

Aus der
Universitätsklinik für Urologie Tübingen

**Etablierung von Organoiden aus Zellen des Spülurins
von Patientinnen und Patienten mit Blasentumoren**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Pollehne, Paul**

2023

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. B. Amend

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Liebau

Tag der Disputation: 05.07.2023

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	10
1 Einleitung.....	11
1.1 Das Urothelkarzinom.....	11
1.1.1 Physiologische Anatomie und Histologie - Urothel und Harnblase	11
1.1.2 Epidemiologie	12
1.1.3 Risikofaktoren.....	13
1.1.4 Diagnostik und Subtypen.....	14
1.1.5 Therapie	16
1.2 Organoide aus Urin als 3D-Tumormodel.....	17
1.2.1 Organoide als Tumormodel	18
1.2.2 Organoide aus Urothelkarzinomzellen.....	19
1.2.3 Inkulturnahme und 3D-Matrix.....	20
1.2.4 Charakterisierung von Blasentumororganoiden.....	23
1.3 Zielsetzung der Arbeit	27
2 Material und Methoden	28
2.1 Probenmaterial.....	28
2.2 Chemikalien und Reagenzien	28
2.3 Geräte und Verbrauchsmittel	29
2.4 Medien und Lösungen.....	31
2.5 Zellkultur.....	34
2.5.1 Aufarbeitung von Tumorgewebe.....	34
2.5.2 Aufarbeitung von Spülurin	35
2.5.3 3-D-Kultur von Blasentumorzellen in BME.....	36
2.5.4 Passagieren von Zellkulturen in BME	37
2.5.5 3-D-Zellkultur von Blasentumorzellen in GrowDex®.....	38
2.5.6 Einfrieren von Zellkulturen	38
2.5.7 Auftauen von Zellkulturen	39
2.6 Versuchsaufbau der Matrixvergleiche	39
2.7 Auswertung	40

2.7.1	Wachstumserfassung	40
2.7.2	Immunfluoreszenzfärbungen und immunhistochemische Färbungen 40	
2.7.3	Chamber Slides	41
2.7.4	Fluoreszenzfärbung von Chamber Slides	43
2.7.5	Einbettung von Proben in Paraffin	43
2.7.6	Entparaffinierung und Demaskierung von Paraffinschnitten	45
2.7.7	Fluoreszenzfärbung von Paraffinproben	46
2.7.8	Immunhistochemische Färbungen von Paraffinproben	48
2.7.9	Antikörper	49
2.7.10	Statistik	52
3	Ergebnisse	53
3.1	Zellisolation	53
3.1.1	Zentrifugationszeiten	53
3.1.2	Etablierung eines Lysepuffers	54
3.2	Wachstum und Passagierung	57
3.2.1	Übersicht und Passagen	57
3.2.2	Vergleichende Wachstumsmessungen in Kulturen aus Urin und soliden Tumoren	58
3.2.3	Zunahme der Zellkulturgrößen	59
3.2.4	UCO#1	60
3.2.5	UCO#18	60
3.2.6	UCO#20	61
3.2.7	UCO#25	61
3.2.8	UCO#28	61
3.2.9	UCO#33	61
3.2.10	UCO#34	65
3.2.11	UCO#35	65
3.2.12	UCO#36	65
3.3	Alternativmatrixvergleich	66
3.3.1	Ermittlung der nutzbaren Konzentrationen	66
3.3.2	RT112	68

3.3.3	BCO#140.....	72
3.3.4	UCO#33.....	76
3.4	Immunfluoreszenzcharakterisierungen der Kulturen aus Spülurin	79
3.4.1	Überblick.....	79
3.4.2	UCO#1.....	79
3.4.3	UCO#18.....	80
3.4.4	UCO#20.....	81
3.4.5	UCO#25.....	82
3.4.6	UCO#28.....	83
3.4.7	UCO#33.....	84
3.4.8	UCO#34.....	87
3.4.9	UCO#35.....	88
3.4.10	UCO#36	88
3.4.11	Zusammenfassung.....	89
3.5	Immunhistochemische Charakterisierung der Ursprungstumoren und der Organoidkultur UCO#33	91
3.5.1	Überblick.....	91
3.5.2	Ursprungstumor zu UCO#33	92
3.5.3	UCO#33 5. Passage.....	94
3.5.4	Ursprungstumor zu UCO#18	95
3.5.5	Ursprungstumor zu UCO#20	97
3.5.6	Ursprungstumor zu UCO#25	98
3.5.7	Ursprungstumor zu UCO#34	100
3.5.8	Ursprungstumor zu UCO#36	102
3.5.9	Zusammenfassung	103
3.5.10	Vergleich der Urinkulturen mit dem Ursprungstumor.....	104
3.6	Einflussfaktoren der Patienten	105
3.6.1	UCO#1.....	105
3.6.2	UCO#18.....	105
3.6.3	UCO#20.....	105
3.6.4	UCO#25.....	106
3.6.5	UCO#28.....	106

3.6.6	UCO#33.....	106
3.6.7	UCO#34.....	106
3.6.8	UCO#35.....	107
3.6.9	UCO#36.....	107
3.6.10	Zusammenfassung.....	107
4	Diskussion	108
4.1	Entwicklung eines geeigneten Protokolls zur Isolation von Zellen aus Spülurin.....	109
4.2	Vergleich von Hydrogel und Basalmembranextrakt als Kulturmatrix von Blasentumorzellorganoiden.....	110
4.3	Effizienz der Organoidkultur aus Spülurin und Vergleich mit der Organoidkultur aus soliden Tumoren	112
4.4	Einflussfaktoren auf den Kulturerfolg der einzelnen Proben.....	115
4.5	Schlussfolgerung der Arbeit	118
4.6	Ausblick.....	118
5	Zusammenfassung	121
6	Literaturverzeichnis.....	122
7	Erklärung zum Eigenanteil	128
8	Veröffentlichungen.....	129
9	Danksagung.....	130

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1 Beispielhafte Negativkontrollen (nur Sekundärantikörper Cy3 und Alexa488 ohne Primärantikörper) für die Fluoreszenzfärbungen. Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Zugehörige Färbungen sind oben links: Abb.23-24, oben rechts: Abb. 15-16, unten links: Abb.29-30, unten rechts: Abb. 20-22.....	41
Abbildung 2 Effekt des Lysepuffers auf die Zellkultur bei Zugabe des Puffers zwischen der 1. und der 2. Passage. Obere Zeile: UCO#12, Untere Zeile: UCO#13. Lichtmikroskopische Bilder in 25-facher Vergrößerung.....	55
Abbildung 3 Boxplotdiagramm der gemessenen Durchmesser der Organoide und Konglomerate im Lysepufferversuch.	56
Abbildung 4 Lichtmikroskopische Bilder der Primärkultur von UCO#33 in 100-facher Vergrößerung an den Tagen 0 und 17.....	62
Abbildung 5 Lichtmikroskopisches Bild der 2. Passage von UCO#33 in 100-facher Vergrößerung.....	63
Abbildung 6 Lichtmikroskopische Bilder der 1. Passage von UCO#33 bei 100-facher (obere Reihe) und 200-facher (untere Reihe) Vergrößerung.	63
Abbildung 7 Lichtmikroskopische Bilder der 4. Passage von UCO#33 an Tag 0 (links) und Tag 7 (rechts) in 25-facher Vergrößerung (oben) und 100-facher Vergrößerung (unten).....	64
Abbildung 8 Lichtmikroskopische Aufnahmen der Kultur RT112 in unterschiedlichen GrowDex®-Konzentrationen in 100-facher Vergrößerung an Tag 1 und Tag 7.....	67
Abbildung 9 Boxplot der Durchmesser der Kultur RT112 in GrowDex® und BME nach 7 Tagen.	69
Abbildung 10 Immunfluoreszenzbilder der unterschiedlichen Färbemuster der Organoide der Kultur RT112 in BME (links) und GrowDex® (GD, rechts). Zur besseren Darstellung wurden Kontrast, Schärfe und Farbtemperatur angepasst.	71
Abbildung 11 Boxplot der Durchmesser der Kultur BCO#140 in GrowDex® und BME nach 7 Tagen.	72
Abbildung 12 Immunfluoreszenzbilder der unterschiedlichen Färbemuster der Organoide der Kultur BCO#140 in BME (links) und GrowDex® (GD, rechts). Zur besseren Darstellung wurden Kontrast, Schärfe und Farbtemperatur angepasst.	75
Abbildung 13 Boxplot der Durchmesser der Kultur UCO#33 in GrowDex® und BME nach 7 Tagen.	76
Abbildung 14 Immunfluoreszenzbilder der unterschiedlichen Färbemuster der Organoide der Kultur UCO#33 in BME (links) und GrowDex® (GD, rechts). Zur besseren Darstellung wurden Kontrast, Schärfe und Farbtemperatur angepasst.	78
Abbildung 15 Fluoreszenzfärbung der Kultur UCO#1 in 400-facher Vergrößerung. Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) und AE1/AE3-Färbung (rot).	79

Abbildung 16	Fluoreszenzfärbung der Kultur UCO#1 in 400-facher Vergrößerung. Gleichzeitige Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau), der Antigene CD276 (grün) und S100P (rot).	79
Abbildung 17	Fluoreszenzfärbung der Kultur UCO#18 in 400-facher Vergrößerung. Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) und CK7-Färbung (grün).	80
Abbildung 18	Fluoreszenzfärbung der Kultur UCO#20 in 400-facher Vergrößerung. Fehlende Anfärbung des Antigens CD24(grün) und geringgradige Anfärbung von CD44(rot). Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). ...	81
Abbildung 19	Fluoreszenzfärbung der Kultur UCO#25 in 400-facher Vergrößerung. Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) und CK20-Färbung (rot).	82
Abbildung 20	Fluoreszenzfärbung der Kultur UCO#28 in 400-facher Vergrößerung. Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) und CK7-Färbung (grün).	83
Abbildung 21	Fluoreszenzfärbung der Kultur UCO#28 in 400-facher Vergrößerung. Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) und CD276-Färbung (grün).	83
Abbildung 22	Fluoreszenzfärbung der Kultur UCO#28 in 400-facher Vergrößerung. Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) und CD24-Färbung (grün).	83
Abbildung 23	Fluoreszenzfärbung der Kultur UCO#33 in Passage 3 in 200-facher Vergrößerung. Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) und CK7-Färbung (grün).	84
Abbildung 24	Fluoreszenzfärbung der Kultur UCO#33 in Passage 3. Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) und Kofärbung (gelb) von CD24 (grün) und CD44 (rot).	85
Abbildung 25	Fluoreszenzfärbung der Kultur UCO#33 in Passage 5 in 400-facher Vergrößerung. Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) und Kofärbung (orange) von GATA-3 (grün), AE1/AE3 (rot).	86
Abbildung 26	Fluoreszenzfärbung der Kultur UCO#33 in Passage 5 in 400-facher Vergrößerung. Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) und Ki67-Färbung (rot).	86
Abbildung 27	Fluoreszenzfärbung der Kultur UCO#33 in Passage 5 in 400-facher Vergrößerung. Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) Kofärbung von CD24-Färbung (grün) und CD44 (rot).	86
Abbildung 28	Fluoreszenzfärbung der Kultur UCO#34 in 400-facher Vergrößerung. Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) und Kofärbung von CK7 (grün) und p53 (rot).	87
Abbildung 29	Fluoreszenzfärbung der Kultur UCO#36 in 100-facher Vergrößerung. Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) und Kofärbung von CD24 (grün) und CD44 (rot).	88
Abbildung 30	Fluoreszenzfärbung der Kultur UCO#36 in 400-facher Vergrößerung. Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) und CD44-Färbung (rot).	89
Abbildung 31	Immunhistochemischen Färbungen des Ursprungstumors von UCO#33 in 200-facher Vergrößerung.	92
Abbildung 32	Immunhistochemischen Färbungen der Kultur aus Urin UCO#33 in Passage 5 in 200-facher Vergrößerung.	94

Abbildung 33 Immunhistochemischen Färbungen des Ursprungstumors von UCO#18 in 200facher Vergrößerung.....	96
Abbildung 34 Immunhistochemischen Färbungen des Ursprungstumors von UCO#20 in 200facher Vergrößerung.....	97
Abbildung 35 Immunhistochemischen Färbungen des Ursprungstumors von UCO#25 in 200facher Vergrößerung.....	99
Abbildung 36 Immunhistochemischen Färbungen des Ursprungstumors von UCO#34 in 200facher Vergrößerung.....	101
Abbildung 37 Immunhistochemischen Färbungen des Ursprungstumors von UCO#36 in 200facher Vergrößerung.....	102
Tabelle 1 Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien.....	29
Tabelle 2 Liste der genutzten Geräte und Verbrauchsmittel.....	31
Tabelle 3 Konzentrations- und Zeitangaben der für die Paraffineinbettung genutzten Alkohol-Paraffinreihe.	45
Tabelle 4 Konzentrations- und Zeitangaben der für die Rehydrierung genutzten absteigenden Alkoholreihe.	46
Tabelle 5 Liste der für die Immunfluoreszenzfärbung genutzten Antikörper mit Spezifizierungen, Hersteller und Verdünnungsangaben für Paraffinschnitte und Chamber Slides, Klon- und Bestellinformationen.....	52
Tabelle 6 Zentrifugationszeiten und -geschwindigkeiten für die Zellisolation der Urinproben, durchgeführt mit einer Hereus Multifuge 3SR+ mit Ausschwingrotor.	54
Tabelle 7 Ergebnisse der Wachstumsmessung der Organoide aus Urin und Tumorgewebe und die daraus resultierende Steigung. Zusammengehörige Proben sind mit der gleichen Farbe unterlegt. Die beiden rot geschriebenen Differenzen zeigen die größten beobachteten Werte.....	58
Tabelle 8 Anzahl der Wells in Primärkultur und 1. Passage, sowie die Differenz in korrespondierenden Kulturen aus Urin und Tumorgewebe. Zusammengehörige Proben sind gleichfarbig unterlegt.....	60
Tabelle 9 Deskriptive Statistik für den Vergleich von BME und GrowDex® mithilfe der Blasentumorlinie RT112.....	68
Tabelle 10 Deskriptive Statistik für den Vergleich von BME und GrowDex® mithilfe der Organoidzellreihe BCO#140.	72
Tabelle 11 Deskriptive Statistik für den Vergleich von BME und GrowDex® mithilfe der Organoidzellreihe UCO#33.	76

Tabelle 12 In der Immunfluoreszenzcharakterisierung erhobene Proteinausstattung der Sphäroide bzw. Zellkonglomerate mit den dazugehörigen Belichtungszeiten. + steht für ein positives Fluoreszenzsignal, - für ein ausgebliebenes Fluoreszenzsignal und +/- für Färbungen, in denen positive und negative Färbungen auftraten. Zusammengehörigen Merkmale und Belichtungszeiten sind untereinander jeweils grau oder weiß hinterlegt.....	90
Tabelle 13 Histocores der gefärbten Proteinmarker für die Ursprungtumoren und die Organoidkultur UCO#33 in der Immunhistochemie. Bei dem Marker CD24 lag bei allen soliden Tumoren ein systematisch-methodischer Fehler (Ergebnisse in Klammern).....	103

Abkürzungsverzeichnis

BME	Basement membrane extract
GD	GrowDex®
UCO	Urinprobenorganoid
BCO	Tumorprobenorganoid
CT	Computertomografie
TNM	tumor, nodes, metastasis
TUR-B	Transurethrale Resektion der Harnblase
FGF(-R)	Fibroblastenwachstumsfaktor (-Rezeptor)
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
HBSS	Hank´s Balanced Salt Solution
(D)PBS	(Dulbecco´s) Phosphate Buffered Saline
DMSO	Dimethyldulfoxid
FBS	Fötales Rinderserum
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium
PFA	Paraformaldehyd
BSA	Bis(trimethylsilyl)acetamid
DAB	Diaminobenzidin
BTM	Blasentumormedium
rb.	Rabbit
ms.	Mouse

1 Einleitung

Eine vielversprechende Möglichkeit für die weitere Erforschung und die Entwicklung neuer Therapien des Harnblasenkarzinoms bieten Organoide, die aus solchen Tumoren abgeleitet werden. Im Gegensatz zu der bisherigen Methode, diese Organioide aus Gewebeproben der Tumoren zu gewinnen, beschäftigt sich diese Arbeit mit der Gewinnung von Organoiden aus Spülurin. Diese Art der Probengewinnung ist weniger invasiv und perspektivisch auch mit geringerem Aufwand für die PatientInnen und den behandelnden Arzt verbunden. Entsprechende Organoide können als Modell der Urothelkarzinome im Labor genutzt werden, um neue Erkenntnisse über diese Tumoren zu erhalten, ihre Interaktion mit der Umgebung und ihr Ansprechen auf Medikamente zu untersuchen.

Die enthaltenen Zellen können sich innerhalb der Organoide organisieren und die Eigenschaften der ursprünglichen Karzinome beibehalten oder auch verändern. Daher ist es wichtig zusätzlich zur Kultivierung der Organoide auch ihre molekulare Charakterisierung und Morphologie zu untersuchen, um damit ihre Ähnlichkeit zu den ursprünglichen Tumoren darzustellen. Das Ziel der Arbeit mit Organoiden aus Harnblasenkarzinomen ist es, Tumormodelle für die Forschung zu gewinnen und PatientInnen mit dieser Erkrankung eine personalisiertere und zielgerichtetere Therapie zu ermöglichen und damit die bestehenden Therapiemöglichkeiten weiterzuentwickeln und zu ergänzen.

1.1 Das Urothelkarzinom

1.1.1 *Physiologische Anatomie und Histologie - Urothel und Harnblase*

Das Urothelkarzinom entsteht aus dem Übergangsepithel der ableitenden Harnwege, welches typischerweise die paarigen Nierenbecken und Ureteren sowie die Harnblase, den proximalen Anteil der Urethra und die Drüsenausführungsgänge der Prostata auskleidet (Birder and Andersson, 2013). Es besteht aus einer Basalzellschicht, mehreren Intermediärzellschichten und einer apikalen Superficialzellschicht. Diese großen, hexagonalen Zellen werden auch als Schirmzelle (in engl. Texten: umbrella cells) bezeichnet und sind durch tight junctions fest und flüssigkeitsdicht miteinander verbunden. Ist das Urothel

nicht aufgedehnt, besteht es aus 3-7 Zellschichten, die stark ineinander verzahnt sind und in Reservefalten vorliegen, was eine Anpassung des Füllungsvolumen der Organe an größere Urinmengen erlaubt und somit in der Harnblase unter physiologischen Bedingungen eine Speicherung von bis zu 550 ml Flüssigkeit erlaubt. Unter pathologischen Bedingungen, wie beispielsweise einer Überlaufinkontinenz, sind unter maximaler Aufdehnung sogar Füllungsvolumina bis zu 2 Litern über längere Zeit möglich.

Die Harnblase ist als muskuläres, subperitoneales Hohlorgan im Bindegewebe dorsal der Symphyse lokalisiert und liegt kaudal teilweise den Levatorschenkeln auf. Beim Mann grenzt dorsal an die Harnblase das Rektum an und die nach kaudal austretende Urethra wird von der Prostata umfasst (prostatistische Urethra). Bei der Frau liegt (bei regelhafter Anteversio und Anteflexio) der Uterus dorsal der Harnblase und dieser teilweise auch auf. Seitlich wird die Harnblase durch jeweils eine Peritonealfalte (Fossa paravesicalis) eingefasst (Aumüller et al., 2014:780, Schünke et al., 2005:174).

1.1.2 Epidemiologie

Das Karzinom der Harnblase lag bei der prozentualen Angabe des Anteils an Krebsneuerkrankungen des Zentrums für Krebsregisterdaten in Deutschland im Jahr 2018 (Erdmann et al., 2021) für Frauen auf dem 12. Platz mit einem Anteil von 2 % (4770 Neuerkrankungen) und bei Männern auf Platz 4 mit einem Anteil von 5,1 % (13500 Neuerkrankungen). Zählt man die Neuerkrankungen an nicht-invasiven papillären und in-situ Karzinomen, sowie an Neubildungen unsicheren oder unbekanntem Verhaltens hinzu (diese wurden aufgrund abweichender ICD-10-Verschlüsselungen in die prozentualen Anteile nicht miteinbezogen), so betragen die Absolut-Zahlen der Neuerkrankungen im Jahr 2018 für Frauen 7630 Neuerkrankungen und für Männer 23410 (Erdmann et al., 2021). An einem Karzinom der Harnblase starben in Deutschland (standardisierte Sterberate) im Jahr 2018 1,7 von 100000 Frauen (1840 Todesfälle) und 5,1 von 100000 Männern (3862 Todesfälle) (Erdmann et al., 2021). Bei einem mittleren Erkrankungsalter der Frauen von 76 Jahren und der Männer von 75 Jahren kann

das Harnblasenkarziom als Krankheit des älteren Menschen bezeichnet werden (Erdmann et al., 2021).

Es wurde eine relative 5-Jahres-Überlebensrate von 48 % bei Frauen und 59 % bei Männern beobachtet, die gruppiert nach den UICC-Stadien von Stadium 1 (82 % bei Frauen, 81 % bei Männern) bis Stadium 4 (17 % bei Frauen, 81 % bei Männern) stark abnahm (Erdmann et al., 2021).

1.1.3 Risikofaktoren

Als wichtige Risikofaktoren für die Erkrankung an einem Harnblasenkarzinom oder einer Vorstufe davon gilt das aktive oder passive Rauchen. Chemische Stoffe, die das Erkrankungsrisiko erhöhen, wie Amine und Benzol werden zwar in Europa als Arbeitsstoffe zum großen Teil nicht mehr eingesetzt, sind aber aufgrund von langen Latenzzeiten anamnestisch weiterhin von Bedeutung und können in bestimmten Fällen als Berufskrankheit anerkannt werden (Erdmann et al., 2021).

Auch das männliche Geschlecht gilt als Risikofaktor für Blasenkarzinome, da Männer fünf Mal häufiger an Blasenkrebs erkranken als Frauen. Auch im Tierexperiment konnte dieser Effekt bestätigt werden, ohne dass eine eindeutige Begründung gefunden werden konnte (Mikhaleva et al., 2021).

Kaukasier haben ein signifikant höheres Risiko an Blasenkrebs zu erkranken als Menschen anderer Ethnien, wobei die Überlebensrate von Menschen afrikanischer Herkunft, die an Blasenkrebs erkranken, am geringsten ist (Yee et al., 2011).

Es wurden diverse genetische Prädispositionen für das Entstehen von Blasenkarzinomen identifiziert, wie eine langsame Acetylierung der N-Acetyltransferase oder das Fehlen der Glutathion-S-Transferase. Generell lässt sich sagen, dass für direkte Verwandte von Menschen mit Blasenkrebs im Vergleich zur restlichen Bevölkerung ein doppelt so hohes Risiko besteht, ebenfalls an Blasenkrebs zu erkranken (Mikhaleva et al., 2021).

Medikamente, wie das in der Krebstherapie eingesetzte Alkylans Cyclophosphamid (Travis et al., 1995) oder das in der Diabetestherapie

eingesetzte PPAR- γ Agonist Pioglitazon (Lewis et al., 2011) können ebenfalls das Risiko für die Entstehung von Blasen Tumoren erhöhen.

Weitere gesicherte oder diskutierte Risikofaktoren sind eine chronische Zystitis (z.B. bei Langzeitversorgung mit einem Blasendauerkatheter), chronische Blasensteine oder Entzündungen (z.B. bei Shistosomiasis), Strahlentherapie des Urogenitaltraktes, Langzeittherapie mit Dauerurinkathetern und Erkrankungen mit Harnstase (z.B. benigne Prostatahyperplasie), Chlor- und Arsenbelastung in Trinkwasser und weitere weniger gesicherte Faktoren (Mikhaleva et al., 2021).

1.1.4 Diagnostik und Subtypen

Die hier beschriebenen Angaben zur Diagnostik und Klassifizierung des Harnblasenkarzinoms beziehen sich größtenteils auf die 2020 veröffentlichte S3-Leitlinie zur Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms des Leitlinienprogrammes Onkologie der AWMF (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V.). Die federführende Fachgesellschaft war in dieser Leitlinie die Deutsche Gesellschaft für Urologie (DGU).

Der oft erste Hinweis in der primären Diagnostik eines Harnblasenkarzinoms ist der Nachweis einer schmerzlosen Makrohämaturie, die sich durch die rötliche Anfärbung des Urins andeutet und durch den laborchemischen Nachweis oder mittels Urin-Teststreifen von Hämoglobin bestätigt wird. Auch in Vorsorge- oder Routineuntersuchungen kann eine schmerzlose Mikro- oder Makrohämaturie einen Hinweis auf ein Harnblasenkarzinom geben (AWMF, 2020).

Der Nachweis von malignen Zellen oder ihren Bestandteilen in der Urinzytologie ist ein wichtiger Bestandteil der initialen Diagnostik. Es können lichtmikroskopisch oder durch Fluoreszenzfärbungen tumorsuspekte Zellen nachgewiesen werden oder durch Marker-basierte Diagnostik nach Bestandteilen der Zellen gesucht werden (AWMF, 2020).

In der orientierenden Sonografie der Harnblase und des oberen Harntraktes wird nach sichtbaren Raumforderungen, sowie einem eventuell begleitenden

Harnstau, oder nach anderen Ursachen für die Blutbeimischung des Urins (z.B. eine Urolithiasis) gesucht (AWMF, 2020).

Als Standard in der Primärdiagnostik des Harnblasenkarzinoms wird anschließend eine diagnostische Zystoskopie durchgeführt, in der die Ausbreitung und Morphologie der Raumforderung, sowie weitere Auffälligkeiten der Harnblase genauer beschrieben werden können. Diese kann entweder mit Weißlicht oder mit fluoreszenzbasierten Methoden durchgeführt werden (AWMF, 2020).

Wird ein muskelinvasives Karzinom vermutet, so erfolgen weitere bildgebende Verfahren, wie CT-Untersuchungen oder nuklearmedizinische Diagnostik (AWMF, 2020).

Die Tumoren der Harnblase werden nach TNM-Klassifikation anhand ihrer Invasionstiefe (T1-4), der betroffenen Lymphknoten (N1-3) und eventueller Fernmetastasierungen (M0-1b) eingeteilt. Besonders der Unterscheidung der nicht-muskelinvasiven Karzinome (Tis/Ta bis T1) von den muskelinvasiven Karzinomen (ab T2) kommt in Prognose und Therapie eine große Bedeutung zu. In dieses Staging fließen die Ergebnisse der bildgebenden Verfahren und klinischen Untersuchungen ein. Abschließend wird das klinische Staging durch die pathologische Untersuchung der Resektate nach der Therapie bestätigt oder korrigiert (AWMF, 2020).

Zur Beurteilung des Differenzierungsstadiums, mit dem eine Abschätzung der Invasivität und Aggressivität der Tumorzellen vorgenommen werden kann, wird ein reproduzierbares pathologisches Grading durchgeführt. Dieses teilt die Tumoren, anhand von histopathologischen Kriterien, in G1-G3 ein. Nach der aktuellen WHO-Klassifikation der urothelialen Tumoren von 2016 werden die G1-Tumoren weitestgehend als Low-Grade bezeichnet und die G2-3 Tumoren als High-Grade. Muskelinvasive Tumoren sind dabei immer als High-Grade Tumoren zu klassifizieren (AWMF, 2020).

Unterschieden werden luminale von basalen Tumoren des Urothels, die sich, außer in den morphologisch unterschiedlichen Wachstumsmustern, auch in Invasivität und molekularen Merkmalen unterscheiden (Guo et al., 2020).

1.1.5 Therapie

Die hier beschriebenen Angaben zur Therapie des Harnblasenkarzinoms beziehen sich ebenfalls auf die 2020 veröffentlichte S3-Leitlinie zur Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms der AWMF (AWMF, 2020).

In der Therapie des malignen Urothelkarzinoms unterscheiden sich die Therapie von nicht-muskelinvasiven Tumoren stark von der Therapie der muskulinvasiven Tumoren (AWMF, 2020).

Bei lokal begrenzten Tumoren (pTa, pTis, T1), die die Muskelschicht (Tunica muscularis) der Harnblase noch nicht infiltriert haben, kann oft eine minimalinvasive Therapie mittels starr-endoskopischer transurethrale Resektion der Blase (TUR-B) erfolgen, die keinen Hautschnitt notwendig macht und in fast allen Fällen kontinenterhaltend durchgeführt werden kann. Hierbei wird der Tumor in Weißlicht oder unter zusätzlicher in-vivo Fluoreszenzfärbung mit einem vor dem Eingriff installierten Farbstoff (Hexylaminolaevulinat), der vermehrt von Tumorzellen aufgenommen wird (Photodynamische Diagnostik), endoskopisch dargestellt und mit einer Elektroschlinge entfernt (AWMF, 2020).

Um die Rezidivrate bzw. die Progressionsrate zu senken können im Anschluss an die minimalchirurgische Therapie adjuvant das Zytostatikum Mitomycin oder das Immuntherapeutikum BCG (Bacillus Calmette-Guérin) intravesikal, häufig auch mehrfach, in die Harnblase eingebracht werden (AWMF, 2020).

Fortgeschrittenere Tumoren (ab T2), die bereits in den Detrusormuskel eingedrungen sind, werden durch die chirurgische Entfernung der Harnblase, die radikale Zystektomie, und anschließender kontinenter oder nicht-kontinenter Harnableitung therapiert. Bei der radikalen Zystektomie wird offenchirurgisch, konventionell laparoskopisch oder auch laparoskopisch roboterassistiert die Harnblase mit Prostata und proximaler Urethra, den Bläschendrüssen, einem

Abschnitt des Ductus deferens, den intramuralen und teilweise auch distalen Anteilen der Harnleiter beim Mann oder mit Uterus, Adnexen und oberem Drittel der vorderen Vaginalwand bei der Frau entfernt und anschließend eine pelvine Lymphadenektomie durchgeführt. In der harnableitenden Versorgung kann, je nach Risikokonstellation, Patientenzustand und Patientenwunsch, entweder eine kontinente Harnableitung (Ileumneoblase, katheterisierbare Pouchformen, die nur noch selten angewendete transrektale Harnableitung) oder eine inkontinente Harnableitung (Ileum- oder Kolonkonduit, Harnleiterhautfistel) gewählt werden (AWMF, 2020).

(Neo-)Adjuvant können außerdem verschiedene Therapieregime aus Chemo- und Strahlentherapie zum Einsatz kommen, je nach Tumorstaging und -grading, Operationsmethode und Risikokonstellation. Zunehmend finden auch Immuntherapien und neue Substanzen, wie die Therapie mit monoklonalen Antikörpern (z.B. Enfortumab-Vedotin®) Einsatz in der systematischen Therapie des Urothelkarzinoms (AWMF, 2020).

Bei bereits fernmetastasierten Tumoren kommen in der Regel palliative Therapien zum Einsatz, wie palliative Chemotherapien, Harnableitungen, Schmerztherapie und die psychoonkologische Betreuung der Patienten (AWMF, 2020).

Die in 1.1.2 beschriebene geringe 5-Jahres-Überlebensrate, insbesondere bei den lokal fortgeschrittenen und den metastasierten Harnblasenkarzinomen, sowie die eingeschränkten Behandlungsmöglichkeiten in diesen höheren Tumorstadien machen eine intensive Forschung an neuen Möglichkeiten der Therapie, insbesondere systemischer, medikamentöser Therapieansätze, dringend notwendig.

1.2 Organoide aus Urin als 3D-Tumormodel

Organoide können als in-vitro Model für Organe und Erkrankungen genutzt werden und stellen durch die Differenzierung und Organisation der enthaltenen Zellen ein komplexes, sich selbst reproduzierendes Zellsystem für die Grundlagenforschung, klinische Forschung und personalisierte Medizin dar (Corrò et al., 2020).

Insbesondere für die Forschung an Pathomechanismen, immunologischen Phänomenen und der Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Interaktionen von Tumoren und die Wirksamkeitstestung von Medikamenten in einem kontrollierten und reproduzierbaren Rahmen ergeben sich durch Tumorzell-Organoid vielfältige Möglichkeiten.

1.2.1 Organoid als Tumormodel

Organoid aus Tumorzellen haben sich in verschiedenen medizinischen Disziplinen als vielversprechendes in-vitro Tumormodel etabliert. Der Begriff Organoid beschreibt das dreidimensionale Wachstum von Stammzellen, Progenitorzellen oder differenzierten Zellen, die in geeigneten Trägermaterialien gewebeähnliche Kulturen aufbauen (Marsee et al., 2021) und sich auch selbst aus Einzelzellen oder Zellkonglomeraten nachbilden können.

Als Sphäroide werden in einem Konglomerat wachsende Zellen bezeichnet, die in dreidimensionaler Form wachsen, ohne dabei an der Oberfläche des Kulturgefäßes zu haften (Fennema et al., 2013).

Beide Begriffe sind allerdings nicht fest definiert und werden in verschiedenen Veröffentlichungen abweichend verwendet.

In dieser Arbeit, in der unter anderem an Organoidkulturen für Forschungszwecke und damit für die Langzeitkultur gearbeitet wurde, wurden alle dreidimensional wachsenden Zellkonglomerate vor der fünften Passagierung als Sphäroide bezeichnet. Die Kulturen, die nach der fünften Passage weiterhin ein Wachstum in dreidimensionaler und organisierter Form zeigten, wurden als Organoid bezeichnet, da erst dann die Fähigkeit zur organisierten Reproduktion als gegeben angesehen wurde.

Im Gegensatz zur zweidimensionalen Tumor-Zellkultur handelt es sich bei den dreidimensionalen Organoiden um Zellkluster, die sich in ihrem Zellverband organisieren, typische tumorähnliche Wachstumsmuster nachahmen und teilweise auch Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen zeigen, was sie als komplexes tumorähnliches Modell für die Krebsforschung, Medikamentenentwicklung und klinische Anwendungen interessant macht.

Organoide konnten bereit aus diversen benignen und malignen Geweben gewonnen werde, wie beispielsweise dem Kolon, der Leber, der Retina oder der Brustdrüse (Corrò et al., 2020). Bei der Gewinnung von Organoidkulturen aus Ovarialkarzinomgewebe, konnte dabei beispielsweise eine Erfolgsrate von 65 % erreicht werden (Kopper et al., 2019), bei Glioblastomgewebe wurden Erfolgsraten bis zu 91 % der Kulturen berichtet (Abdullah et al., 2022).

1.2.2 Organoide aus Urothelkarzinomzellen

1.2.2.1 Solide Tumorproben

Auch aus urothelialen Tumor-Zellen konnten bereits Organoide in Langzeitkulturen gewonnen und untersucht werden, die die Heterogenität und Klassifizierung der Ursprungstumoren nachahmen konnten (Meijer, 2021, Mullenders et al., 2019). Es wurde eine Effizienz von 60-70 % beschrieben (Mullenders et al., 2019). Auch wurden die Organoide schon erfolgreich für Medikamententests genutzt (Medle et al., 2022, Wei et al., 2022).

Die Gewebeproben, aus denen die Organoidkulturen aus Urothelkarzinomzellen etabliert wurden, konnten bisher aber nur im Rahmen eines invasiven Eingriffs, also einer TUR-B oder Zystektomie, gewonnen werden. Im Rahmen von klinischen Anwendungen wäre es aber interessant, eventuelle Tests, die das Ansprechen der Tumoren auf Medikamente wie Chemotherapeutika untersuchen, durchzuführen, bevor der Tumor entfernt wurde und somit eine gezielte neoadjuvante Therapie zu ermöglichen. Auch wäre es für die Gewinnung von Organoiden für Forschungszwecke von Vorteil, wenn diese ohne invasive Prozedur und mittels möglichst unkomplizierter und leicht zugänglicher Entnahmetechnik gewonnen werden könnten.

1.2.2.2 Urinproben

Die Gewinnung von Tumorzellen aus Urin stellt eine weniger invasive und einfacher zugängliche Methode dar als die Isolierung der Zellen aus soliden Tumorproben.

Aus menschlichem Urin Stammzellen und Tumorzellen zu extrahieren, ist in der diagnostischen Urinzytologie und in der Stammzellforschung bereits etabliert und es liegen erprobte Verfahren hierzu vor (Zhou et al., 2012).

In der Forschung an autologen Urotheltransplantaten konnten bereits zweidimensionale Kulturen aus Spülurinproben mit einer Effizienz von 55,2 % kultiviert werden (Nagele et al., 2008).

Dreidimensionale Kulturen aus Tubuluszellen der Niere, auch als Tuboloide bezeichnet, konnten bereits aus humanen Urinproben gewonnen und über längere Zeit zu kultiviert werden (Schutgens et al., 2019).

Im Tiermodell wurden erfolgreich Organoide von Hunden mit Prostatakarzinomen und Blasenkarzinomen aus Urinproben der Tiere gewonnen und als Langzeitkulturen fortgeführt (Elbadawy et al., 2019, Usui et al., 2017).

Die Gewinnung von Blasentumorzellorganoiden aus menschlichen Urinproben ist bisher noch weitgehend unerforscht und vor dieser Arbeit konnten keine publizierten Vorerfahrungen hierzu gefunden werden. (Stand Recherche 22.06.2022, pubmed, google scholar, Suchbegriffe: „organoid, urine, bladder cancer“ und “organoid, urine, urothelial cancer”)

1.2.3 Inkulturnahme und 3D-Matrix

Um Organoide aus soliden Tumorproben oder Urin zu gewinnen, sind verschiedene Schritte und Faktoren zu beachten. Als erstes müssen die Zellen aus ihrem Gewebe gelöst und/oder isoliert werden. Hierbei ist es wichtig, dass zum einen die richtigen Zellen isoliert werden, also die urothelialen Tumorzellen mit Stammzellaktivität, und zum anderen möglichst viele Zellen vital und vermehrungsfähig entnommen werden.

Bei der Aufarbeitung von soliden Tumorproben wird das Tumorgewebe zuerst mechanisch zerkleinert, um für den darauffolgenden Verdau der Kollagenfasern und damit die Freisetzung der Zellen durch das Versetzen mit Kollagenase eine größere Oberfläche für die Enzymarbeit zu schaffen. Anschließend muss die Probe möglichst so aufgearbeitet werden, dass die Tumorzellen in möglichst

wenig Restgewebe vorliegen. Hierzu wurde ein modifiziertes Protokoll von Mullenders et al. genutzt (Mullenders et al., 2019).

Wird Urin als Ursprungsprobe genutzt, so liegen die Zellen bereits in Zellverbänden oder einzeln vor, da sowohl von der gesunden Blasenwand als auch von der Oberfläche des Tumors kontinuierlich Zellen abschilfern. Durch das Spülen der Blase vor der Entnahme des Spülurins, der in dieser Arbeit genutzt wurde, werden nochmals oberflächliche Zellen gelöst. Durch die Behandlung der entnommenen Proben mit antibiotikahaltigen Pufferlösungen und mehrmaliges Zentrifugieren werden auch hier die vorhandenen Zellen angereichert. Die Grundlagen des in dieser Arbeit etablierten und optimierten Protokolls zur Isolation von Blasentumorzellen aus Spülurin bilden Beschreibungen und Protokolle aus mehreren Veröffentlichungen (Usui et al., 2017, Zhou et al., 2012, Nagele et al., 2008).

