

Die Expression von CDCP1 in Urothelzellkarzinomen beeinflusst das Wachstum und die Ausbreitung des Tumors

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Sina Flottmann

aus Bonn

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Manuel Ritter
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Sebastian Strieth

Tag der Mündlichen Prüfung: 17.06.2025

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	4
1.	Deutsche Zusammenfassung	5
1.1	Einleitung	5
1.2	Material und Methoden	7
1.3	Ergebnisse	10
1.4	Diskussion	13
1.5	Zusammenfassung	14
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	15
2.	Veröffentlichungen	21
3.	Erklärung zum Eigenanteil	22
4.	Danksagung	23
5.	Publikationen (PDF-Version)	24

Abkürzungsverzeichnis

(p)AKT	(phosphorylierte) Proteinkinase B
Ba/Sq	Basal/Squamös
CDCP1	CUB domain containing protein 1
CRISPR/Cas9	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR-associated protein 9
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	Epidermal growth factor receptor
(p)ERK	(phosphorylated) extracellular signal-regulated kinases
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
IHC	Immunhistochemie
kDa	kilo Dalton
Ki67	Kiel-Antigen Nr. 67
KO	Knockout
(p)MAK/(p)MEK	(phosphorylated) Mitogen activated protein kinase
MIBC	Muscle invasive bladder cancer
PFA	Paraformalaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure
SRC	Tyrosinkinase Src
TCGA	The Cancer Genome Atlas Research Networks
TMA	Tissue Microarray
NAT	Normal adjacent tissue
qRT-PCR	Realtime-quantitative Polymerase-Kettenreaktion

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Das Harnblasenkarzinom gehört zu den häufigeren malignen Tumoren. Jährlich erkranken insgesamt etwa 30.000 Menschen in Deutschland (Robert Koch-Institut 2017). Dabei sind Männer deutlich häufiger betroffen als Frauen (Ferlay et al. 2010). Bei den meisten Harnblasenkarzinomen handelt es sich um Urothelkarzinome. Plattenepithel- und Adenokarzinome sind mit jeweils unter 5 % in Mitteleuropa hingegen selten (Fuselier et al. 1978; Kadouri et al. 2020). Klinisch kann sich das Urothelkarzinom durch eine schmerzlose Mikro- oder Makrohämaturie zeigen. Da die Krankheit häufig lange symptomlos bleibt, kommt der Untersuchung des Urins ein hoher diagnostischer Stellenwert zu (Turco et al. 2011). Zur Bestätigung der Verdachtsdiagnose ist eine bioptische Sicherung von Gewebe im Rahmen einer Zystoskopie notwendig. Die Einteilung in nicht muskelinvasive und muskelinvasive Tumore erfolgt nach der TNM-Klassifikation der Joint Commission on Cancer/International Union Cancer Consortium (O'Sullivan et al. 2017). Am häufigsten finden sich oberflächliche, nicht muskelinvasive Urothelkarzinome, die sich auf die Mukosa oder die Submukosa beschränken (T0-T1). Sobald der Tumor die Muskelschicht infiltriert, ab TNM-Stadium T2, entspricht dies einem muskelinvasiven Blasenkarzinom (MIBC) (Lee und Droller 2000). Auf einer molekularen Ebene, die in der klinischen Diagnostik bisher keine Anwendung findet, kann man das MIBC in fünf verschiedene Gruppen unterteilen: luminal-papillär, luminal-nicht spezifiziert, luminal-instabil, stroma-reich, basal-squamös (Ba/Sq) und neuroendokrin-ähnliche (Kamoun et al. 2020). Dabei ist die Unterform Ba/Sq die häufigste Untergruppe (Xylinas et al. 2013). Diese kommt insbesondere bei Frauen und in lokal und systemisch fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung vor. Die standardisierte Behandlung von muskelinvasiven Urothelkarzinomen ist die radikale Zystektomie mit vorausgehender oder anschließender platinbasierter Chemotherapie (Onkologie 2019). Der Einsatz von Immuntherapie und auch der zunehmende Einsatz von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten, wie Enfortumab Vedotin, haben zu einer Erweiterung der therapeutischen Möglichkeiten geführt (Gemeinsamer Bundesausschuss, 2022; Ghatalia und Plimack 2020). Trotz dieser zunehmenden therapeutischen Möglichkeiten ist die Prognose von Patienten mit

muskelinvasiven Urothelkarzinom mit lokaler oder Fernmetastasierung weiterhin schlecht. Eine Fernmetastasierung des Tumors verringert die 5-Jahre-Überlebensrate auf unter 10 % (Amsberg et al. 2022).

Aus diesem Grund ist eine Erweiterung des therapeutischen Arsenalts wichtig und bleibt eine zentrale Aufgabe der Forschung. Es werden weitere Angriffspunkte gesucht, die direkt oder indirekt das Wachstum von Urothelkarzinomen beeinflussen könnten.

Interessanterweise hat sich gezeigt, dass das Abzielen auf das CUB domain containing protein (CDCP1), entweder mit monoklonalen Antikörpern oder mit niedermolekularen Inhibitoren, einen wirksamen Effekt auf die Hemmung des Tumorwachstums und der Metastasierung in vivo haben kann (Nakashima et al. 2017). CDCP1, ist ein Transmembranprotein, das in einer Vielzahl von Tumoren häufig überexprimiert wird (Khan et al. 2021) und dessen Überexpression mit fortgeschrittenem Stadium, schlechterer Prognose und geringerem Therapieansprechen assoziiert ist (Alajati et al. 2015; Alajati et al. 2020). Erhöhte Konzentrationen dieses Proteins konnten in vielen untersuchten malignen Erkrankungen nachgewiesen werden. Einige Studien demonstrierten weiterhin, dass CDCP1 ein potentes Onkogen ist, und konnten zeigen, dass seine Überexpression funktionell in das Fortschreiten von Krankheiten involviert ist (Alajati et al. 2013; Alajati et al. 2015; Alajati et al. 2020; Khan et al. 2021). CDCP1 ist ein Substrat der Tyrosinkinase Src und fördert Interaktionen mit verschiedenen Tyrosinkinase-Rezeptoren, wodurch sie einen Schlüsselfaktor für nachfolgende pro-tumorale Signalwege darstellen. CDCP1 kann durch Phosphorylierung durch das SRC-Protein aktiviert werden, wodurch wichtige Signalwege für Zellmigration und Überleben in Krebszellen verstärkt werden (Casar et al. 2014; He et al. 2010; Spassov et al. 2009; Wortmann et al. 2011). Gleichermaßen beschreiben andere Studien CDCP1-Überexpression als treibende Kraft des MAPK/ERK- und AKT-abhängigen Tumorwachstums (Casar et al. 2014). Da Behandlungen mit SRC- und auch mit MAPK/ERK-Inhibitoren in der Klinik mit niedriger Toleranz in Verbindung gebracht werden (Liu et al. 2018), könnte die gezielte Beeinflussung von CDCP1 eine alternative therapeutische Option darstellen.

Ungeachtet der Vielzahl an Studien, die sich mit CDCP1 beschäftigen, berichteten bisher nur zwei Studien über einen möglichen Zusammenhang zwischen CDCP1 und Urothelkarzinomen (Yang et al. 2019; Ying et al. 2020). Von Yang et al. konnte gezeigt

werden, dass CDCP1 in den meisten Urothelkarzinom-Proben (n=33) im Vergleich zu angrenzendem tumorfreien Gewebe (NAT) vermehrt exprimiert wird. Weiterhin zeigten sie eine Verbindung zwischen CDCP1 Expression und dem fortschreitenden Wachstum von Urothelkarzinomen (Ying et al. 2020).

Ein Anliegen dieser Studie war es deswegen, anhand einer größeren Anzahl von Patientenproben zu prüfen, ob CDCP1 vermehrt in Urothelkarzinomen, insbesondere in aggressiveren Tumorformen, exprimiert wird. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf der Frage, ob eine erhöhte Expression von CDCP1 die Gesamtüberlebenszeit der Patienten beeinflussen könnte. Der funktionelle Einfluss von CDCP1 auf das Tumorstadium sowie auf die lokale und systemische Ausbreitung von Urothelkarzinomen ist bislang nur unzureichend untersucht worden und stellt einen weiteren wichtigen Aspekt dieser Arbeit dar.

1.2 Material und Methoden

Alle Versuche und Methoden sind ausführlich in der Publikation (Seite 21 ff.) beschrieben, daher wird hier das Wichtigste in Kürze dargestellt.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn (Genehmigungsnummer: 036/08 und 093/12) und der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (Zulassungsnummer: 329_16B und 97_18Bc) genehmigt. Die Studie wurde nach den Grundsätzen der Deklaration von Helsinki durchgeführt und alle Teilnehmer der Studie wurden vor der Einbindung ihrer Präparate in die Studie anonymisiert.

In der ersten Gewebe-Mikroarray (TMA)-Kohorte wurde die CDCP1-Expression von Patientenproben bestimmt, die im Rahmen von radikalen Zystektomien oder transurethralen Resektionen von Harnblasentumoren am Universitätsklinikum Bonn gesammelt wurden. Diese Proben beinhalten benignes Harnblasenurothel und Harnblasenkarzinome in unterschiedlichen Stadien der Erkrankung (pT1-pT4). Das zweite TMA setzt sich aus einer Kohorte zusammen, die Patientenproben abbildet, die unter einem muskelinvasiven Urothelkarzinom litten. Diese Patienten wurden in kurativer Absicht mittels radikaler Zystektomie und bilateraler Lymphadenektomie am Universitätskrankenhaus Erlangen therapiert.

Die immunhistochemische (IHC) Untersuchung des CDCP1 Proteins erfolgte nach einem etablierten Färbeprotokoll an der VENTANA BenchMark ULTRA autostainer (Ventana) in einer immunhistochemischen Routineeinrichtung. Die Färbungsintensivität wurde von zwei erfahrenen Uropathologen unterteilt in negativ (0), schwach (1), moderat (2) und stark (3). Negative und schwache Proben wurden als CDCP1-low eingestuft, wohingegen moderate und starke Färbungen als CDCP1-high betrachtet wurden.

Einzelzell-RNA-Sequenzierungsdaten wurden gemäß Chen et al. (2020) heruntergeladen und über deren interaktive Shiny R-Schnittstelle abgerufen. Die Analyse und Verarbeitung des Datensatzes wurden mit Seurat Version 4.1.1 unter macOS Version 12.2.1 (Monterey) durchgeführt. Die verwendeten Daten beschränkten sich auf die als „epithelial“ gekennzeichneten Zellen. Diese produzieren EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule), ein Protein, das auf der Oberfläche von Epithelzellen vorkommt. Die Visualisierung der Daten erfolgte mittels Nebulosa (Version 1.4.0) und scCustomize (Version 0.7.0). Zur Darstellung wurde die „batlow“-Farbpalette des R-Paket scico (Version 1.3.0) verwendet. Die Layout-Gestaltung der Abbildung wurde mit Adobe Illustrator Version 24.1 vorgenommen.

Log2-transformierte RSEM (RNA-Seq by Expectation Maximization) RNA-Sequenzierungsdaten (RNA-Seq v2) von CDCP1 wurden vom Cancer Genome Atlas Research Network (TCGA, <http://cancergenome.nih.gov/>) generiert. Und wurden dann für n = 408 Urothelkarzinomproben vom UCSC (University of California, Santa Cruz) Xena browser (<http://xena.ucsc.edu>) heruntergeladen. Diese Proben wurden dann nach dem Ansatz der Konsens-Subtypisierung für MIBC klassifiziert.

Für funktionelle Analysen wurden Zelllinien aus humanen Urothelkarzinomen (T24, TCCSUP und SCaBER) in RPMI1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640, Thermo Fisher Scientific) mit 10 % FCS (Fetal Calf Serum, Thermo Fisher Scientific) mit 1 % Streptomycin/Penicillin (10.000 units/ml Penicillin und 10.000 µg/ml Streptomycin; Thermo Fisher Scientific) und 1 % L-Glutamin (200 mM; Thermo Fisher Scientific) kultiviert. Zur Bildung von Spheroide wurden Zellen in 1,2 % Methylcellulose (Sigma-Aldrich) mit einer Dichte von 25×10^3 cells/mL als hängende Tropfen ausgesät und für 72 Stunden inkubiert. Der Durchmesser der gebildeten Spheroide wurde mit Image J gemessen und das Volumen der Spheroide mit der Formel $V = \frac{4}{3} \times \pi \times r^3$ berechnet.

Zur Durchführung des Migrationsassay wurden 20×10^3 Zellen auf 24-well Platten-Einsätze gesät und für 72 h inkubiert. Darauf folgte eine Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd (PFA) in einer 4 %igen Lösung. Im Anschluss wurde die innere Seite der eingesetzten Membran gewaschen, um die auf die Außenseite migrierten Zellen mit Crystal Violet färben und zählen zu können.

