

Aus der Klinik für Urologie
der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. Axel Stuart Merseburger

***Der Einfluss von Biomarkern in Urothelkarzinomen auf die epithelial-
mesenchymale Transition – Hyaluronidasen und β -Arrestine als Biomarker
und therapeutische Angriffspunkte***

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin –

vorgelegt von

Martin Johannes Peter Hennig
aus Burg

Lübeck 2021

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Mario Kramer

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Hodjat Shekarriz Foumani

Tag der mündlichen Prüfung: 28.01.2022

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 28.01.2022

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Der Einfluss von Biomarkern in Urothelkarzinomen auf die epithelial-mesenchymale Transition – Hyaluronidasen und β -Arrestine als Biomarker und therapeutische Angriffspunkte

Einleitung

Die hohe Rezidivrate, sowie die Heterogenität von Blasentumoren machen diese kostspielig und schwer zu behandeln. Eine Diagnostik über urinbasierte Tests wird seit Jahren angestrebt und wäre als Konsequenz der einfachste Weg diese Krebsart zu erkennen oder Therapieentscheidungen hieraus abzuleiten und möglichst frühzeitig zu treffen. Eine Vielzahl an verschiedenen Urintests (z.B. NMP-22, BTastat, UROMONITOR, UroVysion, UBC Rapid) stehen im klinischen Alltag zur Verfügung, sind jedoch weder nach geltenden nationalen oder europäischen Leitlinien für die Primärdiagnostik oder die alleinige Nachsorge von Patienten mit Blasentumoren empfohlen und werden allenfalls ergänzend eingesetzt. Eine effektive, zielgerichtete Behandlung an Hand dieser Urintests ist derzeit nicht möglich. Es fehlt zudem an zielgerichteten Behandlungsmöglichkeiten des fortgeschrittenen Blasentumors, welche auf Basis therapeutischer Biomarker nutzbar gemacht werden könnte.

Die häufigste histologische Form von Blasentumoren bilden, in über 90% der Fälle, Urothelkarzinome. Obwohl es hierbei auch niedrig-aggressive Varianten (low-grade Urothelkarzinome) gibt, welche nur in Ausnahmefällen zu einer Metastasierung führen, so bergen gerade die aggressiven Varianten ein beachtliches Progressionsrisiko. High-grade Tumoren bedürfen daher selbst im nicht-muskelinvasiven, das heisst oberflächlichen Stadium, einer engmaschigen Kontrolle und Behandlung, welche für die Patienten belastend, sowie mit einer deutlichen Morbidität verknüpft und für das Gesundheitssystem kostspielig ist.

Patienten, welche ein auf die Blase begrenztes, muskelinvasives Urothelkarzinom aufweisen werden in der überwiegenden Zahl der Fälle mittels radikaler Zystektomie behandelt. Trotz dieser radikalen und mit deutlicher Einschränkung der Lebensqualität verbundenen Vorgehensweise, erfahren bis zu 50% der Patienten

innerhalb von 2 Jahren nach dem Eingriff eine Metastasierung. Patienten mit metastasiertem Urothelkarzinom können mittels Chemotherapie behandelt werden. Jedoch liegt hierunter die Lebenserwartung lediglich bei durchschnittlich 14 Monaten.

Das weltweit am häufigsten genutzte Erstlinientherapieregime stellt die Kombination aus Gemcitabin und Cisplatin dar. Eine ebenbürtig wirkungsvolle Alternative stünde in einer Kombination aus Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin und Cisplatin zur Verfügung, wird jedoch auf Grund des nachteiligen Nebenwirkungsprofils weitaus seltener angewandt.

Biomarker stellen Einflussfaktoren dar, welche repräsentativ für Tumoreigenschaften stehen können. Hierbei ist stellvertretend für die Aggressivität von malignen Tumoren das Tumorwachstums-, die Invasions- und Motilitätsneigung und Angiogenese zu betrachten, sowie von Veränderungen der Biomarkerexpression auszugehen. Die zielgerichtete Einflussnahme auf Biomarker kann zur Entwicklung neuer Therapieformen beitragen und damit eine effektive Kontrolle von Blasen Tumoren ermöglichen. Das Potential von malignen Stammzellen zur Selbsterneuerung ist ein entscheidender Impulsgeber hinter dem Tumorwachstum und einer Resistenzentwicklung gegenüber Systemtherapien.

Die Identifizierung von Biomarkern, welche diese Selbsterneuerung beeinflussen oder regulieren, stellt ein potenzielles, therapeutisches Ziel für die weitere Entwicklung von Therapien beim Urothelkarzinom dar.

Hyaluronsäure (HA) ist ein wesentlicher Bestandteil im Aufbau der extrazellulären Matrix und entspricht einem nicht-sulfatierten Glykosaminoglykan. Hierbei greift HA in eine Vielzahl von physiologischen Vorgängen ein. Maßgeblich ist HA am osmotischen Haushalt des Gewebes beteiligt und ist Mitregulator von Zellproliferation, Adhäsions- und Migrationsverhalten. Ein wesentlicher Anteil dieser regulatorischen Wirkung wird durch die miteinander verwobenen Signalwege des Glykoproteins CD44 und des „Receptor for Hyaluronan Mediated Motility“ (RHAMM) vermittelt. Die Bildung von HA wird bei Menschen durch drei Synthasen katalysiert (HAS1, HAS2 und HAS3). Hierbei wird HA auf der zytoplasmatischen Seite der

Zellmembranen gebildet und anschließend in den extrazellulären Raum ausgestoßen. Die Bildung erfolgt hierbei hauptsächlich durch mesenchymale Zellen, wobei der Abbau von HA durch Enzyme der Familie der Hyaluronidasen (HYAL) geschieht. HYAL zersetzen HA durch Hydrolisierung der Verbindungen von D-Glucuronsäure und *N*-Acetylglucosamin-Disaccharideinheiten. Einige dieser entstehenden Fragmente haben starke angiogene Eigenschaften.

Im Umfeld von malignen Zellen wird HA vermehrt in Fragmente abgebaut. Obwohl die Expression von HYAL in einigen Tumorentitäten erniedrigt ist, so ist bekannt, dass eine vermehrte Zahl angiogener Fragmente mit einem Tumorprogress korreliert. Diese Fragmente bestehen aus 10 bis 15 Disaccharideinheiten und konnten, wie bereits in Vorstudien gezeigt, im Urin von Patienten nachgewiesen werden. Hierbei konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass erhöhte HA- und HYAL-Spiegel im Urin das Vorliegen von high-grade Urothelkarzinomen mit einer Genauigkeit von mehr als 85% nachweisen konnten und sich somit prinzipiell eine Eignung zum Einsatz im Rahmen der nicht-invasiven Nachsorge bei Blasenkrebspatienten ergibt. Patienten mit erhöhten HYAL-1 Expressionsniveau von im Urin nachgewiesener messenger Ribonukleinsäure (mRNA) haben ein erhöhtes Risiko ein Rezidiv Ihres Urothelkarzinoms innerhalb von 6 Monaten zu erleiden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich abgeschilferte urotheliale Zellen als diagnostischer Marker bei Patienten mit Urothelkarzinomen eignen.

Veränderungen des Hyaluronsäurestoffwechsels können in verschiedenen Tumorarten beobachtet werden. Jedoch, speziell in Blasentumoren wird vermehrt Hyaluronsäure durch Tumorzellen synthetisiert und im umgebenden Extrazellularraum abgebaut. HA-HA Rezeptorinteraktionen sorgen hierbei für eine Induzierung onkogener Signalwege (z.B. CD44/RHAMM, PI3-K/AKT) und in der Folge für eine verstärkte epithelial-mesenchymale Transition (EMT) von Zellen.

Der Diagnostik, dem Verständnis der Interaktion mit onkogenen Signalwegen, sowie der Beeinflussung dieser Signalwege kommt eine entscheidende Bedeutung zur. Der Einsatz von HA, HYAL oder HAS-Aktivität als Biomarker beziehungsweise von Surrogatparametern der EMT erscheint daher konsequent und naheliegend.

Ziel unserer Untersuchungen war es Wege und Möglichkeiten zum Einsatz von Biomarkern in vitro und vivo zu beleuchten und Angriffspunkte für potentielle Therapien beim Urothelkarzinom zu benennen.

1. Publikation

Jordan AR, Racine RR, **Hennig MJP** and Lokeshwar VB (2015). The role of CD44 in disease pathophysiology and targeted treatment. Front. Immunol. 6:182. doi: 10.3389/fimmu.2015.00182

Impact Factor 6,429

Hintergrund

In Vorbereitung weitergehender Untersuchungen recherchierten und resümierten wir in Form dieses Reviews die Interaktion des CD44-Rezeptors und des folgenden Signalwegs, welche eng verwoben mit der Regulierung der EMT sind. CD44 ist ein transmembranöses Protein mit einer Vielzahl an hierdurch vermittelten Funktionen. Die vermittelten Signale hängen vom jeweils bindenden Liganden, den Co-Rezeptor-Eigenschaften, sowie den Interaktionen mit dem Zytoskelett ab. HA stellt den Hauptliganden für CD44 dar. CD44 ist an einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt, nimmt jedoch in vielen onkologischen Erkrankungen eine Schlüsselstellung beim Tumorwachstum und bei der Metastasierungsneigung ein und wird unter anderem bei der Identifizierung von (hämatopoetischen) Stammzellen verwendet. Die Signaltransduktion kann hierbei in eine HA-abhängige und HA-unabhängige unterschieden werden. Die HA-unabhängige Signalweitergabe beruht auf einer Interaktion des intrazellulären Rezeptoranteils mit Proteinen des Zytoskeletts. Dementgegen basiert eine HA-abhängige Übertragung von Signalen auf einer Vernetzung von zwei CD44 Molekülen, welches hierdurch weiteren CD44 assoziierten Proteinen ermöglicht zu interagieren.