Sind die Zellen isoliert, so müssen sie in eine entsprechende Matrix eingebracht werden. Diese Matrix muss verschiedene Ansprüche erfüllen. Einerseits benötigen die Zellen ein möglichst dem menschlichen Blut entsprechendes Milieu (37 °C, pH ~ 7,4) und ein Angebot an Wachstumsfaktoren, um die Haftung an die Matrix, Proliferation und Differenzierung zu ermöglichen. Andererseits sollen die Zellen aber auch nicht zu einer Differenzierung angeregt werden, die Sie in der Charakterisierung und den Zelleigenschaften zu sehr von den Zellen im Ursprungstumor unterscheidet, damit sie als adäquates Modell der Ursprungstumoren genutzt werden können.

In den bisher genannten Vorarbeiten wurden als 3D-Matrix für das Wachstum der Organoide unterschiedliche Arten von Basalmembranextrakt (BME) genutzt, welches aus murinen Engelbreth-Holm-Swarm Sarkomzellen gewonnen wird. Außer den Hauptproteinen Laminin, Kollagen 4 und Enactin sind nach einer Arbeit von Hughes et al. über 1800 weitere Proteine unterschiedlichster Größe und Funktion im BME enthalten, worunter sich Wachstumsfaktoren und andere Proteine befinden, die potentiell Einfluss auf Wachstum und Differenzierung der Zellen nehmen können (Hughes et al., 2010). Außerdem wurden unterschiedliche BME-Produkte untersucht und es konnte herausgestellt werden,

dass diese sich teils erheblich in ihrer Zusammensetzung unterscheiden. BME ist also, trotz seines vielfältigen erfolgreichen Einsatzes in der Organoid-Kultur, ein wenig definiertes und in seiner Wirkweise noch schlecht verstandenes Reagenz, welches unter verschiedenen Herstellern in seiner Zusammensetzung variiert und sogar innerhalb einer Charge eine inhomogene Verteilung von Matrixbestandteilen aufweist (Kozlowski et al., 2021).

Aufgrund dieser Kritik, wird aktiv an Matrixalternativen geforscht, die besser reproduzierbare Zusammensetzungen und klarer definierte Bestandteile haben, um die weitere Erforschung und Kultur von Organoiden besser vergleichbar und standardisierbar zu machen und Einflussfaktoren der Matrix auf Wachstum und Zelldifferenzierung zu reduzieren. Einige vielversprechende Alternativen sind bereits in der Testung und Anwendung, wie dezellularisierte extrazelluläre Matrix, synthetische Hydrogele oder gelformende rekombinante Proteine (Kozlowski et al., 2021).

Ein Hydrogel, das nach Anwendungshinweisen des Herstellers, bereits für verschiedene Zellarten erfolgreich getestet wurde ist das aus Cellulose von Birken hergestellte, tierprodukt- und zellfreie Hydrogel GrowDex®. Anwendungshinweise liegen unter anderen bereits für embryonale metanephrische Mesenchymzellen (Saarela et al., 2021) und Mammakarzinomzellen (Niklander and Paasonen, 2019) vor. Da für Blasentumorzellen bisher keine Evidenz hierzu bestand, wurde das Wachstum von Blasentumorzell-Organoiden in GrowDex® in dieser Arbeit mit dem Wachstum in BME verglichen.

Der letzte wichtige Faktor für die Langzeitkultur von Organoiden sind die Kulturbedingungen. Die Kultivierung der Organoide im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und Wasserdampf in der Atmosphäre ist ein standardisiertes Verfahren in der Zellkultur. Auch die Technik des Passagierens der Kulturen ist in vielen Vorarbeiten mit Organoid-Kulturen aus Blasenkrebs-Zellen beschrieben und damit gut etabliert. Das für die Organoide genutzte Medium unterscheidet sich allerdings in den Publikationen verschiedener Arbeitsgruppen und ist zurzeit noch Interesse aktiver Forschung. In dieser Arbeit wurde ein nach

Mullenders et al. modifiziertes Medium verwendet, mit dem bereits erfolgreich Blasentumororganoiden aus Gewebeproben in Langezeitkulturen etabliert werden konnten (Mullenders et al., 2019).

1.2.4 Charakterisierung von Blasentumororganoiden

1.2.4.1 Molekulare Marker

Um Organoiden im Hinblick auf ihre Ähnlichkeit oder ihre Unterschiede mit den zugehörigen Ursprungstumoren oder anderen Zellreihen, ihren Differenzierungsgrad, Stammzell- und Proliferationseigenschaften und andere relevante Charakteristika untersuchen zu können, werden in der modernen Tumorbio­logie unter anderem molekulare Marker genutzt. Dabei handelt es sich um bestimmte Proteine, die in den untersuchten Zellen in physiologischer oder nicht-physiologischer Menge exprimiert sein können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit immunhistochemischen Verfahren und Immunfluoreszenz-Färbungen ausgewählte Proteine für die Charakterisierung der Organoiden nachgewiesen, die im Folgenden näher beschrieben werden.

GATA-3

GATA-3 ist ein Transkriptionsfaktor, der als Marker einer urothelialen Differenzierung genutzt wird aber auch in anderen Geweben oder Tumoren, wie Brustkrebs nachweisbar sein kann. In benignem Urothel ist GATA-3 regelhaft ausgeprägt, sowie in durchschnittlich 80 % der Urothelkarzinome. Je invasiver und aggressiver das Karzinom wächst, desto weniger wahrscheinlich ist eine Expression vorhanden (Naik et al., 2021).

CK5 und CK6

CK5 und CK6 sind als Zytokeratine Teil des Zytoskelettes der Basalzellen der Epidermis. Eine Expression findet sich aber auch in unreifen Plattenepithelien und Transitionalzellen. In normalem Urothel und Neoplasien niedriger Malignität ist ein basaler Nachweis von CK5 und CK6 möglich. In klinisch aggressiveren Tumoren ist häufig kein Nachweis mehr möglich (Akhtar et al., 2020).

CK7 und CK20

Urothelkarzinome zeigen gehäuft eine Koexpression von CK7 und CK20. Allerdings gilt dies auch für andere Karzinome, wie Ovarial- oder Kolonkarzinome (AWMF, 2020). CK 20 findet sich in normalem Urothel nur in den Deckzellen, kann aber mit Zunahme der Aggressivität und Invasivität des Tumors über die gesamte Breite des Urothels nachweisbar sein (Akhtar et al., 2020).

Vimentin

Vimentin ist ein mesenchymales Intermediärfilament, welches einen mesenchymalen Wandel von urothelialen Zellen anzeigen kann, da das Protein in normalem Urothel nicht exprimiert wird.

AE1/AE3

AE1/AE3 ist eine Panzytokeratin -Antikörpermischung, welche die epitheliale Herkunft von benignen oder malignen Geweben anzeigt. AE1 bindet die Zytokeratine 10,14,15,16 und 19. AE3 bindet die Zytokeratine 1,2,3,4,5,6,7 und 8.

CD24

CD24 ist ein Protein, das normalerweise auf Granulozyten und B-Zellen vorkommt. Es steht in Verdacht als Tumorstammzellmarker in unterschiedlichen Geweben ein möglicher Prädiktor für eine erfolgreiche Langzeitkultur von Organoiden aus Blasentumorzellen zu sein (Geng et al., 2022a).

CD44

In benignem Urothel kommt CD44 nur in den basal gelegenen Stammzellen vor. Mit der Differenzierung des Urothels verliert sich seine Expression (Ho et al., 2012). CD44 wurde in dieser Arbeit zur Identifikation von Zellen mit Stammzellaktivität in Urothel genutzt.

Ki67

Ki67 lagert sich während der Interphase der Zellteilung an die Chromosomen und kann dort nachgewiesen werden. Ist es in ausgeprägtem Maße exprimiert, zeigt es eine hohe Proliferationsrate der Zellen an.

CD276

CD276 ist ein Protein der sog. Immunoglobulin-Superfamilie, welches, wenn es auf körpereigenen Zellen oder Tumorzellen ausgeprägt ist, die T-Zell-vermittelte Immunantwort regulieren kann. Die Expression auf Tumorzellen kann dazu beitragen, dass der Tumor der Immunantwort entkommt. Dieser Mechanismus spielt auch in Blasenkarzinomen eine Rolle und wird als möglicher Angriffspunkt für zielgerichtete Therapien diskutiert (Aicher et al., 2021).

FGFR-3

Bei FGFR-3 handelt es sich um einen zellulären Rezeptor für die Fibroblasten-Wachstumsfaktoren FGF1, FGF2 und FGF9, der besonders an der Ossifikation langer Röhrenknochen beteiligt ist. Der von diesem Rezeptor angestoßene Signalweg steuert die Proliferation, Differenzierung und Migration von Zellen. Er ist in verschiedenen Tumoren mutiert und/oder überexprimiert. Besonders in papillären nicht-muskelinvasiven Urothelkarzinomen finden sich regelhaft aktivierende FGFR-3-Mutationen (McConkey and Choi, 2018).

Perlecan

Perlecan ist ein Proteoglykan, das von Endothel und glatten Muskelzellen ausgehend in der Extrazellulärmatrix abgelagert wird. Sein Vorkommen in der Extrazellulärmatrix verschiedener Tumoren wird im Zusammenhang mit einer höheren oder niedrigeren Wahrscheinlichkeit einer Metastasierung und der Angiogenese in Tumorerkrankungen diskutiert (Elgundi et al., 2019).

P63

P63 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Proliferation und Differenzierung von Zellen beeinflusst. Dieses Protein wird insbesondere in basalen Subtypen des Blasenkarzinoms nachgewiesen und dient dort, zusammen mit anderen Faktoren, zur molekularen Identifikation von basalen Blasentumoren (Iyyanki et al., 2021).

P53

P53, welches in gesunden Zellen als Tumorsupressorgen das Genom während der Zellteilung auf Fehler überprüft, ist besonders bei muskelinvasiven Tumoren und Carcinoma-in-situ der Blase oft mutiert und akkumuliert in den Zellen, was zu einer vermehrten Detektion des Proteins führt (McConkey and Choi, 2018). Eine geringgradig gesteigerte Expression ist aber auch in reaktiven Läsionen zu beobachten.

S-100-P

S-100-P ist ein Protein im Zytoplasma von Zellen, das an der Regulation von unterschiedlichen Zellprozessen beteiligt ist. In einer hohen Anzahl der Urothelkarzinome zeigt sich eine Expression von S-100-P, wodurch es ein relevanter Marker für die Identifikation von Urothelkarzinomen ist (Higgins et al., 2007).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die hauptsächliche Zielsetzung dieser Arbeit war es, ein Protokoll zu entwickeln und zu etablieren, mit dem es möglich ist aus Blasentumorzellen aus dem Spülurin von Patienten mit Blasentumoren Organoidkulturen herzustellen. Sekundäre Ziele waren die Charakterisierung der Zellen in den Sphäroiden und Organoiden und welchen Einfluss das Trägermaterial auf Organoiden ausübt.

Die Grundlage bildeten hierzu Vorarbeiten, in denen Organoiden aus Blasentumorzellen von soliden Tumorproben, im Tierexperiment und die Isolation von Stammzellen aus menschlichem Urin beschrieben sind (Elbadawy et al., 2019, Mullenders et al., 2019, Zhou et al., 2012).

Außerdem wurden im molekularen Vergleich der Organoiden und Sphäroide untereinander und mit ihren Ursprungstumoren nach prädiktiven Faktoren für ein gutes Organoidwachstum von Blasentumororganoiden gesucht. Hierfür wurden immunhistochemische Färbungen und Fluoreszenzfärbungen mit Antikörpern durchgeführt. Auch relevante anamnestische Daten der betroffenen Patienten und pathologische Daten zum Tumorstaging und -grading wurden betrachtet.

2 Material und Methoden

2.1 Probenmaterial

Patienten, deren Gewebe für die Zellkulturen in dieser Studie genutzt wurden, haben grundsätzlich ihr Einverständnis zur Verwendung des Gewebes gegeben.

Die 35 aufgearbeiteten Urinproben wurden vor einer TUR-B durch Spülen der Blase mit NaCl 0,9 % Lösung mit einem starren Zystoskop steril entnommen. Es wurden 23, zu je einer der Urinproben korrespondierende, Proben aus soliden Tumoren aufgearbeitet, die während einer TUR-B oder einer Zystektomie entnommen wurden.

Der Ethikantrag wurde unter der Projektnummer 840/2020BO2 von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität und des Universitätsklinikums Tübingen bewilligt.

2.2 Chemikalien und Reagenzien

<i>Reagenz/Chemikalie</i>	<i>Hersteller</i>
Advanced DMEM/F12(1x)	Thermo Fischer, Waltham, USA
B27-Supplement	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
L-Glutamin 20 MM	Biochrom, Berlin, DE
HEPES - 1 M	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
N-Acetylcystein - 500 mM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Nicotinamid - 1 M	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
A38-01-5	Tocris Bioscience, Bristol, UK
Primocin	Thermo Fischer, Waltham, USA
FGF-10 – 100 µg/ml	Peprtech Gmbh, Cranbury, USA
FGF-7 – 50 µg/ml	Peprtech Gmbh, Cranbury, USA
FGF-2 – 50 µg/ml (FGF-basic)	Peprtech Gmbh, Cranbury, USA
Y-27632 – 100 mM	Hycultec, Beutelsbach, DE
EGF – 500 µM	Peprtech Gmbh, Cranbury, USA
Accutase	BioLegend, San Diego, USA
G418	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
HBSS NaHCO ₃ -	Biochrom, Berlin, DE
Aprotinin	Calbiochem, Burlington USA
Matrizе BME Typ 2 Cultrex®	R&D Systems, Minneapolis, USA
TrypLE	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
Dispase 2	Merck, Darmstadt, DE

Penicillin/Streptomycin 10000 i.E./ml	Thermo Fischer, Waltham, USA
Phosphate Buffered Saline PBS(1x)	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline DPBS(1x)	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
Kollagenase	STEMCELL Technologies, Vancouver, CAN
Erythrozytenlysepuffer (eBioscience 1XRBC Lysis Buffer)	Thermo Fischer, Waltham, USA
Amphotericin B	Sigma Aldrich, Taufkirchen, DE
DMSO	AppliChem, Darmstadt, DE
FBS	Sigma Aldrich, Taufkirchen, DE
RPMI 1640	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
Trypan-Blau	Sigma Aldrich, Taufkirchen, DE
Histogel	Thermo Fischer, Waltham, USA
Xylol	AppliChem, Darmstadt, DE
Tris	AppliChem, Darmstadt, DE
Urea	Sigma Aldrich, Taufkirchen, DE
PFA 4 %	MORPHISTO, Offenbach, DE
GrowDex® Hydrozellulosegel	UPMBIOMEDICALS, Helsinki, FI
GrowDase™	UPMBIOMEDICALS, Helsinki, FI
Paraffin	McCormick, St. Louis, USA
0,1 % Tween 20	Sigma Aldrich, Taufkirchen, DE
Triton-X-100	Merck, Darmstadt, DE
BSA 5 %	Sigma Aldrich, Taufkirchen, DE
Fluoreszenz Mounting Medium	DAKO, Sante Clara, USA
Färbeset für Immunhistochemie – ZytoChem-Plus HRP Polymer-Kit	Zytomed Systems, Berlin, DE
DAB - Diaminobenzidin	DAKO, Sante Clara, USA
Hämatoxylin-Lösung	Vector Laboratories, California, USA

Tabelle 1 Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien.

2.3 Geräte und Verbrauchsmittel

<i>Arbeitsmittel</i>	<i>Hersteller</i>
Mikroskop Axiovert 135	Zeiss Germany, Jena, DE
Wasserbad 1083	GFL, Burgenwedel, DE
Inkubator CB210	BINDER, Tuttlingen, DE
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3SR+	Thermo Fisher Scientific, Osterode, DE
Zentrifuge Heraeus Biofuge pico	Kendro Laboratory Products, Osterode, DE
Steriler Abzug LaminAir HBB 2448	Holten LaminAir A/S, Allerød, DK
Pipette Research plus 10	Eppendorf, München, DE

Pipette Research plus 100	Eppendorf, München, DE
Pipette Research plus 200	Eppendorf, München, DE
Pipette Research plus 1000	Eppendorf, München, DE
Pipettenspitze Pipette tip 200µl	Sarstedt AG&Co. KG, Nümbrecht, DE
Pipettenspitze epT.I.P.S. 50-1000µl	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Pipettenspitze Kristall-Pipettenspitze 0,5-20 µl	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Gefriergefäß CryoTube™ Vials 1,8 ml	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, DK
Motorisierte Pipette Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, DE
Pipettenspitze 5 ml	Falcon, Durham, USA
Pipettenspitze 10 ml	Falcon, Durham, USA
Pipettenspitze 25 ml	Corning Inc., New York, USA
Zellkulturplatte Multiwellplatte 24 Well Cellstar®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Zellkulturplatte 48 Well Cell culture plate Costar®	Corning Inc., Kennebunk, USA
Zellkulturplatte 96 Well Cell culture plate Cellstar®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Zellkulturplatte Cell culture dishes , PS, 60*15mm, Cellstar®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Zählkammer Neubauer improved 0,1 mm Tiefe, 0,0025 mm ³	Assistent Germany, Sondheim vor der Rhön, DE
Zellsieb BD Falcon™ 70µm Nylon	BD Bioscience Discovery Labware, Bedford, USA
Laborgefäß Cellstar ^R Tubes 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Laborgefäß Cellstar ^R Tubes 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Laborwaage Satorius BL 310	Sartorius AG, Göttingen, DE
Mikrotom Leica RM2125 RT	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, DE
Objektträger 76x26 mm	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, DE
Deckgläser 24x50 mm	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, DE
Magnetrührer MR Hei-Standard	Heidolph, Schwabach, DE
Chirurgische Einmalskalpelle Gr. 15	Braun/Aesculap AG, Tuttlingen, DE
Pasteurpipettenspitzen large size	WU Mainz, Mainz, DE
Labor-Saugpumpe N811KN.18	KnF, Village-Neuf, FR
Gußform Tissue-Tek® Cryomold®	Sakura Finetek USA, Torrance, USA
Paraffinierungsronde LEICA TP1020	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, DE

Paraffineinbettungsgerät EG1150H	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, DE
Gefrierplatte LEICA EG1150C	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, DE
Einbettungskassetten Universal	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, DE
Reaktionsgefäß Safe-Lock Tubes 0,5ml	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Reaktionsgefäß Safe-Lock Tubes 1,5ml	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Feuchte Kammer	LabArt UG & Co. KG, Waldbüttelbrunn, DE
Fluoreszenzmikroskop Axiophot	Carl Zeiss, West Germany
Mikroskopierkammer CultureSlides	Corning Incorporated, New York, USA

Tabelle 2 Liste der genutzten Geräte und Verbrauchsmittel.

2.4 Medien und Lösungen

2.4.1.1 L- WRN-Konditionierung

Um das Medium mit Wnt, R-Spondin und Noggin anzureichern, wurde DMEM durch L-WRN-Zellen (L-WRN, ATCC®, CRL-3276™) konditioniert und so das Medium mit den drei Faktoren angereichert. Es handelt sich um fibroblastenähnliche Zellen, die aus der Areola von Mäusen gewonnen wurden (Miyoshi and Stappenbeck, 2013).

Die L-WRN-Zellen wurden aufgetaut und in flachen Zellkulturflaschen bis zu einer Konfluenz von 80-90 % mit L-Zell-Medium kultiviert. Anschließend wurden sie durch die Zugabe von Accutase vereinzelt, erneut in einer flachen Zellkulturflasche ausgesät und mit L-Zell-Selektionsmedium weiter kultiviert, bis diese Konfluenz erneut erreicht wurde. Nun erfolgte wieder eine Vereinzlung durch Accutase-Zugabe und die Zellen wurden auf 10 flache Zellkulturflaschen verteilt. Wenn unter der Kultur mit L-Zell-Medium wieder eine Konfluenz erreicht wurde, wurde das Medium abgenommen und durch 30 ml L-Zell-Konditionierungsmedium je Flasche ersetzt. Dieses wurde anschließend für 5-7 Tage in der Zellkultur belassen und anschließend abgenommen, 5 Minuten bei

30000 rpm und 4°C zentrifugiert und bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

Die Konditionierung wurde mit jeder Kulturflasche ein weiteres Mal durchgeführt. Das konditionierte Medium wurde gepoolt, durch einen 0,45 µm Sterilfilter gegeben und anschließend bis zu Verwendung bei -80 °C gelagert.

L-Zell-Medium

- DMEM
- 10 % FBS
- 1 % Penicillin/Streptomycin

L-Zell-Selektions-Medium

- L-Zell-Medium
- 50 µg/ml G418 (20 µl/ 20 ml)

L-Zell-Konditionierungs-Medium

- Advanced DMEM/F12
- 1 % Penicillin/Streptomycin
- 1 % HEPES
- 1 % L-Glutamin

2.4.1.2 Herstellung Blasentumor-Medium

B27-Supplement, L-Glutamin und A83-01 wurden im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

Für 49,818 ml Blasentumormedium (BTM) wurden 22,5 ml L-WRN konditioniertes Medium und 22 ml Advanced DMEM(1x)/F-12 in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen gegeben und bei 4 °C (auf Eis) gelagert.

Nun wurden nacheinander 2,5 ml 5 % csFBS, 1 ml B27-Supplement, 500 µl L-Glutamin, 500 µl HEPES 1 M, 500 µl Nicotinamid 1 M, 125 µl N-Acetylcystein 500 mM, 50 µl A83-01 5 mM, 50 µl Primocin 50 mg/ml, 50 µl FGF-10 100 µg/ml, 25 µl FGF-7 50 µg/ml, 12,5 µl FGF-2 50 µg/ml, 5 µl Y-27632 100 mM und 0,5 µl

EGF 500 μ M in die Grundlösung pipettiert. Das Medium wurde durch Schwenken vermengt und bis zur Verwendung im Kühlschrank bei 8 °C gelagert.

2.4.1.3 Transportmedium

Das Transportmedium wurde je nach Bedarf in der benötigten Menge hergestellt und enthält:

- HBSS NaHCO₃- 0,35 g/l
- HEPES 1 mM
- Aprotinin 20 KIU/ml
- Penicillin/Streptomycin 1 %

2.4.1.4 Arbeitsmedium

Zusammensetzung von 50 ml Arbeitsmedium:

- 44,5 ml Advanced DMEM(1x) F-12
- 5 ml 5 % steril filtriertes FBS
- 0,5 ml Penicillin/Streptomycin

2.4.1.5 Waschpuffer

Zusammensetzung von 100 ml Waschpuffer:

- 98,8 ml DPBS
- 1 ml Penicillin/Streptomycin
- 0,2 ml Amphotericin B

2.4.1.6 Splitting-Medium (für 51,125 ml)

- 50 ml Advanced DMEM/F-12
- 500 μ l HEPES
- 500 μ l L-Glutamin
- 125 μ l Primocin

2.4.1.7 Freeze-Medium

- 20 % DMSO
- 30 % FBS inaktiviert, sterilfiltriert
- 50 % RPMI 1640

2.4.1.8 Blockier- und Permeabilisierungslösung

- 50 ml 5 % BSA
- 100 µl Triton-X-100
- 50 µl 0,1 % Tween 20

2.4.1.9 Demaskierungspuffer

- 100 mM Tris 12,4 g
- Urea 50 g (5 %)
- mit Aqua bidest auf 1000 ml aufgefüllt und den pH mit HCl auf 9,5 eingestellt

2.5 Zellkultur

2.5.1 Aufarbeitung von Tumorgewebe

Das während einer TUR-B entnommene Tumormaterial wurde direkt nach dem Eingriff in ein Gefäß mit kaltem Transportmedium überführt und in diesem maximal 24 Stunden gekühlt gelagert.

Nach Eintreffen des Tumorgewebes im Labor wurde die Gewebeprobe in einer Zellkulturschale gewogen und anschließend mit PBS (37 °C) bedeckt. Das Gewebe wurde mechanisch in < 1 mm große Gewebestücke zerkleinert und in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Die Zellkulturschale wurde mehrmals mit 37 °C warmen PBS gespült und dieses ebenfalls in das Zentrifugationsröhrchen überführt.

Es folgte die Zentrifugation der Probe bei Raumtemperatur von 10 Minuten bei 480 g. Der Überstand wurde abgenommen und je 100 mg Gewebe, 1 ml PBS (37 °C) und 15 µl Kollagenase zugegeben. Die Zellsuspension wurde anschließend für 30 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nun wurde noch einmal dieselbe Menge Kollagenase zugefügt und die Suspension weitere 30 Minuten inkubiert. Während der Inkubation wurde die Probe alle 10 Minuten durch Schütteln aufgewirbelt.

Nach der Inkubation wurde die Probe durch ein Zellsieb mit 70 µm Durchmesser in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen gegeben und das Sieb

mehrmals mit Arbeitsmedium gespült. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei Raumtemperatur für 7 Minuten bei 150 g. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 1 ml Arbeitsmedium resuspendiert. Es folgte die Zellzählung in der Neubauer improved Zählkammer. Anschließend wurde weiter verfahren wie in 2.5.2.

2.5.2 Aufarbeitung von Spülurin

Der in der Universitätsklinik für Urologie, vor einer TUR-B, entnommene Spülurin wurde nach Entnahme sofort mit der gleichen Menge an kaltem PBS gepuffert und bis zur Verarbeitung bei 4 °C (auf Eis) gekühlt. Die Urinproben wurden innerhalb von maximal 4 Stunden ab dem Entnahmezeitpunkt verarbeitet.

Die Urinproben wurden in sterile 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und bei Raumtemperatur mit 250 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Urin-Überstand wurde bis auf 1 ml abgenommen und das Gewebepellet resuspendiert. Anschließend wurden die Proben aus allen 50 ml Zentrifugationsröhrchen in ein Gefäß überführt und 10 ml Waschpuffer zugegeben. Die Lösung wurde über 10 Minuten bei Raumtemperatur und 250 g zentrifugiert.

Im nächsten Schritt wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 1 ml Arbeitsmedium resuspendiert. Ein Aliquot von 10 µl wurde für die Zellzählung in der Neubauer improved Zählkammer entnommen und die Zellzahl der Probe durch Medienzugabe oder erneute Zentrifugation und Medienabnahme auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt, mit der dreifachen Menge an BME auf Eis gemischt, resuspendiert und auf 2-7 Wells (Vertiefungen der Zellkulturplatte) einer 48-Well-Platte ausplattiert. Waren sehr wenige oder keine Zellen bei der Zellzählung sichtbar, wurde die Probe abzentrifugiert, der Überstand bis auf 10 µl abgenommen, mit 30 µl BME auf Eis resuspendiert und auf 2 Wells einer 48-Well Platte als Tropfen gegeben. Je Well wurde ein 20 µl Aliquot der Zell-BME-Suspension genutzt, die eine halbkugelförmige dreidimensionale Struktur auf dem Boden der Wells bildeten und im weiteren als Domes bezeichnet werden.

Die 48-Well Platte wurde gewendet, für 15 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und danach die einzelnen Wells mit 250 µl Blasentumormedium

bedeckt. Repräsentative Domes wurden als Lichtmikroskopische Bilder festgehalten und die Zellkultur dann bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.5.2.1 Änderungen

Bei der primären Zentrifugation (7 Minuten bei 150 g) wurde bei der Probe UCO#1 ein rot-gelblicher Schleier beim Abnehmen des Überstandes sichtbar, wodurch ein erneutes Zentrifugieren notwendig wurde. Für die nächsten Proben wurde schrittweise die erste Zentrifugation auf 10 Minuten verlängert und die Beschleunigung auf 250 g erhöht. Eine genaue Ausführung ist im Ergebnisteil in 3.1.1 enthalten.

Die Probe UCO#2 wurde aufgrund massiver Verunreinigung durch Erythrozyten aufgeteilt und bei einer Hälfte ein zusätzlicher Waschgang mit Erythrozyten-Lysepuffer eingefügt, welcher später etabliert und in das Protokoll aufgenommen wurde, siehe 3.1.2.

2.5.3 3-D-Kultur von Blasentumorzellen in BME

Die kultivierten Blasentumorzellen wurden im Abstand von 1-3 Tagen lichtmikroskopisch evaluiert und hinsichtlich ihres Größenzuwachses und der Morphologie der kultivierten Zellen/Zellkonglomerate beurteilt.

Nach spätestens 7 Tagen erfolgte ein Austausch des Blasen-Tumor-Mediums. Dieser erfolgte früher, wenn sich durch eine Gelbfärbung des Mediums (pH-Umschlag ersichtlich durch Farbindikator Phenolrot) eine starke Verstoffwechslung des Mediums durch die Zellen zeigte. Das Medium wurde vorsichtig unter dem sterilen Abzug mit einer Pipette abgenommen und neues Medium mit einer Temperatur von 37 °C zugegeben.

Nach spätestens 5 Tagen wurden 50 µl Medium hinzugegeben, um den Zellen ausreichend Substrat zu liefern, ohne frühzeitig die von den Zellen erzeugten Substrate zu entfernen.

Die Kultur erfolgte in 48-Well Zellkulturplatten bei 37° C und 5% CO₂ im Inkubator.

2.5.4 Passagieren von Zellkulturen in BME

Die Urin- und Tumorzellkulturen wurden passagiert, wenn sie ein starkes Wachstum von Sphäroiden oder Organoiden zeigten und die Versorgung mit Medium oder die Intaktheit des gegossenen Domes gefährdet schien. Auch wurden die Zellen passagiert, wenn lichtmikroskopisch eine Absonderung von Membranvesikeln als Zeichen einer drohenden Apoptose zu beobachten war.

Das Verhältnis, in dem die ehemaligen Wells in neue überführt wurden (z.B. 1:2, 4:1, etc.), wurde anhand des Wachstumsverhaltens und der geschätzten Zellmenge in den Wells festgelegt. Wiesen die Kulturen ein starkes Wachstum auf wurden Sie in einem Verhältnis (alte Kultur: neue Kultur) <1 ausgesät, wurde ihr Wachstum eher als regredient eingeschätzt wurden sie in einem Verhältnis >1 in die neuen Wells überführt.

Aus den entsprechenden Well-Platten wurde das Medium vorsichtig abpipettiert und zu den 48-Well-Platten je 250 μ l PBS und 50 μ l Dispase gegeben. Nun wurden die Well-Platten bei 37 °C und 5 % CO₂ für 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurde je Well 200 μ l Trypsin hinzugegeben, dieses mit dem Dome resuspendiert und die Suspension in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Eppendorfgefäße wurden für 17 Minuten bei 37 °C und 1400 rpm auf dem Rüttler inkubiert, anschließend in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und die Trypsin-Reaktion mit 1 ml Arbeitsmedium je Well gestoppt. Es folgte eine Zentrifugation der Zentrifugationsröhrchen bei Raumtemperatur und 150 g für 5 Minuten. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet auf Eis mit je 5 μ l BTM für jedes geplante neue Well resuspendiert. Nun wurde je geplantem Well 15 μ l BME hinzugegeben und sehr vorsichtig und frei von Luftblasen durch mehrmaliges Resuspendieren mit der Zell-Medium-Lösung auf Eis vermengt. Danach wurde je Well ein Tropfen von 20 μ l vorsichtig und möglichst mittig in das Well der neuen Kulturplatte pipettiert. Um dreidimensionale Dome zu erhalten wurde die Platte zügig gewendet und zum Aushärten des BME für 15 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. 250 μ l BTM wurden vorsichtig hinzugegeben, die Dome lichtmikroskopisch begutachtet und fotodokumentiert.

2.5.5 3-D-Zellkultur von Blasentumorzellen in GrowDex®

Um die entsprechenden Verdünnungen des Hydrogels herzustellen, wurde die Grundlösung, welche 1,5 % GrowDex® enthält, mit einer Pipettenspitze mit abgeschnittener Spitze durch Resuspendieren mit der entsprechenden Menge von BTM und Zellsuspension gemischt.

Für je 12 Wells der 96-Well-Platten, in die je 100 µl Zell-Matrix-Suspension gegeben wurde, wurden für die entsprechenden Verdünnungen folgende Volumina zugegeben. Jedem Well wurden 10000 Zellen zugegeben, mit Ausnahme der Konzentrationen 0,8 % und 1 %.

Um eine Verdünnung von 0,2 % GrowDex® zu erreichen wurden 172,9 µl Hydrogel, 1067,1 µl BTM und 60 µl Zellsuspension (Zellen in BTM) zugegeben.

Um eine Verdünnung von 0,5 % GrowDex® zu erreichen wurden 432,9 µl Hydrogel, 807,1 µl BTM und 60 µl Zellsuspension zugegeben.

Um eine Verdünnung von 0,8 % GrowDex® zu erreichen wurden 639,6 µl Hydrogel, 410,4 µl BTM und 150 µl Zellsuspension zugegeben. Da die optimale Zelldichte hier noch erprobt wurde, wurde eine höhere Zellanzahl von 50000 Zellen/Well ausgesät.

Um eine Verdünnung von 1 % GrowDex® zu erreichen wurden 800,4 µl Hydrogel, 249,6 µl BTM und 150 µl Zellsuspension zugegeben. Da die optimale Zelldichte hier noch erprobt wurde, wurde eine höhere Zellanzahl von 50000 Zellen/Well ausgesät.

Die Suspension aus Zellen und Hydrogel wurde anschließend mit je 100 µl je Well in die 96-well-Platte überführt und mit 150 µl Medium bedeckt.

Der Wechsel und die Zugabe von BTM wurde wie bei der Kultur von Zellen in BME in 2.5.3 gehandhabt.

2.5.6 Einfrieren von Zellkulturen

Die vereinzelt Zellen in Blasentumormedium wurden für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 150 g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Das Zellpellet wurde in 1 ml resuspendiert und die Zellzahl mittels

Neubauer-Zählkammer ermittelt. Es wurde eine Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml in BTM eingestellt. Auf Eis wurden je 500 μ l Freeze-Medium und 500 μ l Zellsuspension in ein Kryoröhrchen gegeben, welches über Nacht im Gefrierschrank bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert wurde. Am nächsten Tag wurden die gefrorenen Zellen dann in den Stickstofftank bei $-270\text{ }^\circ\text{C}$ überführt und dort gelagert.

2.5.7 Auftauen von Zellkulturen

Um die eingefrorenen Zellen wieder aufzutauen und für eine Zellkultur nutzbar zu machen, wurden die tiefgefrorenen Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank im Wasserbad bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ geschwenkt, bis nur noch ein kleiner Eiskern übrigblieb. Die Zellen wurden in 15 ml Zentrifugationsröhrchen mit 10 ml kaltem FBS-haltigem Medium überführt und die Zellzahl wurde mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zentrifugationsröhrchen wurden bei 150 g und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert und das Zellpellet dann wie in 2.5.4 bzw. 2.5.5 für die Zellkultur genutzt.

2.6 Versuchsaufbau der Matrixvergleiche

Für den Vergleich der unterschiedlichen Matrices wurden drei etablierte Organoid-Zelllinien aus Blasen-tumorzellen in BME (wachstumsfaktoren-gemindert und nicht-wachstumsfaktoren-gemindert) und in Hydrogel überführt. Als Ziellinien wurden eine etablierte und kommerziell erwerbliche Blasen-tumor-Ziellinie genutzt, die erfolgreich in dreidimensionaler Kultur überführt werden konnte (RT112). Außerdem wurde eine aus solidem Tumor gewonnene Blasen-tumor-Ziellinie (BCO#140) und eine aus Urin von Patienten mit Blasen-tumor gewonnene Ziellinie (UCO#33) genutzt.

Es wurden je Well 10000 Zellen ausgesät und je Versuchsgruppe 6 Wells angelegt. Die Kultur der BME-Gruppen erfolgte in 48-Well-Platten, die der GrowDex®-Gruppen in 96 Well-Platten.

RT112 wurde für 7 Tage in Kultur gegeben, die Ziellinie BCO#140 für 11 Tage und die Ziellinie UCO#33 für 7 Tage. Anschließend wurde in zufällig ausgewählten Messfenstern wie in 2.7.1 der Durchmesser der enthaltenen

Organoide gemessen und zwischen den Gruppen BME und GrowDex® verglichen.

Die Charakteristika der Organoiden wurden anhand von beispielhaften Fluoreszenzfärbungen verglichen.

2.7 Auswertung

2.7.1 Wachstumserfassung

Für die Ausmessung der Organoiden und Sphäroide wurde ein zufälliges Messfenster in einem Lichtmikroskop bei 10-facher Vergrößerung ausgewählt und durch alle Ebenen der Probe durchfokussiert. Immer wenn in einer Ebene Zellverbände klar abgrenzbar fokussiert waren, wurden diese fotografisch festgehalten und anschließend auf den Bildern der größte Durchmesser ausgemessen. Für die Messungen wurde die Software ZEN 3.4 (blue edition) in der Version 3.4.91.00000 vom 06.05.2021 der Firma Karl Zeiss Microscopy GmbH genutzt.

Die gemessenen Daten wurden, wie in 2.7.8 beschrieben, gebündelt und die Versuchsgruppen durch die entsprechenden statistischen Tests verglichen.

2.7.2 Immunfluoreszenzfärbungen und immunhistochemische Färbungen

Proteine und damit Expressionsmuster und Eigenschaften von Zellen wurden in dieser Arbeit mit Antikörperfärbungen immunhistochemisch oder mit Immunfluoreszenz nachgewiesen, die an Paraffinschnitten oder Chamber Slides mit Primär- und Sekundärantikörpern durchgeführt wurden. Um eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers außerhalb der Bindungsstellen der Primärantikörper auszuschließen, wurden für jede Färbereihe Negativkontrollen durchgeführt, in denen auf die Paraffinschnitte oder die Chamber Slides nur der Sekundärantikörper ohne Primärantikörper gegeben wurde.

Um die Übersichtlichkeit der folgenden Abbildungen mit Immunfluoreszenzfärbungen zu gewährleisten sind diese nur beispielhaft abgebildet (Abb.1).

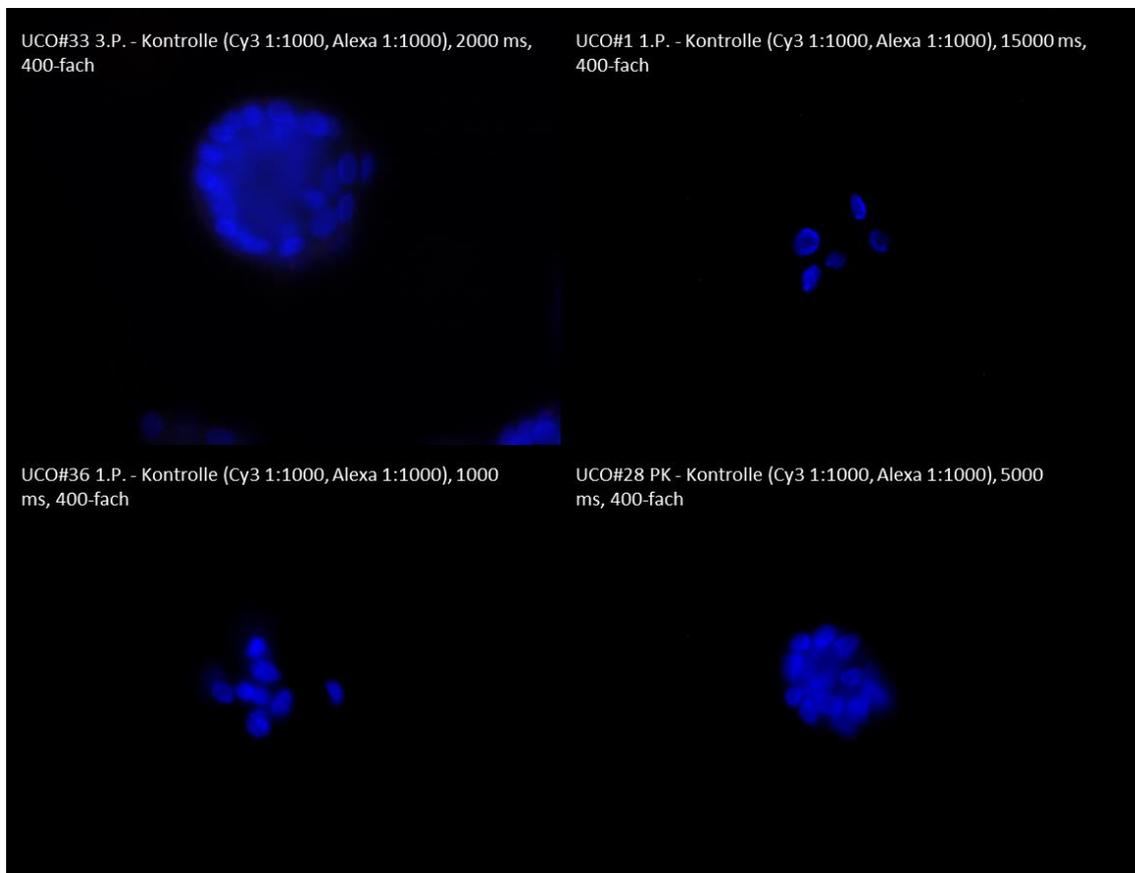


Abbildung 1 Beispielhafte Negativkontrollen (nur Sekundärantikörper Cy3 und Alexa488 ohne Primärantikörper) für die Fluoreszenzfärbungen. Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Zugehörige Färbungen sind oben links: Abb.23-24, oben rechts: Abb. 15-16, unten links: Abb.29-30, unten rechts: Abb. 20-22.