Für das Crystal Violet Proliferationsassay wurden Zellen in einer 96-Well-Plate ausgesät. Nach Inkubation über Nacht wurden die Zellen behandelt und für weitere drei bis sieben Tage inkubiert. Alle Bedingungen liefen in Triplikaten. Zur Färbung wurden die Zellen mit 37 % Paraformaldehyd 10 Minuten lang fixiert, dann mit destilliertem Wasser gewaschen und mit 0,05 % Crystal Violet für 30 Minuten gefärbt. Die Zellen wurden noch zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und dann bei Raumluft getrocknet. 0,1 % Essigsäure wurden pro Well hinzugefügt, um den Farbstoff zu lösen. Zum Schluss wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen. Die Mittelwerte der Triplikate wurden durch die Kontrolle an Tag 0 dividiert.

Für die Etablierung des Ex-vivo-Organoidmodells wurden einzelne Zellen von der Harnblase männlicher CDCP1pcLSL/+ Mäuse isoliert, wie bereits von Drost, J. et al. (2016) beschrieben. Die Zellen wurden mit Adenoviren, die entweder Cre oder einen Kontrollvektor exprimieren, infiziert und nach Protokoll inkubiert. Nach Suspension der Zellen mit Matrigel wurden Tropfen gebildet, denen im Verlauf Organoidmedium zugesetzt wurde. Die Organoiden wuchsen 14 Tage. Ihr Wachstum wurde definiert, indem die Höhe und die Länge und somit die ungefähre Oberfläche mit Image J gemessen wurde. Die Organoiden wurden dann gesammelt und in 4 % PFA fixiert.

Für den Western Blot wurden folgende Antikörper verwendet: CDCP1 (#4115, Cell Signaling, Danvers, MA, US), pMEK (#9154S, Cell signaling), MEK (#4694S, Cell signaling), pAKT (#9271 T, Cell signaling), AKT (#2920S, Cell Signaling) pERK (#9102S, Cell Signaling), ERK (#4377, Cell Signaling), GAPDH (#2118, Cell Signaling), β -actin (#A2228, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US). Für die IHC-Analyse Die Antikörper, die für die ICH-Analyse verwendet wurden, waren CDCP1, Ki67, p-Erk1/2, CK5 und CK14.

Die RNA der humanen Zelllinien sowie die RNA aus den TMAs wurden mit der TRIzol Methode (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) isoliert. Für die qRT-PCR wurde TB Green® Premix Ex Taq™ II (#RR82WR, TaKara, Kusatsu, Japan) auf einem Quant Studio 5 (applied biosystems, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA)

verwendet. Folgende Primer-Sequenzen wurden verwendet: CDCP1 (Invitrogen Thermo Fisher, forward *TGGTTCCACCCCAGAAATGT*, reverse *GATGATGCACAGACGTTTTAT*), GAPDH (Invitrogen Thermo Fisher Scientific, forward *CTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC*, reverse *ACGACC AAATCCGTTGACTC*).

Zur Implementierung von CDCP1 in die Zellen mittels CRISPR-Cas9-Methode wurde zunächst das doppelsträngige Oligonukleotid einer funktionalen sgRNA durch Annealing der folgenden einzelsträngigen Oligonukleotide hergestellt: hCDCP1_KO_BS, 5'-AAACccgtgggtcaggatcggaac-3'; hCDCP1_KO_TS, 5'-CACCGgttccgatcctgaccacgg-3' gewonnen. Danach folgte die Klonierung in das Plasmid pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) (#48139, Addgene, Watertown, MA, US). Das Vektorplasmid mit der enthaltenen sgRNA wurde mithilfe des Restriktionsenzym BbsI-HF (NEB, Ipswich, MA, US) verdaut und mit einer T4-DNA-Ligase (NEB, Ipswich, MA, US) ligiert. Daraufgehend wurde das px459-CDCP1-/sgRNA-Plasmid mit Lipofectamine™ 3000 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) in die Zellen transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die transfizierten Klone durch viertägige Puromycin Behandlung (0.6 µg/ mL) selektiert und mit einem polyklonalen Ansatz erweitert, um stabile Zelllinien zu erhalten.

1.3 Ergebnisse

Um die klinische Relevanz von CDCP1 in Urothelkarzinomen zu prüfen, erfolgte zunächst eine IHC-Färbung von CDCP1 auf in Paraffin eingebetteten humanen Urothelkarzinom-Proben nach dem zuvor beschriebenen Protokoll. Eine Kohorte von 147 Teilnehmern in den Stadien pT1 bis pT4 wurde untersucht und die Proben anhand ihrer Membranfärbung für CDCP1 in vier Gruppen eingeteilt (negativ, schwach, mittel, stark). Alle Gruppen mit negativer oder schwacher Färbung wurden in die Gruppe CDCP1-low eingeteilt, während mittlere und starke Färbungen als CDCP1-high eingestuft wurden (Abb. 1A, Seite 25). Die CDCP1-Expression zeigte sich im normalen Urothel oder NAT negativ oder schwach ausgeprägt. Eine große Anzahl von Urothelkarzinomen im T1- oder T2-Stadium wurden als negativ/schwach für CDCP1 (CDCP1-low) eingestuft, während 35 % von T3 und 50 % von T4 eine hohe Expression von CDCP1 aufwiesen (CDCP1-high) (Abb. 1B, Seite 25). Die Konzentrationen von CDCP1 sind in muskulär invasiven Blasenkrebsstadien (MIBC)-Stadien (T2-T4) signifikant höher als in dem nicht invasiven Stadium (T1) ($p < 0,05$,

Abb. 1C, Seite 25). Patienten mit einer hohen Expression von CDCP1 (CDCP1-high) hatten eine signifikant schlechtere Prognose im Vergleich zu Patienten mit niedriger CDCP1-Expression (CDCP1-low) ($p < 0,001$, Abb. 1D, Seite 25). Durchgeführte Western-Blot- und Real-Time-PCR- (RT-PCR) Analysen an humanen Gewebeproben zeigten einen deutlichen Anstieg der CDCP1-Expression auf Protein- und RNA-Ebene in Urothelkarzinomen im Vergleich zu NAT (Abb. 1E, Seite 25; $p < 0,01$, Abb. 1F, Seite 25).

Zusammenfassend geben diese Daten einen Hinweis darauf, dass CDCP1 in Urothelkarzinomen im Vergleich zu gesundem Gewebe überexprimiert ist und dass seine Überexpression mit kürzerer Überlebenszeit assoziiert ist.

Um weitere Erkenntnisse über die Expression von CDCP1 in Urothelkarzinomen zu gewinnen, erfolgte eine Analyse der CDCP1-Expression in zwei öffentlich zugänglichen Datensätzen aus dem TCGA. Der erste Datensatz aus humanen Gewebeproben zeigte gesteigerte Level von CDCP1 in Urothelkarzinomen im Vergleich zu deren NAT ($p < 0,0001$, Abb. 2A, Seite 26). Zudem wurde festgestellt, dass die CDCP1-Konzentration mit dem Ba/Sq-Subtyp assoziiert ist ($p < 0,0001$, Abb. 2B, Seite 26). Dies konnte mit einem zweiten Datensatz, einem Single-Cell-RNA-Sequencing von menschlichen Urothelkarzinom-Proben, bestätigt werden. Die Analyse des Datensatzes ergab, dass die Expression von CDCP1 und Markern, von denen berichtet wird, dass sie im Ba/Sq-Subtyp angereichert sind, ein hohes Maß an Ko-Lokalisierung aufweisen. Dazu gehören EGFR, Zytokeratin 5 (CK5) und Zytokeratin 14 (CK14) (Abb. 2C, Seite 26). 56 % von 184 analysierten Tumoren waren positiv für CDCP1 (Abb. 2D, Seite 26). Es zeigte sich eine Korrelation zwischen der Expression des Proteins CDCP1 und dem Ba/Sq-Subtyp (Abb. 2E, Seite 26). Der Zusammenhang mit dem Ba/Sq-Subtyp von Urothelkarzinomen wurde mit den zugehörigen Subtyp-Markern CK5 und CK14 weiter validiert ($p < 0,0001$, Abb. 2F, Seite 26). Die mRNA-Werte von CDCP1, die in dieser Kohorte die beobachteten Proteinwerte widerspiegeln ($p < 0,0001$, Abb. 2G, Seite 26) waren im Ba/Sq-Subtyp angereichert ($p < 0,0001$, Abb. 2H, Seite 26). Insgesamt zeigen diese Ergebnisse eine Assoziation von CDCP1-Expression mit dem aggressiveren Ba/Sq-Urothelkarzinom-Subtyp. In Betracht ziehend, dass bereits mehrere Studien über den Zusammenhang von CDCP1 und Therapieresistenz in Tumoren berichten, sollte herausgefunden werden, ob dieses Protein einen ähnlichen Einfluss auf MIBC zeigt. Die Gesamtüberlebenszeit von

chemotherapeutisch behandelten Patienten, deren Tumore ein hohes Level an CDCP1 exprimierten, ist verringert ($p < 0,05$, Abb. 2I, Seite 26).

Um den Effekt einer CDCP1-Überexpression zu modellieren, diente das von (Alajati et al. 2020) generierte transgene Mausmodell für CDCP1 (CDCP1pcLSL/+). Ein ex vivo 3D-Organoid-System, welches CDCP1 überexprimiert, konnte etabliert werden. Die Harnblase von acht Wochen alten männlichen Mäusen wurde entnommen und, wie bereits beschrieben, in einzelne Zellen dissoziiert. Die Harnblasenzellen wurden mit Adeno-Cre-Virus infiziert, um die Expression von CDCP1 zu induzieren. Die infizierten Zellen wurden in Matrigel ausgesät (Abb. 3A, Seite 31). Die zweiwöchige Analyse zeigte den Effekt, den die CDCP1-Expression auf das Wachstum der Mausblasenorganoide hatte. CDCP1-Überexpression führte zur Bildung von größeren und morphologisch ausgeprägteren Organoiden im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3B, Seite 31). Die Quantifizierung der Organoidfläche zeigte eine signifikante Zunahme ihrer Größe, wenn CDCP1 überexprimiert wurde ($p < 0,001$, Abb. 3C, Seite 31). Auf molekularer Ebene bestätigte die immunhistochemische Analyse die Expression von CDCP1 in den generierten Mausorganoiden (Abb. 3D, Seite 31). Organoide, die CDCP1 überexprimieren, wiesen hohe Level von Ki67 und pERK auf (Abb. 3D, Seite 31). Um die Relevanz dieser Erkenntnisse weiter zu bewerten, erfolgte ein CDCP1-Knockout (KO) in CDCP1-exprimierenden humanen Zelllinien mit der CRISP/Cas9-Methode. Zuerst wurden verschiedene Urothelkarzinom-Zelllinien auf ihre CDCP1-Expression gescreent. Western-Blot-Analysen zeigten unterschiedliche Expressionen in den getesteten Urothelkarzinom-Zelllinien. In Anbetracht der Tatsache, dass CDCP1-Expression mit dem Ba/Sq-Subtyp verbunden ist und CDCP1 in den Ba/Sq SCaBer-Zellen hochexprimiert wird, wurde in dieser Zelllinie ein KO von CDCP1 erzeugt (Abb. 3E, Seite 31). Der Verlust von CDCP1 führt in SCaBER-Zellen zu reduzierten Spiegeln von pAKT, pMEK und pERK1/2 (Abb. 3E, Seite 31). Funktionelle Analysen zeigten, dass CDCP1 Depletion sowohl die 2D- und die 3D-Proliferation ($p < 0,001$, Abb. 3F; $p < 0,05$, Abb. 3G, Seite 31), als auch die Migration in dieser Zelllinie verringert ($p < 0,001$, Abb. 3H, Seite 31). T24- und TCCSUP-Zellen, die als Non-type (Earl et al. 2015; Ertl et al. 2022) gelten, zeigten ein ähnliches Verhalten wie SCaBER-Zellen, wenn CDCP1 ausgeschaltet wurde. Die CDCP1-Depletion führte zu einer geringeren Migration. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse daraufhin, dass CDCP1-Expression die Proliferation von Urothelkarzinomen

voranbringt, während die Herunterregulierung die Proliferation und Migration von humanen Urothelkarzinom-Zelllinien reduziert.

1.4 Diskussion

Ungeachtet der Anzahl an Studien, die CDCP1 als entscheidenden Einflussfaktor bei onkologischen Vorgängen in verschiedenen Tumoren beschreiben, sind die funktionelle Rolle von CDCP1 und die klinische Relevanz in Urothelkarzinomen bisher unzureichend untersucht worden. Im Vergleich zu vorherigen Ergebnissen untersuchten wir Proben auf RNA- und Protein-Ebene und konnten einen starken Hinweis darauf geben, dass CDCP1 in Urothelkarzinomen verglichen mit NAT überexprimiert wird und dass CDCP1 mit MIBC assoziiert ist. Zudem wurde der Einfluss von erhöhter CDCP1-Expression in Urothelkarzinomen auf das Gesamtüberleben mit Kaplan-Meier-Analysen untersucht. Hier zeigte sich, dass Patienten mit hoher CDCP1-Expression eine signifikant schlechtere Gesamtüberlebenszeit haben (Abb. 1D, Seite 25).