HA-unabhängige Signalweitergabe durch CD44

Im Rahmen der HA-unabhängigen Signalweitergabe ist eine Interaktion zwischen CD44 und Proteinen der ERM-Familie (Ezrin–Radixin–Moesin) maßgebend. Diese Proteinfamilie sorgt unter anderem für eine Verbindung zellulärer Aktinfilamente mit Proteinen der Zellmembran über ihr C-terminales Ende. Bereits im Vorfeld konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen der Einfluss zum Beispiel auf den Wnt-Signalweg untersucht werden, welcher bei der Entstehung von kolorektalen Karzinomen oder Gebärmutterhalskrebs einen entscheidenden Einfluss auf Motilität und Metastasierungneigung ausübt.

Darüberhinaus ist eine Beteiligung einer Isoform von CD44 an der Aktivierung des c-MET-Signalwegs nachgewiesen. Eine Überaktivierung des c-MET Signalweg wird gemeinhin auch als Ausgangspunkt eines „invasiven Wachstumsprogramms“ von Zellen angesehen. Dieser Signalweg vermittelt die Aktivierung weiterer onkogener Signalwege (RAS, PI3-K/AKT, MAPK/ERK). Hierbei phosphoryliert der extrazelluläre CD44 Anteil c-MET bei Bindung eines Liganden an den c-MET Rezeptor. Der intrazelluläre Anteil interagiert hiernach mit ERM Proteinen und ermöglicht so die Bindung weiterer Proteine (GRB2 & SOS), welche Teile des MAPK/ERK Signalwegs sind. Dieser Signalweg vermittelt ein direktes, externes Signal in einen Wachstums- und Proliferationsantrieb für betreffende Zellen und wurde in der Literatur bereits ausführlich untersucht. Bei Entstehung vieler Malignome besteht ein Defekt im MAPK/ERK Signalweg und ermöglicht eine unkontrollierte Signalaktivierung, welche zu Wachstum und Proliferation führt. Auf Grund der ausgiebigen Voruntersuchung dieses Signalwegs, konnte bereits eine Vielzahl an therapeutischen Targets identifiziert und nutzbar gemacht werden (z.B. Sorafenib als Raf-Inhibitor beim fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom). Im Rahmen der Deaktivierung von c-MET erfolgt eine Internalisierung des Rezeptors nur unter Mitwirkung der v6 Splicevariante von CD44. Hierbei erfolgt eine Bindung von CD44 und Ezrin und ermöglicht so die Endozytose. Hierdurch kann eine geregelte Migration und Zellverzweigung aufrechterhalten werden.

Zusammenfassend zeigt sich, dass CD44 indirekt, d.h. ohne direkte Ligandenbindung, eine Vielzahl von Signalwegen beeinflusst, welche Tumorentwicklung, -wachstum und -progress steuern. Die Bedeutung von CD44 als Co-Rezeptor wird somit unterstrichen und macht CD44 als therapeutisches Ziel für weitere Forschung interessant.

HA-abhängige Signalweitergabe durch CD44

Bei Bindung eines HA-Moleküls an den CD44 Rezeptor kommt es wie oben beschrieben zur HA-abhängigen Signalweitergabe. Diese Bindung kann jedoch nur im Rahmen einer Proteinkomplexbildung mit RHAMM erfolgen und nicht direkt. RHAMM dient hierbei als entscheidender Co-Rezeptor. Eine komplette Inaktivierung dieses Proteinkomplex kann, wie Vorstudien belegen, nur bei gleichzeitiger Hemmung des CD44-Rezeptors und Inaktivierung von RHAMM, zum Beispiel mittels Antikörper, erfolgen.

Bekannterweise wird die HA-abhängige Signalinduktion über Deziduazellen während der Frühschwangerschaft, Prostata-, Kopf-Hals- oder Brustkrebszellen genutzt und über eine PI3-K/AKT- und MAPK/ERK- Signalwegaktivierung die Proliferation von Zellen ermöglicht. Zahlreiche Vorstudien haben sich darüberhinaus auf den Einfluss dieser Form der Signalweitergabe in verschiedenen Malignomen konzentriert. Ein weiterer bereits gut untersuchter Aspekt ist hierbei der Einfluss der CD44 abhängigen Signaltransduktion über den Epidermal Growth Factor Rezeptor (EGFR).

Die Assoziation von CD44 zu der Vielzahl an - bereits bei der HA-unabhängigen Signalweitergabe genannten - beteiligten Molekülen erlaubt es, dass CD44 bei Interaktionen alle notwendigen Komponenten der Signalweiterleitung in sogenannten Lipidflößen mitführt. Bei der Bindung von HA an CD44 wird CD44 somit in räumliche Nähe zu Rezeptoren wie ErbB2, EGFR oder TGF- β versetzt, welches eine direkte Assoziation und Interaktion ermöglicht.

Eine gesteigerte direkte HA-CD44 Interaktion führt, wie am Beispiel von Brustkrebszellreihen gezeigt werden konnte, zudem zur Hochregulation von inhibitorischen Proteinen der Apoptose, z.B. VCAM-1 und induziert eine

Chemoresistenz, durch Überexpression von ABCG2, einer Membran-ATPase. In Prostakrebsmetastasen konnte eine gesteigerte Expression einer CD44 Subform (v6) beobachtet werden. Nach Knock-down von CD44v6 zeigte sich im Modell eine gesteigerte Sensitivität gegenüber den üblicherweise verwendeten taxanbasierten Therapien.

Dies unterstreicht die Notwendigkeit einer differenzierten Betrachtung von CD44. Der klassische Standpunkt eines Biomarkers ohne relevante Funktion scheint in Anbetracht der Erkenntnisse nicht länger gerechtfertigt. Es ist daher eher davon auszugehen, dass CD44 eine Reihe von Signalwegen unterhält und somit einen potentiellen therapeutischen Biomarker darstellt. CD44 wird daher zuletzt zunehmend als Biomarker von Tumorstammzellen angesehen und genutzt. Hierbei liegt der Forschungsfokus auf dem Einfluss von CD44 auf die EMT.

Zusammenfassung der wichtigsten Aspekte

Durch die Interaktion von HA-CD44, sowie durch die Interaktion von CD44 mit weiteren Signalproteinen werden physiologische Signale zur Wundheilung, Beeinflussung des Immunsystems, sowie der Entwicklungs-Angiogenese vermittelt.

Eine konstitutionelle oder irreguläre HA-CD44 Interaktion kann jedoch zu Fibrose, Narbenbildung, pathologischen Immunreaktionen und Tumorwachstum führen. Die hohe Expression von CD44, sowie eine gesteigerte Produktion von HA im Tumormikromilieu machen beide Proteingruppen zu potentiellen therapeutischen Angriffspunkten. Für die Entwicklung potentieller Therapien zeigt sich jedoch die hohe physiologische Konzentration von CD44 und HA in der Haut als Hinderniss. Darüberhinaus ist die HA-CD44 Interaktion im Rahmen der Wundheilung auch in weiteren Organen maßgeblich. Es bedarf daher eines weiterführenden Verständnisses der komplexen HA-CD44 Interaktionen und HA-abhängigen und -unabhängigen Signalvermittlung um hochspezifische Therapien zur Vermeidung gravierender Nebenwirkungen entwickeln zu können.

2. & 3. Publikation

Jordan AR, Lokeshwar SD, Lopez LE, **Hennig MJP**, Chipollini J, Yates T, Hupe MC, Merseburger AS, Shiedlin A, Cerwinka WH, Liu K, Lokeshwar VB. Antitumor activity of sulfated hyaluronic acid fragments in pre-clinical models of bladder cancer. Oncotarget. 2017 Apr 11;8(15):24262-24274. doi: 10.18632/oncotarget.10529. Impact Factor 5,168

Morera DS*, **Hennig MJP***, Talukder A, Lokeshwar SD, Wang J, Garcia-Roig M, Ortiz N, Yates TJ, Lopez LE, Kallifatidis G, Kramer MW, Jordan AR, Merseburger AS, Manoharan M, Soloway MS, Terris MK, Lokeshwar VB. Hyaluronic acid family in bladder cancer: potential prognostic biomarkers and therapeutic targets. Br J Cancer. 2017 Nov 7;117(10):1507-1517. doi: 10.1038/bjc.2017.318. *These authors contributed equally to this work and are joint first authors. Impact Factor 6,176

Hintergrund und Ziele

Die Beziehungen zwischen HA und der Induktion der EMT wurden in der bisherigen Literatur nahegelegt, jedoch erfolgte bislang keine Untersuchung der HA-Familie oder des Expressionsverhaltens von EMT-Markern in Urothelkarzinomen. Einer besonderen Bedeutung kommt hierbei der, durch die Proteinkinasen B (AKT) vermittelten, zellulären Wirkung zu. Bekannterweise sind AKT Protoonkogene, welche eine zentrale Rolle für zelluläre Prozesse wie Wachstum, Proliferation, Zellzyklus und -stoffwechsel einnehmen. Eine Aktivierung und somit Regulierung der AKT wird durch extrazelluläre Signale gesteuert, unter Vermittlung und Regulierung durch Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3-K). Die hieraus resultierende Zellsteuerung, wird als PI3-K/AKT-Signalweg bezeichnet. Nachgeschaltet werden unter anderem die Effektoren nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of

activated B-cells (NF- κ B), mechanistic Target of Rapamycin (mTOR) und Ras-homolog-enriched-in-brain (Rheb) beeinflusst.

Da mehrere HAS in Urothelkarzinomzellreihen vorkommen und hierüber Wachstum und Progressionsneigung der Karzinomzellen mitregulieren, erscheint die Inhibition einer einzigen Synthese weniger zielführend, verglichen mit der Inhibierung des gesamten HA-Syntheseprozesses durch eine Substanz.

