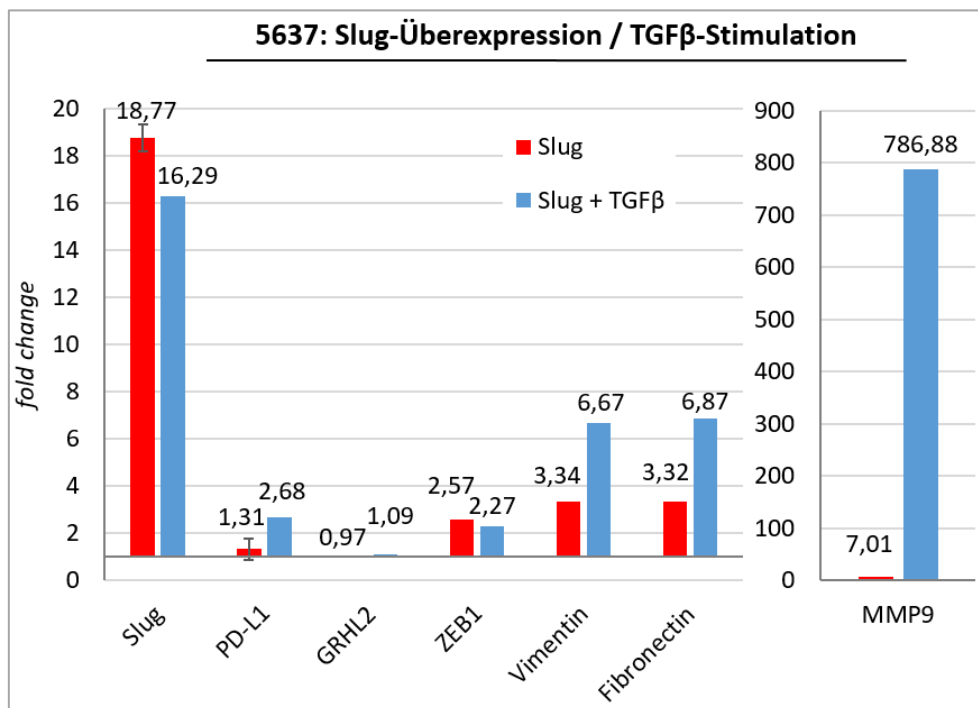


Abbildung 45: Durch Slug-Überexpression sowie TGF β -Stimulation induzierte EMT-Veränderungen in der Genexpression (Zelllinie 5637)

qRT-PCR-Analyse der Änderung (*fold change*) der relativen Transkriptmengen von PD-L1 und EMT-Markern in 5637-Zellen nach Slug-Überexpression sowie nach zusätzlicher TGF β -Stimulation (10 ng/mL, 3 Tage). Die jeweilige Genexpression wurde auf die Expression von β -Actin normalisiert und in Relation zu unbehandelten Kontrollzellen dargestellt. Fehlerbalken indizieren die Standardabweichung der Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten.

Die Überexpression des Slug-Gens wurde durch einen Anstieg der spezifischen mRNA (18,8-fach) bestätigt und bewirkte eine Zunahme der Transkription der Vimentin-, Fibronectin- und MMP9-Gene, die jeweils durch TGF β noch zusätzlich gesteigert werden konnte. Die PD-L1-mRNA-Expression wurde analog zum PD-L1-Protein ausschließlich durch TGF β beeinflusst, wobei der *fold change* (2,7-fach) nicht höher war als bei der alleinigen TGF β -Stimulation (Abbildung 36).

Die Überexpression von Slug in 5637-Zellen zeigte, dass nicht alle auf eine EMT hinweisenden Veränderungen auch mit einem Anstieg der PD-L1-Expression einhergehen. So bewirkte die Überexpression von Slug zwar eine EMT-Induktion (u.a. ZEB1- und Vimentin-Zunahme sowie EpCAM-Abnahme), jedoch weder auf mRNA- noch auf Proteinebene einen Anstieg der PD-L1-Expression. Dieser wurde erst durch die TGF β -Behandlung von 5637-Slug-Zellen erzielt.

Der Transkriptionsfaktor Slug wurde auch in BFTC-905 mit dem Ziel eine EMT zu induzieren überexprimiert. Die Analyse der Morphologie sowie Proteinexpression der Zellen ist in Abbildung 46 dargestellt.

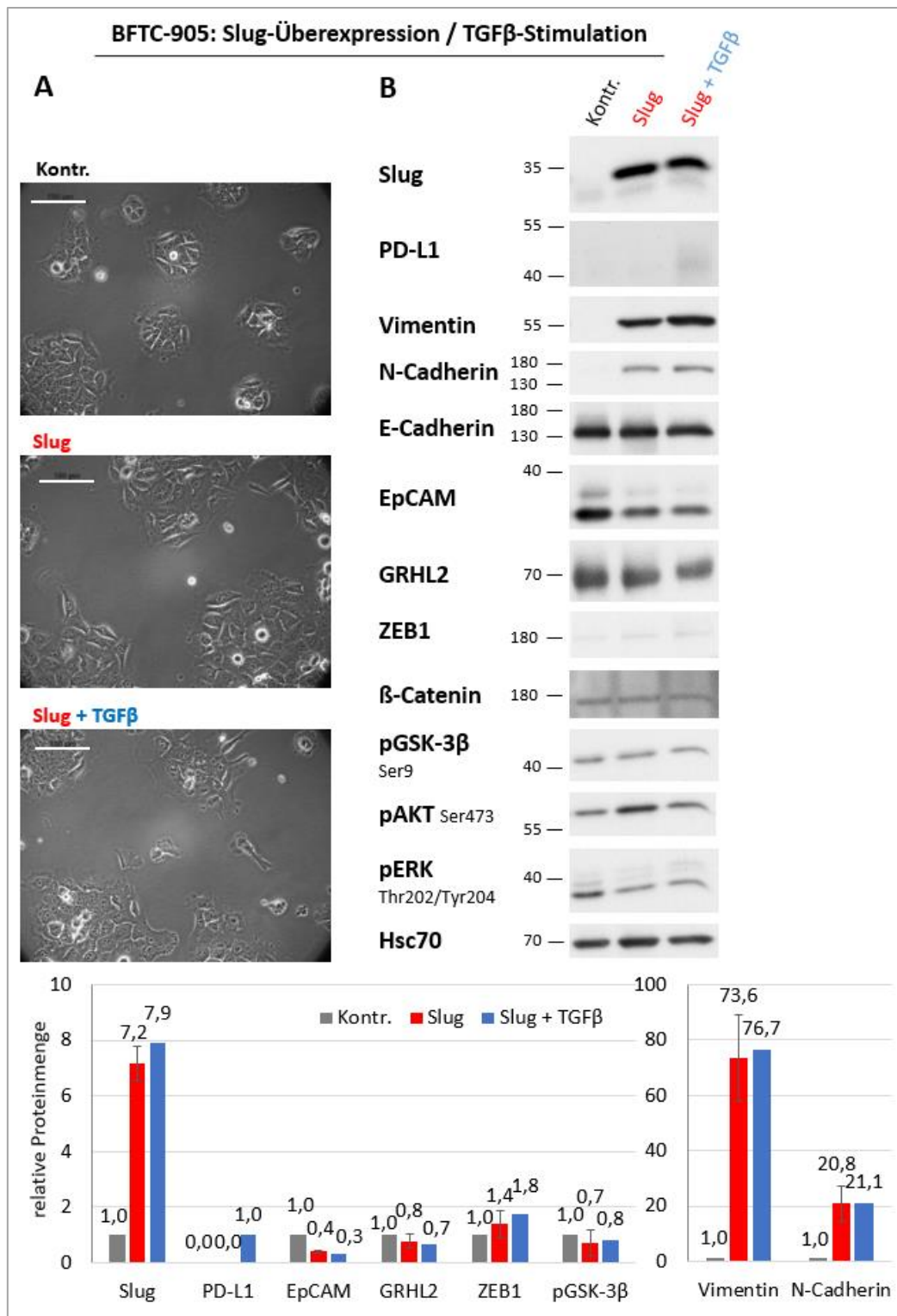


Abbildung 46: Durch Slug-Überexpression sowie TGFβ-Stimulation induzierte EMT-Veränderungen der Zellmorphologie und Proteinexpression (Zelllinie BFTC-905)

Analyse von BFTC-905-Zellen nach Slug-Überexpression sowie nach zusätzlicher TGFβ-Stimulation (10 ng/mL, 3 Tage) (A) Mikroskopische Dokumentation der Zellmorphologie. Die Maßstabsleiste entspricht 100 μm. (B) Mittels Western-Blot-Analyse wurden die Expression von PD-L1 und EMT-indikativen Proteinen sowie Phosphorylierungsprofile untersucht. Exogenes Slug wurde aufgrund des HA-tags mit höherem Molekulargewicht detektiert als das endogene Protein. Die Detektion von Hsc70 diente als Kontrolle für die Beladung mit gleichen Proteinmengen. Abgebildet sind repräsentative Bandenmuster aus 3 biologischen Replikaten. Für ausgewählte Western-Blot-Analysen wurde die relative Änderung der Proteinmenge densitometrisch quantifiziert und auf die Expression von Hsc70 normalisiert.

Sowohl durch die alleinige Slug-Überexpression als auch durch die TGF β -Behandlung von BFTC-905-Slug wies ein zunehmender Anteil der Zellen eine spindelförmige Morphologie und weniger Zell-Zell-Kontakte auf. Die Überexpression von Slug wurde in der Western Blot-Analyse bestätigt (7,2-fach) und konnte durch TGF β -Behandlung von BFTC-905-Slug nicht eindeutig weiter gesteigert werden. Ein Anstieg der PD-L1-Proteinexpression wurde nicht durch die alleinige Slug-Überexpression, wohl aber durch die Kombination mit TGF β ausgelöst. Anzeichen für eine Slug-induzierte EMT waren der Anstieg in der Proteinexpression von Vimentin (73,6-fach) und N-Cadherin (20,8-fach) sowie die Herabregulation der EpCAM-Expression (0,4-fach). Die TGF β -Behandlung der Slug-überexprimierenden Zellen bewirkte außerdem eine schwache Herabregulation von GRHL2 (0,7-fach) und einen geringfügigen weiteren Rückgang von EpCAM (von 0,4-fach auf 0,3-fach). Die Proteinmenge an pAKT war erhöht bei Slug-Überexpression, wobei der Effekt bei TGF β -Behandlung der Slug-überexprimierenden Zellen nicht weiter bestand. Die Proteinmenge an pERK hingegen war unter beiden EMT-induzierenden Bedingungen verringert.

Die Ergebnisse der qRT-PCR zur Analyse der PD-L1-mRNA-Expression sowie von ausgewählten EMT-anzeigenden Transkripten ist in Abbildung 47 dargestellt.

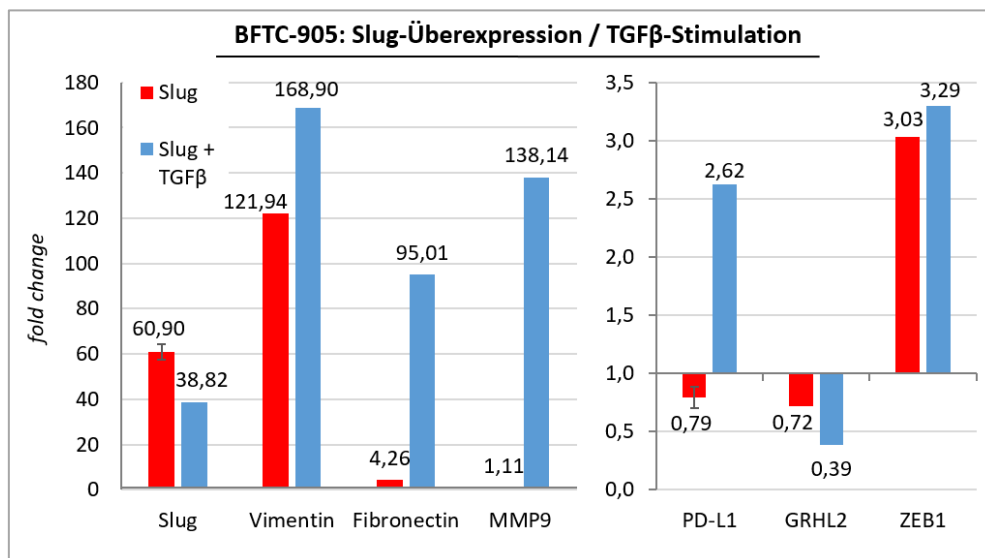


Abbildung 47: Durch Slug-Überexpression sowie TGF β -Stimulation induzierte EMT-Veränderungen in der Genexpression (Zelllinie BFTC-905)

qRT-PCR-Analyse der Änderung (*fold change*) der relativen Transkriptmengen von PD-L1 und EMT-Markern in BFTC-905-Zellen nach Slug-Überexpression sowie nach zusätzlicher TGF β -Stimulation (10 ng/mL, 3 Tage). Die jeweilige Genexpression wurde auf die Expression von β -Actin normalisiert und in Relation zu unbehandelten Kontrollzellen dargestellt. Fehlerbalken indizieren die Standardabweichung der Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten.

Die Überexpression von Slug konnte auch auf transkriptioneller Ebene nachgewiesen werden (61-fach). Zur verstärkten Transkription des PD-L1-Gens kam es nicht durch alleinige Slug-Überexpression, sondern erst durch TGF β -Behandlung von BFTC-905-Slug-Zellen (2,6-fach). EMT-anzeigend war in BFTC-905-Slug die verstärkte Transkription von ZEB1, Vimentin und

Fibronectin, wobei letztere durch TGF β weiter erhöht wurde. Die TGF β -Behandlung von BFTC-905-Slug bewirkte auch eine Zunahme der MMP9-Transkription. Die GRHL2-Transkription wurde durch die Slug-Überexpression verringert und nahm durch TGF β -Stimulation von BFTC-905-Slug-Zellen noch weiter ab.

Die Überexpression von Slug führte in BFTC-905-Zellen zu deutlichen EMT-Veränderungen auf Protein- und mRNA-Ebene, welche durch die Behandlung mit TGF β noch stärker ausgeprägt waren. Effekte auf PD-L1 ließen sich sowohl transkriptionell als auch auf Proteinebene lediglich durch TGF β -Stimulation der Slug-überexprimierenden Zellen beobachten, was einen synergistischen Effekt von exogenem Slug und TGF β vermuten lässt. Auch dieser experimentelle Ansatz zeigte, analog zu den Ergebnissen mit 5637-Slug-Zellen, dass nicht alle EMT-anzeigenden Veränderungen (u.a. Anstieg der Vimentin- und N-Cadherin-Expression sowie Verringerung der EpCAM-Expression bei Slug-Überexpression) auch mit einem Anstieg der PD-L1-Expression einhergehen.

Zusammenfassend zeigte die durch verschiedene experimentelle Ansätze erzielte EMT-Induktion in den Zelllinien 5637 und BFTC-905, dass Veränderungen von EMT-anzeigenden Transkripten oder Proteinen zwar häufig aber nicht grundsätzlich mit einem Anstieg der PD-L1-Expression assoziiert sind. Die Proteinmenge an phosphorylierter GSK-3 β hingegen ist in 5637-Zellen immer mit der PD-L1-Expression assoziiert. Daher stellt sich die Frage, welchen Einfluss die Aktivität von GSK-3 β auf die PD-L1-Expression hat und wodurch die Phosphorylierung von GSK-3 β vermittelt wird. Eine mögliche Regulation der PD-L1-Expression durch GSK-3 β -Aktivität wird in 3.6 untersucht.

3.6 Untersuchungen zur potenziellen Regulation von PD-L1 durch GSK-3 β

In den Versuchen zur Induktion von EMT (3.5) in der Zelllinie 5637 wurde eine Korrelation von erhöhter PD-L1-Proteinexpression mit dem Nachweis von phosphorylierter GSK-3 β beobachtet. Die Phosphorylierung von GSK-3 β an Serin 9 bewirkt die Inaktivierung der Kinase [158]. Im Promotionsprojekt wurden unter allen Bedingungen, die einen PD-L1-Anstieg bewirkten (vor allem TGF β -Stimulation, GRHL2-kd und TGF β -Stimulation von GRHL2-kd-Zellen, aber in geringem Maße auch ZEB1-Überexpression), auch erhöhte Mengen von pGSK-3 β detektiert. Je stärker die PD-L1-Expression zunahm, desto stärker war auch der Anstieg der Proteinmenge von pGSK-3 β . Für das Mammakarzinom wurde beschrieben, dass GSK-3 β die Stabilität von PD-L1 beeinflussen kann [76]. Außerdem wurde im vorliegenden Projekt in vier UCB-Zelllinien mit PD-L1-kd in frühen Passagen ein zunächst unerwarteter Anstieg phosphorylierter Kinase beobachtet. Weiterhin wurde eine Verminderung inaktiver GSK-3 β bei gleichzeitig erhöhter GSK-3 β -Gesamtmenge und geringerer AKT-Phosphorylierung in RT-112-PD-L1 gezeigt (Abbildung 48). Daraus generierte sich die Hypothese, dass die Zellen auf diese Weise dem experimentell veränderten PD-L1-Expressionsniveau in einem Kompensationsmechanismus entgegenwirkten.

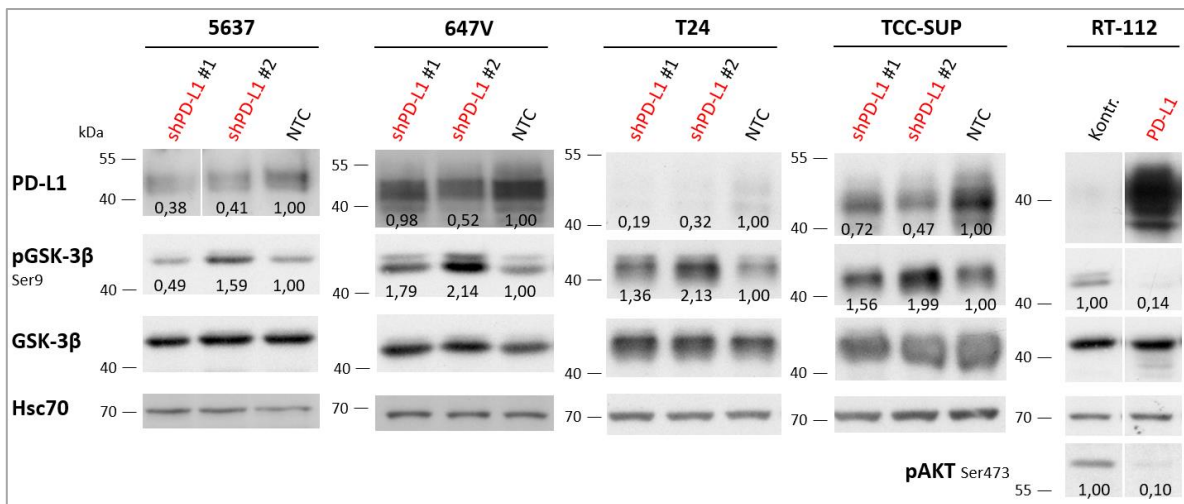


Abbildung 48: Beeinflussung der GSK-3β-Phosphorylierung durch modifizierte PD-L1-Expression

Western-Blot-Analyse der Serin 9-Phosphorylierung von GSK-3β, gesamt GSK-3β sowie AKT-Phosphorylierung in Zellen mit PD-L1-kd (5637, 647V, T24 und TCC-SUP) und PD-L1-Überexpression (RT-112). Die Detektion von Hsc70 diente als Kontrolle für die Beladung mit gleichen Proteinmengen. Die relative Änderung von Proteinmengen wurde densitometrisch quantifiziert und auf die Expression von Hsc70 normalisiert. Die Ergebnisse mit RT-112 zeigen repräsentative Bandenmuster aus 3 biologischen Replikaten.

Um einen möglichen kausalen Zusammenhang der erhöhten GSK-3β-Phosphorylierung mit erhöhter PD-L1-Expression in 5637-Zellen zu evaluieren, sollte die Aktivität von GSK-3β inhibiert werden. Hierzu wurden 5637-Zellen mit dem GSK-3-Inhibitor CHIR99021 behandelt. Die Analysen der PD-L1- und Vimentin-Expression sind in Abbildung 49 dargestellt.

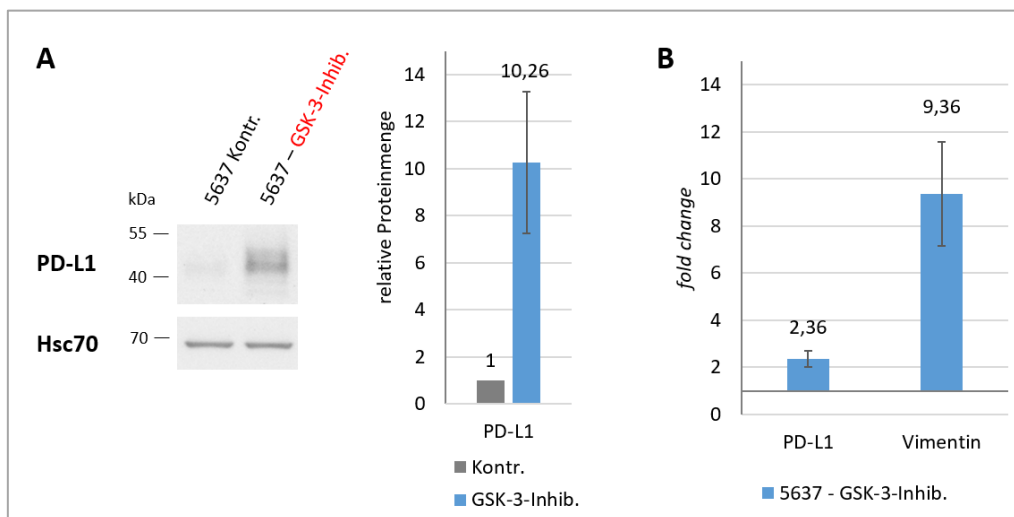


Abbildung 49: Effekte der GSK-3-Inhibition durch CHIR99021 in 5637-Zellen

5637-Zellen wurden für 3 Tage mit dem GSK-3-Inhibitor CHIR99021 (5 μM) vs. DMSO (1:2.000, Kontr.) behandelt. (A) Mittels Western-Blot-Analyse wurde die Expression von PD-L1 untersucht. Die Detektion von Hsc70 diente als Kontrolle für die Beladung mit gleichen Proteinmengen. Abgebildet sind repräsentative Bandenmuster aus 3 biologischen Replikaten. Die relative Änderung der Proteinmenge wurde densitometrisch quantifiziert und auf die Expression von Hsc70 normalisiert. (B) qRT-PCR-Analyse der Änderung (*fold change*) der relativen Transkriptmengen von PD-L1 und Vimentin. Die Genexpressionen wurden auf die Expression von β-Actin normalisiert und in Relation zu Kontrollzellen dargestellt. Fehlerbalken indizieren die Standardabweichung der Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten.

Die Inhibition von GSK-3 in 5637-Zellen führte zu einer eindeutigen Heraufregulation der PD-L1-Proteinexpression (ca. 10-fach). Auch die Transkription des PD-L1-Gens war erhöht (ca. 2,4-fach). Ein Genexpressionsanstieg von Vimentin deutete auf EMT-Veränderungen der Zellen hin.

In BFTC-905-Zellen wurde bei TGF β -Stimulation auch eine Korrelation der PD-L1-Expression mit der Proteinmenge an phosphorylierter GSK-3 β beobachtet. Hier gab es weder einen Anstieg von pGSK-3 β noch von PD-L1 (Abbildung 37). Daher sollte auch in dieser Zelllinie der Effekt einer GSK-3-Inhibition getestet werden. Anders als bei 5637-Zellen beeinflusste die Behandlung mit CHIR99021 in BFTC-905-Zellen das PD-L1-Expressionsniveau jedoch nicht (hier nicht gezeigt).

Um die Signalkette, die ausgehend von TGF β zur Erhöhung der PD-L1-Expression beiträgt, aufzuklären, sollte im Folgenden die Kinase identifiziert werden, die in 5637-Zellen an der Phosphorylierung und somit der Inaktivierung von GSK-3 β beteiligt ist. Hierzu gibt es bisher nur präliminäre Ergebnisse. Zunächst wurde AKT inhibiert, denn in PD-L1-überexprimierenden RT-112-Zellen wurden neben geringeren Mengen von pGSK-3 β auch verringerte Mengen von pAKT detektiert (Abbildung 48), was eine Regulation von GSK-3 β durch AKT vermuten lässt. Eine Behandlung von 5637-Zellen über ein bis drei Tage mit dem AKT-Inhibitor MK-2206 (0,1 – 10 μ M) führte weder zu verminderter GSK-3 β -Phosphorylierung noch zu verringerter PD-L1-Expression (hier nicht gezeigt).

Im nächsten Schritt sollte eine mögliche Beteiligung des mTOR-Signalwegs an der Phosphorylierung von GSK-3 β überprüft werden. Zwar verringerte die Inhibition von mTOR durch RAD001/Everolimus (1 μ M, 24 h) wie erwartet die Menge an phosphoryliertem S6, jedoch nicht die TGF β -vermittelte Erhöhung der PD-L1-Expression (hier nicht gezeigt).

Zur Eingrenzung von putativ an der GSK-3 β -Phosphorylierung beteiligten Signaltransduktionswegen sollte daraufhin die Beteiligung des TGF β -Rezeptors 1 (ALK5) und der TGF β -aktivierten Kinase 1 (TAK1) überprüft werden. Die Inhibition von ALK5 mit SB-431542 (10 μ M, 3 d) verhinderte wie zu erwarten den TGF β -vermittelten Anstieg von PD-L1 und Vimentin. Die Inhibition von TAK1 durch den Inhibitor 5Z7O (1 μ M, 3 d) führte hingegen nicht zu einer Blockierung des durch TGF β ausgelösten PD-L1-Anstiegs, sondern überraschenderweise zu einer weiteren Erhöhung der PD-L1-Expression (hier nicht gezeigt). Somit lässt sich zusammenfassend feststellen, dass die Inhibition von GSK-3 zu einem starken PD-L1-Anstieg auf Proteinebene (10,3-fach) und einem schwächeren PD-L1-Anstieg auf mRNA-Ebene (2,4-fach) führt. Die an der GSK-3 β -Phosphorylierung beteiligten Kinasen konnten bisher noch nicht identifiziert werden.