Im zweiten Teil dieser Studie erfolgten Analysen über die klinische Relevanz von CDCP1 in zusätzlichen Kohorten und in verschiedenen Subtypen. Unsere Ergebnisse zeigen eine signifikante Anreicherung von CDCP1-Expressionen im Ba/Sq-Subtyp (Abb. 2B, 2C, 2E, 2H, Seite 26). Da berichtet wurde, dass CDCP1 mit dem epidermal growth factor receptor (EGFR) interagiert (Rebouissou et al. 2014), dessen Aktivität wiederum mit Ba/Sq-Tumoren in Urothelkarzinomen assoziiert ist (Kamoun et al. 2020) und ein Cross-Talk zwischen den beiden Proteinen bereits in anderen Tumoren (Dong et al. 2012; He et al. 2016b; Murakami et al. 2022) beschrieben wurde, sind weitere Studien notwendig, um einen potenziellen CDCP1/EGFR-Einfluss in Urothelkarzinomen zu untersuchen. Solche Studien könnten zeigen, dass eine kombinierte Therapie, die auf CDCP1 und EGFR abzielt, effektiv bei der Behandlung von Ba/Sq-Blasentumoren eingesetzt werden könnte (Chopra et al. 2023).

Ein weiterer wichtiger klinischer Aspekt, der in unserer Studie präsentiert wird, ist der Zusammenhang von CDCP1 und einer potenziellen Therapieresistenz gegen platinhaltige Chemotherapie. Diese wurde bereits für Mamma- und Ovarialkarzinome beschrieben (Khan et al. 2021; He et al. 2016a). Tatsächlich zeigte sich bei chemotherapeutisch behandelten Patienten, die hohe Spiegel von CDCP1 aufwiesen, das allgemeine

Überleben deutlich reduziert (Abb. 2I, Seite 26). Dies deutet darauf hin, dass CDCP1 an der Resistenz gegen die Erstlinien-Chemotherapie bei Urothelkarzinomen beteiligt sein könnte und gegebenenfalls einen Marker für die Empfindlichkeit von Chemotherapien darstellen könnte.

Um die onkogene Rolle von CDCP1 in Urothelkarzinomen zu bestimmen, konnte das bereits generierte Mausmodell für die Überexpression von CDCP1 in einer Cre-abhängigen Weise genutzt werden (Alajati et al. 2020). Die aus diesem Mausmodell gewonnene Überexpression von CDCP1 führte in Blasenorganoiden im Vergleich zur Kontrollgruppe zu größeren und besser definierten Organoiden (Abb. 3B, 3C, Seite 31). Diese vorläufigen Ergebnisse sprechen dafür, dass CDCP1-Überexpression Onkogenese im Blasenurothel fördern kann. Zusätzlich ermutigen diese Ergebnisse zu der Entwicklung eines blasenspezifischen CDCP1-überexprimierenden transgenen Mausmodells, um das onkogene Potenzial von CDCP1 in Urothelkarzinomen zu analysieren.

Western-Blot-Analysen konnten auf einem molekularen Level zeigen, dass die Ausschaltung von CDCP1 in SCaBER-Zellen die Phosphorylierung von MEK, ERK und AKT reduziert. Die Abhängigkeit der Aktivierung der Signalwege von MAPK/ERK und AKT von der CDCP1-Expression in SCaBER deutet darauf hin, dass dieses Protein eine entscheidende Rolle in der Progression von Urothelkarzinomen spielen könnte. In vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivierung der MAPK/ERK- und AKT-Signalwege Tumorwachstum und Krebszellmotilität fördert (Alajati et al. 2020; Casar et al. 2014). Mit SCaBER-Zellen durchgeführte funktionelle Analysen zeigen, dass die Depletion von CDCP1 die 2D- und 3D-Proliferation und die Migration der Tumorzellen verringert (Abb. 3F, 3G, 3H, Seite 31). Zusammenfassend demonstrieren diese Erkenntnisse, dass die Wachstums- und die Migrationsfähigkeit von SCaBER-Zellen von der CDCP1-Expression abhängig sind. Dies deutet darauf hin, dass Patienten, die von einem Ba/Sq-Urothelkarzinom betroffen sind, von Therapien profitieren könnten, die auf CDCP1 gerichtet sind. Weitere Studien zur Validierung der Wirksamkeit der Hemmung von CDCP1 werden dringend empfohlen.

1.5 Zusammenfassung

Das Urothelkarzinom ist eine häufige Krebserkrankung, die im fortgeschrittenen Tumorstadium eine deutlich reduzierte Prognose aufweist. Untersuchungen über

Biomarker oder Angriffspunkte für Therapien sind notwendig, um weitere Möglichkeiten zu schaffen, das Outcome dieser Patienten zu verbessern. In dieser Studie wurde das Protein CDCP1 untersucht, welches bereits in früheren Studien eine Assoziation mit Tumorprogression in anderen Organen gezeigt hat. Diese haben gezeigt, dass das Transmembranprotein CDCP1 an Prozessen wie Zellmigration, Invasion und dem Überleben von Tumorzellen beteiligt ist. Diese Erkenntnisse bilden die Grundlage der Vermutung, dass CDCP1 auch in Urothelkarzinomen einen Einfluss auf das Wachstum und die Aggressivität zeigen könnte.

Im Rahmen der Experimente wurde die klinische Relevanz von CDCP1 in zwei Urothelkarzinom-Kohorten in verschiedenen Stadien der Erkrankungen immunhistochemisch untersucht und gezeigt, dass CDCP1 in muskelinvasiven Urothelkarzinomen vermehrt exprimiert wird und signifikant mit kürzerem Gesamtüberleben korreliert. Die funktionelle Rolle der CDCP1-Überexpression wurde mithilfe von Ex-vivo-Organoiden untersucht, die vom CDCP1^{pcLSL/+} transgenen Mausmodell abgeleitet wurden. Darüber hinaus wurden mit der CRISPR/Cas9-Technologie UC-Zelllinien mit CDCP1-Knockout generiert. Die Überexpression von CDCP1 induziert die Aktivierung des MAPK/ERK-Signalwegs in Ex-Vivo-Organoiden und verstärkt deren Proliferation. In ähnlicher Weise reduziert der Knockout von CDCP1 in UC-Zelllinien deren Proliferation und Migration sowie die Aktivität des MAP/ERK-Signalwegs. Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse die Relevanz von CDCP1 in fortgeschrittenem Urothelkarzinom und weisen auf seine onkogene Rolle hin. Die Expression von CDCP1 in Urothelkarzinomen scheint einen Einfluss auf die Progressivität des Tumors zu haben. Unsere Ergebnisse unterstreichen, dass das Abzielen auf CDCP1 eine rationale therapeutische Strategie zur Behandlung von fortgeschrittenem Urothelkarzinomen sein könnte.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Alajati A, D'Ambrosio M, Troiani M, Mosole S, Pellegrini L, Chen J, Revandkar A, Bolis M, Theurillat J-P, Guccini I, Losa M, Calcinotto A, Bernardis G de, Pasquini E, D'Antuono R, Sharp A, Figueiredo I, Nava Rodrigues D, Welti J, Gil V, Yuan W, Vljajnic T, Bubendorf L,

Chiorino G, Gnetti L, Torrano V, Carracedo A, Campese L, Hirabayashi S, Canato E, Pasut G, Montopoli M, Rüschoff JH, Wild P, Moch H, Bono J de, Alimonti A. CDCP1 overexpression drives prostate cancer progression and can be targeted in vivo. *J Clin Invest* 2020; 130: 2435–2450

Alajati A, Guccini I, Pinton S, Garcia-Escudero R, Bernasocchi T, Sarti M, Montani E, Rinaldi A, Montemurro F, Catapano C, Bertoni F, Alimonti A. Interaction of CDCP1 with HER2 enhances HER2-driven tumorigenesis and promotes trastuzumab resistance in breast cancer. *Cell Rep* 2015; 11: 564–576

Alajati A, Sausgruber N, Aceto N, Duss S, Sarret S, Voshol H, Bonenfant D, Bentires-Alj M. Mammary tumor formation and metastasis evoked by a HER2 splice variant. *Cancer Res* 2013; 73: 5320–5327

Amsberg G von, Retz M, Santis M de, Niegisch G. Erstlinientherapie des metastasierten Urothelkarzinoms: ein Update. *Onkologie* 2022; 28: 792–798

Casar B, Rimann I, Kato H, Shattil SJ, Quigley JP, Deryugina EI. In vivo cleaved CDCP1 promotes early tumor dissemination via complexing with activated $\beta 1$ integrin and induction of FAK/PI3K/Akt motility signaling. *Oncogene* 2014; 33: 255–268

Chopra S, Trepka K, Sakhamuri S, Carretero-González A, Zhu J, Egusa E, Zhou J, Leung K, Zhao N, Hooshdar N, Feng FY, Wells JA, Chou J, Evans MJ. Theranostic Targeting of CUB Domain-Containing Protein 1 (CDCP1) in Multiple Subtypes of Bladder Cancer. *Clin Cancer Res* 2023; 29: 1232–1242

Chen Z, Zhou L, Liu L, Hou Y, Xiong M, Yang Y, Hu J, Chen K. Single-cell RNA sequencing highlights the role of inflammatory cancer-associated fibroblasts in bladder urothelial carcinoma. *Nat Commun* 2020; 11: 5077

Dong Y, He Y, Boer L de, Stack MS, Lumley JW, Clements JA, Hooper JD. The cell surface glycoprotein CUB domain-containing protein 1 (CDCP1) contributes to epidermal growth factor receptor-mediated cell migration. *J Biol Chem* 2012; 287: 9792–9803

Drost J, Karthaus WR, Gao D, Driehuis E, Sawyers CL, Chen Y, Clevers H. Organoid culture systems for prostate epithelial and cancer tissue. *Nat Protoc* 2016; 11: 347–358

Earl J, Rico D, Carrillo-de-Santa-Pau E, Rodríguez-Santiago B, Méndez-Pertuz M, Auer H, Gómez G, Grossman HB, Pisano DG, Schulz WA, Pérez-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

Ertl IE, Lemberger U, Ilijazi D, Hassler MR, Bruchbacher A, Brettner R, Kronabitter H, Gutmann M, Vician P, Zeitler G, Koren A, Lardeau C-H, Mohr T, Haitel A, Compérat E, Oszwald A, Wasinger G, Clozel T, Elemento O, Kubicek S, Berger W, Shariat SF. Molecular and Pharmacological Bladder Cancer Therapy Screening: Discovery of Clofarabine as a Highly Active Compound. *Eur Urol* 2022; 82: 261–270

Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127: 2893–2917

Fuselier HA, Brannan W, Ochsner MG, Matos LH. Adenocarcinoma of the bladder as seen at Ochsner Medical Institutions. *South Med J* 1978; 71: 804–806

Gemeinsamer Bundesausschuss (2022): Beschluss. Online verfügbar unter: <https://www.g-ba.de/bewertungsverfahren/nutzenbewertung/836/#beschluesse>, zuletzt geprüft am 05.12.2024.