4-Methylumbelliferone (4-MU; 7-Hydroxy-4-Methylcumarin) stellt hierbei einen bekannten HAS-Inhibitor dar. Die inhibitorische Wirkung wird hierbei durch einen intrazellulären Verbrauch der Uridin-5'-Diphospho-Glucuronsäure (UDP-GlcA) verursacht. Diese ist, neben N-Acetylglucosamin, das Substrat zur Synthese von HA. Des Weiteren wird die Expression der HAS und UDP-Dehydrogenase durch 4-MU herunterreguliert. Die Michaelis-Menten-Konstante für die UDP-Glc-Transferase und die HAS-Enzyme liegt bei 0,4mM. Aus bereits etablierten Tier- und Zellmodellversuchen ist bekannt, dass 4-MU antitumorale Eigenschaften besitzt. Das Ausmaß und die Wirkung bei Urothelkarzinomen wurden jedoch bislang nicht untersucht. Kommerziell erhältlich und vermarktet wird 4-MU als Nahrungsergänzungsmittel zur Erhöhung der Gallesekretion in Europa und Asien. Nebenwirkungen unter 4-MU Einnahme sind bislang nicht beschrieben.

Eine weitere Möglichkeit zur Einflussnahme auf den HA-Stoffwechsel bestünde in der Hemmung des Abbaus der HA durch HYAL. In Voruntersuchungen in Bezug auf Prostatakrebs konnte gezeigt werden, dass sulfatierte HA-Polymere (sHA) eine inhibitorische Wirkung auf die HYAL-Aktivität entfalten. Diese Inhibierung konnte auf eine kompetitive oder nicht-kompetitive Hemmung der HYAL zurückgeführt werden. Die nicht-kompetitive Hemmung durch sHA war hierbei bis zu 15fach stärker als die kompetitive Hemmung. Es resultierte hieraus eine Inhibierung des Prostatakrebswachstums in vitro, wie auch in vivo (Mausmodell).

Das Ziel unserer Erhebungen war es daher den Einfluss des HA-Stoffwechsels in der Urothelkarzinom-Umgebung im Zell- und Tiermodell zu untersuchen und die

HA-Familie somit als diagnostische und therapeutische Biomarker weiter zu beleuchten. Alle am HA-Stoffwechsel beteiligten Proteine stellen prinzipiell Biomarker dar und können als therapeutische Ziele betrachtet werden. In weiteren Schritten wurde zudem auch eine mögliche Strategie zur Einflussnahme auf dieses System untersucht werden. Hierbei wurde der Einfluss der kompetitiven und nicht-kompetitiven Hemmung durch sHA auf Urothelkarzinome in vitro und vivo, sowie die Wirkweise untersucht. In einem weiteren Tiermodell der Maus ließ sich darüberhinaus ein potentieller therapeutischer Nutzen für ein auf dem Markt befindliches Nahrungsergänzungsmittels (4-MU) in Kombination mit einer Standardtherapie bei metastasiertem Urothelkarzinom belegen.

Die folgenden Abschnitte umfassen die Methodik und Ergebnisse beider Arbeiten, auf Grund der methodischen und inhaltlichen Nähe.

Methodik

Zunächst stand eine Kohorte mit 70 Gewebeproben aus der Blase zur Untersuchung zur Verfügung, welche von gesunden Probanden und an Urothelkarzinom der Blase erkrankten Patienten an der Universität von Miami, gesammelt wurden. Bei 30 akquirierten Gewebeproben war histopathologisch normales Urothel nachgewiesen wurden. In weiteren 40 Proben wurde der Nachweis eines Urothelkarzinoms erbracht. Von allen Patienten stand ein langer klinischer Nachsorgezeitraum zur Verfügung, sowie relevante klinische Parameter.

mRNA wurde mit Hilfe handelsüblicher Extraktionskits gewonnen und die Expressionsniveaus verschiedener EMT-Gene und HA-Familien-Gene per quantitativer real-time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) gemessen. Die hierfür verwendeten Primersequenzen wurden bereits im Vorfeld generiert und getestet. Eine Normalisierung der Expressionswerte erfolgte gegenüber der definierten Haushaltsgene β -Aktin und 18-S.

Den gemessenen Werten wurden die, im Rahmen des „The Cancer Genome Project“ (TCGA) frei zugänglich stehenden, Expressionsniveaus gegenübergestellt. Der TCGA-Datensatz umfasst hierbei 407 Blasenkrebspatienten bei 407 welchen

die Expressionsniveau der HA-Familien- und EMT-Gene, sowie (lediglich) die Überlebenszeiträume zur Verfügung stehen.

Desweiteren konnte auf die methodischen Erfahrungen aus Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe zurückgegriffen werden. Es wurden verschiedene handelsübliche Urothelkarzinomzellreihen (HT1376, 5637, J82, TCC-SUP, HT1197, RT4, T24, 253JL und UMUC-3) verwendet und gegen zwei Zellreihen, abstammend von normalem Urothel (SV-HUC1 und Urotsa), verglichen. Alle Zellen wurden in einem geeigneten Kulturmedium (RPMI 1640 oder F12K, 10% Fötales Kälberserum unter Zugabe von Gentamicin) gezüchtet und maximal 10x passagiert. Die verwendeten Substrate, Antikörper und Reagenzien wurden auf übliche Weise erworben (z.B. Sigma Aldrich, Genzyme Corp.).

Die HYAL-Aktivität konnte mittels eines ELISA-like-assays untersucht werden. Die gemessene HYAL-Aktivität (mU/ml) wurde ins Verhältnis zur Zellzahl oder Proteingesamtkonzentration gesetzt um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Untersuchte Zellen wurden je nach Bedarf unter der Ausbildung unterschiedlicher Konzentration von sHA (bis zu 40µg/ml), angiogener Fragmente (50µg/L), 4-MU (0–0,6mM) oder - im Rahmen der Untersuchung des Wirkmechanismus – LY294002 (Pan-PI3-Kinase Inhibitor, bis zu 10µg/L) inkubiert.

Western-Blots erfolgten nach Normalisierung der Zellzahl, wobei B-Aktin als Kontrolle verwandt wurde. Zur weiteren Untersuchung des Zellverhaltens, unter den jeweiligen Inkubationsbedingungen, erfolgte die Erfassung der Proliferationsrate durch Zellzählung unter Trypanblaufärbung.

Um eine semiquantitative Berechnung der Proteinkonzentration zu ermöglichen wurden die entstandenen Blots eingescannt und mittels ImageJ Software (National Institute of Health, Bethesda, MA, USA). Zur Berechnung der relativen Quantität eines spezifischen Proteins wurde hierbei die Intensität einer Proteinbande gegenüber der korrespondierenden Intensität einer B-Aktin, oder GAPDH Bande verglichen.

Die Zellmotilität und Invasionsneigung wurden mittels eines Matrigel™-Assays eruiert. Dazu wurden Zellen in die obere Kammer einer Matrigel beschichteten, offenporigen 12µm Platte überführt. Die untere Kammer enthielt Zellnährmedium. Nach erfolgter Inkubation wurde die Invasion von Zellen in die untere Kammer unter Nutzung eines MTT-(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)-Tests bestimmt. Zusätzlich wurden angiogene Fragmente, sHA oder 4-MU in die Kammern zugegeben. Die Messung mittels der oben genannten Assays erfolgte nach 18 beziehungsweise 48 Stunden. Zur weiteren Beurteilung der Zellmotilität und Zell-Zell-Interaktion wurde in 253JL Zellen ein Scratch Wound Assay durchgeführt. Die Zellen wurden mittels 4-MU behandelt.

Der Verschluss der zellulären Monoschicht wurde hierbei zu unterschiedlichen Zeitpunkten fotografiert und der Anteil des erfolgten Wundverschluss wurde berechnet. Zur Bestimmung des Apoptosegrades wurden Zellen, welche über 48h mit 4-MU inkubiert waren, mittels Cell Death ELISA Plus Kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) untersucht. Der Apoptoseindex wurde hierbei je 5000 Zellen angegeben.

Die Bestimmung des Expressionsniveaus verschiedener EMT- und HA-Familien-Genen wurde zunächst mRNA aus den Zellreihen in Analogie zu den bereits im Vorfeld untersuchten Gewebeproben gewonnen. Die Untersuchung des Expressionsniveau erfolgte mittels qRT-PCR.

Zur weitergehenden Untersuchung des Einflusses von sHA auf den PI3-K/AKT-Signalweg erfolgte eine transiente Transfektion des Myr-HA-AKT1 plasmid (mAKT; Addgene, Inc.) in 253JL Zellen. Als negative Kontrolle erfolgte zudem eine transiente Transfektion eines leeren, nicht-plasmid beladenen Vektors.

Eine durch das Plasmid induzierte Überexpression von AKT führt zu einer konstitutionellen Aktivierung des PI3-K/AKT-Signalwegs und somit zu einer im Signalweg abwärts gerichteten, erhöhten onkogenen Wirkung. Um zu klären, ob die

zuvor beobachteten Effekte eine Folge der sHA Behandlung darstellten, erfolgte eine Exposition der transfektierten 253JL Zellen gegenüber sHA über 48h. Diese Zellen wurden, wie oben beschrieben, hinsichtlich ihres Motilitäts-, Invasions-, Proliferations- und Apoptoseverhalts untersucht.

Es erfolgten erneute Western-Blots zur Prüfung der Proteinbiosynthese. Zudem wurde die PI3-K-Aktivität, sowie die NF- κ B-Aktivität (Promega Corporation) mittels des PI3-K p85 ELISA Assays (Active Motif) und NF- κ B-Reporter Assays in 253JL Zellen – vor und nach Transfektion – nach Inkubation mit sHA (5 μ g/ml) untersucht.

Die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen innerhalb der transfektierten 253JL erfolgte ein in situ Proximity Ligation Assay. Hierzu erfolgte die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen, welche anschließend unter Verwendung von anti-PI-3K- und anti-CD44-Antikörpern (Sigma Aldrich) inkubiert wurden. Zur Beurteilung der Interaktion erfolgte eine konfokale Mikroskopie mittels Zeiss LSM 700.