3.7 Detektion von zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) im Blut von UCB-Patienten und Nachweis der Vimentin- und PD-L1-Expression von CTCs

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass in Blutproben von UCB-Patienten mit dem CellSearch®-System detektierte zirkulierende Tumorzellen (CTCs) prognostische Bedeutung für das Überleben der Patienten besitzen [130, 131]. Das CellSearch®-System ermöglicht eine standardisierte und halbautomatische Ermittlung der Anzahl an CTCs in einem bestimmten Blutvolumen. Um diese CTCs phänotypisch weiter analysieren zu können, steht in diesem Gerät ein zusätzlicher Fluoreszenzkanal zur Verfügung, in dem die Expression eines Proteins mit Hilfe eines direkt fluoreszenzmarkierten Antikörpers bestimmt werden kann. Im Promotionsprojekt sollte nun für UCB-CTCs der Nachweis der PD-L1-Expression im CellSearch®-System etabliert werden und an Blutproben von UCB-Patienten validiert werden. Des Weiteren sollte ein Assay für den Nachweis der Vimentin-Expression von CTCs im CellSearch-System etabliert werden, um zu untersuchen, ob in UCB-Patienten hinsichtlich der EMT auch CTCs mit einem intermediären Phänotyp auftreten.

Zur Etablierung der PD-L1-Bestimmung auf Einzelzellen in Blutproben sollte zunächst mittels Multiplex-Immunfluoreszenz (2.4.5) die Detektierbarkeit von in Spenderblut transferierten UCB-Zelllinien-Zellen demonstriert werden (Abbildung 50). Hierfür wurden die Zelllinien 647V, RT-112-PD-L1 und UM-UC-3-PD-L1 ausgewählt. Diese waren durch CD45-Negativität sowie ihre Größe auch vor dem Hintergrund mononukleärer Zellen des peripheren Bluts (PBMCs, *peripheral blood mononuclear cells*) eindeutig identifizierbar. In Übereinstimmung mit Ergebnissen der Western-Blot-Analysen wurde lediglich in 647V- und RT-112-Zellen, jedoch nicht in UM-UC-3-Zellen Keratin-Expression nachgewiesen (Abbildung 19). Die PD-L1-Expression der Tumorzellen konnte mit den erwarteten Unterschieden im Expressionsniveau (vgl. Abbildung 11 und Abbildung 28) detektiert werden.

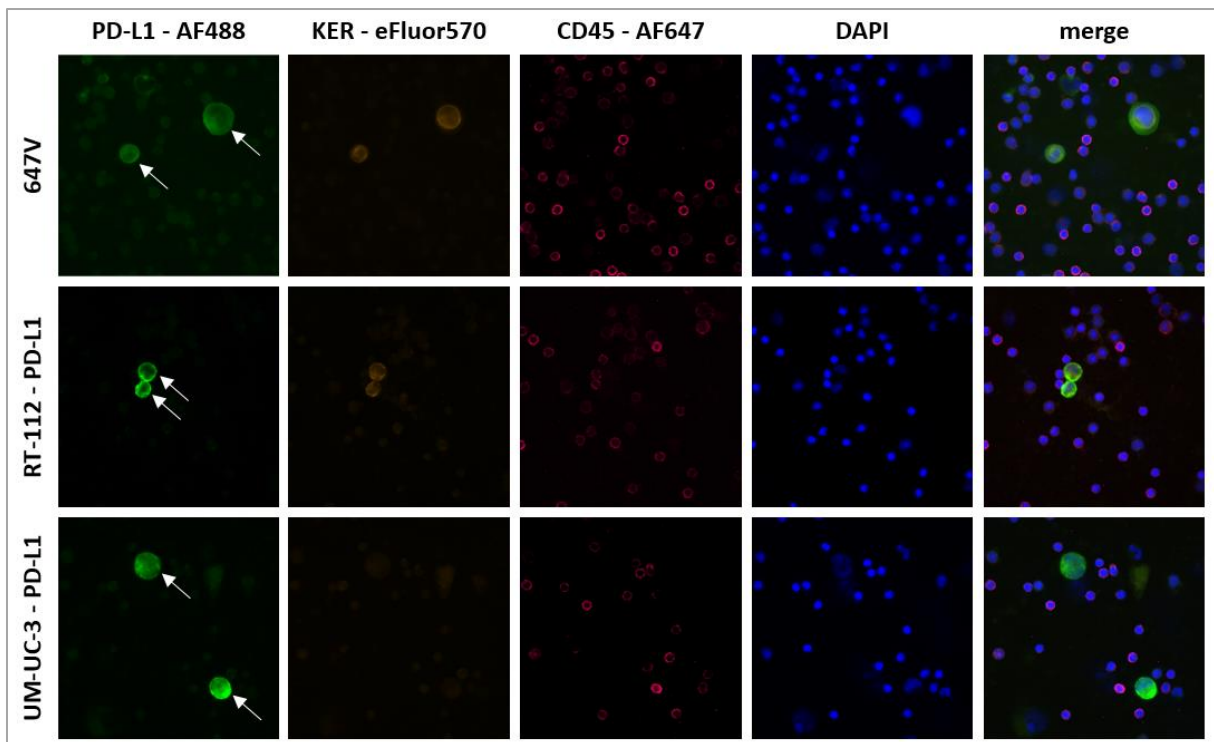


Abbildung 50: Detektion von PD-L1-positiven Zelllinien-Zellen in Spenderblut mittels Multiplex-IF

In Spenderblut transferierte 647V- sowie RT-112- und UM-UC-3-Zellen mit PD-L1-Überexpression wurden über Ficoll-Dichtezentrifugation aufgereinigt und auf Zytospins gebracht. Die Präparate wurden über Nacht bei 4°C mit anti-PD-L1-Antikörper (Klon E1L3N, 1:100 in 10% AB-Serum) inkubiert, welcher mit AlexaFluor488-konjugiertem Sekundärantikörper (1:200 in PBS) detektiert wurde. Anschließend wurde mit eFluor570-konjugiertem anti-Pan-Zytokeratin-Antikörper (Klon AE1/AE3, 1:80 in PBS), AlexaFluor647-konjugiertem anti-CD45-Antikörper (Klon HI30, 1:150 in PBS) und DAPI (1:1.000 in PBS) gefärbt. Pfeile indizieren PD-L1-positive Tumorzellen.

Im nächsten Schritt sollte die Detektion der PD-L1-Expression im CellSearch®-System anhand von Zelllinien mit unterschiedlicher PD-L1-Intensität etabliert werden. Unter Verwendung des CTC-Kits und AlexaFluor488-konjugiertem anti-PD-L1-Antikörper (Klon E1L3N) waren zunächst jedoch keine eindeutigen Unterschiede zwischen PD-L1-positiven und -negativen Zelllinien detektierbar. Die Austestung verschiedener Antikörper-Konzentrationen sowie unterschiedlicher Expositionszeiten während der automatischen fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der Zellen in CellSearch®-cartridges erzielten keine Verbesserung. Auch mit AlexaFluor488-konjugiertem anti-PD-L1-Antikörper des Klons D8T4X, welcher an ein extrazelluläres Epitop von PD-L1 bindet (vgl. Abbildung 11), konnte keine aussagekräftige PD-L1-Detektion etabliert werden. Deshalb wurde der Einsatz des CXC-Kits getestet, in welchem zur Detektion des optionalen Markers, in diesem Fall PD-L1, nicht das Fluorophor AlexaFluor488 sondern das signalintensivere Fluorophor PE verwendet wird. Der Vorteil ist, dass somit eine sensitivere Detektion von PD-L1 ermöglicht wird. Auf der anderen Seite ist dies durch eine geringere Sensitivität des Nachweises von Keratin als im CTC-Kit begleitet. Mit PE-konjugiertem anti-PD-L1-Antikörper des Klons E1L3N war die Detektion von Expressionsunterschieden zwischen Zelllinien gemäß ihrer PD-L1-Expression, die mittels

Western-Blot-Analyse bestimmt worden war (vgl. Abbildung 11), möglich. Eine 1:50-Verdünnung sowie eine Expositionszeit von 1,6 Sekunden unterschieden PD-L1-negative RT-4-Zellen eindeutig von PD-L1-positiven 647V-Zellen (Abbildung 51A). Auch auf CTCs von UCB-Patienten konnte PD-L1-Expression mit unterschiedlicher Intensität nachgewiesen werden (Abbildung 51B).

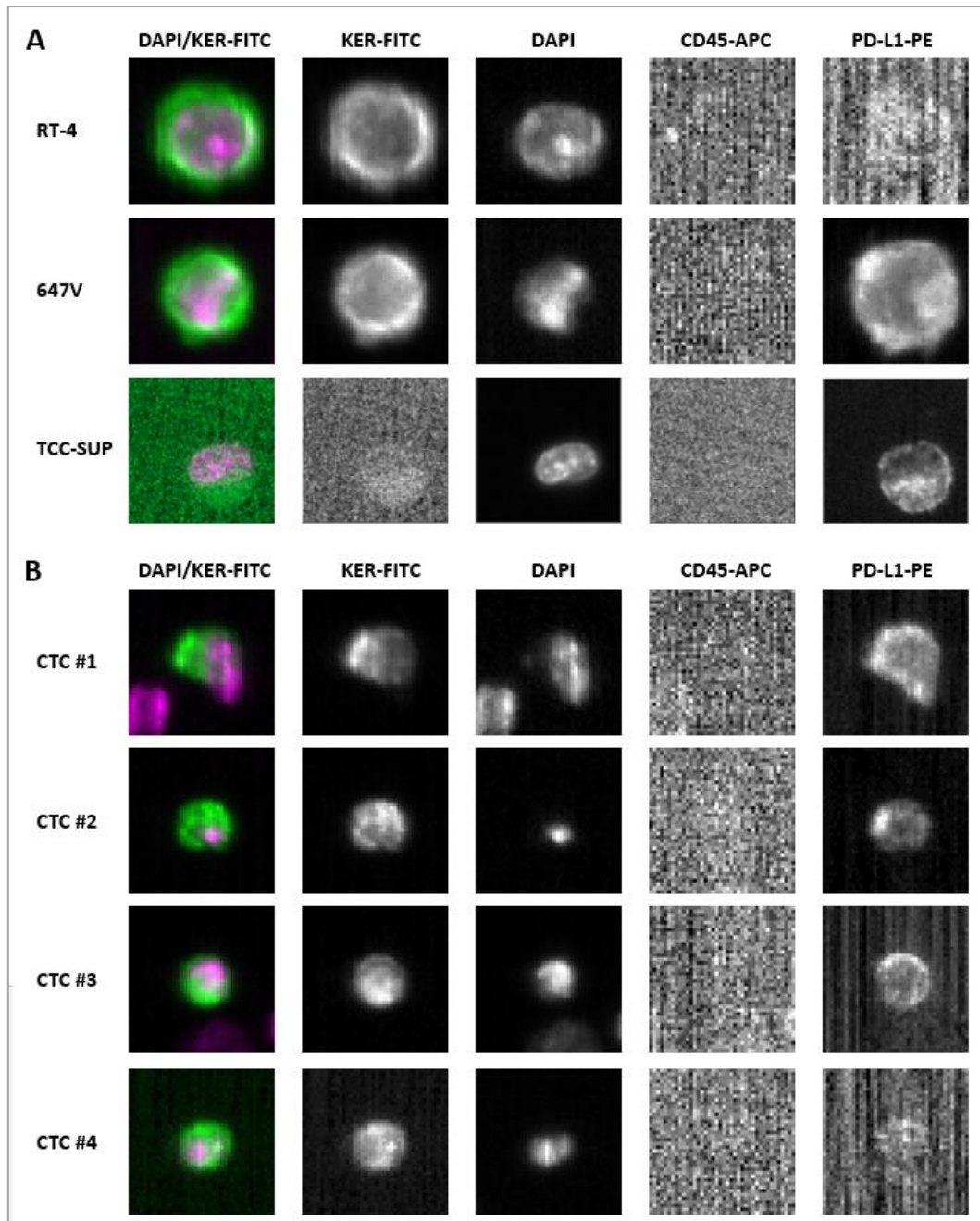


Abbildung 51: Nachweis der PD-L1-Expression von Zelllinien-Zellen und CTCs im CellSearch®-System

Tumorzellen wurden im CellSearch®-System automatisch aus Blutproben angereichert und unter Verwendung des CXC-Kits als Keratin-positive (KER-FITC), CD45-negative (CD45-APC) und DAPI-positive Zellen detektiert. PD-L1-Expression wurde mit PE-konjugiertem anti-PD-L1-Antikörper (PD-L1-PE, Klon E1L3N, 1:50, Einlesezeit 1,6 s) nachgewiesen. (A) Analyse von in Spenderblut transferierten UCB-Zelllinien-Zellen (RT-4, 647V, TCC-SUP). Die Identifikation der Keratin-negativen TCC-SUP-Zellen erfolgte durch manuelle Auswertung. (B) CTC #1-3: PD-L1-positive CTCs eines UCB-Patienten (M1). CTC #4: PD-L1-negative CTC desselben UCB-Patienten.

Im CellSearch-System werden EpCAM-positive Zellen angereichert. Im Fall von TCC-SUP-Zellen ist sogar die in der Western-Blot-Analyse nicht nachweisbare Menge von EpCAM (Abbildung 15) ausreichend, um zumindest einen Teil der Zellen anzureichern. Diese zeichnen sich, wie in der Abbildung zu sehen, durch geringe Keratin-Expression aus, was ebenfalls mit Ergebnissen der Western-Blot-Analyse (Abbildung 19) übereinstimmt. Aus diesem Grund war eine manuelle Auswertung zur Wiederfindung der Zellen notwendig. Die PD-L1-Expression jedoch war deutlich erkennbar. Es wurde geschlussfolgert, dass auch zumindest ein Anteil solcher Zellen, die einen ML-Phänotyp aufweisen, mit dem CellSearch®-System nachgewiesen werden kann. Da angenommen wird, dass CTCs mit einem intermediären Phänotyp (d.h. epitheliale und mesenchymale Eigenschaften) besonders aggressiv sein können [101], sollte untersucht werden, ob solche Zellen mit intermediärem Phänotyp in Blutproben von UCB-Patienten nachgewiesen werden können. Aus diesem Grund sollte auch der Nachweis eines mesenchymalen Markers im CellSearch®-System etabliert werden. Hierzu bot sich die Verwendung des CTC-Kits an, da hierüber standardmäßig die CTC-Anzahl bestimmt wurde. Da in den Versuchen zur EMT-Induktion in allen EMT-aktivierten UCB-Zellen ein Anstieg der Expression von Vimentin beobachtet wurde (siehe 3.5), sollte ein Nachweis für die Vimentin-Expression von CTCs etabliert werden. Unter Verwendung eines AlexaFluor488-konjugierten anti-Vimentin-Antikörpers (Klon V9, Verdünnung 1:50, Expositionszeit 0,8 s) war eine klare Unterscheidung der Vimentin-positiven Zelllinien 5637 und MDA-MB-231 von der Vimentin-negativen Zelllinie HT-1197 möglich (Abbildung 52A, vgl. Abbildung 15). Es wurden jedoch nur wenige CTCs mit intermediärem Phänotyp nachgewiesen (Abbildung 52B).

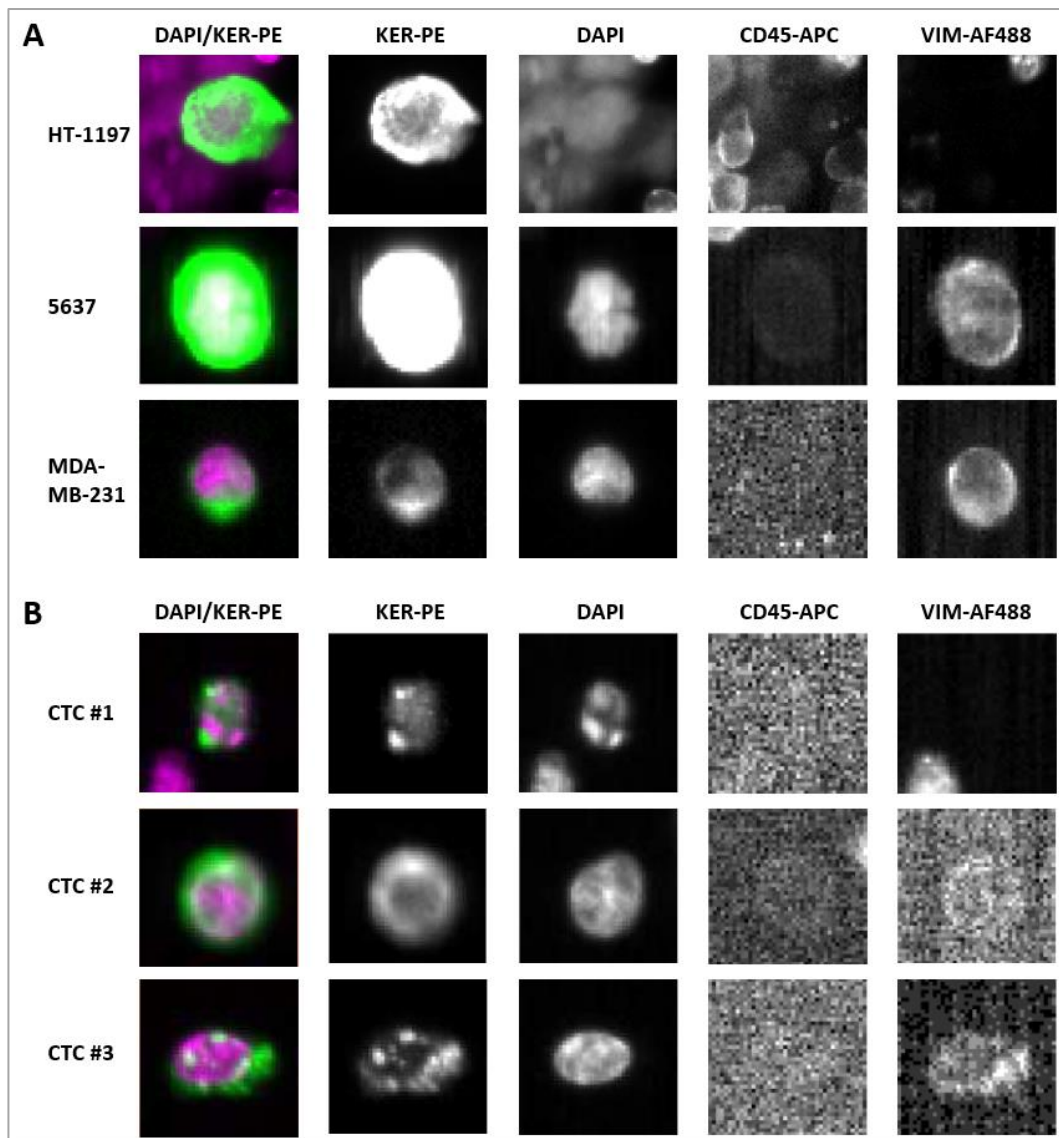


Abbildung 52: Nachweis der Vimentin-Expression von Zelllinien-Zellen und CTCs im CellSearch®-System

Tumorzellen wurden im CellSearch®-System automatisch aus Blutproben angereichert und unter Verwendung des CTC-Kits als Keratin-positive (KER-PE), CD45-negative (CD45-APC) und DAPI-positive Zellen detektiert. Vimentin-Expression wurde mit AlexaFluor488-konjugiertem anti-Vimentin-Antikörper (VIM-AF488, Klon V9, 1:50, Einlesezeit 0,8 s) nachgewiesen. (A) Analyse von in Spenderblut transferierten Zelllinien (HT-1197, 5637, MDA-MB-231). (B) CTCs von UCB-Patienten. CTC #1: Vimentin-negativ, unten Vimentin-positiver Leukozyt, CTC #2: schwache Vimentin-Expression, CTC #3: moderate Vimentin-Expression.

In der folgenden Analyse von Patientenproben auf CTC-Positivität und CTC-PD-L1- sowie CTC-Vimentin-Expression sollte zum einen die klinische Anwendbarkeit der beiden etablierten CellSearch®-Assays demonstriert werden und zum anderen die Assoziation mit klinisch-pathologischen Daten untersucht werden. Im Zeitraum von Januar 2015 bis September 2018 wurden Blutproben von 93 nicht-metastasierten (M0) und 33 metastasierten (M1) UCB-Patienten im CellSearch®-System analysiert. Das Kollektiv wurde nicht für die verabreichte Therapie oder den Therapiefortschritt zum Datum der Blutentnahme selektioniert. Die Ergebnisse des CTC-Nachweises unter Verwendung des CTC-Kits sind in Tabelle 21 zusammengestellt.

Tabelle 21: CTC-Nachweis in Blutproben von nicht-metastasierten (M0) und metastasierten (M1) UCB-Patienten

	Median	Mittelwert	Bereich	CTC-positiv ≥ 1	CTC-negativ	p-Wert	CTC-positiv ≥ 5	CTC-negativ	p-Wert
M0 (n=93)	0	0,65	0 - 14	21 (22,6%)	72	0,004	3 (3,2%)	90	<0,001
M1 (n=33)	1	24,33	0 - 400	17 (51,5%)	16		10 (30,3%)	23	

Die CTC-Positivität lag in metastasierten Patienten mit 51,5% deutlich höher als in nicht-metastasierten Patienten mit 22,6% (Schwellenwert für Positivität: ≥ 1 CTC/7,5 ml Blut). Die statistische Auswertung mit dem Fisher's Exact Test ergab einen signifikanten Unterschied der CTC-Positivität zwischen M0- und M1-Patienten sowohl bei einem Schwellenwert von ≥ 1 CTCs/7,5 ml Blut ($p=0,004$) als auch von ≥ 5 CTCs/7,5 ml Blut CTCs ($p<0,001$). Auch die absolute Anzahl der CTCs unterschied sich signifikant zwischen M0 und M1 ($p<0,001$, Mann-Whitney-U-Test). Für einen Teil der Patienten wurde außerdem die Vimentin-Expression der CTCs analysiert (Tabelle 22).

Tabelle 22: Vimentin-Nachweis auf CTCs von UCB-Patienten (M0 + M1)

	Vimentin-positiv ≥ 1 CTC	Vimentin-negativ
M0 (n=7)	2 (28,6%)	5
M1 (n=12)	3 (25,0%)	9

Obwohl die Anzahl auf CTC-Vimentin-Expression untersuchter Proben gering war, wurden in beiden Patientengruppen (M0 und M1) nahezu identische Anteile von Proben mit Vimentin-positiven CTCs (28,6% und 25,0%) detektiert. Hierbei wiesen pro Probe maximal zwei CTCs Vimentin-Expression auf, in den meisten Fällen sogar nur eine. Während in beiden Proben der nicht-metastasierten Patienten jeweils nur eine CTC gefunden wurde, welche dann Vimentin-positiv war, wurden in zwei Proben fortgeschrittener Patienten zwei CTCs gefunden, von denen jeweils eine Vimentin-positiv war, und in einer M1-Probe 48 CTCs, von denen lediglich zwei schwach Vimentin-positiv waren.

Eine Analyse der PD-L1-Expression mittels CXC-Kit wurde aufgrund der geringeren Keratin-Sensitivität standardmäßig in Proben von Patienten durchgeführt, welche in der CTC-Kit-Analyse mindestens drei CTCs aufwiesen. Hierbei wurden lediglich in Proben von M1-Patienten CTCs nachgewiesen. Der PD-L1-Nachweis in diesen Zellen ist in Tabelle 23 dargestellt.

Tabelle 23: PD-L1-Nachweis in CTCs von UCB-Patienten (M1)

Probe	CTC-Anzahl (CXC-Kit)	PD-L1-positive CTCs	Intensität PD-L1
1	10	3	1 ⁺
2	93	1	2 ⁺
3	2	-	-
4	5	3	1 ⁺
5	2	2	1 ⁺
6	44	35	4 x 3 ⁺ /10 x 2 ⁺ /21 x 1 ⁺
7	43	9	1 ⁺
8	278	16	heterogen (1 ⁺ /2 ⁺ /3 ⁺)
9	47	-	-

In sieben von neun Proben (77,8%) konnte mindestens eine PD-L1-positive CTC nachgewiesen werden. Dabei war die Expression von PD-L1 stets heterogen, sodass sich jeweils nur ein Anteil aller CTCs als PD-L1-positiv präsentierte. Auch die Intensität der PD-L1-Expression war sehr variabel.

Fallbeschreibung eines Patienten unter Immun-Checkpoint-Therapie mit Verlaufsprobe:

Bei einem 58 Jahre alten Patienten wurde ein schlecht differenziertes, lokal fortgeschrittenes, inoperables Urothelkarzinom der Harnblase (pT4b cN0 cM0) mit Infiltration in die Prostata und in die ventrale Bauchwand diagnostiziert. Zunächst wurde der Patient mit sechs Zyklen einer platinhaltigen Kombinations-Chemotherapie behandelt. Drei Monate nach Abschluss dieser Therapie zeigte sich ein Progress mit ossärer Metastasierung. Unter einer Zweitlinien-Therapie mit Vinflunin wurde nach fünf Monaten ein erneuter Progress festgestellt. Daran schloss sich eine Therapie mit dem anti-PD-L1-Antikörper Atezolizumab an. Der Patient wies schon zu Beginn der Therapie eine hohe Tumorlast auf und verstarb drei Monate darauf.

Die erste Blutprobe wurde wenige Tage nach der ersten Atezolizumab-Gabe entnommen und direkt mittels CXC-Kit-Analyse untersucht. Von neun detektierten CTCs waren acht apoptotisch und eine CTC war morphologisch relativ intakt. Nur diese intakte Zelle wies schwache PD-L1-Expression auf. Drei Monate später, nach insgesamt drei Gaben Atezolizumab, wurde eine zweite Probe analysiert. Mittels CTC-Kit-Analyse wurden 48 CTCs gefunden, von denen zwei sehr schwach Vimentin-positiv waren. Mittels CXC-Kit-Analyse wurden 44 CTCs nachgewiesen, worunter sich 35 PD-L1-positive Zellen (Intensitäten: 4 x 3⁺, 10 x 2⁺, 21 x 1⁺) befanden.

4 Diskussion

PD-L1 (*programmed death-ligand 1*) ist ein immunmodulatorisches Protein, welches von Leukozyten und auch von Tumorzellen exprimiert werden kann. Die spezifische Interaktion mit dem Rezeptor PD-1 (*programmed death 1*) auf T-Zellen wirkt inhibitorisch auf die T-Zell-Aktivierung, sodass es zum *immune escape* des Tumors kommen kann. Da beim UCB auf der einen Seite verlängerte Ansprechraten auf Immun-Checkpoint-Therapien mit PD-1/PD-L1-Inhibitoren verzeichnet werden, auf der anderen Seite jedoch weiterhin ein verlässlicher prädiktiver Biomarker fehlt, sollte in diesem Projekt ein Beitrag zur Aufklärung der Regulation und Tumorzell-intrinsischen Funktionen von PD-L1 im UCB geleistet werden. Für die Regulation der PD-L1-Expression wurden in Abhängigkeit vom Zell-/Tumortyp bereits verschiedene beteiligte Signaltransduktionswege identifiziert [45, 46]. Darüber hinaus liegen für mehrere Tumorentitäten Hinweise darauf vor, dass die PD-L1-Expression mit dem für die Tumorzell-disseminierung wichtigen Prozess der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) assoziiert sein könnte [61-63]. Deshalb bestand ein Ziel des vorliegenden Promotionsvorhabens darin, diesen Zusammenhang für das UCB zu verifizieren und auf molekularer Ebene näher zu analysieren.