Ghatalia P, Plimack ER. Integration of Immunotherapy Into the Treatment of Advanced Urothelial Carcinoma. *J Natl Compr Canc Netw* 2020; 18: 355–361

He Y, Wu AC, Harrington BS, Davies CM, Wallace SJ, Adams MN, Palmer JS, Roche DK, Hollier BG, Westbrook TF, Hamidi H, Konecny GE, Winterhoff B, Chetty NP, Crandon AJ, Oliveira NB, Shannon CM, Tinker AV, Gilks CB, Coward JI, Lumley JW, Perrin LC, Armes JE, Hooper JD. Elevated CDCP1 predicts poor patient outcome and mediates ovarian clear cell carcinoma by promoting tumor spheroid formation, cell migration and chemoresistance. *Oncogene* 2016; 35: 468–478

He Y, Harrington BS, Hooper JD. New crossroads for potential therapeutic intervention in cancer - intersections between CDCP1, EGFR family members and downstream signaling pathways. *Oncoscience* 2016; 3: 5–8

He Y, Wortmann A, Burke LJ, Reid JC, Adams MN, Abdul-Jabbar I, Quigley JP, Leduc R, Kirchhofer D, Hooper JD. Proteolysis-induced N-terminal ectodomain shedding of the

integral membrane glycoprotein CUB domain-containing protein 1 (CDCP1) is accompanied by tyrosine phosphorylation of its C-terminal domain and recruitment of Src and PKCdelta. *J Biol Chem* 2010; 285: 26162–26173

Kadouri Y, Boualaoui I, Lachkar S, Sayegh HE, Benslimane L, Nouini Y. Carcinome épidermoïde de la vessie: expérience rétrospective dans un hôpital universitaire marocain et revue de la littérature. *Pan Afr Med J* 2020; 37: 143

Kamoun A, Reyniès A de, Allory Y, Sjö Dahl G, Robertson AG, Seiler R, Hoadley KA, Groeneveld CS, Al-Ahmadie H, Choi W, Castro MAA, Fontugne J, Eriksson P, Mo Q, Kardos J, Zlotta A, Hartmann A, Dinney CP, Bellmunt J, Powles T, Malats N, Chan KS, Kim WY, McConkey DJ, Black PC, Dyrskjöt L, Höglund M, Lerner SP, Real FX, Radvanyi F. A Consensus Molecular Classification of Muscle-invasive Bladder Cancer. *Eur Urol* 2020; 77: 420–433

Khan T, Kryza T, Lyons NJ, He Y, Hooper JD. The CDCP1 Signaling Hub: A Target for Cancer Detection and Therapeutic Intervention. *Cancer Res* 2021; 81: 2259–2269

Lee R, Droller MJ. The natural history of bladder cancer. Implications for therapy. *Urol Clin North Am* 2000; 27: 1-13, vii

Liu F, Yang X, Geng M, Huang M. Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy. *Acta Pa Sin B* 2018; 8: 552–562

Murakami Y, Kusakabe D, Watari K, Kawahara A, Azuma K, Akiba J, Taniguchi M, Kuwano M, Ono M. AXL/CDCP1/SRC axis confers acquired resistance to osimertinib in lung cancer. *Sci Rep* 2022; 12: 8983

Nakashima K, Uekita T, Yano S, Kikuchi J-I, Nakanishi R, Sakamoto N, Fukumoto K, Nomoto A, Kawamoto K, Shibahara T, Yamaguchi H, Sakai R. Novel small molecule inhibiting CDCP1-PKCδ pathway reduces tumor metastasis and proliferation. *Cancer Sci* 2017; 108: 1049–1057

Onkologie, Leitlinienprogramm (2019): S3-Leitlinie Harnblasenkarzinom. Online verfügbar unter <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/harnblasenkarzinom>, zuletzt geprüft am 05.12.2024.

O'Sullivan B, Brierley J, Byrd D, Bosman F, Kehoe S, Kossary C, Piñeros M, van Eycken E, Weir HK, Gospodarowicz M. The TNM classification of malignant tumours-towards common understanding and reasonable expectations. *Lancet Oncol* 2017; 18: 849–851

Rebouissou S, Bernard-Pierrot I, Reyniès A de, Lepage M-L, Krucker C, Chapeaublanc E, Hérault A, Kamoun A, Caillault A, Letouzé E, Elarouci N, Neuzillet Y, Denoux Y, Molinié V, Vordos D, Laplanche A, Maillé P, Soyeux P, Ofualuka K, Reyat F, Biton A, Sibony M, Paoletti X, Southgate J, Benhamou S, Lebreton 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: 244ra91

Robert Koch-Institut (2017): Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Online verfügbar unter:

https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Harnblasenkrebs/harnblasenkrebs_node.html, zuletzt geprüft am 05.12.2024

Spasov DS, Baehner FL, Wong CH, McDonough S, Moasser MM. The transmembrane src substrate Trask is an epithelial protein that signals during anchorage deprivation. *Am J Pathol* 2009; 174: 1756–1765

Turco P, Houssami N, Bulgaresi P, Troni GM, Galanti L, Cariaggi MP, Cifarelli P, Crocetti E, Ciatto S. Is conventional urinary cytology still reliable for diagnosis of primary bladder carcinoma? Accuracy based on data linkage of a consecutive clinical series and cancer registry. *Acta Cytol* 2011; 55: 193–196

Wortmann A, He Y, Christensen ME, Linn M, Lumley JW, Pollock PM, Waterhouse NJ, Hooper JD. Cellular settings mediating Src Substrate switching between focal adhesion kinase tyrosine 861 and CUB-domain-containing protein 1 (CDCP1) tyrosine 734. *J Biol Chem* 2011; 286: 42303–42315

Xylinas E, Rink M, Robinson BD, Lotan Y, Babjuk M, Brisuda A, Green DA, Kluth LA, Pycha A, Fradet Y, Faison T, Lee RK, Karakiewicz PI, Zerbib M, Scherr DS, Shariat SF. Impact of histological variants on oncological outcomes of patients with urothelial carcinoma of the bladder treated with radical cystectomy. *Eur J Cancer* 2013; 49: 1889–1897

Yang F, Jin H, Que B, Chao Y, Zhang H, Ying X, Zhou Z, Yuan Z, Su J, Wu B, Zhang W, Qi D, Chen D, Min W, Lin S, Ji W. Dynamic m6A mRNA methylation reveals the role of METTL3-m6A-CDCP1 signaling axis in chemical carcinogenesis. *Oncogene* 2019; 38: 4755–4772

Ying X, Jiang X, Zhang H, Liu B, Huang Y, Zhu X, Qi D, Yuan G, Luo J, Ji W. Programmable N6-methyladenosine modification of CDMP1 mRNA by RCas9-methyltransferase like 3 conjugates promotes bladder cancer development. *Mol Cancer* 2020; 19: 169

2. Veröffentlichungen

Dieser Publikationsdissertation liegt die folgende, unabhängig begutachtete Veröffentlichung zugrunde:

Saponaro M, Flottmann S, Eckstein M, Hommerding O, Klümper N, Corvino D, Hosni S, Schmidt A, Mönig N, Schmidt D, Ellinger J, Toma M, Kristiansen G, Bald T, Alimonti A, Ritter M, Hölzel M, Alajati A. CDCP1 expression is frequently increased in aggressive urothelial carcinoma and promotes urothelial tumor progression. Scientific reports 2023; 13: 73

<https://doi.org/10.1038/s41598-022-26579-z>

3. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik und Poliklinik für Urologie unter Betreuung von Prof. Dr. med. Manuel Ritter durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch mich in Zusammenarbeit mit meinem Betreuer Dr. rer. nat. Abdullah Alajati (Laborleitung) und Miriam Saponaro.

Die Experimente und die Auswertung dieser wurden von Miriam Saponaro und mir im gleichen Anteil durchgeführt. Die Ergebnisse wurden gemeinsam mit Miriam Saponaro und Dr. rer. nat. Abdullah Alajati interpretiert und diskutiert.

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

4. Danksagung

Ich danke meinem Betreuer Dr. rer. nat Abdullah Alajati und meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Manuel Ritter für die Möglichkeit der Durchführung dieser Doktorarbeit.

Bedanken möchte ich mich beim gesamten Laborteam der Urologie: Anja, Doris, Sana, Viola, Ngoc, Julia, Niklas, Nicolas, ohne euch wäre es nicht möglich gewesen ein ganzes Jahr im Labor zu arbeiten. Vielen Dank für eure Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank geht an Miriam. Ich bin sehr dankbar dafür, dass du nach Deutschland gekommen bist.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und bei meinen Freunden bedanken.

5. Publikationen (PDF-Version)

www.nature.com/scientificreports

scientific reports



OPEN

CDCP1 expression is frequently increased in aggressive urothelial carcinoma and promotes urothelial tumor progression

Miriam Saponaro^{1,6}, Sina Flottmann^{1,6}, Markus Eckstein², Oliver Hommerding³, Niklas Klümper^{1,4}, Dillon Corvino⁴, Sana Hosni¹, Anja Schmidt¹, Nicolas Mönig¹, Doris Schmidt¹, Jörg Ellinger¹, Marieta Toma³, Glen Kristiansen³, Tobias Bald⁴, Andrea Alimonti⁵, Manuel Ritter¹, Michael Hölzel⁴ & Abdullah Alajati¹✉

The prognosis of patients with advanced urothelial carcinoma (UC) remains poor and improving treatment continues to be a major medical need. CUB domain containing protein 1 (CDCP1) is a known oncogene in various types of solid cancers and its overexpression is associated with impaired prognosis. However, its role in UC remains undetermined. Here we assessed the clinical relevance of CDCP1 in two cohorts of UC at different stages of the disease. Immunohistochemistry showed that CDCP1 is highly expressed in advanced UC, which significantly correlates with shorter overall survival. Importantly, the basal/squamous UC subtype showed significantly enriched CDCP1 at the mRNA and protein levels. The functional role of CDCP1 overexpression was assessed taking advantage of ex vivo organoids derived from the CDCP1^{pCLSL/+} transgenic mouse model. Furthermore, CDCP1 knockout UC cell lines were generated using CRISPR/Cas9 technology. Interestingly, CDCP1 overexpression significantly induced the activation of MAPK/ERK pathways in ex vivo organoids and increased their proliferation. Similarly, CDCP1 knockout in UC cell lines reduced their proliferation and migration, concomitant with MAPK/ERK pathway activity reduction. Our results highlight the relevance of CDCP1 in advanced UC and demonstrate its oncogenic role, suggesting that targeting CDCP1 could be a rational therapeutic strategy for the treatment of advanced UC.

The standard treatment for advanced urothelial cancer (UC) is radical cystectomy preceded or followed by platinum-based chemotherapy¹. The advent of immunotherapy and, more recently, the use of antibody–drug conjugates (ADC) has broadened the therapeutic armamentarium². However, the prognosis of patients with advanced UC remains poor and effective treatment remains a major medical need. CUB domain containing protein 1 (CDCP1), also known as SIMA135³, gp140⁴, CD318⁵, or Trask⁴, is a transmembrane protein that is frequently overexpressed in a variety of human cancers⁶. In the cell membrane, CDCP1 exists in two forms as the 135 kDa full-length (FL) protein can be cleaved by serine proteases at arginine-368 and lysine-369. Its proteolysis results in the formation of a soluble 65 kDa fragment and a membrane-spanning fragment of 70 kDa⁷. Both the cleaved (C) and FL forms act as substrates for Src, promoting interactions with several receptor tyrosine kinases (RTKs) thereby representing a key factor for pro-tumoral downstream signaling^{7–10}. Accordingly, several studies demonstrated that CDCP1 is a potent oncogene and suggest that its overexpression is functionally involved in disease progression^{6,11–13}. Indeed, elevated levels of this protein are associated with more advanced stages, poorer prognoses, and/or therapy responses in all studied malignancies^{11,12,14–24}. Our recent study carried out on a novel spontaneous mouse model of prostate cancer showed that CDCP1 promotes progression and metastasis through the upregulation of MAPK/ERK and AKT pathways¹². Similarly, other studies describe CDCP1 overexpression as a driver of MAPK/ERK- and AKT-dependent tumor progression^{8,11}. Interestingly, CDCP1 targeting, either

¹Department of Urology and Pediatric Urology, University Medical Center Bonn (UKB), Venusberg-Campus 1, 53127 Bonn, Germany. ²Institute of Pathology, University Hospital Erlangen, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (FAU), Erlangen, Germany. ³Institute of Pathology, University Medical Center Bonn (UKB), Bonn, Germany. ⁴Institute of Experimental Oncology, University Medical Center Bonn (UKB), Bonn, Germany. ⁵Institute of Oncology Research, Università Della Svizzera Italiana, Bellinzona, Switzerland. ⁶These authors contributed equally: Miriam Saponaro and Sina Flottmann. ✉email: abdullah.alajati@ukbonn.de

with monoclonal antibodies or small molecule inhibitors, has demonstrated effectiveness in inhibiting tumor growth and metastasis *in vivo*²⁵. Moreover, a recent study identified CDCP1 as a suitable target for CAR T-cell-based immunotherapy in pancreatic cancer²⁶. Since treatments with either SRC or MAPK/ERK inhibitors have been associated with poor tolerability in the clinic²⁷, CDCP1 targeting could represent an excellent alternative therapeutic option. However, to the best of our knowledge, the role of CDCP1 in UC has not been well described, and more studies to assess it are needed²⁸.

Results

UC exhibits an elevated expression of CDCP1, which correlates with shorter overall survival in UC patients. To assess the clinical relevance of CDCP1 in UC, we first performed immunohistochemistry (IHC) staining of human CDCP1 on paraffin-embedded human bladder cancer samples based on the previously described protocol¹². We examined a cohort of 147 specimens spanning from T1 to T4 stages (Table 1)^{29,30} and stratified samples based on their membrane staining for CDCP1 into four groups (negative, weak, moderate and strong). All groups with negative or weak staining intensity were classified as CDCP1-low, while moderate and strong groups were classified as CDCP1-high (Fig. 1A). In line with previous results^{28,31}, CDCP1 expression was negatively or weakly expressed in normal urothelium or normal adjacent tissue (NAT) (Supplementary Fig. 1). A large portion of urothelial tumors at T1 and T2 stages were classified as negative/weak for CDCP1 (CDCP1-low), while the 35% of T3 and 50% of T4 showed high expression levels of CDCP1 (CDCP1-high) (Fig. 1B). Of note, levels of CDCP1 in muscular invasive bladder cancer (MIBC) stages (T2-T4) are significantly higher than in the non-invasive stage (T1) (Fig. 1C). Most importantly, patients with CDCP1-high expression showed a significant poorer outcome compared to patients with CDCP1-low expression levels (Log Rank mantel cox test $P < 0.0001$) (Fig. 1D). In parallel, we performed western blot and real-time PCR (RT-PCR) analyses ($n = 10$ and $n = 107$ respectively) on additional UC frozen samples and the corresponding NAT. These analyses demonstrated a robust increase of CDCP1 expression at protein and RNA levels in UC when compared to NAT (Fig. 1E,F). Taken together, these data showed that CDCP1 is overexpressed in UC compared to normal tissues, and its overexpression is associated with advanced UC and shorter overall survival (OS).