Es erfolgte der Transfer des in vitro Modells auf ein Mausmodell unter Verwendung von etwa 1 ½ Monate alten Nacktmäusen. Den Tieren wurde die transfektierte 253JL-Zellsuspension oder HT1376 subkutan injiziert. Die Tiere wurden hiernach in 5 Gruppen geteilt und verschiedenen Behandlungen unterworfen, welche unterschiedliche Dosierungen von sHA oder eine als Placebo fungierende Pufferlösung erhielten. Eine Behandlung erfolgte über 40 bis 48 Tage. Nach erfolgter Einschläferung wurde Tumorgewebe gewonnen und einem Immunoblotting unterzogen. Während des Untersuchungszeitraum wurden regelmäßig Tumolvolumen und Tiergewicht gemessen.

Alle statistischen Analysen erfolgten mittels GraphPad Prism (La Jolla, CA, USA) oder JMP Software from SAS (Cary, NC, USA). Für die Analysen erfolgte die Berechnung von Durchschnittswerten und Standardabweichung für quantifizierbare Daten. Univariate Varianzanalyse erfolgten zum Vergleich verschiedener Parameter gefolgt entweder durch einen ungepaarten T-Test oder den Turkey-Test, im Falle ungleicher Gruppengrößen. Zur Festlegung der Grenzwerte für die erfolgte

Stratifizierung wurde die Grenzwertoptimierungskurve erzeugt und der Youden Index berechnet. An Hand der Werte erfolgte die Gruppenzuordnung und hiernach die Auftragung in Kaplan-Meier-Kurven.

Ergebnisse

Die in den Gewebeproben untersuchten Expressions-Niveaus der sieben, bekannten HA-Familien-Gene (HAS1-3, CD44 standard und variant, RHAMM und HYAL-1) zeigten sich signifikant erhöht. Zusätzlich konnte eine Korrelation bei HAS1 und 2, sowie bei HYAL-4 bei eben jenen Patienten festgestellt werden, welche im späteren Verlauf eine Metastasierung entwickelten. Hierbei zeigten sich bis zu 4,2fach erhöhte Expression von HYAL-1 verglichen zu jenen Patienten, welche keine Metastasierung zeigten. Die Expression von HAS3, CD44 oder RHAMM korrelierte dagegen nicht mit einer Metastasierung. Zusätzlich konnte eine Abhängigkeit des krankheitsspezifischen Überlebens von der Expression von HYAL-1 gezeigt werden. In einer multivariaten Analyse zeigte sich einzig HYAL-1 als unabhängiger Prädiktor für eine Metastasierung.

Eine Stratifizierung in Hoch- und Niedrigrisikogruppen für die Entwicklung von Metastasen erfolgte an Hand der Expression von HAS1 und HYAL-1 via Kaplan-Meier-Kurven.

Bei der statistischen Aufarbeitung des TCGA-Datensatz zeigte sich eine Korrelation von HAS2 und 3 und HYAL-1 mit dem Gesamtüberleben der Patienten. Das krankheitsspezifische Überleben lag nicht vor. HAS1-3-, sowie HYAL-1-Expression bargen hier die Möglichkeit zur Stratifizierung in Hoch- und Niedrigrisikogruppen für das Gesamtüberleben.

Diese statistischen Untersuchungen zeigen, dass HA-Familiengene geeignete Biomarker zur Prognoseabschätzung auch auf Bezug des klinischen Kontexts bei Urothelkarzinomen sind.

Es erfolgte die Untersuchung des Einflusses von 4-MU auf die HA-Synthese und die Zellfunktionen der Urothelkarzinomzellreihen. Hierbei wurde zunächst mittels gezeigt, dass alle Zellreihen relevante und hohe Mengen von HA sekretieren (100 – 1200ng je 100 Zellen). Es folgte die Inkubation von 253JL und HT1376 Zellen mit 4-MU (80mg/ml). Nachweisbar war eine Reduktion der HA-Synthese um 490% und bestätigte somit auch vorangegangene Untersuchungen hinsichtlich der notwendigen 4-MU Konzentration.

Der Einfluss von 4-MU auf die Zellproliferation ergab eine dosisabhängige Inhibition des Wachstums der Zellen mit 56-60% Inhibition bei 80mg/ml. Immortalisierte normale urotheliale Zellreihen, wie Urotsa oder SV-HUC1, erfuhren keine relevante Wachstumsinhibition.

Das gehemmte Wachstum der Zellen unter 4-MU Behandlung war am ehesten durch eine gesteigerte Apoptose zu erklären. Es zeigte sich in den Apoptoseassays eine 3-4fache Steigerung des Apoptoseindex.

Bei erneuter Hinzugabe von HA während der Inkubationszeit der 253JL und HT1376 Zellen, bei zeitgleicher Behandlung mit 4-MU, kam es zur Abschwächung des zuvor durch 4-MU beobachteten inhibitorischen Effekts von 58% - gegenüber 17% unter Zugabe von HA. Die Zugabe von HA zeigte hierbei, dass auch die Apoptoseindizes dieser Zell wieder sanken.

Es schlossen sich Untersuchungen zur Zelladhäsion, Migration und Invasionsneigung unter Einfluss von 4-MU im nächsten Schritt an. Für diese Untersuchungen wurden erneut 253JL und HT1376 Zellen gewählt, da gerade in diesen Zellzeihen besonders hohe HA-Mengen synthetisiert werden, beide Zellreihen ein invasives Wachstum zeigen und verschiedene Isoformen von CD44 exprimieren. 253JL Zellen exprimieren die Unterform CD44s, wohingegen HT1376 Zellen die CD44v Unterform bilden. Zudem besitzen 253JL Zellen einen mutierten, aktivierten PI3-K Signalweg, bei vorliegendem AKT und p53 Wildtyp. Demgegenüber liegt in HT1376-Zellen ein PI3-K und AKT Wildtyp vor, bei jedoch mutiertem p53.

Bei 253JL Zellen, welche im Scratch Wound Assay unter Zugabe von 4-MU untersucht wurden, zeigte sich eine dosisabhängige Verzögerung des Zellverbandverschlusses. In unbehandelten 253JL Zellen war der Verschluss nach 24 Stunden zu etwa 75% vollständig, wohingegen unter einer 4-MU Konzentration von 80mg/ml lediglich ein Verschluss von etwa 33% nach 24 Stunden erreicht wurde.

Vergleichbar zeigte sich, dass 4-MU in beiden Zellreihen die chemotaktische Motilität um 52% beziehungsweise 61% herabsetzte. Zudem wurde das invasive Potential deutlich gehemmt und nahezu außer Kraft gesetzt. Die Effekte zeigten sich nach Zugabe von HA während des Untersuchungszeitraums umkehrbar.

In den 253JL und HT1376 Zellen zeigte unter 4-MU Behandlung eine induzierte Aktivierung von proapoptotischen Effektoren wie zum Beispiel Caspase 3,8 und 9, FAS und FADD, bei gleichzeitiger Deaktivierung von antiapoptotischen Effektoren wie bcl-2. Proapoptische Effektoren zeigten sich bis 400fach erhöht unter 4-MU Behandlung. Auch hier zeigten sich die Effekte reversibel unter HA-Zugabe.

Die Ergebnisse erklären das Wirkprinzip von 4-MU, welches in großem Maße auf einer Inhibition der HA-Synthese bei gleichzeitiger Steigerung der Apoptose in den Zellen beruht.

Die Zelloberflächeninteraktion von HA mit seinem Rezeptoren CD44 und RHAMM induziert einen Intrazellulären Signalweg, der wie oben beschrieben eine Aktivierung von PI3-K, AKT und weiterer EMT-Marker nach sich zieht. In beiden Zelllinien zeigte sich, dass nach Behandlung mit 4-MU die Expression von CD44 und RHAMM um den Faktor 10, ebenso wie der von EMT-Markern wie B-Catenin, Twist und Snail, gesenkt wird.

Bei der Untersuchung auf Proteinebene zeigten beide Zelllinien unter Therapie mit 4-MU eine dosisabhängige Herabregulation von CD44 und RHAMM und Phosphorylierung von AKT. Konsequenterweise zeigten sich ebenso B-Catenin, Twist und Snail herunterreguliert.

Die B-Catenin-Aktivierung ist posttranslational durch AKT und GSK-3a/b reguliert. Aktiviertes B-Catenin führt zur Hochregulation von Snail und Twist über den sogenannten B-Catenin LCF/LEF-Komplex, welcher wiederum die Expression von E-Cadherin negativ beeinflusst. Dies wiederum konnte bei mit 4-MU behandelten Proteinen aus den Zellreihen in deutlicher abgeschwächter Weise beobachtet werden. Dies bestätigt, dass die Effekte von 4-MU als Folge der Inhibition der HA-Synthese mit anzusehen sind.

Um zu bestätigen, dass die Effekte von 4-MU auf die HA-Rezeptor vermittelte AKT Aktivierung und die hieraus resultierende Aktivierung des dahinterliegenden Signalwegs zurückzuführen ist, erfolgte die Überexpression von mAKT, welches konstitutionell aktiv ist, in 253JL Zellen. Es zeigte sich, dass die mAKT Überexpression den Effekten von 4-MU vollständig entgegenwirkte (Vermehrte Expression von Snail, Twist, B-Catenin). In den Zellen zeigte sich zudem kein Einfluss einer 4-MU Behandlung auf die Invasivität.

Da als Schlussfolgerung 4-MU die AKT-Aktivierung inhibiert, erfolgte eine Bestimmung des weitergehenden Einflusses auf die PI3-K-Aktivität. Diese zeigte sich in den mit 4-MU behandelten 253JL Zellen bis zu 90% herunterreguliert.

Der PI3-K/AKT Signalweg induziert die NF- κ B Aktivität durch den Abbau von I κ B. Im Rahmen der Untersuchung der transkriptionellen Aktivität von NF- κ B zeigte sich eine Inhibition um 40-50% dieses Signalwegs unter Behandlung mit 4-MU sowohl in 253JL-, aber auch in HT1376-Zellen.