Nur für einen Teil der mit einer Immuntherapie behandelten Patienten korreliert das Therapieansprechen mit der PD-L1-Expression der Tumor- und/oder Immunzellen in Primärtumoren. Für das fehlende Therapieansprechen werden verschiedene Ursachen diskutiert. So kann die PD-L1-Expression beispielsweise innerhalb eines Tumors heterogen sein, sich zwischen Primärtumor und Metastasen unterscheiden und sich im Verlauf der Tumorentstehung/-progression verändern [8, 42, 43]. Nicht immer können jedoch Tumorgewebebiopsien entnommen und auf PD-L1-Expression analysiert werden. Der translationale Teil des Projekts war deshalb auf die Etablierung und Validierung eines Assays zum Nachweis der PD-L1-Expression in zirkulierenden Tumorzellen (CTCs, *circulating tumor cells*), die aus peripherem Blut isoliert und charakterisiert werden können, gerichtet.

4.1 Regulation der PD-L1-Expression im UCB

Da für die funktionelle Untersuchung von PD-L1 eine spezifische und gleichzeitig sensitive Detektion unerlässlich ist, wurde zu Beginn der Arbeiten ein geeigneter Antikörper ermittelt. Die Vielfalt der kommerziell erhältlichen anti-PD-L1-Antikörper sowie die wachsende Anzahl der hiermit publizierten Studien [31] verdeutlichen die Komplexität dieser Entscheidung. Für das vorliegende Projekt wurden unterschiedliche anti-PD-L1-Antikörper-Klone in der Western-Blot-Analyse verglichen. Nur Klon E1L3N von CST erlaubte eine eindeutige Unterscheidung positiver und negativer Zelllinien anhand von Signalen, die dem erwarteten Molekulargewicht entsprachen. Das Epitop für diesen Antikörper befindet sich auf der intrazellulären Domäne von PD-L1. Einen zusätzlichen Hinweis auf die Spezifität des Antikörpers lieferte der Vergleich

mit einem weiteren Antikörper-Klon (D8T4X), welcher gegen die extrazelluläre Domäne gerichtet ist und mit geringerer Sensitivität dieselben Zelllinien als PD-L1-positiv identifizierte. Im Set der 13 UCB-Zelllinien war die PD-L1-Proteinexpression heterogen. Die Unterschiede zwischen den Zelllinien entsprachen weitgehend denen der relativen Genexpression, welche mithilfe spezifischer Primer durch qRT-PCR detektiert wurde. Dies ließ vermuten, dass die PD-L1-Expression in UCB-Zelllinien in erster Linie durch die Transkription reguliert ist. Dennoch gab es Zelllinien mit höherer (TCC-SUP) und geringerer (HT-1197 und UM-UC-3) PD-L1-Proteinexpression als aufgrund der relativen mRNA-Expression zu erwarten gewesen wäre. Eine Hypothese zur Erklärung dieser teilweisen Diskrepanzen könnte laut Brodská *et al.* in dem Verhältnis der Expression von verschiedenen PD-L1-Transkriptvarianten liegen und wurde in der vorliegenden Arbeit auch für UCB-Zelllinien evaluiert. Mittels qRT-PCR konnte neben der Expression der PD-L1-Transkriptvarianten 1 und 2 in Kombination auch die Expression der Varianten 1 und 4 in Kombination sowie die deutlich schwächere Expression von ausschließlich Variante 2 nachgewiesen werden. In UCB-Zellen zeigte sich eine positive Korrelation der Expression der verschiedenen Transkriptvarianten, was nicht mit der negativen Korrelation in Blut- und Leukämiezellen übereinstimmte, die Brodská *et al.* beobachteten. Ihre Hypothese, dass eine erhöhte Expression von Variante 2 die Gesamt-PD-L1-Expression negativ beeinflussen könnte [142], war somit nicht dazu geeignet, die in UCB-Zelllinien teilweise vorliegenden Unterschiede in der Transkription und Proteinexpression von PD-L1 zu erklären. Eine alternative Erklärung für die Abweichungen könnte sich aus einer unterschiedlich regulierten Proteinstabilität ergeben, wie für PD-L1 bereits postuliert wurde [73-76, 117, 159, 160].

Um Hinweise auf die Regulation und auf Tumorzell-intrinsische Funktionen von PD-L1 im UCB zu ermitteln, wurden die Zelllinien zunächst bezüglich einer Korrelation der PD-L1-Expression mit molekularen Charakteristika, wie beispielsweise der Expression Zelltyp-definierender Proteine oder Phosphorylierungsprofile, untersucht.

Die Einteilung der 13 UCB-Zelllinien in Subgruppen erfolgte (a) nach EL- und ML-Eigenschaften (*epithelial-like* und *mesenchymal-like*) und (b) nach molekularen Subtypen. Eine schematische Darstellung der Einteilung ist in Abbildung 53 dargestellt.

		Epitheliale Eigenschaften					Mesenchymale Eigenschaften							
		E-Cadherin Keratine		GRHL2 EpCAM			N-Cadherin Vimentin		Fibronectin ZEB1					
		Luminal	Basal				Kein Typ							
		UPK1A, 2, 3A KRT 7, 19, 20	KRT 5, 6, 14, 16											
PD-L1		-	-	+	++	+++	+++	++	-	-	-	+	+	+++
		RT-4	RT-112	BFTC-905	HT-1376	HT-1197	647V	5637	UM-UC-3	SW1710	253J	J82	T24	TCC-SUP

Abbildung 53: Schematische Einteilung der UCB-Zelllinien in Subgruppen und nach PD-L1-Expression

Das Set der 13 UCB-Zelllinien wurde im vorliegenden Projekt nach EL-/ML-Eigenschaften, molekularen Subtypen und PD-L1-Expression eingeteilt. Definierte Indikatorproteine für die einzelnen Subgruppen sind jeweils angegeben. Die PD-L1-Expression wurde basierend auf Transkript- und Proteinmengen in keine Expression (-), schwache Expression (+), moderate Expression (++) und starke Expression (+++) unterteilt.

(a) Anhand von Western-Blot-Analysen von in der Literatur bekannten EMT-Indikatorproteinen ließen sich die UCB-Zelllinien in der vorliegenden Arbeit gemäß ihrer epithelialen und mesenchymalen Eigenschaften klassifizieren. So konnten sie in sieben EL-Zelllinien (RT-4, RT-112, BFTC-905, HT-1376, HT-1197, 647V und 5637) sowie sechs ML-Zelllinien (UM-UC-3, SW1710, 253J, J82, T24 und TCC-SUP) eingeteilt werden, was auch mit dem morphologischen Erscheinungsbild der Zellen übereinstimmte. Hierbei erwies sich der Phänotyp der Zelllinie 5637 als intermediär, basierend auf der parallelen Expression EL- und ML-assoziierter Proteine. Die vorgenommene Einteilung der Zelllinien konnte durch eine von Tan *et al.* durchgeführte Berechnung eines EMT-scores bestätigt werden [146]. Die Einteilung wurde außerdem mit den Stammzeleigenschaften der Zellen verglichen, welche mit der Expression von CD44 assoziiert sind. Hierbei zeigten die ML-Zelllinien eine eindeutige Korrelation mit der CD44-Expression und wiesen somit verstärkte Stammzeleigenschaften auf. Die PD-L1-Expression verteilte sich nahezu ausgewogen über beide Subgruppen und ist demnach im UCB nicht immer mit mesenchymalen Eigenschaften assoziiert. Vielmehr zeigten auch EL-Zelllinien sehr starke PD-L1-Expression. Dieses Ergebnis steht damit im Kontrast zu Studien, die mittels Immunhistochemie für das Adenokarzinom der Lunge [112] und für HNSCC [113] sowie in einer entitätenübergreifenden Genexpressionsanalyse [63] eine Assoziation der PD-L1-Expression mit mesenchymalen Eigenschaften ermittelten.

(b) Basierend auf Mutationsprofilen und Genexpressionsdaten wurden für das UCB verschiedene Einteilungen in molekulare Subtypen vorgenommen [78, 80-83, 147]. So definierten z.B. Warrick *et al.* für das UCB die molekularen Subtypen „Luminal“, „Basal“ und „Kein Typ“ anhand einer mit agglomerativen Methoden erfolgten Auswertung von

Genexpressionsdaten aus der „Cancer Cell Line Encyclopedia“ [149] und nahmen eine Zuordnung von UCB-Zelllinien vor. Luminale Zellen (RT-4, RT-112) wiesen eine erhöhte Expression von Uroplakinen, ErbB-Proteinen sowie Keratinen 7, 19 und 20 auf. Basale Zellen (BFTC-905, HT-1376, HT-1197, 647V und 5637) waren hingegen gekennzeichnet durch die Expression der Keratine 5, 6, 14 und 16 [82]. Die in basale und luminale unterteilten Zelllinien entsprachen gemäß der Einteilung nach den EMT-Eigenschaften den EL-Zelllinien. Waren alle aufgeführten Indikatorproteine schwach exprimiert, so wurde die Zelllinie als „Kein Typ“ definiert [82], was im vorliegenden Projekt den als „ML“ bezeichneten Zelllinien entsprach. Auch die Einteilung von UCB-Zelllinien durch Earl *et al.* in basale und nicht-basale Zelllinien [148] anhand einer auf 40 Genen basierenden basalen Signatur [161] bestätigte die Einteilung der Zelllinien durch Warrick *et al.* Zur Unterscheidung des luminalen und basalen Subtyps von UCB-Zelllinien in der vorliegenden Arbeit war die Western-Blot-Analyse der Proteinexpression von panKeratin und Keratin 5, 8, 14, 18, 19 und 20 nicht ausreichend. Stattdessen gelang eine Unterscheidung anhand der Genexpression der Uroplakine 1A, 2 und 3A, wobei die Expression in den luminalen UCB-Zelllinien (RT-4 und RT-112) stärker war als in den basalen. Western-Blot-Analysen der PD-L1-Expression in UCB-Zelllinien sowie Genexpressionsdaten aus der Datenbank „Oncomine“ zeigten eine klare Korrelation der PD-L1-Expression mit dem basalen Subtyp und dementsprechend PD-L1-Negativität in luminalen Zellen. Übereinstimmend berichten auch Robertson *et al.* und Hodgson *et al.* von einem erhöhten Anteil PD-L1-exprimierender Zellen in basalen Urothelkarzinomen [78, 79]. Für das Mammakarzinom wurde ebenfalls eine erhöhte PD-L1-Expression in basalen Tumorzellen beschrieben [162, 163].

Zur weiteren Untersuchung einer möglichen Korrelation der PD-L1-Expression mit der Expression und Aktivierung ausgewählter Proteine in UCB-Zelllinien wurde im ersten Schritt die Expression des MHC I (HLA Klasse I)-Proteins untersucht. Ein *immune escape* von Tumorzellen kann neben der Expression von PD-L1 unter anderem auch durch den Verlust von MHC I ausgelöst werden. Daher sollte evaluiert werden, ob die Expression beider Proteine in UCB-Zelllinien miteinander korreliert. Im Gegensatz zu den Beobachtungen von Aust *et al.*, nach denen beim Ovarialkarzinom die Herabregulation von MHC I mit PD-L1-Negativität assoziiert war [150], bestand in UCB-Zelllinien keine Korrelation zwischen PD-L1- und MHC I-Expression. Vielmehr gab es im vorliegenden Projekt Zelllinien, die keines der Moleküle, nur jeweils eines oder beide gleichzeitig exprimierten. Dies stimmt mit den Beobachtungen von Perea *et al.* überein, die in NSCLC-Tumoren ebenfalls alle vier Kombinationen der Expression von PD-L1 und MHC I detektierten. Sie schlussfolgerten, dass die beiden Mechanismen des *immune escapes* (Herabregulation von MHC I und Heraufregulation von PD-L1) unabhängig voneinander zu sein scheinen, und schlugen MHC I-Verlust als möglichen Biomarker für das Ansprechen auf Immuntherapien vor [37].

Auch in der Analyse der Expression und Phosphorylierungsprofile von Kinasen, die an der Regulation von für Tumorerkrankungen zentralen Signalwegen beteiligt sind, war keine Zelllinien-übergreifende Korrelation mit der PD-L1-Expression erkennbar. So wurden die Mengen der phosphorylierten Proteine ERK, AKT, GSK-3 β , 4E-BP1 (als Indikator für den mTOR-Signalweg) und STAT3 sowie die Expression von CDK5 und EGFR analysiert. Da die alleinige Bestimmung der Expression phosphorylierter und nicht-phosphorylierter Proteine keine eindeutige Aussage bezüglich einer Assoziation mit der PD-L1-Expression zuließ, wurden im Projekt einzelne Signalwege eingehender untersucht. In der Literatur wurden für unterschiedliche Zellsysteme bereits verschiedene Regulationsmechanismen für PD-L1 identifiziert [45, 46, 84]. So postulieren Dorand *et al.* beispielsweise, dass für einen IFN γ -vermittelten Anstieg der PD-L1-Expression in Medulloblastom-Zellen die Kinase CDK5 benötigt wird [151]. Li *et al.* beschreiben eine Stabilisierung von glykosyliertem PD-L1 in Mammakarzinom-Zellen durch die Inaktivierung von GSK-3 β , welche durch EGFR-Aktivierung vermittelt werden kann [76]. Außerdem fanden Mittendorf *et al.* Hinweise auf eine Regulation von PD-L1 durch den Verlust von PTEN und die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs in Mammakarzinom-Zellen [164].

Im Folgenden wurde untersucht, ob die PD-L1-Expression in UCB-Zelllinien durch extrinsische Einflüsse modifizierbar ist. Das immunstimulierende Zytokin IFN γ [165] kann in der Tumormikroumgebung durch Lymphozyten ausgeschüttet werden und daraufhin in Tumorzellen PD-L1-Expression induzieren [22, 40, 152]. Daher wurde ein Set der Zelllinien, in welchem alle molekularen Subtypen repräsentiert waren, mit IFN γ stimuliert. In den meisten der hier untersuchten UCB-Zelllinien wurde ebenfalls eine starke PD-L1-Heraufregulation beobachtet. Diese beruhte maßgeblich auf einer erhöhten Transkription und wurde durch die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT1 und die erhöhte Genexpression des Transkriptionsfaktors IRF1 vermittelt, wie bereits für das Magenkarzinom [51] und das Melanom [52] beschrieben. Während die STAT1-Phosphorylierung und die IRF1-Transkription in allen stimulierten Zelllinien deutlich anstiegen, traten die Effekte auf die Transkription sowie Proteinexpression von PD-L1 nicht in allen Zelllinien mit gleicher Intensität auf. So war beispielsweise der Anstieg in der im unstimulierten Zustand PD-L1-negativen RT-112 besonders ausgeprägt, während er in der zweiten luminalen, PD-L1-negativen Zelllinie RT-4 sowie in der stark PD-L1-positiven 647V kaum detektiert wurde. Die beiden luminalen Zelllinien (RT-4, RT-112) zeigten gleichzeitig den stärksten Anstieg von pERK und pGSK-3 β durch die IFN γ -Behandlung. Eventuell könnte der in RT-4 im Gegensatz zu RT-112 ausbleibende Anstieg von phosphoryliertem AKT für die geringere PD-L1-Heraufregulation verantwortlich sein. Daher bietet sich in RT-112 der gleichzeitige Einsatz von AKT-Inhibitoren und IFN γ -Stimulation zum Test dieser Hypothese an. Auch Anantharaman *et al.* beobachteten eine unterschiedlich ausgeprägte Zunahme der PD-L1-Expression durch IFN γ -Stimulation in

unterschiedlichen Zellsystemen, darunter auch ausbleibende Effekte der IFN γ -Behandlung auf die PD-L1-Expression [140]. Gato-Cañas *et al.* postulieren, dass der Anstieg der PD-L1-Expression möglicherweise einen Schutzmechanismus der Tumorzellen vor IFN γ -vermittelter Zytotoxizität darstellen könnte, wobei PD-L1 über Signalweiterleitung durch seine intrazytoplasmatische Domäne inhibitorisch auf die IFN γ -Signalkaskade wirken kann [92]. Generell scheint die Funktion von IFN γ in der Tumormikroumgebung ambivalent zu sein, da es einerseits als immun-aktivierendes Zytokin bereits zur Therapie verschiedener Tumorentitäten, darunter UCB [41], eingesetzt wurde und andererseits über die Heraufregulation der PD-L1-Expression die Immunantwort supprimieren kann [40]. Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit ein transkriptioneller Anstieg des zweiten PD-1-Liganden, PD-L2, in IFN γ -stimulierten UCB-Zelllinien beobachtet werden. Dabei war die Expression von PD-L2 jedoch deutlich geringer als die von PD-L1, sodass nur in einigen der Zelllinien detektierbare Proteinexpressionen erreicht wurden. Ebenso wurde in Melanom-Zellen bei IFN γ -Stimulation ein Anstieg von PD-L2 beobachtet [52].

4.2 Tumorzell-intrinsische Funktion von PD-L1 im UCB

Untersuchungen beim Mamma- und Ovarialkarzinom sowie beim Melanom deuten darauf hin, dass PD-L1 auch über die Immunregulation hinausgehende, intrinsische Funktionen in Tumorzellen ausüben kann [86, 90, 166, 167]. Um solche intrinsischen, potenziell die Tumorprogression begünstigenden Funktionen von PD-L1 in UCB-Zellen zu identifizieren, wurde die PD-L1-Expression in einer Auswahl von Zelllinien, die alle Subgruppen widerspiegelte, durch experimentelle Herabregulation (*knockdown*) (5637, 647V, HT-1197, T24 und TCC-SUP) sowie Überexpression (RT-112, UM-UC-3, 5637 und BFTC-905) modifiziert. Mittels Immunfluoreszenz wurde exemplarisch gezeigt, dass überexprimiertes PD-L1 an die Membran transportiert werden kann, und seine Funktionalität in Bezug auf die PD-1-Bindung wurde nachgewiesen. Die Spezifität der Bindung wurde zusätzlich über die Blockierung durch die therapeutischen anti-PD-1-Antikörper Pembrolizumab und Nivolumab gezeigt.

Der shRNA-vermittelte *knockdown* erwies sich als nicht stabil, sodass die PD-L1-Expression sich trotz erfolgreich durchgeführter Selektion der Zellen nach einigen Passagen wieder der basalen Expression angleich. In der Literatur gibt es für einzelne Tumorentitäten unterschiedliche Angaben dazu, ob die PD-L1-Expression einen Einfluss auf die Proliferation der Zellen ausüben kann. So wurde für das Pankreaskarzinom [85], das Zervixkarzinom [71], das Leberzellkarzinom [70], das Magenkarzinom [168], das Ovarialkarzinom sowie das Melanom [86] eine Beeinflussung der Zellproliferation durch modifizierte PD-L1-Expression gezeigt. In einem Sarkom-Mausmodell hingegen wurde kein Einfluss von mittels shRNA reduzierter PD-L1-Expression auf die Proliferation gefunden [90]. Im vorliegenden Projekt wurden eine verminderte Expression bei PD-L1-*knockdown* und eine gesteigerte Zellproliferation bei PD-L1-Überexpression beobachtet. Diese Effekte konnten jedoch nicht

zuverlässig in Proliferationsassays quantifiziert werden, da sie transient waren und die Proliferation sich mit dem Verlust des *knockdown* der PD-L1-Expression im Kultivierungsverlauf wieder dem Ausgangszustand annäherte. Stattdessen könnte möglicherweise ein *knockout* von PD-L1 ein stabiles Ausschalten der PD-L1-Expression bewirken und somit die Aufklärung weiterer intrinsischer Funktionen von PD-L1 ermöglichen. Die durch PD-L1 beeinflussten Phosphorylierungsprofile von Kinasen, die an zentralen Signalwegen beteiligt sind, unterschieden sich zelllinienabhängig. Dabei war die Menge an phosphoryliertem AKT in HT-1197-shPD-L1 erhöht und in RT-112-PD-L1 sowie interessanterweise auch in 647V-shPD-L1 erniedrigt. Im Einklang mit der erniedrigten pAKT-Proteinmenge in 647V-shPD-L1 wurde in einem Sarkom-Mausmodell durch shRNA-vermittelten *knockdown* von PD-L1 ebenfalls eine reduzierte AKT-Phosphorylierung beobachtet [90]. Außerdem wurde eine erhöhte Proteinmenge an phosphoryliertem ERK in T24-shPD-L1 festgestellt. Dies stand im Widerspruch zu Ergebnissen von Qiu *et al.*, wonach die PD-L1-Expression in Glioblastom-Zellen den ERK-Signalweg aktiviert [169].

In der durch mRNA-Sequenzierung durchgeführten Transkriptomanalyse der Zelllinien RT-112 und UM-UC-3 mit stabiler PD-L1-Überexpression wurde überraschenderweise nur eine sehr geringe Anzahl von Genen mit gegenüber der Vektorkontrolle differenzieller mRNA-Expression gefunden. Davon wurde lediglich ein 3 - 4-facher Anstieg der Genexpression von Neurotensin in UM-UC-3-Zellen mittels qRT-PCR-Analyse verifiziert. Aufgrund zu geringer Expression war das Peptidhormon in der Western-Blot-Analyse jedoch nicht detektierbar. Über welchen intrazellulären Signalweg PD-L1 die Genexpression von Neurotensin erhöht und ob dadurch ein physiologisch relevantes Expressionsniveau des Neuropeptids erreicht wird, bleibt zunächst unklar. Es gibt Hinweise darauf, dass Neurotensin durch β -Catenin sowie weitere Aktivatoren des WNT-Signalwegs induziert werden kann [170]. Außerdem kann Neurotensin das Tumorwachstum in Kolonkarzinom-Zellen, die den Neurotensin-Rezeptor NTR1 exprimieren, begünstigen [171]. Weiterhin wurde beschrieben, dass Neurotensin Mastzellen aktiviert und die Freisetzung inflammatorischer Moleküle wie VEGF [172] und IL-8 [173] stimuliert, womit es interessanterweise eine aktivierende und damit zu PD-L1 gegensätzliche Wirkung auf das Immunsystem ausüben könnte. Es wurde sogar postuliert, dass Neurotensin über die IL-8-Sekretion den EMT-Prozess herbeiführen kann und somit an der Metastasierung von Tumorzellen beteiligt sein kann [173]. In UM-UC-3-PD-L1-Zellen wurden zwar keine Hinweise auf eine EMT-Induktion festgestellt, dies war jedoch nicht überraschend, da die Zelllinie bereits starke mesenchymale Eigenschaften besaß. Daher sollte in zukünftigen Experimenten ein möglicher Einfluss einer Stimulation von anderen, eher epithelialen UCB-Zellen mit Neurotensin auf die IL-8-Sekretion und auf Veränderungen von EMT-assoziierten Proteinen untersucht werden.

Ein weiterführender Ansatz zur Untersuchung der möglichen Tumorzell-intrinsischen Funktion von PD-L1 ist die spezifische Aktivierung von PD-L1 durch den Rezeptor PD-1. Es gibt Hinweise darauf, dass auch PD-L1 als Rezeptor fungieren kann [93-95] und Signale über seine konservierte intrazytoplasmatische Domäne weiterleiten kann [88, 92, 93]. Dies wird unterstützt durch die massenspektrometrische Detektion von phosphoryliertem PD-L1 in Mammakarzinom-Proben, wobei sich beide nachgewiesenen Phosphorylierungsstellen (S283 und T290) in der intrazellulären Domäne von PD-L1 befinden [91].

Zu diesem Zweck wurde zunächst die Bindung von rekombinatem PD-1 an PD-L1-exprimierende Tumorzellen nachgewiesen, wobei die Intensität der Fluoreszenz abhängig vom PD-L1-Expressionsniveau der jeweiligen Zelllinie war und durch die Blockierung mit anti-PD-1-Antikörpern spezifisch inhibiert werden konnte. In der vorliegenden Arbeit konnten in einer Auswahl von Zelllinien weder Effekte der PD-1-Stimulation auf die Zellviabilität und -proliferation, noch auf die Aktivierung ausgewählter Signalwege detektiert werden. Hierbei gab es keinen Unterschied zwischen der Bindung von PD-1 an endogenes PD-L1 oder exogenes, welches durch Überexpression in die UCB-Zellen eingebracht worden war. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu von Black *et al.* erhobenen Befunden, nach denen die Interaktion mit PD-1 in der PD-L1-positiven Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 zur Aktivierung des mTOR- und des ERK-Signalwegs sowie zur Steigerung der Zellproliferation führte [94]. Auch Yang *et al.* beschreiben den Effekt der PD-1-Bindung auf die Proliferation anhand der mit IFN γ -stimulierten Magenkarzinom-Zelllinie SGC-7901 [95]. Es ist denkbar, dass für PD-1-vermittelte intrinsische Effekte in den gewählten UCB-Zellen die Interaktion mit gelöstem PD-1 nicht ausreicht, sondern hierzu membrangebundenes PD-1 erforderlich ist.

4.3 Regulation und Funktion von PD-L1 im Kontext der epithelialen-mesenchymalen Transition

Einen zentralen Aspekt des Projekts bildet die Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs der PD-L1-Expression mit der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT). EMT stellt für die Tumorzell dissemination als Voraussetzung für die Metastasierung einen essenziellen Prozess dar, da Tumorzellen durch EMT migratorische und invasive Eigenschaften akquirieren, wodurch ihre Ablösung vom Primärtumor, die Intravasion ins Gefäßsystem, die Zirkulation in der Blutbahn als CTCs sowie schließlich die Extravasion in entfernte Gewebe begünstigt werden [96, 97, 100]. Vor allem beim Mamma- und Bronchialkarzinom wurde die Expression von PD-L1 mit EMT in Verbindung gebracht. Während einige Arbeiten eine Korrelation der PD-L1-Expression mit EMT-anzeigenden Proteinen beschreiben [63, 112, 113, 115, 174], zeigen andere Studien einen durch Induktion von EMT vermittelten Anstieg der PD-L1-Expression [61, 62, 114, 115, 117, 174] und es gibt sogar Hinweise auf durch PD-L1-Expression ausgelöste EMT-anzeigende Veränderungen [88, 116, 118, 169]. Da diese in der Literatur zum Teil kontrovers skizzierten Zusammenhänge bisher nicht für das UCB untersucht

wurden, wurde im vorliegenden Projekt eine mögliche gegenseitige Beeinflussung von EMT und PD-L1-Expression an UCB-Zelllinien analysiert. Diese bezieht sowohl die Fragestellung der Regulation der PD-L1-Expression als auch die Suche nach Tumorzell-intrinsischen Funktionen von PD-L1 im UCB ein.