CDCP1 expression is elevated in advanced UC and enriched in Ba/Sq subtype. To gain further insights about the expression of CDCP1 in UC, we analyzed CDCP1 expression in two publically available data sets. The first, consisting of 405 tissue specimens of bladder cancer from the cancer genome atlas (TCGA), was classified according to the consensus subtyping approach of muscle-invasive urothelial bladder cancer (MIBC)³². In line with our previous results, we observed elevated levels of CDCP1 in UC compared to its NAT (Fig. 2A). Importantly, we found that CDCP1 levels were strongly associated with the Ba/Sq subtype (Fig. 2B). This was confirmed using a second data set, a single-cell-RNA-sequencing (scRNAseq) of human UC samples³³. Indeed, analysis of this dataset for cells annotated as epithelial origin revealed that expression of CDCP1 and that of markers reported to be enriched in the Ba/Sq subtype, such as EGFR, KRT5 (CK5) and KRT14 (CK14), have a high degree of co-localization (Fig. 2C). Thereafter, we performed IHC of CDCP1 on a well-established prospectively recruited consecutive cohort of MIBC patients treated with radical cystectomy and adjuvant chemotherapy as previously described (Table 2)³². The multivariate analysis on this cohort demonstrated that CDCP1 is not an independent variable for the prediction of patients' prognosis (Table 3). However, out of 184 analyzed tumors 56% were positive for CDCP1 (Fig. 2D) and we found a strong association between CDCP1 protein expression and the Ba/Sq subtype (Fig. 2E). This association with the Ba/Sq subtype of UC was further validated using the Ba/Sq subtype markers CK5 and CK14³² (Fig. 2F). Of note, the mRNA levels of CDCP1 reflected the protein levels observed in this cohort (Fig. 2G) and were enriched in the Ba/Sq subtype (Kruskal Wallis: $P < 0.0001$) (Fig. 2H). Together, these results confirm the association of CDCP1 expression with the aggressive Ba/Sq UC subtype. Moreover, considering that several studies have already reported the association of CDCP1 with therapy resistance⁶, we questioned whether this protein has the same impact on MIBC. The OS of chemotreated patients expressing high CDCP1 levels is clearly reduced (Fig. 2I), suggesting that CDCP1 may be a suitable marker for chemotherapy sensitivity and targeting CDCP1 could serve as a novel therapeutic strategy to treat resistant patients.

Transgenic overexpression of CDCP1 induces proliferation in ex vivo mouse organoids and its knockout inhibits proliferation and migration of UC cells. To model the effect of CDCP1 overexpression in UC, we exploited the previously generated transgenic mouse model for CDCP1 (CDCP1^{pCLSL/+}) and established an ex vivo 3D organoids system that overexpresses CDCP1¹². Briefly, the bladder of 8 weeks old male CDCP1^{pCLSL/+} mice was excised and dissociated into single cells, as previously described³³. Bladder cells were infected with an adeno-Cre virus to induce the expression of CDCP1 and seeded in Matrigel (Fig. 3A). We examined the effect of CDCP1 expression on the growth of bladder mouse organoids over two weeks. CDCP1 overexpression resulted in the formation of larger and morphologically distinctive organoids compared to the controls (Fig. 3B). Quantification of the organoids area revealed a significant increase in their size when CDCP1 is overexpressed compared to the controls (Fig. 3C). At the molecular level, IHC analysis on mouse organoids confirmed the expression of CDCP1 (Fig. 3D). Importantly, CDCP1 overexpressing organoids expressed high levels of Ki67 and pERK (Fig. 3D). To further assess the relevance of these findings in human UC, we aimed to perform CDCP1 knockout (KO) in CDCP1 expressing cells with the CRISPR/Cas9 method. Firstly, we screened several UC cell lines for their CDCP1 expression. Western blot analysis indicated variable expression of CDCP1 among the tested UC cell lines (Supplementary Fig. 2A). Given the fact that CDCP1 expression was associated with Ba/Sq subtype and it is highly expressed in the Ba/Sq ScaBER cells, we generated KO of CDCP1 in this cell line (Fig. 3E). Interestingly, loss of CDCP1 in ScaBER cells reduced pAKT, pMEK and pERK1/2 levels (Fig. 3E).

Age		
Average (range)	68 (38; 94)	
Sex	N	% of total
Female	46	25.7%
Male	132	74.3%
Primary tumor (location)	N	% of total
Control	31	19.0%
BCa	136	81.0%
Tumor stage	N	% of total
Control	31	–
min.pT1	38	26.0%
min.pT2	40	27.0%
min.pT3	45	31.0%
min.pT4	24	16.0%
Tumor type	N	% of total
Control	31	–
Non-muscle invasive (NMIBC)	38	26.0%
Muscle invasive (MIBC)	109	74.0%
Survival time (months)		
Median (range)	50 (1; 283)	
CDCP1 level	N	% of total
Low	115	78.3%
High	32	21.7%

Table 1. Characterization of cohort 1.

and supplementary Fig. 2B). Functional analyses showed that CDCP1 depletion reduced both 2D and 3D proliferation (Fig. 3F,G) and migration in this cell line (Fig. 3H). Interestingly, T24 and TCCSUP cells, which are considered non-type^{34,35}, showed a similar behavior to SCAER when knocked out for CDCP1, with the exception for the 2D proliferation (Supplementary Fig. 2C–F). Collectively, these results demonstrate that CDCP1 expression promotes UC proliferation, while its downregulation reduces proliferation and migration of UC cell lines.

Discussion

Despite the preponderance of studies identifying CDCP1 as a key contributor to oncogenic events in several cancers⁶, the functional role of CDCP1 and its clinical relevance in UC remains poorly characterized. Only two previous studies from the same laboratory indicate its involvement in BCa^{28,31}. Yang et al. showed that N6-methyladenosine modified the mRNA levels of CDCP1 in response to chemical carcinogens, which promoted CDCP1 translation. The same group also showed that CDCP1 is moderately or highly expressed in most of the BCa samples (n = 33) when compared to para-tumor controls and correlated CDCP1 expression with BCa progression³¹. In line with these results, the first part of our study demonstrated that CDCP1 is overexpressed in UC when compared to NAT and is associated with MIBC. Moreover, the impact of elevated CDCP1 expression in UC was investigated by Kaplan–Meier analysis, which indicated that patients expressing high levels of CDCP1 have significantly poorer OS (Fig. 1D).

In the second part of this study, we further explored the clinical relevance of CDCP1 in UC. Indeed, our results obtained from three different data sets, showed significant enrichment of CDCP1 expression in the Ba/Sq subtype (Fig. 2B,C,E,H). Since CDCP1 is reported to interact with the epidermal growth factor receptor (EGFR)³⁶, whose activity is also associated with Ba/Sq tumors in BCa^{37,38}, and a cross-talk between these two proteins is already described in other tumor types^{39–41}, further studies investigating the potential CDCP1/EGFR cross-talk are needed. Such studies may show that a combinational therapy targeting CDCP1 and EGFR may be effective for the treatment of Ba/Sq bladder tumors.

Another important clinical aspect presented by our study is the association of CDCP1 with therapy resistance, which has been reported in breast and ovarian cancers^{6,11,18}. Indeed, the OS of chemotherapy-treated patients expressing high CDCP1 levels was clearly reduced, supporting the hypothesis that CDCP1 is involved in resistance to first-line chemotherapy in UC.

To determine the oncogenic role of CDCP1 in UC, we took advantage of the previously generated mouse model for CDCP1 overexpression in a Cre-dependent manner¹². Remarkably, CDCP1 overexpression in bladder organoids obtained from this mouse model resulted in larger and well-defined organoids compared to the control groups (Fig. 3B,C). These preliminary results suggest that CDCP1 overexpression may support oncogenesis in bladder urothelium. Additionally, these results encourage the development of a bladder-specific CDCP1-overexpressing transgenic mouse model to further analyze the oncogenic potential of CDCP1 in UC.

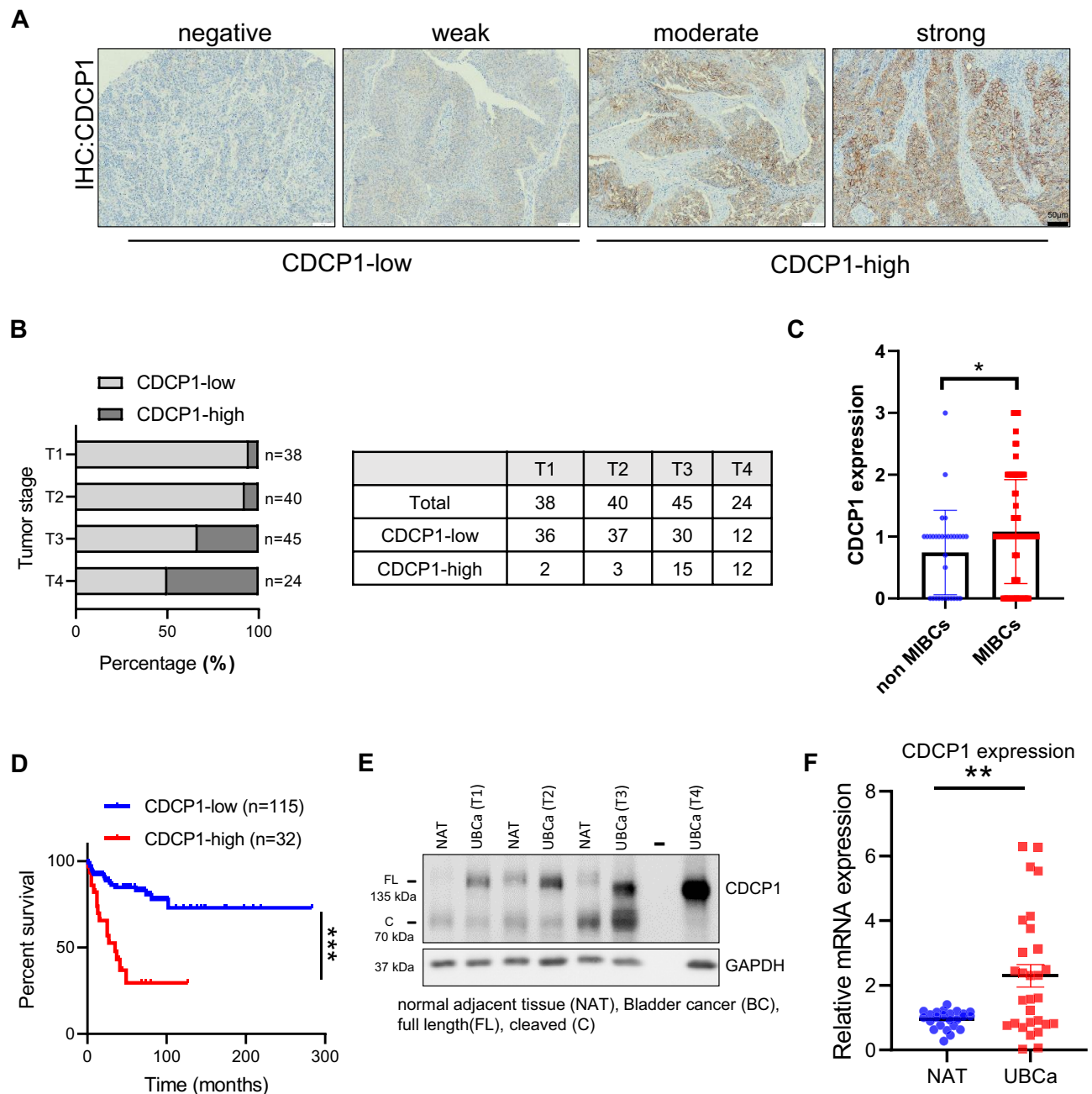


Figure 1. UC exhibits elevated expression of CDCP1, which correlates with shorter overall survival in UC patients. **(A)** Representative images of CDCP1-low and CDCP1-high tumors. **(B)** Percentage of patients expressing low and high CDCP1 levels, divided by the tumor stage (T1, T2, T3, T4). The table indicates the relative number of patients, which express low and high CDCP1 divided per tumor stage. **(C)** Column bar graph comparing the expression of CDCP1 in NMIBC (T1) and MIBC (T2–T4). Error bars indicate SD. * $P < 0.05$. Statistical test: two-tailed unpaired t test. **(D)** Kaplan–Meier survival analysis of UC patients stratified based on the semi-quantitative expression of CDCP1 (CDCP1-low: negative, weak; CDCP1-high: moderate, strong). *** $P < 0.001$. Statistical test: log-rank test. **(E)** Western blot analysis of CDCP1 and GAPDH expression on representative tumor samples from patients presenting lesions at different stages (T1, T2, T3 and T4). CDCP1 tumor expression is compared with its expression in the NAT from the same patients. **(F)** Comparison between the expression of CDCP1 in UC samples and NAT at the transcriptional level. Expression was quantified via real-time quantitative PCR, and normalized to GAPDH. Error bars indicate SD. ** $P < 0.01$. Statistical test: two-tailed unpaired t test.