Die antitumoralen Effekte von 4-MU wurden im oben beschriebenen HT1376 Mausmodell untersucht. Hierbei zeigte eine signifikante Inhibition des Tumorstwachstums bereits ab Dosen von 200mg/kg. Dieser Effekt währte auch nach vorzeitiger Beendigung der 4-MU Gabe bis zum Untersuchungsende fort. Die Unterschiede im Tumorstvolumen betrugen gegenüber der Placebogruppe mehr als 500mm³ und waren statistisch signifikant. Tiere, welche von Beginn an mit 4-MU behandelt wurden, entwickelten keine klassischen palpablen Tumore. Das Gewicht

der Tiere entwickelte sich während des Untersuchungszeitraum nicht unterschiedlich gegenüber der Placebogruppe.

Es erfolgten immunohistochemische Untersuchungen des Tumorgewebes nach Behandlungsende, wobei eine Herabsetzung von B-Catenin und eine Hochregulation von E-Cadherin in den mit 4-MU behandelten Gruppen nachgewiesen werden konnte.

Die Messung der EMT-Marker Expression in den Urothelkarzinom-Gewebeproben zeigte erhöhte Expression von B-Catenin, Twist und Snail bei gleichzeitiger Herunterregulierung von E-Cadherin im Vergleich zu normalem Urothel. Hierbei zeigten sich in Gewebeproben von metastasierten Patienten einzig Twist signifikant erhöht gegenüber Patienten mit lokalisierten Tumoren. Die Erhöhung der Twist-Expression stellte sich in univariater Analyse als korrelierend mit der Entwicklung von Metastasen heraus. Eine Auftragung via Kaplan-Meier-Kurve ließ bei Stratifizierung nach Twist-Expression eine Unterscheidung in Niedrig- und Hochrisikogruppen zu, hinsichtlich der Entwicklung von Metastasen. Unter Verwendung des TCGA-Datensatzes konnte zudem gezeigt werden, dass B-Catenin, Snail und Twist mit dem Gesamtüberleben der Patienten korreliert. Darüberhinaus ermöglichten auch hier die Snail- und Twistexpression eine Stratifizierung in 2 Risikogruppen hinsichtlich des Gesamtüberlebens.

Da eine gesteigerte HA vermittelte Signalweiterleitung die Expression von B-Catenin, Snail und Twist hoch- und jene von E-Cadherin herunterreguliert, untersuchten wir die Expression von HYAL im Zusammenhang mit der von EMT Biomarkern. Hierbei konnte über alle Gewebeproben gezeigt werden, dass eine Übexpression von HYAL in Blasentumoren mit einer signifikanten Überexpression von B-Catenin, Snail und Twist Expressionsniveaus einhergeht.

Zusammenfassung

Unsere Studien an Gewebeproben, im verwendeten Mausmodell, wie auch auf in vitro zeigen das eine HA vermittelte Signalweiterleitung einen aggressiven

Phänotyp von Blasentumoren unterstützt und erhält, indem es Urothelkarzinome in die Lage versetzt die EMT hochzuregulieren und somit die Motilitäts-, Invasions- und Proliferationsneigung zu erhöhen. HYAL-Moleküle (z.B. HAS1, HYAL-1, HYAL-4) und EMT-Marker (z.B. Twist) zeigten sich hierbei als potentielle Biomarker. Es besteht somit die Möglichkeit eine prognostische Einstufung in Hoch-Risiko und Niedrig-Risiko Patienten vornehmen zu können. Dies könnte der künftigen Stratifizierung dienen und die Einschätzung erlauben, welche Tumorpatienten von einer Blockade der HA-vermittelten Signaltransduktion profitieren. Die Gruppe der HYAL stellt sich somit als potentieller Kandidat für die Entwicklung einer zielgerichteten, biomarkerbasierten Therapie dar. An Hand der Untersuchungen konnte die Effektivität und der Einfluss möglicher therapeutischer Optionen dargelegt werden. 4-MU erscheint hierbei eine vielversprechende Behandlungsoption, welches im Tiermodell beachtliche Effekte erzielen konnte und bestenfalls das Tumorwachstum zum Stillstand kommen lässt.

4. Publikation

Kallifatidis G, Smith DK, Morera DS, Gao J, **Hennig MJ**, Hoy JJ, Pearce RF, Dabke IR, Li J, Merseburger AS, Kuczyk MA, Lokeshwar VB, Lokeshwar BL. β -Arrestins Regulate Stem Cell-Like Phenotype and Response to Chemotherapy in Bladder Cancer. Mol Cancer Ther 2019 Feb 20;18: 801. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-18-1167.

Impact Factor 4,856

Hintergrund und Ziele

Arrestine bilden eine eigenständige Proteinfamilie, welche sich aus vier bekannten Proteinen zusammensetzt. Zwei dieser Proteine kommen beim Menschen

ausschließlich im Bereich der Retina vor und werden daher auch als visuelle Arrestine (Typ 1 & 4) bezeichnet. Die beiden anderen Familienmitglieder, auch β -Arrestine genannt, Arrestin 2 (ARRB1) und Arrestin 3 (ARRB2), sind im menschlichen Körper allgegenwärtig und an den meisten physiologischen Prozessen im menschlichen Körper beteiligt.

β -Arrestine fungieren als Bremse von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Dies erfolgt durch die Entkopplung der Rezeptoren von heterotrimerischen G-Proteinen und Zuführung derer zur Endozytose. Hierdurch wird eine aktivierte Signalgebung beendet. Wie bereits aus der Literatur bekannt ist dieser Mechanismus der Signalabschwächung bei verschiedenen malignen Entitäten gestört, wodurch eine Progressions- und Metastasierungsneigung begünstigt wird. Des Weiteren konnte eine G-Protein unabhängige Beeinflussung von Signalwegen, wie MAPK und PI3-K/Akt, durch β -Arrestine gezeigt werden.

In der weiterführenden Literatur finden sich Hinweise darauf, dass β -Arrestine eine Rolle bei der Regulation von stammzellartigem Verhalten von Tumorzellen innehaben und so Selbsterneuerung, Progression und Apoptose mitregulieren.

β -Arrestine wurden bislang jedoch nicht im Zusammenhang mit Urothelkarzinomen untersucht. Unsere Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zielten daher auf das funktionelle Verständnis von β -Arrestinen bei Urothelkarzinomen, sowie deren potentielle Eignung als Biomarker.

Methodik

Für die Untersuchung standen erneut Gewebeproben aus einer Biobank zur Verfügung. Diese Proben entstammten ursprünglich Patienten, welche entweder ein Urothelkarzinom der Harnblase oder gutartige Erkrankungen des urogenitalen Trakts aufwiesen, wo die Indikation zur transurethralen Resektion bestand. Die Gewebeproben wurden in Übereinstimmung mit den ethischen Vorgaben der Deklaration von Helsinki an der Universität von Miami gewonnen und archiviert. Bei 20 Gewebeproben zeigte sich normales Urothel. In weiteren 43 Proben bestand der histopathologisch gesicherte Nachweis eines Urothelkarzinoms. Von allen

Patienten dieser Kohorte stand ein klinisch relevanter Nachsorgezeitraum, sowie weitere klinische Parameter zur Verfügung.

Darüberhinaus konnte in einer zweiten Kohorte auf FFPE-Gewebe von 31 Zystektomie Patienten zurückgegriffen werden, welche eine syn- oder metachrone Metastasierung erfuhren. 27 dieser Patienten wurden mit einer, auch nach heutigem Stand, leitliniengerechten Erstlinientherapie mittels Gemcitabin/Cisplatin behandelt. Drei dieser Patienten erhielten Gemcitabin/Cisplatin erst als Zweitlinientherapie. Ein weiterer Patient wurde mittels Gemcitabin-Monotherapie kombiniert mit einer lokalen Bestrahlung der Harnblase behandelt. Auch hier stand ein klinisch relevanter Nachsorgezeitraum, sowie weitere klinische Parameter zur Verfügung.

Für die Bestimmung des Expressionsniveaus von ARRB1 und ARRB2 wurde zunächst mRNA aus den Proben mittels handelsüblicher Extraktionskits gewonnen. Die Untersuchung des Expressionsniveau erfolgte mittels qRT-PCR, wobei die hierfür verwendeten Primersequenzen bereits im Vorfeld generiert und getestet wurden. Eine Normalisierung der Expressionswerte erfolgte gegenüber β -Aktin.

Zur weiteren funktionellen Untersuchung des Einflusses verschiedener Expressionsniveaus auf das Verhalten von Urothelkarzinomzellen wurde erneut auf ein Zellmodell zurückgegriffen. Hierbei wurden die bereits erwähnten Urothelkarzinomzellreihen HT1376, 253JL und 5637 verwendet und wie in den oben genannten Vorpublikationen parallel zur – normale urotheliale Zellen repräsentierenden – Zellreihe Urotsa kultiviert.

Eine Über- und Unterexpression von ARRB2 konnte nach stabiler Transfektion eines konstitutionell aktiven oder inaktiven ARRB2-Gens mittels eines kommerziell erworbenen Plasmidpanels (Origene) in HT1376 und 253JL Zellen erreicht werden. Hierdurch waren weitere mechanistische und funktionelle Untersuchungen möglich. Die Vorbereitung des Proteinnachweis der Zellreihen erfolgte durch Lysierung und Proteingewinnung nach Behandlung mittels eines RIPA-Puffers unter Verwendung des Pierce Micro BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific). Western-Blots erfolgten nach Normalisierung der Zellzahl, wobei B-Aktin als Kontrolle fungierte.

Die Zellmotilität wurde mittels eines Matrigel™-Assays eruiert. In dieser Untersuchung wurden Zellen in die obere Kammer einer Matrigel beschichteten, offenporigen 8 μ m Platte überführt. Die untere Kammer enthielt Zellnährmedium.

Nach erfolgter Inkubation wurde die Invasion von Zellen in die untere Kammer unter Nutzung eines MTT-(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)-Tests bestimmt.