Traten in Immunfluoreszenzfärbungen, welche nicht wiederholt werden konnten, unspezifischen Färbungen auf, so weist der zugehörige Text darauf hin.

Entsprechende Kontrollen für die immunhistochemischen Färbungen wurden im Rahmen der Färbungen durch das Department für Pathologie und Neuropathologie standardisiert durchgeführt und sind hier nicht abgebildet.

2.7.3 Chamber Slides

Chamber-Slides wurden zur Immunfluoreszenzfärbung von Organoiden oder Sphäroiden angefertigt, wenn bei gut wachsenden Kulturen 3-4 Wells für die

Färbungen zur Verfügung standen und damit nicht genügend Material für die Einbettung der Zellen in Paraffinblöcke vorhanden war.

Zur Auflösung der 3D-Matrix wurden bei in BME kultivierten Proben je Well 100 µl Dispase zu dem Kulturmedium hinzugegeben und die Kulturplatte dann für eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die in der Lösung schwimmenden Organoide in 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt, die im Vorhinein mit 0,1 % BSA beschichtet wurden, um ein Anheften der Organoide am Plastik zu verhindern. Die entleerten Wells wurden mehrmals mit kaltem Splittingmedium ausgewaschen und das Splittingmedium ebenfalls in die Zentrifugationsröhrchen überführt. Die Zentrifugationsröhrchen wurden anschließend mit kaltem Splittingmedium auf 12 ml aufgefüllt und dann für 5 Minuten bei 150 g und Raumtemperatur zentrifugiert.

Bei den in GrowDex® kultivierten Proben wurde den Wells für jedes mg Cellulose 450 µg GrowDase™ zugesetzt, verdünnt in Arbeitsmedium. Die GrowDase™-Arbeitsmedium-Lösung hatte dabei das gleiche Volumen, wie die in dem Well enthaltene Matrix. Nun wurde die Kulturplatte für 8 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden auch die hier enthaltenen Organoide in beschichtete Zentrifugationsröhrchen überführt und die Proben, wie im vorigen Absatz beschrieben, abzentrifugiert.

Die von der jeweiligen Matrix befreiten Organoide oder Sphäroide lagen nun als Pellet vor. Von hier an wurde mit Proben beider Matrices gleich verfahren.

Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und je geplantem Chamber Slide 1160 µl kaltes Splittingmedium und 40 µl BME hinzugefügt und mit dem Pellet resuspendiert. Anschließend wurde in jede der 8 Kammern der Chamber Slides Platte 150 µl der Organoidsuspension gegeben und die Platte für 2 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um die enthaltenen Organoide absinken zu lassen.

Zur chemischen Fixierung der Probe wurde anschließend 250 µl PFA 4 % je Kammer hinzugegeben und die Probe für 30 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurde das PFA wieder abpipettiert und die Probe dreimal mit 250 µl PBS für 5 Minuten gewaschen. Anschließend wurde 250 µl Blockierlösung je Kammer

zugegeben, um die Zellmembranen zu permeabilisieren und unspezifische Bindungen möglichst zu verhindern. Die Proben wurden 30 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend für 5 Minuten mit 250 µl PBS je Kammer gewaschen.

2.7.4 Fluoreszenzfärbung von Chamber Slides

Die Fluoreszenzfärbung wurde mit den in 2.7.2 beschriebenen vorbereiteten Chamber Slides und unter möglichst lichtarmen Kautelen durchgeführt.

Die entsprechenden Primärantikörper wurden, wie in der Tabelle in 2.7.8 angegeben, in 1 % BSA/PBS verdünnt. Nun wurde das PBS von den Kammern vorsichtig abpipettiert und 100 µl der Antikörperlösung je Kammer hinzugegeben. Einer Kammer, im Regelfall der 8. Kammer, wurde ausschließlich 100 µl PBS als Kontrolle des Sekundärantikörpers zugegeben. Die Kammern wurden in einer feuchten Kammer bei 37° C und 5 % CO₂ für 1 Stunde inkubiert. Danach wurde der Primärantikörper abpipettiert und die Kammer dreimal für 3 Minuten mit je 250 µl PBS gewaschen.

Anschließend wurden die fluoreszenzmakierten Sekundärantikörper (ALEXA488, Cy3) im Verhältnis 1:1000 zusammen in einem Eppendorfgefäß in BSA 1 % verdünnt, 100 µl je Kammer zugegeben und für eine Stunde in einer feuchten Kammer bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Durch Zugabe von 1 µl einer DAPI-Stammlösung wurden die Zellkerne angefärbt. Der Sekundärantikörper wurde dann abpipettiert und die Kammern für dreimal 3 Minuten mit 250 µl PBS je Kammer gewaschen.

Zuletzt wurde die Plastikabtrennung zwischen den Kammern entfernt und die Objektträger mit Mountingmedium und Deckgläschen eingedeckt.

2.7.5 Einbettung von Proben in Paraffin

Die Einbettung von Proben in Paraffin wurde genutzt, um Gewebeschnitte für Immunfluoreszenzfärbungen und immunhistochemische Färbungen anzufertigen. Organoid- oder Sphäroidkulturen wurden in Paraffinblöcke überführt, wenn mindestens 8 Wells aus einer Kultur für die Färbungen zur Verfügung standen. Diese Methode wurde nur mit Kulturen in BME durchgeführt.

Jedem Well der zu färbenden Zellkultur wurde 100 µl Dispase zugegeben, ohne das Medium vorher abzunehmen. Die Kulturplatte wurde dann für eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um die Matrix aufzulösen. Anschließend wurden die gelösten Organoide in 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt, die zuvor mit 0,1 % BSA beschichtet wurden, um ein Anheften der Organoide zu verhindern. Es folgte eine Zentrifugation der Zentrifugationsröhrchen für 2 Minuten bei 150 g und Raumtemperatur. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in 500 µl 4 % Paraformaldehyd (PFA) resuspendiert und in ein mit 0,1 % BSA beschichtetes Eppendorfgefäß überführt. Die Organoide wurden dann über Nacht zur Fixierung im Kühlschrank gelagert.

Die Eppendorf Gefäße mit den fixierten Organoiden wurden bei 150 g für 2 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und das überstehende PFA abgenommen und fachgerecht entsorgt. Nun wurden 300 µl, auf 60 °C erhitztes Histogel zugegeben und die Probe darin vorsichtig und möglichst ohne Bildung von Luftblasen resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension in eine Cryomold-Plastikform gegeben und im Kühlschrank ausgehärtet. Die nach 30 Minuten ausgehärtete Probe wurde in eine Einbettungskassette überführt. Die in Histogel eingebetteten Organoide wurden in 70 % Ethanol für bis zu einer Woche gelagert und dann in das Paraffinierungsronnel überführt und hier nach folgendem Schema (Tab. 3) durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert, mit Xylol gereinigt und schrittweise durch Paraffin infiltriert.

Schritt	Reagenz	Zeit in Stunden
1	70 % Ethanol	1,5
2	70 % Ethanol	1
3	96 % Ethanol	1,5
4	96 % Ethanol	1
5	100 % Ethanol	1,5
6	100 % Ethanol	1
7	100 % Ethanol	1
8	Xylol	1,5
9	Xylol	1,5
10	Xylol	1
11	Paraffin	1,5
12	Paraffin	1,5

Tabelle 3 Konzentrations- und Zeitangaben der für die Paraffineinbettung genutzten Alkohol-Paraffinreihe.

Anschließend wurden die Proben mithilfe der Einbettmaschine in Paraffinblöcke eingegossen und in den Kühlschrank gegeben.

Die ausgehärteten Blöcke konnten anschließend mit einem Mikrotom bei einer Schnittdicke von 3 µm geschnitten, auf Objektträger gegeben und bei Raumtemperatur getrocknet werden.

2.7.6 Entparaffinierung und Demaskierung von Paraffinschnitten

Die benötigte Anzahl der Objektträger, je ein Probenschnitt je Färbung und ein Schnitt für die Negativkontrolle des Sekundärantikörpers, mit den angetrockneten Paraffinschnitten wurde lichtmikroskopisch auf enthaltene Organoide oder Sphäroide überprüft.

Die auf den Objektträgern aufliegenden Paraffinschnitte wurden mit Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe nach folgendem Schema rehydriert (Tab.4).

Schritt	Reagenz	Zeit in Minuten
1	Xylol	15
2	Xylol	15
3	Xylol	15
4	100 % Ethanol	3
5	100 % Ethanol	3
6	96 % Ethanol	3
7	96 % Ethanol	3
8	75 % Ethanol	3
9	75 % Ethanol	5
10	30 % Ethanol	5
11	H ₂ O	5

Tabelle 4 Konzentrations- und Zeitangaben der für die Rehydrierung genutzten absteigenden Alkoholreihe.

Zur Demaskierung der Epitope und weiteren Permeabilisierung der Zellmembranen für die immunhistochemischen und Immunfluoreszenzfärbungen wurde mit der HIER-Methode (heat induced epitop retrieval) gearbeitet. Die Objektträger wurden für 10 Minuten bei 85 °C im Tris-Urea-Puffer mit einem pH von 9,5 inkubiert und anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur in PBS gepuffert.

2.7.7 Fluoreszenzfärbung von Paraffinproben

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden die entparaffinierten und demaskierten Proben aus 2.7.5 genutzt. Die Färbung wurde unter möglichst lichtarmen Kautelen durchgeführt, um die Fluoreszenzfarbstoffe nicht auszubleichen.

Für die Färbungen wurden die entsprechenden Primärantikörper in BSA 0,1 % verdünnt. Dafür wurden je Objektträger 100 µl BSA 0,1 % in ein Eppendorfgefäß vorgelegt und falls möglich jeweils ein anti-rabbit und ein anti-mouse Antikörper in der entsprechenden Verdünnung hinzupipettiert. Mit einem Kreisschüttler wurden die Antikörper in der Lösung homogen verteilt.

Das PBS wurde von den Objektträgern vorsichtig abgeschüttet und auf jeden Objektträger 100 µl der vorbereiteten Lösungen mit den unterschiedlichen Primärantikörpern gegeben. Auf einen Objektträger wurde lediglich 0,1 % BSA in PBS gegeben, da sie als Negativkontrolle der Sekundärantikörper fungierten. Anschließend wurden die Objektträger für 24 Stunden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Objektträger wurden dreimal für je 3 Minuten mit je 250 µl PBS vorsichtig gewaschen, um die überschüssigen Antikörper zu entfernen.

In einem Eppendorfgesäß wurden die Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:1000 verdünnt. DAPI zur Darstellung des Chromatins und damit der Zellkerne wurde jeder Färbung zugegeben. Die Sekundärantikörper anti-mouse Immunglobulin mit Cy3-Markierung und anti-rabbit Immunglobulin mit Alexa488 Markierung und DAPI wurden zu allen Proben, einschließlich den Negativkontrollen, zugegeben

Dazu wurden je 100 µl der Lösung auf die Objektträger zu den Schnitten pipettiert und diese für eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger dreimal für je 3 Minuten mit je 250 µl PBS gewaschen und dann das überschüssige PBS gründlich abgeschüttet.

Die Objektträger wurden mit Fluorescence Mounting Medium und Deckglässchen eingedeckt und bis zur Auswertung im Kühlschrank unter lichtfreien Bedingungen gelagert.

Die Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop. Es wurden Bilder von repräsentativen Organoiden oder Sphäroiden in allen Färbungen und den Kontrollen in 400-facher und teilweise 200-facher Vergrößerung angefertigt. Die empfohlenen Belichtungszeiten wurden durch das Programm Axiovision (Version 4.8.2 06/2010) der Firma Zeiss berechnet. Dazu wurde die Belichtungszeit der Negativkontrolle zugrunde gelegt.

2.7.8 Immunhistochemische Färbungen von Paraffinproben

Für die Immunhistochemischen Färbungen wurden die entparaffinierten, rehydrierten und demaskierten Proben aus 2.7.5 genutzt.

Die Färbung der Antigene p63, p53, CD44, GATA-3, CK 5/6, CK7, CK20 und die HE-Färbungen wurden in freundlicher Zusammenarbeit mit dem Department für Pathologie und Neuropathologie der Universitätsklinik Tübingen von den Kollegen des immunhistochemischen Labors maschinell durchgeführt.

Die im Folgenden beschriebene Färbemethode wurde in unserem Labor für die Antigene CD24 und GATA-3 (als Positiv-Kontrolle) sowohl für Paraffinschnitte aus Gewebeproben als auch für solche aus Organoiden durchgeführt.

Für die Färbungen wurde das ZytoChem-Plus HRP Polymer-Kit verwendet, in dem ein Großteil der benötigten Färbematerialien schon in standardisierter Verdünnung vorliegen und welches als CE zertifiziertes in-vitro-Diagnostikum zugelassen ist.

Die Objektträger wurden wie in 2.7.5 beschrieben rehydriert und demaskiert. Anschließend wurden endogene Peroxidasen, die in der Färbung zu unerwünschter Hintergrundfärbung führen können, durch 10-minütiges Inkubieren der Objektträger mit je 100 µl eines Peroxidblocks (3 % H₂O₂-Lösung) inhibiert und die Proben anschließend für 2 Minuten mit je 500 µl PBS gewaschen.

Unspezifische Hintergrundfärbungen des Primär- oder Sekundärantikörpers wurden durch die 5-minütige Inkubation mit je 100 µl einer weiteren Blockierlösung (Reagent 1) vermindert. Nachdem die Probe für 2 Minuten mit je 500 µl PBS gewaschen wurde, erfolgte die Inkubation mit 100 µl von den nach 2.7.8 verdünnten Primärantikörpern oder der Negativkontrolle aus PBS. Die Gewebeproben wurden für 60 Minuten bei 37°C und 5 % CO₂ in einer feuchten Kammer inkubiert, die Organoidschnitte bei Raumtemperatur über Nacht, ebenfalls in einer feuchten Kammer. Nach dreimaligem Waschen der Proben mit je 500 µl PBS, um unspezifische Färbungen durch verbliebene ungebundene Primärantikörper zu verhindern, wurden je 100 µl eines Verstärkungsreagenz (Reagent 2) auf die Proben gegeben und für 20 Minuten inkubiert. Anschließend

wurden die Objektträger erneut dreimal für je 5 Minuten mit je 500 µl PBS gewaschen. Nun wurden die Proben mit je 100 µl HRP-Polymer, welches kovalent verbundene Sekundärantikörper mit Meerrettich-Peroxidase enthält, für 60 Minuten inkubiert, sodass der Sekundärantikörper den Fc-Teil des Primärantikörpers binden konnte. Dann wurden die Proben dreimalig für je 2 Minuten mit je 500 µl PBS gewaschen.

Anschließend wurden die Proben mit je 100 µl DAB, welches eine Reaktion mit der Peroxidase eingeht und damit einen braunen Farbumschlag der antikörpermarkierten Strukturen bedingt, unter lichtmikroskopischer Kontrolle inkubiert, bis der Farbniederschlag sichtbar war. Dann wurde die Reaktion mit H₂O im Wasserbad gestoppt.

Um die Zellen in der Färbung zu identifizieren, wurde nun für die Hintergrundfärbung 2 Tropfen Hämatoxylin-Lösung je Objektträger zugegeben und die Gewebeproben für 4 Minuten inkubiert, die Organoidproben für 14 Minuten. Die gefärbten Proben wurden nun bei Raumtemperatur für 10 Minuten bei fließendem Wasser im Wasserbad gewaschen und anschließend mit Mounting-Medium und Deckglas bedeckt.

Der für die quantitative Einschätzung der Expression der Proteine genutzte Histoscore berechnet sich aus den prozentualen Mengen der leicht, mittel und stark angefärbten Zellen oder Zellkerne nach folgender Formel:

Histoscore = (Prozent leicht angefärbter Zellen/Zellkerne)+(Prozent mäßig stark angefärbter Zellen/Zellkerne x 2)+(Prozent maximal stark angefärbter Zellen/Zellkerne x 3)

2.7.9 Antikörper

In der folgenden Tabelle (Tab. 5) sind die Primär- und Sekundärantikörper aufgeführt, die für die Immunfluoreszenz-Färbung der Chamberslides in 2.7.3 und die der Paraffinschnitte in 2.7.6 genutzt wurden mit den notwendigen Verdünnungen abgebildet.

Antikörper	Hersteller	Verdün- nung Chamber Slides	Verdün- nung Paraffin- schnitte	Klon	Katalog- nummer
Alexa488	Jackson Immuno Research, UK	1:1000	1:1000	-	115-165- 166
DAPI	Sigma Aldrich, USA	1:1000	1:1000	-	SigmaD8 417 10mg/28, 4ml H2O
Cy3	Jackson Immuno Research, UK	1:1000	1:1000	-	111-545- 045
rb.Anti- GATA-3	Abcam, UK	1:100	1:50	IgG, polyklonal	Ab10662 5
rb.Anti- CK7	Abcam, UK	1:300	1:100	IgG, monoklonal EPR1619Y	Ab68459
rb.Anti- CK5	BioLegend, USA	1:200	1:50	hauptsächlich IgG, polyklonal poly19055	905504/1 00µg
rb.Anti- CD276	Abcam, UK	1:100	1:100	IgG, polyklonal	Ab22625 6
rb.Anti- TP63	Invitrogen, Thermo Fischer, USA	1:100	1:50	IgG, rekombinant, monoklonal 10H7L17	703809

rb.Anti- CD24	Abcam, UK	1:100	1:50	IgG, EPR19925	Ab20207 3
rb.Anti- Perlecan	-	1:200	1:100	Freundliche Überlassung der Arbeitsgemeinschaft Prof. Dr. Klein, Medizinische Klinik	
rb.Anti- FGFR-3	Abcam, UK	1:100	-	IgG1, monoklonal EPR2281(3)	Ab15596 0
ms.Anti- AE1/AE3	Merck, DE	1:200	1:100	IgG1, monoklonaler Klon AE1/AE3	Mab3412
ms.Anti- p53	Invitrogen, Thermo Fischer, USA	1:100	1:50	IgG1, monoklonal, PAb 240	MA5- 15244
ms.Anti- Vimentin	Becton Dickinson, USA	1:100	1:50	IgG1, monoklonal, RV202	550513
ms.Anti- S-100-P	Becton Dickinson, USA	1:100	1:100	IgG1, monoklonal, 16/S100P	610306
ms.Anti- CK20	Merck, DE	1:100	1:50	IgMk, monoklonaler Klon XQ1	Mabt845- 25UG
ms.Anti- FGFR-3	Invotrogen, Thermo Fischer, USA	-	1:50	IgG1, monoklonal OTI1B10	MA5- 26493
ms.Anti- CD44	Abcam, UK	1:200	1:50	IgG1, MEM- 263	Ab9524

ms.Anti-Ki67	Biomol-Arigo, DE	1:100	1:100	IgG1, monoklonal, ARG57562	Arg57562
--------------	------------------	-------	-------	----------------------------	----------

Tabelle 5 Liste der für die Immunfluoreszenzfärbung genutzten Antikörper mit Spezifizierungen, Hersteller und Verdünnungsangaben für Paraffinschnitte und Chamber Slides, Klon- und Bestellinformationen.

Die einzelnen für die Experimente genutzten Färbeschemata sind den Tabellen im Ergebnisteil zu entnehmen.

2.7.10 Statistik

Für die statistische Auswertung der verschiedenen Versuche, sowie für die statistischen Diagramme wurde das Statistikprogramm IBM SPSS Statistics 27 genutzt.

Alle ausgewerteten Messreihen wurden zuerst auf Normalverteilung getestet. Hierzu wurde ein Histogramm erstellt und mit der Normalverteilungskurve abgeglichen. Auch wurde eine deskriptive Statistik errechnet und Schiefe und Kurtosis betrachtet, die bei einer Normalverteilung zwischen -1 und 1 liegen. Abschließend wurden der Kolmogorov-Smirnov-Test und der Shapiro-Wilk-Test durchgeführt, bei denen eine Signifikanz von $p < 0,05$ gegen eine Normalverteilung spricht.

Wenn eine Normalverteilung anzunehmen war, wurden die Mittelwerte errechnet und diese mittels T-test für nicht-verbundene Stichproben bei paarigen Vergleichen und eine multifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) für mehr als 2 Gruppen verglichen.

Für die Messreihen, in denen für mindestens eine Gruppe keine Normalverteilung anzunehmen war, wurde für paarige Vergleiche der Mediane ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt, der bei einer Signifikanz von $p < 0,05$ auf einen Unterschied der beiden Mediane hinweist. Für Vergleiche von mehr als 2 Gruppen wurde ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt, bei dem bei einer Signifikanz von $p < 0,05$ ein Unterschied zwischen mindestens 2 der Gruppen anzunehmen ist.

3 Ergebnisse

3.1 Zellisolation

Bei der Etablierung eines Protokolls zur Isolation und Kultivierung von Zellen aus Spülurinproben traten im Vergleich zum etablierten Protokoll für die Aufarbeitung solider Tumorproben und den in der Literatur vorbeschriebenen Protokollen zur Zellisolation aus Urin verschiedene technische Herausforderungen auf. Nach der ersten Zentrifugation der Urinproben verblieben weiße Schleier über dem Pellet, was für eine Kosedimentation von Zellen mit unlöslichen Bestandteilen des Urins sprach. Einige Proben waren durch die, typischerweise bei Blasentumorpatienten auftretende, Hämaturie massiv mit Erythrozyten durchsetzt.

3.1.1 Zentrifugationszeiten

Zur Separation der zellulären von den restlichen Bestandteilen der Urinprobe wurde zuerst eine Zentrifugation bei 150 g Beschleunigung und 7 Minuten Dauer bei Raumtemperatur erprobt (UCO#1). Im Überstand der zentrifugierten Probe waren deutliche weiße Schlieren zu sehen und das Zellpellet war nicht klar zum Überstand abgrenzbar, was vermuten ließ, dass ein Anteil der enthaltenen Zellen noch im Überstand schwebte. Nach der Durchführung eines zweiten Zentrifugationsschrittes bei dieser Probe mit erneut 150 g für 7 Minuten bei Raumtemperatur, waren keine Schlieren mehr sichtbar und das Pellet war klar abgrenzbar.

Bei der Probe UCO#2 wurde die Zentrifugationszeit auf 10 Minuten erhöht, wobei erneut Schlieren auftraten und ein zweiter Zentrifugationsschritt notwendig war.

In den folgenden aufgearbeiteten Urinproben, UCO#3 bis UCO#14, wurde die Zentrifugationsbeschleunigung schrittweise um 50 g erhöht, sobald weiße Schlieren auftraten (Tab. 6).

Probe	Zentrifugations-zeit in Minuten	Zentrifugations-beschleunigung	Überstand nach 1. Zentrifugation	Zusätzlicher Zentrifugations-schritt
UCO#1	7	150 g	Schlieren	7 Minuten 150 g
UCO#2	10	150 g	Schlieren	7 Minuten 150 g
UCO#3	10	200 g	Schlieren	-
UCO#4	10	200 g	Schlieren	-
UCO#5	10	200 g	klar	-
UCO#6	10	200 g	klar	-
UCO#8	10	200 g	klar	-
UCO#9	10	200 g	klar	-
UCO#10	10	200 g	klar	-
UCO#11	10	200 g	Schlieren	7 Minuten 150 g
UCO#12	10	250 g	klar	-
UCO#13	10	250 g	klar	-
UCO#14	10	250 g	klar	-

Tabelle 6 Zentrifugationszeiten und -geschwindigkeiten für die Zellisolation der Urinproben, durchgeführt mit einer Hereus Multifuge 3SR+ mit Ausschwingrotor.

Bei einer Zentrifugation der Urinproben mit einer Hereus Multifuge 3SR+ Zentrifuge für 10 Minuten bei 250 g trat keine weitere Schlierenbildung mehr auf und die Zellpellets waren klar vom Überstand abgrenzbar. Diese Zentrifugationsparameter wurden für das Protokoll übernommen.

3.1.2 Etablierung eines Lysepuffers

Insbesondere bei den Proben UCO#1, UCO#2, UCO#5, UCO#9, UCO#12 und UCO#13 war die Anzahl der enthaltenen Erythrozyten so hoch, dass das Auszählen und somit die Einstellung der Zelldichte für die Primärkultur nicht möglich war.

Durch die Anwendung eines Lysepuffers konnte eine Reduktion der Kontamination der Proben durch Erythrozyten etabliert und eine deutliche Reduktion der Erythrozyten in den Kulturen erreicht werden (Abb. 2).

Um eine potentielle Wachstums-Beeinflussung der Blasentumorzellen durch den Lysepuffer in der 3-D-Kultur zu untersuchen, wurde die etablierte Blasentumorzellreihe RT112 in 2 Versuchsgruppen mit dem Lysepuffer auf Eis für 5 Minuten und 10 Minuten behandelt und in einer Kontrollgruppe für 10 Minuten in PBS inkubiert.

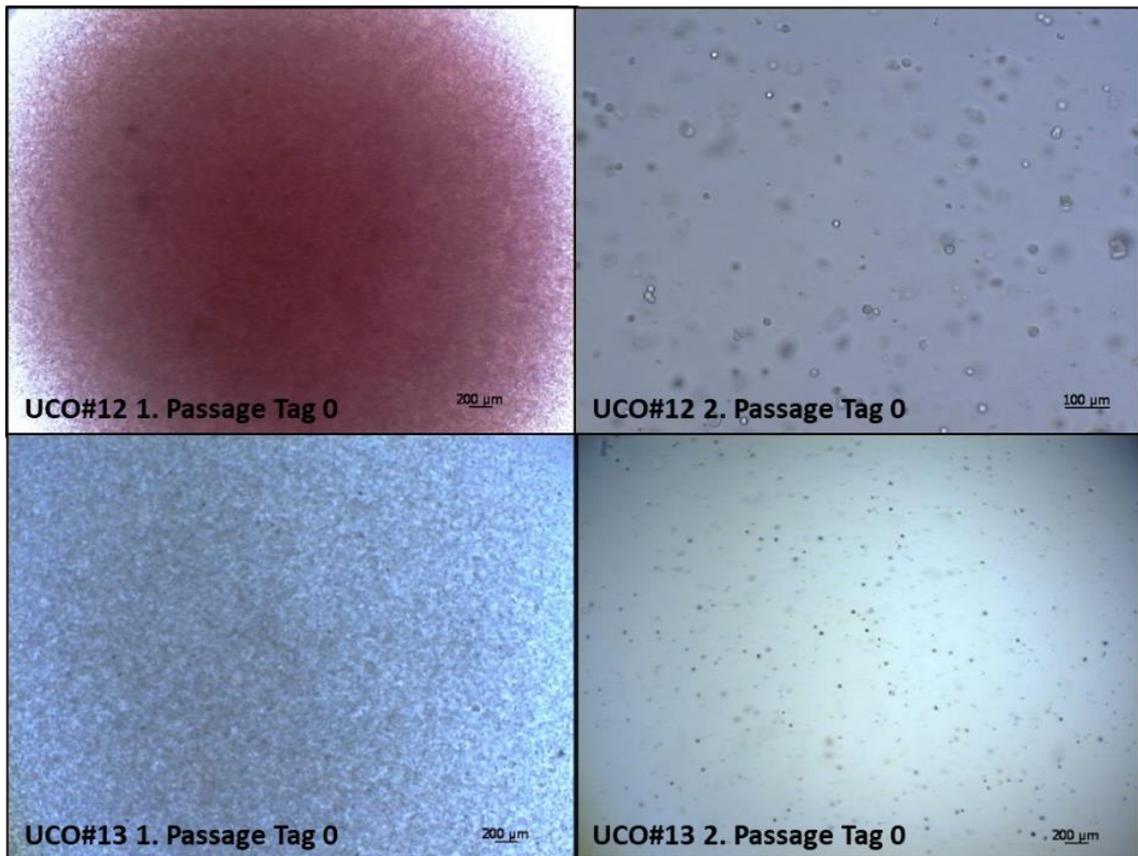


Abbildung 2 Effekt des Lysepuffers auf die Zellkultur bei Zugabe des Puffers zwischen der 1. und der 2. Passage. Obere Zeile: UCO#12, Untere Zeile: UCO#13. Lichtmikroskopische Bilder in 25-facher Vergrößerung.

Nach 7 Tagen wurden in einem zufällig ausgewählten Messfenster gleicher Größe alle sichtbaren Zellkonglomerate und Organoide lichtmikroskopisch ausgemessen.

Es wurden in den Versuchsgruppen 5-Minuten-Lysepuffer 60 und in der Gruppe 10-Minuten-Lysepuffer 64 Organoide und Konglomerate ausgemessen. In der Kontrollgruppe waren 38 Organoide und Konglomerate ausmessbar (Abb.3).

Im Histogramm mit Normalverteilungskurve war keine Normalverteilung ersichtlich. Sowohl im Kolmogorov-Smirnov Test (p für 5 Minuten=0,049; p für 10 Minuten <0,001; p für PBS=0,007) als auch im Shapiro-Wilk Test (p <0,001 für alle Gruppen) lagen die Signifikanzen der Gruppen unter 0,05, was ebenfalls nicht für eine Normalverteilung der Daten sprach.

In der Versuchsgruppe 5-Minuten-Lysepuffer zeigte sich ein Median von 66,23 μm . In der Versuchsgruppe 10-Minuten-Lysepuffer zeigte sich ein Median von 65,2 μm . In der Kontrollgruppe PBS zeigte sich ein Median von 63,63 μm .

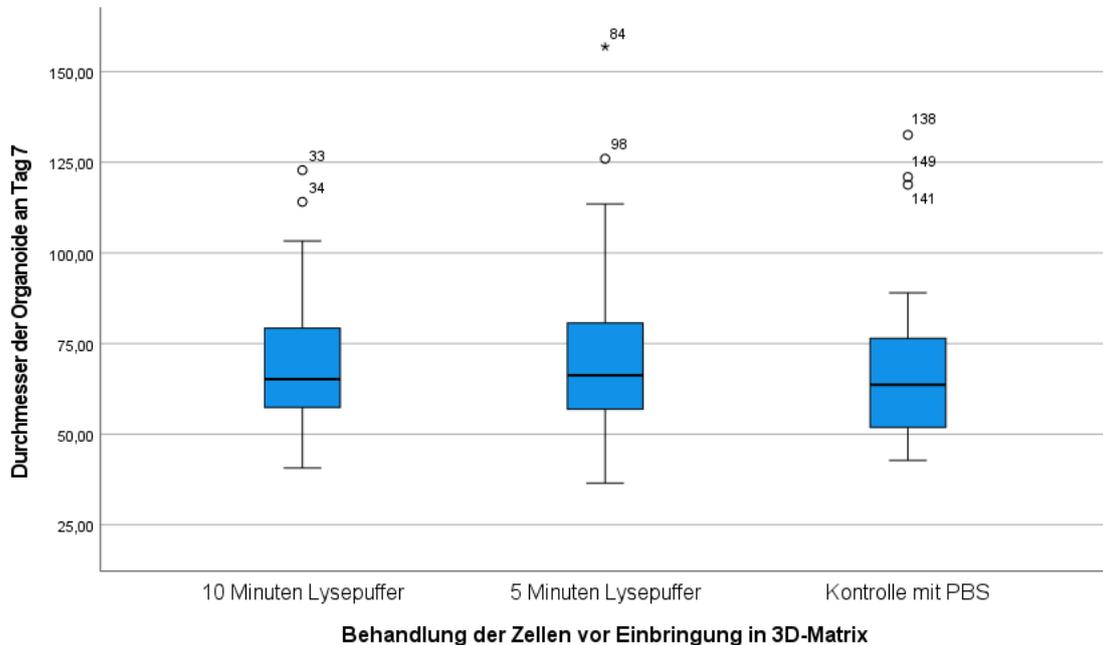


Abbildung 3 Boxplotdiagramm der gemessenen Durchmesser der Organoide und Konglomerate im Lysepufferversuch.

Bei einer Signifikanz größer 0,05 ($p=0,546$) im Kruskal-Wallis-Test ist ein signifikanter Unterschied der Mediane der Rangzahlen nicht wahrscheinlich.

Bei dem direkten Vergleich der Gruppen untereinander im Mann-Whitney U-Test beträgt die Signifikanz der Unterschiede der Mediane ebenfalls jeweils über 0,05 (10 Minuten und 5 Minuten $p=0,797$; 10 Minuten und PBS $p=0,326$; 5 Minuten und PBS $p=0,336$). Ein signifikanter Unterschied der Gruppen kann also auch hier nicht angenommen werden.

Somit gab es keinen Hinweis auf einen statistischen Unterschied der Mediane der Organiddurchmesser in den Versuchsgruppen und der Erythrozyten-Lysepuffer wurde in das Protokoll zur Zellisolation aus Urin aufgenommen.

3.2 Wachstum und Passagierung

3.2.1 Übersicht und Passagen

Von 35 aufgearbeiteten Spülurinproben konnten in 28 Fällen (80 %) tumorsuspekte Zellen isoliert werden. Die folgenden Angaben beziehen sich jeweils auf die Gesamtanzahl der Proben (n=35 bzw. n=23). In 27 Proben (77 %) konnte ein Wachstum der Zellen zu Sphäroiden beobachtet werden. Nach der Überführung in die 1. Passage zeigten noch 20 Kulturen (57 %) sphäroidales Wachstum. In der 2. Passage konnten noch in 12 Kulturen (34 %) Sphäroide beobachtet werden. Die 3. Passage erreichten 7 Zellkulturen (20 %). In der 4. Passage wurden noch in 4 Kulturen (11 %) Sphäroide beobachtet. Eine Zellkultur (3 %), UCO#33, erreichte die 5. Passage und konnte auch darüber hinaus weiter kultiviert und damit als Organoidzellreihe etabliert werden.

Von den 23 aufgearbeiteten soliden Tumorproben, die jeweils bei demselben Eingriff entnommen wurden, wie eine der aufgearbeiteten Spülurinproben, wurden in 20 Fällen (87 %) tumorsuspekte Zellen isoliert, in 19 Primärkulturen (82 %) konnten Sphäroide beobachtet werden. In der 1. Passage zeigten noch 9 Zellkulturen (39 %) sphäroidales Wachstum. In der 2. Passage konnten bei 3 Kulturen (13 %) Sphäroide beobachtet werden. Eine Kultur (4 %) zeigte in der 3. Passage Sphäroide, die 4. oder 5. Passage erreichte keine der Kulturen.

Zusammenfassend zeigte sich eine initial höhere Rate von sphäroidbildenden Zellkulturen in den aufgearbeiteten soliden Tumoren gegenüber den aufgearbeiteten Spülurinen. In den höheren Passagen wuchsen aber in den Spülurinkulturen deutlich mehr Kulturen in dreidimensionaler, organisierter Form.

Im Folgenden wurden verschiedene vergleichende Messungen durchgeführt, die das Wachstum von den aus Spülurin gewonnenen Zellkulturen gegen das Wachstum von aus soliden Tumorgewebe gewonnen Kulturen untersuchten.

Des Weiteren sind die Beschreibungen der Zellkulturen ausgeführt, die genug Zellmasse generierten, um in die in 3.4 beschriebene Immunfluoreszenz überführt werden zu können und zu denen teilweise in 3.5 die immunhistochemischen Färbungen der Ursprungstumoren beschrieben sind.

3.2.2 Vergleichende Wachstumsmessungen in Kulturen aus Urin und soliden Tumoren

In 8 Fällen gab es sowohl Messungen der Größenzunahme von Sphäroiden in der Kultur aus Spülurin als auch von der zugehörigen soliden Tumorkultur in der 1. Passage.

Kulturpaare	Probe	1. Messung in μm	2. Messung in μm	Tag 1. Messung	Tag 2. Messung	Steigung	Differenz ($\Delta\text{UCO}-\Delta\text{BCO}$)
1	UCO#5	73,4	85,1	2	5	3,9	+7,3
	BCO#174	43	32,8	2	5	-3,4	
2	UCO#11	53	50,6	2	5	-0,8	-2,2
	BCO#175	67,2	71,4	2	5	1,4	
3	UCO#12	0	0	2	4	0	-0,5
	BCO#176	56,7	58	1	4	0,5	
4	UCO#16	0	0	1	10	0	-3,2
	BCO#187	61	77	1	6	3,2	
5	UCO#17	91,2	102,3	1	4	3,7	+21,9
	BCO#186	54,5	0	1	4	-18,2	
6	UCO#25	46,3	66,8	1	3	10,3	+10,3
	BCO#211	0	0	1	3	0	
7	UCO#26	0	0	2	6	0	-2,8
	BCO#213	43,3	54,4	2	6	2,8	
8	UCO#27	0	58,9	1	11	5,9	+0,7
	BCO#214	0	51,4	1	11	5,1	

Tabelle 7 Ergebnisse der Wachstumsmessung der Organoide aus Urin und Tumorgewebe und die daraus resultierende Steigung. Zusammengehörige Proben sind mit der gleichen Farbe unterlegt. Die beiden rot geschriebenen Differenzen zeigen die größten beobachteten Werte.

An zwei Zeitpunkten wurden in zufälligen Messfenstern alle Sphäroide und Zellkonglomerate ausgemessen und ein Mittelwert gebildet. Aus den errechneten mittleren Durchmessern und der Kulturzeit wurde eine Steigung errechnet und diese dann zwischen Spülurinkultur und der aus solidem Tumor verglichen. In den zufällig ausgewählten Messfenstern waren in 4 Fällen ein stärkeres Wachstum bei den soliden Tumoren zu beobachten, in 4 Fällen zeigten die Spülurinkulturen einen größeren Zuwachs. Der Unterschied der Größenzunahme (Tab. 7) war bei 3 der 4 Spülurinproben gegenüber den soliden Tumoren aber wesentlich größer als bei den Fällen, in denen die soliden Tumorproben die größere Zunahme zeigten.

Zusammenfassend lassen die vorliegenden Messungen vermuten, dass es keinen klaren Nachteil im Wachstum der Spülurinkulturen gegenüber den soliden

Tumorproben gibt. Es konnte außerdem beobachtet werden, dass der Unterschied besonders deutlich war, wenn die Spülurine ein besseres Wachstum zeigten. Die zugehörigen Kulturen aus soliden Tumorproben wuchsen in diesen Fällen gar nicht oder die Sphäroide wurden kleiner.

