

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin II

(Schwerpunkt: Hämatologie, Onkologie, Klinische Immunologie,  
Rheumatologie)

**Organoide aus malignem Harnblasengewebe: Etablierung  
einer Kultivierungsmethode und Vergleich verschiedener  
Wachstumsbedingungen**

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

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

**vorgelegt von**

**Daub, Dominik**

**2021**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. G. Klein  
2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Liebau

Tag der Disputation: 22.06.2020

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>II</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Die Harnblase .....	1
1.2 Harnblasenkarzinom .....	2
1.2.1 Diagnostik und Therapie .....	3
1.2.2 TUR-B.....	5
1.2.3 Zystektomie .....	6
1.3 Organoide und 3D Kultur.....	7
1.3.1 Grundlagen.....	7
1.3.2 Die Rolle der Stammzellen .....	8
1.3.3 Aktuelle Erfolge und Grenzen.....	9
1.3.4 Molekulare Subtypen .....	10
1.3.5 Kulturmedien.....	12
1.3.6 Probengewinnung.....	13
1.3.7 Gewebeverdau .....	13
1.4 Zielsetzung der Arbeit .....	14
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>16</b>
2.1 Chemikalien und Reagenzien .....	16
2.2 Geräte und Verbrauchsmittel .....	18
2.3 Antikörper.....	19
2.4 Probengewinnung .....	20
2.4.1 Transurethrale Resektion von Blasengewebe (TUR-B).....	20
2.4.2 Zystektomie .....	20
2.5 Verdau von Tumorgewebe zu Einzelzellen .....	21
2.5.1 Varianten .....	22
2.6 Dreidimensionale Zellkultur .....	22
2.7 Herstellung von Aktivkohle-behandeltem FBS (csFBS) .....	24
2.8 Gewinnung von R-Spondin-1-konditioniertem Medium .....	24

2.9	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	26
2.10	Western Blot.....	28
2.11	Herstellung von humanem Prostatakulturmedium.....	29
2.12	Einfrieren von Einzelzellen .....	30
2.13	Auftauen von Einzelzellen .....	31
2.14	Passagieren („Splitting“) von Organoiden .....	31
2.14.1	Variante .....	32
2.15	Fixieren von Organoiden.....	32
2.16	Einbetten von Organoiden in Histogel.....	33
2.17	Kryostatschnitte und Immunfluoreszenzfärbung .....	34
2.18	Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung ganzer Organoide.....	35
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
3.1	Wachstum der Organoide .....	37
3.1.1	Übersicht .....	37
3.1.2	Anzahl.....	38
3.1.3	Größe und Wachstumszeitraum .....	39
3.2	Passagierung .....	41
3.3	Gewebeverdau.....	43
3.3.1	Verdau durch Kollagenase (lang) .....	43
3.3.2	Verdau durch Kollagenase (kurz) .....	44
3.3.3	Verdau durch Kollagenase/Hyaluronidase.....	45
3.3.4	Passagierung.....	46
3.4	Medien .....	48
3.4.1	Western Blot.....	48
3.4.2	Medienvergleich.....	49
3.5	Immunfluoreszenzfärbungen.....	52
3.5.1	Gewebeschnitte .....	52
3.5.2	Organoidschnitte.....	52
3.5.3	Ganze Organoide .....	53
3.6	Einflussfaktoren der Patienten .....	57
3.6.1	Geschlecht.....	57
3.6.2	Tumorstadium und Grading .....	57
3.7	Phänomene.....	59
3.7.1	Lymphknotenmetastase.....	59
3.7.2	„Blasenartige Zellen“ .....	62

<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>64</b>
4.1	Organoidwachstum .....	65
4.2	Einfluss der Probenaufbereitung .....	67
4.3	Zellkulturmedien .....	70
4.4	Subtypisierung mittels Immunfluoreszenzfärbung .....	71
4.5	Einfluss von Tumorstadium und Differenzierung .....	73
4.6	Exkurs: „Organoide aus Lymphknotenmetastasen“ .....	74
4.7	Ausblick.....	76
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>78</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>80</b>
	<b>Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift</b> .....	<b>83</b>
	<b>Danksagung</b> .....	<b>84</b>



## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Histologischer Aufbau des Urothels .....	1
<b>Abbildung 2:</b> Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen.....	2
<b>Abbildung 3:</b> TNM-Stadienklassifikation für Harnblasentumoren.....	4
<b>Abbildung 4:</b> Notwendige Eigenschaften zur Definition von Organoiden.....	7
<b>Abbildung 5:</b> Magic Mark™ XP Western Protein Standard .....	27
<b>Abbildung 6:</b> Probe BLCA #21.....	38
<b>Abbildung 7:</b> Verlauf von BLCA 22 (Prostatamedium) .....	39
<b>Abbildung 8:</b> Erfolgreiche Passagierung von BLCA # 9.....	41
<b>Abbildung 9:</b> Vergleich von BLCA #28 vor und nach der Passage.....	42
<b>Abbildung 10:</b> Gewebeprobe BLCA #25 vor dem Verdau.....	43
<b>Abbildung 11:</b> Probenröhrchen mit Geweberesten nach Kollagenaseverdau. ....	44
<b>Abbildung 12:</b> Vergleichsaufnahmen der Ansätze nach Kollagenaseverdau .....	45
<b>Abbildung 13:</b> Vergleich von sanftem und intensivem Verdau bei der Passagierung.....	47
<b>Abbildung 14:</b> Western Blot zum Nachweis von R-Spondin. ....	48
<b>Abbildung 15:</b> Gegenüberstellung von erfolgreichen Ansätzen .....	51
<b>Abbildung 16:</b> Immunfluoreszenzfärbungen von Gewebeschnitten aus BLCA #22.....	52
<b>Abbildung 17:</b> Organoide von BCO #56 unmittelbar vor der Fixierung. ....	54
<b>Abbildung 18:</b> Immunfluoreszenzfärbungen von CK5 (basal) und CK8/18 (luminal).....	54
<b>Abbildung 19:</b> Organoid mit basalen <b>und</b> luminalen Zelltypen. ....	55
<b>Abbildung 20:</b> Immunfluoreszenzfärbungen der Basalmembran und Integrin-β1.....	56
<b>Abbildung 21:</b> Negativkontrollen der Sekundär-Antikörper .....	56
<b>Abbildung 22:</b> BLCA #15 an Tag 35.....	59
<b>Abbildung 23:</b> Zeitlicher Verlauf von BLCA #15. ....	60
<b>Abbildung 24:</b> BLCA #15 an Tag 35 in hoher Vergrößerung. ....	61
<b>Abbildung 25:</b> Zeitlicher Verlauf von BLCA #15 S1.....	61
<b>Abbildung 26:</b> BLCA #15 S2 an Tag 40. ....	62
<b>Abbildung 27:</b> "Blasenartige Zellen" als Phänomen .....	63

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Liste der Chemikalien und Hersteller.....	16
<b>Tabelle 2:</b> Liste der verwendeten Geräte und Verbrauchsmittel mit Herstellern .....	18
<b>Tabelle 3:</b> Liste der verwendeten Antikörper .....	19
<b>Tabelle 4:</b> Zusammensetzungen der verwendeten Gele.....	26
<b>Tabelle 5:</b> Zusätze zur Herstellung von Prostatakulturmedium .....	29
<b>Tabelle 6:</b> Übersicht aller erfolgreichen Ansätze mit Anzahl der Organoiden, Größe und Wachstumszeitraum .....	37
<b>Tabelle 7:</b> Übersicht aller erfolgreichen Ansätze, bei welchen eine Passagierung ("Splitting") durchgeführt wurde .....	40
<b>Tabelle 8:</b> Vergleich der erfolgreichen Ansätze in Bezug auf das Wachstum in zwei unterschiedlichen Medien.....	49
<b>Tabelle 9:</b> Verteilung von Erfolgen und Misserfolgen bei Proben aus low- und high-grade Tumoren .....	57
<b>Tabelle 10:</b> Verteilung von Erfolgen und Misserfolgen gegliedert nach Stadium der Tumoren .	58

