

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Harnblasenkarzinom	1
1.1.1 Neoplasien der Harnblase	1
1.1.2 Epidemiologie des Harnblasenkarzinoms	1
1.1.3 Ätiologie des Harnblasenkarzinoms	2
1.1.4 Symptome des Harnblasenkarzinoms	3
1.1.5 Klassifikation des Harnblasenkarzinoms	3
1.1.6 Diagnostik des Harnblasenkarzinoms	5
1.2 Histologische und molekulare Subtypen des Harnblasenkarzinoms ..	6
1.2.1 Urothelkarzinom	8
1.2.1.1 Mikroskopie und Diagnostik des Urothelkarzinoms	8
1.2.1.2 Prognose des Urothelkarzinoms	9
1.2.1.3 Therapie des Urothelkarzinoms	9
1.2.2 Plattenepithelkarzinom der Harnblase	10
1.2.2.1 Plattenepithel-Metaplasie	10
1.2.2.2 Plattenepitheliales Carcinoma <i>in situ</i>	12
1.2.2.3 Pathogenese des Plattenepithelkarzinoms	13
1.2.2.4 Mikroskopie und Diagnostik des Plattenepithel-	
karzinoms	14
1.2.2.5 Prognose des Plattenepithelkarzinoms	15
1.2.2.6 Therapie des Plattenepithelkarzinoms	15
1.2.3 Urothelkarzinom mit plattenepithelialer Differenzierung	16
1.3 Molekulare Tumorgenese der Subtypen der Harnblase	17
1.3.1 Allgemeine Tumorgenese	17
1.3.2 Onkogene und Tumorsuppressorgene	17
1.3.3 Epigenetik	18
1.4 <i>Grainyhead Like Transcription Factor Familie (GRHL)</i>	22
1.4.1 Der Transkriptionsfaktor <i>GRHL1</i>	24
1.4.2 Der Transkriptionsfaktor <i>GRHL2</i>	25
1.4.3 Der Transkriptionsfaktor <i>GRHL3</i>	27

2 Zielsetzung	32
3 Material und Methoden	34
3.1 Klinische Patientenproben	34
3.1.1 Formalinfixiertes paraffineingebettetes Gewebe (FFPE)	37
3.1.2 Kryokonserviertes Gewebe	38
3.2 Geräte	39
3.3 Materialien	40
3.4 Chemikalien, Lösungsmittel und Enzyme	41
3.5 Kits	43
3.6 Puffer und Lösungen	44
3.7 Antikörper	45
3.8 Oligonukleotide	45
3.9 Zellkulturmedien	46
3.10 Humane Zelllinien	46
3.11 Vektoren	46
3.12 Medien für die Anzucht von <i>E. coli</i>	47
3.13 Software und Datenbanken	48
3.14 Molekularbiologische Methoden	49
3.14.1 RNA-Isolation aus FFPE-Material	49
3.14.2 RNA-Isolation aus Kryo-Gewebe	49
3.14.3 RNA-Isolation aus humanen Zelllinien	50
3.14.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	50
3.14.5 Reverse Transkription der RNA in cDNA	51
3.14.6 Reverse Transkription semiquantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion (RT-qPCR)	51
3.14.6.1 Schmelzkurven-Analytik	53
3.14.6.2 Berechnung der relativen Genexpression	53
3.14.6.3 Spezifisches Vorgehen	54
3.14.6.4 Agarose-Gelelektrophorese	54
3.14.7 Vektor-Transformation	55
3.14.7.1 Transformation von <i>E. coli</i>	55
3.14.7.2 Vorkultur der transformierten <i>E. coli</i>	55

3.14.7.3	Plasmid-Maxi-Präparation zur Plasmid-Isolation	56
3.14.7.4	Plasmid-Sequenzierung	56
3.15	Proteinchemische und immunologische Methoden	57
3.15.1	Herstellung von Gewebeschnitten aus FFPE-Material	57
3.15.2	Herstellung von Gewebeschnitten aus Kryo-Material	57
3.15.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Gewebeschnitten	57
3.15.4	Entparaffinierung und Methylenblau-Färbung der Gewebeschnitte	58
3.15.5	Methylenblau-Färbung von FFPE-Gewebeschnitten	58
3.15.6	Kresylviolett-Färbung von Kryo-Gewebeschnitten	59
3.15.7	Tissue microarray (TMA)-Konstruktion.....	59
3.15.8	Immunhistochemie	60
3.15.9	Immunzytologie	63
3.15.10	Herstellung von Protein-Lysaten aus humanen Zelllinien	63
3.15.11	Lithiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (LDS-PAGE)	64
3.15.12	Western Blot und Immundetektion	64
3.15.13	Zytoplasma-Kern-Fraktionierung von Proteinen <i>in vitro</i> kultivierter Zelllinien	65
3.16	Zellbiologische Methoden	66
3.16.1	Kultivierung humaner Zelllinien	66
3.16.2	Passagieren humaner Zelllinien	67
3.16.3	Kryokonservierung humaner Zelllinien	67
3.16.4	Ernte humaner Zelllinien	68
3.16.5	Transfektion humaner Zelllinien	68
3.16.5.1	Transiente Überexpression von <i>GRHL3</i>	68
3.16.5.2	G418-Konzentrationsbestimmung	69
3.16.5.3	Stabile Überexpression von <i>GRHL3</i>	70
3.16.5.4	Stabile, genetisch-veränderte Einzelzellklone mit stabiler <i>GRHL3</i> -Überexpression	71
3.17	Funktionelle <i>in vitro</i> Analysen	72
3.17.1	Zellzahl-Assay	72
3.17.2	XTT-Assay	72