Um den Einfluss einer ARRB1-Inaktivierung auf die Tumorzellen untersuchen zu können erfolgte ein Knockout durch Verwendung der CRIPR/Cas9 Methode. Mittels CRISPR/Cas9 Software (Zhang Lab, MIT 2017; CRISPR.mit.edu) generierte RNA Sequenzen für ARRB1-KO wurden mittels lentiviralem Vektor CRIPRv2GFP kloniert. Die so erzeugten Plasmide wurden in HT1376 transfektiert und nach 48 Stunden mittel Durchflusszytometrie sortiert. Zur Bestätigung des Knockouts erfolgte eine Western Blot Analyse der Zellen.

Zur Untersuchung einer möglichen Chemoresistenz durch eine ARRB2 Überexpression wurden ARRB2 überexpremierende HT1376 Zellen (HT1376-OE) und deren Kontrollen (HT1376 mit leerem Plasmid transfektiert) in Mikrotiterplatten mit 10nmol/L Tritium(³H)-Gemcitabin (TCI America) inkubiert. Zu festgelegten Zeitpunkten wurde die ³H-Gemcitabin Konzentration mittels Flüssigszintillationsmessung im Nährmedium, sowie intrazellulär bestimmt.

Die Übertragung des Zellmodells auf in vivo Bedingungen erfolgte erneut im Mausmodell. Hierbei wurde die gleiche Menge an erzeugten HT1376-OE-Zellen und deren Kontrollen in 8 Wochen alte Nacktmäuse subkutan eingebracht. Während des Untersuchungszeitraum erfolgte die wöchentliche Messung von Tumolvolumen und Tiergewicht. Gemcitabin (25mg/kg) wurde zwei Mal pro Woche verabreicht, sobald die subkutanen Tumore eine Größe von 100mm³ erreicht hatten.

Zur Untersuchung der Proteinexpression wurde in allen untersuchten Geweben auf die Immunofluoreszenz zurückgegriffen. Hierbei untersuchten wir die Expression von Zytokeratinen 14 und 17, sowie CD44, STAT3 und BMI-1. Speziell für die Untersuchung der in Paraffin eingebeteten Gewebeproben wurden die Antigene nach dem Herauslösen aus dem Paraffin mittels der entsprechenden Antikörper inkubiert und anschließend mit zielgerichteten fluoreszierenden Antikörpern (ThermoFisher Scientific) markiert. Die Markierung der Zellkerne erfolgte mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol. Die Untersuchung erfolgte an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (BZ-X710; Keyence Corporation of America).

Die statistische Analyse der gewonnenen Daten erfolgte erneut mit JMP-Pro 13 Software from SAS unter Verwendung bereits genannter statistischer Tests.

Ergebnisse

Eingangs untersuchten wir die zur Verfügung stehenden Gewebeproben auf das Expressionsverhalten von ARRB1 und 2. Es zeigte sich eine statistisch signifikante Erhöhung der Expression von ARRB1 um den Faktor 5,2 bei Patienten, welche Metastasen ausbildeten, verglichen mit dem Tumorgewebe von Patienten, bei denen keine Metastasen in der Nachsorge detektiert wurden. Im Vergleich zu normalem Urothel war die Expression gar um das 7,7fache erhöht. Bei ARRB2 zeigte sich ein inverses Verhalten. Hier war die Expression in normalem Urothel oder in Tumorgewebe gegenüber dem Tumorgewebe von Patienten, welche Metastasen in der Nachsorge ausbildeten, erhöht (2,1 bzw. 4,7fach). Die Expressionsniveaus von ARRB1 zeigten sich 2,7fach erhöht, die von ARRB2 2fach erniedrigt bei Tumorpatienten, welche im weiteren Verlauf an ihrer Erkrankung verstarben, verglichen mit den im Nachsorgezeitraum Überlebenden. In multivariater Analyse zeigten sich ARRB1 und ARRB2 als unabhängige Prädiktoren für das Auftreten von Metastasen. Die Spezifität lag bei 87-91% bei einer Sensitivität um 70%.

Nach Extraktion von mRNA aus den paraffineingebetteten Gewebeproben der Zystektomiepatienten wurde die Expression von ARRB1 und ARRB2 mittels qRT-PCR gemessen. Obwohl verschiedenste Primer für ARRB1 getestet wurden, konnten keine Transkriptionsniveaus für ARRB1 bestimmt werden. Jedoch, ARRB2 zeigte sich 3fach herunterreguliert bei eben jenen Patienten, welche ein Versagen auf eine Chemotherapie mit Gemcitabin/Cisplatin zeigten. ARRB2 stellte sich in multivariater Analyse als einziger unabhängiger Prädiktor eines Therapieversagens dar. Dabei wies die verminderte ARRB2-Expression eine Sensitivität von 73% und Spezifität von 83% zur Prädiktion eines Therapieversagens auf.

In Analogie zu unseren Vorpublikationen wurden die Expressionsniveaus der β -Arrestine im Zellmodell bestimmt. Hierbei zeigten sich sehr unterschiedliche Expressionsmuster in verschiedenen Zellreihen. Je nach Histologie und Grading der verwendeten Zellreihen konnte eine hohe ARRB1 Expression bzw. eine verminderte ARRB2 Expression in aggressiveren Zelltypen nachgewiesen werden. Es fand sich beispielhaft in der HT1376-Urothelkarzinomzellreihe (high grade) eine hohe Expression von ARRB1 bei nicht detektierbarer ARRB2 Expression. Diese Heterogenität der Expressionsmuster von β -Arrestinen in vermeintlicher Korrelation zu histologischen Zelleigenschaften führte zu weitergehenden mechanistischen Untersuchungen, wobei hierfür, auf Grund der Expression beider β -Arrestine, die Zellreihe 253JL Verwendung fand, sowie auf Grund der jeweils hohen Expression von ARRB2 auf die Zellreihen 5637 und HGT1376 zurückgegriffen wurde.

Wie bereits beschrieben wurde ein Gen-Knockout von ARRB2 in den 253JL Zellen mittels stabiler Transfektion erreicht. In den Zellreihen 5637 und HT1376 hingegen wurde ARRB2 überexprimiert nach stabiler Transfektion.

In den Untersuchungen zeigte sich dabei, dass die Überexpression von ARRB2 zu einer signifikant geringeren und kleineren Koloniegröße gegenüber den Kontrollen führte. Die Überexpression von ARRB2 führte zu einer 4,6fach niedrigeren Formation von multizellulären Tumorsphäroiden. Daraus lässt sich ableiten, dass eine Überexpression von ARRB2 zu einer herabgesetzten Tumorregulation und verringerten Aggression führt. Zudem kann hieraus eine geringere Neigung zu Migration und zu stammzellähnlichem Verhalten abgeleitet werden. Bestätigt wurden diese Annahmen durch die Ergebnisse der Motilitäts- und Invasions-Matrigel™-Assays, wo sich bei depletiertem ARRB2 eine erhöhte Motilitäts- und Invasionsneigung (>3,5fach erhöht) zeigte.

In einem weiteren Schritt wurde der Einfluss von ARRB1 auf das Zellverhalten untersucht. Die mittels CRISPR/Cas9 erzeugten ARRB1 depletierten HT1376 Zellen wurden hinsichtlich ihrer Expression von CD44 und BMI-1 untersucht. Diese zeigte sich deutlich herabgesetzt. Eine Western-Blot Analyse mit Ziel des Nachweises von ARRB1 bestätigte die komplette Depletion.

Weiterhin folgte die Untersuchung der Expression verschiedener Urothelkarzinomspezifischer Biomarker und Marker von Stammzeleigenschaften (STAT3, BMI-1). Zytoskeletale Marker, welche eine starke Assoziation zum basalen Urothelkarzinom aufweisen, wie Zytokeratin 14 und 17, zeigten sich bei ARRB2-Depletion stark erhöht und bei Überexpression, zum Beispiel in HT1376 Zellen, stark erhöht (bis zu 7fache Erhöhung der Expression gegenüber Kontrollen). Ausführlichst beschrieben wurde bereits die zentrale Rolle von CD44. Dessen Splice-Varianten (CD44s & CD44v) zeigten sich bei Überexpression von ARRB2 in HT1376 Zellen stark herunterreguliert, wie auch die STAT3 und BMI-1 Expression. Aus den gemessenen Expressionsmustern kann zusammenfassend gefolgert werden, dass eine Depletion von ARRB2 in Urothelkarzinomen mit einer Entdifferenzierung und einem zunehmenden stammzellähnlichem Verhalten der Zellen assoziiert ist, wohingegen es bei Überexpression genau zu gegenteiligen Effekten kommt.

Eine der Haupteigenschaften des stammzellähnlichen Verhaltens bei Tumorzellen ist die Resistenz gegenüber einer chemotherapeutischen Behandlung. Daher fokussierten wir im Weiteren unsere Untersuchungen darauf, ob eine Expressionsveränderung von ARRB2, welche wie beschrieben den stammzellähnlichen Phänotyp bei Urothelkarzinomzellreihen beeinflusst, die Sensitivität hinsichtlich der Behandlung mit einem Agens der Standardchemotherapie Gemcitabin/Cisplatin affiziert.

Bei Überexpression von ARRB2 in 5637 und 253JL Zellen kam es zu einer deutlichen Reduktion der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50} : Kontrollen > 100 nmol/L, Überexpression von ARRB2: 16,5 nmol/L) von Gemcitabin. Eine Depletion von ARRB2 Zellen führte dagegen in 253JL Zellen zu einer Steigerung der IC_{50} , was einer induzierten Resistenz gegenüber Gemcitabin gleichkommt. Diese Effekte konnten jedoch nur hinsichtlich des Wirkpotentials von Gemcitabin beobachtet werden. Einen Einfluss auf die IC_{50} von Cisplatin konnte nicht beobachtet werden.

Um die Wirkung in vivo nachzuweisen wurde auch das Ansprechen einer Behandlung mittels Gemcitabin im Mausmodell, wie oben beschrieben, untersucht.