3.2.3 Zunahme der Zellkulturgrößen

Einen groben Rückschluss auf die Zunahme der Zellmasse in den Kulturen erlaubt die Betrachtung der Zunahme der Anzahl der Wells in den 48-Well-Platten über die Passagierungen.

Betrachtet man die Entwicklung der Well-Anzahlen von der Primärkultur zur 1. Passage bei 13 Paarungen von Spülurinproben und solchen aus soliden Tumoren (Tab. 8), lässt sich in 5 Fällen eine stärkere Zunahme der Well-Anzahlen bei den Spülurinkulturen erkennen, in 8 Fällen eine stärkere Zunahme bei den soliden Tumorkulturen. Da die Unterschiede teilweise sehr gering sind, ließ sich kein klarer Nachteil der Spülurinkulturen gegenüber den soliden Tumorproben in der Zunahme der Zellkulturgröße vermuten.

Kulturpaarung	Kultur	Wells Primärkultur	Wells 1.Passage	Differenz	Differenz UCO-BCO
1	UCO#1	7	13	6	6
	BCO#172	6	6	0	
2	UCO#2	7	8	1	7
	BCO#173	6	0	-6	
3	UCO#5	7	7	0	-1
	BCO#174	6	7	1	
4	UCO#11	7	7	0	-1
	BCO#175	7	8	1	
5	UCO#12	6	7	1	-1
	BCO#176	6	8	2	
6	UCO#14	6	10	4	4
	BCO#182	6	6	0	
7	UCO#16	6	3	-3	-4
	BCO#187	7	8	1	
8	UCO#17	6	11	5	4
	BCO#186	6	7	1	
9	UCO#18	7	6	-1	-1
	BCO#188	6	6	0	
10	UCO#19	26	0	-26	-23
	BCO#199	3	0	-3	
11	UCO#25	5	7	2	6
	BCO#211	7	3	-4	
12	UCO#26	29	7	-22	-37
	BCO#213	6	21	15	
13	UCO#27	28	21	-7	-10
	BCO#214	6	9	3	

Tabelle 8 Anzahl der Wells in Primärkultur und 1. Passage, sowie die Differenz in korrespondierenden Kulturen aus Urin und Tumorgewebe. Zusammengehörige Proben sind gleichfarbig unterlegt.

3.2.4 UCO#1

In der Primärkultur zeigte sich das Wachstum von runden, bis zu ca. 70 µm durchmessenden Konglomeraten und Sphäroiden. Im Laufe der weiteren Passagen wurden diese immer weniger, sodass die Kultur in der 5. Passage verworfen wurde

Die zugehörige Kultur aus solidem Tumorgewebe (BCO#172) wurde in der 4. Passage verworfen.

3.2.5 UCO#18

In der Primärkultur und der 1. Passage zeigte UCO#18 ein Wachstum mit dreidimensionaler Organisation in sphäroidalen Zellverbänden und Einzelzellen. In der dritten und vierten Passage waren kaum noch Zellkonglomerate sichtbar und die Kultur wurde in der 4. Passage verworfen

Die zugehörige Kultur aus solidem Tumorgewebe BCO#188 (Kultur durch Johannes Schneider) zeigte in der Primärkultur ein ähnliches Wachstum, musste aber schon in der 2. Passage verworfen werden.

3.2.6 UCO#20

In der Primärkultur wurden keine Sphäroide beobachtet. In der 1. Passage bildeten sich jedoch einzelne sphärische Zellkugeln aus, welche im Verlauf immer weniger wurden und die Kultur wurde nach der 5. Passagierung verworfen.

Eine zugehörige Kultur aus solidem Tumorgewebe gab es nicht.

3.2.7 UCO#25

Diese Kultur zeigte Sphäroide in der Primärkultur, die ab der 1. Passage einen deutlich kleineren Durchmesser zeigten und in der 2. Passage nicht mehr auftraten, weshalb die Kultur verworfen wurde.

Die zugehörige Kultur BCO#211 wurde in der 1. Passage verworfen.

3.2.8 UCO#28

In der Primärkultur war eine Bildung von Sphäroiden beobachtbar, in der 1. Passage zeigten sich nur noch größenpersistente Einzelzellen, sodass die Kultur verworfen wurde.

Die zugehörige Kultur aus solidem Tumorgewebe BCO#216 (Kultur durch Ruizhi Geng) wurde ebenfalls nach der 1. Passage verworfen.

3.2.9 UCO#33

Bei der Zellkultur UCO#33 handelt es sich um die erfolgreich etablierte Organoidkultur. Die Zellen konnten als Sphäroide kultiviert werden und in dieser Form bis zur 5. Passage überführt und darüber hinaus als Organoide kultiviert werden.

Die entnommene Urinprobe war klar und farblos. Nach der Zellisolation und Konzentration der Zellen auf 1 ml wurde eine vergleichsweise geringe Zelldichte von 10000 Zellen/ml bestimmt (Mittelwert der 26 ausgezählten Spülurinproben 411538 Zellen/ml).

In der Primärkultur wurden die Zellen in 2 Wells einer 48-Well-Platte ausgesät. In der 3D Matrix waren einzelne Zellen und wenige Zellkonglomerate sichtbar (Abb. 4).

Die Kultur wurde für 17 Tage kultiviert und engmaschig beobachtet und evaluiert. Es wurde eine Größenzunahme des Mittelwertes der gemessenen Sphäroiddurchmesser von 5,2 µm über 8 Tage beobachtet.



Abbildung 4 Lichtmikroskopische Bilder der Primärkultur von UCO#33 in 100-facher Vergrößerung an den Tagen 0 und 17.

Nach 17 Tagen zeigte sich das Wachstum von einzelnen kleinen Sphäroiden. Für die erste Passage wurden die Zellen im Verhältnis 1 zu 3 in neue Domes überführt. Aus einzelnen Zellen entwickelten sich in der 13-tägigen Kultur bis zu 250 µm große, kugelförmige Sphäroide, die aus wenigen Zelllagen zu bestehen und im Kugellinneren einen Hohlraum zu haben schienen (Abb. 5).

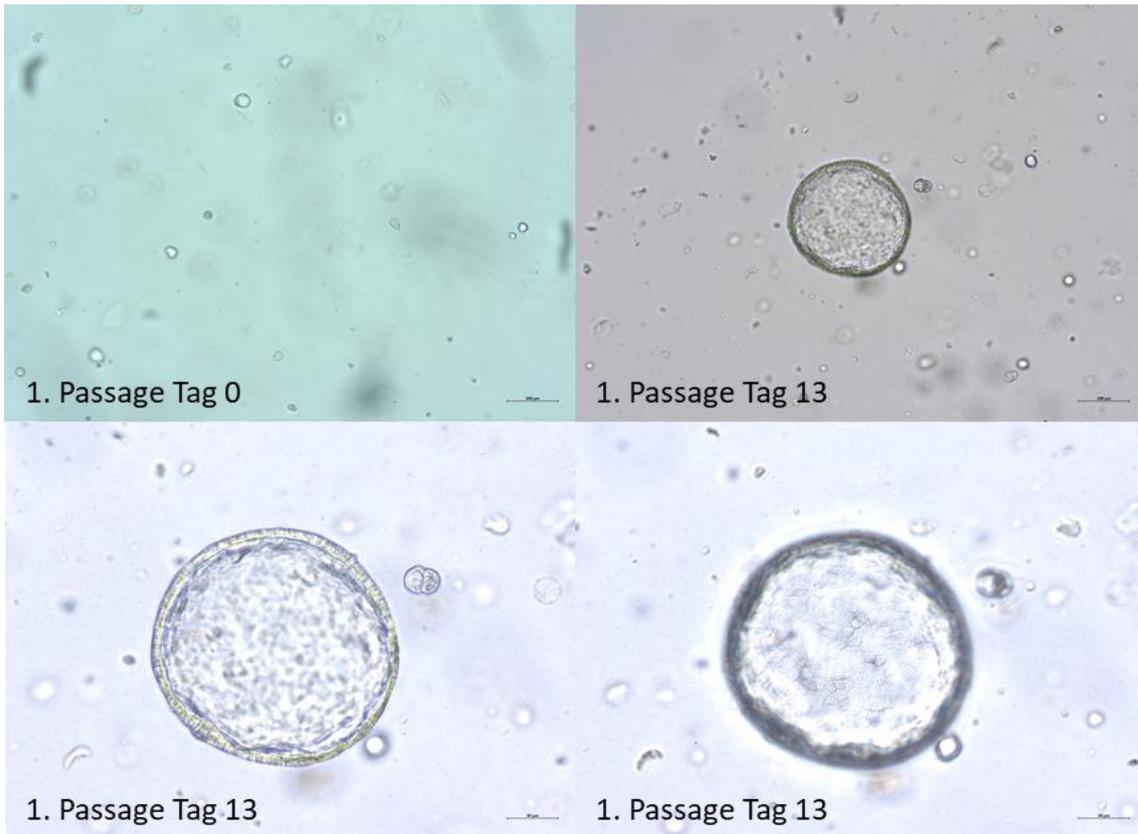


Abbildung 6 Lichtmikroskopische Bilder der 1. Passage von UCO#33 bei 100-facher (obere Reihe) und 200-facher (untere Reihe) Vergrößerung.



Abbildung 5 Lichtmikroskopisches Bild der 2. Passage von UCO#33 in 100-facher Vergrößerung.

Bei der Überführung der Zellen in die zweite Passage wurde ein Teilungsverhältnis von 3 zu 4 gewählt. Innerhalb von 18 Tagen Kulturzeit wuchsen aus vereinzelt Zellen und Zellkonglomeraten bis zu 370 μm durchmessende Sphäroide, die denen in Passage 1 beschriebenen morphologisch glichen (Abb. 6).

Die Überführung in die 3. Passage wurde mit einem Teilungsverhältnis von 1 zu 3 durchgeführt. Der Mittelwert der gemessenen Sphäroiddurchmesser stieg über 4 Tage um 31,7 μm an. Die Kultur wurde nach 7 Tagen in die nächste Passage überführt.

Für die 4. Passage konnten die vereinzelt Zellen mit einem Teilungsverhältnis von 1 zu 6 in die nächste Kultur ausgesät werden. Innerhalb von 7 Tagen wurde, wie in Passage 3, eine optisch dichte Kultur erreicht.

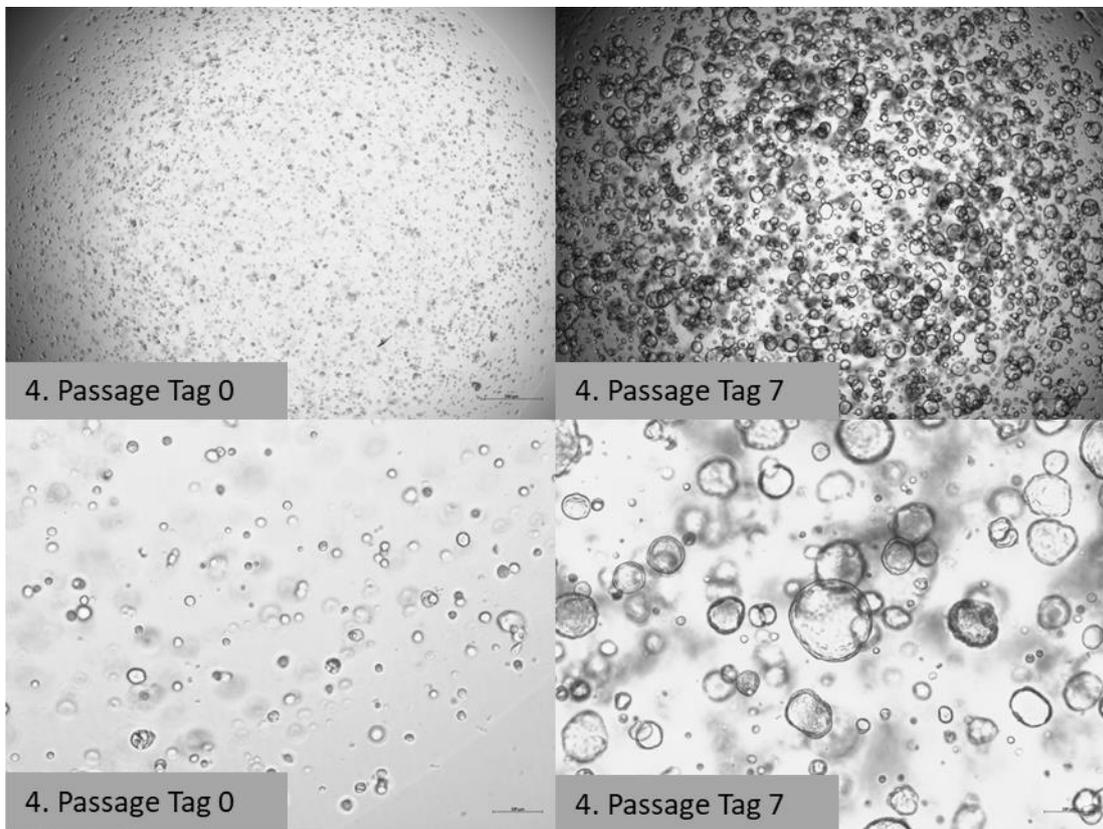


Abbildung 7 Lichtmikroskopische Bilder der 4. Passage von UCO#33 an Tag 0 (links) und Tag 7 (rechts) in 25-facher Vergrößerung (oben) und 100-facher Vergrößerung (unten).

Der Anstieg des Mittelwertes der gemessenen Sphäroide über 4 Tage betrug 19,9 μm . Die Morphologie der Sphäroide entsprach denen in Passage 1-3 und schien sehr homogen und gleichmäßig rund geformt zu sein (Abb. 7)

Bei der Überführung in die 5. Passage konnte ein Teilungsverhältnis von 1 zu 8 gewählt werden. Nach 7-tägiger Kultur ergaben sich die gleichen runden und homogen dichtstehenden Sphäroide wie in Passage 4 und die Kultur konnte als etablierte Organoidkultur fortgeführt werden.

Mit Zunahme der Passagen konnte die Zellkultur also in einem wesentlich größeren Verhältnis gesplittet werden, die Organoide wuchsen schneller und in größerer Zahl und die Kulturzeit bis zur dicht wachsenden Kultur verkürzte sich.

Die zugehörige Kultur aus solidem Tumorgewebe (BCO#220, Kultur durch Ruizhi Geng) zeigte in der Primärkultur vereinzelte Sphäroide. In der 1. Passage entwickelten sich diese Sphäroide nicht mehr und die Kultur wurde verworfen.

3.2.10 UCO#34

In der Primärkultur konnten hier einzelne Zellkonglomerate beobachtet werden. Nach Überführung in die 1. Passage zeigten die einzelnen Konglomerate kein Wachstum mehr und die Zellkultur wurde verworfen.

Die zugehörige Kultur aus solidem Tumor BCO#221 (Kultur durch Ruizhi Geng) wurde in der 2. Passage verworfen.

3.2.11 UCO#35

In der Zellkultur UCO#35 bildeten sich in der Primärkultur, sowie in der 1. Und 2. Passage einzelne, runde Sphäroide, morphologisch ähnlich denen in der Kultur UCO#33. In der 3. Passage bildeten sich diese Sphäroide aber nicht mehr aus und die Kultur wurde verworfen.

Die zugehörige Kultur aus soliden Tumorzellen (UCO#222, Kultur durch Ruizhi Geng) wurde in der 1. Passage verworfen.

3.2.12 UCO#36

Die Kultur UCO#36 zeigte in der Primärkultur dicht stehende, große Zellkonglomerate. Nach der Überführung in die 1. Passage waren nur noch wenige Konglomerate ohne erkennbares Wachstum sichtbar und die Kultur wurde verworfen.

Es gab keine zugehörige Kultur aus solidem Tumorgewebe.

3.3 Alternativmatrixvergleich

Um einen Vergleich des Hydrogels GrowDex® gegen das bisher genutzte BME zu ermöglichen, musste zuerst die für die Blasen-tumorzellen nutzbare Konzentration des durch den Hersteller angebotenen Grundsubstrates des Hydrogels ermittelt werden. Anschließend wurden drei unterschiedliche Zellreihen in Hydrogel und BME parallel kultiviert und bezüglich des Durchmessers und der Charakterisierung der Organioide verglichen.

3.3.1 Ermittlung der nutzbaren Konzentrationen

Zur Ermittlung der optimalen Konzentration des GrowDex® Grundsubstrates wurden unterschiedliche Konzentrationen (0,2 %, 0,5 %, 0,8 %, 1 %) in Verdünnung mit BTM getestet und an der Zellkultur der etablierten Blasen-tumorzellreihe RT112 in dreidimensionaler Zellkultur evaluiert (Abb. 8).

Die in den zufällig gewählten Messfenstern an Tag 1 und Tag 7 ermittelten Messwerte folgten keiner Normalverteilung (Histogramm mit Normalverteilungskurve), weshalb zum Vergleich der Median ermittelt wurde.

Hier ergaben sich für die Konzentration 0,2 % am 1. Tag 35 ausgemessene Organioide mit einem Median von 44 µm, am 7. Tag 13 Organioide mit einem Median von 57 µm.

Bei einer GrowDex® Konzentration von 0,5 % der dreidimensionalen Matrix wurden am 1. Tag 20 Organioide bei einem Median von <1 µm gemessen und am 7. Tag 15 Organioide mit einem Median von 57 µm. Bei den Konzentrationen 1 % und 0,8 % waren die Zellen und späteren Zell-konglomerate licht-mikroskopisch kaum zu evaluieren und am 7. Tag waren keine Organioide mehr sichtbar.

Im Mann-Whitney U-Test ergab sich im Vergleich der Rangzahlen der gemessenen Durchmesser der Konzentrationen 0,2 % und 0,5 % kein signifikanter Unterschied an Tag 1 ($p=0,687$) oder Tag 7 ($p=0,846$).

Somit wurden beide Konzentrationen für die weiteren Untersuchungen genutzt.

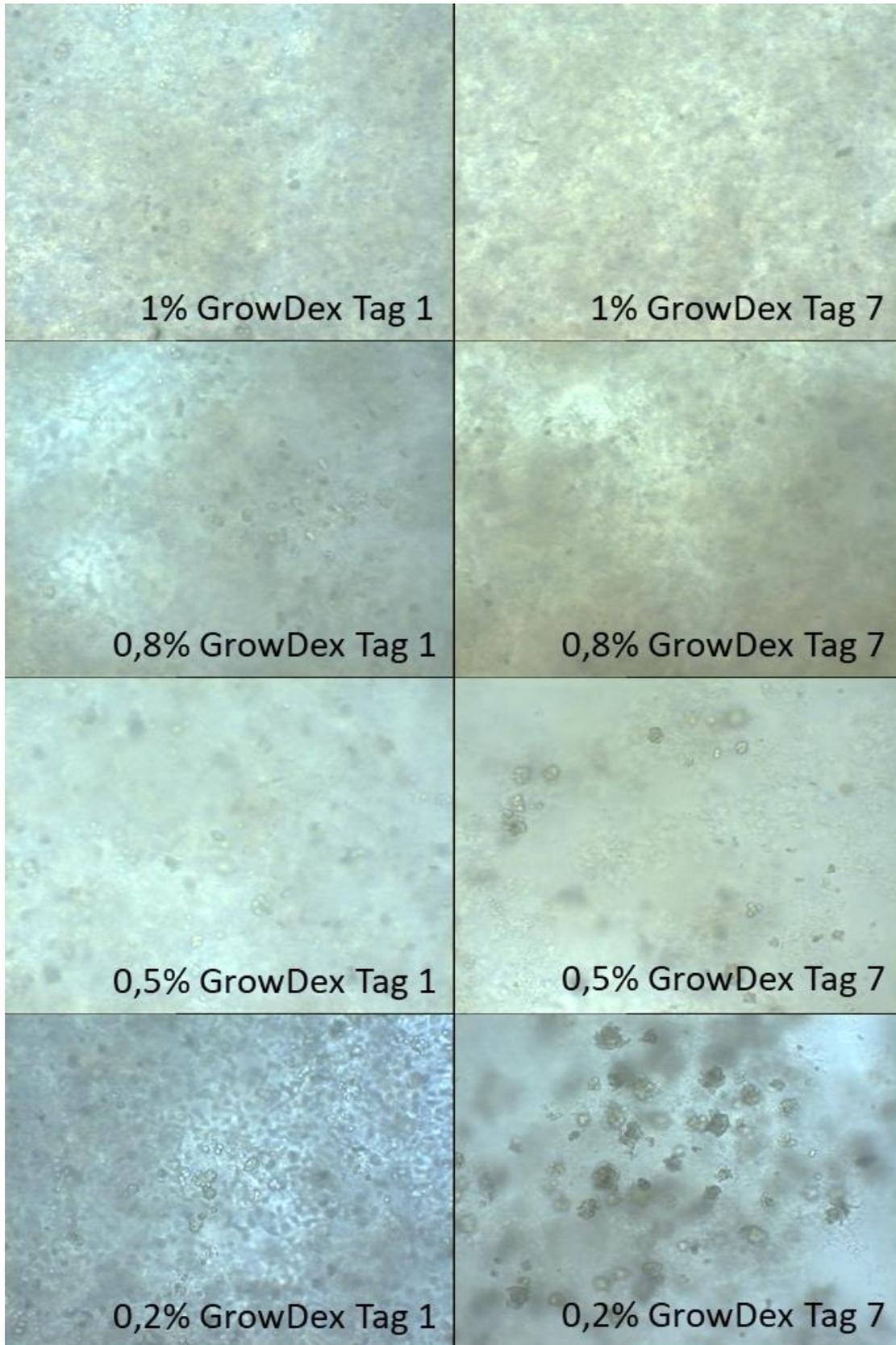


Abbildung 8 Lichtmikroskopische Aufnahmen der Kultur RT112 in unterschiedlichen GrowDex®-Konzentrationen in 100-facher Vergrößerung an Tag 1 und Tag 7.

3.3.2 RT112

3.3.2.1 Größenmessungen

Die lichtmikroskopisch gemessenen Durchmesser in zufälligen Messfenstern wurden nach 7 Tagen erfasst und verglichen (Abb. 9, Tab. 9). In diesem Experiment wurde außerdem das wachstumsfaktoren-geminderte gegen das nicht wachstumsfaktoren-geminderte BME verglichen.

Deskriptive Statistik

	Typ der 3-D-Matrix		Statistik
Größe der Organoide in μm	BME wachstumsfaktoren-gemindert Tag 7	Median	66,3
		Standard Abweichung	19,8
	BME nicht wachstumsfaktoren-gemindert Tag 7	Median	55,7
		Standard Abweichung	20,9
	GrowDex 0,2% Tag 7	Median	71,4
		Standard Abweichung	28,3
	GrowDex 0,5% Tag 7	Median	62,1
		Standard Abweichung	20,5

Tabelle 9 Deskriptive Statistik für den Vergleich von BME und GrowDex® mithilfe der Blasentumorlinie RT112.

Bei der Testung auf Normalverteilung fiel im Histogramm mit Normalverteilungskurve in allen 4 Gruppen eine deutliche Linksschiefe auf.

Auch die statistisch ermittelte Schiefe und Kurtosis bewegte sich in 2 der 4 Messreihen deutlich über 1.

Im Kolmogorov-Smirnov-Test waren bis auf 1 Versuchsgruppe (BME-nicht wachstumsfaktorengemindert $p=0,19$) die Signifikanzen kleiner 0,05 und im Shapiro-Wilk Test bewegten sich alle Signifikanzen unter 0,05. Eine Normalverteilung konnte also nicht angenommen werden.

Im Kruskal-Wallis Test zeigte sich bei einer Signifikanz von $p=0,008$ ein signifikanter Unterschied innerhalb der Mediane der Gruppen.

Daraufhin wurden die Mediane der Versuchsgruppen untereinander mittels Mann-Whitney U-Test verglichen.

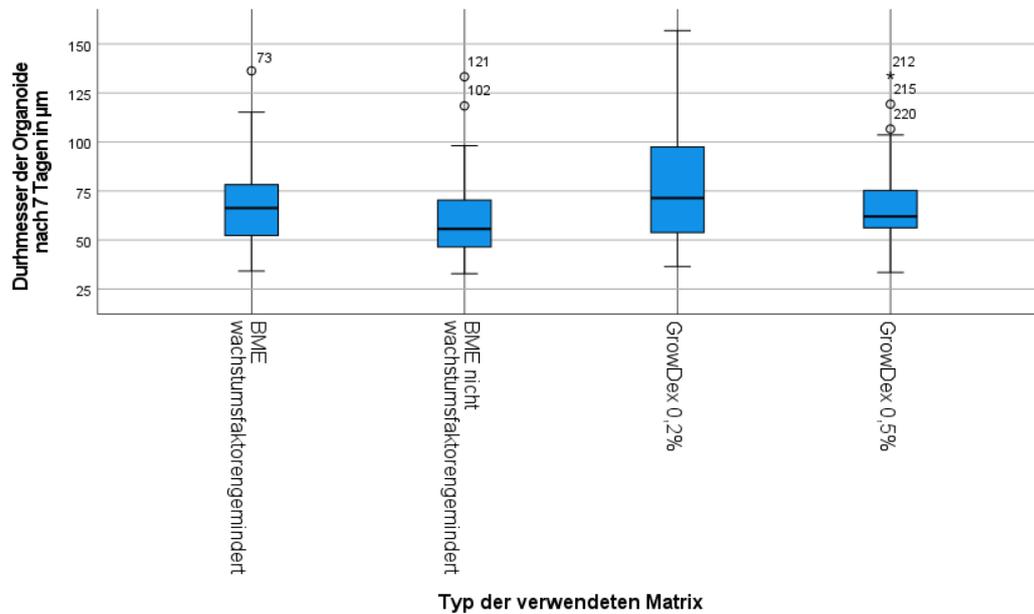


Abbildung 9 Boxplot der Durchmesser der Kultur RT112 in GrowDex® und BME nach 7 Tagen.

Beim Vergleich der beiden BME-Varianten zeigte sich an Tag 7 bei einem $p=0,026$ ein signifikanter Unterschied der Mediane. Für das wachstumsfaktorengeminderte BME ergab sich bei $N=84$ ein Median von $66,31 \mu\text{m}$ und für das nicht wachstumsgeminderte BME ergab sich bei $N=45$ ein Median von $55,65 \mu\text{m}$. Somit erschien ein Wachstumsvorteil für das wachstumsfaktorengeminderte BME wahrscheinlich. In den folgenden Versuchen wurde daher als Vergleichspartner für das Hydrogel ausschließlich wachstumsfaktorengemindertes BME verwendet.

Im Vergleich der beiden unterschiedlichen GrowDex-Konzentrationen gegen das wachstumsfaktorengeminderte BME ergab sich im Mann-Whitney U-Test bei der Konzentration von 0,2 % GrowDex® ($p=0,06$, $N=48$, Median= $71,44 \mu\text{m}$) ein signifikanter Unterschied der Mediane zu Gunsten des Hydrogels.

Bei der Konzentration 0,5 % GrowDex® ($p=0,993$, $N=49$, Median= $62,07 \mu\text{m}$) ergab sich ein signifikanter Unterschied der Mediane zugunsten des BME.

Abhängig von der Konzentration des GrowDex® gibt es also Hinweise auf einen Unterschied des Wachstums in Hydrogel und BME.

3.3.2.2 Fluoreszenzcharakterisierungen

In der Fluoreszenzcharakterisierung, die für beispielhaft ausgewählte Antigene in Chamber Slides durchgeführt wurde, konnten zwischen den in GrowDex® kultivierten Organoiden gegenüber den in BME kultivierten Organoiden Unterschiede in der Proteinexpression vermutet werden (Abb. 10).

Die Negativkontrolle in den Färbungen der GrowDex® - Gruppe für den Sekundärantikörper Cy3 zeigte eine schwache aber teils zellgebundene Fluoreszenz. Die Färbungen der Proben wurden also als in Relation zu der Negativkontrolle (intensivere Anfärbung als Negativkontrolle = positiv, gleiche oder schwächere Anfärbung = negativ) interpretiert.

In BME wurde eine Expression des Tumormarkers p53 und des Proliferationsmarkers Ki67 bei einer Belichtungszeit von 1000 ms und 792 ms beobachtet. Diese Marker konnten in den Organoiden in GrowDex® bei derselben Belichtungszeit nicht nachgewiesen werden, sodass von einem Unterschied in der Proteinexpression, sowie der Proliferationsaktivität der Zellen ausgegangen werden konnte.

Der Tumormarker TP63 und der Extrazellulärmarker FGFR-3 hingegen waren bei einer Belichtungszeit von 1000 ms ausschließlich in den in GrowDex® gewachsenen Organoiden nachzuweisen, was ebenfalls für eine veränderte Proteinexpression und Interaktion mit der Extrazellulärmatrix der Organoide sprach.

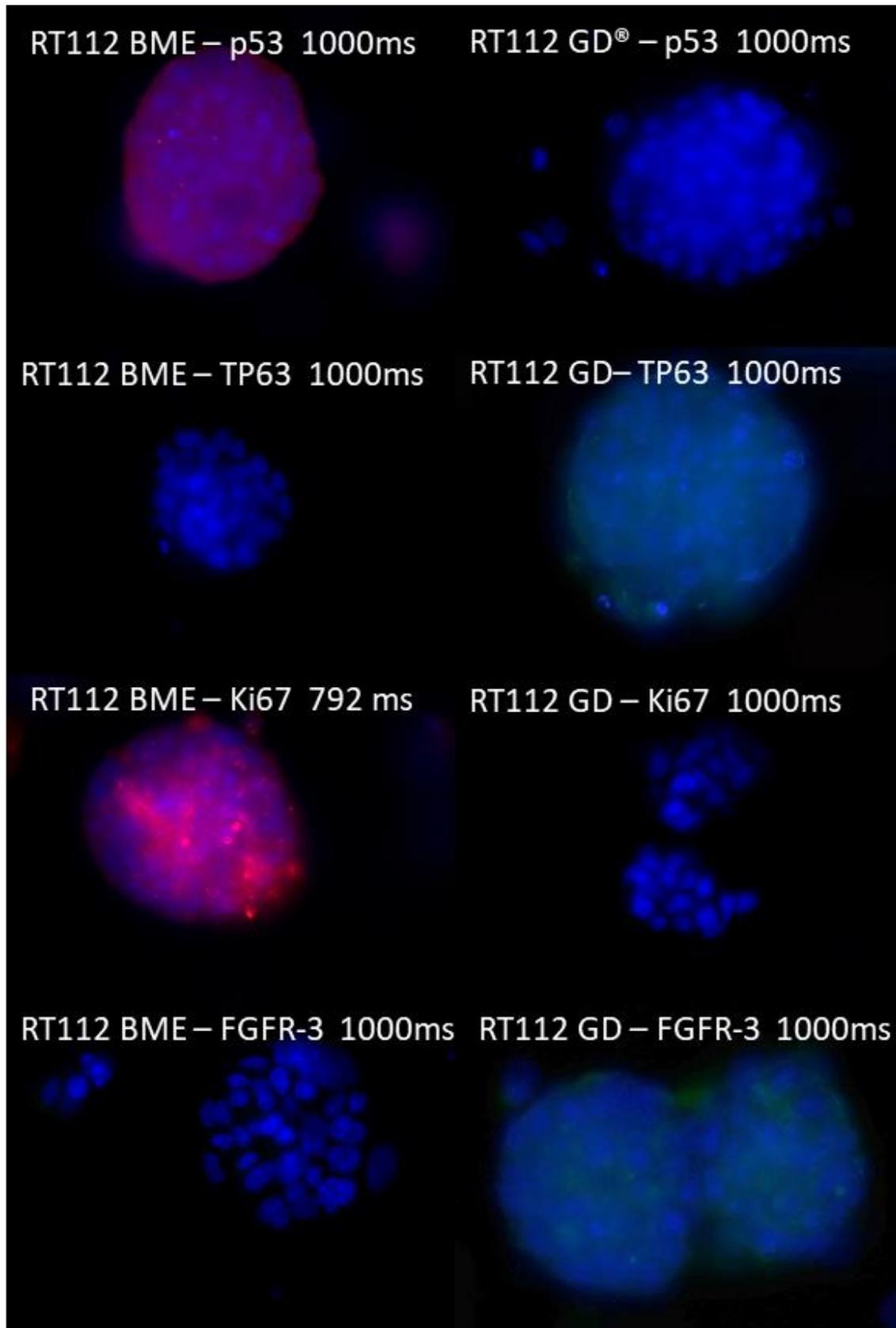


Abbildung 10 Immunfluoreszenzbilder der unterschiedlichen Färbemuster der Organoide der Kultur RT112 in BME (links) und GrowDex[®] (GD, rechts). Zur besseren Darstellung wurden Kontrast, Schärfe und Farbtemperatur angepasst.

3.3.3 BCO#140

Nach 7 Tagen Kultur konnten 23 Organoide bei einer GrowDex® Konzentration von 0,2 % ausgemessen werden, bei einer Konzentration von 0,5 % waren es 7 Organoide. In der Versuchsgruppe BME konnten 80 Organoide ausgemessen werden (Abb.11, Tab. 10).

Deskriptive Statistik

	Typ der verwendeten Matrix		Statistik
	Durchmesser der Organoide nach 7 Tagen in μm	BME	Median
Standard Abweichung			14,6
GrowDex 0,2%		Median	22,4
		Standard Abweichung	14,1
GrowDex 0,5%		Median	35,7
		Standard Abweichung	22,2

Tabelle 10 Deskriptive Statistik für den Vergleich von BME und GrowDex® mithilfe der Organoidzellreihe BCO#140.

Im Histogramm der einzelnen Versuchsgruppen war in den GrowDex-Messreihen eine Datenverteilung außerhalb der Normalverteilungskurve zu

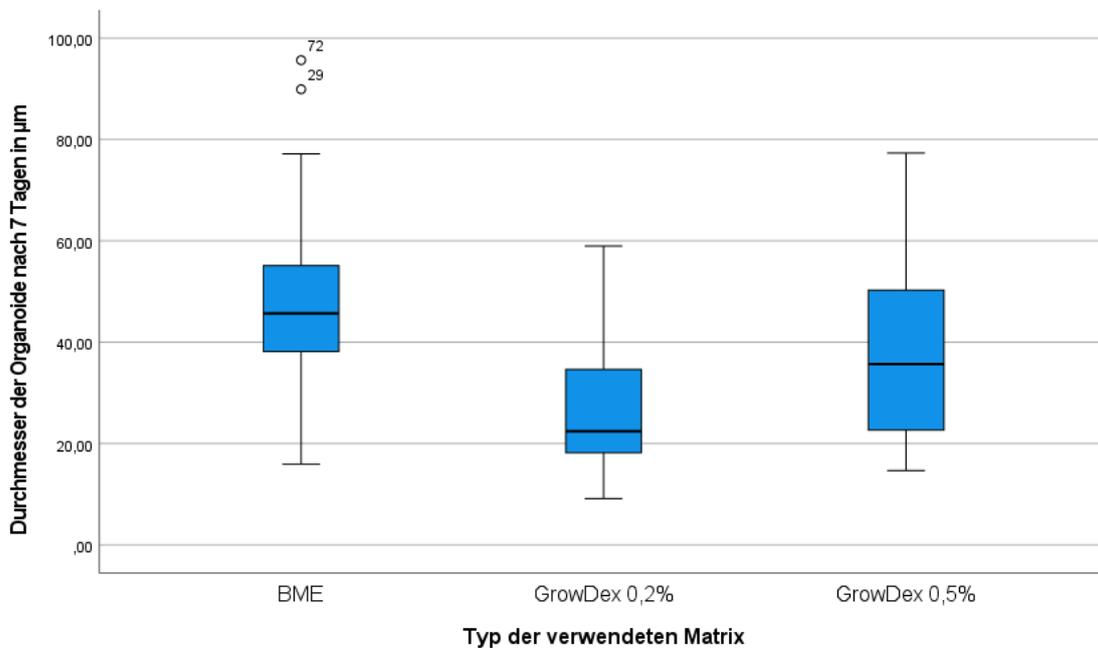


Abbildung 11 Boxplot der Durchmesser der Kultur BCO#140 in GrowDex® und BME nach 7 Tagen.

erkennen. Das Histogramm der BME-Messreihe bewegte sich größtenteils innerhalb der Normalverteilungskurve.

Schiefe und Kurtosis der Messreihen errechneten sich für die GrowDex-Messungen zwischen -1 und 1, für die BME-Messreihe war die Schiefe ebenfalls in diesem Bereich, die Kurtosis allerdings über 1.

In den statistischen Tests auf Normalverteilung errechnete sich für das BME sowohl im Kolmogorov-Smirnov-Test ($p=0,008$) als auch im Shapiro-Wilk-Test ($p=0,013$) die Signifikanz $p<0,05$, was gegen eine Normalverteilung der Daten sprach. Die beiden GrowDex Messreihen (0,2 % und 0,5 %) zeigten sich in beiden Tests mit $p> 0,05$ (Kolmogorov-Smirnov-Test: $p=0,132$ bzw. 0,2; Shapiro-Wilk-Test: $p=0,066$ bzw. 0,615), was für eine Normalverteilung der Daten sprach.

In der Betrachtung der verschiedenen Tests in Zusammenschau, konnte nicht von der Normalverteilung aller Messreihen ausgegangen werden.

Somit wurden die Mediane der drei Versuchsgruppen mit dem Kruskal-Wallis-Test verglichen und dann die einzelnen Messreihen mittels Mann-Whitney U-Test. Im Kruskal-Wallis Test ergab sich eine Signifikanz von $p<0,001$, was für einen Unterschied in mindestens zwei der Messreihen sprach.

Im Vergleich des BME (Median=45,71 μm) gegen das GrowDex® 0,2 % (Median=22,43 μm) zeigte sich im Mann-Whitney U-Test ($p<0,001$) bei einer Signifikanz von $<0,05$ ein wahrscheinlicher Unterschied der Mediane zugunsten des BME.

Im Vergleich des BME (Median=45,71 μm) gegen das GrowDex® 0,5 % (Median=35,68 μm) ergab sich im Mann-Whitney U-Test eine Signifikanz von $p=0,17$ und somit kein Hinweis auf einen signifikanten Unterschied der Mediane, allerdings wäre bei der geringen Stichprobenanzahl des GrowDex® 0,5 % ein signifikanter Unterschied auch erst bei einem sehr großen Unterschied der Mediane zu erreichen.

Im Vergleich der beiden GrowDex® Konzentrationen gegeneinander, errechnete sich im Mann-Whitney U-Test eine Signifikanz von $p=0,174$, was gegen einen signifikanten Unterschied der Mediane sprach. Dies ist aber, wie im oberen Absatz erläutert, mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die geringe Stichprobengröße verfälscht.

Zusammenfassend ließ sich aus den Messungen der Durchmesser und Vergleichen der Mediane für die Zellreihe BCO#140 in der 3D-Kultur ein Vorteil des BME gegenüber dem GrowDex® 0,2 % vermuten. Die Ergebnisse des GrowDex® 0,5 % wurden aufgrund der geringen Stichprobengröße nicht einbezogen.

3.3.3.1 Fluoreszenzcharakterisierungen

In der Immunfluoreszenz konnten GATA-3 und AE1/AE3 als Färbungen bei BCO#140 nicht ausgewertet werden, da sie in BME kein Fluoreszenzsignal zeigten. Im Vergleich zu anderen Charakterisierungen der Zellreihe in Vorarbeiten ist dies nicht erwartbar und es musste von einer fehlerhaften Färbung ausgegangen werden.