Die Western-Blot-Analyse der Expression von EMT-assoziierten Proteinen in 13 UCB-Zelllinien ermöglichte eine eindeutige Unterteilung in sieben Zelllinien mit EL- und sechs mit ML-Phänotyp. Da wie oben bereits beschrieben keine Korrelation von EMT-Markern mit der basalen Expression von PD-L1 festgestellt wurde, sondern diese in beiden Subgruppen gleichermaßen vertreten war, traf die für andere Entitäten beschriebene Assoziation von PD-L1 und EMT [63] nicht auf das UCB zu. Die Einteilung von UCB-Zelllinien anhand eines von Tan *et al.* definierten EMT-scores [146] bestätigte die im Promotionsprojekt vorgenommene Zuordnung hinsichtlich epithelialer und mesenchymaler Eigenschaften. Dass sowohl in der Zelllinie mit dem geringsten (RT-4) als auch in der mit dem höchsten (UM-UC-3) EMT-score [146] keine PD-L1-Expression detektiert wurde, unterstreicht das Ergebnis, dass PD-L1-Expression und EMT in UCB-Zelllinien nicht notwendigerweise assoziiert sind.

Weder durch mittels IFN γ -Stimulation induzierte PD-L1-Expression noch durch Experimente zum *knockdown* und zur Überexpression von PD-L1 in UCB-Zelllinien wurden Hinweise auf durch EMT bedingte Charakteristika der Zellen beobachtet. Auch die Interaktion mit rekombinantem PD-1 führte nicht zur Verstärkung der mesenchymalen Eigenschaften, wie von Chen *et al.* für die Ösophaguskarzinom-Zelllinie Eca-109 postuliert wurde [88]. Die dieser Aussage zugrunde liegenden Experimente wurden unter anderem an 5637-Zellen durchgeführt, für welche die stärkste phänotypische Plastizität unter den in der vorliegenden Arbeit eingesetzten UCB-Zelllinien beobachtet wurde (3.5.1). Daraus kann geschlossen werden, dass die alleinige Veränderung des Expressionsniveaus von PD-L1 im UCB die EMT-Eigenschaften der Zellen nicht modifiziert.

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die PD-L1-Expression durch experimentelle Auslösung einer EMT in den UCB-Zellen beeinflusst werden kann. Dies gelang jedoch nur in wenigen Zelllinien und nicht jede Zelllinie wurde durch die einzelnen EMT-auslösenden Faktoren in gleicher Weise beeinflusst. In Vorversuchen wurden 5637-Zellen aufgrund eines Vimentin-Anstiegs und dem bereits erwähnten erhöhten Potenzial der phänotypischen Plastizität unter EMT-induzierenden Bedingungen als geeignetes Modellsystem ermittelt. Außerdem wurde BFTC-905 als weiteres Zelllinienmodell gewählt, da auch hier unter TGF β -Stimulation auf Transkriptionsebene eine erhöhte PD-L1-Genexpression beobachtet wurde. Sowohl in 5637- als auch in BFTC-905-Zellen ließen sich EMT-Eigenschaften mit verschiedenen experimentellen Ansätzen beeinflussen. Es wurden einerseits durch TGF β -Stimulation und

andererseits durch die Herauf- oder Herabregulation der EMT-assoziierten Transkriptionsfaktoren GRHL2, ZEB1 und Slug Veränderungen in Richtung mesenchymaler Eigenschaften erzielt. Eine Kombination aus TGF β -Stimulation und Modifikation der Expression der Transkriptionsfaktoren verstärkte die einzelnen Effekte. Die unterschiedlichen experimentellen Konzepte beeinflussten verschiedene EMT-assoziierte Proteine, wobei Vimentin bereits bei schwachen Veränderungen in Richtung von eher mesenchymalen Eigenschaften transkriptionell induziert wurde und somit als erstes EMT-Indikatorprotein sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene fungierte.

Das Zytokin TGF β ist für seine EMT-induzierende Wirkung, die über verschiedene Signaltransduktionswege vermittelt werden kann, bekannt [96, 97, 155]. TGF β induziert EMT demnach vorrangig, jedoch nicht ausschließlich über den SMAD-Signalweg [102, 156, 175]. Durch die Bindung von TGF β bilden der TGF β -Rezeptor 1 (ALK5) und der TGF β -Rezeptor 2 einen heteromeren Komplex, wodurch es zur Phosphorylierung und somit zur Aktivierung von ALK5 kommt [104, 176]. Nachfolgend werden SMAD2 und SMAD3 durch ALK5 phosphoryliert und dadurch aktiviert. pSMAD2 und pSMAD3 verlassen danach den Rezeptor-Komplex, um mit SMAD4 zu interagieren und im Nukleus die Transkription spezifischer Zielgene zu aktivieren [104, 176]. Darüber hinaus kann die Ausbildung des Rezeptor-Komplexes zur Freisetzung der im unstimulierten Zustand an ALK5 bindenden TGF β -aktivierten Kinase (TAK1) führen. Die aktivierte TAK1 kann daraufhin unabhängig von der ALK5-Phosphorylierung weitere Signalwege aktivieren, wie z.B. p38-MAPK oder JNK [104]. Durch TGF β können darüber hinaus auch u.a. der PI3K/AKT- und der mTOR-Signalweg aktiviert werden [104, 105]. Änderungen der Expression EMT-assoziiierter Proteine durch experimentelle TGF β -Stimulation konnten in verschiedenen Zellen gezeigt werden [106, 177], darunter z.B. in der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-10A, in welcher daraufhin die E-Cadherin-Expression abnahm und die Expression von N-Cadherin und Vimentin zunahm [107, 117]. Im vorliegenden Projekt führte die Stimulation mit TGF β in 5637- und BFTC-905-Zellen zu EMT-Veränderungen sowohl in der Morphologie der Zellen als auch in der Expression von EMT-anzeigenden Proteinen.

Der Transkriptionsfaktor GRHL2 wurde im Mamma- [106, 107], Magen- [178], Pankreas- [179] und Ovarialkarzinom [154] als wesentlicher Faktor für die Aufrechterhaltung des epithelialen Phänotyps identifiziert. Ein GRHL2-*knockdown* führte beispielsweise in der Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-468 zu EMT-assoziierten morphologischen Veränderungen, zu verringerter Zellproliferation und zur transkriptionellen Heraufregulation von u.a. Vimentin und ZEB1 [107]. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit in der UCB-Zelllinie 5637 ein GRHL2-kd vorgenommen, um EMT auszulösen. Durch die auf etwa 40% verminderte GRHL2-Proteinexpression konnten EMT-Veränderungen, z.B. Verlust von Zell-Zell-Kontakten, erhöhte

Vimentin-Expression sowie verringerte E-Cadherin- und Snail-Transkription beobachtet werden.

Der Transkriptionsfaktor ZEB1 ist, im Gegensatz zu GRHL2, mit mesenchymalen Eigenschaften und Invasivität der Zellen sowie Metastasierung assoziiert [180]. Für das Mammakarzinom wurde beschrieben, dass ZEB1 und GRHL2 sich in einem negativen, reziproken *feedback*-Mechanismus gegenseitig regulieren [107, 108]. Cieply *et al.* nahmen eine ZEB1-Überexpression in HMLE-Zellen (HMECs [*human mammary epithelial cells*] mit hTERT- und SV40T/t-Überexpression) vor. Diese führte dementsprechend zu verringerter GRHL2- und E-Cadherin-Expression [108].

Zur Induktion von EMT sollte deshalb ZEB1 auch in UCB-Zellen überexprimiert werden. Während BFTC-905-Zellen die Überexpression von ZEB1 ohne Problematik tolerierten, gelang die stabile ZEB1-Überexpression in 5637-Zellen nicht. Es kann vermutet werden, dass diese Zelllinie über effektive Mechanismen zur Verhinderung der ZEB1-Expression verfügt. Auch Chung *et al.* erreichten nur eine moderate Expression von exogenem ZEB1 in den Ovarialkarzinom-Zellen OVCA429 [154]. Cieply *et al.* hingegen nutzten für die ZEB1-Überexpression in HMLE-Zellen einen Doxycyclin-induzierbaren Vektor [108]. Ohne Passagierung der ZEB1-transfizierten 5637-Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit schließlich eine detektierbare Proteinexpression von ZEB1 erzielt werden.

ZEB1 wird in 5637- und BFTC-905-Zellen möglicherweise über die Proteinstabilität reguliert, da die Stimulation von ZEB1-überexprimierenden Zellen mit TGF β einen starken weiteren ZEB1-Proteinanstieg in beiden Zelllinien bewirken konnte. Da das Transgen unter der Kontrolle eines Fremdpromotors war, kann eine transkriptionelle Regulation als Ursache für diesen beobachteten Proteinanstieg weitestgehend ausgeschlossen werden.

Der für das Mammakarzinom bereits untersuchte reziproke negative *feedback*-Mechanismus wurde sowohl auf Transkriptions- als auch auf Proteinebene *in vitro* demonstriert [107, 108]. Auch in den in der vorliegenden Arbeit eingesetzten UCB-Zelllinien wurde GRHL2 und ZEB1-Expression sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene nachgewiesen. Jedoch lassen die bisherigen Beobachtungen in 5637-Zellen keine eindeutigen Rückschlüsse darauf zu, dass GRHL2 und ZEB1 in diesen Zellen einem derartigen *feedback*-Mechanismus unterliegen. Einerseits wurde durch die TGF β -Stimulation von 5637-Zellen mit GRHL2-kd ein transkriptioneller Anstieg der ZEB1-Expression mit einem gleichzeitigen weiteren Rückgang der GRHL2-Expression beobachtet. Andererseits stieg die GRHL2-Proteinexpression in 5637-Zellen bei ZEB1-Überexpression sogar 1,7-fach an. Auf BFTC-905-Zellen hingegen könnte der beschriebene Regulationsmechanismus möglicherweise zutreffen, denn zum einen war hier die GRHL2-Transkription in ZEB1-überexprimierenden Zellen auf 69% vermindert und zum anderen nahm in Slug-überexprimierenden Zellen die Expression von GRHL2 ab und gleichzeitig die von ZEB1 zu. Interessanterweise wurde in Ovarialkarzinom-Zellen keine signifikante Bindung von GRHL2 an den ZEB1-Promoter detektiert. Dennoch bestand auch hier

eine reziproke negative Beziehung von GRHL2 und ZEB1, welche möglicherweise durch miR-200 vermittelt wurde [154]. Verglichen mit Mammakarzinom-Zelllinien bewirkte die Überexpression von ZEB1 in den beiden UCB-Zelllinien nur geringe EMT-Veränderungen [108, 154], die sich fast ausschließlich in einem Anstieg der Vimentin-Expression manifestierten. Die Überexpression des Transkriptionsfaktors Slug hingegen induzierte in beiden Zelllinien (5637 und BFTC-905) EMT, was z.B. in der Herabregulation von EpCAM und der Heraufregulation von Vimentin ersichtlich wurde. Slug wurde zur Überexpression ausgewählt, da dies der einzige der analysierten EMT-Transkriptionsfaktoren war, dessen Transkription durch TGF β -Stimulation von 5637-Zellen anstieg. Auch Wu *et al.* beobachteten durch Überexpression von Slug in 5637-Zellen eine EMT-Induktion [181]. In Kombination mit den in dieser Arbeit herauf- oder herunterregulierten Transkriptionsfaktoren (GRHL2, ZEB1 und Slug) führte die zusätzliche Stimulation mit dem Zytokin TGF β jeweils zur Verstärkung der EMT-Veränderungen.

Nicht alle experimentellen Ansätze zur EMT-Induktion führten auch zur Steigerung der PD-L1-Expression auf transkriptioneller und/oder posttranskriptioneller Ebene. So wurde die PD-L1-Transkription in 5637-Zellen ausschließlich durch die Stimulation mit TGF β erhöht. Hierdurch wurde gleichzeitig eine Zunahme der Proteinexpression bewirkt. Dagegen kam es durch den alleinigen GRHL2-kd und die alleinige ZEB1-Überexpression in 5637-Zellen nicht zu einem deutlichen Anstieg der PD-L1-Transkription, jedoch zu einer geringen Erhöhung der PD-L1-Proteinmenge, die möglicherweise auf einer erhöhten PD-L1-Proteinstabilität beruhte. Die TGF β -Behandlung der GRHL2-herabregulierten oder ZEB1-überexprimierenden 5637-Zellen führte zu einer weiteren Steigerung der PD-L1-Proteinexpression.

In BFTC-905 war die TGF β -Stimulation zwar ebenfalls ausreichend für eine transkriptionelle PD-L1-Induktion, um jedoch einen Anstieg auf Proteinebene auszulösen, war die gleichzeitige Überexpression von ZEB1 oder Slug notwendig. Die alleinige Überexpression von ZEB1 löste, ähnlich wie die alleinige TGF β -Behandlung, auch einen transkriptionellen Anstieg von PD-L1 ohne Zunahme der Proteinmenge aus. Da erst die Kombination der Überexpression von ZEB1 oder Slug mit der TGF β -Wirkung eine Stabilisierung von PD-L1 bewirkte, ist hier auf das Vorliegen synergistischer Effekte zu schließen. Die alleinige Überexpression des Transkriptionsfaktors Slug hatte in beiden Zelllinien keinen Einfluss auf die PD-L1-Expression.

Im Projekt wurde gezeigt, dass UCB-Zellen EMT-Veränderungen durchlaufen können, ohne dass die PD-L1-Expression beeinflusst wird. So wurden in 5637-Zellen durch TGF β -Stimulation sowohl EMT als auch ein deutlicher PD-L1-Anstieg vermittelt; in BFTC-905-Zellen hingegen blieb die Zunahme der PD-L1-Expression trotz detektierbarer EMT-Veränderungen auf eine Erhöhung der mRNA beschränkt, die zudem schwächer ausgeprägt war als bei 5637. In anderen ausgewählten UCB-Zelllinien blieb die PD-L1-Transkription unverändert bei TGF β -

Behandlung. Diese wurden in der vorliegenden Arbeit nicht auf EMT-Veränderungen untersucht. Auch in der Literatur finden sich kontroverse Daten zu einer PD-L1-Induktion durch TGF β . Während Asgarova *et al.* sowie Funaki *et al.* von einer PD-L1-Zunahme durch TGF β -vermittelte EMT in NSCLC-Zellen berichten [114, 115], zeigen Noman *et al.*, dass TGF β -induzierte EMT keinen Einfluss auf die PD-L1-Expression der Mammakarzinom-Zelllinien MCF7 und MDA-MB-231 hat [62]. Auch Li *et al.* behandelten Mammakarzinom-Zelllinien mit TGF β , hier BT549 und MDA-MB-468, ohne einen Anstieg von PD-L1 zu beobachten [76]. In der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-10A hingegen konnten Hsu *et al.* nach TGF β -Stimulation Veränderungen von EMT-assoziierten Proteinen sowie gesteigerte PD-L1-Expression detektieren [117]. Die im vorliegenden Projekt beobachtete Erhöhung der PD-L1-Transkription in beiden UCB-Zelllinien könnte auf die gleichzeitig beobachtete Aktivierung des Transkriptionsfaktors c-JUN zurückzuführen sein, wie auch von Jiang *et al.* für Melanom-Zellen postuliert wurde [182].

In 5637-Zellen wurde die bereits durch TGF β -Behandlung erzielte Erhöhung der PD-L1-Expression durch die gleichzeitige Herabregulation von GRHL2 oder Überexpression von ZEB1 noch weiter gesteigert. In BFTC-905-Zellen dagegen reichte die alleinige Stimulation mit TGF β nicht aus, um die Proteinexpression von PD-L1 zu erhöhen. Das gelang dann in der Kombination der TGF β -Behandlung mit ZEB1- oder Slug-Überexpression. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass TGF β weitere Signaltransduktionsprozesse auslöst, die sowohl die Expression der in der Arbeit untersuchten Transkriptionsfaktoren als auch bisher unbekannter, die PD-L1-Expression zusätzlich beeinflussender Faktoren, inklusive der Proteinstabilität von PD-L1, regulieren können.

Dass nicht alle Faktoren, die in der vorliegenden Arbeit in UCB-Zellen zu Veränderungen des Expressionsniveaus einzelner EMT-anzeigender Proteine geführt haben, notwendigerweise eine erhöhte PD-L1-Expression bedingen, wurde durch weitere Ergebnisse des Projekts gezeigt. Besonders durch die Überexpression von Slug wurden deutliche EMT-Veränderungen in beiden UCB-Zelllinien (u.a. Anstieg der Vimentin- und N-Cadherin-Expression sowie Verringerung der EpCAM-Expression) generiert; dennoch blieb ein Effekt auf PD-L1 aus. Noman *et al.* beschreiben ebenfalls, dass die EMT-vermittelte PD-L1-Induktion in Mammakarzinom-Zelllinien abhängig vom modifizierten Transkriptionsfaktor ist. So identifizierten sie in WISP2-herabregulierten MCF7-Zellen durch den zusätzlichen *knockdown* weiterer Transkriptionsfaktoren eine Regulation von PD-L1 durch ZEB1, während Snail, Slug und Twist nicht beteiligt waren [62]. Dass exogenes Slug in 5637 gar nicht und in BFTC-905 nur bei gleichzeitiger TGF β -Stimulation und nur in geringem Maße die PD-L1-Expression steigerte, bestätigt die Ergebnisse von Noman *et al.* Die von ihnen postulierte Regulation von PD-L1 durch ZEB1 wurde in 5637-Zellen mit schwachem Effekt auf die PD-L1-Proteinmenge in der vorliegenden Arbeit ebenfalls beobachtet. In BFTC-905-ZEB1-Zellen zeigte sich jedoch lediglich ein Effekt auf die PD-L1-mRNA, obwohl die Proteinmenge von PD-L1 sogar abnahm. Als

Regulationsmechanismus in Mamma- und Bronchialkarzinom-Zellen wurde eine Inhibition von PD-L1 durch die miR-200 beschrieben, welche wiederum durch ZEB1 reprimiert wird [61, 62]. Chung *et al.* beschreiben, dass die miR-200 im Ovarialkarzinom auch durch GRHL2 direkt transkriptionell reguliert wird [154]. Die in 5637-Zellen beobachtete, durch GRHL2-Verlust vermittelte Zunahme an PD-L1-Protein beruht jedoch vermutlich nicht auf einer direkten Wirkung der miR-200, da hier kein transkriptioneller PD-L1-Anstieg detektiert wurde. Vielmehr scheint eine Regulation von PD-L1 über die Proteinstabilität beteiligt zu sein, wie eingangs aufgrund zum Teil divergierender relativer mRNA- und Proteinexpression von PD-L1 im Vergleich der UCB-Zelllinien untereinander postuliert. Hsu *et al.* beschreiben beispielsweise eine PD-L1-Stabilisierung durch N-Glykosylierung in EMT-aktivierten Mammakarzinom-Zellen, welche durch β -Catenin und die N-Glykosyltransferase STT3 vermittelt wird [117]. Zwar wurden in der vorliegenden Arbeit keine Expressionsänderungen von β -Catenin durch EMT-Induktion beobachtet, doch um zu evaluieren, ob eine entsprechende Regulation möglicherweise auch für UCB-Zellen zutrifft, müsste auch die subzelluläre Lokalisation und Aktivität von β -Catenin ausgewertet werden.

Jedoch konnte in allen EMT-aktivierten 5637-Zellen eine Assoziation der PD-L1-Proteinexpression mit der Menge an phosphorylierter GSK-3 β beobachtet werden. Die Phosphorylierung von GSK-3 β an Serin 9 führt zur Inaktivierung der Kinase [158]. Aus diesen Ergebnissen und aufgrund der Arbeiten von Li *et al.* wurde die Hypothese generiert, dass die PD-L1-Expression in 5637 einer stabilitätsbedingten Regulation durch GSK-3 β unterliegt. Li *et al.* demonstrierten, dass GSK-3 β PD-L1 bindet und an Threonin 180 und Serin 184 phosphoryliert, was zur Ubiquitylierung und somit zum proteasomalen Abbau von PD-L1 führt [76]. Außerdem zeigten sie, dass ein *knockout* von GSK-3 β zu verstärkter PD-L1-Proteinexpression führen kann [183]. Passenderweise wurde auch in IFN γ -stimulierten RT-112-Zellen neben einem starken PD-L1-Anstieg eine gleichzeitige deutliche Zunahme von pGSK-3 β beobachtet.

Ein weiterer Hinweis auf eine GSK-3 β -vermittelte Regulation von PD-L1 war eine zunächst unerwartete Beobachtung in PD-L1-modifizierten Zelllinien. So wurde in vier PD-L1-kd-Zelllinien (5637, 647V, T24, TCC-SUP) in frühen Passagen ein Anstieg und in RT-112-PD-L1-Zellen ein Rückgang von inaktiver pGSK-3 β gegenüber den Kontrollzellen detektiert. Hieraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass die Zellen auf diese Weise in einem Kompensationsmechanismus der experimentell veränderten PD-L1-Expression entgegenwirken. Dies wurde auch dadurch bekräftigt, dass die PD-L1-Expression in Zellen mit PD-L1-kd in späteren Passagen wieder auf ihr Ausgangsniveau anstieg.

Weitere Hinweise auf einen kausalen Zusammenhang der GSK-3 β -Aktivität mit der PD-L1-Expression in 5637-Zellen wurden schließlich durch die Inhibition von GSK-3 durch CHIR99021 (IC₅₀-Werte von 10 nM für GSK-3 α und 6,7 nM für GSK-3 β) demonstriert. Wie erwartet führte dies zu deutlich erhöhter PD-L1-Proteinexpression (10-fach). Allerdings scheint der

Regulationsmechanismus in UCB-Zellen nicht auf die Stabilisierung von PD-L1 beschränkt zu sein, da auch ein moderater Anstieg der PD-L1-Transkriptmenge (2,4-fach) detektiert wurde. Ob es sich tatsächlich um eine direkte Regulation handelt oder welche Transkriptionsfaktoren beteiligt sein könnten, muss durch Folgeexperimente geklärt werden. Außerdem nahm bei GSK-3-Inhibition die Vimentin-Transkription zu, was auf die Induktion von EMT-Veränderungen hindeutet. Die Regulation der PD-L1-Expression über die Aktivität von GSK-3 β wurde somit nachgewiesen, jedoch nicht unabhängig vom EMT-Prozess. Diese Ergebnisse werden unterstützt durch die Daten von Min *et al.*, welche EMT über die Inhibition von GSK-3 durch SB-415286 in Ösophaguskarzinom-Zelllinien auslösten, wobei PD-L1 auf mRNA- und Proteinebene anstieg [174].

Im nächsten Schritt sollte nun ermittelt werden, durch welchen Signalweg GSK-3 β in EMT-aktivierten 5637-Zellen an Serin 9 phosphoryliert und somit inhibiert werden kann. Dass in PD-L1-überexprimierenden RT112-Zellen neben geringeren Mengen von pGSK-3 β auch verringerte Mengen an phosphoryliertem AKT detektiert wurden, ließ eine Regulation von GSK-3 β durch AKT vermuten, wie auch von Cross *et al.* gezeigt wurde [184]. Vorläufige Ergebnisse der Behandlung von 5637 mit dem AKT-Inhibitor MK-2206 ergaben jedoch keine Verminderung der PD-L1-Expression, die im Falle einer Regulation über die Achse AKT/GSK-3 β /PD-L1 durch verstärkte GSK-3 β -Aktivität zu erwarten gewesen wäre. Dies war im Einklang mit der in EMT-aktivierten 5637-Zellen unveränderten Menge an pAKT. Die Menge an pERK war zum Teil, jedoch nicht konsistent in EMT-induzierten Zellen verstärkt, sodass eine Regulation von GSK-3 β über ERK in 5637 ebenfalls unwahrscheinlich erschien. Auch die beschriebene Inaktivierung von GSK-3 β durch den mTOR-Signalweg [158] trifft wahrscheinlich auf die untersuchten 5637-Zellen nicht zu, da der mTOR-Inhibitor RAD001 (Everolimus) die TGF β -vermittelte PD-L1-Induktion in präliminären Ergebnissen nicht verhinderte.

Um die Suche nach dem Signalweg, der in TGF β -behandelten 5637-Zellen die verminderte Aktivität von GSK-3 β verursachen könnte, einzugrenzen, wurden bereits Vorversuche zur Inhibition des TGF β -Rezeptors 1 (ALK5) und der TGF β -aktivierten Kinase (TAK1), welche die Signalweiterleitung auch über den nicht-kanonischen TGF β -Signalweg vermittelt, durchgeführt. Während die Blockierung von ALK5 wie erwartet die Wirkung von TGF β auf die PD-L1- und Vimentin-Expression verhinderte, kam es unter der Inhibition von TAK1 nach wie vor zu einem TGF β -vermittelten PD-L1-Anstieg. Dieser wurde überraschenderweise durch die TAK1-Inhibition sogar noch verstärkt und auch die Proteinmenge von pGSK-3 β nahm zu. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Phosphorylierung von GSK-3 β und somit auch der Expressionsanstieg von PD-L1 in TGF β -behandelten 5637-Zellen nicht über TAK1, sondern hauptsächlich über die Aktivierung von SMAD2 und SMAD3 reguliert werden [104]. Der durch TAK1-Inhibition verursachte PD-L1-Anstieg könnte eventuell dadurch verursacht werden, dass die verringerte TAK1-Aktivität zu verringerter SMAD7-Expression führt, was wiederum die

Inhibition der Phosphorylierung von SMAD2 und SMAD3 durch SMAD7 aufheben könnte, sodass mehr aktives SMAD2 und SMAD3 zur Verfügung stehen [185].

Weitere Kinasen, die durch Inhibition auf ihre mögliche Beteiligung an der Phosphorylierung von GSK-3 β überprüft werden könnten, sind PKA, PKC und p90RSK. [186] Der Einfluss von PKA auf die GSK-3 β -Phosphorylierung wurde bereits in verschiedenen Zellsystemen gezeigt [187, 188]. Interessanterweise löste das in der vorliegenden Arbeit durch PD-L1-Überexpression in UM-UC-3-Zellen transkriptionell induzierte Peptidhormon Neurotensin in Kolonkarzinomzellen eine PKC-vermittelte Phosphorylierung von GSK-3 β aus [189], sodass die beobachtete erhöhte Genexpression von Neurotensin in diesem Zusammenhang untersucht werden sollte. Der im Promotionsprojekt experimentell ermittelte putative Mechanismus der PD-L1-Regulation UCB-Zellen, die verschiedenen EMT-auslösenden Faktoren ausgesetzt wurden, ist in Abbildung 54 am Beispiel von 5637-Zellen schematisch dargestellt.