Hierbei konnte ein deutlich reduziertes Tumorwachstum (deutlich geringere Zunahme von Tumolvolumen und -gewicht) bei Tumoren resultierend aus der Überexpression von ARRB2 im Vergleich zu den Kontrollen nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung der Expressionsniveaus von CD44v, CK14, CK17 und CK5 aus den Maustumoren zeigte sich die CD44v Expression, sowie derer der Zytokeratine in ARRB2 überexprimierenden Tumoren deutlich erniedrigt, was die inverse Korrelation der ARRB2 Expression zum Verhalten der Expressionsniveaus von typischen Urothelkarzinom-Biomarkern unterstreicht. Desweiteren konnten mittels Immunofluoreszenz eine drastische Reduktion der Expression weiterer Stammzellmarker wie BMI-1, STAT3 und erneut CD44 nachgewiesen werden. Kurzum, die Überexpression von ARRB2 führte zu einer Erhöhung der Sensitivität gegenüber einer Behandlung von Gemcitabin bei Urothelkarzinomen. Gegenteilig verhält sich eine verminderte oder gar unterdrückte Expression von ARRB2, welche mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Gemcitabin einhergeht.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit zeigt sich, welchen Einfluss ARRB1 und ARRB2 auf die Regulation des stammzellähnlichen Verhaltens von Urothelkarzinomzellen ausüben. Dies ist die erste Studie, welche dies an Hand eines Gewebesatzes zeigt. Wir konnten zeigen, dass diese beiden Proteine gegensätzliche Funktionen aufweisen und wie deren Regulation den dahinterliegenden Signalweg beeinflusst. Beide Proteine haben einen maßgeblichen Einfluss auf die Regulation der Selbsterhaltung von Zellen. Beachtenswert zeigt sich dabei der potenzielle Nutzen beider Proteine als diagnostischer, aber letztlich auch prädiktiver Biomarker hinsichtlich der Entstehung einer Metastasierung und dem Ansprechen auf eine chemotherapeutische Behandlung mit Gemcitabin.

Die Feststellung, dass die Expression von ARRBs mit klinischen Ereignissen korreliert, ist aus mehreren Gründen bedeutend. Zum einen konnte ein wechselseitiges Expressionsmuster von ARRB1 und ARRB2 in Tumoren nachgewiesen werden, welches durch die weiteren funktionellen und mechanistischen Untersuchungen bestätigt wurde.

Zum anderen zeigte sich insbesondere in der Gruppe von Hochrisikopatienten (Patienten mit einem muskelinvasivem Urothelkarzinom), dass die Expression von ARRB1 und ARRB2 als Prädiktor für das Eintreten einer späteren Metastasierung und des krankheitsspezifischen Überlebens herangezogen werden kann.

Schließlich zeigt sich, dass insbesondere die ARRB2 Expression eine Rolle als Biomarker bei Effektivität und Ansprechen eines klassischen Systemtherapieregims, wie Gemcitabin/Cisplatin, spielt und sich hieraus eine Rolle als Vorhersagewert für das Ansprechen ableiten lässt.

Potentiell wäre es denkbar, dass eine ARRB2 Bestimmung in Zystektomie-Präparaten die Identifizierung von Patienten erlaubt, welche zum einen ein hohes Risiko einer Metastasierung innehalten oder von einer adjuvanten Systemtherapie profitieren könnten. Insbesondere die Patienten, welche nach primär operativer Behandlung ein hohes Rezidivrisiko aufweisen und wo von einem Nicht-Ansprechen auf eine konventionelle Erstlinientherapie mit Gemcitabin/Cisplatin auszugehen ist, könnten von einem schnelleren Zuführen zu immunonkologischen Systemtherapien profitieren.

Mehr und mehr Studien zeigen, dass die Heterogenität von Urothelkarzinomen auf das Vorhandensein einer kleinen Population von Karzinomzellen mit Stammzeleigenschaften zurückzuführen ist. In unserer Studie zeigt sich, dass die Expression von ARRB2 in inverser Korrelation zur Expression von Stammzellmarkern und Selbsterneuerung dieser Population steht.

Die konsequente Überexpression von ARRB2 führte zu einem Rückgang von verschiedenen Stammzellmarkern, wie z.B. CD44 – welcher in zahlreichen anderen malignen Entitäten mit Metastasen und Cisplatin-Resistenz einhergeht und eine zentrale Rolle in zahlreichen Signalwegen dient, wie bereits dargelegt.

In einer Vielzahl an Publikationen finden sich deutliche Hinweise, dass muskelinvasive Urothelkarzinome sich überwiegend aus karzinomatösen Stammzellen des basalen Urothels bilden. Wir konnten zeigen, dass die Expression von ARRB2 mit der Regulation von Biomarkern (CK14, CK17) des basalen Urothelkarzinoms korreliert.

Obwohl es eine Reihe von Biomarkern für Stammzellpotential bei Urothelkarzinomen gibt, sei nochmals auf die Heterogenität von Blasentumoren verwiesen. Es ist wahrscheinlich, dass diese Heterogenität bereits bei den Tumorstammzellen besteht. Umso bedeutender ist es, die einzelnen Mechanismen der Stammzellregulation zu entschlüsseln und somit neue diagnostische und therapeutische Möglichkeiten offenzulegen. Die Untersuchung und mechanistische Beschreibung von ARRB1 und ARRB2 stellt somit ein weiteres Puzzelstück dar und birgt das Potential für die weitere Untersuchung und Anwendung im klinischen Rahmen.

Danksagung

Mein außerordentlicher Dank gilt all jenen Personen, ohne deren Unterstützung die Anfertigung dieser Promotionsschrift nicht möglich gewesen wäre.

In erster Linie danke ich hierbei Herrn PD Dr. med. Mario W. Kramer als Mentor, Freund und Doktorvater, welcher in vielen Gesprächen den Fokus immer wieder auf wesentliche Aspekte und Ziele lenken konnte. Durch die zahlreichen kritischen Anmerkungen, seine Beharrlichkeit, sowie Geduld gelang die Erarbeitung, Aufbereitung und Abschluss dieses Manuskripts. Dies werde ich dauerhaft dankbar in Erinnerung behalten.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. med. Axel S. Merseburger für seine fortwährende Unterstützung und Hilfestellung. Als wesentlicher Türöffner und Netzwerker gebührt ihm nicht nur Dank für die Ermöglichung des wissenschaftlichen Austausches an den Universitäten Miami und Augusta in den Vereinigten Staaten von Amerika, sondern auch für sein Vertrauen in die eigenen Fähigkeiten und die bisher erfahrene fachliche und wissenschaftliche Ausbildung.

Ferner gebührt mein Dank Frau Prof. Ph.D. Vinata Lokeshwar, welche als fürsorgliche Mentorin und hingebungsvolle Wissenschaftlerin stets mit fundierten Kommentaren und ihrer Zielstrebigkeit die Grundlagen für die Erarbeitung der Publikationen legte.

Dankbarkeit gebührt ebenso meiner Frau Berenike Theresa Rogge für ihre Geduld und Vertrauen, ihre motivierende Art und ihre bereitwillige Unterstützung, welche sie jederzeit zu geben bereit ist.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, Dr. med. Bernd Arthur und Dr. med. Brita Jutta Inge Hennig, für die Ermöglichung aller Chancen und Wege in meinem bisherigen Leben, für Ihre vorbehaltlose Unterstützung, Liebe und Geduld.

Publikationen:

(1)

Kallifatidis, G.; Smith, D. K.; Morera, D. S.; Gao, J.; **Hennig, M. J.**; Hoy, J. J.; Pearce, R. F.; Dabke, I. R.; Li, J.; Merseburger, A. S.; Kuczyk, M. A.; Lokeshwar, V. B.; Lokeshwar, B. L. β -Arrestins Regulate Stem Cell-Like Phenotype and Response to Chemotherapy in Bladder Cancer. *Mol Cancer Ther* **2019**, *18* (4), 801. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-18-1167>.

(2)

Jordan, A. R.; Racine, R. R.; **Hennig, M. J. P.**; Lokeshwar, V. B. The Role of CD44 in Disease Pathophysiology and Targeted Treatment. *Frontiers in Immunology* **2015**, *6*, 182. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00182>.

(3)

Ozimek, T.; Kramer, M. W.; Hupe, M. C.; Laturnus, J. M.; Struck, J. P.; **Hennig, M. J. P.**; Merseburger, A. S.; Cordes, J. The Impact of Endourological Experience on Flexible Ureteroscopy Outcomes and Performance at Different Levels of Expertise: Retrospective Multifactorial Analysis. *Urol Int* **2020**, *104* (5–6), 452–458. <https://doi.org/10.1159/000504989>.

(4)

Hennig, M. J.; Hupe, M. C.; Hensen, B.; Jansen, M. C.; Kramer, M. W.; Kuczyk, M. A.; Merseburger, A. S. Sarcopenia as a Useful Predictor of Postoperative Complications Following Radical Cystectomy: An Assessment of Preoperative CT Scans. *JCO* **2017**, *35* (6_suppl), 351–351. https://doi.org/10.1200/JCO.2017.35.6_suppl.351.

(5)

Kramer, M.; Hensen, B.; Jansen, M. C.; **Hennig, M. J.**; Hupe, M. C.; Tezval, H.; Wacker, F.; Kuczyk, M. A.; Merseburger, A. S. Sarcopenia as a Marker for Prediction of Long-Term Survival Following Radical Cystectomy. *JCO* **2016**, *34* (2_suppl), 435–435. https://doi.org/10.1200/jco.2016.34.2_suppl.435.

(6)

Struck, J. P.; Hupe, M. C.; Heinisch, A.; Ozimek, T.; **Hennig, M. J. P.**; Klee, M.; von Klot, C.; Kalogirou, C.; Kuczyk, M. A.; Merseburger, A. S.; Kramer, M. W. RLC Score (R Status, Lymphovascular Invasion, C-Reactive Protein) Predicts Survival Following Radical Cystectomy for Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Aktuelle Urol* **2021**. <https://doi.org/10.1055/a-1310-3583>.