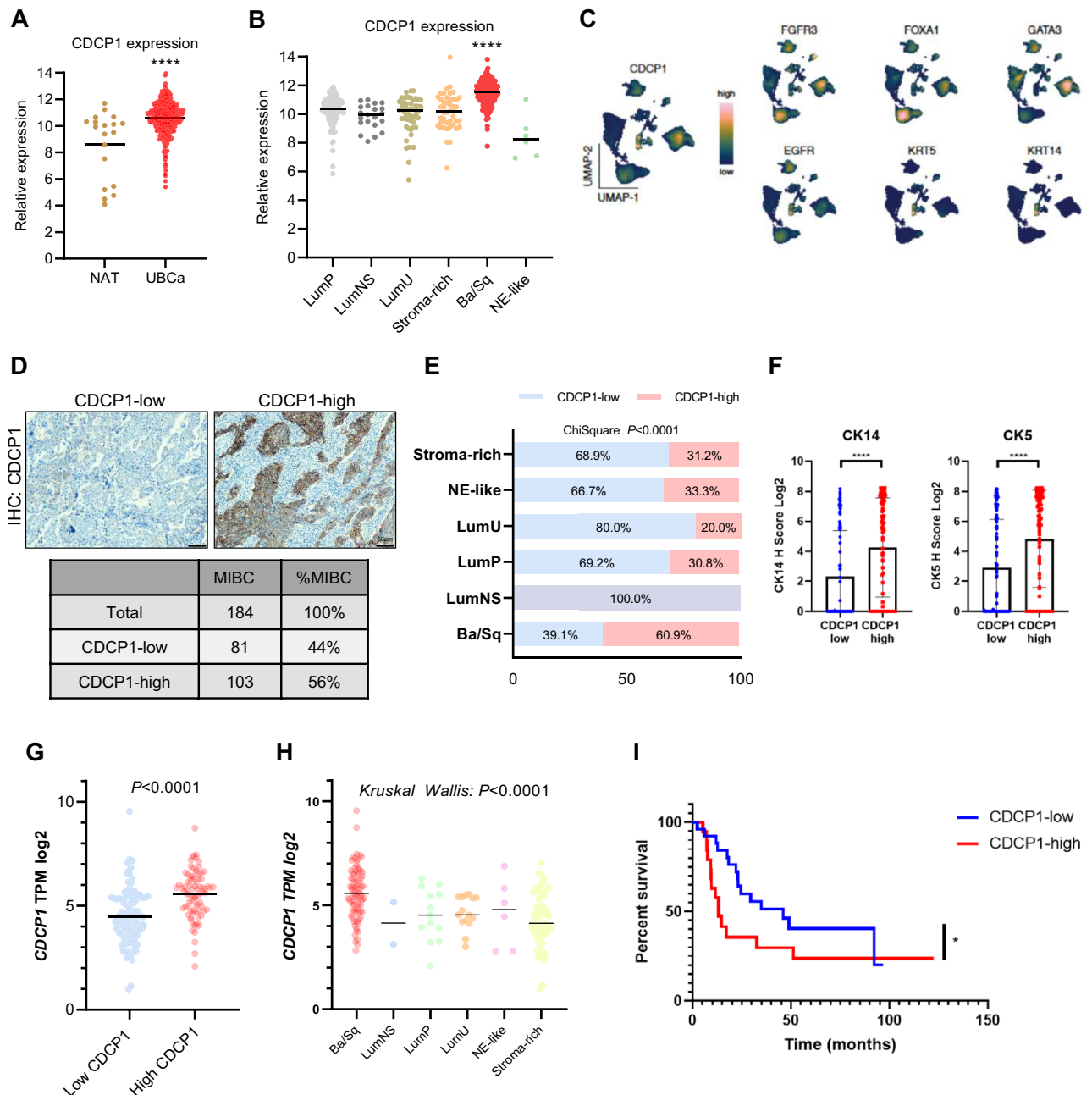


Figure 2. CDCP1 expression is elevated in advanced UC and enriched in Ba/Sq subtype. **(A)** Expressional levels of CDCP1 in UC tissue compared to NAT. Data obtained from the TCGA BLCA data set. **** $P < 0.0001$. Statistical test: two-tailed unpaired t test. **(B)** Comparison of CDCP1 levels between the UC molecular subtypes from TCGA BLCA data set. **** $P < 0.0001$. Statistical test: one-way analysis of variance. **(C)** Visualization via scRNAseq analysis of the expressional levels of CDCP1, and different Lu subtype molecular markers (FGFR3, FOXA1, GATA3) and Ba/Sq subtype molecular markers (EGFR, KRT5, KRT14) in the UC cohort from Chen et al., 2020. **(D)** Representative images of tumors from the MIBC TMA showing tumors with CDCP1-low and CDCP1-high. Table showing the total number of MIBC tumors, CDCP1-low and CDCP1-high. **(E)** Percentage of tumors from the MIBC TMA which show a low or high CDCP1 expression, clustered on the base of the UC subtype. **(F)** Bar graphs indicating the expression of CK5 and CK14 in CDCP1-high tumors compared to CDCP1-low tumors. The expression is evaluated by IHC in the MIBC TMA. Error bars indicate SD. **** $P < 0.0001$. Statistical test: two-tailed unpaired t test. **(G)** Transcriptional expression of CDCP1 (TPM: transcripts per million reads) compared to CDCP1-low and CDCP1-high levels in the MIBC TMA confirming the correlation between CDCP1 transcripts and protein levels. **(H)** CDCP1 TPM across the UC subtypes showing the high expression of CDCP1 in the Ba/Sq subtype. Tumor samples are correspondent to the ones from the MIBC TMA. **(I)** Kaplan–Meier survival analysis of UC patients treated with chemotherapy stratified based on the semi-quantitative expression of CDCP1 (CDCP1-low: negative, weak; CDCP1-high: moderate, strong). * $P < 0.05$. Statistical test: Gehan–Breslow–Wilcoxon test.

Age (years)		
Average (range)	68,7 (37; 91)	
Sex	N	% of total
Female	46	25.0%
Male	138	75.0%
Primary tumor (location)	N	% of total
BCa	184	100.0%
Grading 2004/2016	N	% of total
High grade	184	100.0%
Grading 1973	N	% of total
G2	5	3.0%
G3	179	97.0%
Initial tumor stage	N	% of total
pT2	53	29.0%
pT3	88	48.0%
pT4	43	23.0%
pN-stage	N	% of total
NX	13	7.0%
pN0	118	64.0%
pN1	19	10.0%
pN2	34	18.0%
Adjuvant chemotherapy	N	% of total
No	139	76.0%
Yes	45	24.0%
Survival time (months)		
Average (range)	37 (0; 153,33)	
CDCP1 level	N	% of total
Low	81	44.0%
High	103	56.0%
Molecular variant	N	% of total
Ba/Sq	87	47.0%
LumNS	2	1.0%
LumP	13	7.0%
LumU	15	8.0%
NE-like	6	3.0%
Stroma-rich	61	33.0%

Table 2. Characterization of cohort 2.

At the molecular level, we showed that CDCP1 depletion reduced MEK, ERK and AKT phosphorylation in western blot analyses on SCaBER cells knocked out for CDCP1. The reliance of MAPK/ERK and AKT pathways activation on CDCP1 expression in SCaBER suggests that this protein may play a crucial role in UC progression. Indeed, it was previously reported that the activation of MAPK/ERK and AKT pathways increased tumor growth and cancer cells motility^{8,12}. Functional analysis performed with SCaBER cells showed that CDCP1 depletion reduced their 2D and 3D proliferation and migration (Fig. 3F,G,H). Altogether, these findings demonstrate that the growth and migration abilities of SCaBER cells rely on CDCP1 expression, suggesting that Ba/Sq UC patients could benefit from CDCP1-targeting therapies. Therefore, further studies validating the efficacy of CDCP1 inhibition are clearly encouraged.

Materials and methods

Patient cohort and case report. The study was approved by the ethical review board of the Medical Faculty of the University of Bonn (approval number: 036/08 and 093/12) and the Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nürnberg (approval number: 329_16B and 97_18Bc). The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki. The study participants were anonymized before their specimens were included in the study cohort. Informed consent was obtained for all the participants. In the first TMA, CDCP1 expression was assessed from patient samples obtained via radical cystectomy or transurethral resection and provided by the University Hospital of Bonn, including benign bladder urothelium and BCa with different stages of disease (T1-T4) as previously described (Table 1)^{29,30}. In the second TMA, CDCP1 expression was assessed in a well-characterized prospective homogenous MIBC cohort treated by radical cystectomy in conjunction with bilateral lymphadenectomy in curative intent at the Department of Urology of the University Hospital of Erlangen³².

Cox proportional hazards fit				
Censor: disease specific survival censor				
Effect summary				
Source	LogWorth		P value	
pN-stage summary	2.798	++++++	0.00159	
pT-stage summary	1.64	++++	0.02293	
L	0.908	++	0.12351	
Resection margin	0.888	++	0.12938	
Age	0.782	++	0.1653	
Histology summary	0.771	++	0.16948	
Gender	0.217	+	0.60618	
CDCP1 low vs. high	0.148		0.71175	
V	0.007		0.98386	
WHO 2016 grading	–	–	–	
Whole model				
Number of events	95			
Number of censorings	89			
Total number	184			
AICc	BIC			
858.166	903.533			
Model	–LogLikelihood	ChiSquare	DF	Prob > Chisq
Difference	34.3554	68.7108	15	0
Full	412.6543			
Reduced	447.0097			
Parameter estimates				
Term	Estimate	Std error	Lower 95%	Upper 95%
CDCP1 low vs. high [low]	0.043	0.117	–0.18	0.28
pT-stage summary [pT2]	–0.55	0.228	–1.02	–0.11
pT-stage summary [pT3]	0.057	0.153	–0.24	0.36
pN-stage summary [pN+]	0.047	0.178	–0.3	0.4
pN-stage summary [pN0]	–0.677	0.187	–1.04	–0.31
Gender [female]	0.063	0.122	–0.18	0.3
Age	0.013	0.01	–0.01	0.03
Resection margin [R1-R0]	0.29	0.281	–0.28	0.82
Resection margin [RX-R1]	2.301	1.098	–0.66	4.1
L[1-0]	0.433	0.283	–0.12	1
V[1-0]	0.005	0.252	–0.5	0.49
Variant summary [neuroendocrine]	1.258	0.512	0.08	2.15
Variant summary [urothelial-NOS]	–0.505	0.209	–0.91	–0.08
Variant summary [urothelial-sarcomatoid/rhabdoid]	–0.022	0.286	–0.61	0.53
Variant summary [urothelial-squamous]	–0.371	0.253	–0.87	0.12
Effect Wald tests				
Source	Nparm	DF	Wald ChiSquare	Prob > ChiSq
CDCP1 low vs. high	1	1	0.14	0.712
pT-stage summary	2	2	7.49	0.024
pN-stage summary	2	2	13.24	0.001
Gender	1	1	0.27	0.604
Age	1	1	1.89	0.169
Resection margin	2	2	6.48	0.039
WHO 2016 grading	0	0	0	
L	1	1	2.34	0.126
V	1	1	0	0.984
Variant summary	4	4	8.54	0.074
Continued				