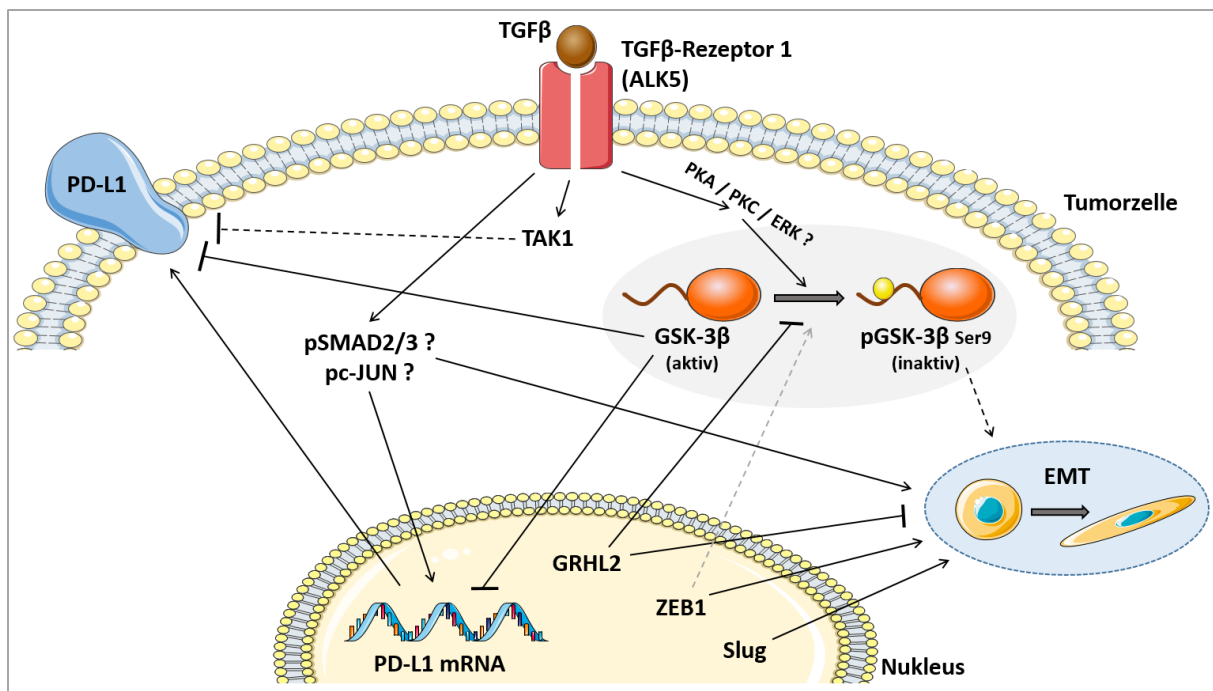


Abbildung 54: Putativer Regulationsmechanismus der PD-L1-Expression in EMT-aktivierten UCB-Zellen (5637)

Im Promotionsprojekt wurden Erkenntnisse zur Regulation der PD-L1-Expression in EMT-aktivierten 5637-Zellen gewonnen. Eine Stimulation mit TGF β kann sowohl die PD-L1-Transkription als auch die Proteinexpression steigern. Letzteres erfolgt vermutlich über die Phosphorylierung von GSK-3 β , was zur Inaktivierung der Kinase und somit zu verringertem PD-L1-Abbau führt. Durch welche Kinase diese Phosphorylierung vermittelt wird, ist noch unklar. Gleichzeitig löst TGF β in 5637-Zellen EMT aus, was mechanistisch ebenfalls nicht abschließend geklärt ist. Hierbei könnte möglicherweise die Phosphorylierung von SMAD2/3 oder c-JUN eine Rolle spielen. EMT wird außerdem durch erhöhte Expression von ZEB1 und Slug sowie verringerte Expression von GRHL2 induziert. Ein knockdown von GRHL2 bewirkt gleichzeitig die Inaktivierung von GSK-3 β und dadurch wahrscheinlich eine Stabilisierung von PD-L1. Gestrichelte Pfeile indizieren Effekte, die in weiteren Versuchen verifiziert werden müssen, und graue gestrichelte Pfeile geben Tendenzen an. Die Abbildung wurde erstellt mit graphischen Elementen von SERVIER Medical Art (<https://www.servier.de/medical-art>).

4.4 Bedeutung der PD-L1-Expression auf CTCs von UCB-Patienten

In der Therapie des fortgeschrittenen oder metastasierten UCB konnte mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren im Vergleich zur Chemotherapie bei einem Teil der Patienten ein länger anhaltendes Ansprechen beobachtet werden, so dass bereits klinische Zulassungen erreicht wurden [27, 28]. Dennoch fehlt weiterhin ein verlässlicher Biomarker zur Identifizierung der Patienten, die von der Therapie profitieren können. Als prädiktive Faktoren werden unter anderem die PD-1- und PD-L1-Expression sowohl auf Tumorzellen als auch auf tumorinfiltrierenden Leukozyten diskutiert. Jedoch finden sich auch in der PD-1/PD-L1-negativen Gruppe Patienten, die auf die Therapie ansprechen [1, 8, 31]. Es erscheint daher sinnvoll, auch das prädiktive Potenzial einer Analyse der PD-L1-Expression auf zirkulierenden Tumorzellen (CTCs, *circulating tumor cells*) für das Ansprechen auf Immun-Checkpoint-Therapien zu evaluieren. Gerade in fortgeschrittenen Stadien des Krankheitsverlaufs bietet sich die Analyse von Flüssigbiopsien (*liquid biopsy*) an, da hier Biopsien des Tumorgewebes häufig nicht zur Verfügung stehen [125]. CTCs haben darüber hinaus das Potenzial, viele der zum Zeitpunkt der Blutentnahme vorhandenen Tumorzell-Subklone zu repräsentieren [120, 124]. Der Nachweis von CTCs kann u.a. mit dem CellSearch®-System erfolgen, welches das bisher einzige Gerät mit einer Zulassung der FDA (*food and drug administration*) zur Anwendung bei ausgewählten Tumorentitäten ist. Es basiert auf einer automatischen Anreicherung von EpCAM-positiven Zellen und anschließender Immunfärbung sowie Fluoreszenz-mikroskopischer Auswertung. Um zur Beantwortung der Frage beizutragen, ob ein Echtzeit-Monitoring der PD-L1-Expression auf CTCs von UCB-Patienten klinische Relevanz hat, wurde im Promotionsprojekt ein CellSearch®-basierter Assay zur Analyse der PD-L1-Expression etabliert.

In der Disseminierung von Tumorzellen spielt die EMT eine wichtige Rolle, da sie die Mobilität, Plastizität und Invasivität von CTCs begünstigt [96]. Außerdem haben die Versuche an UCB-Zelllinien gezeigt, dass die PD-L1-Expression durch den EMT-Prozess beeinflusst werden kann. Da ein epithelial-mesenchymal-intermediärer Phänotyp mit besonderer Aggressivität der Zellen assoziiert wurde [101], sollte evaluiert werden, ob auch CTCs mit einem solchen intermediären Phänotyp identifiziert werden können. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich ein CellSearch®-basierter Assay zum Nachweis der Vimentin-Expression etabliert.

Die CTC-Positivitätsrate sowie die Vimentin-Expression der CTCs wurden unter Verwendung der CTC-Kit-Reagenzien analysiert. Diese erlauben einen sensitiven CTC-Nachweis über die Detektion der Keratin-Expression der Zellen mittels Phycoerythrin (PE)-markiertem Antikörper. Zur Analyse der PD-L1-Expression der CTCs hingegen wurden CXC-Kit-Reagenzien verwendet. Der Vorteil dieses Kits besteht in der höheren Sensitivität für den optionalen Fluoreszenzmarker im PE-Kanal, in diesem Fall PD-L1. Daraus resultierte gleichzeitig eine geringere Sensitivität für Keratin als im CTC-Kit, da in diesem Kit für den Positivmarker zwar

der gleiche anti-pan-Keratin-Antikörper eingesetzt wurde, dieser aber mit dem in der Fluoreszenzintensität schwächeren Fluorochrom Fluorescein markiert war. Zur PD-L1-Detektion im CellSearch®-System wurde derselbe Antikörper-Klon (E1L3N) verwendet, der auch im funktionellen Teil des Projekts zur Analyse der PD-L1-Expression eingesetzt wurde.

Die für ein UCB-Patientenkollektiv (n = 93 [M0], n = 33 [M1]) erhobenen Daten zeigten in metastasierten gegenüber nicht-metastasierten Patienten eine signifikant höhere Rate der CTC-Positivität (51,5% vs. 22,6%, p=0,004) sowie eine signifikant höhere CTC-Anzahl (p<0,001). Dies entspricht den Ergebnissen anderer Studien, in denen UCB-Patienten ebenfalls mit dem CellSearch®-System untersucht worden sind. So wurden bei nicht-metastasierten UCB-Patienten CTC-Positivitätsraten von 22,2% [131], 23% [130] und 30% [129] gefunden sowie von 57,1% [133] und 44% [190] bei metastasierten UCB-Patienten. Warum trotz metastasierter Erkrankung bei einem erheblichen Anteil der Patienten keine CTCs nachweisbar sind, ist bisher nicht geklärt [191]. Im CellSearch®-System können ausschließlich CTCs mit EpCAM-Expression detektiert werden. Möglicherweise könnten fehlende EpCAM- und/oder Keratin-Expression von solchen CTCs, die eine EMT durchlaufen haben, zum fehlenden Nachweis eines Teils der CTCs mit dem CellSearch®-System beitragen.

Um den Anteil von CTCs mit intermediärem Phänotyp zu evaluieren, wurde die Expression von Vimentin mit Hilfe eines Alexa 488-markierten anti-Vimentin-Antikörpers im vierten Kanal des CellSearch®-Systems analysiert. In nur wenigen Fällen wurden einzelne CTCs mit meistens sehr geringer Vimentin-Expression gefunden. Überraschenderweise war der Anteil von Patienten mit Vimentin-positiven CTCs fast identisch im Vergleich von nicht-metastasierten (28,6%) mit metastasierten (25,0%) Patienten. Dabei muss beachtet werden, dass diese Ergebnisse bisher auf einer sehr geringen Probenanzahl, die einerseits CTC-positiv war und andererseits auf Vimentin-Expression getestet wurden (n = 7 [M0], n = 12 [M1]), beruhen. Trotzdem lässt sich schlussfolgern, dass sowohl in Patienten mit nicht-metastasierten Tumoren als auch in denen mit fortgeschrittenen Tumoren selten intermediäre CTCs detektiert werden können. Ob vor allem CTCs nachgewiesen werden, die bereits wieder einer MET unterlagen, oder ob nur selten EMT durchlaufen wurde, kann mit derartigen deskriptiven Analysen nicht herausgefunden werden. Es sollten jedoch größere UCB-Patientenkollektive analysiert werden, um zu ermitteln, ob der Nachweis Vimentin-positiver CTCs mit klinisch-pathologischen Parametern korreliert. Auch Lindsay *et al.* wiesen mit dem CellSearch®-System nur in 37,5% (30/80) CTC-positiver Prostatakarzinom-Patienten Vimentin-positive CTCs nach, fanden jedoch eine Assoziation dieser CTCs mit einer schlechteren Gesamt-Überlebensrate [192].

Der spezifische Nachweis der PD-L1-Expression im CellSearch®-System wurde zunächst anhand von Zelllinien-Zellen und Patienten-CTCs gezeigt. Lediglich bei metastasierten UCB-

Patienten wurden in den mit dem CXC-Kit durchgeführten Analysen CTCs gefunden. In 77,8% (7/9) der untersuchten CTC-positiven Proben wurde mindestens eine PD-L1-positive CTC gefunden. Dabei war die Expression heterogen zwischen den Patienten aber auch zwischen den einzelnen Zellen. Darüber hinaus wurden bei einem metastasierten UCB-Patienten Blutproben im Verlauf der Immuntherapie mit Atezolizumab untersucht. Interessanterweise war in diesem Fall ein Anstieg von PD-L1-positiven CTCs mit einem Krankheitsprogress verbunden. Die geringe Anzahl Vimentin-positiver CTCs in diesem und weiteren untersuchten Patienten ließ darauf schließen, dass ein erheblicher Teil der PD-L1-positiven CTCs gleichzeitig Vimentin-negativ war. Vermutlich war somit in Patienten-CTCs die Expression von PD-L1 nicht mit einem intermediären Phänotyp assoziiert.

Dieser im Promotionsprojekt etablierte Test stellt den ersten CellSearch®-Assay zur Evaluation der PD-L1-Expression von CTCs in UCB-Patienten dar und kann in zukünftigen klinischen Studien verwendet werden. In einer vorausgehenden Arbeit wurde zu diesem Zweck das Epic-Sciences-System verwendet, welches ebenfalls CTCs mittels Immunfluoreszenz identifiziert. Anantharaman *et al.* fanden auf diese Weise PD-L1-positive CTCs in 33% (7/21) der Patienten mit metastasiertem UCB und in keinem von vier nicht-metastasierten Patienten mit fortgeschrittenem UCB. Zur PD-L1-Detektion wurde derselbe Antikörper-Klon (E1L3N) verwendet. Interessanterweise befanden sich unter den PD-L1-positiven CTCs auch Keratin-negative Zellen, welche durch genomische Analysen als Tumorzellen identifiziert wurden. Wenn auch nicht statistisch signifikant, war das Vorhandensein von PD-L1-positiven CTCs auch hier mit einem verkürzten Gesamt-Überleben assoziiert [140]. Diese Tendenz wurde auch in einer in Kooperation durchgeführten und zur Publikation eingereichten Arbeit aus dem Institut für Tumorbologie (ITB) an NSCLC-Patienten bestätigt. Janning *et al.* zeigten hierin eine Assoziation von PD-L1-positiven CTCs mit der Resistenz gegenüber einer PD-1/PD-L1-Inhibition. Die Analyse der PD-L1-Expression von CTCs erfolgte nach größenbasierter Isolation im Parsortix-System und unter Verwendung des gegen ein extrazelluläres Epitop von PD-L1 gerichteten Antikörper-Klons D8T4X [193]. Eine weitere Arbeit zum NSCLC, die auf CellSearch®-Analysen mit einem anderen anti-PD-L1-Antikörper-Klon basiert, unterstützt die mögliche Bedeutung von PD-L1-positiven CTCs als Marker für Resistenz gegenüber Immun-Checkpoint-Therapien [194]. Große prospektive klinische Studien könnten die therapeutische Relevanz der PD-L1-Expression auf CTCs für das Ansprechen auf PD-1/PD-L1-Immuntherapien im UCB und anderen Tumorentitäten bestätigen.

4.5 Ausblick

Im funktionellen Teil des vorliegenden Projekts wurden die Regulation und eine mögliche Tumorzell-intrinsische Funktion von PD-L1 im UCB mit besonderem Fokus auf den Zusammenhang mit dem EMT-Prozess untersucht.

Da bisher in der Analyse der Tumorzell-intrinsischen Funktion von PD-L1 im UCB lediglich ein transkriptioneller Anstieg von Neurotensin und ein transientser Effekt auf die Zellproliferation ermittelt wurden, sollten in zukünftigen Studien alternative experimentelle Herangehensweisen getestet werden, um weitere immununabhängige Funktionen von PD-L1 zu finden. Nachdem der shRNA-vermittelte *knockdown* von PD-L1 instabil war, könnte ein vollständiger *knockout* von PD-L1 mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Technologie einen aussichtsreichen Ansatz darstellen. Der *knockout* sollte unter anderem in der Zelllinie 5637 vorgenommen werden, da diese durch ihre phänotypische Plastizität bisher am besten dazu geeignet ist, den EMT-Prozess zu durchlaufen. Somit könnte die Frage nach der intrinsischen Funktion besser mit Untersuchungen zur EMT verbunden werden.

Außerdem ist denkbar, dass für die Evaluation von PD-1-vermittelten intrinsischen Effekten in den verwendeten UCB-Zellsystemen die Interaktion mit freiem PD-1 nicht ausreichend ist, sondern dass stattdessen membrangebundenes PD-1 in interagierenden Immunzellen erforderlich ist. Daher sollte in Folgeexperimenten die Interaktion von PD-L1-exprimierenden Tumorzellen mit PD-1-exprimierenden Suspensionszellen untersucht werden.

In den bisherigen Untersuchungen zur Induktion des EMT-Prozesses wurde gezeigt, dass verschiedene EMT-auslösende Bedingungen die PD-L1-Transkription und -Proteinexpression in unterschiedlichem Maße und in Abhängigkeit von der gewählten Zelllinie beeinflussen. Um die differenzierten Analysen zu den wichtigsten EMT-Transkriptionsfaktoren zu erweitern und noch fundiertere Aussagen bezüglich des möglichen Einflusses einer EMT auf die PD-L1-Expression treffen zu können, sollten weitere EMT-Transkriptionsfaktoren auf ihre Fähigkeit, die PD-L1-Expression zu beeinflussen, untersucht werden. Dies umfasst u.a. den *knockdown* von GRHL2 auch in BFTC-905 sowie die Überexpression von Snail und Twist in 5637 und BFTC-905. Darüber hinaus sollte die potenzielle Beteiligung von mikro-RNAs an dem beobachteten Anstieg der PD-L1-Expression in EMT-aktivierten Zellen [61, 62] untersucht werden. Des Weiteren muss die Signaltransduktionskette ausgehend von TGF β auf die Phosphorylierung von GSK-3 β und deren Einfluss auf die Expression von PD-L1 umfassend analysiert werden.

Resultierend aus den ersten Ergebnissen an Patientenproben sollte der in der vorliegenden Arbeit etablierte Assay zur Bestimmung der PD-L1-Expression auf CTCs nun prospektiv als translationales Forschungsprojekt in klinischen Studien für Patienten, die eine Immun-Checkpoint-Therapie erhalten, eingesetzt werden. Die Isolation individueller CTCs mit anschließender genomischer Einzelzell-Analyse würde darüber hinaus Aufschluss über klinisch relevante Mutationen geben, die mit den im Primärtumor und Metastasen detektierbaren Aberrationen verglichen werden können.

5 Zusammenfassung

Ziel von Therapien mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren ist es, die negative Regulation der T-Zell-Aktivierung zu blockieren und dadurch die Suppression der gegen den Tumor gerichteten Immunantwort wieder aufzuheben. So werden beispielsweise anti-PD-1/PD-L1-Antikörper eingesetzt, um zu erreichen, dass Tumorzellen vom Immunsystem erkannt und zerstört werden. Mit diesen Therapien konnten bereits Erfolge beim Harnblasenkarzinom (UCB) erzielt werden. Obwohl beim UCB PD-L1 und PD-1 mit unterschiedlicher Intensität sowohl in Tumoralen als auch Immunzellen exprimiert werden können, liegt ein verlässlicher Biomarker für die Vorhersage des Therapieansprechens bisher noch nicht vor. In die Regulation der Expression von Immun-Checkpoint-Molekülen ist eine Vielzahl von Signaltransduktionsmechanismen involviert, die zwischen Tumorentitäten oder individuellen Tumoren eines Tumortyps stark variieren können. Sie können sowohl durch intrinsische als auch extrinsische Faktoren beeinflusst werden, welche für das UCB noch weitestgehend unbekannt sind. Deshalb sollte mit dem vorliegenden Promotionsprojekt ein Beitrag zur Aufklärung der Regulation der PD-L1-Expression im UCB geleistet werden. Es wurden verschiedene experimentelle *in vitro*-Ansätze gewählt, um einerseits Faktoren zu identifizieren, die die PD-L1-Expression in UCB-Zellen beeinflussen können, und andererseits Tumorzell-intrinsische Funktionen von PD-L1 aufzudecken. Die PD-L1-Expression wurde dabei vor allem im Kontext des für die Tumorzell dissemination essenziellen Prozesses der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) untersucht. Darüber hinaus wurde ein Assay zur Messung der PD-L1-Expression von zirkulierenden Tumorzellen (CTCs, *circulating tumor cells*) etabliert, um die klinische Relevanz der CTC-PD-L1-Expression in Blutproben von UCB-Patienten als potenziellen Biomarker zu evaluieren.

Die wichtigsten Ergebnisse des Promotionsprojekts lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Western-Blot- und qRT-PCR-Analysen von 13 UCB-Zelllinien zeigten, dass die PD-L1-Expression mit dem molekularen Subtyp assoziiert ist. Während alle EL (*epithelial-like*)-Zelllinien, die dem basalen Subtyp zugeordnet werden können, PD-L1-Expression aufwiesen, konnte PD-L1 in den EL-Zelllinien mit lumenalem Subtyp nicht detektiert werden. Sowohl PD-L1-positive als auch PD-L1-negative Zelllinien konnten innerhalb des ML (*mesenchymal-like*)-Phänotyps („kein Subtyp“) identifiziert werden.
- In fast allen Zelllinien konnte durch Stimulation mit dem immunaktivierenden Zytokin IFN γ ein deutlicher Anstieg sowohl der PD-L1-spezifischen Transkriptmenge als auch der Proteinexpression beobachtet werden. Die hier erzielte Erhöhung der PD-L1-Expression wurde u.a. durch die Transkriptionsfaktoren STAT1 und IRF1 vermittelt.
- Zur Untersuchung Tumorzell-intrinsischer Funktionen von PD-L1 wurden anhand verschiedener UCB-Zelllinien Modellsysteme mit *knockdown* oder Überexpression von PD-L1 generiert. Hierbei zeigten Zellen mit verminderter PD-L1-Expression verringerte

und Zellen mit gesteigerter PD-L1-Expression erhöhte Proliferationsraten. Die Transkriptomanalyse von zwei PD-L1-überexprimierenden Zelllinien ergab jedoch nur wenige PD-L1-vermittelte differenziell exprimierte Gene. Ein in Folgeprojekten zu untersuchendes Kandidatengen kodiert für das Peptidhormon Neurotensin.

- PD-L1-Expression wurde sowohl in den EL- als auch in den ML-Zelllinien detektiert. Weder Zellen mit PD-L1-*knockdown* noch mit PD-L1-Überexpression zeigten Hinweise auf Veränderungen der Expression von EMT-indizierenden Proteinen.
- Ob Faktoren, die EMT auslösen können, die PD-L1-Expression beeinflussen, sollte a) durch Behandlung der Zellen mit dem EMT-induzierenden Zytokin TGF β , b) durch *knockdown* des als EMT-Suppressor bekannten Transkriptionsfaktors GRHL2 und c) durch Überexpression der EMT-Transkriptionsfaktoren ZEB1 und Slug untersucht werden. Hierzu wurden zwei Zelllinien (5637, BFTC-905) ausgewählt, die sowohl EL- als auch ML-Eigenschaften aufweisen. Nur in diesen beiden Zelllinien ließ sich die PD-L1-Transkription durch TGF β -Behandlung erhöhen. Die Herauf- bzw. Herabregulation einzelner die EMT beeinflussender Transkriptionsfaktoren führte zwar zu Veränderungen der Expression EMT-anzeigender Transkripte und/oder Proteine, aber nicht zu einer entscheidenden Änderung der PD-L1-Expression. Durch die TGF β -Behandlung der manipulierten Zelllinien jedoch konnte ein deutlicher Anstieg der PD-L1-Expression erzielt werden.
- In 5637-Zellen scheint die Aktivität der Kinase GSK-3 β eine entscheidende Rolle in der Regulation der PD-L1-Expression zu spielen. So war die Erhöhung der PD-L1-Proteinexpression mit der Inaktivierung von GSK-3 β durch Phosphorylierung der Aminosäure Serin 9 assoziiert. Der Einsatz eines spezifischen GSK-3-Inhibitors führte zu einem deutlichen Anstieg der PD-L1-Expression. Die bisherigen Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass weder der AKT- noch der mTOR-Signalweg für die beobachtete GSK-3 β -Phosphorylierung verantwortlich ist. In folgenden Experimenten soll untersucht werden, ob die Kinasen PKA, PKC oder ERK an diesem Prozess beteiligt sind.
- Zum Nachweis der PD-L1-Expression auf CTCs von UCB-Patienten wurde mit Hilfe von PD-L1-positiven und -negativen UCB-Zelllinien ein Assay für das CellSearch[®]-System etabliert. Die Analyse von Patientenproben ergab einerseits Heterogenität der PD-L1-Expression zwischen unterschiedlichen UCB-Patienten und andererseits CTC-Subpopulationen mit unterschiedlicher Intensität der PD-L1-spezifischen Immunfluoreszenz innerhalb individueller Patienten.

Abschließend lässt sich schlussfolgern, dass die PD-L1-Expression im UCB in Abhängigkeit vom Zelltyp verschiedenen Regulationsmechanismen unterliegt und durch exogene Faktoren

beeinflusst werden kann. Die Inaktivierung der Kinase GSK-3 β scheint dabei eine entscheidende Bedeutung für die Modulation der PD-L1-Expression zu besitzen.

Der in der vorliegenden Arbeit etablierte Nachweis der PD-L1-Expression auf CTCs in Blutproben von UCB-Patienten steht für die klinische Anwendung zur Verfügung und sollte in zukünftige klinische Studien einbezogen werden. Hierbei sollte die CTC-PD-L1-Expression mit dem Ansprechen der Patienten auf Immun-Checkpoint-Therapien verglichen werden.

Zusammenfassend wurde in diesem Projekt mit einer Vielzahl von experimentellen *in vitro*-Modellsystemen die PD-L1-Expression im UCB untersucht, um zu einem besseren Verständnis sowohl ihrer Regulation und Funktion als auch der klinischen Bedeutung der CTC-PD-L1-Expression beizutragen.

6 Summary

Therapies with immune checkpoint inhibitors aim at blocking the negative regulation of T cell activation, thereby relieving the suppression of anti-tumor immunity. For urothelial carcinoma of the bladder (UCB), good clinical responses have been observed with anti-PD-1/PD-L1 antibodies, which are used to achieve recognition and elimination of tumor cells by the immune system. Although PD-1 and PD-L1 can be expressed in tumor as well as immune cells in varying quantities, a reliable biomarker for predicting response to therapy is still lacking for UCB. Numerous signal transduction mechanisms are involved in regulation of immune checkpoint molecules. These may differ not only between tumor types but also between individual tumors of the same entity, based on intrinsic as well as extrinsic factors which are largely unknown for UCB. Therefore, the purpose of the current project was to contribute to elucidation of PD-L1 regulation in UCB. Firstly, factors influencing PD-L1 expression in UCB should be identified by applying different experimental *in vitro* approaches. Subsequently, tumor cell-intrinsic functions of PD-L1 should be revealed. PD-L1 expression was mainly investigated in the context of the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), which is an essential process for tumor cell dissemination. Furthermore, an assay for detection of PD-L1 expression on circulating tumor cells (CTCs) was established to evaluate the clinical relevance of CTC-PD-L1 expression in blood samples of UCB patients as a potential biomarker.