(7)

Hennig, M. J. P.; Kramer, M. W. [Potential for improvement by new resection and imaging techniques in TUR-B]. *Aktuelle Urol* **2020**, *51* (4), 348–352. <https://doi.org/10.1055/a-1171-1137>.

(8)

Hupe, M.; Vahlensieck, W.; **Hennig, M.** ^{*}; Ozimek, T.; Struck, J.; Tezval, H.; Merseburger, A.; Kuczyk, M.; Kramer, M. PD57-11 CROSS-SECTIONAL STUDY EVALUATING LONG-TERM BOWEL ISSUES IN BLADDER CANCER PATIENTS: DIARRHEA AS A LIMITING FACTOR OF QUALITY OF LIFE AFTER RADICAL CYSTECTOMY. *Journal of Urology* **2017**, 197 (4S). <https://doi.org/10.1016/j.juro.2017.02.2613>.

^{*}=presenting author

(9)

Hennig Martin J.P.; Lokeshwar Soum D.; Wilson Shenelle N.; Knapp Judith; Hupe Marie C.; Jordan Andre R.; Manoharan Murugesan; Kramer Mario W.; Merseburger Axel S.; Lopez Luis E.; Lokeshwar Vinata B. MP88-18 HYAL4: A MOLECULAR MARKER AND DETERMINANT OF BLADDER CANCER PROGRESSION. *Journal of Urology* **2016**, 195 (4S), e1135–e1136. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2016.02.2436>.

(10)

Lokeshwar Soum D.; Wilson Shenelle N.; **Hennig Martin J.P.** ^{*}; Garcia-Roig Michael; Ortiz Nicholas; Manoharan Murugesan; Soloway Mark S.; Lokeshwar Vinata B. MP71-05 MOLECULAR SUBTYPING OF RCC AND METASTASIS PREDICTION BY MIRNA EXPRESSION. *Journal of Urology* **2016**, 195 (4S), e917–e917. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2016.02.1451>.

^{*}=presenting author

(11)

Hennig Martin J.P.; Lokeshwar Soum D.; Wilson Shenelle N.; Jordan Andre R.; Chipollini Juan; Hupe Marie C.; Kramer Mario W.; Lopez Luis E.; Merseburger Axel S.; Lokeshwar Vinata B. MP61-01 ANTITUMOR ACTIVITY OF SULFATED ANGIOGENIC FRAGMENTS: A NOVEL HYALURONIDASE INHIBITOR. *Journal of Urology* **2016**, 195 (4S), e803–e803. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2016.02.875>.

(12)

Hupe, M.; Lokeshwar, S.; **Hennig, M.** ^{*}; Schimmelpfennig, D.; Kramer, M.; Merseburger, A.; Soloway, M.; Lokeshwar, V. MP48-01 EXPRESSION AND FUNCTION OF A NOVEL CHONDROITINASE IN BLADDER CANCER. *Journal of Urology* **2017**, 197 (4S). <https://doi.org/10.1016/j.juro.2017.02.1482>.

^{*}=presenting author

(13)

Jordan, A.; **Hennig, M.** ^{*}; Merseburger, A.; Hupe, M.; Kramer, M.; Soloway, M.; Lokeshwar, V. MP39-15 SDCT2 AS A FUNCTIONAL BIOMARKER OF RENAL CELL CARCINOMA. *Journal of Urology* **2017**, 197 (4S). <https://doi.org/10.1016/j.juro.2017.02.1189>.

^{*}=presenting author

(14)

Lokeshwar, S. D.; Talukder, A.; Yates, T. J.; **Hennig, M. J. P.**; Garcia-Roig, M.; Lahorewala, S. S.; Mullani, N. N.; Klaassen, Z.; Kava, B. R.; Manoharan, M.; Soloway, M. S.; Lokeshwar, V. B. Molecular Characterization of Renal Cell Carcinoma: A Potential Three-MicroRNA Prognostic Signature. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2018**, 27 (4), 464–472. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-17-0700>.

(15)

Gilbert, N.; Guo, X.; Bauer, J.; **Hennig, M.**; Kümpers, C.; Merseburger, A. Intravesikale Salpingiose – Fallbericht und Literaturüberblick. *Aktuel Urol* **2018**, 49 (03), 266–268. <https://doi.org/10.1055/s-0043-110039>.

(16)

Hupe, M. C.; Dormayer, L.; Ozimek, T.; Struck, J. P.; **Hennig, M. J. P.**; Klee, M.; von Klot, C. A. J.; Kuczyk, M. A.; Merseburger, A. S.; Kramer, M. W. Impact of Double J Stenting or Nephrostomy Placement during Transurethral Resection of Bladder Tumour on the Incidence of Metachronous Upper Urinary Tract Urothelial Cancer. *BMC Cancer* **2020**, 20 (1), 140. <https://doi.org/10.1186/s12885-020-6620-2>.

(17)

Morera, D. S.*; **Hennig, M. J. P.***; Talukder, A.; Lokeshwar, S. D.; Wang, J.; Garcia-Roig, M.; Ortiz, N.; Yates, T. J.; Lopez, L. E.; Kallifatidis, G.; Kramer, M. W.; Jordan, A. R.; Merseburger, A. S.; Manoharan, M.; Soloway, M. S.; Terris, M. K.; Lokeshwar, V. B. Hyaluronic Acid Family in Bladder Cancer: Potential Prognostic Biomarkers and Therapeutic Targets. *Br J Cancer* **2017**, 117 (10), 1507–1517. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.318>.

*First Authors

(18)

Hupe, M. C.; Vahlensieck, W.; Ozimek, T.; Struck, J. P.; **Hennig, M. J. P.**; Tezval, H.; von Klot, C. A.; Merseburger, A. S.; Kuczyk, M. A.; Kramer, M. W. Diarrhea and Flatulence Are Major Bowel Disorders after Radical Cystectomy: Results from a Cross-Sectional Study in Bladder Cancer Patients. *Urol Oncol* **2018**, 36 (5), 237.e1-237.e8. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2017.12.014>.

(19)

Dressler, F. F.; Dogan, S.; **Hennig, M.**; Frank, T.; Struck, J.; Cebulla, A.; Salem, J.; Borgmann, H.; Klatte, T.; Kramer, M. W.; Hofbauer, S. [Current practice patterns of perioperative cystectomy management in Germany: a questionnaire survey]. *Aktuelle Urol* **2020**. <https://doi.org/10.1055/a-1025-2523>.

(20)

Hupe, M. C.; Vahlensieck, W.; **Hennig, M. J.**; Ozimek, T.; Struck, J.; Tezval, H.; Merseburger, A. S.; Kuczyk, M. A.; Kramer, M. W. Cross-Sectional Evaluation of Long-Term Bowel Issues after Radical Cystectomy. *JCO* **2017**, 35 (6_suppl), 318–318. https://doi.org/10.1200/JCO.2017.35.6_suppl.318.

(21)

Kramer, M. W.; **Hennig, M. J.**[✉]; von Klot, C. A. J.; Wegener, G.; Heinisch, A.; Peters, I.; Herrmann, T. R. W.; Kuczyk, M. A.; Tezval, H.; Merseburger, A. S. Correlation of the Clinical Frailty Scale with Long-Term Survival after Radical Cystectomy. *JCO* **2015**, 33 (7_suppl), 314–314. https://doi.org/10.1200/jco.2015.33.7_suppl.314.

✉=presenting author

(22)

Struck, J. P.; Kramer, M. W.; Katzendorn, O.; Hupe, M. C.; Ozimek, T.; **Hennig, M. J. P.**; Wießmeyer, J. R.; von Klot, C. A. J.; Kuczyk, M. A.; Kreipe, H. H.; Merseburger, A. S.; Perner, S.; Dressler, F. F. Bicentric Retrospective Analysis of En Bloc Resection and Muscularis Mucosae Detection Rate in Non-Muscle Invasive Bladder Tumors: A Real-World Scenario. *Adv Ther* **2020**. <https://doi.org/10.1007/s12325-020-01529-1>.

(23)

Jordan, A. R.; Lokeshwar, S. D.; Lopez, L. E.; **Hennig, M.**; Chipollini, J.; Yates, T.; Hupe, M. C.; Merseburger, A. S.; Shiedlin, A.; Cerwinka, W. H.; Liu, K.; Lokeshwar, V. B. Antitumor Activity of Sulfated Hyaluronic Acid Fragments in Pre-Clinical Models of Bladder Cancer. *Oncotarget* **2017**, 8 (15), 24262–24274. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10529>.

(24)

Dogan, S.; **Hennig, M.**; Frank, T.; Struck, J. P.; Cebulla, A.; Salem, J.; Borgmann, H.; Klatte, T.; Merseburger, A. S.; Kramer, M.; Hofbauer, S. L. Acceptance of Adjuvant and Neoadjuvant Chemotherapy in Muscle-Invasive Bladder Cancer in Germany: A Survey of Current Practice. *Urol Int* **2018**, 101 (1), 25–30. <https://doi.org/10.1159/000487405>.

(25)

Lokeshwar, V. B.; Morera, D. S.; Hasanali, S. L.; Yates, T. J.; Hupe, M. C.; Knapp, J.; Lokeshwar, S. D.; Wang, J.; **Hennig, M. J. P.**; Baskar, R.; Escudero, D. O.; Racine, R. R.; Dhir, N.; Jordan, A. R.; Hoyer, K.; Azih, I.; Manoharan, M.; Klaassen, Z.; Kavuri, S.; Lopez, L. E.; Ghosh, S.; Lokeshwar, B. L. A Novel Splice Variant of HYAL-4 Drives Malignant Transformation and Predicts Outcome in Patients with Bladder Cancer. *Clin Cancer Res* **2020**, 26 (13), 3455–3467. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-2912>.

(26)

Hupe MC, Hennig MJP, Struck JP, Salem J, Merseburger AS, Kramer MW. The Lubeck medical consultation bag. *Urologe A*. (2017) May; 56(5):662-664.

<https://doi.org/10.1007/s00120-017-0372-x>.