Auch die Färbung des S-100-P konnte für BCO#140 nicht ausgewertet werden, da Färbeintensität und Belichtungszeit uneindeutig nahe an der Negativkontrolle waren und somit keine klare Interpretation möglich war.

Sowohl in den Färbungen der Gruppe BME als auch in der Gruppe GrowDex® zeigte die Negativkontrolle eine zellgebundene positive Färbung für beiden Sekundärantikörper (Cy3 und Alexa488). Alle Fluoreszenzfärbungen sind also in Relation zu der jeweiligen Negativkontrolle als positiv oder negativ interpretiert worden.

In den verwertbaren Färbungen zeigte sich, dass ein positiver Nachweis des Markers TP63 (Belichtungszeit: 1463 ms) nur bei BCO#140 in BME zu beobachten war, was für einen Unterschied in der Proteinexpression der beiden Proben spricht (Abb. 11).

CD24 (Belichtungszeit: 959 ms) und CK20 (Belichtungszeit: 388 ms) konnten in BCO#140 ausschließlich in den GrowDex®-Organoiden detektiert werden

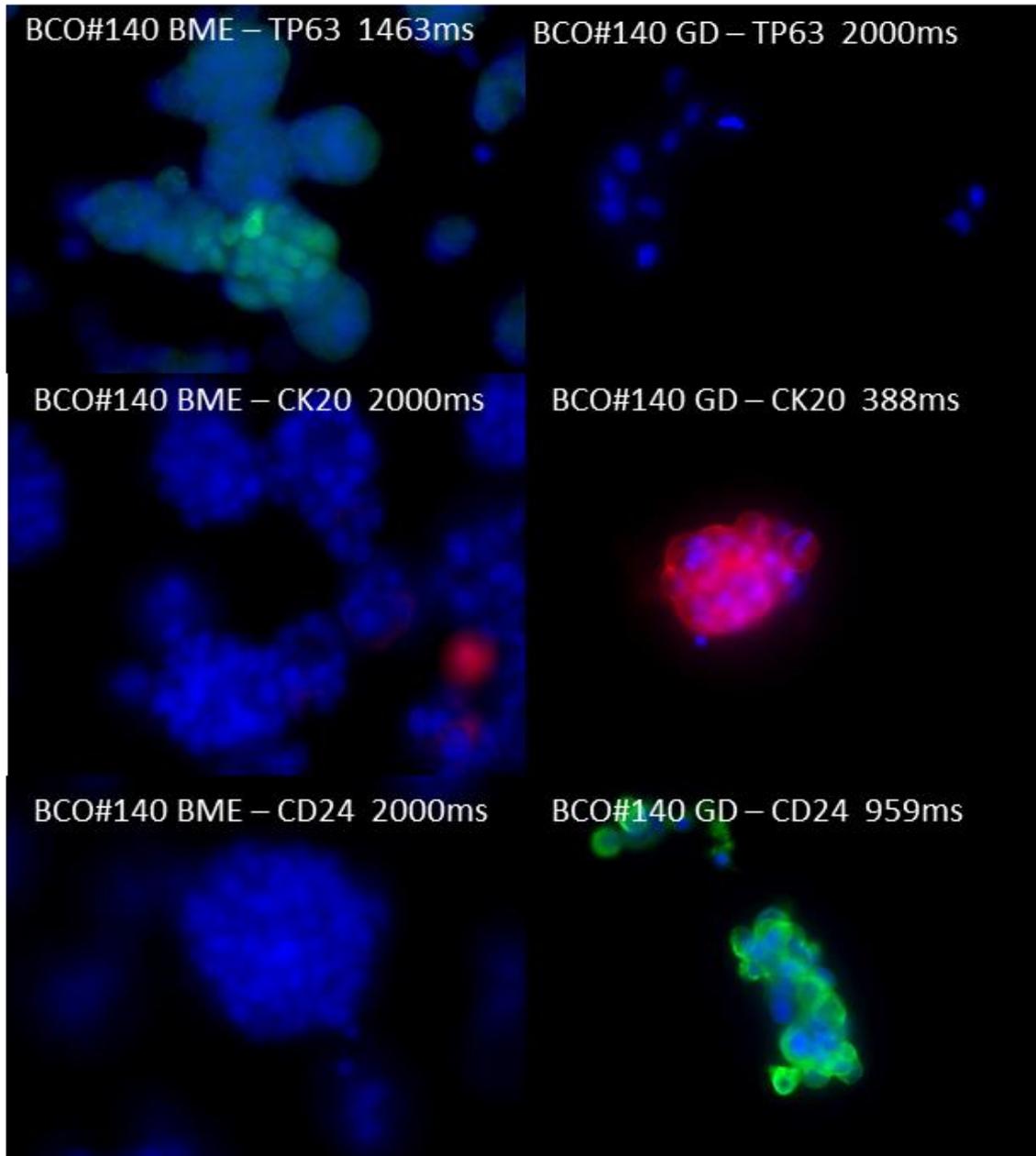


Abbildung 12 Immunfluoreszenzbilder der unterschiedlichen Färbemuster der Organoide der Kultur BCO#140 in BME (links) und GrowDex® (GD, rechts). Zur besseren Darstellung wurden Kontrast, Schärfe und Farbtemperatur angepasst.

(Abb. 12). In BME wurde bei einer Belichtungszeit von 2000 ms kein, als positiv zu wertendes, Fluoreszenzsignal detektiert. Es konnte eine veränderte Tumorstammzellaktivität, sowie eine Änderung der Zelldifferenzierung in den verschiedenen Kulturmumgebungen vermutet werden (Abb. 12).

3.3.4 UCO#33

3.3.4.1 Größenmessungen

In diesem Versuch wurden bei den Kulturen in BME 205 Organoide ausgemessen, in GrowDex® 0,2 % wurden 36 Organoide ausgemessen und in GrowDex® 0,5 % wurden 83 Organoide ausgemessen (Abb. 13, Tab. 11).

Deskriptive Statistik

	Typ der verwendeten Matrix		Statistik
	Durchmesser der Organoide nach 7 Tagen in μm	BME	Median
Standard Abweichung			25,3
GrowDex 0,2%		Median	27,7
		Standard Abweichung	9,3
GrowDex 0,5%		Median	23,2
		Standard Abweichung	9,6

Tabelle 11 Deskriptive Statistik für den Vergleich von BME und GrowDex® mithilfe der Organoidzellreihe UCO#33.

In den Histogrammen mit Normalverteilungskurve der Messwerte ließ sich in keiner der Messreihen eine Verteilung entlang der Normalverteilungskurve

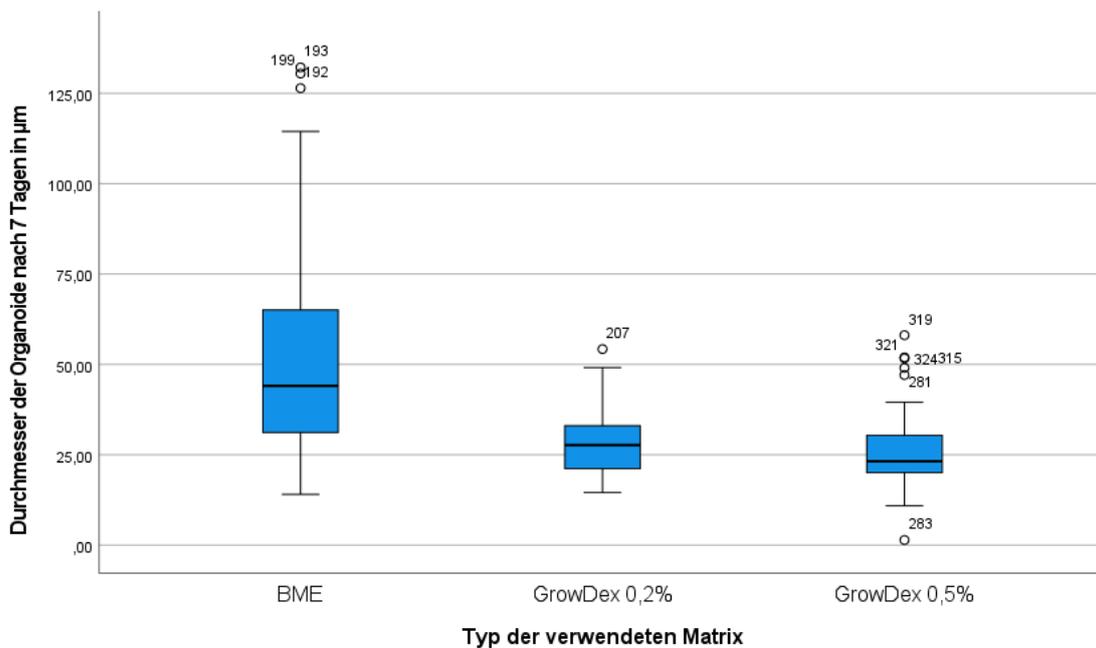


Abbildung 13 Boxplot der Durchmesser der Kultur UCO#33 in GrowDex® und BME nach 7 Tagen.

erkennen.

Die Schiefe der Messreihen lag bei allen Versuchsgruppen in etwa bei 1. Die Kurtosis lag für die GrowDex® 0,2 % und die BME-Kultur zwischen 0 und 1, was für eine Normalverteilung der Werte spricht. Bei der GrowDex® 0,5 % Kultur betrug sie aber 1,79, was gegen eine Normalverteilung der Werte spricht.

Bei den Kolmogorov-Smirnov- und Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung zeigt sich in allen Gruppen (BME, GrowDex® 0,2 %, GrowDex® 0,5 %) eine Signifikanz von $p < 0,05$ (Kolmogorov-Smirnov-Test: $p < 0,001$, $p = 0,114$, $p < 0,001$; Shapiro-Wilk-Test: $p < 0,001$, $p = 0,011$, $p < 0,001$), was in allen Gruppen gegen eine Normalverteilung der Werte sprach, außer im Kolmogorov-Smirnov-Test für GrowDex® 0,2 %.

Es konnte also für keine der Messwertreihen von einer Normalverteilung der Werte ausgegangen werden. Daher wurden zum Vergleich der Mediane der Gruppen der Kruskal-Wallis-Test und Mann-Whitney U-Tests durchgeführt.

Im Kruskal-Wallis Test zeigte sich bei einer Signifikanz von $p < 0,001$ ein wahrscheinlicher und signifikanter Unterschied der Mediane von wenigstens 2 der Gruppen.

Der Vergleich des BME (Median=44,05 μm) gegen GrowDex® 0,2 % (Median=27,71 μm) ergab bei einer Signifikanz von $p < 0,001$ im Mann-Whitney U-Test eine Überlegenheit des BME.

Bei der Gegenüberstellung des BME und des GrowDex® 0,5 % (Median=23,23 μm) zeigte sich im Mann-Whitney U-Test bei einer Signifikanz von $p < 0,01$ ebenfalls eine Überlegenheit des BME.

Vergleicht man die beiden GrowDex® Konzentrationen gegeneinander so musste eine Überlegenheit des GrowDex® 0,2 % bei einer Signifikanz von $p < 0,01$ im Mann-Whitney U-Test angenommen werden.

Zusammenfassend kann in diesem Versuch mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Überlegenheit des BME als Matrix für die 3D Kultur der Blasentumor-Organoidreihe UCO#33 angenommen werden.

3.3.4.2 Fluoreszenzcharakterisierungen

Sowohl in den Färbungen der Gruppe BME als auch in der Gruppe GrowDex® zeigte die Negativkontrolle eine zellgebundene positive Färbung für einen oder beide Sekundärantikörper (Cy3 und Alexa488). Alle Fluoreszenzfärbungen sind also in Relation zu der jeweiligen Negativkontrolle interpretiert worden (intensivere Anfärbung als Negativkontrolle=positiv, weniger intensive Anfärbung=negativ).

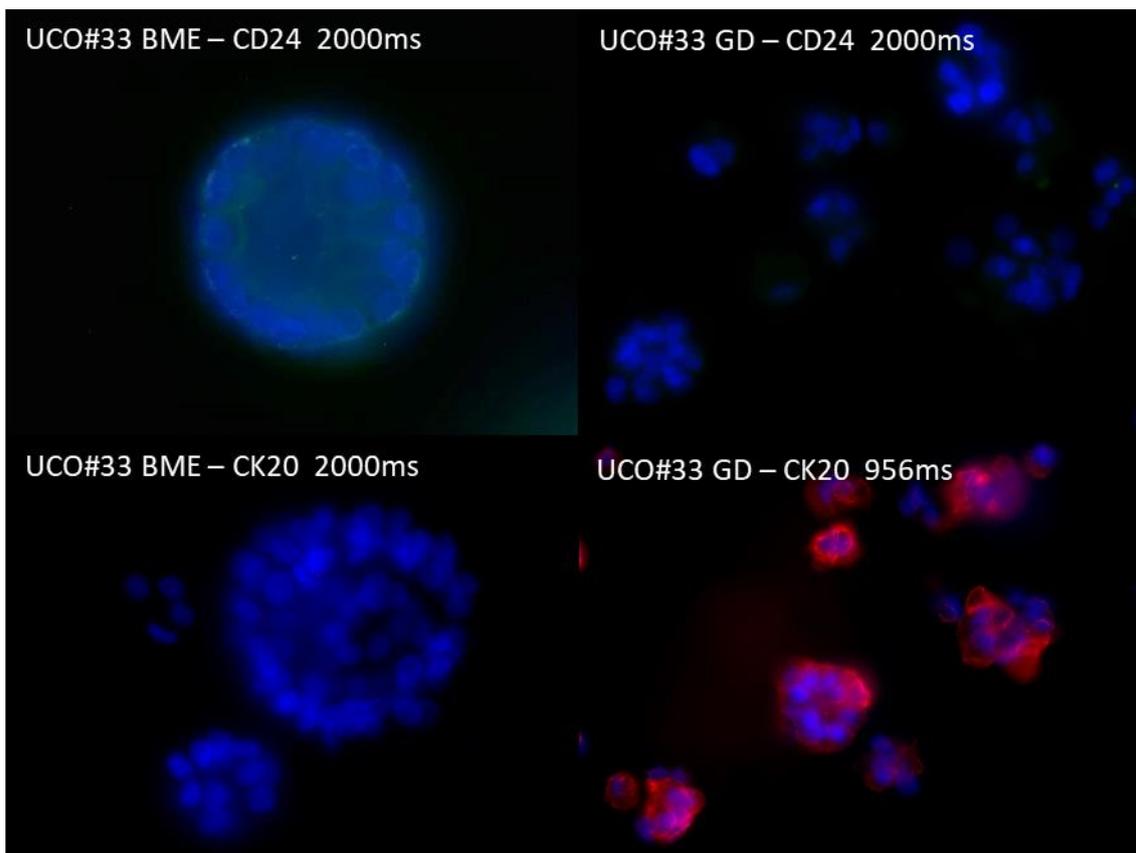


Abbildung 14 Immunfluoreszenzbilder der unterschiedlichen Färbemuster der Organoide der Kultur UCO#33 in BME (links) und GrowDex® (GD, rechts). Zur besseren Darstellung wurden Kontrast, Schärfe und Farbtemperatur angepasst.

Es zeigte sich eine nur in der BME-Gruppe vorhandene positive Färbung von CD24 bei 2000 ms Belichtungszeit (Abb. 14).

CK20 konnte bei einer Belichtungszeit von 956 ms nur in der GrowDex®-Gruppe nachgewiesen werden (Belichtungszeit in BME=2000 ms).

Beide Unterschiede sprechen für eine Veränderung der Proteinexpression abhängig von der Art der genutzten Kulturmatrix der Organoidkulturen.

3.4 Immunfluoreszenzcharakterisierungen der Kulturen aus Spülurin

3.4.1 Überblick

In 9 Kulturen aus Spülurinen konnte ausreichend Zellmasse generiert werden, um Sphäroide oder Organoide in Chamber Slides oder Paraffinblöcke überführen zu können und gleichzeitig die Kultur weiterzuführen. Von 2 Kulturen konnten Paraffinschnitte angefertigt werden, von 6 Kulturen Chamber Slides und von der erfolgreichen Lanzeitkultur, UCO#33, konnten Chamber Slides in der 3. Passage und in der 5. Passage gewonnen werden.

3.4.2 UCO#1

Die Färbung der aus UCO#1 gewonnen Paraffinschnitte stammen aus der 1. Passage dieser Kultur.

Die Färbung mit Anti-AE1/AE3 (Abb. 15) und Anti-CK7 Antikörpern (ohne Abb., Tab. 12) ergab ein stark positives Fluoreszenzsignal, was für einen epithelialen Ursprung der Zellen spricht.

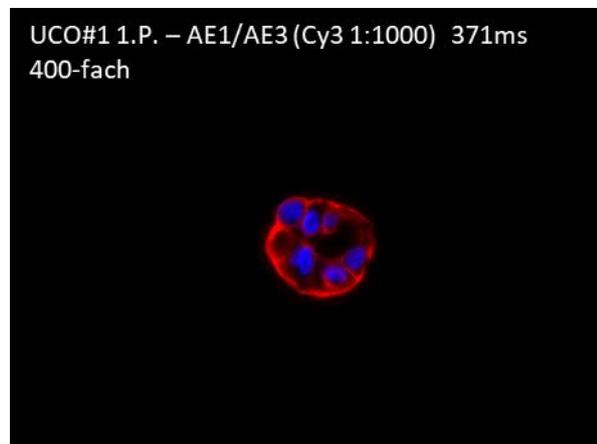


Abbildung 15 Fluoreszenzfärbung der Kultur UCO#1 in 400-facher Vergrößerung. Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) und AE1/AE3-Färbung (rot).

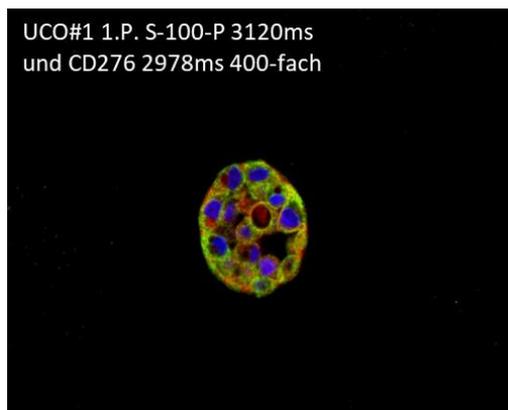


Abbildung 16 Fluoreszenzfärbung der Kultur UCO#1 in 400-facher Vergrößerung. Gleichzeitige Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau), der Antigene CD276 (grün) und S100P (rot).

Die positive Anfärbung der Sphäroide auf GATA-3 deutet auf eine urotheliale Differenzierung der Zellen hin (ohne Abb., Tab. 12).

Die in der Fluoreszenz signifikante Anfärbung für die Tumormarker TP63, CK5 (ohne Abb., Tab. 12) und S100P (Abb. 16) kann als Malignitätsmerkmal interpretiert werden. Die erhöhte Expression von CD276 Molekülen (Abb. 16) deutet auf eine

T-Zell regulierende Aktivität der Zellen hin und damit auf eventuelle Immun-Escape-Mechanismen der Tumorzellen.

Fehlende Anfärbung gegen CD44 und eine schwache Färbung auf CD24 bei einer sehr langen Belichtungszeit (4000 ms) sprechen eher für eine geringe (Tumor-)Stammzellaktivität in der vorliegenden Probe (ohne Abb., Tab. 12).

Zusammenfassend lässt die Fluoreszenzfärbung von UCO#1 maligne urotheliale Zellen vermuten. Im pathologischen Bericht der entnommenen Probe im Rahmen der TUR-B wurde aber eine Metastase eines Endometriumkarzinoms diagnostiziert, welches ebenfalls CK7 und GATA-3 positiv sein kann.

3.4.3 UCO#18

In den gefärbten Paraffinschnitten aus der 2. Passage der Probe UCO#18 lässt sich durch eine deutliche Anfärbung der Zytokerantinantigene AE1/AE3 eine epitheliale Herkunft der Sphäroidzellen vermuten (ohne Abb., Tab. 12). Für eine urotheliale Differenzierung sprechen die positive Färbung von GATA-3 (ohne Abb., Tab. 12) und CK7 (Abb. 17), wobei die sehr deutliche

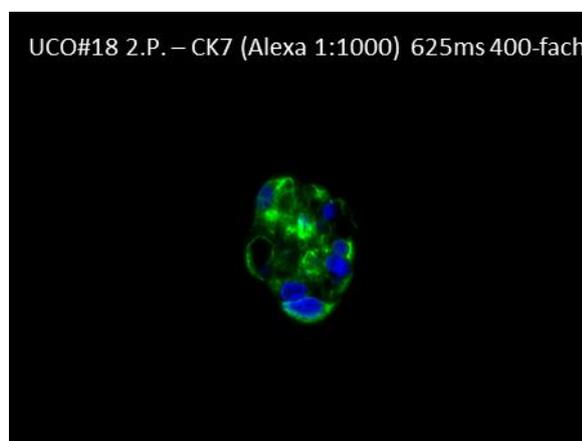


Abbildung 17 Fluoreszenzfärbung der Kultur UCO#18 in 400-facher Vergrößerung. Anfärbung der Zellkerne mit DAP I (blau) und CK7-Färbung (grün).

Fluoreszenzfärbung des CK7 Antigens zusätzlich als eine Überexpression im Sinne eines Malignitätsmerkmals interpretiert werden kann.

In der Kultur UCO#18 konnten positive Färbungen für CK5, Vimentin und TP63 beobachtet werden, die als Tumormarker für eine maligne Transformation der Zellen mit einer Änderung der Differenzierung sprechen (ohne Abb., Tab. 12). Das Antigen p53 konnte nicht in allen Sphäroiden nachgewiesen werden, war also inhomogen angefärbt (ohne Abb., Tab. 12).

Die fehlende Expression von CD24 und CD44 in der Kultur UCO#18 lässt auf eine geringe Stammzellaktivität in der untersuchten Probe schließen (ohne Abb., Tab. 12).

Zusammenfassend lässt sich für UCO#18 ebenfalls eine urotheliale Herkunft der Sphäroidzellen sowie eine maligne Entität der Zellen vermuten.

3.4.4 UCO#20

Die gefärbten Chamber Slides der Probe UCO#20 stammen aus der 5. Passage der Kultur. Es zeigten sich positive Färbungen auf AE1/AE3 (ohne Abb., Tab. 12), sowie in einigen Sphäroiden positive Färbungen auf GATA-3 (ohne Abb., Tab. 12), sodass eine epitheliale und urotheliale Herkunft angenommen werden kann. Eine ausgeprägte Färbung von CK7 spricht auch für eine urotheliale Differenzierung und könnte auf eine Überexpression des Zytokeratins hindeuten und damit auf eine Malignität der Zellen (ohne Abb., Tab. 12).

Die positive Färbung des Proliferationsmarkers Ki67 spricht für eine verstärkte Proliferation der Zellen (ohne Abb., Tab. 12). Allerdings konnte CD44 nicht in allen Sphäroiden nachgewiesen werden und das Antigen CD24 war in keinen der Sphäroide angefärbt, was gegen eine erhöhte Aktivität von Stammzellen in dieser Probe spricht (Abb. 18).



Abbildung 18 Fluoreszenzfärbung der Kultur UCO#20 in 400-facher Vergrößerung. Fehlende Anfärbung des Antigens CD24(grün) und geringgradige Anfärbung von CD44(rot). Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau).

In einem Anteil der Sphäroide auftretende positive Färbungen für

Vimentin, CK20, p53, CD276 und S100P deuten auf eine Malignität der Zellen, zumindest einiger Sphäroiden, hin sowie auf Immun-Escape-Mechanismen (ohne Abb., Tab. 12).

Zusammenfassend macht dieses Färbemuster den Schluss auf entartete urotheliale Zellen in der Kultur UCO#20 wahrscheinlich.

3.4.5 UCO#25

Die Fluoreszenzfärbungen der Chamber Slides der Kultur UCO#25 wurden in der 1. Passage der Kultur durchgeführt. In der Negativkontrolle für den Sekundärantikörper Cy3 waren einzelne grell-leuchtende rote Punkte zu sehen, die aber nicht im direkten Zusammenhang mit Zellbestandteilen standen.

Es zeigte sich ein positives Fluoreszenzsignal für AE1/AE3, GATA-3 und CK7, was eine epitheliale und urotheliale Orientierung der Zellen wahrscheinlich macht (ohne Abb., Tab. 12).

Die positive Ki67-Färbung in Kombination mit den fehlenden Nachweisen für CD24 und dem nur in einzelnen Sphäroiden nachweisbarem Antigen CD44 könnte auf eine erhöhte Proliferationsrate ohne vermehrtes Vorhandensein Pluripotenter Stammzellen schließen lassen (ohne Abb., Tab. 12).

Die positive Anfärbung von CK20 (Abb. 19), S100P und TP63 (ohne Abb., Tab. 12) als Tumormarker lassen eine maligne Entität der Zellen in UCO#25 vermuten.

Der Nachweis von p53 und CD276 deutet zusätzlich auf eine Veränderung von Zellzyklus und T-Zell-Interaktion im Sinne von Immun-Escape-Mechanismen hin (ohne Abb., Tab. 12).

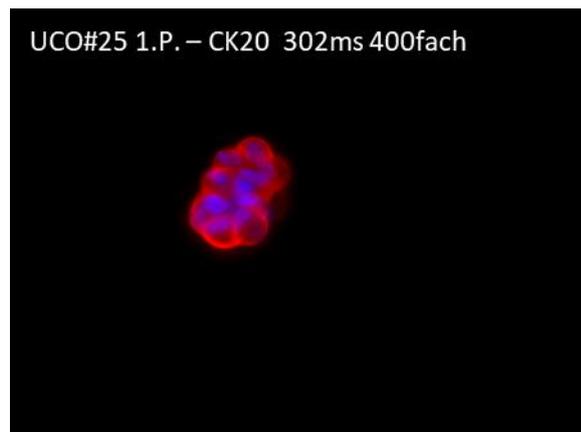


Abbildung 19 Fluoreszenzfärbung der Kultur UCO#25 in 400-facher Vergrößerung. Anfärbung der Zellkern mit DAPI (blau) und CK20-Färbung (rot).

Zusammenfassend lassen sich auch in dieser Probe, UCO#25, maligne, urotheliale Zellen der Sphäroide vermuten.

3.4.6 UCO#28

In der Kultur UCO#28 war schon in der Primärkultur ausreichend Material für die

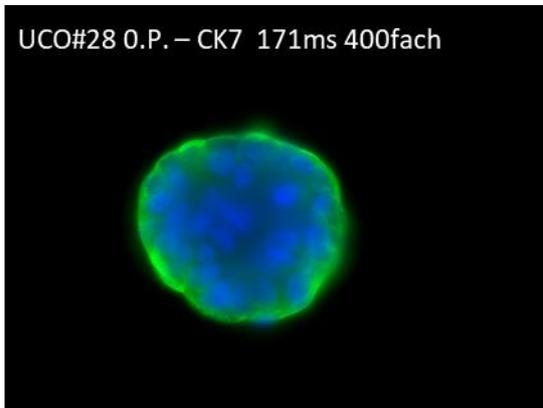


Abbildung 20 Fluoreszenzfärbung der Kultur UCO#28 in 400-facher Vergrößerung. Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) und CK7-Färbung (grün).

Es zeigte sich ein positiver Nachweis der Antigene AE1/AE3, CK7 (Abb. 20) und GATA-3, sodass am ehesten von urothelialen Zellen ausgegangen werden kann (ohne Abb., Tab. 12).

P53 und S100P waren ebenfalls nachweisbar (ohne Abb., Tab. 12) und weisen auf eine maligne Entität der

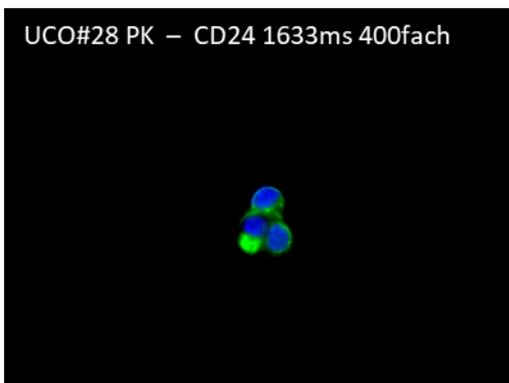


Abbildung 22 Fluoreszenzfärbung der Kultur UCO#28 in 400facher Vergrößerung. Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) und CD24-Färbung (grün).

Anfertigung von Chamber Slides vorhanden. In der Negativkontrolle für den Sekundärantikörper Cy3 waren diffuse, schwach leuchtende und nicht an die Sphäroidgrenzen gebundene Färbungen zu sehen, die Interpretation der Färbungen wurde in Relation zu diesen akzidentellen Anfärbungen durchgeführt.

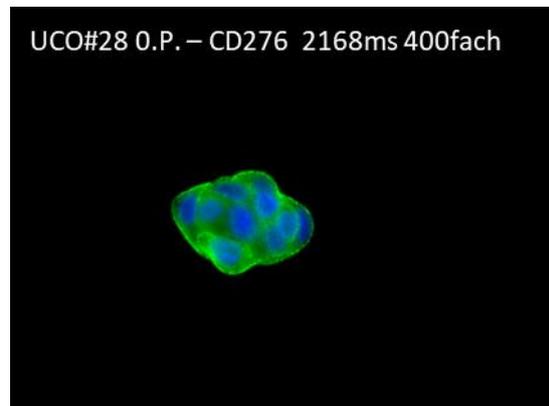


Abbildung 21 Fluoreszenzfärbung der Kultur UCO#28 in 400-facher Vergrößerung. Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) und CD276-Färbung (grün).

Sphäroide hin, was durch die positive CD276-Anfärbung (Abb. 21) unterstützt wird, die im Rahmen eines Immun-Escape-Mechanismus auch auf maligne Zellen hinweist.

In einigen Zellen ließ sich eine deutliche Expression von CD24 als Tumorstammzellmarker feststellen (Abb. 22). Der Stammzellmarker CD44 war in

den Sphäroiden nicht angefärbt. Ki67 als Proliferationsmarker war in deutlicher Ausprägung nachweisbar, sodass eine erhöhte Proliferationsrate der Zellen und das Vorhandensein von Tumor-Stammzellen vermutet werden kann (ohne Abb., Tab. 12).

Zusammenfassend lassen sich urotheliale Tumorzellen mit erhöhter Stammzellaktivität in den gefärbten Sphäroiden der Kultur UCO#28 vermuten.

3.4.7 UCO#33

3.4.7.1 3. Passage

In den Chamber Slides der 3. Passage der Kultur UCO#33 war sowohl für den Sekundär-Antikörper Cy3(Anti-Mouse) als auch für Alexa488(Anti-Rabbit) eine leicht positive Negativkontrolle vorhanden. Die Färbungen wurden in Relation zu diesen Kontrollen interpretiert.

Es war eine positive Anfärbung der Antigene GATA-3, AE1/AE3 (ohne Abb., Tab. 12) und CK7 (Abb. 22) vorhanden, durch die eine urotheliale Herkunft der Zellen wahrscheinlich ist. Für CK7 war die Färbung der Sphäroide allerdings inhomogen und nicht bei allen Organoiden vorhanden (Abb. 23).

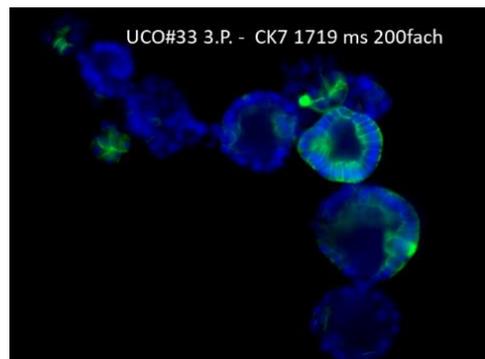


Abbildung 23 Fluoreszenzfärbung der Kultur UCO#33 in Passage 3 in 200-facher Vergrößerung. Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) und CK7-Färbung (grün).

Auch das mesenchymale Intermediärfilament Vimentin konnte nachgewiesen werden (ohne Abb., Tab. 12). Zusammen mit dem Nachweis von S100P, TP63, CK20 (welches nicht bei allen Sphäroiden nachweisbar war) und CD276 lässt sich eine maligne Entität der Zellen vermuten (ohne Abb., Tab. 12).

Es war eine deutliche Co-Expression von CD24 und CD44 in einigen Sphäroiden nachweisbar, was eine ausgeprägte

Stammzellaktivität der Zellen wahrscheinlich macht (Abb. 24). In einem Teil der gefärbten Sphäroide konnten nur jeweils einer der beiden

Marker nachgewiesen werden. Auch der Proliferationsmarker Ki67

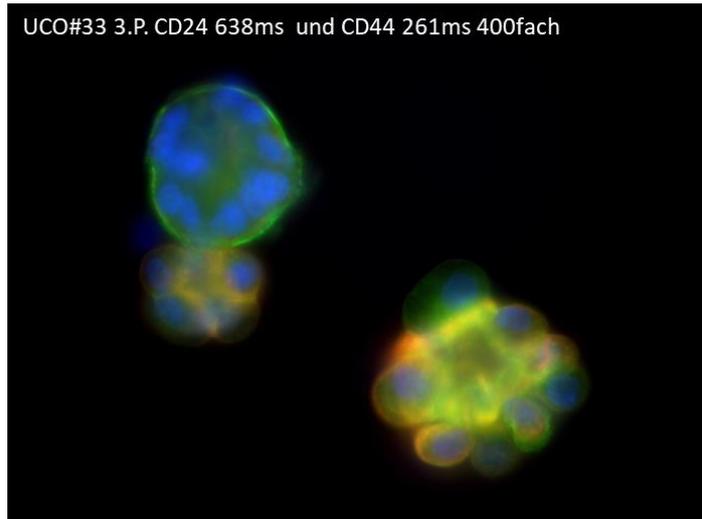


Abbildung 24 Fluoreszenzfärbung der Kultur UCO#33 in Passage 3. Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) und Kofärbung (gelb) von CD24 (grün) und CD44 (rot).

war in den Fluoreszenzfärbungen positiv, was für eine erhöhte Proliferationsrate spricht (ohne Abb., Tab. 12).

Die Färbung auf FGFR-3 lieferte ebenfalls ein positives Fluoreszenzsignal, was auf eine Interaktion der Zellen mit der sie umgebenden Matrix hindeutet (ohne Abb., Tab. 12).

In den DAPI-Färbungen lässt sich außerdem eine kugelförmige, hohle Form der Sphäroide vermuten, was die lichtmikroskopisch erhobene Vermutung aus 3.2.9 stützt (Abb. 23).

Zusammenfassend gibt es deutliche Hinweise auf maligne urotheliale Zellen mit einer ausgeprägten Stammzellaktivität in der dritten Passage der Kultur UCO#33.

3.4.7.2 5. Passage 5

Die in der 5. Passage der Kultur UCO#33 angefertigten und gefärbten Chamber Slides zeigten ebenfalls in einigen der durchgeführten Negativkontrollen latente positive Anfärbungen für den Sekundärantikörper Cy3 und wurden in Relation zu diesen Kontrollen interpretiert. Die Färbungen der 5. Passage wurden mit denen der 3. Passage verglichen.

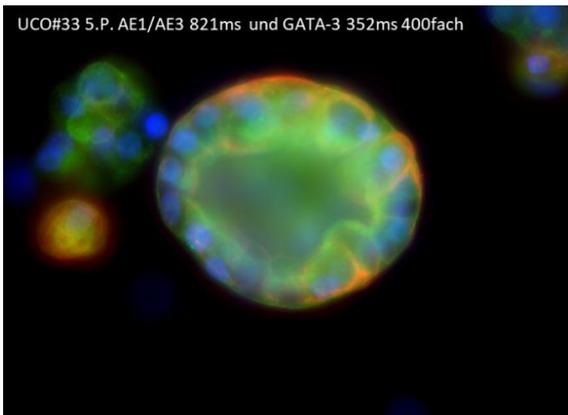


Abbildung 25 Fluoreszenzfärbung der Kultur UCO#33 in Passage 5 in 400-facher Vergrößerung. Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) und Ko-Färbung (orange) von GATA-3 (grün), AE1/AE3 (rot).

waren als Tumormarker ebenfalls nachweisbar, CK20 jedoch nicht (ohne Abb., Tab. 12). CK5 zeigte in dieser Passage eine positive Anfärbung, was zusammen mit der negativen CK-20-Färbung auf eine Veränderung des Expressionsmusters der Organoiden im Laufe der Passagen hindeutet (ohne Abb., Tab. 12).

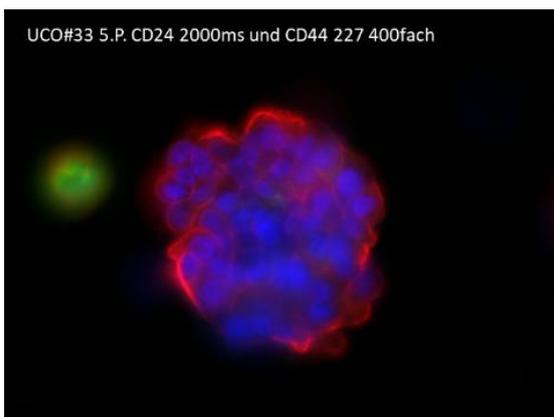


Abbildung 27 Fluoreszenzfärbung der Kultur UCO#33 in Passage 5 in 400-facher Vergrößerung. Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) Kofärbung von CD24-Färbung (grün) und CD44 (rot).

Die gefärbten Organoiden waren positiv für AE1/AE3 (Abb. 24) und zeigten einen deutlichen Nachweis für GATA-3 (Abb. 25) und weiterhin inhomogen positive Signale für CK7 (ohne Abb., Tab. 12), was für eine weiterhin bestehende Differenzierung der Zellen als urothelial spricht.

CD276, S100P, TP63 und in einigen der Organoiden p53 und Vimentin

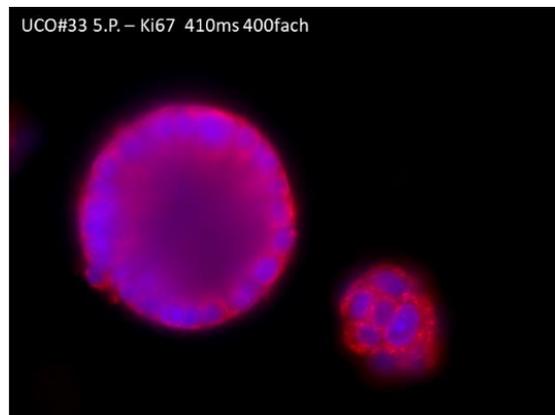


Abbildung 26 Fluoreszenzfärbung der Kultur UCO#33 in Passage 5 in 400-facher Vergrößerung. Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) und Ki67-Färbung (rot).

Die Ki67-Färbung (Abb. 26) zeigte bei einer geringeren Belichtungszeit ein positives Fluoreszenzsignal, was eine höhere Proliferationsaktivität als in der 3. Passage vermuten lässt. CD24 und CD44 konnten ebenfalls weiterhin nachgewiesen werden, wobei im Vergleich mit Passage 3, CD44 ein stärkeres Signal erzeugte als CD24

(Abb. 27). Außerdem war im Gegensatz zu CD44, CD24 nicht in allen Organoiden nachweisbar.

Die Färbung gegen FGFR-3 zeigte sich leicht positiv, was die Bildung einer extrazellulären Matrix bzw. Interaktion mit der 3D-Matrix weiterhin wahrscheinlich macht (ohne Abb., Tab. 12).