The main results of the project can be summarized as follows:

- Western blot and qRT-PCR analyses of 13 UCB cell lines found PD-L1 expression to be associated with the molecular subtype of the cells. While all epithelial-like (EL) cell lines, which could be attributed to a basal subtype, showed PD-L1 expression, PD-L1 was not detectable in EL cell lines of a luminal subtype. Within the mesenchymal-like (ML) phenotype (“no subtype”), PD-L1-positive as well as PD-L1-negative cell lines could be identified.
- By stimulation with the immune-activating cytokine IFN γ , a substantial increase of PD-L1 transcript, as well as protein expression, could be observed in almost all cell lines. This was mediated mainly by the transcription factors STAT1 and IRF1.
- For the investigation of tumor cell-intrinsic functions of PD-L1, model systems based on different UCB cell lines, with either knockdown or overexpression of PD-L1, were generated. Cells with reduced PD-L1 expression showed attenuated proliferation rates, whereas cells with increased PD-L1 expression presented with enhanced proliferation rates. Transcriptome analysis of two PD-L1-overexpressing cell lines revealed only a few differentially expressed genes. One candidate gene that can be analyzed in following projects codes for the peptide hormone neurotensin.
- PD-L1 expression was detected in EL cell lines as well as in ML cell lines. Both PD-L1 knockdown and overexpression did not result in changes in the expression levels of EMT-indicating proteins.

- It was also investigated if factors that mediate EMT can influence the expression of PD-L1 a) by treatment of the cells with the EMT-inducing cytokine TGF β , b) by knockdown of the transcription factor GRHL2, which is known as an EMT suppressor, and c) by overexpression of the EMT transcription factors ZEB1 and Slug. Therefore, two cell lines (5637, BFTC-905) which exhibit both epithelial and mesenchymal traits were chosen. Only in these two cell lines was PD-L1 transcription increased by TGF β treatment. Up- or downregulation of individual EMT-influencing transcription factors caused changes in the expression levels of EMT-indicating proteins and/or transcripts, but not a substantial change in PD-L1 expression. TGF β treatment of the 5637 and BFTC-905 cells that had undergone knockdown or overexpression led to a distinct upregulation of PD-L1 expression.
- In 5637 cells, the activity of the kinase GSK-3 β seems to play a crucial role in regulation of PD-L1 expression. Thus, an increase in PD-L1 protein expression was associated with inactivation of GSK-3 β by phosphorylation of amino acid serine 9. Application of a specific GSK-3 inhibitor generated a considerable PD-L1 upregulation. From preliminary results it can be deduced that neither the AKT nor the mTOR pathway are causative for GSK-3 β phosphorylation in this instance. In following experiments it should be analyzed whether the kinases PKA, PKC or ERK are involved in this process.
- For detection of PD-L1 expression on CTCs of UCB patients, an assay for the CellSearch[®]-system was established using PD-L1-positive and -negative UCB cell lines. Analysis of patient samples revealed inter- and intra-patient heterogeneity of PD-L1-specific immunofluorescence.

It can be concluded that PD-L1 expression in UCB follows different cell type-dependent regulatory mechanisms and can furthermore be influenced by extrinsic factors. Moreover, the findings of this project indicate that inactivation of the kinase GSK-3 β seems to play a crucial role for modulation of PD-L1 expression.

The robust assay for detection of PD-L1 expression on CTCs of UCB patients, which could be established in the current project, is readily available for clinical application and should be considered for implementation in future clinical trials. Here, CTC-PD-L1 expression should be related to response to therapy with immune checkpoint inhibitors.

In summary, this project addressed PD-L1 expression in UCB by implementing a number of *in vitro* approaches and experimental models with the aim of better elucidating its regulation and function as well as the clinical relevance of CTC-PD-L1 expression.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Bidnur S, Savdie R, Black PC: Inhibiting immune checkpoints for the treatment of bladder cancer. *Bladder Cancer* 2016;2:15-25.
- 2 Aggen DH, Drake CG: Biomarkers for immunotherapy in bladder cancer: A moving target. *J Immunother Cancer* 2017;5:94.
- 3 Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A: Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015;65:87-108.
- 4 Knowles MA, Hurst CD: Molecular biology of bladder cancer: New insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer* 2015;15:25-41.
- 5 Erben P, Hartmann A, Bolenz C: [molecular characterisation of urothelial bladder cancer: Will it improve patient care?]. *Aktuelle Urol* 2015;46:227-235.
- 6 Donin NM, Lenis AT, Holden S, Drakaki A, Pantuck A, Belldegrün A, Chamie K: Immunotherapy for the treatment of urothelial carcinoma. *J Urol* 2017;197:14-22.
- 7 Morales A, Eidinger D, Bruce AW: Intracavitary bacillus calmette-guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol* 1976;116:180-183.
- 8 Bellmunt J, Powles T, Vogelzang NJ: A review on the evolution of pd-1/pd-l1 immunotherapy for bladder cancer: The future is now. *Cancer Treat Rev* 2017;54:58-67.
- 9 Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, Carter SL, Stewart C, Mermel CH, Roberts SA, Kiezun A, Hammerman PS, McKenna A, Drier Y, Zou L, Ramos AH, Pugh TJ, Stransky N, Helman E, Kim J, Sougnez C, Ambrogio L, Nickerson E, Shefler E, Cortes ML, Auclair D, Saksena G, Voet D, Noble M, DiCara D, Lin P, Lichtenstein L, Heiman DI, Fennell T, Imielinski M, Hernandez B, Hodis E, Baca S, Dulak AM, Lohr J, Landau DA, Wu CJ, Melendez-Zajgla J, Hidalgo-Miranda A, Koren A, McCarroll SA, Mora J, Crompton B, Onofrio R, Parkin M, Winckler W, Ardlie K, Gabriel SB, Roberts CWM, Biegel JA, Stegmaier K, Bass AJ, Garraway LA, Meyerson M, Golub TR, Gordenin DA, Sunyaev S, Lander ES, Getz G: Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* 2013;499:214-218.
- 10 Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, Xie M, Zhang Q, McMichael JF, Wyczalkowski MA, Leiserson MDM, Miller CA, Welch JS, Walter MJ, Wendl MC, Ley TJ, Wilson RK, Raphael BJ, Ding L: Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 2013;502:333-339.
- 11 Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SA, Behjati S, Biankin AV, Bignell GR, Bolli N, Borg A, Borresen-Dale AL, Boyault S, Burkhardt B, Butler AP, Caldas C, Davies HR, Desmedt C, Eils R, Eyfjord JE, Foekens JA, Greaves M, Hosoda F, Hutter B, Ilicic T, Imbeaud S, Imielinski M, Jager N, Jones DT, Jones D, Knappskog S, Kool M, Lakhani SR, Lopez-Otin C, Martin S, Munshi NC, Nakamura H, Northcott PA, Pajic M, Papaemmanuil E, Paradiso A, Pearson JV, Puente XS, Raine K, Ramakrishna M, Richardson AL, Richter J, Rosenstiel P, Schlesner M, Schumacher TN, Span PN, Teague JW, Totoki Y, Tutt AN, Valdes-Mas R, van Buuren MM, van 't Veer L, Vincent-Salomon A, Waddell N, Yates LR, Australian Pancreatic Cancer Genome I, Consortium IBC, Consortium IM-S, PedBrain I, Zucman-Rossi J, Futreal PA, McDermott U, Lichter P, Meyerson M, Grimmond SM, Siebert R, Campo E, Shibata T, Pfister SM, Campbell PJ, Stratton MR: Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 2013;500:415-421.

- 12 Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD: The three es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 2004;22:329-360.
- 13 Kim R, Emi M, Tanabe K: Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 2007;121:1-14.
- 14 Mohme M, Riethdorf S, Pantel K: Circulating and disseminated tumour cells - mechanisms of immune surveillance and escape. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14:155-167.
- 15 Chen DS, Mellman I: Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity* 2013;39:1-10.
- 16 Carosella ED, Ploussard G, LeMaout J, Desgrandchamps F: A systematic review of immunotherapy in urologic cancer: Evolving roles for targeting of ctla-4, pd-1/pd-l1, and hla-g. *Eur Urol* 2015;68:267-279.
- 17 Le Mercier I, Lines JL, Noelle RJ: Beyond ctla-4 and pd-1, the generation z of negative checkpoint regulators. *Front Immunol* 2015;6:418.
- 18 Khandelwal N, Breinig M, Speck T, Michels T, Kreutzer C, Sorrentino A, Sharma AK, Umansky L, Conrad H, Poschke I, Offringa R, Konig R, Bernhard H, Machlenkin A, Boutros M, Beckhove P: A high-throughput rnai screen for detection of immune-checkpoint molecules that mediate tumor resistance to cytotoxic t lymphocytes. *EMBO Mol Med* 2015;7:450-463.
- 19 Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH: Pd-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2008;26:677-704.
- 20 Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T: Induced expression of pd-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* 1992;11:3887-3895.
- 21 Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, Greenfield EA, Bourque K, Boussiotis VA, Carter LL, Carreno BM, Malenkovich N, Nishimura H, Okazaki T, Honjo T, Sharpe AH, Freeman GJ: Pd-l2 is a second ligand for pd-1 and inhibits t cell activation. *Nat Immunol* 2001;2:261-268.
- 22 Rodig N, Ryan T, Allen JA, Pang H, Grabie N, Chernova T, Greenfield EA, Liang SC, Sharpe AH, Lichtman AH, Freeman GJ: Endothelial expression of pd-l1 and pd-l2 down-regulates cd8+ t cell activation and cytolysis. *Eur J Immunol* 2003;33:3117-3126.
- 23 Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T: Engagement of the pd-1 immunoinhibitory receptor by a novel b7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000;192:1027-1034.
- 24 Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman GJ, Kuchroo VK, Sharpe AH: Pd-l1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory t cells. *J Exp Med* 2009;206:3015-3029.
- 25 Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, Roche PC, Lu J, Zhu G, Tamada K, Lennon VA, Celis E, Chen L: Tumor-associated b7-h1 promotes t-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002;8:793-800.

- 26 Pardoll DM: The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012;12:252-264.
- 27 Davarpanah NN, Yuno A, Trepel JB, Apolo AB: Immunotherapy: A new treatment paradigm in bladder cancer. *Curr Opin Oncol* 2017; doi: 10.1097/CCO.0000000000000366.
- 28 Sundahl N, Rottey S, De Maeseneer D, Ost P: Pembrolizumab for the treatment of bladder cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2018;18:107-114.
- 29 Mariathasan S, Turley SJ, Nickles D, Castiglioni A, Yuen K, Wang Y, Kadel EE, III, Koeppen H, Astarita JL, Cubas R, Jhunjhunwala S, Banchereau R, Yang Y, Guan Y, Chalouni C, Ziai J, Senbabaoglu Y, Santoro S, Sheinson D, Hung J, Giltmane JM, Pierce AA, Mesh K, Lianoglou S, Riegler J, Carano RAD, Eriksson P, Hoglund M, Somarriba L, Halligan DL, van der Heijden MS, Loriot Y, Rosenberg JE, Fong L, Mellman I, Chen DS, Green M, Derleth C, Fine GD, Hegde PS, Bourgon R, Powles T: Tgfbeta attenuates tumour response to pd-1 blockade by contributing to exclusion of t cells. *Nature* 2018;554:544-548.
- 30 Massard C, Gordon MS, Sharma S, Rafii S, Wainberg ZA, Luke J, Curiel TJ, Colon-Otero G, Hamid O, Sanborn RE, O'Donnell PH, Drakaki A, Tan W, Kurland JF, Rebelatto MC, Jin X, Blake-Haskins JA, Gupta A, Segal NH: Safety and efficacy of durvalumab (medi4736), an anti-programmed cell death ligand-1 immune checkpoint inhibitor, in patients with advanced urothelial bladder cancer. *J Clin Oncol* 2016;34:3119-3125.
- 31 Diggs LP, Hsueh EC: Utility of pd-1 immunohistochemistry assays for predicting pd-1/pd-1 inhibitor response. *Biomark Res* 2017;5:12.
- 32 Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, Sosman JA, McDermott DF, Powderly JD, Gettinger SN, Kohrt HE, Horn L, Lawrence DP, Rost S, Leabman M, Xiao Y, Mokatrinn A, Koeppen H, Hegde PS, Mellman I, Chen DS, Hodi FS: Predictive correlates of response to the anti-pd-1 antibody mpdl3280a in cancer patients. *Nature* 2014;515:563-567.
- 33 Carbognin L, Pilotto S, Milella M, Vaccaro V, Brunelli M, Calio A, Cuppone F, Sperduti I, Giannarelli D, Chilosì M, Bronte V, Scarpa A, Bria E, Tortora G: Differential activity of nivolumab, pembrolizumab and mpdl3280a according to the tumor expression of programmed death-ligand-1 (pd-1): Sensitivity analysis of trials in melanoma, lung and genitourinary cancers. *PLoS One* 2015;10:e0130142.
- 34 Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, van der Heijden MS, Balar AV, Necchi A, Dawson N, O'Donnell PH, Balmanoukian A, Loriot Y, Srinivas S, Retz MM, Grivas P, Joseph RW, Galsky MD, Fleming MT, Petrylak DP, Perez-Gracia JL, Burris HA, Castellano D, Canil C, Bellmunt J, Bajorin D, Nickles D, Bourgon R, Frampton GM, Cui N, Mariathasan S, Abidoye O, Fine GD, Dreicer R: Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: A single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet* 2016;387:1909-1920.
- 35 Powles T, Eder JP, Fine GD, Braithel FS, Loriot Y, Cruz C, Bellmunt J, Burris HA, Petrylak DP, Teng SL, Shen X, Boyd Z, Hegde PS, Chen DS, Vogelzang NJ: Mpdl3280a (anti-pd-1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature* 2014;515:558-562.

- 36 Powles T, Smith K, Stenzl A, Bedke J: Immune checkpoint inhibition in metastatic urothelial cancer. *Eur Urol* 2017;72:477-481.
- 37 Perea F, Sanchez-Palencia A, Gomez-Morales M, Bernal M, Concha A, Garcia MM, Gonzalez-Ramirez AR, Kerick M, Martin J, Garrido F, Ruiz-Cabello F, Aptsiauri N: Hla class i loss and pd-l1 expression in lung cancer: Impact on t-cell infiltration and immune escape. *Oncotarget* 2018;9:4120-4133.
- 38 Tauriello DVF, Palomo-Ponce S, Stork D, Berenguer-Llargo A, Badia-Ramentol J, Iglesias M, Sevillano M, Ibiza S, Canellas A, Hernando-Momblona X, Byrom D, Matarin JA, Calon A, Rivas EI, Nebreda AR, Riera A, Attolini CS, Batlle E: Tgfbeta drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. *Nature* 2018;554:538-543.
- 39 Benci JL, Xu B, Qiu Y, Wu TJ, Dada H, Twyman-Saint Victor C, Cucolo L, Lee DSM, Pauken KE, Huang AC, Gangadhar TC, Amaravadi RK, Schuchter LM, Feldman MD, Ishwaran H, Vonderheide RH, Maity A, Wherry EJ, Minn AJ: Tumor interferon signaling regulates a multigenic resistance program to immune checkpoint blockade. *Cell* 2016;167:1540-1554 e1512.
- 40 Mandai M, Hamanishi J, Abiko K, Matsumura N, Baba T, Konishi I: Dual faces of ifngamma in cancer progression: A role of pd-l1 induction in the determination of pro- and antitumor immunity. *Clin Cancer Res* 2016;22:2329-2334.
- 41 Giannopoulos A, Constantinides C, Fokaeas E, Stravodimos C, Giannopoulou M, Kyroudi A, Gounaris A: The immunomodulating effect of interferon-gamma intravesical instillations in preventing bladder cancer recurrence. *Clin Cancer Res* 2003;9:5550-5558.
- 42 Madore J, Vilain RE, Menzies AM, Kakavand H, Wilmott JS, Hyman J, Yearley JH, Kefford RF, Thompson JF, Long GV, Hersey P, Scolyer RA: Pd-l1 expression in melanoma shows marked heterogeneity within and between patients: Implications for anti-pd-1/pd-l1 clinical trials. *Pigment Cell Melanoma Res* 2015;28:245-253.
- 43 Cree IA, Booton R, Cane P, Gosney J, Ibrahim M, Kerr K, Lal R, Lewanski C, Navani N, Nicholson AG, Nicolson M, Summers Y: Pd-l1 testing for lung cancer in the uk: Recognizing the challenges for implementation. *Histopathology* 2016;69:177-186.
- 44 Li CW, Lim SO, Chung EM, Kim YS, Park AH, Yao J, Cha JH, Xia W, Chan LC, Kim T, Chang SS, Lee HH, Chou CK, Liu YL, Yeh HC, Perillo EP, Dunn AK, Kuo CW, Khoo KH, Hsu JL, Wu Y, Hsu JM, Yamaguchi H, Huang TH, Sahin AA, Hortobagyi GN, Yoo SS, Hung MC: Eradication of triple-negative breast cancer cells by targeting glycosylated pd-l1. *Cancer Cell* 2018;33:187-201 e110.
- 45 Zerdes I, Matikas A, Bergh J, Rassidakis GZ, Foukakis T: Genetic, transcriptional and post-translational regulation of the programmed death protein ligand 1 in cancer: Biology and clinical correlations. *Oncogene* 2018;37:4639-4661.
- 46 Chen J, Jiang CC, Jin L, Zhang XD: Regulation of pd-l1: A novel role of pro-survival signalling in cancer. *Ann Oncol* 2016;27:409-416.
- 47 Shi Y: Regulatory mechanisms of pd-l1 expression in cancer cells. *Cancer Immunol Immunother* 2018;67:1481-1489.
- 48 Dong P, Xiong Y, Yue J, Hanley SJB, Watari H: Tumor-intrinsic pd-l1 signaling in cancer initiation, development and treatment: Beyond immune evasion. *Front Oncol* 2018;8:386.

- 49 Budczies J, Bockmayr M, Denkert C, Klauschen F, Groschel S, Darb-Esfahani S, Pfarr N, Leichsenring J, Onozato ML, Lennerz JK, Dietel M, Frohling S, Schirmacher P, Iafrate AJ, Weichert W, Stenzinger A: Pan-cancer analysis of copy number changes in programmed death-ligand 1 (pd-l1, cd274) - associations with gene expression, mutational load, and survival. *Genes Chromosomes Cancer* 2016;55:626-639.
- 50 Twa DD, Chan FC, Ben-Neriah S, Woolcock BW, Mottok A, Tan KL, Slack GW, Gunawardana J, Lim RS, McPherson AW, Kridel R, Telenius A, Scott DW, Savage KJ, Shah SP, Gascoyne RD, Steidl C: Genomic rearrangements involving programmed death ligands are recurrent in primary mediastinal large b-cell lymphoma. *Blood* 2014;123:2062-2065.
- 51 Moon JW, Kong SK, Kim BS, Kim HJ, Lim H, Noh K, Kim Y, Choi JW, Lee JH, Kim YS: Ifngamma induces pd-l1 overexpression by jak2/stat1/irf-1 signaling in ebv-positive gastric carcinoma. *Sci Rep* 2017;7:17810.
- 52 Garcia-Diaz A, Shin DS, Moreno BH, Saco J, Escuin-Ordinas H, Rodriguez GA, Zaretsky JM, Sun L, Hugo W, Wang X, Parisi G, Saus CP, Torrejon DY, Graeber TG, Comin-Anduix B, Hui-Lieskovan S, Damoiseaux R, Lo RS, Ribas A: Interferon receptor signaling pathways regulating pd-l1 and pd-l2 expression. *Cell Rep* 2017;19:1189-1201.
- 53 Bellucci R, Martin A, Bommarito D, Wang K, Hansen SH, Freeman GJ, Ritz J: Interferon-gamma-induced activation of jak1 and jak2 suppresses tumor cell susceptibility to nk cells through upregulation of pd-l1 expression. *Oncoimmunology* 2015;4:e1008824.
- 54 Gowrishankar K, Gunatilake D, Gallagher SJ, Tiffen J, Rizos H, Hersey P: Inducible but not constitutive expression of pd-l1 in human melanoma cells is dependent on activation of nf-kappab. *PLoS One* 2015;10:e0123410.
- 55 Concha-Benavente F, Srivastava RM, Trivedi S, Lei Y, Chandran U, Seethala RR, Freeman GJ, Ferris RL: Identification of the cell-intrinsic and -extrinsic pathways downstream of egfr and ifngamma that induce pd-l1 expression in head and neck cancer. *Cancer Res* 2016;76:1031-1043.
- 56 Lienlaf M, Perez-Villarroel P, Knox T, M P, E S, J P, K VW, C L, F C, S D, M SKS, M M, A K, J PI, A S, E S, J W, E MS, A V: Essential role of hdac6 in the regulation of pd-l1 in melanoma. *Mol Oncol* 2016;10:735-750.
- 57 Marzec M, Zhang Q, Goradia A, Raghunath PN, Liu X, Paessler M, Wang HY, Wysocka M, Cheng M, Ruggeri BA, Wasik MA: Oncogenic kinase npm/alk induces through stat3 expression of immunosuppressive protein cd274 (pd-l1, b7-h1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:20852-20857.
- 58 Kim EY, Kim A, Kim SK, Chang YS: Myc expression correlates with pd-l1 expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2017;110:63-67.
- 59 Casey SC, Tong L, Li Y, Do R, Walz S, Fitzgerald KN, Gouw AM, Baylot V, Gutgemann I, Eilers M, Felsher DW: Myc regulates the antitumor immune response through cd47 and pd-l1. *Science* 2016;352:227-231.
- 60 Barsoum IB, Smallwood CA, Siemens DR, Graham CH: A mechanism of hypoxia-mediated escape from adaptive immunity in cancer cells. *Cancer Res* 2014;74:665-674.
- 61 Chen L, Gibbons DL, Goswami S, Cortez MA, Ahn YH, Byers LA, Zhang X, Yi X, Dwyer D, Lin W, Diao L, Wang J, Roybal J, Patel M, Ungewiss C, Peng D, Antonia S, Mediavilla-

- Varela M, Robertson G, Suraokar M, Welsh JW, Erez B, Wistuba, II, Chen L, Peng D, Wang S, Ullrich SE, Heymach JV, Kurie JM, Qin FX: Metastasis is regulated via microRNA-200/zeb1 axis control of tumour cell pd-l1 expression and intratumoral immunosuppression. *Nat Commun* 2014;5:5241.
- 62 Noman MZ, Janji B, Abdou A, Hasmim M, Terry S, Tan TZ, Mami-Chouaib F, Thiery JP, Chouaib S: The immune checkpoint ligand pd-l1 is upregulated in emt-activated human breast cancer cells by a mechanism involving zeb-1 and mir-200. *Oncoimmunology* 2017;6:e1263412.
- 63 Mak MP, Tong P, Diao L, Cardnell RJ, Gibbons DL, William WN, Skoulidis F, Parra ER, Rodriguez-Canales J, Wistuba, II, Heymach JV, Weinstein JN, Coombes KR, Wang J, Byers LA: A patient-derived, pan-cancer emt signature identifies global molecular alterations and immune target enrichment following epithelial-to-mesenchymal transition. *Clin Cancer Res* 2016;22:609-620.
- 64 Skinner HD, Giri U, Yang LP, Kumar M, Liu Y, Story MD, Pickering CR, Byers LA, Williams MD, Wang J, Shen L, Yoo SY, Fan YH, Molkentine DP, Beadle BM, Meyn RE, Myers JN, Heymach JV: Integrative analysis identifies a novel axl-pi3 kinase-pd-l1 signaling axis associated with radiation resistance in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2017;23:2713-2722.
- 65 Lastwika KJ, Wilson W, 3rd, Li QK, Norris J, Xu H, Ghazarian SR, Kitagawa H, Kawabata S, Taube JM, Yao S, Liu LN, Gills JJ, Dennis PA: Control of pd-l1 expression by oncogenic activation of the akt-mtor pathway in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2016;76:227-238.
- 66 Chen N, Fang W, Zhan J, Hong S, Tang Y, Kang S, Zhang Y, He X, Zhou T, Qin T, Huang Y, Yi X, Zhang L: Upregulation of pd-l1 by egfr activation mediates the immune escape in egfr-driven nsclc: Implication for optional immune targeted therapy for nsclc patients with egfr mutation. *J Thorac Oncol* 2015;10:910-923.
- 67 Janse van Rensburg HJ, Azad T, Ling M, Hao Y, Snetsinger B, Khanal P, Minassian LM, Graham CH, Rauh MJ, Yang X: The hippo pathway component taz promotes immune evasion in human cancer through pd-l1. *Cancer Res* 2018;78:1457-1470.
- 68 Parsa AT, Waldron JS, Panner A, Crane CA, Parney IF, Barry JJ, Cachola KE, Murray JC, Tihan T, Jensen MC, Mischel PS, Stokoe D, Pieper RO: Loss of tumor suppressor pten function increases b7-h1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat Med* 2007;13:84-88.
- 69 Wang Q, Lin W, Tang X, Li S, Guo L, Lin Y, Kwok HF: The roles of microRNAs in regulating the expression of pd-1/pd-l1 immune checkpoint. *Int J Mol Sci* 2017;18:doi: 10.3390/ijms18122540.
- 70 Guo W, Tan W, Liu S, Huang X, Lin J, Liang R, Su L, Su Q, Wang C: Mir-570 inhibited the cell proliferation and invasion through directly targeting b7-h1 in hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol* 2015;36:9049-9057.
- 71 Dong P, Xiong Y, Yu J, Chen L, Tao T, Yi S, Hanley SJB, Yue J, Watari H, Sakuragi N: Control of pd-l1 expression by mir-140/142/340/383 and oncogenic activation of the oct4-mir-18a pathway in cervical cancer. *Oncogene* 2018;37:5257-5268.