Source	Nparm	DF	Wald ChiSquare	Prob > ChiSq	
Risk ratios					
Unit risk ratios					
Per unit change in regressor					
Term	Risk ratio	Lower 95%	Upper 95%	Reciprocal	
Age	1.01	0.99	1.03	0.9867414	
Range risk ratios					
Per change in regressor over entire range					
Term	Risk ratio	Lower 95%	Upper 95%	Reciprocal	
Age	2.06	0.75	5.86	0.4863856	
Risk ratios for CDCP1 low vs. high					
Level1	/Level2	Risk ratio	Prob > Chisq	Lower 95%	Upper 95%
High	Low	0.92	0.712	0.58	1.45
Low	High	1.09	0.712	0.69	1.74
Risk ratios for pT-stage summary					
Level1	/Level2	Risk ratio	Prob > Chisq	Lower 95%	Upper 95%
pT3	pT2	1.84	0.069	0.96	3.69
pT4	pT2	2.83	0.006	1.34	6.16
pT4	pT3	1.54	0.087	0.94	2.52
pT2	pT3	0.54	0.069	0.27	1.05
pT2	pT4	0.35	0.006	0.16	0.75
pT3	pT4	0.65	0.087	0.4	1.07
Risk ratios for pN-stage summary					
Level1	/Level2	Risk ratio	Prob > Chisq	Lower 95%	Upper 95%
pN0	pN+	0.48	0.009	0.28	0.83
pNX	pN+	1.79	0.131	0.83	3.66
pNX	pN0	3.7	0.002	1.68	7.76
pN+	pN0	2.06	0.009	1.2	3.56
pN+	pNX	0.56	0.131	0.27	1.2
pN0	pNX	0.27	0.002	0.13	0.6
Risk ratios for gender					
Level1	/Level2	Risk ratio	Prob > Chisq	Lower 95%	Upper 95%
Male	female	0.88	0.606	0.55	1.44
Female	Male	1.14	0.606	0.69	1.82
Risk ratios for resection margin					
Level1	/Level2	Risk ratio	Prob > Chisq	Lower 95%	Upper 95%
R1	R0	1.34	0.312	0.75	2.28
RX	R0	13.34	0.074	0.7	76.53
RX	R1	9.98	0.104	0.52	60.06
R0	R1	0.75	0.312	0.44	1.33
R0	RX	0.07	0.074	0.01	1.42
R1	RX	0.1	0.104	0.02	1.93
Risk ratios for L					
Level1	/Level2	Risk ratio	Prob > Chisq	Lower 95%	Upper 95%
1	0	1.54	0.124	0.89	2.71
0	1	0.65	0.124	0.37	1.12
Risk ratios for V					
Level1	/Level2	Risk ratio	Prob>Chisq	Lower 95%	Upper 95%
1	0	1.01	0.984	0.61	1.64
0	1	0.99	0.984	0.61	1.64
Risk ratios for variant summary					
Level1	/Level2	Risk ratio	Prob>Chisq	Lower 95%	Upper 95%
Urothelial-NOS	Neuroendocrine	0.17	0.024	0.05	0.61
Urothelial-sarcomatoid/ rhabdoid	Neuroendocrine	0.28	0.1	0.07	1.1
Urothelial-sarcomatoid/ rhabdoid	Urothelial-NOS	1.62	0.192	0.8	3.28
Urothelial-squamous	Neuroendocrine	0.2	0.038	0.05	0.73
Continued					

Risk ratios for variant summary					
Level1	/Level2	Risk ratio	Prob>Chisq	Lower 95%	Upper 95%
Urothelial-squamous	Urothelial-NOS	1.14	0.669	0.62	2.11
Urothelial-squamous	Urothelial-sarcomatoid/ rhabdoid	0.71	0.385	0.32	1.53
Urothelial-variant histology	Neuroendocrine	0.2	0.038	0.05	0.74
Urothelial-variant histology	Urothelial-NOS	1.16	0.6	0.67	1.98
Urothelial-variant histology	Urothelial-sarcomatoid/ rhabdoid	0.71	0.365	0.35	1.46
Urothelial-variant histology	Urothelial-squamous	1.01	0.976	0.52	1.97
Neuroendocrine	Urothelial-NOS	5.83	0.024	1.63	20.81
Neuroendocrine	Urothelial-sarcomatoid/ rhabdoid	3.6	0.1	0.91	14.27
Urothelial-NOS	Urothelial-sarcomatoid/ rhabdoid	0.62	0.192	0.31	1.25
Neuroendocrine	Urothelial-squamous	5.1	0.038	1.36	19.11
Urothelial-NOS	Urothelial-squamous	0.87	0.669	0.47	1.61
Urothelial-sarcomatoid/ rhabdoid	Urothelial-squamous	1.42	0.385	0.65	3.08
Neuroendocrine	Urothelial-variant histology	5.05	0.038	1.36	18.76
Urothelial-NOS	Urothelial-variant histology	0.87	0.6	0.51	1.48
Urothelial-sarcomatoid/ rhabdoid	Urothelial-variant histology	1.4	0.365	0.68	2.88
Urothelial-squamous	Urothelial-variant histology	0.99	0.976	0.51	1.93

Table 3. Multivariate analysis for CDCP1.

Immunohistochemistry. IHC of CDCP1 protein was performed on a VENTANA BenchMark ULTRA autostainer (Ventana) according to an accredited staining protocol in a routine immunohistochemistry facility. A polyclonal anti-CDCP1 primary antibody (#4115, rabbit polyclonal, Cell Signaling, Danvers, MA, US, dilution: 1:75) was used in this study. This antibody was previously used and validated in several other studies^{11, 12, 17, 21}. CDCP1 staining was evaluated by two experienced pathologists (OH and GK) and only specific membrane expression of CDCP1 was assessed. Staining intensity was classified as negative (0), weak (1), moderate (2) and strong (3). Negative and weak specimens were considered CDCP1-low, whereas moderate and strong staining were considered CDCP1-high.

TCGA data analysis. Log2-transformed RSEM (RNA-Seq by Expectation Maximization) RNA sequencing data (RNA-Seq v2) of CDCP1 generated by The Cancer Genome Atlas Research Network (TCGA, <http://cancer.genome.nih.gov/>) were downloaded from the UCSC Xena browser (<http://xena.ucsc.edu>) for n = 408 UC.

scRNAseq analysis. Data was downloaded as from Chen et al., 2020³³, using their interactive Shiny R interface. Analysis and dataset processing was performed using Seurat version 4.1.1 running on a mac OS version 12.2.1 (Monterey). Analysis was performed using standard Seurat dataset processing pipeline. In brief, data was subsetted to include only cells annotated as “epithelial”. Data was visualised using the Nebulosa (version 1.4.0) and scCustomize (version 0.7.0) packages (Table 2). The colour-blind friendly, perceptually uniform and ordered “batlow” colour pallet was used via the R package scico (version 1.3.0). The figure was layed out using Adobe Illustrator version 24.1. Data availability: Publically available scRNAseq data was obtained from chen et al., 2020. Code availability: Code to reproduce scRNAseq data can be found at <https://github.com/Eomesodermin>.

Cell culture and functional assays. The human UC cell lines used were purchased from ATCC (ATCC, Manassas, VA, US). Cells were cultured in RPMI1640 (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10% FCS (Thermo Fisher Scientific), 1% streptomycin/penicillin (10,000 units/ml Penicillin and 10,000 µg/ml Streptomycin; Thermo Fisher Scientific) and 1% L-glutamine (200 mM; Thermo Fisher Scientific). For the spheroids formation assay, cells were grown in 1.2% Methylcellulose (Sigma-Aldrich) at a density of 25×10^3 cells/mL as hanging drops and incubated under standard culture conditions for 72 h. The diameter of the formed spheroids was measured with Image J and spheroids volume was calculated with the formula $V = 4/3 \times \pi \times r^3$. For the migration assay we put 20×10^3 cells on 24-well plate inserts and incubate for 12 h. We then fixed the cells with PFA 4%, performed crystal violet assay and swapped the internal part of the insert’s membrane to eliminate cells which didn’t migrate. We finally counted the migrated cells on the external part of the membrane. For the establishment of the ex vivo organoids model, single cells from the bladder of male CDCP1^{pcLSL/+} mice were isolated as previously described³³. Single cells were suspended (10^5 cells/mL) in DMEM, 10% FBS, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin and infected with adenoviruses (rAAV2/1-CMV-GFP and rAAV2/1-CBA-Cre) via spinoculation at 600×g, 1 h, 32 °C. Cells were then incubated for 1 h at 37 °C and 5% CO₂. 10^6 cells were suspended in 1 mL of Matrigel (Corning, New York, United States) and 40 µL drops were formed in pre-warmed flat bottom 24-well plates. Matrigel drops were left 30 min to solidify at 37 °C and 5% CO₂ inverting the 24-well

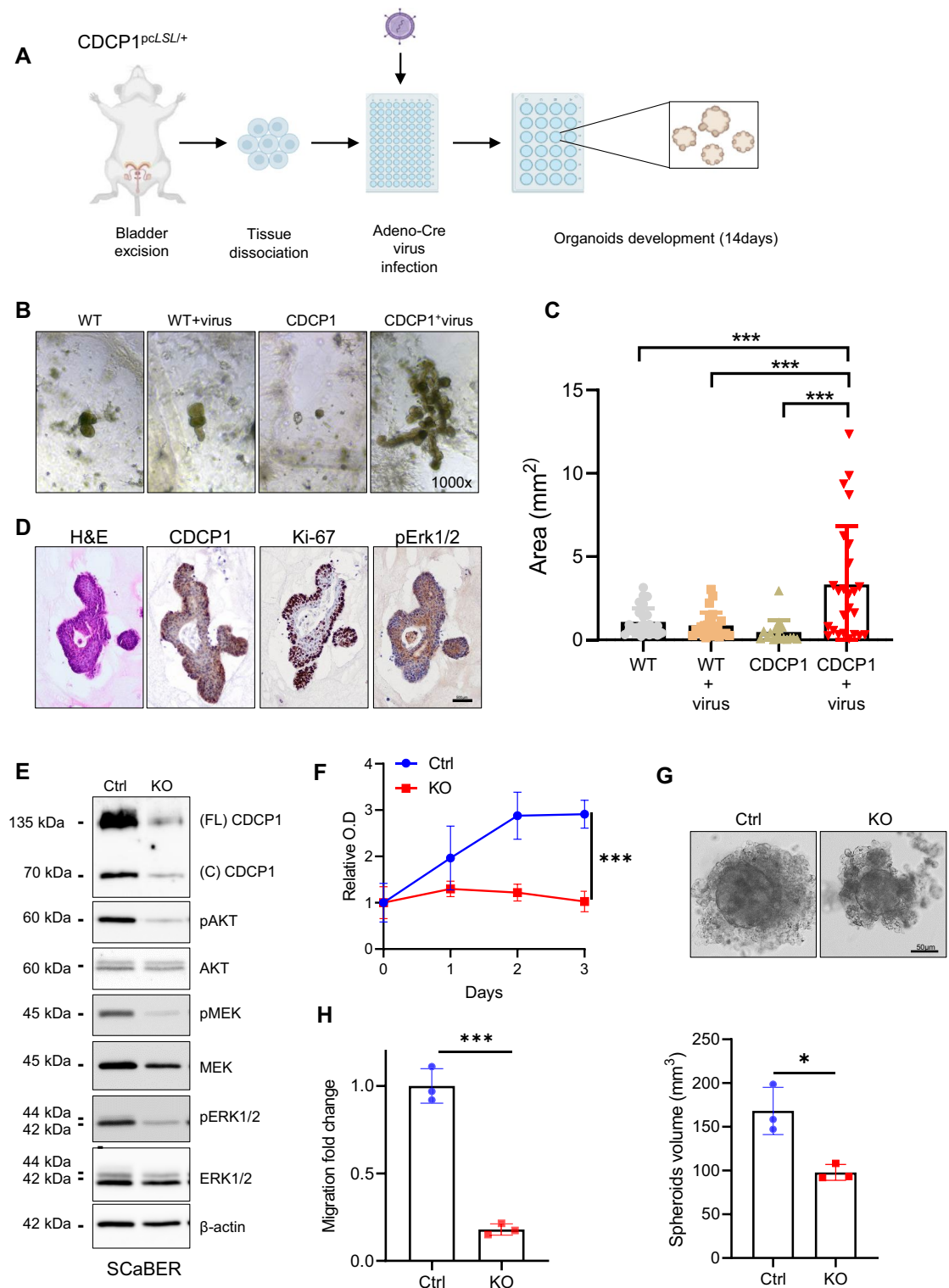


Figure 3. Transgenic overexpression of CDCP1 induces proliferation in ex vivo mouse organoids and its knockout inhibits proliferation and migration of UC cells. **(A)** Schematic representation of the generation of mouse organoids. **(B)** Representative images of the organoids generated from the C57BL/6 (WT) and transgenic (CDCP1) mice after 14 days of culture. The WT+virus and the CDCP1+virus conditions are transduced with the adeno-CRE virus. The WT and the CDCP1 conditions are processed as WT+virus and CDCP1+virus in the absence of the adeno-CRE virus. WT, WT+virus and CDCP1 conditions are all controls. **(C)** Quantification of the approximate area of the organoids. Error bars indicate SD. *** $P < 0.001$. Statistical test: one-way analysis of variance. **(D)** Representative images of H&E and IHC (CDCP1, Ki67, p-ERK1/2) performed on the organoids. **(E)** Western blot analysis of CDCP1 and major downstream targets of CDCP1 signaling in SCaBER UC cell line (Ctrl) and its CDCP1^{-/-} counterpart (KO). **(F)** Relative O.D (proliferation) change of the CDCP1 expressing SCaBER cells (Ctrl) compared to the CDCP1^{-/-} (KO). Error bars indicate SD. *** $P < 0.001$. Statistical test: two-tailed unpaired t test. **(G)** Representative images of the spheroids originated from the CDCP1+ (Ctrl) and CDCP1^{-/-} (KO) SCaBER cells. Bar graphs show the quantification of the spheres volume. Error bars indicate SD. * $P < 0.05$. Statistical test: two-tailed unpaired t test. **(H)** Migration fold change of CDCP1 expressing SCaBER (Ctrl) compared to the CDCP1^{-/-} (KO). Error bars indicate SD. *** $P < 0.001$. Statistical test: two-tailed unpaired t test.

plates and 500 μ L of organoids media was added. Organoids were grown for 14 days and pictures were taken. Organoids' growth was defined by measuring height and length with Image J and calculating the approximate surface. Organoids were then collected and fixed in 4% PFA. For the crystal violet proliferation assay, 2,000 cells were seeded per well in a 96-well plate. After overnight incubation, cells were treated and incubated for three to seven days depending on the experiment. All conditions were run in triplicate wells. For staining, cells were fixed with 37% paraformaldehyde for 10 min, then washed with distilled water and stained 0.05% crystal violet for 30 min. Cells were washed twice with distilled water and dried. 0.1% acetic acid was added per well to solubilize the dye. Finally, the absorbance was measured at a wavelength of 570 nm. The mean values of the triplicate wells were divided by a day zero control. Relative optical density (O.D) was normalized respect to the vehicle control.