Die bereits vermutete hohle Kugelform der Organoide ist weiterhin sichtbar (Abb. 24).

Zusammenfassend lässt sich in der 5. Passage der Kultur UCO#33 eine Veränderung von Teilen des Zytoskeletts und der Stammzellaktivität der Organoid-Zellen im Vergleich zu den Sphäroiden 3. Passage der Kultur vermuten.

3.4.8 UCO#34

In den Chamber Slides der 1. Passage der Kultur UCO#34 konnte ein positiver Nachweis der Antigene AE1/AE3 (ohne Abb., Tab. 12) und CK7 (Abb. 27)

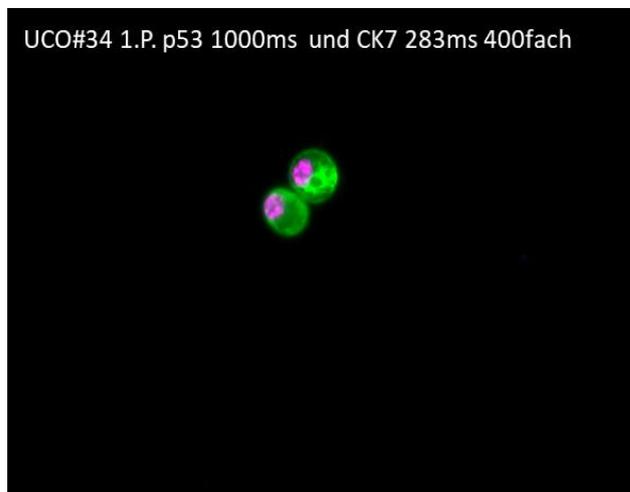


Abbildung 28 Fluoreszenzfärbung der Kultur UCO#34 in 400-facher Vergrößerung. Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) und Kofärbung von CK7 (grün) und p53 (rot).

erbracht werden, was auf eine urotheliale Abstammung der Sphäroide hindeutet. GATA-3 war in dieser Kultur nicht angefärbt (ohne Abb., Tab. 12).

Das positive Fluoreszenzsignal in der Färbung auf S100P und in einigen Sphäroiden TP63 (ohne Abb., Tab. 12) und p53 (Abb. 28) spricht für eine maligne Entität der Zellen.

In einigen Sphäroiden konnte CD44 nachgewiesen werden, was auf eine, zumindest teilweise vorhandene, Stammzellaktivität innerhalb der Kultur hinweist (ohne Abb., Tab. 12). CD24 konnte hier nicht nachgewiesen werden (ohne Abb., Tab. 12).

Zusammenfassend sind in der Kultur UCO#34 malignen Zellen, wahrscheinlich urothelialen Ursprungs, zu vermuten.

3.4.9 UCO#35

Aufgrund der, im Vergleich zu den anderen Kulturen, geringen Zellmenge konnten in den Chamber Slides der 3. Passage der Probe UCO#35 deutlich weniger Marker durch Antikörper angefärbt werden. In dieser Färbereihe wurden leicht positive Färbungen in der Negativkontrolle für Cy3 beobachtet und bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet.

Ein Nachweis von CK7 weist auf epitheliale Zellen hin und könnte auch auf einen urothelialen Ursprung hinweisen (ohne Abb., Tab. 12).

Vimentin und CK20 konnten in den Färbungen nachgewiesen werden, was auf eine Entdifferenzierung der Zellen und auf eine maligne Entität hindeutet (ohne Abb., Tab. 12).

Ein deutlicher Nachweis von CD44 spricht für eine Stammzellaktivität in der Zellkultur (ohne Abb., Tab. 12). CD24 konnte nicht nachgewiesen werden (ohne Abb., Tab. 12).

Die Hinweise auf die Herkunft und Entität der Zellen der Kultur UCO# 35 sind hier deutlich schwächer, wären aber mit Zellen eines Urothelkarzinoms vereinbar.

3.4.10 UCO#36

In der 1. Passage der Kultur UCO#36 konnte in den Chamber Slides mit dem Nachweis der Antigene GATA-3, CK7 und in einem großen Anteil der Sphäroide AE1/AE3 eine urotheliale Herkunft vermutet werden (ohne Abb., Tab. 12).

Die ausgeprägte Expression von CD44 in einigen Sphäroiden lässt eine Stammzellaktivität in der Kultur

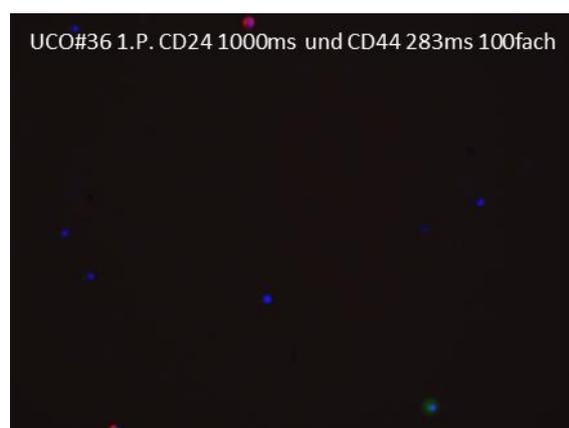


Abbildung 29 Fluoreszenzfärbung der Kultur UCO#36 in 100-facher Vergrößerung. Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) und Kofärbung von CD24 (grün) und CD44(rot).

vermuten (Abb. 30). CD24 konnte hier in einzelnen Zellen nachgewiesen werden, jedoch nie in Ko-Expression mit CD44 (Abb. 29).

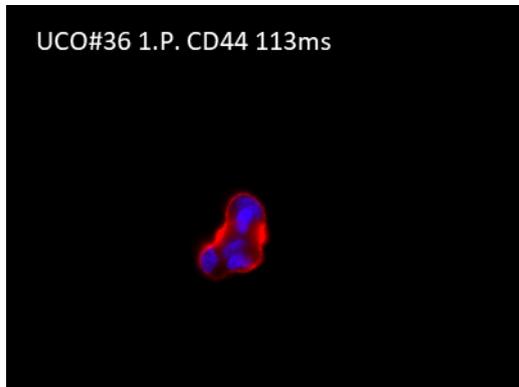


Abbildung 30 Fluoreszenzfärbung der Kultur UCO#36 in 400-facher Vergrößerung. Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) und CD44-Färbung (rot).

Auch konnten die Tumormarker p53, CK5, Vimentin und CK20 in den Sphäroiden angefärbt werden, was für eine Malignität der Zellen spricht (ohne Abb., Tab. 12).

Da das Protein CD276 ebenfalls in einigen der Sphäroide exprimiert war, lässt sich ein Immun-Escape-Mechanismus der Zellen vermuten (ohne Abb., Tab. 12).

Zusammenfassend können in der Kultur UCO#36 maligne urotheliale Zellverbänden vermutet werden.

3.4.11 Zusammenfassung

Es wurden Färbungen aus Kulturen von 9 verschiedenen Patientenproben angefertigt. Aufgrund der nachgewiesenen Expressionsmuster in Zusammenschau mit den histopathologischen Diagnosen kann in 8/9 Fällen (88,9%) mit hoher Wahrscheinlichkeit von urothelialen Tumorzellen ausgegangen werden.

	GATA-3	AE1/AE3	CK7	P53	TP63	Vimentin	S100P	CK5	CK20	CD276	CD24	CD44	Ki67	FGFR3	Perlecan
UCO#1 1.P.	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-			
Belichtungszeit in ms	3950- 10000	283-564	560- 1236	4935- 7249	860- 10000	5071- 10000	2919- 3879	1080- 1890	1500- 5800	2317- 4870	4000	4000	-	-	-
UCO#18	+	+	+	+/-	+	+	-	+	-	-	-	-		-	-
Belichtungszeit in ms	1638- 2636	363-524	398- 804	3000	1792- 3000	1378- 3000	3000	2076- 3000	3000	3000	3000	3000	-	3000	3000
UCO#20	+/-	+	+	+/-	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	+/-	+	-	
Belichtungszeit in ms	1000	108-1000	147- 1000	1000	1000	1000	521- 1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	-
UCO#25	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+/-	+	-	
Belichtungszeit in ms	1179- 5000	129-519	177- 217	3000	308- 3000	3000	114- 423	3000	302- 1493	981- 3000	3000	3000	240- 545	3000	-
UCO#28	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+/-	-	+		
Belichtungszeit in ms	1629- 5083	124-511	150- 199	3489- 4038	5000	5000	571- 1452	5000	5000	266- 4714	579- 5000	3892- 5000	400- 1000	-	-
UCO#33 3.P.	+	+	+/-	+/-	+	+	+	-	+/-	+	+/-	+	+	+	
Belichtungszeit in ms	826- 2000	772-2000	480- 1285	222- 2000	235- 2000	472-1200	2000	2000	641- 2000	658- 1490	638- 2000	220- 2000	1299- 2000	2000	-
UCO#33 5.P.	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+	-	+	+/-	+	+	-	
Belichtungszeit in ms	668- 1160	422-575	210- 859	569- 2000	2000	1589- 2000	1624- 2000	2000	2000	747- 859	2000	179- 500	353- 911	2000	-
UCO#34	-	+	+	+/-	+/-	-	+	-	+	-	-	+/-			
Belichtungszeit in ms	1000	252-978	258- 1000	1000	1000	1000	233- 729	1000	1000	1000	1000	386- 402	-	-	-
UCO#35			+		-	+			+		-	+			
Belichtungszeit in ms	-	-	1411	-	2000	1100	-	-	2000	-	2000	236	-	-	-
UCO#36	+	+/-	+	+	-	+	-	+	+	+/-	-	+/-	-	-	
Belichtungszeit in ms	1000	177-1000	221- 1000	150- 383	1000	337-1000	1000	265- 1000	121- 1000	1000	1000	113- 1000	1000	1000	-

Tabelle 12 In der Immunfluoreszenzcharakterisierung erhobene Proteinausstattung der Sphäroide bzw. Zellkonglomerate mit den dazugehörigen Belichtungszeiten. + steht für ein positives Fluoreszenzsignal, - für ein ausgebliebenes Fluoreszenzsignal und +/- für Färbungen, in denen positive und negative Färbungen auftraten. Zusammengehörigen Merkmale und Belichtungszeiten sind untereinander jeweils grau oder weiß hinterlegt.

Vergleicht man die Charakterisierungen der Kulturen UCO#1, UCO18, UCO#20, UCO#25, UCO#28, UCO#34, UCO#35, UCO#36, welche in der Kultur nicht über die 5. Passage hinaus kultiviert werden konnten mit den Merkmalen der Kultur UCO#33 in der frühen gefärbten Passage 3, dann zeigt die Kultur als einzige eine Ko-Expression der Stammzellmarker CD24 und CD44 in denselben Sphäroiden, was für ein vermehrtes Vorhandensein von Zellen mit (Tumor-) Stammzellaktivität spricht (Tab. 12).

Im Vergleich der Passagen 3 und 5 der Kultur UCO#33 zeigt sich eine Veränderte Expression einzelner Tumormarker, sowie Hinweise auf eine stärkere Stammzellaktivität und Proliferationstätigkeit der Zellen mit steigender Passage aufgrund niedrigerer benötigter Belichtungszeiten für den Nachweis der Proteine CD24, CD44 und Ki67 in der 5. Passage (Tab. 12).

In Zusammenschau der Daten lässt sich bei den meisten Kulturen, die ausreichend Zellmasse für Fluoreszenzfärbungen generierten, eine urotheliale Herkunft und eine Malignität vermuten. Außerdem ist aus den zahlreichen inhomogenen Nachweisen von Merkmalen innerhalb der einzelnen Kulturen abzuleiten, dass in den Kulturen Zellen mit unterschiedlichen Expressionsmustern aus den Urinproben isoliert wurden.

3.5 Immunhistochemische Charakterisierung der Ursprungstumoren und der Organoidkultur UCO#33

3.5.1 Überblick

In Zusammenarbeit mit der Universitätsklinik für Pathologie und Neuropathologie der Universität Tübingen, konnten zu 5 der Organoid- oder Sphäroidkulturen (UCO#18, UCO#20, UCO#25, UCO#33, UCO#36) zugehörige Paraffinschnitte von den Ursprungstumoren immunhistochemisch gefärbt werden. Aus der etablierten Organoidkultur UCO#33 konnten in der 5. Passage ebenfalls Paraffinschnitte gewonnen werden, die im Anschluss immunhistochemisch gefärbt wurden. Die Antigenfärbungen für die Merkmale p63, TP53, CD44, GATA-3, CK 5/6, CK7, CK20 und die HE-Färbungen wurden durch das pathologische Institut der Universität Tübingen durchgeführt (Abb. 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36). Die CD24-Färbungen wurden in unserer Arbeitsgruppe angefertigt,

waren in Rücksprache mit der pathologischen Abteilung aber für die Gewebeschnitte der Originaltumoren nicht aussagekräftig und konnten daher nicht in die Auswertung einbezogen werden.

Die berechneten Histoscores wurden durch eine erfahrene Pathologin aus der Universitätsklinik für Pathologie und Neuropathologie in Tübingen überprüft und bestätigt.

3.5.2 *Ursprungstumor zu UCO#33*

In der HE-Färbung zeigte sich ein deutlich verbreitertes Urothel, welches bis zu 27 Zelllagen enthielt. Basal längliche Zellen mit Kontakt zur Basalmembran gingen in kleinere Zellen mit teils pleomorphen Zellkernen und einer erhöhten Zell-Plasma-Relation über, bei denen kein Kontakt mehr zur Basalmembran ersichtlich war. Eine Crusta oder sonstige klare Epithelbegrenzung waren nicht erkennbar. Die Neoplasien hielten sich, wie in dem pathologischen Bericht vorbeschrieben, streng an die Grenze der Basalmembran (Abb.31).

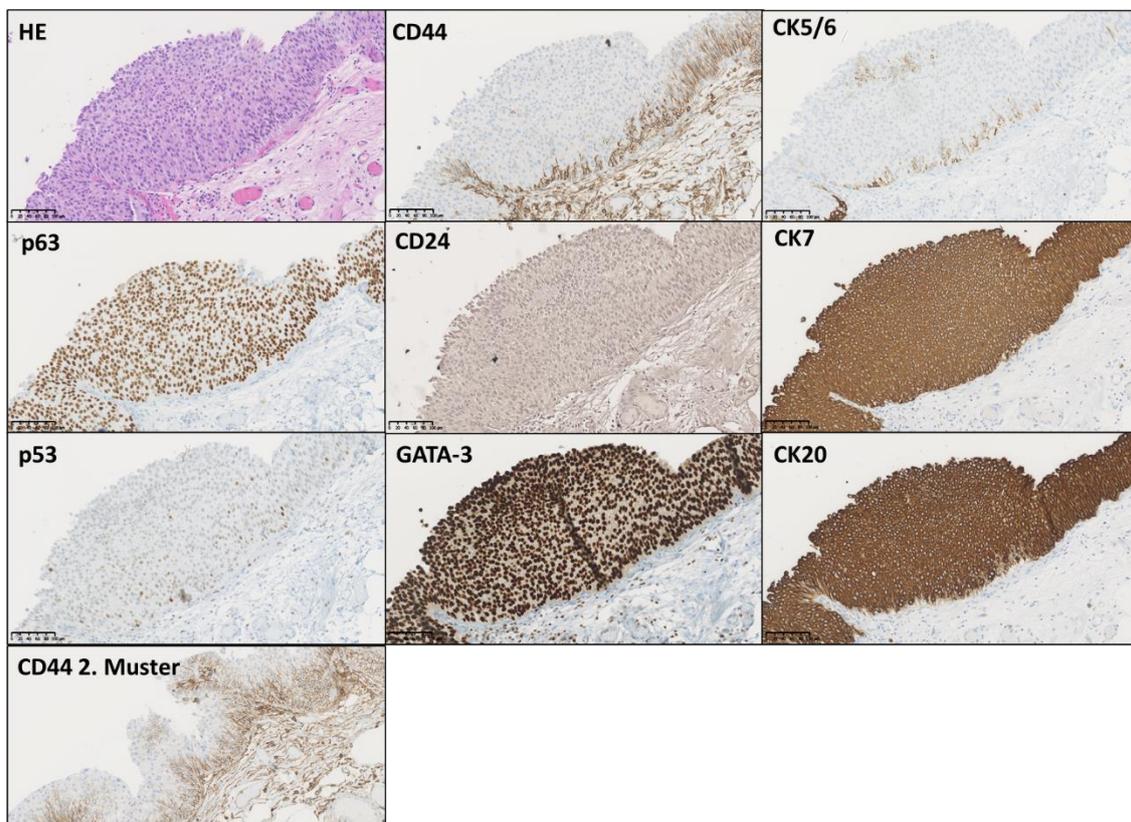


Abbildung 31 Immunhistochemischen Färbungen des Ursprungstumors von UCO#33 in 200facher Vergrößerung.

In der TP63-Färbung zeigten nahezu alle Zellkerne eine positive Anfärbung mit hoher und sehr hoher Intensität (Histoscore=210). Für p53 konnte lediglich ein Teil der Zellen als positiv gewertet werden, diese waren aber in allen Zellschichten lokalisiert (Histoscore=44). Es kann also von Tumorzellen ausgegangen werden (Abb. 31).

Für das Antigen CD44 zeigten sich in der Gesamtprobe zwei unterschiedliche Färbemuster. In beiden Fällen waren fast ausschließlich Zellmembranen angefärbt, welche direkt an der oder mit Kontakt zur Basalmembran lagen. Die Histoscores der beiden Muster betragen 41 und 80. Der Unterschied scheint hauptsächlich durch die Breite der Tumorzellschicht über den positiven Zellen bedingt. Das Antigen CD24 konnte in keinem Areal der Probe nachgewiesen werden (Histoscore=0). Es ist also von einer Stammzellaktivität ausschließlich in den basalmembrannahen Zellschichten auszugehen (Abb. 31).

GATA-3 wurde durch eine maximal kräftige Färbung aller Zellkerne in allen Zellschichten nachgewiesen mit einem Histoscore von 300. CK 5/6 als epitheliale Marker wurden in schwacher Färbintensität hauptsächlich der Zellmembran nahe der Basalmembran und in einem kleinen Areal in den oberen Zellschichten nachgewiesen mit einem Histoscore von 13. Es kann also von Zellen mit urothelialer Differenzierung ausgegangen werden (Abb.31).

In der Färbung für das Antigen CK7 zeigte sich eine homogene Färbung von Zytoplasma und Zellmembran maximaler Intensität mit einem Histoscore von 300. Diese Überexpression des Zytokeratins zusammen mit der, bis auf einige weniger stark angefärbte Zellen, gleich ausgeprägten Anfärbung des Tumormarkers CK20 (Histoscore=295) spricht für eine maligne Entartung der urothelialen Zellen (Abb. 31).

3.5.3 UCO#33 5. Passage

In der HE-Färbung konnten suffizient angefärbte Zellen mit basophilen, blau angefärbten Zellkernen und eosinophil, rötlich gefärbtem Zytoplasma dargestellt werden. Die Organoide stellten sich als oval bis rund dar. Wie schon in der Lichtmikroskopie (3.2.9) und der Immunfluoreszenz (3.4.7) vermutet, zeigten sie einen Hohlraum, der vermutlich von einer einzigen Zellschicht umkleidet ist (Abb.32).

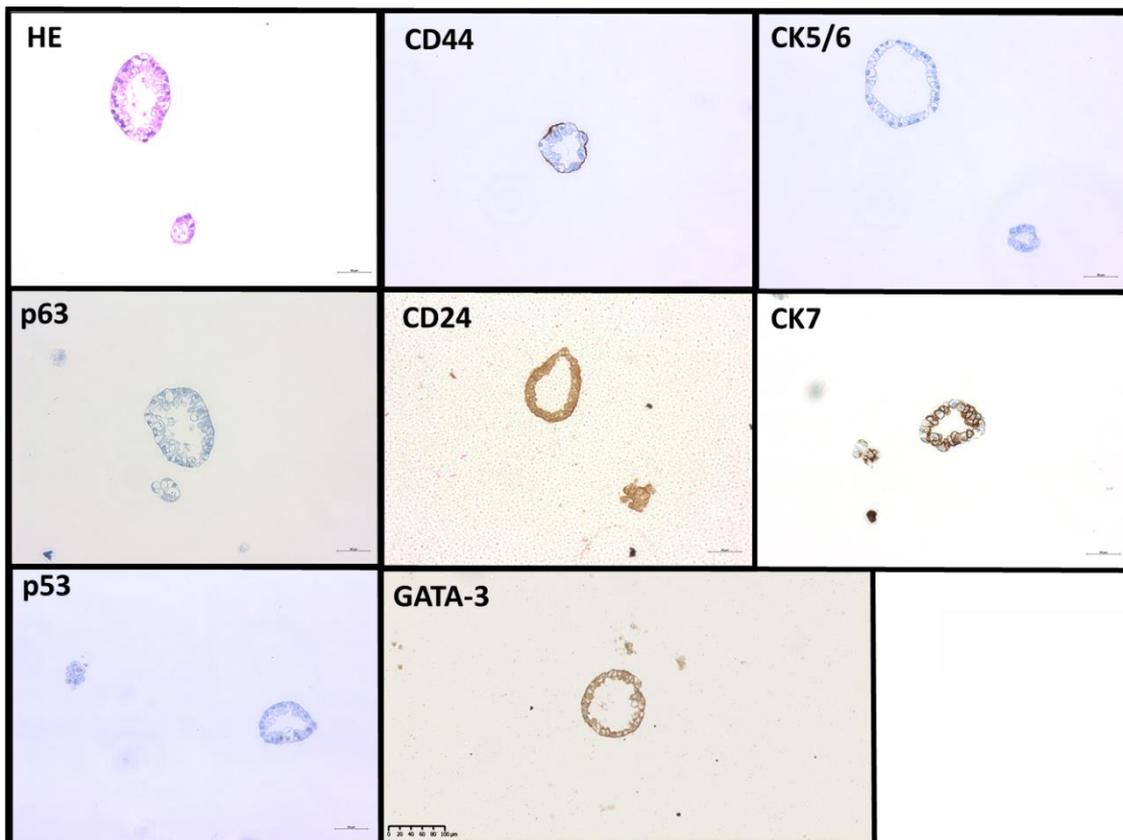


Abbildung 32 Immunhistochemischen Färbungen der Kultur aus Urin UCO#33 in Passage 5 in 200facher Vergrößerung.

Im Gegensatz zum Ursprungstumor zeigten die Organoide keine positiv angefärbten Zellkerne in der TP63-Färbung (Histoscore=0). P53 konnte in vereinzelt Zellen als nukleäre, kräftige Färbung nachgewiesen werden bei einem Histoscore von 20, was annähernd dem Färbemuster des Originaltumors entspricht. Es zeigt sich also ein selektiver Unterschied der Proteinexpression von Tumormarkern im Vergleich zum Ursprungstumor (Abb.32).

Die Färbung für CD44 ergab eine sehr kräftige, membranöse Anfärbung fast aller untersuchten Zellen. Allerdings beschränkte sich die Anfärbung bei einem

Großteil der Organoide auf die apikale Zellmembran (Histoscore=75), was eine Stammzellaktivität vermuten lässt, sowie auch eine Organisation und Orientierung der Zellen in ihrem Verbund. In der Färbung des Antigens CD24 war ebenfalls eine, in den meisten Fällen, auf die apikale Zellmembran begrenzte Anfärbung erkennbar. Die Intensität der Anfärbung war allerdings schwächer (Histoscore=20) als bei CD44 (Abb. 32).

GATA-3 zeigte sich in einer, im Vergleich zum Ursprungstumor, abgeschwächten Färbintensität aber über alle Zellen als positiv. Allerdings färbten sich im Gegensatz zu den soliden Tumorproben hier nicht nur der Zellkern sondern auch die Zellmembran an (Histoscore 200). CK5/6 zeigte sich konsistent als negativ in den gefärbten Organoidschnitten (Histoscore=0). Eine urotheliale Orientierung lässt sich also vermuten, aber auch hier sind Unterschiede zum Ursprungstumor in der Proteinausstattung, speziell im Zytoskelett, wahrscheinlich (Abb. 32).

CK7 war in 80% der Zellen mit einer sehr hohen Intensität, in 20% der Zellen mit einer hohen Intensität angefärbt, wobei die unterschiedlich stark angefärbten Zellen innerhalb der Sphäroide sehr deutlich voneinander zu unterscheiden sind und an allen Membrananteilen dieser Zellen eine gleichartige Färbung aufweisen (Histoscore=280), was einen weiteren Hinweis für eine Orientierung oder Organisation der Zellen im Organoid-Zellverband gibt (Abb.32).

Die Färbung gegen CK20 konnte nicht ausgewertet werden, da beim Färbeprozess die Zellproben vom Objektträger gewaschen wurden und keine Möglichkeit für eine erneute Färbung bestand.

3.5.4 Ursprungstumor zu UCO#18

In der HE-Färbung zeigte sich ein deutlich tumorsuspekte Urothelverbreiterung mit bis zu 25 Zellschichten. Es war ein erhöhtes Zell-Plasma-Verhältnis vorhanden und die Einzelzellen zeigten teilweise keine Verbindung mehr zur Basalmembran. Eine Crusta oder Deckzellschicht war nicht erkennbar. Wie im pathologischen Bericht vorbeschrieben, beschränkte sich die Neoplasie

ausschließlich auf die Epithelschicht und überschritt die Basalmembran nicht (Abb.33).

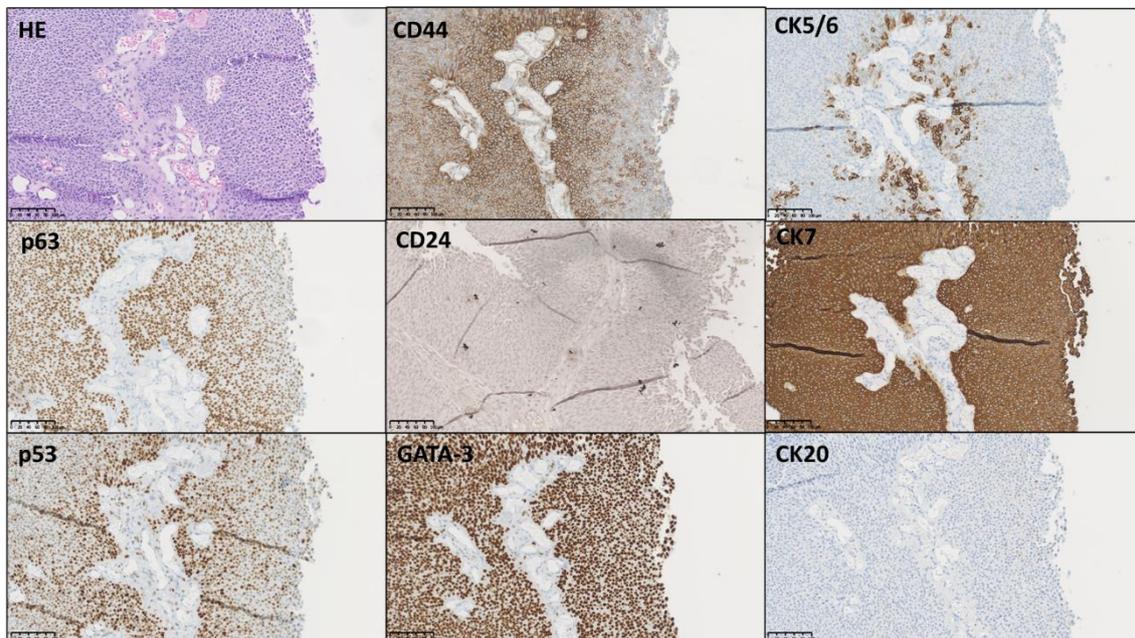


Abbildung 33 Immunhistochemischen Färbungen des Ursprungstumors von UCO#18 in 200facher Vergrößerung.

In der p-63 Färbung zeigten sich angefärbte Zellkerne in verschiedenen Intensitäten bei einem Histoscore von 210. Die p53 Expression konnte ebenfalls als nukleäre Färbung aber in geringerem Maße und am ausgeprägtesten nahe der Basalmembran, bei einem Histoscore von 130, nachgewiesen werden. Zusammen spricht dies für eine Malignität der Zellen (Abb.33).

Die CD44 Färbung zeigte eine basal betonte, klar auf die Zellmembran beschränkte Anfärbung aller Zellen mit einem Histoscore von 200, was auf eine erhöhte Stammzellaktivität der Tumorzellen schließen lässt (Abb. 33).

In der GATA-3 Färbung war eine nukleäre, homogene Färbung maximaler Intensität über alle Zellschichten hinweg vorhanden mit einem Histoscore von 300. Zusammen mit der fast ausschließlich basal, dort aber sehr deutlich, ausgeprägten Zytoplasmaanfärbung für CK5/6 (Histoscore=25) ist eine urotheliale Differenzierung der Tumorzellen wahrscheinlich (Abb.33).

Die Färbung des Antigens CK7 war für alle Tumorzellen homogen und auf Zytoplasma und Zellmembran beschränkt. Die Anfärbung der Zellen war deutlich

positiv bei einem Histoscore von 300, was auf epitheliale Zellen hindeutet und in dieser Überexpression einen Hinweis auf Malignität gibt (Abb.33).

CK20 konnte in dem Gewebe nicht nachgewiesen werden (Abb. 33).

3.5.5 *Ursprungstumor zu UCO#20*

In der HE-Färbung dieser Probe war ein stark verbreitetes Epithel zu erkennen, das teils filiforme Tumorareale bildete, die rundum von einer Basalmembran mit Bindegewebe umgeben waren und kein Lumen zeigten. Es waren teilweise über 25 Zellschichten zu erkennen. Mittig der filiformen Tumor-Konglomerate waren muzinös-zystisch erscheinende rund-ovale Strukturen angeschnitten. Die basalen 2-5 Zellschichten schienen eine Verbindung zur Basalmembran zu haben, die oberen Zellschichten zeigten sich kleinzelliger und mit einer erhöhten Zell-Plasma-Relation und teils pleomorphen Kernen. Die Tumorzellen hielten sich streng an die Basalmembrangrenze (Abb. 34).

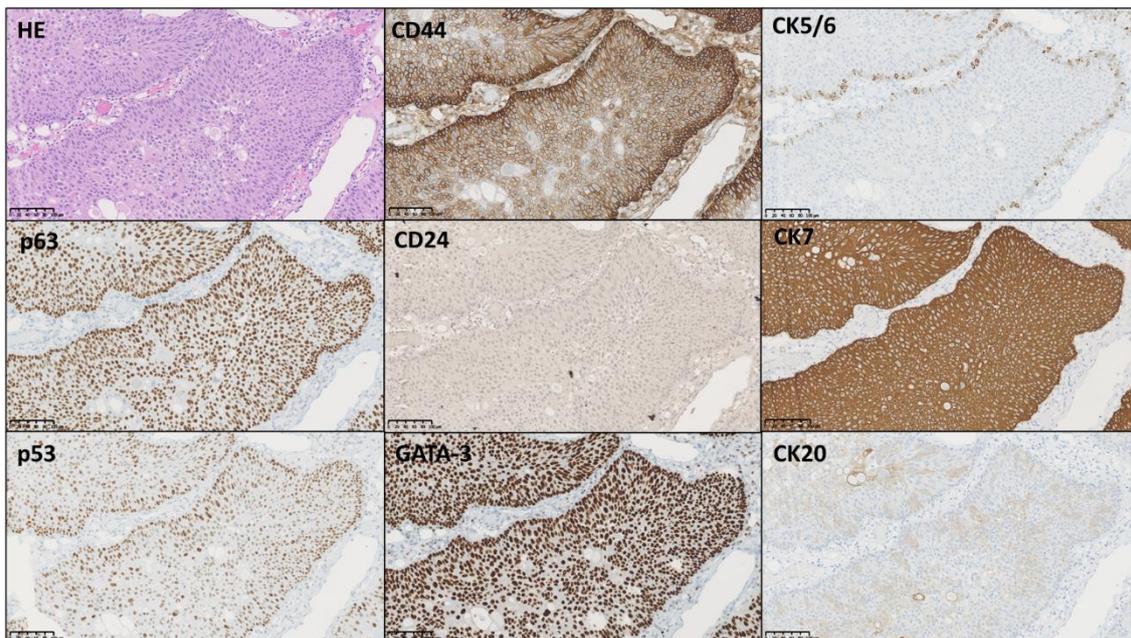


Abbildung 34 Immunhistochemischen Färbungen des Ursprungstumors von UCO#20 in 200facher Vergrößerung.

In der p63-Färbung war eine Anfärbung aller Zellkerne im Bereich des epithelialen Tumors zu beobachten. Die Intensität variierte zwischen maximaler Anfärbung und einer deutlichen Anfärbung (Histoscore=250). Für das Antigen p53 zeigte sich ebenfalls eine vollständige Anfärbung der Zellkerne. Hier war die

Färbeintensität aber in der Mehrzahl der Zellen eher schwach (Histoscore=125). Es ist also eine Überexpression der beiden Tumormarker wahrscheinlich, was auf die Malignität der Zellen schließen lässt (Abb.34).

Die Antigenfärbung für CD44 war basal in maximaler Intensität erkennbar. In den mittleren Anteilen der filiformen Tumorzapfen war eine Färbung mittlerer Intensität zu sehen. Bei einem Histoscore von 215 ist hier von einer vermehrten Stammzellaktivität der Zellen auszugehen (Abb. 34).

GATA-3 konnte in allen tumorsuspekten Zellen nukleär in maximaler Färbeintensität nachgewiesen werden (Histoscore=300). Die Epithelmarker CK 5/6 waren nur in großen Anteilen der basalen Zellreihe in schwacher bis mittlerer Intensität nachweisbar bei einem Histoscore von 8. Zusammen lassen beide Färbungen eine urotheliale Herkunft der Zellen vermuten (Abb. 34).

Die Anfärbung des Zytokeratins 7 verlief homogen und in maximaler Intensität im Zytoplasma und der Zellmembran aller Tumorzellen. Zusammen mit der nicht klar auf die Deckzellen begrenzten Anfärbung Zellen für das Antigen CK20 mit einem Histoscore von 40, weist das auf einen malignen, epithelialen Tumor hin (Abb. 34).

3.5.6 Ursprungstumor zu UCO#25

In der HE-Färbung zeigte sich eine deutlich verdickte Epithelzellschicht mit bis zu 17 Schichten. Die basalen Zellen zeigten einen Kontakt zur Basalmembran, die weiter apikal gelegenen Zellschichten nicht. Sie waren deutlich kleiner und haben eine massiv erhöhte Kern-Plasma-Relation. Eine Crusta war nicht zu erkennen.

In Teilen der Probe überschritten die Tumorzellen die Grenze der Basalmembran (Abb. 35).

In der p63-Färbung zeigten sich 2 verschiedenen Expressionsmuster. In dem einen waren alle Zellen, in mittlerer bis hoher Intensität (Histoscore=240), positiv angefärbt. In dem anderen Tumoranteil waren lediglich einzelne Zellen mittel bis stark angefärbt (Histoscore=25). Der Tumor schien also verschiedene Anteile mit unterschiedlichen Proteinexpressionsmustern zu haben (Abb. 35).

Die Färbung des Antigens p53 zeigte, bei einem Histoscore von 165, Zellen mit allen Färbeintensitäten. 10% der Zellen waren gar nicht angefärbt (Abb. 35).

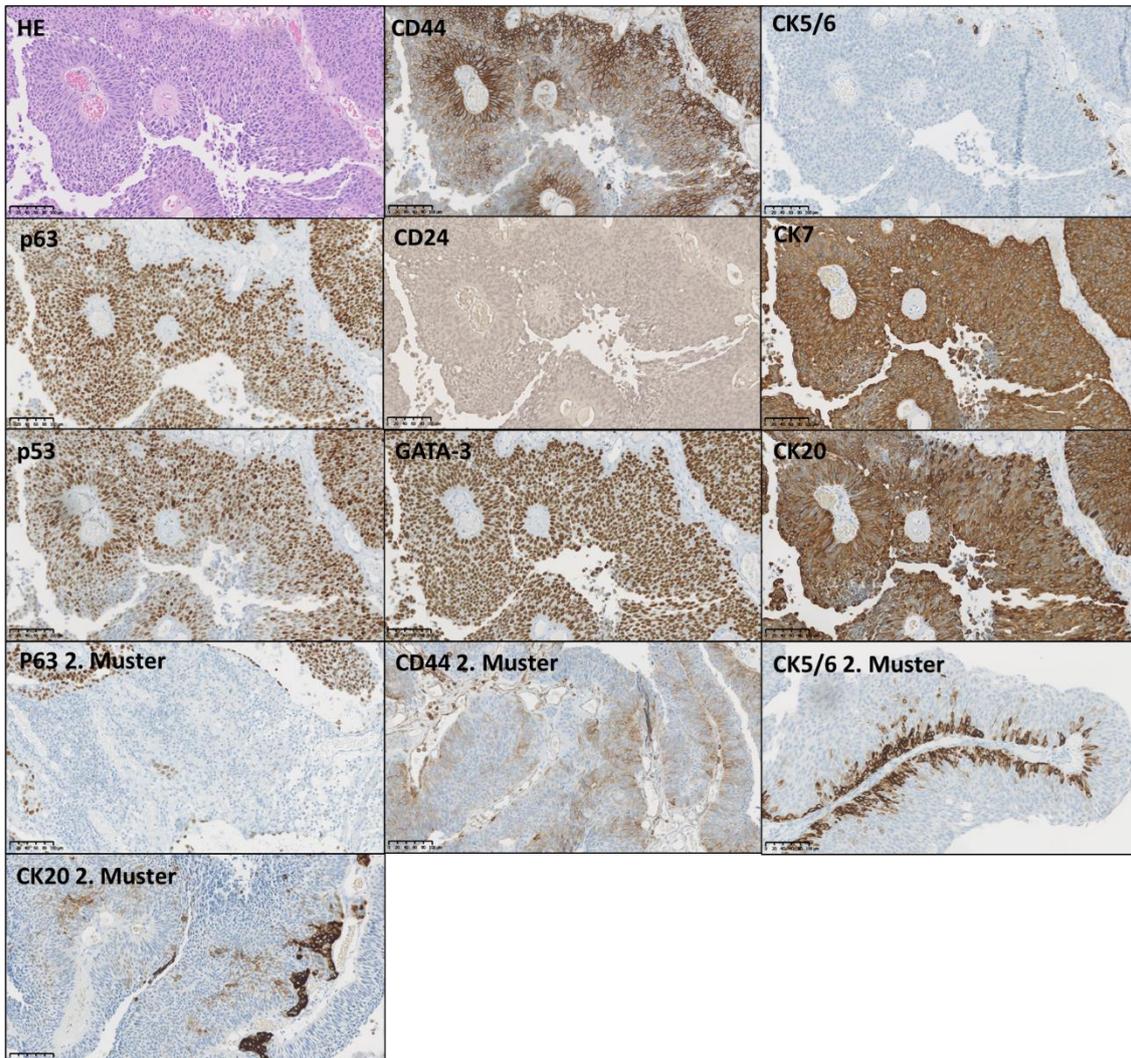


Abbildung 35 Immunhistochemischen Färbungen des Ursprungstumors von UCO#25 in 200facher Vergrößerung.

In der CD44-Färbung waren 2 Expressionsmuster unterscheidbar, eines mit sehr starker Proteinexpression bei einem Histoscore von 230 und eines mit einer eher schwachen Ausprägung mit einem Histoscore von 55. In beiden Anteilen war die jeweils höhere Färbeintensität in den basalen Schichten der Tumorzellen. Es scheint also einen Anteil mit höherer und einen mit niedrigerer Stammzellaktivität zu geben (Abb. 35).