- 72 Kataoka K, Shiraishi Y, Takeda Y, Sakata S, Matsumoto M, Nagano S, Maeda T, Nagata Y, Kitanaka A, Mizuno S, Tanaka H, Chiba K, Ito S, Watatani Y, Kakiuchi N, Suzuki H, Yoshizato T, Yoshida K, Sanada M, Itonaga H, Imaizumi Y, Totoki Y, Munakata W, Nakamura H, Hama N, Shide K, Kubuki Y, Hidaka T, Kameda T, Masuda K, Minato N, Kashiwase K, Izutsu K, Takaori-Kondo A, Miyazaki Y, Takahashi S, Shibata T, Kawamoto H, Akatsuka Y, Shimoda K, Takeuchi K, Seya T, Miyano S, Ogawa S: Aberrant pd-l1 expression through 3'-utr disruption in multiple cancers. *Nature* 2016;534:402-406.
- 73 Burr ML, Sparbier CE, Chan YC, Williamson JC, Woods K, Beavis PA, Lam EYN, Henderson MA, Bell CC, Stolzenburg S, Gilan O, Bloor S, Noori T, Morgens DW, Bassik MC, Neeson PJ, Behren A, Darcy PK, Dawson SJ, Voskoboinik I, Trapani JA, Cebon J, Lehner PJ, Dawson MA: Cmtm6 maintains the expression of pd-l1 and regulates anti-tumour immunity. *Nature* 2017;549:101-105.
- 74 Mezzadra R, Sun C, Jae LT, Gomez-Eerland R, de Vries E, Wu W, Logtenberg MEW, Slagter M, Rozeman EA, Hofland I, Broeks A, Horlings HM, Wessels LFA, Blank CU, Xiao Y, Heck AJR, Borst J, Brummelkamp TR, Schumacher TNM: Identification of cmtm6 and cmtm4 as pd-l1 protein regulators. *Nature* 2017;549:106-110.
- 75 Lim SO, Li CW, Xia W, Cha JH, Chan LC, Wu Y, Chang SS, Lin WC, Hsu JM, Hsu YH, Kim T, Chang WC, Hsu JL, Yamaguchi H, Ding Q, Wang Y, Yang Y, Chen CH, Sahin AA, Yu D, Hortobagyi GN, Hung MC: Deubiquitination and stabilization of pd-l1 by csn5. *Cancer Cell* 2016;30:925-939.
- 76 Li CW, Lim SO, Xia W, Lee HH, Chan LC, Kuo CW, Khoo KH, Chang SS, Cha JH, Kim T, Hsu JL, Wu Y, Hsu JM, Yamaguchi H, Ding Q, Wang Y, Yao J, Lee CC, Wu HJ, Sahin AA, Allison JP, Yu D, Hortobagyi GN, Hung MC: Glycosylation and stabilization of programmed death ligand-1 suppresses t-cell activity. *Nat Commun* 2016;7:12632.
- 77 Qian Y, Deng J, Geng L, Xie H, Jiang G, Zhou L, Wang Y, Yin S, Feng X, Liu J, Ye Z, Zheng S: Tlr4 signaling induces b7-h1 expression through mapk pathways in bladder cancer cells. *Cancer Invest* 2008;26:816-821.
- 78 Robertson AG, Kim J, Al-Ahmadie H, Bellmunt J, Guo G, Cherniack AD, Hinoue T, Laird PW, Hoadley KA, Akbani R, Castro MAA, Gibb EA, Kanchi RS, Gordenin DA, Shukla SA, Sanchez-Vega F, Hansel DE, Czerniak BA, Reuter VE, Su X, de Sa Carvalho B, Chagas VS, Mungall KL, Sadeghi S, Peadamallu CS, Lu Y, Klimczak LJ, Zhang J, Choo C, Ojesina AI, Bullman S, Leraas KM, Lichtenberg TM, Wu CJ, Schultz N, Getz G, Meyerson M, Mills GB, McConkey DJ, Network TR, Weinstein JN, Kwiatkowski DJ, Lerner SP: Comprehensive molecular characterization of muscle-invasive bladder cancer. *Cell* 2018;174:1033.
- 79 Hodgson A, Liu SK, Vesprini D, Xu B, Downes MR: Basal-subtype bladder tumours show a 'hot' immunophenotype. *Histopathology* 2018;73:748-757.
- 80 Aine M, Eriksson P, Liedberg F, Sjobahl G, Hoglund M: Biological determinants of bladder cancer gene expression subtypes. *Sci Rep* 2015;5:10957.
- 81 Choi W, Porten S, Kim S, Willis D, Plimack ER, Hoffman-Censits J, Roth B, Cheng T, Tran M, Lee IL, Melquist J, Bondaruk J, Majewski T, Zhang S, Pretzsch S, Baggerly K, Siefker-Radtke A, Czerniak B, Dinney CP, McConkey DJ: Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer Cell* 2014;25:152-165.

- 82 Warrick JI, Walter V, Yamashita H, Chung E, Shuman L, Ampona VO, Zheng Z, Chan W, Whitcomb TL, Yue F, Iyyanki T, Kawasaki YI, Kaag M, Guo W, Raman JD, Park JS, DeGraff DJ: Foxa1, gata3 and ppar cooperate to drive luminal subtype in bladder cancer: A molecular analysis of established human cell lines. *Sci Rep* 2016;6:38531.
- 83 Cancer Genome Atlas Research N: Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature* 2014;507:315-322.
- 84 Ritprajak P, Azuma M: Intrinsic and extrinsic control of expression of the immunoregulatory molecule pd-l1 in epithelial cells and squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2015;51:221-228.
- 85 Song X, Liu J, Lu Y, Jin H, Huang D: Overexpression of b7-h1 correlates with malignant cell proliferation in pancreatic cancer. *Oncol Rep* 2014;31:1191-1198.
- 86 Clark CA, Gupta HB, Sareddy G, Pandeswara S, Lao S, Yuan B, Drerup JM, Padron A, Conejo-Garcia J, Murthy K, Liu Y, Turk MJ, Thedieck K, Hurez V, Li R, Vadlamudi R, Curiel TJ: Tumor-intrinsic pd-l1 signals regulate cell growth, pathogenesis, and autophagy in ovarian cancer and melanoma. *Cancer Res* 2016;76:6964-6974.
- 87 Ghebeh H, Lehe C, Barhoush E, Al-Romaih K, Tulbah A, Al-Alwan M, Hendrayani SF, Manogaran P, Alaiya A, Al-Tweigeri T, Aboussekhra A, Dermime S: Doxorubicin downregulates cell surface b7-h1 expression and upregulates its nuclear expression in breast cancer cells: Role of b7-h1 as an anti-apoptotic molecule. *Breast Cancer Res* 2010;12:R48.
- 88 Chen L, Xiong Y, Li J, Zheng X, Zhou Q, Turner A, Wu C, Lu B, Jiang J: Pd-l1 expression promotes epithelial to mesenchymal transition in human esophageal cancer. *Cell Physiol Biochem* 2017;42:2267-2280.
- 89 Xu S, Tao Z, Hai B, Liang H, Shi Y, Wang T, Song W, Chen Y, OuYang J, Chen J, Kong F, Dong Y, Jiang SW, Li W, Wang P, Yuan Z, Wan X, Wang C, Li W, Zhang X, Chen K: Mir-424(322) reverses chemoresistance via t-cell immune response activation by blocking the pd-l1 immune checkpoint. *Nat Commun* 2016;7:11406.
- 90 Chang CH, Qiu J, O'Sullivan D, Buck MD, Noguchi T, Curtis JD, Chen Q, Gindin M, Gubin MM, van der Windt GJ, Tonc E, Schreiber RD, Pearce EJ, Pearce EL: Metabolic competition in the tumor microenvironment is a driver of cancer progression. *Cell* 2015;162:1229-1241.
- 91 Mertins P, Mani DR, Ruggles KV, Gillette MA, Clauser KR, Wang P, Wang X, Qiao JW, Cao S, Petralia F, Kawaler E, Mundt F, Krug K, Tu Z, Lei JT, Gatta ML, Wilkerson M, Perou CM, Yellapantula V, Huang KL, Lin C, McLellan MD, Yan P, Davies SR, Townsend RR, Skates SJ, Wang J, Zhang B, Kinsinger CR, Mesri M, Rodriguez H, Ding L, Paulovich AG, Fenyo D, Ellis MJ, Carr SA, Nci C: Proteogenomics connects somatic mutations to signalling in breast cancer. *Nature* 2016;534:55-62.
- 92 Gato-Canas M, Zuazo M, Arasanz H, Ibanez-Vea M, Lorenzo L, Fernandez-Hinojal G, Vera R, Smerdou C, Martisova E, Arozarena I, Wellbrock C, Llopiz D, Ruiz M, Sarobe P, Breckpot K, Kochan G, Escors D: Pdl1 signals through conserved sequence motifs to overcome interferon-mediated cytotoxicity. *Cell Rep* 2017;20:1818-1829.
- 93 Azuma T, Yao S, Zhu G, Flies AS, Flies SJ, Chen L: B7-h1 is a ubiquitous antiapoptotic receptor on cancer cells. *Blood* 2008;111:3635-3643.

- 94 Black M, Barsoum IB, Truesdell P, Cotechini T, Macdonald-Goodfellow SK, Petroff M, Siemens DR, Koti M, Craig AW, Graham CH: Activation of the pd-1/pd-l1 immune checkpoint confers tumor cell chemoresistance associated with increased metastasis. *Oncotarget* 2016;7:10557-10567.
- 95 Yang Y, Wu KE, Zhao E, Li W, Shi L, Xie G, Jiang B, Wang Y, Li R, Zhang P, Shuai X, Wang G, Tao K: B7-h1 enhances proliferation ability of gastric cancer stem-like cells as a receptor. *Oncol Lett* 2015;9:1833-1838.
- 96 Thiery JP: Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2:442-454.
- 97 Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA: Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009;139:871-890.
- 98 Thiery JP, Sleeman JP: Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:131-142.
- 99 Kalluri R, Weinberg RA: The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009;119:1420-1428.
- 100 Joosse SA, Gorges TM, Pantel K: Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Mol Med* 2015;7:1-11.
- 101 Jolly MK, Tripathi SC, Jia D, Mooney SM, Celiktas M, Hanash SM, Mani SA, Pienta KJ, Ben-Jacob E, Levine H: Stability of the hybrid epithelial/mesenchymal phenotype. *Oncotarget* 2016;7:27067-27084.
- 102 Lamouille S, Xu J, Derynck R: Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:178-196.
- 103 Zhang YE: Non-smad pathways in tgf-beta signaling. *Cell Res* 2009;19:128-139.
- 104 Choi ME, Ding Y, Kim SI: Tgf-beta signaling via tak1 pathway: Role in kidney fibrosis. *Semin Nephrol* 2012;32:244-252.
- 105 Tan EJ, Olsson AK, Moustakas A: Reprogramming during epithelial to mesenchymal transition under the control of tgfbeta. *Cell Adh Migr* 2015;9:233-246.
- 106 Cieply B, Riley Pt, Pifer PM, Widmeyer J, Addison JB, Ivanov AV, Denvir J, Frisch SM: Suppression of the epithelial-mesenchymal transition by grainyhead-like-2. *Cancer Res* 2012;72:2440-2453.
- 107 Werner S, Frey S, Riethdorf S, Schulze C, Alawi M, Kling L, Vafaizadeh V, Sauter G, Terracciano L, Schumacher U, Pantel K, Assmann V: Dual roles of the transcription factor grainyhead-like 2 (grhl2) in breast cancer. *J Biol Chem* 2013;288:22993-23008.
- 108 Cieply B, Farris J, Denvir J, Ford HL, Frisch SM: Epithelial-mesenchymal transition and tumor suppression are controlled by a reciprocal feedback loop between zeb1 and grainyhead-like-2. *Cancer Res* 2013;73:6299-6309.
- 109 Brabletz S, Brabletz T: The zeb/mir-200 feedback loop--a motor of cellular plasticity in development and cancer? *EMBO Rep* 2010;11:670-677.
- 110 Bracken CP, Gregory PA, Kolesnikoff N, Bert AG, Wang J, Shannon MF, Goodall GJ: A double-negative feedback loop between zeb1-sip1 and the microrna-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* 2008;68:7846-7854.

- 111 Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, Vadas MA, Khew-Goodall Y, Goodall GJ: The mir-200 family and mir-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting zeb1 and sip1. *Nat Cell Biol* 2008;10:593-601.
- 112 Kim S, Koh J, Kim MY, Kwon D, Go H, Kim YA, Jeon YK, Chung DH: Pd-l1 expression is associated with epithelial-to-mesenchymal transition in adenocarcinoma of the lung. *Hum Pathol* 2016;58:7-14.
- 113 Ock CY, Kim S, Keam B, Kim M, Kim TM, Kim JH, Jeon YK, Lee JS, Kwon SK, Hah JH, Kwon TK, Kim DW, Wu HG, Sung MW, Heo DS: Pd-l1 expression is associated with epithelial-mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2016;7:15901-15914.
- 114 Asgarova A, Asgarov K, Godet Y, Peixoto P, Nadaradjane A, Boyer-Guittaut M, Galaine J, Guenat D, Mougey V, Perrard J, Pallandre JR, Bouard A, Balland J, Tirole C, Adotevi O, Hendrick E, Herfs M, Cartron PF, Borg C, Hervouet E: Pd-l1 expression is regulated by both DNA methylation and nf-kb during emt signaling in non-small cell lung carcinoma. *Oncoimmunology* 2018;7:e1423170.
- 115 Funaki S, Shintani Y, Kawamura T, Kanzaki R, Minami M, Okumura M: Chemotherapy enhances programmed cell death 1/ligand 1 expression via tgf-beta induced epithelial mesenchymal transition in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2017;38:2277-2284.
- 116 Alsuliman A, Colak D, Al-Harazi O, Fitwi H, Tulbah A, Al-Tweigeri T, Al-Alwan M, Ghebeh H: Bidirectional crosstalk between pd-l1 expression and epithelial to mesenchymal transition: Significance in claudin-low breast cancer cells. *Mol Cancer* 2015;14:149.
- 117 Hsu JM, Xia W, Hsu YH, Chan LC, Yu WH, Cha JH, Chen CT, Liao HW, Kuo CW, Khoo KH, Hsu JL, Li CW, Lim SO, Chang SS, Chen YC, Ren GX, Hung MC: Stt3-dependent pd-l1 accumulation on cancer stem cells promotes immune evasion. *Nat Commun* 2018;9:1908.
- 118 Wang Y, Wang H, Zhao Q, Xia Y, Hu X, Guo J: Pd-l1 induces epithelial-to-mesenchymal transition via activating srebp-1c in renal cell carcinoma. *Med Oncol* 2015;32:212.
- 119 Mehlen P, Puisieux A: Metastasis: A question of life or death. *Nat Rev Cancer* 2006;6:449-458.
- 120 Pantel K, Speicher MR: The biology of circulating tumor cells. *Oncogene* 2016;35:1216-1224.
- 121 Pantel K, Brakenhoff RH: Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 2004;4:448-456.
- 122 Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B: Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer* 2008;8:329-340.
- 123 Pantel K, Alix-Panabieres C, Riethdorf S: Cancer micrometastases. *Nat Rev Clin Oncol* 2009;6:339-351.
- 124 Mader S, Pantel K: Liquid biopsy: Current status and future perspectives. *Oncol Res Treat* 2017;40:404-408.
- 125 Pantel K, Alix-Panabieres C: Liquid biopsy: Potential and challenges. *Mol Oncol* 2016;10:371-373.

- 126 Brock G, Castellanos-Rizaldos E, Hu L, Coticchia C, Skog J: Liquid biopsy for cancer screening, patient stratification and monitoring. *Translational Cancer Research* 2015;4:280-290.
- 127 Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K: Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2011;11:426-437.
- 128 Alix-Panabieres C, Pantel K: Technologies for detection of circulating tumor cells: Facts and vision. *Lab Chip* 2014;14:57-62.
- 129 Rink M, Chun FK, Minner S, Friedrich M, Mauermann O, Heinzer H, Huland H, Fisch M, Pantel K, Riethdorf S: Detection of circulating tumour cells in peripheral blood of patients with advanced non-metastatic bladder cancer. *BJU Int* 2011;107:1668-1675.
- 130 Rink M, Chun FK, Dahlem R, Soave A, Minner S, Hansen J, Stoupiec M, Coith C, Kluth LA, Ahyai SA, Friedrich MG, Shariat SF, Fisch M, Pantel K, Riethdorf S: Prognostic role and her2 expression of circulating tumor cells in peripheral blood of patients prior to radical cystectomy: A prospective study. *Eur Urol* 2012;61:810-817.
- 131 Soave A, Riethdorf S, Dahlem R, von Amsberg G, Minner S, Weisbach L, Engel O, Fisch M, Pantel K, Rink M: A nonrandomized, prospective, clinical study on the impact of circulating tumor cells on outcomes of urothelial carcinoma of the bladder patients treated with radical cystectomy with or without adjuvant chemotherapy. *Int J Cancer* 2017;140:381-389.
- 132 Soave A, Riethdorf S, Dahlem R, Minner S, Weisbach L, Engel O, Fisch M, Pantel K, Rink M: Detection and oncological effect of circulating tumour cells in patients with variant urothelial carcinoma histology treated with radical cystectomy. *BJU Int* 2017;119:854-861.
- 133 Rink M, Soave A, Engel O, Fisch M, Riethdorf S, Pantel K: [tumor cells in the peripheral blood of patients with urothelial carcinoma of the bladder: Detection and impact of circulating]. *Urologe A* 2014;53:501-508.
- 134 David R: Pd-l1 expression by circulating breast cancer cells. *Lancet Oncol* 2015;16:e321.
- 135 Powles T, Necchi A, Rosen G, Hariharan S, Apolo AB: Anti-programmed cell death 1/ligand 1 (pd-1/pd-l1) antibodies for the treatment of urothelial carcinoma: State of the art and future development. *Clin Genitourin Cancer* 2018;16:117-129.
- 136 Tretiakova M, Fulton R, Kocherginsky M, Long T, Ussakli C, Antic T, Gown A: Concordance study of pd-l1 expression in primary and metastatic bladder carcinomas: Comparison of four commonly used antibodies and rna expression. *Mod Pathol* 2018;31:623-632.
- 137 Boorjian SA, Sheinin Y, Crispen PL, Farmer SA, Lohse CM, Kuntz SM, Leibovich BC, Kwon ED, Frank I: T-cell coregulatory molecule expression in urothelial cell carcinoma: Clinicopathologic correlations and association with survival. *Clin Cancer Res* 2008;14:4800-4808.
- 138 Nakanishi J, Wada Y, Matsumoto K, Azuma M, Kikuchi K, Ueda S: Overexpression of b7-h1 (pd-l1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers. *Cancer Immunol Immunother* 2007;56:1173-1182.

- 139 Tretiakova M, Fulton R, Kocherginsky M, Long T, Ussakli C, Antic T, Gown A: Concordance study of pd-l1 expression in primary and metastatic bladder carcinomas: Comparison of four commonly used antibodies and rna expression. *Mod Pathol* 2017
- 140 Anantharaman A, Friedlander T, Lu D, Krupa R, Premasekharan G, Hough J, Edwards M, Paz R, Lindquist K, Graf R, Jendrisak A, Louw J, Dugan L, Baird S, Wang Y, Dittamore R, Paris PL: Programmed death-ligand 1 (pd-l1) characterization of circulating tumor cells (ctcs) in muscle invasive and metastatic bladder cancer patients. *BMC Cancer* 2016;16:744.
- 141 Kleffel S, Posch C, Barthel SR, Mueller H, Schlapbach C, Guenova E, Elco CP, Lee N, Juneja VR, Zhan Q, Lian CG, Thomi R, Hoetzenecker W, Cozzio A, Dummer R, Mihm MC, Jr., Flaherty KT, Frank MH, Murphy GF, Sharpe AH, Kupper TS, Schatton T: Melanoma cell-intrinsic pd-1 receptor functions promote tumor growth. *Cell* 2015;162:1242-1256.
- 142 Brodska B, Otevrelva P, Kuzelova K: Correlation of pd-l1 surface expression on leukemia cells with the ratio of pd-l1 mrna variants and with electrophoretic mobility. *Cancer Immunol Res* 2016;4:815-819.
- 143 Sanger F, Coulson AR: A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 1975;94:441-448.
- 144 Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature* 1970;227:680-685.
- 145 Schott DS, Pizon M, Pachmann U, Pachmann K: Sensitive detection of pd-l1 expression on circulating epithelial tumor cells (cetcs) could be a potential biomarker to select patients for treatment with pd-1/pd-l1 inhibitors in early and metastatic solid tumors. *Oncotarget* 2017;8:72755-72772.
- 146 Tan TZ, Miow QH, Miki Y, Noda T, Mori S, Huang RY, Thiery JP: Epithelial-mesenchymal transition spectrum quantification and its efficacy in deciphering survival and drug responses of cancer patients. *EMBO Mol Med* 2014;6:1279-1293.
- 147 Aine M, Eriksson P, Liedberg F, Hoglund M, Sjobahl G: On molecular classification of bladder cancer: Out of one, many. *Eur Urol* 2015;68:921-923.
- 148 Earl J, Rico D, Carrillo-de-Santa-Pau E, Rodriguez-Santiago B, Mendez-Pertuz M, Auer H, Gomez G, Grossman HB, Pisano DG, Schulz WA, Perez-Jurado LA, Carrato A, Theodorescu D, Chanock S, Valencia A, Real FX: The ubc-40 urothelial bladder cancer cell line index: A genomic resource for functional studies. *BMC Genomics* 2015;16:403.
- 149 Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA, Kim S, Wilson CJ, Lehár J, Kryukov GV, Sonkin D, Reddy A, Liu M, Murray L, Berger MF, Monahan JE, Morais P, Meltzer J, Korejwa A, Jane-Valbuena J, Mapa FA, Thibault J, Bric-Furlong E, Raman P, Shipway A, Engels IH, Cheng J, Yu GK, Yu J, Aspesi P, Jr., de Silva M, Jagtap K, Jones MD, Wang L, Hatton C, Palesscandolo E, Gupta S, Mahan S, Sougnez C, Onofrio RC, Liefeld T, MacConaill L, Winckler W, Reich M, Li N, Mesirov JP, Gabriel SB, Getz G, Ardlie K, Chan V, Myer VE, Weber BL, Porter J, Warmuth M, Finan P, Harris JL, Meyerson M, Golub TR, Morrissey MP, Sellers WR, Schlegel R, Garraway LA: The cancer cell line encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 2012;483:603-607.
- 150 Aust S, Felix S, Auer K, Bachmayr-Heyda A, Kenner L, Dekan S, Meier SM, Gerner C, Grimm C, Pils D: Absence of pd-l1 on tumor cells is associated with reduced mhc i

- expression and pd-l1 expression increases in recurrent serous ovarian cancer. *Sci Rep* 2017;7:42929.
- 151 Dorand RD, Nthale J, Myers JT, Barkauskas DS, Avril S, Chirieleison SM, Pareek TK, Abbott DW, Stearns DS, Letterio JJ, Huang AY, Petrosiute A: Cdk5 disruption attenuates tumor pd-l1 expression and promotes antitumor immunity. *Science* 2016;353:399-403.
 - 152 Abiko K, Matsumura N, Hamanishi J, Horikawa N, Murakami R, Yamaguchi K, Yoshioka Y, Baba T, Konishi I, Mandai M: Ifn-gamma from lymphocytes induces pd-l1 expression and promotes progression of ovarian cancer. *Br J Cancer* 2015;112:1501-1509.
 - 153 Wu MZ, Tsai YP, Yang MH, Huang CH, Chang SY, Chang CC, Teng SC, Wu KJ: Interplay between hdac3 and wdr5 is essential for hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cell* 2011;43:811-822.
 - 154 Chung VY, Tan TZ, Tan M, Wong MK, Kuay KT, Yang Z, Ye J, Muller J, Koh CM, Guccione E, Thiery JP, Huang RY: Grhl2-mir-200-zeb1 maintains the epithelial status of ovarian cancer through transcriptional regulation and histone modification. *Sci Rep* 2016;6:19943.
 - 155 Zavadil J, Bottinger EP: Tgf-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 2005;24:5764-5774.
 - 156 Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P: Tgf-beta signalling from cell membrane to nucleus through smad proteins. *Nature* 1997;390:465-471.
 - 157 Massague J, Blain SW, Lo RS: Tgfbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 2000;103:295-309.
 - 158 Cohen P, Frame S: The renaissance of gsk3. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:769-776.
 - 159 Jingjing W, Wenzheng G, Donghua W, Guangyu H, Aiping Z, Wenjuan W: Deubiquitination and stabilization of programmed cell death ligand 1 by ubiquitin-specific peptidase 9, x-linked in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Med* 2018;7:4004-4011.
 - 160 Zhang J, Bu X, Wang H, Zhu Y, Geng Y, Nihira NT, Tan Y, Ci Y, Wu F, Dai X, Guo J, Huang YH, Fan C, Ren S, Sun Y, Freeman GJ, Sicinski P, Wei W: Cyclin d-cdk4 kinase destabilizes pd-l1 via cullin 3-spop to control cancer immune surveillance. *Nature* 2018;553:91-95.
 - 161 Rebouissou S, Bernard-Pierrot I, de Reynies A, Lepage ML, Krucker C, Chapeaublanc E, Hérault A, Kamoun A, Caillault A, Letouze E, Elarouci N, Neuzillet Y, Denoux Y, Molinie V, Vordos D, Laplanche A, Maille P, Soyeux P, Ofualuka K, Reyat F, Biton A, Sibony M, Paoletti X, Southgate J, Benhamou S, Lebret T, Allory Y, Radvanyi F: Egfr as a potential therapeutic target for a subset of muscle-invasive bladder cancers presenting a basal-like phenotype. *Sci Transl Med* 2014;6:244ra291.
 - 162 Sabatier R, Finetti P, Mamessier E, Adelaide J, Chaffanet M, Ali HR, Viens P, Caldas C, Birnbaum D, Bertucci F: Prognostic and predictive value of pdl1 expression in breast cancer. *Oncotarget* 2015;6:5449-5464.
 - 163 Soliman H, Khalil F, Antonia S: Pd-l1 expression is increased in a subset of basal type breast cancer cells. *PLoS One* 2014;9:e88557.
 - 164 Mittendorf EA, Philips AV, Meric-Bernstam F, Qiao N, Wu Y, Harrington S, Su X, Wang Y, Gonzalez-Angulo AM, Akcakanat A, Chawla A, Curran M, Hwu P, Sharma P, Litton JK,

- Molldrem JJ, Alatrash G: Pd-l1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol Res* 2014;2:361-370.
- 165 Zitvogel L, Galluzzi L, Kepp O, Smyth MJ, Kroemer G: Type I interferons in anticancer immunity. *Nat Rev Immunol* 2015;15:405-414.
- 166 Almozyan S, Colak D, Mansour F, Alaiya A, Al-Harazi O, Qattan A, Al-Mohanna F, Al-Alwan M, Ghebeh H: Pd-l1 promotes oct4 and nanog expression in breast cancer stem cells by sustaining pi3k/akt pathway activation. *Int J Cancer* 2017;141:1402-1412.
- 167 Gupta HB, Clark CA, Yuan B, Sareddy G, Pandeswara S, Padron AS, Hurez V, Conejo-Garcia J, Vadlamudi R, Li R, Curiel TJ: Tumor cell-intrinsic pd-l1 promotes tumor-initiating cell generation and functions in melanoma and ovarian cancer. *Signal Transduct Target Ther* 2016;1:doi: 10.1038/sigtrans.2016.1030.
- 168 Li J, Chen L, Xiong Y, Zheng X, Xie Q, Zhou Q, Shi L, Wu C, Jiang J, Wang H: Knockdown of pd-l1 in human gastric cancer cells inhibits tumor progression and improves the cytotoxic sensitivity to cik therapy. *Cell Physiol Biochem* 2017;41:907-920.
- 169 Qiu XY, Hu DX, Chen WQ, Chen RQ, Qian SR, Li CY, Li YJ, Xiong XX, Liu D, Pan F, Yu SB, Chen XQ: Pd-l1 confers glioblastoma multiforme malignancy via ras binding and ras/erk/emt activation. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2018;1864:1754-1769.
- 170 Kim JT, Liu C, Zaytseva YY, Weiss HL, Townsend CM, Jr., Evers BM: Neurotensin, a novel target of wnt/beta-catenin pathway, promotes growth of neuroendocrine tumor cells. *Int J Cancer* 2015;136:1475-1481.
- 171 Maoret JJ, Anini Y, Rouyer-Fessard C, Gully D, Laburthe M: Neurotensin and a non-peptide neurotensin receptor antagonist control human colon cancer cell growth in cell culture and in cells xenografted into nude mice. *Int J Cancer* 1999;80:448-454.
- 172 Vasiadi M, Mondolfi AP, Alysandratos KD, Therianou A, Katsarou-Katsari A, Petrakopoulou T, Theoharidis A, Miniati A, Theoharides TC: Neurotensin serum levels and skin gene expression are increased in atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 2013;169:695-699.
- 173 Ye Y, Liu P, Wang Y, Li H, Wei F, Cheng Y, Han L, Yu J: Neurotensin, a novel messenger to cross-link inflammation and tumor invasion via epithelial-mesenchymal transition pathway. *Int Rev Immunol* 2016;35:340-350.
- 174 Thar Min AK, Okayama H, Saito M, Ashizawa M, Aoto K, Nakajima T, Saito K, Hayase S, Sakamoto W, Tada T, Hanayama H, Saze Z, Momma T, Ohki S, Sato Y, Motoyama S, Mimura K, Kono K: Epithelial-mesenchymal transition-converted tumor cells can induce t-cell apoptosis through upregulation of programmed death ligand 1 expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Med* 2018;doi: 10.1002/cam4.1564.
- 175 Xu J, Lamouille S, Derynck R: Tgf-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res* 2009;19:156-172.
- 176 Derynck R, Feng XH: Tgf-beta receptor signaling. *Biochim Biophys Acta* 1997;1333:F105-150.
- 177 Mishra VK, Subramaniam M, Kari V, Pitel KS, Baumgart SJ, Naylor RM, Nagarajan S, Wegwitz F, Ellenrieder V, Hawse JR, Johnsen SA: Kruppel-like transcription factor klf10