Westernblot and IHC antibodies. For western blot the following antibodies were used: CDCP1 (#4115, Cell Signaling, Danvers, MA, US), pMEK (#9154S, Cell signaling), MEK (#4694S, Cell signaling), pAKT (#9271 T, Cell signaling), AKT (#2920S, Cell Signaling) pERK (#9102S, Cell Signaling), ERK (#4377, Cell Signaling), GAPDH (#2118, Cell Signaling), β -actin (#A2228, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US). Some of the membranes used for the western blot were cut prior to hybridization. For IHC analysis, the following antibodies were used: CDCP1 (#4115, rabbit polyclonal, Cell Signaling, 1:50), Ki67 (#MSK018, Zytomed, Berlin, Germany, 1:50), p-Erk1/2 (clone 197G2, rabbit monoclonal, Cell Signaling, 1:50), CK5 (clone XM26, mouse monoclonal, Diagnostic BioSystems[®], USA, dilution 1:50), CK14 (clone SP53, rabbit monoclonal, Cell Marque[™], USA, dilution 1:40).

Quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR). RNA was isolated with TRIzol method (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA). qRT-PCR was performed using TB Green[®] Premix Ex Taq[™] II (#RR82WR, TaKara, Kusatsu, Japan) on a Quant Studio 5 (applied biosystems, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA). The primer sequences used were as follow: CDCP1 (Invitrogen Thermo Fisher, forward *TGGTTCCACCCAGAAATGT*, reverse *GATGATGCACAGACGTTTAT*), GAPDH (Invitrogen Thermo Fisher Scientific, forward *CTCTGCTCCTCTGTTTCGAC*, reverse *ACGACCAATCCGTTGACTC*).

CRISPR-CAS9. A functional sgRNA was generated digesting pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) (#48139, Addgene, Watertown, MA, US) with BbsI-HF (NEB, Ipswich, MA, US) and ligating a double-stranded DNA oligonucleotide which targets the third exon of CDCP1 with T4 DNA ligase (NEB, Ipswich, MA, US). The double-stranded oligonucleotide was obtained by annealing the following single-stranded oligonucleotides: hCDCP1_KO_BS, 5'-AAACccgtggtcaggatcggaac-3'; hCDCP1_KO_TS, 5'-CACCGttccgctgaccacgg-3'. After the ligation, px459-CDCP1^{-/-}sgRNA plasmid was transfected in the cells using Lipofectamine[™] 3000 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). After 2 days, the transfected clones were selected with a 4-days Puromycin treatment (0.6 μ g/mL) and expanded with a polyclonal approach to obtain stable cell lines.

Data availability

The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 3 August 2022; Accepted: 16 December 2022

Published online: 02 January 2023

References

- Witjes, J. A. *et al.* European Association of Urology guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer: Summary of the 2020 guidelines. *Eur. Urol.* **79**, 82–104 (2021).
- Ghatalia, P. & Plimack, E. R. Integration of immunotherapy into the treatment of advanced urothelial carcinoma. *J. Natl. Compr. Cancer Netw.* **18**, 355–361 (2020).
- Hooper, J. D. *et al.* Subtractive immunization using highly metastatic human tumor cells identifies SIMA135/CDCP1, a 135 kDa cell surface phosphorylated glycoprotein antigen. *Oncogene* **22**, 1783–1794 (2003).
- Bhatt, A. S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Craik, C. S. & Moasser, M. M. Adhesion signaling by a novel mitotic substrate of src kinases. *Oncogene* **24**, 5333–5343 (2005).
- Takeda, H., Fujimori, Y., Kai, S., Ogawa, H. & Nakano, T. CD318/CUB-domain-containing protein 1 expression on cord blood hematopoietic progenitors. *Exp. Ther. Med.* **1**, 497–501 (2010).
- Khan, T., Kryza, T., Lyons, N. J., He, Y. & Hooper, J. D. The CDCP1 signaling hub: A target for cancer detection and therapeutic intervention. *Cancer Res.* **81**, 2259–2269 (2021).
- He, Y. *et al.* Proteolysis-induced N-terminal ectodomain shedding of the integral membrane glycoprotein CUB domain-containing protein 1 (CDCP1) is accompanied by tyrosine phosphorylation of its C-terminal domain and recruitment of Src and PKCdelta. *J. Biol. Chem.* **285**, 26162–26173 (2010).
- Casar, B. *et al.* In vivo cleaved CDCP1 promotes early tumor dissemination via complexing with activated β 1 integrin and induction of FAK/PI3K/Akt motility signaling. *Oncogene* **33**, 255–268 (2014).
- Spasov, D. S., Baehner, F. L., Wong, C. H., McDonough, S. & Moasser, M. M. The transmembrane src substrate trask is an epithelial protein that signals during anchorage deprivation. *Am. J. Pathol.* **174**, 1756–1765 (2009).
- Wortmann, A. *et al.* Cellular settings mediating Src substrate switching between focal adhesion kinase tyrosine 861 and CUB-domain-containing protein 1 (CDCP1) tyrosine 734. *J. Biol. Chem.* **286**, 42303–42315 (2011).
- Alajati, A. *et al.* Interaction of CDCP1 with HER2 enhances HER2-driven tumorigenesis and promotes trastuzumab resistance in breast cancer. *Cell Rep.* **11**, 564–576 (2015).
- Alajati, A. *et al.* CDCP1 overexpression drives prostate cancer progression and can be targeted in vivo. *J. Clin. Invest.* **130**, 2435–2450 (2020).
- Alajati, A. *et al.* Mammary tumor formation and metastasis evoked by a HER2 splice variant. *Cancer Res.* **73**, 5320–5327 (2013).

14. Turdo, F. *et al.* CDCP1 is a novel marker of the most aggressive human triple-negative breast cancers. *Oncotarget* **7**, 69649–69665 (2016).
15. Ikeda, J. *et al.* Expression of CUB domain containing protein (CDCP1) is correlated with prognosis and survival of patients with adenocarcinoma of lung. *Cancer Sci.* **100**, 429–433 (2009).
16. Gao, W. *et al.* Isolation and phenotypic characterization of colorectal cancer stem cells with organ-specific metastatic potential. *Gastroenterology* **145**, 636–646.e5 (2013).
17. Harrington, B. S. *et al.* Cell line and patient-derived xenograft models reveal elevated CDCP1 as a target in high-grade serous ovarian cancer. *Br. J. Cancer* **114**, 417–426 (2016).
18. He, Y. *et al.* Elevated CDCP1 predicts poor patient outcome and mediates ovarian clear cell carcinoma by promoting tumor spheroid formation, cell migration and chemoresistance. *Oncogene* **35**, 468–478 (2016).
19. Emerling, B. M. *et al.* Identification of CDCP1 as a hypoxia-inducible factor 2 α (HIF-2 α) target gene that is associated with survival in clear cell renal cell carcinoma patients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 3483–3488 (2013).
20. Cao, M. *et al.* HIF-2 α regulates CDCP1 to promote PKC δ -mediated migration in hepatocellular carcinoma. *Tumor Biol.* **37**, 1651–1662 (2016).
21. Kryza, T. *et al.* Effective targeting of intact and proteolysed CDCP1 for imaging and treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Theranostics* **10**, 4116–4133 (2020).
22. Miyazawa, Y. *et al.* CUB domain-containing protein 1, a prognostic factor for human pancreatic cancers, promotes cell migration and extracellular matrix degradation. *Can. Res.* **70**, 5136–5146 (2010).
23. Bühring, H. *et al.* CDCP1 identifies a broad spectrum of normal and malignant stem/progenitor cell subsets of hematopoietic and nonhematopoietic origin. *Stem Cells* **22**, 334–343 (2004).
24. Heitmann, J. S. *et al.* Identification of CD318 (CDCP1) as novel prognostic marker in AML. *Ann. Hematol.* **99**, 477–486 (2020).
25. Nakashima, K. *et al.* Novel small molecule inhibiting CDCP1-PKC δ pathway reduces tumor metastasis and proliferation. *Cancer Sci.* **108**, 1049–1057 (2017).
26. Schäfer, D. *et al.* Identification of CD318, TSPAN8 and CD66c as target candidates for CAR T cell based immunotherapy of pancreatic adenocarcinoma. *Nat. Commun.* **12**, 1453 (2021).
27. Liu, F., Yang, X., Geng, M. & Huang, M. Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy. *Acta Pharm. Sin.* **B 8**, 552–562 (2018).
28. Yang, F. *et al.* Dynamic m6A mRNA methylation reveals the role of METTL3-m6A-CDCP1 signaling axis in chemical carcinogenesis. *Oncogene* **38**, 4755–4772 (2019).
29. Schneider, A.-C. *et al.* Global histone H4K20 trimethylation predicts cancer-specific survival in patients with muscle-invasive bladder cancer. *BJU Int.* **108**, E290–296 (2011).
30. Klümper, N. *et al.* Mediator complex subunit MED1 protein expression is decreased during bladder cancer progression. *Front. Med. (Lausanne)* **4**, 30 (2017).
31. Ying, X. *et al.* Programmable N6-methyladenosine modification of CDCP1 mRNA by RCas9-methyltransferase like 3 conjugates promotes bladder cancer development. *Mol. Cancer* **19**, 169 (2020).
32. Chen, Z. *et al.* Single-cell RNA sequencing highlights the role of inflammatory cancer-associated fibroblasts in bladder urothelial carcinoma. *Nat. Commun.* **11**, 5077 (2020).
33. Drost, J. *et al.* Organoid culture systems for prostate epithelial and cancer tissue. *Nat. Protoc.* **11**, 347–358 (2016).
34. Earl, J. *et al.* The UBC-40 urothelial bladder cancer cell line index: A genomic resource for functional studies. *BMC Genomics* **16**, 403 (2015).
35. Ertl, I. E. *et al.* Molecular and pharmacological bladder cancer therapy screening: Discovery of clofarabine as a highly active compound. *Eur. Urol.* **82**, 261–270 (2022).
36. Law, M. E. *et al.* CUB domain-containing protein 1 and the epidermal growth factor receptor cooperate to induce cell detachment. *Breast Cancer Res.* **18**, 80 (2016).
37. Kamoun, A. *et al.* A consensus molecular classification of muscle-invasive bladder cancer. *Eur. Urol.* **77**, 420–433 (2020).
38. Rebouissou, S. *et al.* EGFR as a potential therapeutic target for a subset of muscle-invasive bladder cancers presenting a basal-like phenotype. *Sci. Transl. Med.* **6**, 244ra91 (2014).
39. Murakami, Y. *et al.* AXL/CDCP1/SRC axis confers acquired resistance to osimertinib in lung cancer. *Sci. Rep.* **12**, 8983 (2022).
40. Dong, Y. *et al.* The cell surface glycoprotein CUB domain-containing protein 1 (CDCP1) contributes to epidermal growth factor receptor-mediated cell migration. *J. Biol. Chem.* **287**, 9792–9803 (2012).
41. He, Y., Harrington, B. S. & Hooper, J. D. New crossroads for potential therapeutic intervention in cancer-intersections between CDCP1, EGFR family members and downstream signaling pathways. *Oncoscience* **3**, 5–8 (2016).
42. Eckstein, M. *et al.* Cytotoxic T-cell-related gene expression signature predicts improved survival in muscle-invasive urothelial bladder cancer patients after radical cystectomy and adjuvant chemotherapy. *J. Immunother. Cancer* **8**, e000162 (2020).

Author contributions

Study concept and design: A.Alajati, M.S.Acquisition of data: M.S., S.F., M.E., O.H., A.S., N.M., D.S.Analysis and interpretation of data: M.S., S.F., M.E., N.K., D.C.Drafting of the manuscript: A.Alajati, M.S., S.F.Critical revision of the manuscript for important intellectual content: A.Alajati, S.H., J.E., M.T., G.K., T.B., A.Alimonti, M.R., M.H.Statistical analysis: M.S., S.F., M.E., N.K., D.C.Administrative, technical, or material support: A.Alajati. Supervision: A.Alajati.

Funding

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. M.S. and S.F. are supported by the Universitätsklinikum Bonn (UKB).

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-022-26579-z>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to A.A.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2023, corrected publication 2023