In der Färbung des Antigens GATA-3 waren alle Zellkerne der Tumorzellen in maximaler Intensität angefärbt bei einem Histoscore von 300. Für die Antigene CK5/6 gab es 2 verschiedene Expressionsmuster, eines mit nur einzelnen

angefärbten Zellen (Histoscore=3) und eines mit einer mittleren bis starken Färbung der hauptsächlich basalen Zellreihen (Histoscore=40). Es kann also von einem urothelialen Tumor ausgegangen werden (Abb. 35).

CK7 konnte in allen Tumorzellen in einer mittleren bis starken Färbeintensität nachgewiesen werden bei einem Histoscore von 280. Die Färbung des Zytokeratin 20 teilte sich in zwei unterschiedliche Expressionsmuster auf, eines mit einer sehr ausgeprägten Anfärbung und einem Histoscore von 200 und eines, in dem nur partiell angefarbte Zellen gefunden werden konnten mit einem Histoscore von 26. Auch hier scheint ein urothelialer Tumor wahrscheinlich, der in seinen verschiedenen Anteilen unterschiedliche Proteinexpressionen und Zytoskelettanteile zeigt (Abb. 35).

3.5.7 Ursprungstumor zu UCO#34

In der HE-Färbung ließ sich ein balkenartiger, am ehesten epithelialer, Tumor erkennen, der in und teilweise auf der mit angeschnittenen Blasenwand lag. Es waren diffus ineinander wachsende Zellnester erkennbar mit pleomorphen, atypischen Kernen und ohne erkennbare Zellorientierung. Am Rand des Tumors hielten sich die Zellen teils noch an die Basalmembrangrenze, mittig war diese nicht mehr abzugrenzen und es fanden sich auch Zellnester in dem darunterliegenden Bindegewebe (Abb. 36).

In der Färbung des Antigens p63 fielen 2 unterschiedliche Expressionsmuster des Tumors auf. In einem Muster waren 40 % der Zellkerne angefarbt bei einem Histoscore von 70 in dem anderen Muster waren nur vereinzelt Kernfärbungen zu finden (Histoscore=0,4). Für das Protein p53 zeigten 66 % der Zellen eine Kernfärbung, größtenteils niedriger Färbeintensität. Es ließ sich also ein Tumor mit verschiedenen Anteilen vermuten (Abb. 36).

Auch die CD44 Färbung zeigte zwei unterschiedliche Färbemuster. Eines mit eher vereinzelt angefarbten Zellketten und einem Histoscore von 60 und eines in dem noch eine Basalmembran zu erkennen ist und ein Großteil der Zellen, insbesondere basal, eine Anfärbung der Zellmembran zeigen (Histoscore=260). Es handelte sich also um einen Tumor, dessen verschiedene Anteile unterschiedlich starke Stammzellaktivität aufwiesen (Abb. 36).

Das Antigen GATA-3 konnte in 90 % der Zellen mit mittlerer bis starker Färbeintensität nachgewiesen werden. Für die Antigene CK5/6 zeigten sich wiederum 2 unterschiedliche Muster, eines mit nur sporadischer Expression (Histoscore=10) und eines mit basal betonter mittlerer bis starker Anfärbung von 60% der Zellen (Histoscore=160) (Abb. 36).

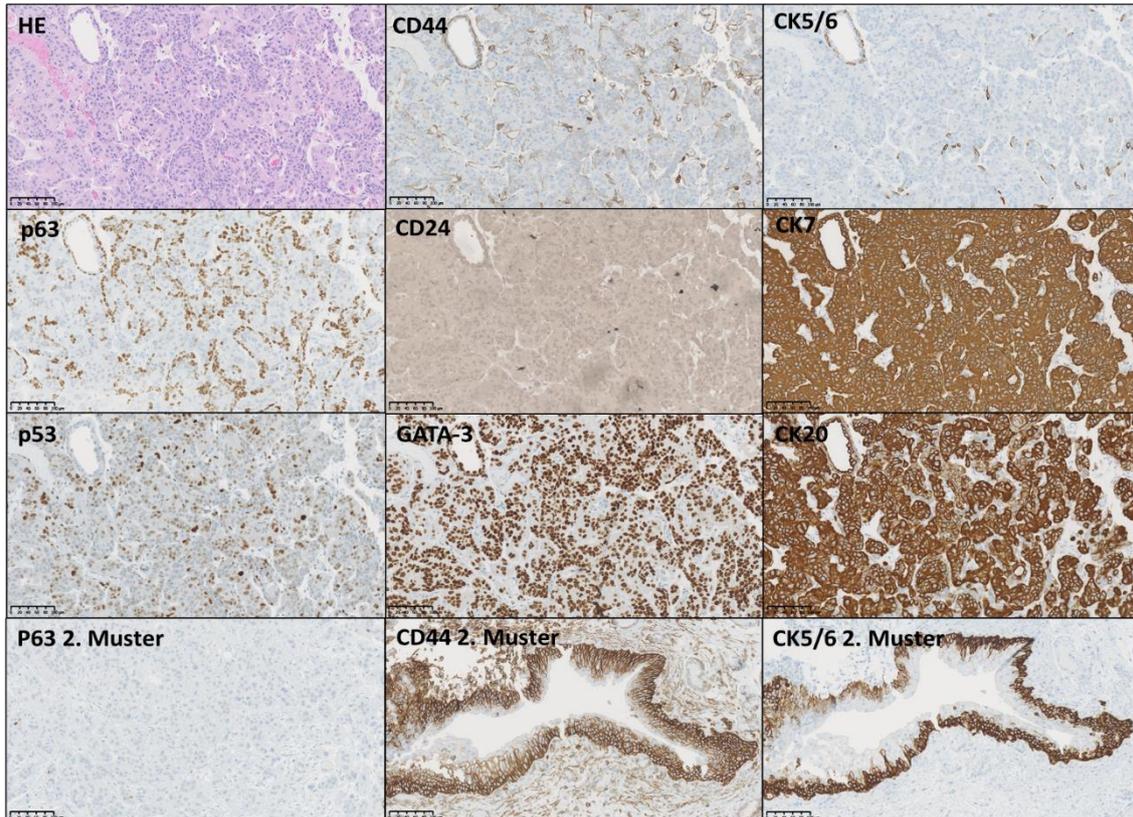


Abbildung 36 Immunhistochemischen Färbungen des Ursprungstumors von UCO#34 in 200facher Vergrößerung.

CK7 zeigte sich in allen Zellen maximal intensiv angefärbt bei einem Histoscore von 300. Die Färbung auf das Antigen CK20 war in allen Tumoranteilen mit mittlerer und hoher Färbeintensität zu beobachten (Histoscore=280). Es kann also von epithelialen Zellen maligner Dignität ausgegangen werden (Abb. 36).

3.5.8 Ursprungstumor zu UCO#36

In der HE-Färbung dieses Tumorpräparates zeigte sich ein nur leicht verbreitertes Urothel mit maximal 10 Zellschichten. Die meisten Zellen schienen noch eine Verbindung zur Basalmembran zu unterhalten. Kernatypien waren keine erkennbar und eine Crusta war teilweise ausgebildet. Die Zellen hielten die Basalmembrangrenze streng ein (Abb. 37).

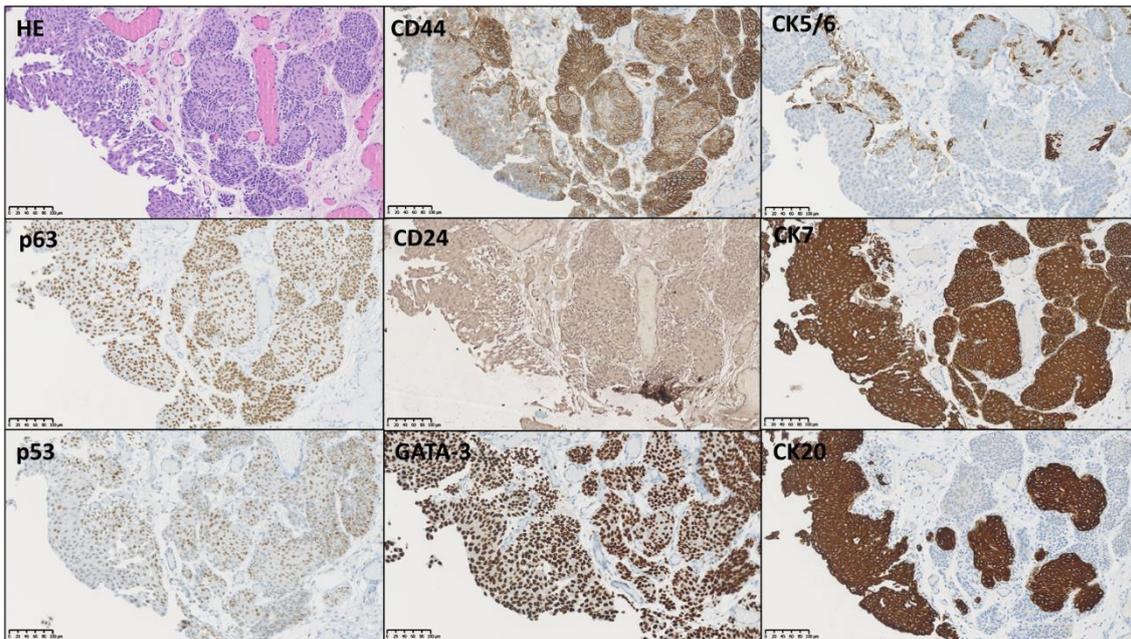


Abbildung 37 Immunhistochemischen Färbungen des Ursprungstumors von UCO#36 in 200facher Vergrößerung.

Die Zellen zeigten eine homogene Anfärbung mittlerer Intensität gegen das Proteins p63 (Histoscore=200). p53 konnte in der Mehrzahl der Zellkerne nur mit schwacher Intensität nachgewiesen werden (Histoscore=110) (Abb. 37).

Innerhalb der epithelialen Zellen zeigten sich für das Antigen CD44 angefärbte Zellmembranen in allen Intensitäten (Histoscore=190). Dies weist auf eine Stammzellaktivität unterschiedlicher Ausprägung unter den Zellen hin (Abb. 37).

Alle Zellkerne zeigten eine deutlich positive Anfärbung auf GATA-3 mit einem Histoscore von 300. CK5/6 waren sporadisch basal nachweisbar. Es ist also eine urotheliale Orientierung der Zellen wahrscheinlich (Abb. 37).

Die Antigenfärbung auf CK7 war in allen Zellen im Zytosol und auf der Zellmembran in maximaler Intensität nachweisbar (Histoscore=300). Für CK 20

waren klar abgegrenzte Epithelanteile mit maximaler Färbeintensität und solche ohne Anfärbung zu beobachten. Dies kann als Zellatypie gewertet werden (Abb. 37).

3.5.9 Zusammenfassung

Im Vergleich des Ursprungstumors der Kultur UCO#33 und der Organoidkultur in der 5. Passage, lässt sich eine deutlich verringerte Expression der Proteine p63, p53, GATA-3 und CK5/6 in der Organoidprobe feststellen (Tab. 13). Der Proteinmarker CD44 und war in der Organoidprobe vermehrt nachweisbar gegenüber Anteilen des Ursprungstumors (Tab. 13).

Probe	P63	P53	CD44	CD24	GATA-3	CK5/6	CK7	CK20
Ursprungstumor UCO#18	210	130	200	-	300	25	300	0
Ursprungstumor UCO#20	250	125	215	-	300	8	300	40
Ursprungstumor UCO#25	240/25	165	230/55	-	300	3/40	280	200/26
Ursprungstumor UCO#33	210	44	41/80	-	300	13	300	295
UCO#33 5.Passage	0	20	75	20	200	0	280	-
Ursprungstumor UCO#34	70/0,4	73	60/260	-	210	10/160	300	280
Ursprungstumor UCO#36	200	110	190	-	300	22	300	180

Tabelle 13 Histocores der gefärbten Proteinmarker für die Ursprungtumoren und die Organoidkultur UCO#33 in der Immunhistochemie. Bei dem Marker CD24 lag bei allen soliden Tumoren ein systematisch- methodischer Fehler (Ergebnisse in Klammern).

Vergleicht man die immunhistochemisch nachgewiesenen Proteinexpressionen der Ursprungstumore ohne erfolgreich etablierte Organoidkultur mit dem Ursprungstumor zu UCO#33, so fällt auf, dass im Ursprungstumor zu UCO#33 eine vergleichsweise niedrige Expression von p53 und CD44 nachweisbar war (Tab. 13).

In drei der 5 gefärbten Ursprungstumore waren unterschiedliche Anteile mit verschiedenen Proteinexpressionen auszumachen. Marker, die in der Anfärbung innerhalb der Tumoren variierten, waren: p63, CD44, CK5/6 und CK20 (Tab. 13).

Die Färbung für das Protein CD24 konnte lediglich in der 5. Passage der Organoidkultur UCO#33 als leicht positiv ausgewertet werden (Tab. 13).

3.5.10 Vergleich der Urinkulturen mit dem Ursprungstumor

Durch die eingeschränkte quantitative Aussagekraft der Immunfluoreszenzfärbungen in Chamber Slides (Tab. 12) der aus Urin stammenden Kulturen ist nur ein qualitativer Vergleich möglich in dem das Vorhandensein, das teilweise Vorhandensein oder das Fehlen eines Markers angenommen werden kann. Diese Aussagen wurden mit den immunhistochemischen Färbungen der Ursprungstumoren (Tab. 13) verglichen.

Immunhistochemisch war nur eine Kombinationsfärbung der Zytokeratine 5 und 6 möglich, sodass diese der Einzelfärbung des CK5 in der Immunfluoreszenz gegenübergestellt wurde.

In den Proben der Kultur UCO#18 (Tab. 12) waren die Marker CK20 und CD44 im Vergleich mit dem Ursprungstumor (Tab. 13) nicht nachweisbar.

In den Proben der Kultur UCO#20 (Tab.12) waren die Marker TP63 und CK5 ausschließlich in dem Ursprungstumorgewebe (Tab. 13) nachweisbar.

In den Proben der Kultur UCO#25 (Tab. 12) war CK5 in der Sphäroidkultur nicht nachweisbar, in dem Ursprungstumor (Tab. 13) jedoch schon.

In den Proben der Kultur UCO#34 (Tab. 12) waren die Marker GATA-3, p53 und CK5 nur in den Zellen des Ursprungstumors (Tab. 13) nachweisbar.

In den Proben zu der Kultur UCO#36 (Tab. 12) war der Marker TP63 lediglich in der Ursprungstumorprobe (Tab. 13) nachweisbar.

Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass selektiv einzelne Tumor-, Stammzell- oder/und Zytoskelettbestandteile in der 3D-Zellkultur der Zellen aus Spülurin im Gegensatz zum Ursprungstumor nicht exprimiert werden.

3.6 Einflussfaktoren der Patienten

3.6.1 UCO#1

Die Ursprungstumorprobe stammt von einer 79-jährigen Patientin. Anamnestisch gab Sie einen Raucherstatus aber keinen regelmäßigen Alkoholkonsum an. Die entfernten Befunde waren an der linken Seitenwand und der Vorderwand der Blase lokalisiert. Die Urinzytologie wurde als uneindeutig interpretiert.

Pathologisch wurde der Tumor als regionale Metastase eines vordiagnostizierten Karzinomsarkomes des Uterus (Müller'scher Misch tumor) eingestuft. Nach der Entfernung gab es bei der Patientin Rezidive und weitere Metastasen.

3.6.2 UCO#18

Der zugrundeliegende Ursprungstumor stammte von einer 83-jährigen Patientin. In der Anamnese waren weder regelmäßiger Nikotin- noch Alkoholkonsum beschrieben. Die entfernten Befunde waren multilokulär an Blasenauslass, Hinterwand, Blasendach, linker Seitenwand und Vorderwand der Blase lokalisiert. Eine Urinzytologie wurde nicht beschrieben.

Der Tumor wurde pathologisch als TNM pT1, G3, High Grade eingestuft und als wenig differenziert und teils plasmazytoid beschrieben und zeigte auch Metastasierung. Nach der Entnahme wurde ein Rezidiv beschrieben.

3.6.3 UCO#20

Der Ursprungstumor stammte von einem 55-jährigen männlichen Patienten. Es war eine Raucheranamnese aber keine Alkoholanamnese vorhanden. Der Tumorbefund war an der rechten und linken Seitenwand lokalisiert. Die Urinzytologie war negativ.

Pathologisch wurde der Befund als papilläres Urothelkarzinom mit TNM pTa, G1, Low Grade eingeschätzt. Metastasen ergaben sich diagnostisch nicht. Rezidive nach der Entfernung wurden keine beschrieben.

3.6.4 UCO#25

Der Ursprungstumor wurde bei einem 64-jährigen Patienten entnommen. Er gab weder Nikotin- noch Alkoholanamnese an. Der Befund war an der Hinterwand der Blase lokalisiert. Eine Urinzytologie war nicht beschrieben.

Pathologisch wurde der Befund als papilläres Urothelkarzinom mit TNM pT2a, G2, High Grade eingestuft. Metastasen waren keine beschrieben. Der Patient erlitt nach der Probeentnahme ein Rezidiv.

3.6.5 UCO#28

Der zugrunde liegende Ursprungstumor wurde einem 54-jährigen Patienten entnommen. Er gab einen Raucherstatus und keine Alkoholanamnese an. Der Befund war an der Hinterwand, Blasenauslass und Seitenwand (nicht näher beschrieben) der Blase lokalisiert. Die Urinzytologie war negativ.

Pathologisch wurde der Tumor als papilläres Urothelkarzinom mit TNM pT2a, G3, High Grade und vorhandener Metastasierung beschrieben. Rezidive wurden nach Entfernung des Befundes keine beschrieben.

3.6.6 UCO#33

Der Ursprungstumor wurde einem 85-jährigen Patienten entnommen. Anamnestisch wurden weder regelmäßiger Nikotin- noch Alkoholkonsum angegeben. Der Befund war an der linken Seitenwand und der Vorderwand der Blase lokalisiert. Die Urinzytologie war positiv.

Pathologisch wurde ein papilläres Urothelkarzinom mit TNM pT1, G2, Low Grade festgestellt. Es wurden keine Metastasen beschrieben und auch keine Rezidive nach der Entfernung des Tumors.

3.6.7 UCO#34

Der Ursprungstumor wurde bei einem 85-jährigen Patienten entnommen. Anamnestisch wurde kein Raucherstatus und keine Alkoholanamnese beschrieben. Die Lokalisation des Befundes war die rechte Seitenwand. Die Urinzytologie war positiv.

Durch die Pathologie wurde ein stromainvasives, geringdifferenziertes Urothelkarzinom beschrieben mit TNM pT1, G3, High Grade. Metastasierung oder Rezidive nach der Entfernung des Befundes wurden nicht beschrieben.

3.6.8 UCO#35

Der ursprüngliche Tumor wurde einem 61-jährigen Patienten entnommen. Anamnestisch wurde ein Raucherstatus erhoben, jedoch kein regelmäßiger Alkoholkonsum. Die Lokalisation des Befundes war die Hinterwand und der Auslass der Blase. Urinzytologie war keine beschrieben.

Pathologisch wurde der Tumor als neoadjuvant therapiertes sarkomatoides Urothelkarzinom mit einer ca. 90%-iger Vitalität beschrieben und einem TNM-Stadium von ypT4a.

3.6.9 UCO#36

Der Ursprungstumor wurde bei einem 70-jährigen Patienten entnommen. In der Anamnese wurden weder regelmäßiger Nikotin- noch Alkoholkonsum angegeben. Der Befund war am Blasenaustritt lokalisiert. Die Urinzytologie war negativ.

Pathologisch wurde der Tumor als PUNLMP beschrieben.

3.6.10 Zusammenfassung

Zusammenfassend konnte im Vergleich der recherchierten Patientendaten der unerfolgreichen Kulturen aus Urinproben mit der erfolgreichen Organoidkultur UCO#33 kein Faktor ausgemacht werden, der nur in der erfolgreichen Kultur vorhanden war oder fehlte. Die einzige Vermutung, die sich ergab, war, dass eine positive Urinzytologie einen Vorteil verschafft, da es außer der Probe zu UCO#33 nur eine weitere Probe gab, bei der die Urinzytologie als positiv interpretiert wurde. Aufgrund der geringen Anzahl der erfolgreichen Kulturen ist dies mit den vorliegenden Daten aber nicht belegbar.

4 Diskussion

Organoide aus patientenabgeleiteten Blasentumorzellen sind ein erfolgsversprechendes Instrument, um individualisierte Therapien für Patienten zu entwickeln, da insbesondere bei muskelinvasiven Tumoren der Blase die Verbesserung der Prognose durch Chemo- oder Radiotherapie bisher nur sehr eingeschränkt möglich ist (Meijer, 2021).

Bisher wurden Organoiden aus Blasentumorzellen hauptsächlich aus solidem Tumorgewebe gewonnen. Hierfür gibt es etablierte Protokolle, in denen vielversprechenden Erfolgsraten beschrieben werden (Mullenders et al., 2019). Für die Kultur von Organoiden aus festen Tumorproben, ist aber ein invasiver Eingriff in Form einer TUR-B oder einer Zystektomie notwendig. Bei der Kultur von Organoiden aus Urinproben wäre dies nicht zwingend notwendig.

Es konnten bereits Tubuloide aus menschlichem Urin gewonnen und kultiviert werden (Schutgens et al., 2019). Auch im Tierexperiment konnten erfolgreich Organoidkulturen aus Urin kultiviert werden (Elbadawy et al., 2019). Die Kultur von Blasenkarzinomorganoiden aus dem Urin von Patienten mit Urothelkarzinomen wurde bisher noch nicht beschrieben (pubmed-Recherche Stand 22.06.2022) und ist in dieser Arbeit erstmalig aus Spülurin durchgeführt worden.

In dieser Studie konnte erfolgreich die Kultur einer Blasenkrebs-Organoid-Zellreihe aus menschlichem Urin durchgeführt werden. Außerdem wurden Protokolle aus Vorarbeiten (Mullenders et al., 2019, Usui et al., 2017, Zhou et al., 2012) integriert und mögliche technisch-methodische und molekulare Einflussfaktoren auf den Kulturerfolg untersucht.

In den frühen Passagen der Kulturen konnte ein gutes Wachstum beobachtet werden, auch wenn eine Langzeitkultur der Organoiden über die 5. Passage hinaus kaum möglich war. In der Effizienz der Gewinnung von Organoiden aus Spülurin zeigte sich die erstmals etablierte Methode zwar den Vorarbeiten unterlegen, verglichen mit den, im Rahmen dieser Arbeit, kultivierten Sphäroiden aus soliden Tumoren zeigten Sie aber keinen Wachstumsnachteil.

4.1 Entwicklung eines geeigneten Protokolls zur Isolation von Zellen aus Spülurin

Bei der Isolation der Zellen aus dem gewonnenen Spülurin wurde auf etablierte und publizierte Protokolle der Zellisolation aus Spülurin bei Hunden mit Blasenkarzinomen (Elbadawy et al., 2019) und Prostatakarzinomen (Usui et al., 2017) zurückgegriffen, sowie auf Protokolle aus der Isolation von Nierenzellen aus menschlichem Urin (Gijzen et al., 2021, Zhou et al., 2012). Ein Protokoll zur Isolation von Urothelkarzinomzellen aus menschlichem Urin konnte bei der Literaturrecherche (pubmed-Recherche Stand: 22.06.2022) nicht ausgemacht werden.

Bei der Entwicklung eines geeigneten Protokolls traten zwei Probleme auf. Bei einer Zentrifugation des Spülurins für 7 Minuten bei 150 g traten Schlieren in der Probe auf, sodass davon ausgegangen werden musste, dass noch Zellen im Überstand verblieben waren. Die Zentrifugationszeit und -beschleunigung wurden schrittweise erhöht. Es wurde ermittelt bei welchen Parametern eine optimale Trennung zwischen Zellpellet und flüssigem Überstand erreicht wird. Im Gegensatz zum Tierexperiment, in dem die Urinproben bei 600g für 3 Minuten zentrifugiert wurden (Usui et al., 2017) und der Gewinnung von renalen, pluripotenten Stammzellen aus Urin wobei die Proben bei 400g für 10 Minuten zentrifugiert wurden (Zhou et al., 2012) wurde in dieser Arbeit eine optimale Zentrifugationszeit für humane Urinproben von 250g für 10 Minuten beobachtet.

Außerdem waren einige Proben sehr stark mit Erythrozyten durchsetzt, was das Auszählen und eine lichtmikroskopische Beurteilung des Wachstums der Zellen kaum möglich machte. Die Anwendung eines Lysepuffers wurde erfolgreich in das Protokoll etabliert und es konnte kein signifikanter Unterschied im Wachstum der Zellen einer etablierten Blasen tumorzellreihe gegenüber der Kultur ohne Lysepuffer festgestellt werden. Die Aussage des Kontrollversuches ist allerdings eingeschränkt, da der Einfluss des Lysepuffers auf die Zellen lediglich über eine Passage hinweg untersucht wurde und auch nur auf die Zunahme der Größe der Organiode mit und ohne vorangehende Lysepufferanwendung. Da es sich aber um einen für Stammzellen entwickelten und industriell hergestellten Lysepuffer

handelt ist eine langfristige Auswirkung des Puffers auf die Zellen über die folgenden Passagen eher unwahrscheinlich.

Da die Methodik zur Isolation der Zellen unspezifisch für Blasen-tumorzellen ist, waren in vielen der Proben auch andere Zelltypen enthalten, wie zum Beispiel Fibrozyten oder andere bindegewebige Zellen. Hier wäre es, im Rahmen von weiterführenden Projekten, sinnvoll einen selektierenden Schritt zu implementieren und die Zellen z.B. mittels fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (FACS) zu trennen. Als Targets für die Sortierung könnten hier beispielsweise GATA-3 für urotheliale Zellen genutzt werden, da eine GATA-3 Expression in einer Vielzahl der Urothelkarzinome und fast allen benignen Urothelproben auftritt (Naik et al., 2021).

4.2 Vergleich von Hydrogel und Basalmembranextrakt als Kulturmatrix von Blasen-tumorzellorganoiden

Zur Kultur von Organoiden aus Blasenkrebszellen wurde als Matrix bisher, der aus Engelbreth-Holm-Swarm Sarkomzellen von Mäusen gewonnene, Basalmembranextrakt genutzt (Abugomaa et al., 2020, Mullenders et al., 2019). Aufgrund der organischen Herkunft und der heterogenen Zusammensetzung des BME, sowie der zwischen den Chargen schwankende Konzentration von Wachstumsfaktoren gibt es käuflich erwerbliche Alternativen, um das BME durch besser definierte und chargenstabilere Substanzen zu ersetzen (Aisenbrey and Murphy, 2020).

Für die Kultur von Organoiden aus Brustkrebszellen und Nierentubuluszellen wurde hierfür ein aus Birkenzellulose gewonnenes Hydrogel (GrowDex®) nach „Application notes“, die auf der Website des Herstellers (UPMBIOMEDICALS) veröffentlicht wurden, erfolgreich etabliert (Niklander and Paasonen, 2019, Saarela et al., 2021).

In dieser Arbeit wurde das genannte Hydrogel an einer kommerziell erwerblichen Blasenkrebszellreihe (RT112), an einer aus soliden Tumorgewebe gewonnenen Organoidzellreihe (BCO#140) und einer aus Spülurin gewonnenen Organoidzellreihe (UCO#33) im Vergleich zu der jeweiligen Kultur in BME getestet. Verglichen wurden die Größenzunahme der Organoide und die

Expression beispielhafter Proteine zur Charakterisierung der Zellen in beiden Matrices. In einigen der immunfluoreszenzgefärbten Chamber Slides gab es eine dezent positive Reaktion der Negativkontrolle des Sekundärantikörpers, weshalb die Fluoreszenzsignale in Relation zu dieser interpretiert werden mussten und die Ergebnisse dadurch nur eine eingeschränkte Aussage zulassen. Diese Anfärbungen können mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine geringe Autofluoreszenz des in den Chamber Slides nicht vollständig entfernten BME zurückgeführt werden oder auf eine Verunreinigung der Proben. Wenn es möglich war, wurden die Färbungen wiederholt, die Negativkontrollen zeigten aber weiterhin in einzelnen Fällen positive Fluoreszenzsignale, teilweise zellgebunden, teilweise ohne Bezug zu den enthaltenen Zellen, sodass eine klare Ursache der fehlerhaften Kontrollfärbungen nicht identifiziert werden konnte und der Fehler auch nicht ausgeschaltet werden konnte.

In zwei der drei Zellreihen zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Wachstumszunahme der Organoide zugunsten des BME, was vermuten lässt, dass die Organoide in BME eine bessere Versorgung mit Nährstoffen, Sauerstoff, Wachstumsfaktoren oder Zell-Matrix-Kontakten hatten und somit das Wachstum der Organoide dort eher gefördert wird. Es kann daraus folgend vermutet werden, dass auch Proben in der Primärkultur bessere Voraussetzungen für ein dreidimensionales Wachstum in BME gegenüber GrowDex® vorfinden.

Im Vergleich der beispielhaften Charakterisierungen durch molekulare Marker fielen ebenfalls in allen Zellreihen Unterschiede in der Expression einiger Proteine auf, was vermuten lässt, dass die Proteinausstattung der Zellen sich je nach genutzter Kulturmatrix ändert. Hier wäre es in folgenden Arbeiten interessant zu untersuchen, welche der in den beiden Matrices kultivierten Organoide den Ursprungstumoren in der Proteinexpression am ähnlichsten sind. Zum jetzigen Zeitpunkt kann vermutet werden, dass ein Wechsel von BME zu GrowDex® die Proteinexpression von Urothelkarzinomen ändert und damit die Vergleichbarkeit mit vorherigen Ergebnissen und Arbeiten in Frage steht.

Sowohl der Wachstumsvorteil in BME als auch die Änderung der Charakterisierung deuten darauf hin, dass die Kultur von Blasenzellorganoiden

in GrowDex® keinen Vorteil gegenüber der etablierten Kulturmethode in BME bietet.

4.3 Effizienz der Organoidkultur aus Spülurin und Vergleich mit der Organoidkultur aus soliden Tumoren

Bei der Kultivierung von Organoiden aus soliden Tumoren variieren die Effizienzen der erfolgreichen Gewinnung von Organoidkulturen aus verschiedenen Geweben stark. Es werden beispielsweise Effizienzen von 96-100 % für Endometriumzellen (Turco et al., 2017), von >80 % für Mammakarzinomzellen (Sachs et al., 2018), von 28,4 % für Gallengangszellen (Huch et al., 2015), von 6-17 % für Kolonstammzellen (Jung et al., 2011) und von 0,3-0,49 % für Prostatazellen im Tierexperiment (Chua et al., 2014) angegeben. Zwischen den genannten Studien variieren die Definitionen des Organoid-Begriffs allerdings stark und die Zellen wurden auf unterschiedliche Weise vorsortiert, sodass ein Vergleich nur eingeschränkt möglich ist. In der Kultur von kontinuierlich wachsenden Organoidzellreihen aus solidem, menschlichen Blasentumorgewebe wurde eine Effizienz von 60-70% beschrieben (Mullenders et al., 2019). Bei der Kultur von Tubuloiden aus Mäuseurin wurde sogar eine Effizienz von 100 % beschrieben (Schutgens et al., 2019). Für die Kultur von Urinorganoiden aus dem Urin von an Blasenkrebs erkrankten Hunden wurde eine Effizienz von 70 % bei der Generierung von kontinuierlichen Organoid-Zelllinien angegeben (Elbadawy et al., 2019). Allerdings ist in dieser Arbeit nicht beschrieben, ab welcher Passage oder ab welchem Zeitraum der Kultur hier eine Organoid-Reihe als erfolgreich angesehen wurde und welche Passagen die beschriebenen Kulturen erreichten. Insgesamt scheinen aufgrund der, in den oben genannten Veröffentlichungen, beschriebenen Effizienzen die Gewinnung von Organoiden aus Urothelkarzinomen eher eine höhere als eine niedrigere Effizienz im Vergleich mit anderen Geweben aufzuweisen.

In dieser Studie konnten bei der Isolation und der Überführung der aus Spülurin isolierten Zellen in die Primärkultur in 80 % der Fälle tumorsuspekte Zellen beobachtet werden. In 77 % der Fälle zeigten die Zellen ein initial sphäroidales Wachstum. Mit der weiteren Passagierung der Zellkulturen nahm die Ausbildung

von sphäroidalen Strukturen in den dreidimensionalen Kulturen stark ab. Die Effizienz für die Langzeitkultur von Organoidzellreihen betrug 3 %. Diese Effizienz der Langzeitkultur ist den Vorarbeiten deutlich unterlegen. Aufgrund der langen Kulturdauer bis zur Etablierung der Organoide und der in dieser Arbeit beobachteten Abnahme einiger Proteinexpressionen, sind für den klinischen Nutzen dieser Methode die Primärkultur und die erste Passage jedoch deutlich interessanter, in welchen deutlich höhere Effizienzen und Wachstumsraten erreicht werden konnten

Bei den Kulturen, von denen Fluoreszenzfärbungen durchgeführt wurden, konnte in 8 von 9 Färbungen eine Proteinexpression beobachtet werden, die auf eine epitheliale und wahrscheinlich auch maligne urotheliale Differenzierung der Zellen hinweist. Es kann also angenommen werden, dass wenn ein initial gutes Sphäroidwachstum vorhanden ist, es sich auch um Sphäroide aus Urothelkarzinomzellen handelte. Das in dieser Arbeit entwickelte Protokoll kann also grundsätzlich als geeignet angesehen werden, um Urothelkarzinomzellen aus Urin zu isolieren.

Vergleicht man die aus Spülurin gewonnenen Zellkulturen mit den aus den zugehörigen kultivierten soliden Tumorproben zeigten die Kulturen aus Spülurinzellen ein etwas niedrigeres initiales Sphäroidwachstum. In den Primärkulturen der soliden Tumorproben konnten in 87 % der Fälle tumorsuspekte Zellen beobachtet werden und ein sphäroidales Wachstum konnte in 83 % der Fälle in der Primärkultur beobachtet werden. Im Verlauf der weiteren Passagen nahm die Zahl der Kulturen mit sphäroidalem Wachstum aber deutlich stärker ab als in den aus Urin gewonnenen Zellen und es konnte keine Organoidkultur mit Langzeitwachstum gewonnen werden.

Im Vergleich der Wachstumssteigungen der Sphäroidkulturen aus Spülurin und solidem Tumor ergab sich keine Unterlegenheit des Spülurins. Auch in der Errechnung der Zellkulturgrößenzunahme konnte kein Nachteil der Spülurinkulturen beobachtet werden. Beide Methoden sind aber aufgrund der kleinen Stichprobenanzahlen und der Messungenauigkeiten nur eingeschränkt aussagekräftig. In Zusammenschau der berichteten Ergebnisse kann davon

ausgegangen werden, dass die Kultur von Sphäroiden und Organoiden aus Spülurinproben der Kultur aus soliden Tumorproben nicht unterlegen ist.

Gründe für die geringe Effizienz in der Langzeitkultur von Organoiden können in der Entnahme und der Aufarbeitung der Proben, sowie in der Kulturmethode liegen. Kontaminationen als Grund für das ausbleibende Langzeitwachstum können ausgeschlossen werden, da nur einer Probe in der dritten Passage eine Kontamination durch Bakterien zeigte.

Die Entnahme der Proben erfolgte bei den Spülurinproben vor einem invasiven Eingriff (TUR-B oder Zystektomie). Der Ursprungstumor wurde mit einer sterilen Kochsalzlösung umspült, um Zellen aus dem Verbund zu lösen. Zu untersuchen wäre in Folgearbeiten, ob die Konzentration von vitalen Tumorzellen im Mittelstrahlurin höher ist als im Spülurin, da die Kontaktzeit der Flüssigkeit mit dem Tumor hier länger ist und dadurch eine höhere Zellzahl in den Proben enthalten sein könnte. Die Vitalität der Zellen könnte allerdings durch den längeren Kontakt mit dem Urin eingeschränkt werden.

Der wahrscheinlichste Grund für das fehlende Langzeitwachstum ist die Zusammensetzung des Mediums, da für die erfolgreiche Organoidkultur von Blasenkrebszellen eine fein eingestellte Zusammensetzung des Mediums aus Nährstoffen, Wachstumsfaktoren, Spurenelementen und anderen Hilfsstoffen notwendig ist. Hier sollte in folgenden Arbeiten die Zusammensetzung und Ergänzung des Blasentumormediums fokussiert werden.

Denkbar wäre auch, die Kultur der Organoide durch eine zelluläre Umgebung zu ergänzen (z.B. Fibrozyten) um diese als „feeder layer“ zu verwenden. In anderen Studien wurden bereits solche, als Assembloide bezeichnete Kulturen, kultiviert und die Blasenkarzinomzellen aus Langzeit-Organoidkulturen mit Fibrozyten, Endothelzellen, Immunzellen und Muskelzellen zusammen kultiviert (Kim et al., 2020). Es wäre interessant in Folgearbeiten zu untersuchen, ob das initiale Wachstum von Organoiden aus Blasenkarzinomzellen von dieser Methode profitieren kann.

Die Methodik der Zellkultur im Allgemeinen, so wie die des Passagierens ist denen der oben genannten Vorarbeiten sehr ähnlich und etabliert, so dass hier am ehesten keine Optimierung mehr sinnvoll erscheint.

4.4 Einflussfaktoren auf den Kulturerfolg der einzelnen Proben

Um mögliche Faktoren zu identifizieren, die das erfolgreiche Wachstum der Kultur UCO#33 gegenüber den unerfolgreichen anderen Sphäroidkulturen erklären könnten wurden zum einen die Charakterisierungen der unterschiedlichen Organoid- und Sphäroidkulturen aus Urin mittels Fluoreszenzfärbung verglichen. Auch wurden die Proteinexpressionsmuster der Ursprungstumore durch Immunhistochemische Färbungen miteinander verglichen, um mögliche Prädiktoren zu finden, die das Wachstum der späteren Organoidkulturen voraussagen könnten.

Die Aussagekraft dieser Vergleiche ist zum einen durch die teils positiven Negativkontrollen in der Fluoreszenzfärbung und durch die geringe Stichprobe der gefärbten Kulturen in beiden Färbeverfahren eingeschränkt.

In den Fluoreszenzfärbungen fiel auf, dass UCO#33 die einzige Kultur war, die eine Koexpression der beiden Proteine CD24 und CD44 zeigte. Auch eine deutliche Anfärbung der Proteine CD276 und Ki67 war zu beobachten, was aber auch in anderen Kulturen beobachtet wurde.

In klinischen Studien wurde bereits die Expression von CD24 in oberflächlichen Blasentumoren (Ta-T1) mit einem kürzeren rezidivfreien Intervall und einer höheren Rückfallrate in Verbindung gebracht (Liu et al., 2013). Ein Zusammenhang der Expression von CD44 in Blasentumoren und einem höheren Grading und TNM Status wurde ebenfalls vermutet (Hu et al., 2020). Ein besseres Organoidwachstum aufgrund eines aggressiven und invasiven Wachstumsverhaltens der Zellen aus Ursprungstumoren, die diese Marker exprimieren, scheint also durchaus plausibel. Auch gibt es in der Arbeit mit Organoiden aus Pankreaskarzinomzellen den Hinweis auf eine Anreicherung von CD44 und CD24 positiven Zellen in den Organoiden im Vergleich zu ihrer Dichte im Ursprungsgewebe (Choi et al., 2021).