- suppresses tgfbeta-induced epithelial-to-mesenchymal transition via a negative feedback mechanism. *Cancer Res* 2017;77:2387-2400.
- 178 Xiang J, Fu X, Ran W, Wang Z: Grhl2 reduces invasion and migration through inhibition of tgfbeta-induced emt in gastric cancer. *Oncogenesis* 2017;6:e284.
- 179 Nishino H, Takano S, Yoshitomi H, Suzuki K, Kagawa S, Shimazaki R, Shimizu H, Furukawa K, Miyazaki M, Ohtsuka M: Grainyhead-like 2 (grhl2) regulates epithelial plasticity in pancreatic cancer progression. *Cancer Med* 2017;6:2686-2696.
- 180 Zhang P, Sun Y, Ma L: Zeb1: At the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance. *Cell Cycle* 2015;14:481-487.
- 181 Wu K, Zeng J, Zhou J, Fan J, Chen Y, Wang Z, Zhang T, Wang X, He D: Slug contributes to cadherin switch and malignant progression in muscle-invasive bladder cancer development. *Urol Oncol* 2013;31:1751-1760.
- 182 Jiang X, Zhou J, Giobbie-Hurder A, Wargo J, Hodi FS: The activation of mapk in melanoma cells resistant to braf inhibition promotes pd-l1 expression that is reversible by mek and pi3k inhibition. *Clin Cancer Res* 2013;19:598-609.
- 183 Jiao S, Xia W, Yamaguchi H, Wei Y, Chen MK, Hsu JM, Hsu JL, Yu WH, Du Y, Lee HH, Li CW, Chou CK, Lim SO, Chang SS, Litton J, Arun B, Hortobagyi GN, Hung MC: Parp inhibitor upregulates pd-l1 expression and enhances cancer-associated immunosuppression. *Clin Cancer Res* 2017;23:3711-3720.
- 184 Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA: Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase b. *Nature* 1995;378:785-789.
- 185 Freudlsperger C, Bian Y, Contag Wise S, Burnett J, Coupar J, Yang X, Chen Z, Van Waes C: Tgf-beta and nf-kappab signal pathway cross-talk is mediated through tak1 and smad7 in a subset of head and neck cancers. *Oncogene* 2013;32:1549-1559.
- 186 De Matteis SN, R.; Carloni, S.: Gsk-3 β and its unexpected role in immunity, inflammation and cancer. *SM J Oncol Hematol* 2016;1(1): 1001
- 187 Fang X, Yu SX, Lu Y, Bast RC, Jr., Woodgett JR, Mills GB: Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:11960-11965.
- 188 Li M, Wang X, Meintzer MK, Laessig T, Birnbaum MJ, Heidenreich KA: Cyclic amp promotes neuronal survival by phosphorylation of glycogen synthase kinase 3beta. *Mol Cell Biol* 2000;20:9356-9363.
- 189 Wang Q, Zhou Y, Evers BM: Neurotensin phosphorylates gsk-3alpha/beta through the activation of pkc in human colon cancer cells. *Neoplasia* 2006;8:781-787.
- 190 Gallagher DJ, Milowsky MI, Ishill N, Trout A, Boyle MG, Riches J, Fleisher M, Bajorin DF: Detection of circulating tumor cells in patients with urothelial cancer. *Ann Oncol* 2009;20:305-308.
- 191 Riethdorf S, Soave A, Rink M: The current status and clinical value of circulating tumor cells and circulating cell-free tumor DNA in bladder cancer. *Transl Androl Urol* 2017;6:1090-1110.

- 192 Lindsay CR, Le Moulec S, Billiot F, Lorient Y, Ngo-Camus M, Vielh P, Fizazi K, Massard C, Farace F: Vimentin and ki67 expression in circulating tumour cells derived from castrate-resistant prostate cancer. *BMC Cancer* 2016;16:168.
- 193 Janning M, Kobus F, Babayan A, Wikman H, Velthaus JL, Bergmann S, Schatz S, Falk M, Berger LA, Böttcher LM, Päsler S, Gorges TM, O'Flaherty L, Hille C, S.A. J, Simon R, Tiemann M, Bokemeyer C, Reck M, Riethdorf S, Pantel K, Loges S: Determination of pd-l1 expression in circulating tumor cells of nsclc patients and correlation with response to pd-(l)1 inhibitors. manuscript submitted. 2018
- 194 Nicolazzo C, Raimondi C, Mancini M, Caponnetto S, Gradilone A, Gandini O, Mastromartino M, Del Bene G, Prete A, Longo F, Cortesi E, Gazzaniga P: Monitoring pd-l1 positive circulating tumor cells in non-small cell lung cancer patients treated with the pd-1 inhibitor nivolumab. *Sci Rep* 2016;6:31726.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

Tabelle 24: Verwendete Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
3'-UTR	3' untranslatierter Bereich (3'- <i>untranslated region</i>)
4E-BP1	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1</i>
5Z7O	(5Z)-7-Oxo Zeaenol
AG	Arbeitsgruppe
AKT/PKB	Proteinkinase B (Gene: AKT1/2/3)
ALDH1	Aldehyd-Dehydrogenase 1
ALK5	TGFβ-Rezeptor 1 (<i>activin receptor-like kinase 5</i>)
ALOX5	<i>arachidonate 5-lipoxygenase</i>
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
B7-1	Lymphozyten-Aktivierungsantigen CD80 (<i>cluster of differentiation 80</i>)
B7-2	Lymphozyten-Aktivierungsantigen CD86 (<i>cluster of differentiation 86</i>)
B7-H1	<i>B7 homolog 1</i> (alternative Bezeichnung für PD-L1)
BCAT1	<i>branched chain amino acid transaminase 1</i>
bp	Basenpaare (<i>base pairs</i>)
BSA	Bovines Serum Albumin
CA	Karzinom (<i>carcinoma</i>)
CD274	für PD-L1 kodierendes Gen
CD44	CD44 <i>antigen (cluster of differentiation 44)</i>
CD45	<i>Leukocyte common antigen (cluster of differentiation 45)</i>
CDK4-6	<i>cyclin dependent kinase 4-6</i>
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CK/KRT	(Zyto-)Keratin (<i>cytokeratin</i>)
CMTM6	<i>CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing protein 6</i>
CNA	Kopienzahländerung (<i>copy number alteration</i>)
CSN5	<i>COP9 signalosome 5</i>
CST	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, US
CTC	Zirkulierende Tumorzelle (<i>circulating tumor cell</i>)
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
ECL	erweiterte Chemilumineszenz (<i>enhanced chemiluminescence</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
EL	<i>epithelial-like</i>
ELN	Elastin
EMEM	Minimal Essential Medium Eagle
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition (<i>epithelial-to-mesenchymal transition</i>)
EpCAM	Epitheliales Zelladhäsionsmolekül/TROP1 (<i>epithelial cell adhesion molecule</i>)
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i> (Mitogen-aktivierte Kinase/MAP Kinase)
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FDA	<i>food and drug administration</i>
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
g	Gravitationsfeldstärke, $g = 9.81 \text{ m/s}^2$
gDNA	genomische DNA
GJA1	Connexin 43 (<i>Gap junction alpha-1 protein</i>)
GRHL2	<i>grainyhead-like 2</i>
GSK-3	Glykogensynthase-Kinase 3
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HER2	<i>Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2</i>
HIF-1 α	<i>hypoxia-inducible factor 1α</i>
HLA	menschliches Leukozytenantigen (<i>human leukocyte antigen</i>)
HNSCC	Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich (<i>head and neck squamous cell carcinoma</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
i.a.	inter alia (unter anderem)
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration (<i>half maximal inhibitory concentration</i>)
IF	Immunfluoreszenz
IFN γ	Interferon γ
IgC2	<i>Ig-like C2-type</i> (Immunglobulin-artige Domäne)
IGFBP5	<i>insulin like growth factor binding protein 5</i>
IgG	Immunglobulin G

IgG-Fc	Fc-Domäne von humanem IgG
IgV	<i>Ig-like V-type</i> (Immunglobulin-artige Domäne)
IRF1	<i>Interferon regulatory factor 1</i>
IRF6	<i>interferon regulatory factor 6</i>
ITB	Institut für Tumorbilogie, UKE, Hamburg, DE
JAK1/2	Janus kinase 1/2
JNK	c-JUN N-terminale Kinase
kb	Kilo-Basenpaare (<i>kilo base pairs</i>)
kDa	Kilodalton
Kontr.	Kontrolle
LAG3	<i>lymphocyte-activation gene 3</i>
lncRNA	<i>long non-coding RNA</i>
M	molar
M0	nicht-metastasiert
M1	metastasiert
mA	Milliampere
MET	mesenchymale-epitheliale Transition (<i>mesenchymal-to-epithelial transition</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
min	Minuten
miR-200	mikro-RNA-200
ML	<i>mesenchymal-like</i>
MMP2	Matrix-Metalloprotease 2
MMP9	Matrix-Metalloprotease 9
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
mTOR	<i>mechanistic Target of rapamycin</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
N	Asparagin
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren (<i>non-essential amino acids</i>)
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NGS	Sequenzierung der nächsten Generation (<i>next-generation-sequencing</i>)
nm	Nanometer
NP40	Nonidet P-40
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (<i>non-small cell lung cancer</i>)
NTS	Neurotensin
p	phosphoryliertes Protein
p90RSK	<i>90 kDa ribosomal protein S6 kinase</i>

PBMC	mononukleären Zellen des peripheren Bluts (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PD-1	<i>programmed death 1</i>
PD-1-Fc	rekombinantes PD-1 fusioniert mit der Fc-Domäne von humanem IgG
PD-L1	<i>programmed death-ligand 1</i>
PD-L2	<i>programmed death-ligand 2</i>
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
qRT-PCR	quantitative <i>Real Time</i> -PCR
Rb	Retinoblastom-Protein
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i> Lysispuffer
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNA-Seq	mRNA-Sequenzierung
RPKM	<i>reads per kilobase million</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
S	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
sec	Sekunden
shRNA	<i>small hairpin</i> RNA
Slug	<i>Zinc finger protein</i> SNAI2
SMAD2/3/ 4/7	Proteinfamilie mit Homologie zu <i>Caenorhabditis elegans</i> SMA (<i>small worm phenotype</i>) und <i>Drosophila</i> MAD (<i>mothers against decapentaplegic</i>)
Snail	<i>Zinc finger protein</i> SNAI1
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (<i>single-nucleotide polymorphism</i>)
STAT1-5	<i>Signal transducer and activator of transcription 1-5</i>
T	Threonin
TAK1	TGFβ-aktivierte Kinase (<i>TGFβ-activated kinase 1</i>)
TCGA	„ <i>The Cancer Genome Atlas</i> “ (22 Tumorentitäten, 9771 Tumore)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGFβ	Transformierender Wachstumsfaktor β (<i>transforming growth factor β</i>)
TILs	tumorinfiltrierende Leukozyten (<i>tumor infiltrating leukocytes</i>)

TIM-3	<i>T-cell membrane protein 3</i>
TLR4	<i>toll-like receptor 4</i>
TPD52L1/ D53	<i>tumor protein D52-like 1</i>
TROP2	<i>Tumor-associated calcium signal transducer 2</i>
Twist	<i>Twist-related protein 1</i>
UCB	Urothelkarzinom der Harnblase (<i>urothelial carcinoma of the bladder</i>)
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UPK	Uroplakin
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
Y	Tyrosin
ZEB1	<i>zinc finger enhancer-binding protein 1</i>

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Negative Regulation der T-Zell-Aktivierung durch den PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoint.....	4
Abbildung 2: Epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) und mesenchymale-epitheliale Transition (MET)	10
Abbildung 3: Amplifikation der PD-L1-cDNA aus verschiedenen Zelllinien.....	47
Abbildung 4: Gelextraktion von <i>EcoRI</i> -verdauten Vektor- und PD-L1-Insert-Fragmenten ...	47
Abbildung 5: Restriktionsverdau des ungerichtet klonierten Konstrukts pMXs-IP-PD-L1	48
Abbildung 6: Amplifikation des für Slug kodierenden Gens <i>SNAI2</i> aus cDNA.....	49
Abbildung 7: Gelextraktion von <i>EcoRI</i> - und <i>BamHI</i> -verdauten Vektor- und Slug-Insert-Fragmenten.....	50
Abbildung 8: Restriktionsverdau des klonierten Konstrukts pMXs-IP-C-HA-Slug.....	50
Abbildung 9: Testung von drei verschiedenen anti-PD-L1-Antikörpern in der Western-Blot-Analyse.....	52
Abbildung 10: Detektion der PD-L1-Expression mittels Western-Blot-Analyse mit dem Antikörper-Klon E1L3N	52
Abbildung 11: Western-Blot-Analyse der PD-L1-Expression in UCB-Zelllinien	53
Abbildung 12: Detektion der PD-L1-Expression durch Immunfluoreszenz (Antikörper-Klon E1L3N).....	54
Abbildung 13: Vergleich der relativen PD-L1-Protein- und -mRNA-Expression	55
Abbildung 14: Korrelation der relativen Expression von PD-L1-Transkriptvarianten.....	56
Abbildung 15: Western-Blot-Analyse der Expression von EMT-indikativen Proteinen in UCB-Zelllinien.....	57
Abbildung 16: Morphologie der UCB-Zelllinien	58
Abbildung 17: Keine Korrelation der PD-L1-Expression mit epithelialen und mesenchymalen Eigenschaften (Abbildung nach Tan <i>et al.</i> modifiziert)	59
Abbildung 18: Korrelation der PD-L1-Expression mit den Subtypen der UCB-Zelllinien (Abbildung modifiziert nach Warrick <i>et al.</i>)	60
Abbildung 19: Western-Blot-Analyse der Keratin-Expression in UCB-Zelllinien.....	61
Abbildung 20: Genexpression der Uroplakine 1A, 2 und 3A in luminalen und basalen UCB-Zelllinien.....	62
Abbildung 21: Western-Blot-Analyse der MHC I-Expression in UCB-Zelllinien	63
Abbildung 22: Western-Blot-Analysen ausgewählter nicht-phosphorylierter und phosphorylierter Proteine in UCB-Zelllinien.....	64
Abbildung 23: Induktion der PD-L1- und PD-L2-Expression in UCB-Zelllinien durch Stimulation mit IFN γ	66
Abbildung 24: Western-Blot-Analyse von EMT-indikativen und phosphorylierten Proteinen nach IFN γ -Stimulation	67

Abbildung 25: Effekte des PD-L1-kd in drei UCB-Zelllinien mit EL-Phänotyp	70
Abbildung 26: Effekte des PD-L1-kd in zwei UCB-Zelllinien mit ML-Phänotyp.....	71
Abbildung 27: Durch PD-L1-Überexpression induzierter Anstieg der PD-L1-Genexpression..	72
Abbildung 28: Effekte der Überexpression von PD-L1 in vier UCB-Zelllinien	73
Abbildung 29: MTT-Test zur Abbildung der Zellproliferation von zwei PD-L1- überexprimierenden Zelllinien	74
Abbildung 30: Nachweis der PD-L1-Überexpression durch Immunfluoreszenz.....	75
Abbildung 31: qRT-PCR-basierte Verifikation differenziell regulierter Gene in PD-L1- überexprimierenden UM-UC-3-Zellen.....	77
Abbildung 32: Visualisierung der PD-1/PD-L1-Interaktion sowie ihrer Blockierung durch Immun-Checkpoint-Inhibitoren unter Anwendung von Immunfluoreszenz....	78
Abbildung 33: Einfluss der Interaktion von PD-L1 mit rekombinantem PD-1 auf Signaltransduktionswege in RT-112-Zellen mit PD-L1-Überexpression	79
Abbildung 34: Evaluation der Eignung von Hypoxie und GRHL2-kd zur Induktion einer EMT	81
Abbildung 35: Einfluss der Behandlung mit TGF β auf die PD-L1-Genexpression.....	82
Abbildung 36: Durch TGF β -Stimulation induzierte EMT-Veränderungen (Zelllinie 5637)	83
Abbildung 37: Durch TGF β -Stimulation induzierte EMT-Veränderungen (Zelllinie BFTC-905)	85
Abbildung 38: Durch GRHL2-kd sowie TGF β -Stimulation induzierte EMT-Veränderungen der Zellmorphologie und Proteinexpression (Zelllinie 5637)	86
Abbildung 39: Durch GRHL2-kd sowie TGF β -Stimulation induzierte EMT-Veränderungen in der Genexpression (Zelllinie 5637)	88
Abbildung 40: Durch ZEB1-Überexpression sowie TGF β -Stimulation induzierte EMT- Veränderungen der Zellmorphologie und Proteinexpression (Zelllinie 5637). 90	
Abbildung 41: Durch ZEB1-Überexpression sowie TGF β -Stimulation induzierte EMT- Veränderungen in der Genexpression (Zelllinie 5637).....	92
Abbildung 42: Durch ZEB1-Überexpression sowie TGF β -Stimulation induzierte EMT- Veränderungen der Zellmorphologie und Proteinexpression (Zelllinie BFTC-905)	93
Abbildung 43: Durch ZEB1-Überexpression sowie TGF β -Stimulation induzierte EMT- Veränderungen in der Genexpression (Zelllinie BFTC-905)	94
Abbildung 44: Durch Slug-Überexpression sowie TGF β -Stimulation induzierte EMT- Veränderungen der Zellmorphologie und Proteinexpression (Zelllinie 5637). 96	
Abbildung 45: Durch Slug-Überexpression sowie TGF β -Stimulation induzierte EMT- Veränderungen in der Genexpression (Zelllinie 5637).....	97
Abbildung 46: Durch Slug-Überexpression sowie TGF β -Stimulation induzierte EMT- Veränderungen der Zellmorphologie und Proteinexpression (Zelllinie BFTC-905)	99

Abbildung 47: Durch Slug-Überexpression sowie TGF β -Stimulation induzierte EMT-Veränderungen in der Genexpression (Zelllinie BFTC-905)	100
Abbildung 48: Beeinflussung der GSK-3 β -Phosphorylierung durch modifizierte PD-L1-Expression.....	102
Abbildung 49: Effekte der GSK-3-Inhibition durch CHIR99021 in 5637-Zellen.....	102
Abbildung 50: Detektion von PD-L1-positiven Zelllinien-Zellen in Spenderblut mittels Multiplex-IF.....	105
Abbildung 51: Nachweis der PD-L1-Expression von Zelllinien-Zellen und CTCs im CellSearch [®] -System.....	106
Abbildung 52: Nachweis der Vimentin-Expression von Zelllinien-Zellen und CTCs im CellSearch [®] -System	108
Abbildung 53: Schematische Einteilung der UCB-Zelllinien in Subgruppen und nach PD-L1-Expression.....	113
Abbildung 54: Putativer Regulationsmechanismus der PD-L1-Expression in EMT-aktivierten UCB-Zellen (5637).....	126

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete allgemeine Laborgeräte.....	15
Tabelle 2: Verwendete Mikroskope	16
Tabelle 3: Verwendete Zentrifugen	16
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Reagenzien	17
Tabelle 5: Verwendete Vektoren und Gen-Expressionsplasmide	19
Tabelle 6: Neu generierte Gen-Expressionsplasmide	19
Tabelle 7: Verwendete shRNA-Expressionsplasmide	19
Tabelle 8: Für Klonierungen und Sequenzierungen verwendete Oligonukleotide.....	20
Tabelle 9: Für quantitative <i>Real Time</i> -PCR verwendete Oligonukleotide	20
Tabelle 10: Verwendete kommerzielle Kits	23
Tabelle 11: Unkonjugierte Antikörper	24
Tabelle 12: Konjugierte Antikörper	25
Tabelle 13: Sekundäre Antikörper	26
Tabelle 14: Therapeutische Antikörper	26
Tabelle 15: In der Zellkultur eingesetzte humane, rekombinante Proteine und Zytokine.....	26
Tabelle 16: Zur Klonierung verwendete Enzyme	27
Tabelle 17: Inhibitoren und Antibiotika	27
Tabelle 18: Verwendete humane Zelllinien	28
Tabelle 19: Verwendete Analysesoftware und Datenbanken	29
Tabelle 20: Differenziell exprimierte Gene in zwei PD-L1-überexprimierenden Zelllinien	76
Tabelle 21: CTC-Nachweis in Blutproben von nicht-metastasierten (M0) und metastasierten (M1) UCB-Patienten	109
Tabelle 22: Vimentin-Nachweis auf CTCs von UCB-Patienten (M0 + M1).....	109
Tabelle 23: PD-L1-Nachweis in CTCs von UCB-Patienten (M1).....	110
Tabelle 24: Verwendete Abkürzungen.....	152

Danksagung

Es ist ein großartiges Gefühl die eigene Dissertation fertiggestellt vorliegen zu haben. Es ist der Moment, den sich vermutlich jeder Doktorand herbei sehnt und zeitweise für unerreichbar hält, wenn ein Experiment einfach nicht gelingen möchte oder das neue Resultat neben einer generierten Antwort zwei neue Fragen aufwirft – nun ist er tatsächlich erreicht. An diesen Punkt bin ich jedoch keinesfalls ganz alleine gelangt, sondern ich hatte wertvolle Begleitung und Unterstützung. Daher möchte ich diese Seite nutzen, um den Menschen, die während dieser intensiven 3,5 Jahre für mich da waren, den Dank zukommen zu lassen, den sie mehr als verdienen.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Klaus Pantel, dem Direktor des Instituts für Tumorbioogie, für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, die Doktorarbeit im Institut für Tumorbioogie anfertigen zu können. Außerdem danke ich ihm für seine exzellente Unterstützung durch wertvolle fachliche Hinweise, für anregenden wissenschaftlichen Austausch und für sein Vertrauen in mich beim Verfassen gemeinsamer Review-Artikel.

Besonders großen Dank möchte ich meiner Betreuerin Frau PD Dr. Sabine Riethdorf für ihre immerwährende, engagierte Unterstützung und für ihre guten Ideen entgegenbringen. Sie hat mir ein faszinierendes und hoch aktuelles Promotionsthema im Bereich der Immunonkologie bereitgestellt. Ich schätze es sehr, dass sie mich einerseits gut strukturiert anleitete und mir andererseits Gestaltungsspielraum zur Verfolgung meiner eigenen Ideen ließ. Außerdem danke ich ihr für die intensiven fachlichen Diskussionen, die sorgfältige Durchsicht meiner Arbeit und die herzliche, vertrauensvolle Atmosphäre.

Ich bedanke mich herzlich bei Herr Prof. Dr. Jörg Ganzhorn für die Begutachtung meiner Dissertation. Ebenso danke ich ausdrücklich Frau Prof. Dr. Julia Kehr und Herrn PD Dr. Hartwig Lüthen dafür, dass sie umgehend zugestimmt haben, in meiner Prüfungskommission als Vorsitzende und als Prüfer zu fungieren.

Sehr hervorheben möchte ich meinen Dank an Herrn Dr. Volker Aßmann, der mit seinem ausgezeichneten Fachwissen und seiner fundierten technischen Expertise entscheidend zum Gelingen meines Promotionsprojekts beigetragen hat. Wenn ich das Büro von Sabine Riethdorf und Volker Aßmann betrat, konnte ich stets darauf zählen ein offenes Ohr zu finden, sei es bei der Interpretation von Ergebnissen oder der Planung weiterer Schritte.

Für sehr hilfreiche fachliche Anregung danke ich außerdem Herrn Prof. Dr. Manfred Jücker, Herrn Dr. Kai Bartkowiak und Herrn Dr. Stefan Horn. Frau Dr. Linda Scarrott danke ich für die Durchsicht der englischen Zusammenfassung und für die angenehme gemeinsame Zeit im

Büro. Die effiziente Patientenrekrutierung und Bereitstellung von Blutproben verdanke ich Frau Dr. Anja Coym, Frau Prof. Dr. Gunhild von Amsberg, Frau Dr. Melanie Janning, Herrn PD Dr. Michael Rink und Herrn PD Dr. Armin Soave. Sehr großen Dank schulde ich auch jedem einzelnen Patienten, der zur Teilnahme an der CTC-Studie zugestimmt und Blutproben gegeben hat.

Bei der Laborarbeit und bei technischen Fragen durfte ich die tatkräftige und fachkundige Unterstützung von Malgorzata Stoupiec, Oliver Mauermann, Cornelia Coith, Sonja Santjer und Antje Andreas genießen. Vielen Dank dafür.

Ein großes Dankeschön verdienen auch Leonie, Johanna, Lena, Svenja, Ines, Sandra, Katharina, Pari, Yang, Jana, Maha und Sebastian, denn sie haben stets für eine anregende Arbeitsatmosphäre im Labor gesorgt und Motivation gespendet. Ich danke euch für diese großartige Zeit, denn so habt ihr entscheidend das Gelingen meiner Arbeit unterstützt.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, Martina und Toni, denn sie haben mich stets unterstützt, wie sie es bereits während meines ganzen Lebens getan haben. Ihr wart mein Anstoß dieses Projekt zu beginnen und euer Vertrauen in mich hat mich immer wieder beflügelt.

Meinen größten Dank verdient die Person, auf die ich jederzeit zählen konnte und die unermüdlich alle Höhen und Tiefen mit mir geteilt hat – mein Mann Kai. Ich danke dir von ganzem Herzen dafür, dass du immer für mich da bist.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den 06. November 2018

Sonja Bergmann