3.17.3 Apoptose-Assay	73
3.17.4 Colony Formation Assay	73
3.17.5 Scratch-Assay	74
3.17.6 Boyden Chamber Assay	74
3.17.7 Adhäsions-Assay	75
3.17.8 Invasions-Assay	76
3.18 Next Generation Sequencing (NGS)	76
3.19 Statistische Methoden	77
4 Ergebnisse	78
4.1 Charakterisierung der GRHL3 mRNA-Expression in humanem Gewebe der Harnblase	78
4.1.1 <i>GRHL3</i> zeigt konträre Expressionslevel in Plattenepithel- und Urothelkarzinomen	79
4.1.2 <i>GRHL1</i> mit erhöhter Expression in plattenepithelialer Metaplasie	80
4.2 Bestätigung von Subgruppen-spezifischen Expressionsunter- schieden mithilfe eines unabhängigen TCGA-Datensatzes	83
4.3 Charakterisierung der GRHL3 Protein-Expression in der Harnblase ..	84
4.4 Vergleich von GRHL3 Protein- und mRNA-Expression	88
4.5 GRHL3-Expression beeinflusst klinisch-pathologische Parameter im Patientenkollektiv	89
4.6 Prognostischer Einfluss von GRHL3 im TCGA-Datensatz	95
4.7 Charakterisierung der funktionellen Bedeutung von GRHL3 im transienten Modell sowie im stabilen Pool mit GRHL3- Überexpression in den Zelllinien EJ28, J82 und HCV29	96
4.7.1 Transientes GRHL3-Überexpressions-Modell in den Zelllinien EJ28, J82 und HCV29	97
4.7.2 Stabiler Pool mit GRHL3-Überexpression in den Zelllinien EJ28, J82 und HCV29	99
4.7.3 Funktionelle Analysen im transienten Modell sowie im stabilen Pool mit GRHL3-Überexpression in den Zelllinien EJ28, J82 und HCV29	101
4.7.3.1 Proliferative Eigenschaften von Harnblasen- karzinomzelllinien	101

4.7.3.2	Koloniebildungsverhalten von Harnblasenkarzinomzellen	104
4.7.3.3	Migrationsverhalten von Harnblasenkarzinomzellen	106
4.8	Charakterisierung der funktionellen Bedeutung von GRHL3 in stabilen Einzelzellklonen mit GRHL3-Überexpression in den Zelllinien EJ28 und SCaBER	108
4.8.1	Stabile Einzelzellklone mit GRHL3-Überexpression in den Zelllinien EJ28 und SCaBER	108
4.8.2	Funktionelle Analysen im GRHL3-Überexpression-Modell anhand von stabilen Einzelzellklonen	109
4.8.2.1	Proliferative Eigenschaften von stabilen Einzelzellklonen mit GRHL3-Überexpression	109
4.8.2.2	Koloniebildungsverhalten von stabilen Einzelzellklonen mit GRHL3-Überexpression	114
4.8.2.3	Migrationsverhalten von stabilen Einzelzellklonen mit GRHL3-Überexpression	115
4.8.2.4	Zell-Matrix-Adhäsion von stabilen Einzelzellklonen mit GRHL3-Überexpression	119
4.8.2.5	Zellinvasion von stabilen Einzelzellklonen mit GRHL3-Überexpression	120
4.9	Next Generation Sequencing der GRHL3-Überexpressions-Einzelzellklone von EJ28 und SCaBER	121
5	Diskussion	125
5.1	Charakterisierung der Subtyp-spezifischen Expression des Subtypen Transkriptionsfaktors GRHL3 in histologischen und molekularen der Harnblase	125
5.2	Prognostische und klinische Relevanz von GRHL3 in Abhängigkeit vom histologischen Subtypen des Harnblasenkarzinoms	130
5.3	Subtyp-spezifische funktionelle Bedeutung von GRHL3 in histologischen Subtypen des Harnblasenkarzinoms	132

5.4 GRHL3-spezifische Genmuster in Next Generation Sequencing und Ausblick	137
6 Zusammenfassung	141
7 Literaturverzeichnis	142
8 Anhang	172
8.1 Tabellenverzeichnis	172
8.2 Abbildungsverzeichnis	174
8.3 Copyright	176
8.4 Publikationsliste	178
8.5 Danksagung	183
8.6 Erklärung zur Datenaufbewahrung	185
8.7 Eidesstattliche Erklärung	186
8.8 Curriculum Vitae	187