In der Arbeit mit Blasenzellorganoiden wurde bereits vermutet, dass CD24 als prädiktiver Marker für die Proliferationspotenz von Organoidzellreihen in der Langzeitkultur dienen könnte. CD44 konnte hier allerdings nicht mit einem besseren Erfolg von Langzeitkulturen in Zusammenhang gebracht werden (Geng et al., 2022a).

In dieser Arbeit konnte in der erfolgreichen Organoidkultur CD24 in der Immunfluoreszenz und der Immunhistochemie nachgewiesen werden. Eine immunhistochemische Färbung von CD24 in den Ursprungstumoren war methodisch im Rahmen dieses Projektes nicht möglich, sollte aber in folgenden Arbeiten untersucht werden. CD44 war in den Ursprungstumoren der Sphäroidkulturen ohne Langzeitwachstum mit einem höheren Histoscore angefärbt, als in dem Ursprungstumor der erfolgreichen Organoidkultur, was in Verbindung mit den Vorarbeiten (Choi et al., 2021, Geng et al., 2022b) für eine Annahme von CD24 und gegen eine Annahme von CD44 als prädiktiven Marker für eine erfolgreiche Langzeitkultur von Blasenkarzinomorganoiden spricht.

Es konnte anhand der Histoscores der einzelnen Färbungen gezeigt werden, dass in der erfolgreichen Organoidzellreihe im Vergleich zum Ursprungstumor eine erniedrigte Expression von p63, TP53, GATA-3 und CK5/6 vorhanden war.

Die Proteinexpression der Zellen scheint sich in-vitro also teilweise zu verändern. So konnte beobachtet werden, dass sich sogar der Subtyp der Tumoren in der Organoidkultur ändern kann, dieser aber nach Einsetzen der Organoiden als Xenograft in Mäuse wieder in seine ursprüngliche Klassifikation zurückkehrt (Lee et al., 2018). Daher scheint die auch in diesem Projekt beobachtete Änderung der Proteinexpression in der Organoidkultur nicht durch Änderungen in der Genetik oder Selektionsprozesse in-vitro erklärbar zu sein, sondern als ein in-vitro Artefakt der Zellkultur aufzutreten.

Die Expression von CD44 war in den Organoiden stärker ausgeprägt als in den Ursprungstumoren, was für eine Anreicherung oder Selektion der CD44-positiven Zellen in den Organoiden spricht, wie in oberen Abschnitten bereits vermutet.

Vergleicht man nun die Ursprungstumoren untereinander, um mögliche molekulare Vorteile der erfolgreichen Organoidkultur gegenüber den nicht erfolgreichen im ursprünglichen Tumor zu finden, so fällt auf, dass der Ursprungstumor von UCO#33 eine vergleichsweise niedrige Expression der Proteine p53 und CD44 zeigte und als einzige Kultur keine Expression von CK20 zu beobachten war. Ein geringer Anteil von p53-positiven Zellen spricht gegen eine Überexpression und spricht hier, wie in der pathologischen Diagnose für ein papilläres Urothelkarzinom. Dazu passen auch die beschriebene HE-Färbung und die Anfärbung von FGFR-3 in den Organoidkulturen (Minoli et al., 2020).

Eine CK20-Überexpression spricht in nicht-invasiven Blasentumoren für ein höheres Rezidivrisiko und einer eher schlechteren Prognose (Ranzi et al., 2017). Daher ist die fehlende Expression von CK20 in dem Ursprungstumor vermutlich nicht mit einem besseren Organoidwachstum in Verbindung zu bringen und eher als zufälliger Befund zu bewerten.

In dieser Arbeit wurden das Geschlecht, der Raucherstatus, die Alkoholanamnese, die Auswertung der Urinzytologie (falls durchgeführt), das Grading, der TNM-Status und die Lokalisation der Tumoren bei den Patienten von denen die immunfluoreszenzgefärbten Organoidkulturen stammten analysiert um einen möglichen Faktor für ein erfolgreicheres Wachstum von UCO#33 gegenüber den anderen Organoiden aus Urinproben auszumachen. Es konnte kein Faktor gefunden werden, der ausschließlich bei diesem Patienten auftrat oder nicht auftrat. Da aber UCO#33 eine positive Urinzytologie hatte und dies nur bei einem weiteren Patienten beschrieben wurde, kann angenommen werden, dass eine positive Urinzytologie auf tumorsuspekte Zellen einen Vorteil für das Wachstum von Organoiden aus den Urinproben schafft, da das Vorhandensein von einer größeren Anzahl Tumorzellen im Urin wahrscheinlicher ist.

Eine weitere interessante Fragestellung in diesem Kontext wäre, ob der Subtyp der Karzinome als basal oder luminal einen Einfluss auf die Erfolgsraten der Organoid-Kulturen hat. Aktuell liegen zu dieser Fragestellung keine belastbaren Daten vor und in dieser Arbeit konnte aufgrund der geringen Probenanzahl hierzu

keine Aussagen getroffen werden. Für folgende Studien wäre dies aber ein interessanter Ansatzpunkt.

4.5 Schlussfolgerung der Arbeit

In dieser Arbeit konnte erfolgreich ein Protokoll zur Etablierung von Organoiden aus dem Urin von Patienten mit Blasen Tumoren etabliert werden. Das Protokoll wurde im Verlauf der Arbeit optimiert und ergänzt.

Eine alternative, tierproduktfreie Matrix wurde getestet und konnte keinen Vorteil gegenüber der etablierten Kulturmethode mit BME zeigen.

Die Effizienz der Organoidkultur in den frühen Passagen ist vielversprechend. Die Wachstumsraten in der Langzeitkultur sind denen vergleichbarer Vorarbeiten deutlich unterlegen, zeigten allerdings keinen Nachteil gegenüber der Kultur von Organoiden aus soliden Tumoren innerhalb dieser Arbeit.

Als möglicher prädiktiver Marker für ein erfolgreiches Organoidwachstum konnte, wie schon in Vorarbeiten vermutet, CD24 ausgemacht werden. Außerdem konnte, passend zu Beobachtungen in anderen Arbeiten, beobachtet werden, dass einige Proteine in der Organoidkultur weniger stark exprimiert wurden als im Ursprungstumor.

In den patientenbezogenen Faktoren, die für ein besseres Organoidwachstum sprechen könnten, konnte nur ein Vorteil von einer positiven Urinzytologie für tumorsuspekte Zellen vermutet werden.

4.6 Ausblick

Die Zellkultur von Tumorzellen in 3D ist ein vielversprechendes Model um diverse Krankheiten und Organe in der Kulturschale nachzubilden und verspricht vielfältige Einsatzmöglichkeiten in der regenerativen Medizin, der Arzneimittelforsch und der personalisierten Medizin.(Corrò et al., 2020)

Organoide konnten bereits aus diversen Geweben gewonnen werden, unter anderem aus Leber, Hirn und Retina (Gabriel et al., 2021, Li et al., 2021, Mun et al., 2019).

Auch die Kultur von Organoiden aus Blasenzellkarzinomen ist bereits etabliert (Mullenders et al., 2019) und unterliegt ständiger Weiterentwicklung und Aufschlüsselung von molekularen und genetischen Faktoren.

So wurden bereits erste mögliche prädiktive Marker für ein besseres Organoidwachstum aus Blasentumorzellen ausgemacht (Geng et al., 2022a) und die Änderung von Proteinexpression beim Übergang von Tumoren in Organoidkultur und von dort als Xenograft ins Tiermodell untersucht. (Lee et al., 2018)

Allerdings ist für die Kultur von Organoiden aus menschlichen Blasentumorzellen bisher noch eine invasive Prozedur zur Gewinnung der Proben notwendig, was insbesondere der personalisierten Medizin, insbesondere Medikamententests an Organoiden für neoadjuvante Therapien im Wege steht.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kultur von Blasentumororganoiden aus menschlichem Spülurin möglich ist. Allerdings ist die Effizienz in der Langzeitkultur eingeschränkt.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergeben sich weitere Fragen, deren Beantwortung in der weiteren Forschung in diesem Gebiet interessant wäre.

Es wäre von Bedeutung, Faktoren zu identifizieren, mit denen eine bessere Effizienz in der Langzeitkultur der Organoiden erzielt werden kann. Hier sollten insbesondere die Möglichkeit der Kultur als Assembloide im Verbund mit anderen Zellen untersucht werden, als auch Möglichkeiten das Kulturmedium weiter zu optimieren.

Auch konnte CD24 als Marker für ein eventuell besseres Wachstum von Organoiden aus Blasenzellkarzinomen ausgemacht werden. Hier wäre eine Untersuchung der Korrelation mit der Expression von CD24 in den Ursprungstumoren interessant, um das Protein als Ziel für mögliche Vorselektionen der Zellen zu testen.

Auf dem Weg zur klinischen Anwendung der Organoiden aus Urin sollte ihr Ansprechen auf Medikamente mit dem der Patienten korreliert werden und die Gewinnung der Organoiden auch aus Mittelstrahlurin etabliert werden. Damit wäre

es denkbar, die Urinproben in der ambulanten urologischen Praxis zu entnehmen, sie ins Speziallabor zu übersenden und das Ansprechen auf Medikamente zu testen, bevor der Patienten das Krankenhaus betritt.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Protokoll entwickelt, mit dem aus dem Spülurin von Menschen mit Blasen Tumoren Organoide in Langzeitkultur kultiviert werden konnten. Insgesamt wurden 58 Gewebeprobe von PatientInnen mit Blasen Tumoren aufgearbeitet, 35 Proben aus Spülurin, 23 Proben aus korrespondierenden soliden Tumoren. Außerdem wurden 2 unterschiedliche Trägermaterialien getestet, wobei sich GrowDex® gegenüber dem etablierten Basalmembranextrakt (BME) als unterlegen erwies.

Immunfluoreszenzfärbungen wurden durchgeführt, die in fast allen Proben für eine Differenzierung der Sphäroide als maligne urotheliale Zellen sprachen. Im Vergleich zu den soliden Tumorproben zeigten die Kulturen aus Spülurin ein besseres Sphäroidwachstum in späteren Passagen, wobei nur eine Organoid-Langzeitkultur gewonnen werden konnte (UCO#33). Außerdem wurden die Sphäroide auch bezüglich des Sphäroidwachstums und der geschätzten Zunahme der Zellmasse in den Zellkulturen verglichen, wobei kein Nachteil der Kultur von Organoiden aus Spülurin festgestellt werden konnte.

Damit ist die Effizienz der Gewinnung von Blasen Tumor-Organoiden aus Spülurinproben in dieser Arbeit zwar der Effizienz anderer, in Vorarbeiten beschriebener, Methoden unterlegen, zeigte aber innerhalb der hier beschriebenen Versuche keinen Nachteil gegenüber der Kultur aus soliden Tumorproben.

UCO#33 zeigte als einzige Kultur aus Spülurin eine Ko-Expression von CD24 und CD44, was die mögliche Rolle von CD24 als Prädiktor für ein besseres Organoidwachstum weiter stützt.

Im Vergleich der Organoidkulturen mit den Ursprungstumoren konnte eine veränderte Ausprägung einzelner Proteine beobachtet werden

In dieser Studie konnten keine Prädiktoren für PatientInnen definiert werden.

Dennoch sind Organoiden aus Spülurin eine interessante und neue Möglichkeit für die Forschung und personalisierte Medizin. Die Kulturmethodik sollte dafür aber weiter optimiert und verbessert werden.

6 Literaturverzeichnis

- ABDULLAH, K. G., BIRD, C. E., BUEHLER, J. D., GATTIE, L. C., SAVANI, M. R., STERNISHA, A. C., XIAO, Y., LEVITT, M. M., HICKS, W. H., LI, W., RAMIREZ, D. M. O., PATEL, T., GARZON-MUVDI, T., BARNETT, S., ZHANG, G., ASHLEY, D. M., HATANPAA, K. J., RICHARDSON, T. E. & MCBRAYER, S. K. 2022. Establishment of patient-derived organoid models of lower-grade glioma. *Neuro Oncol*, 24, 612-623.
- ABUGOMAA, A., ELBADAWY, M., YAMANAKA, M., GOTO, Y., HAYASHI, K., MORI, T., UCHIDE, T., AZAKAMI, D., FUKUSHIMA, R., YOSHIDA, T., SHIBUTANI, M., YAMASHITA, R., KOBAYASHI, M., YAMAWAKI, H., SHINOHARA, Y., KANEDA, M., USUI, T. & SASAKI, K. 2020. Establishment of 2.5D organoid culture model using 3D bladder cancer organoid culture. *Sci Rep*, 10, 9393.
- AICHER, W. K., KORN, M., REITNAUER, L., MAURER, F. B., HENNENLOTTER, J., BLACK, P. C., TODENHOFER, T., BEDKE, J. & STENZL, A. 2021. Expression patterns of the immune checkpoint ligand CD276 in urothelial carcinoma. *BMC Urol*, 21, 60.
- AISENBREY, E. A. & MURPHY, W. L. 2020. Synthetic alternatives to Matrigel. *Nat Rev Mater*, 5, 539-551.
- AKHTAR, M., RASHID, S., GASHIR, M. B., TAHA, N. M. & AL BOZOM, I. 2020. CK20 and CK5/6 Immunohistochemical Staining of Urothelial Neoplasms: A Perspective. *Adv Urol*, 2020, 4920236.
- AUMÜLLER, G., AUST, G., ENGELE, J., KIRSCH, J., MAIO, G., MAYERHOFER, A. M., S., REIßIG, D., SALVETTER, J., SCHMIDT, W., SCHMITZ, F., SCHULTE, E., SPANEL-BOROWSKI, K., WENNEMUTH, G. W., W., WURZINGER, L. J. & ZILCH, H. G. 2014:780. *Duale Reihe Anatomie*, Georg Thieme Verlag KG.
- AWMF, S.-L. H. 2020. S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 2.0. AWMF-Registrierungsnummer 032/038OL. URL: <http://leitlinienprogrammmonkologie.de/Harnblasenkarzinom>, 92.
- BIRDER, L. & ANDERSSON, K. E. 2013. Urothelial signaling. *Physiol Rev*, 93, 653-80.
- CHOI, J. I., JANG, S. I., HONG, J., KIM, C. H., KWON, S. S., PARK, J. S. & LIM, J. B. 2021. Cancer-initiating cells in human pancreatic cancer organoids are maintained by interactions with endothelial cells. *Cancer Lett*, 498, 42-53.
- CHUA, C. W., SHIBATA, M., LEI, M., TOIVANEN, R., BARLOW, L. J., BERGREN, S. K., BADANI, K. K., MCKIERNAN, J. M., BENSON, M. C., HIBSHOOSH, H. & SHEN, M. M. 2014. Single luminal epithelial progenitors can generate prostate organoids in culture. *Nat Cell Biol*, 16, 951-61, 1-4.
- CORRÒ, C., NOVELLASDEMUNT, L. & LI, V. S. W. 2020. A brief history of organoids. *Am J Physiol Cell Physiol*, 319, C151-c165.
- ELBADAWY, M., USUI, T., MORI, T., TSUNEDOMI, R., HAZAMA, S., NABETA, R., UCHIDE, T., FUKUSHIMA, R., YOSHIDA, T., SHIBUTANI, M., TANAKA, T., MASUDA, S., OKADA, R., ICHIKAWA, R., OMATSU, T.,

- MIZUTANI, T., KATAYAMA, Y., NOGUCHI, S., IWAI, S., NAKAGAWA, T., SHINOHARA, Y., KANEDA, M., YAMAWAKI, H. & SASAKI, K. 2019. Establishment of a novel experimental model for muscle-invasive bladder cancer using a dog bladder cancer organoid culture. *Cancer Sci*, 110, 2806-2821.
- ELGUNDI, Z., PAPANICOLAOU, M., MAJOR, G., COX, T. R., MELROSE, J., WHITELOCK, J. M. & FARRUGIA, B. L. 2019. Cancer Metastasis: The Role of the Extracellular Matrix and the Heparan Sulfate Proteoglycan Perlecan. *Front Oncol*, 9, 1482.
- ERDMANN, F., SPIX, C., KATALINIC, A., CHRIST, M., FOLKERTS, J., HANSMANN, J., KRANZHÖFER, K., KUNZ, B., MANEGOLD, K. & PENZKOFER, A. 2021. Krebs in Deutschland für 2017/2018.
- FENNEMA, E., RIVRON, N., ROUWKEMA, J., VAN BLITTERSWIJK, C. & DE BOER, J. 2013. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends Biotechnol*, 31, 108-15.
- GABRIEL, E., ALBANNA, W., PASQUINI, G., RAMANI, A., JOSIPOVIC, N., MARIAPPAN, A., SCHINZEL, F., KARCH, C. M., BAO, G., GOTTARDO, M., SUREN, A. A., HESCHELER, J., NAGEL-WOLFRUM, K., PERSICO, V., RIZZOLI, S. O., ALTMÜLLER, J., RIPARBELLI, M. G., CALLAINI, G., GOUREAU, O., PAPANTONIS, A., BUSSKAMP, V., SCHNEIDER, T. & GOPALAKRISHNAN, J. 2021. Human brain organoids assemble functionally integrated bilateral optic vesicles. *Cell Stem Cell*, 28, 1740-1757.e8.
- GENG, R., HARLAND, N., MONTES-MOJARRO, I. A., FEND, F., AICHER, W. K., STENZL, A. & AMEND, B. 2022a. CD24: A Marker for an Extended Expansion Potential of Urothelial Cancer Cell Organoids In Vitro? *Int J Mol Sci*, 23.
- GENG, R., HARLAND, N., MONTES-MOJARRO, I. A., FEND, F., AICHER, W. K., STENZL, A. & AMEND, B. 2022b. CD24: A Marker for an Extended Expansion Potential of Urothelial Cancer Cell Organoids In Vitro? *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 5453.
- GIJZEN, L., YOUSEF YENGEJ, F. A., SCHUTGENS, F., VORMANN, M. K., AMMERLAAN, C. M. E., NICOLAS, A., KUREK, D., VULTO, P., ROOKMAAKER, M. B., LANZ, H. L., VERHAAR, M. C. & CLEVERS, H. 2021. Culture and analysis of kidney tubuloids and perfused tubuloid cells-on-a-chip. *Nat Protoc*, 16, 2023-2050.
- GUO, C. C., BONDARUK, J., YAO, H., WANG, Z., ZHANG, L., LEE, S., LEE, J. G., COGDELL, D., ZHANG, M., YANG, G., DADHANIA, V., CHOI, W., WEI, P., GAO, J., THEODORESCU, D., LOGOTHETIS, C., DINNEY, C., KIMMEL, M., WEINSTEIN, J. N., MCCONKEY, D. J. & CZERNIAK, B. 2020. Assessment of Luminal and Basal Phenotypes in Bladder Cancer. *Sci Rep*, 10, 9743.
- HIGGINS, J. P., KAYGUSUZ, G., WANG, L., MONTGOMERY, K., MASON, V., ZHU, S. X., MARINELLI, R. J., PRESTI, J. C., JR., VAN DE RIJN, M. & BROOKS, J. D. 2007. Placental S100 (S100P) and GATA3: markers for transitional epithelium and urothelial carcinoma discovered by complementary DNA microarray. *Am J Surg Pathol*, 31, 673-80.

- HO, P. L., KURTOVA, A. & CHAN, K. S. 2012. Normal and neoplastic urothelial stem cells: getting to the root of the problem. *Nat Rev Urol*, 9, 583-94.
- HU, Y., ZHANG, Y., GAO, J., LIAN, X. & WANG, Y. 2020. The clinicopathological and prognostic value of CD44 expression in bladder cancer: a study based on meta-analysis and TCGA data. *Bioengineered*, 11, 572-581.
- HUCH, M., GEHART, H., VAN BOXTEL, R., HAMER, K., BLOKZIJL, F., VERSTEGEN, M. M., ELLIS, E., VAN WENUM, M., FUCHS, S. A., DE LIGT, J., VAN DE WETERING, M., SASAKI, N., BOERS, S. J., KEMPERMAN, H., DE JONGE, J., IJZERMANS, J. N., NIEUWENHUIS, E. E., HOEKSTRA, R., STROM, S., VRIES, R. R., VAN DER LAAN, L. J., CUPPEN, E. & CLEVERS, H. 2015. Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver. *Cell*, 160, 299-312.
- HUGHES, C. S., POSTOVIT, L. M. & LAJOIE, G. A. 2010. Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics*, 10, 1886-90.
- IYYANKI, T., ZHANG, B., WANG, Q., HOU, Y., JIN, Q., XU, J., YANG, H., LIU, T., WANG, X., SONG, F., LUAN, Y., YAMASHITA, H., CHIEN, R., LYU, H., ZHANG, L., WANG, L., WARRICK, J., RAMAN, J. D., MEEKS, J. J., DEGRAFF, D. J. & YUE, F. 2021. Subtype-associated epigenomic landscape and 3D genome structure in bladder cancer. *Genome Biol*, 22, 105.
- JUNG, P., SATO, T., MERLOS-SUÁREZ, A., BARRIGA, F. M., IGLESIAS, M., ROSSELL, D., AUER, H., GALLARDO, M., BLASCO, M. A., SANCHO, E., CLEVERS, H. & BATLLE, E. 2011. Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells. *Nat Med*, 17, 1225-7.
- KIM, E., CHOI, S., KANG, B., KONG, J., KIM, Y., YOON, W. H., LEE, H.-R., KIM, S., KIM, H.-M., LEE, H., YANG, C., LEE, Y. J., KANG, M., ROH, T.-Y., JUNG, S., KIM, S., KU, J. H. & SHIN, K. 2020. Creation of bladder assembloids mimicking tissue regeneration and cancer. *Nature*, 588, 664-669.
- KOPPER, O., DE WITTE, C. J., LÖHMUSSAAR, K., VALLE-INCLAN, J. E., HAMI, N., KESTER, L., BALGOBIND, A. V., KORVING, J., PROOST, N., BEGTHEL, H., VAN WIJK, L. M., REVILLA, S. A., THEEUWSEN, R., VAN DE VEN, M., VAN ROOSMALEN, M. J., PONSIOEN, B., HO, V. W. H., NEEL, B. G., BOSSE, T., GAARENSTROOM, K. N., VRIELING, H., VREESWIJK, M. P. G., VAN DIEST, P. J., WITTEVEEN, P. O., JONGES, T., BOS, J. L., VAN OUDENAARDEN, A., ZWEEMER, R. P., SNIPPERT, H. J. G., KLOOSTERMAN, W. P. & CLEVERS, H. 2019. An organoid platform for ovarian cancer captures intra- and interpatient heterogeneity. *Nat Med*, 25, 838-849.
- KOZLOWSKI, M. T., CROOK, C. J. & KU, H. T. 2021. Towards organoid culture without Matrigel. *Commun Biol*, 4, 1387.
- LEE, S. H., HU, W., MATULAY, J. T., SILVA, M. V., OWCZAREK, T. B., KIM, K., CHUA, C. W., BARLOW, L. J., KANDOTH, C., WILLIAMS, A. B., BERGREN, S. K., PIETZAK, E. J., ANDERSON, C. B., BENSON, M. C., COLEMAN, J. A., TAYLOR, B. S., ABATE-SHEN, C., MCKIERNAN, J. M., AL-AHMADIE, H., SOLIT, D. B. & SHEN, M. M. 2018. Tumor

- Evolution and Drug Response in Patient-Derived Organoid Models of Bladder Cancer. *Cell*, 173, 515-528.e17.
- LEWIS, J. D., FERRARA, A., PENG, T., HEDDERSON, M., BILKER, W. B., QUESENBERRY, C. P., JR., VAUGHN, D. J., NESSEL, L., SELBY, J. & STROM, B. L. 2011. Risk of bladder cancer among diabetic patients treated with pioglitazone: interim report of a longitudinal cohort study. *Diabetes Care*, 34, 916-22.
- LI, X., ZHANG, L., TANG, F. & WEI, X. 2021. Retinal Organoids: Cultivation, Differentiation, and Transplantation. *Front Cell Neurosci*, 15, 638439.
- LIU, C., ZHENG, S., SHEN, H., XU, K., CHEN, J., LI, H., XU, Y., XU, A., CHEN, B., KAKU, H., NASU, Y., KUMON, H., HUANG, P. & WATANABE, M. 2013. Clinical significance of CD24 as a predictor of bladder cancer recurrence. *Oncol Lett*, 6, 96-100.
- MARSEE, A., ROOS, F. J. M., VERSTEGEN, M. M. A., GEHART, H., DE KONING, E., LEMAIGRE, F., FORBES, S. J., PENG, W. C., HUCH, M., TAKEBE, T., VALLIER, L., CLEVERS, H., VAN DER LAAN, L. J. W. & SPEE, B. 2021. Building consensus on definition and nomenclature of hepatic, pancreatic, and biliary organoids. *Cell Stem Cell*, 28, 816-832.
- MCCONKEY, D. J. & CHOI, W. 2018. Molecular Subtypes of Bladder Cancer. *Current Oncology Reports*, 20, 77.
- MEDLE, B., SJÖDAHL, G., ERIKSSON, P., LIEBERG, F., HÖGLUND, M. & BERNARDO, C. 2022. Patient-Derived Bladder Cancer Organoid Models in Tumor Biology and Drug Testing: A Systematic Review. *Cancers (Basel)*, 14.
- MEIJER, R. P. 2021. Urothelial cancer organoids: a tool for bladder cancer research. *Pathologe*, 42, 165-169.
- MIKHALEVA, L. M., PECHNIKOVA, V. V., PSHIKHACHEV, A. M., ROGOV, K. A., GUSNIEV, M. A., PATSAP, O. I., VASYUKOVA, O. A., AKOPYAN, E. P., BEYLERLI, O., SOMASUNDARAM, S. G., KIRKLAND, C. E. & ALIEV, G. 2021. Bladder Cancer: Update on Risk Factors, Molecular and Ultrastructural Patterns. *Curr Med Chem*, 28, 8517-8533.
- MINOLI, M., KIENER, M., THALMANN, G. N., KRUIHOF-DE JULIO, M. & SEILER, R. 2020. Evolution of Urothelial Bladder Cancer in the Context of Molecular Classifications. *Int J Mol Sci*, 21.
- MIYOSHI, H. & STAPPENBECK, T. S. 2013. In vitro expansion and genetic modification of gastrointestinal stem cells in spheroid culture. *Nat Protoc*, 8, 2471-82.
- MULLENDERS, J., DE JONGH, E., BROUSALI, A., ROOSEN, M., BLOM, J. P. A., BEGTHEL, H., KORVING, J., JONGES, T., KRANENBURG, O., MEIJER, R. & CLEVERS, H. C. 2019. Mouse and human urothelial cancer organoids: A tool for bladder cancer research. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116, 4567-4574.
- MUN, S. J., RYU, J. S., LEE, M. O., SON, Y. S., OH, S. J., CHO, H. S., SON, M. Y., KIM, D. S., KIM, S. J., YOO, H. J., LEE, H. J., KIM, J., JUNG, C. R., CHUNG, K. S. & SON, M. J. 2019. Generation of expandable human pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like liver organoids. *J Hepatol*, 71, 970-985.

- NAGELE, U., MAURER, S., FEIL, G., BOCK, C., KRUG, J., SIEVERT, K. D. & STENZL, A. 2008. In vitro investigations of tissue-engineered multilayered urothelium established from bladder washings. *Eur Urol*, 54, 1414-22.
- NAIK, M., RAO, B. V., FONSECA, D., MURTHY, S. S., GIRIDHAR, A., SHARMA, R., RAJU, K., RAO, T. S. & CHALLA, S. 2021. GATA-3 Expression in all Grades and Different Variants of Primary and Metastatic Urothelial Carcinoma. *Indian J Surg Oncol*, 12, 72-78.
- NIKLANDER, J. & PAASONEN, L. 2019. Breast Cancer Cell Line MCF7 3D Culture Demonstrated in GrowDex® and Matrigel. *UPM Biomedicals*.
- POLLEHNE, P., AMEND, B., MONTES MOJARRO, I. A., WALZ, S., SCHNEIDER, J., FEND, F., STENZL, A., AICHER, W. K. & HARLAND, N. 2022a. Patienten-abgeleitete Blasentumor-Organoiden können aus Spülurin generiert werden-Etablierung und Evaluierung eines vereinfachten Protokolls. *74. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie e.V. Congress Center Hamburg: Deutsche Gesellschaft für Urologie*.
- POLLEHNE, P., MONTES MOJARRO, I. A., SCHNEIDER, J., AMEND, B., FEND, F., STENZL, A., AICHER, W. K. & HARLAND, N. 2022b. A1074 - Patient derived bladder cancer organoids can be generated from rinsing urine -establishment, and evaluation of a simplified approach. *European Urology*, 81, S1582.
- POLLEHNE, P., MONTES MOJARRO, I. A., SCHNEIDER, J., AMEND, B., FEND, F., STENZL, A., AICHER, W. K. & HARLAND, N. 2022c. MP06-06 ESTABLISHMENT AND EVALUATION OF A SIMPLIFIED APPROACH TO PATIENT DERIVED BLADDER CANCER ORGANOIDS USING URINE. *The Journal of Urology*, 207, e79.
- RANZI, A. D., DA SILVA, J. N., GRAZIOTTIN, T. M., ANNELS, N. & BICA, C. G. 2017. Immunohistochemistry Biomarkers in Nonmuscle Invasive Bladder Cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 25, 178-183.
- SAARELA, U., SHEARD, J. & VAINIO, S. 2021. Nephrogenesis in renal organoids demonstrated in nanofibrillar cellulose hydrogel. *UPM Biomedicals*.
- SACHS, N., DE LIGT, J., KOPPER, O., GOGOLA, E., BOUNOVA, G., WEEBER, F., BALGOBIND, A. V., WIND, K., GRACANIN, A., BEGTHEL, H., KORVING, J., VAN BOXTEL, R., DUARTE, A. A., LELIEVELD, D., VAN HOECK, A., ERNST, R. F., BLOKZIJL, F., NIJMAN, I. J., HOOGSTRAAT, M., VAN DE VEN, M., EGAN, D. A., ZINZALLA, V., MOLL, J., BOJ, S. F., VOEST, E. E., WESSELS, L., VAN DIEST, P. J., ROTTENBERG, S., VRIES, R. G. J., CUPPEN, E. & CLEVERS, H. 2018. A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell*, 172, 373-386.e10.
- SCHÜNKE, M., SCHULTE, E. & SCHUMACHER, U. 2005:174. *Prometheus Hals und Innere Organe*, Georg Thieme Verlag KG.
- SCHUTGENS, F., ROOKMAAKER, M. B., MARGARITIS, T., RIOS, A., AMMERLAAN, C., JANSEN, J., GIJZEN, L., VORMANN, M., VONK, A., VIVEEN, M., YENGEJ, F. Y., DERAKHSHAN, S., DE WINTER-DE GROOT, K. M., ARTEGIANI, B., VAN BOXTEL, R., CUPPEN, E.,

- HENDRICKX, A. P. A., VAN DEN HEUVEL-EIBRINK, M. M., HEITZER, E., LANZ, H., BEEKMAN, J., MURK, J. L., MASEREEUW, R., HOLSTEGE, F., DROST, J., VERHAAR, M. C. & CLEVERS, H. 2019. Tubuloids derived from human adult kidney and urine for personalized disease modeling. *Nat Biotechnol*, 37, 303-313.
- TRAVIS, L. B., CURTIS, R. E., GLIMELIUS, B., HOLOWATY, E. J., VAN LEEUWEN, F. E., LYNCH, C. F., HAGENBEEK, A., STOVALL, M., BANKS, P. M., ADAMI, J. & ET AL. 1995. Bladder and kidney cancer following cyclophosphamide therapy for non-Hodgkin's lymphoma. *J Natl Cancer Inst*, 87, 524-30.
- TURCO, M. Y., GARDNER, L., HUGHES, J., CINDROVA-DAVIES, T., GOMEZ, M. J., FARRELL, L., HOLLINSHEAD, M., MARSH, S. G. E., BROSENS, J. J., CRITCHLEY, H. O., SIMONS, B. D., HEMBERGER, M., KOO, B. K., MOFFETT, A. & BURTON, G. J. 2017. Long-term, hormone-responsive organoid cultures of human endometrium in a chemically defined medium. *Nat Cell Biol*, 19, 568-577.
- USUI, T., SAKURAI, M., NISHIKAWA, S., UMATA, K., NEMOTO, Y., HARAGUCHI, T., ITAMOTO, K., MIZUNO, T., NOGUCHI, S., MORI, T., IWAI, S., NAKAGAWA, T., YAMAWAKI, H., OHAMA, T. & SATO, K. 2017. Establishment of a dog primary prostate cancer organoid using the urine cancer stem cells. *Cancer Sci*, 108, 2383-2392.
- WALZ, S., POLLEHNE, P., MAYER, C., AMEND, B., STENZL, A., AICHER, W. K. & HARLAND, N. 2022. Eingeschränktes Wachstum und verändertes Expressionsprofil in Blasentumororganoiden durch Verwendung von Hydrogelen auf Pflanzenbasis als Ersatz für Basalmembran-Extrakte als 3D Matrix. 74. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie e.V. Congress Center Hamburg: Deutsche Gesellschaft für Urologie.
- WEI, Y., AMEND, B., TODENHÖFER, T., LIPKE, N., AICHER, W. K., FEND, F., STENZL, A. & HARLAND, N. 2022. Urinary Tract Tumor Organoids Reveal Eminent Differences in Drug Sensitivities When Compared to 2-Dimensional Culture Systems. *Int J Mol Sci*, 23.
- YEE, D. S., ISHILL, N. M., LOWRANCE, W. T., HERR, H. W. & ELKIN, E. B. 2011. Ethnic differences in bladder cancer survival. *Urology*, 78, 544-9.
- ZHOU, T., BENDA, C., DUNZINGER, S., HUANG, Y., HO, J. C., YANG, J., WANG, Y., ZHANG, Y., ZHUANG, Q., LI, Y., BAO, X., TSE, H. F., GRILLARI, J., GRILLARI-VOGLAUER, R., PEI, D. & ESTEBAN, M. A. 2012. Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples. *Nat Protoc*, 7, 2080-9.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen unter der Betreuung von PD Dr. med. Bastian Amend durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte im Rahmen des Graduiertenkolleges 2543 - Intraoperative multisensorische Gewebedifferenzierung in der Onkologie - Projektteil C1e durch Prof. Dr. med. Dr. hc. Arnulf Stenzl in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. rer. nat. Wilhelm Aicher, PD Dr. med. Bastian Amend und Dr. med. Niklas Harland.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr. rer.nat. Christine Mayer von mir, mit Unterstützung durch Dr. rer.nat. Christine Mayer, Herrn Johannes Schneider und Herrn Ruizhi Geng durchgeführt.

Johannes Schneider führte die Kultur und lichtmikroskopische Dokumentation der Probe BCO#188 durch.

Ruizhi Geng führte die Kultur und lichtmikroskopische Dokumentation der Proben BCO#216, BCO#220, BCO#221 und BCO#222 durch.

Dr. rer. nat. Christine Mayer stellte zeitweise die verschiedenen Medien für die Zellkultur und die Färbemethoden her und war an den Routinearbeiten in der Zellkultur beteiligt.

Die immunhistochemischen Antikörperfärbungen des Gewebes der Ursprungstumoren, sowie die Fixierung und Vorbereitung für die Färbungen wurden, bis auf die Anfärbung des Markers CD24, durch das Immunhistochemielabor des Departments für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Tübingen in freundlicher Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. Falko Fend und Dr. med. Yvonne Montes Mojarro durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 23.09.2022

Paul Pollehne

8 Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden auf dem Jahreskongress 2022 der European Association of Urology im Rahmen einer Abstract-Session präsentiert (Pollehne et al., 2022b):

- POLLEHNE, P., MONTES MOJARRO, I. A., SCHNEIDER, J., AMEND, B., FEND, F., STENZL, A., AICHER, W. K. & HARLAND, N. 2022b.
A1074 - Patient derived bladder cancer organoids can be generated from rinsing urine -establishment, and evaluation of a simplified approach.
European Urology, 81, S1582.

Teile dieser Arbeit konnten als Abstract im „The Journal of Urology“ der American Urological Association veröffentlicht werden (Pollehne et al., 2022c):

- POLLEHNE, P., MONTES MOJARRO, I. A., SCHNEIDER, J., AMEND, B., FEND, F., STENZL, A., AICHER, W. K. & HARLAND, N. 2022c.
MP06-06 ESTABLISHMENT AND EVALUATION OF A SIMPLIFIED APPROACH TO PATIENT DERIVED BLADDER CANCER ORGANIDS USING URINE.
The Journal of Urology, 207, e79.

Teile dieser Arbeit konnten auf dem Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie in Form von 2 Beiträgen zu einer Abstract-Session präsentiert werden (Walz et al., 2022, Pollehne et al., 2022a):

- POLLEHNE, P., AMEND, B., MONTES MOJARRO, I. A., WALZ, S., SCHNEIDER, J., FEND, F., STENZL, A., AICHER, W. K. & HARLAND, N. 2022a.
V12K3K: Patienten-abgeleitete Blasentumor-Organoiden können aus Spülurin generiert werden-Etablierung und Evaluierung eines vereinfachten Protokolls.
74. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie e.V. Congress Center Hamburg: Deutsche Gesellschaft für Urologie.
- WALZ, S., POLLEHNE, P., MAYER, C., AMEND, B., STENZL, A., AICHER, W. K. & HARLAND, N. 2022.
V12K3K: Eingeschränktes Wachstum und verändertes Expressionsprofil in Blasentumororganoiden durch Verwendung von Hydrogelen auf Pflanzenbasis als Ersatz für Basalmembran-Extrakte als 3D Matrix.
74. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie e.V. Congress Center Hamburg: Deutsche Gesellschaft für Urologie.

9 Danksagung

An erster Stelle geht mein Dank an die zahlreichen von Blasenkrebs betroffenen PatientInnen, ohne deren Einverständnis zur Nutzung der Gewebeproben diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Weiterhin möchte ich meinen Dank an die Deutsche Forschungsgemeinschaft richten, die durch das Graduiertenkolleg 2543 den Rahmen für diese Arbeit geschaffen hat, sowie an alle Beteiligten des Projektes für die freundliche und kollegiale Zusammenarbeit.

Ich danke PD Dr. Bastian Amend, der als Betreuer und erster Gutachter diese Arbeit begleitet hat. Außerdem danke ich auch Prof. Dr. Dr. Stenzl dafür, dass ich in seiner Abteilung diese Arbeit durchführen konnte.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Niklas Harland, der als Clinical Scientist diese Arbeit im Labor, in der Klinik sowie in ihrer Fertigstellung eng begleitet hat und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Auch geht mein ausdrücklicher Dank an Prof. Dr. Wilhelm K. Aicher, der mich als Leiter des Forschungslabors sowohl bei der täglichen Arbeit im Labor als auch bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützte und sich stets die Zeit nahm aktuelle Anliegen zu besprechen.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei den Mitarbeitern des Labors Cornelia Bock, Jasmin Knoll und Tanja Abruzzese, die mich bei der praktischen Arbeit stets mit einem offenen Ohr unterstützt haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Christine Mayer für ihre tagtägliche Unterstützung bei der Arbeit im Labor, die maßgeblich zu dieser Arbeit beigetragen hat.

Danken möchte ich auch meiner Freundin Lisa Schwelp für Ihre kontinuierliche und geduldige Unterstützung.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir mit viel Engagement und Unterstützung während dieser Arbeit zur Seite standen.