## Abkürzungsverzeichnis

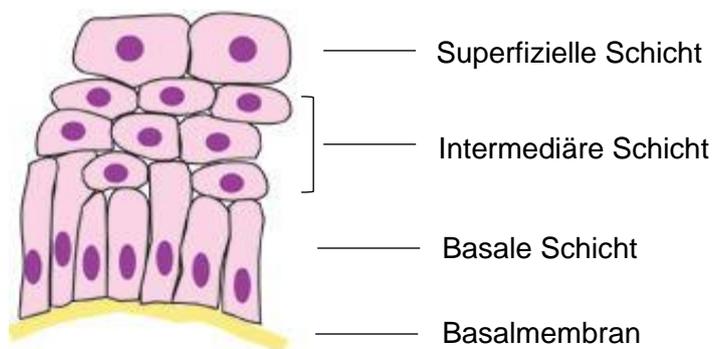
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>BCG</b>	Bacillus Calmette-Guérin
<b>BME</b>	Basement membrane extract
<b>csFBS</b>	Charcoal-stripped fetal bovine serum
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-phenylindole
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>h</b>	Stunden
<b>HHMM</b>	Human hepatocyte maintenance medium
<b>HCM</b>	Hepatocyte complete medium
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>min</b>	Minuten
<b>ml</b>	Milliliter
<b>µm</b>	Mikrometer
<b>PBS</b>	Phosphate-buffered saline
<b>PEG</b>	Polyethylenglycol
<b>PM</b>	Prostatamedium
<b>qRT-PCR</b>	Quantitative real-time polymerase chain reaction
<b>SDS</b>	Natrium-Dodecyl-Sulfat
<b>sec</b>	Sekunden
<b>TEMED</b>	Tetramethylethylendiamin
<b>TUR-B</b>	Transurethrale Resektion der Blase
<b>W</b>	Watt



# 1 Einleitung

## 1.1 Die Harnblase

Die Harnblase ist ein zentrales Glied der harnableitenden Wege des Menschen. Ständig ist die Harnblase wechselnden pH-Milieus, potenziellen Krankheitserregern und zahlreichen Stoffwechselprodukten ausgesetzt, gegen welche sie eine stabile Barriere bildet. Dazu dient ein spezialisiertes, mehrschichtiges Epithel, welches den Großteil der harnableitenden Wege, so auch die Harnblase, bedeckt: das Übergangsepithel (siehe **Abbildung 1**). Es ist auch als *Urothel* bekannt und besteht aus mindestens drei Zellschichten, welche als basale Zellschicht, intermediäre Schicht und superfizielle Schicht bezeichnet werden (Lazzeri, 2006). Die superfizielle Schicht ist zum Lumen gerichtet und



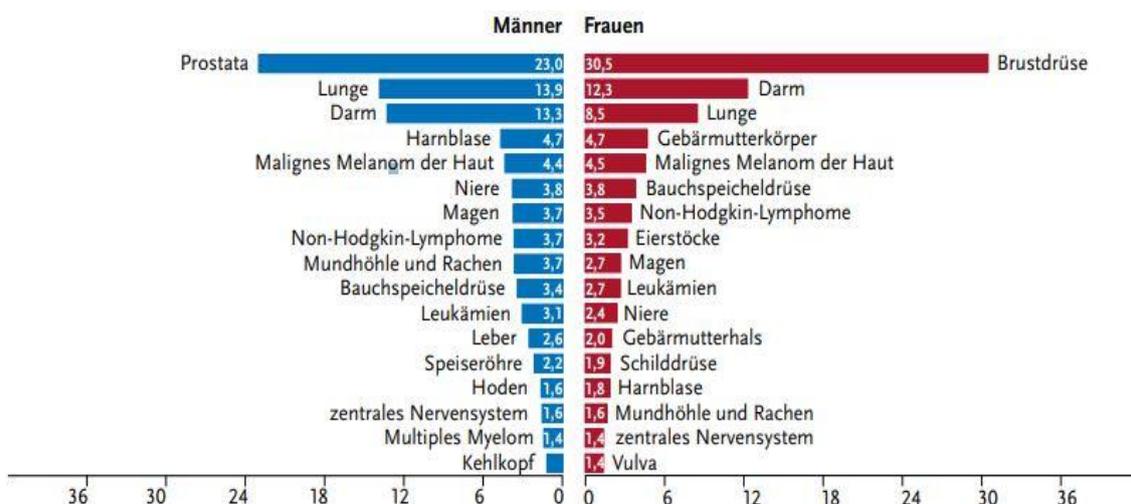
**Abbildung 1:** Histologischer Aufbau des Urothels (entnommen aus Peckham, Michelle (2013): URL: [https://www.histology.leeds.ac.uk/tissue\\_types/epithelia/epithelia\\_classify.php](https://www.histology.leeds.ac.uk/tissue_types/epithelia/epithelia_classify.php), [03.11.2019], University of Leeds).

besteht aus den sogenannten *umbrella cells* oder auch *Deckzellen*. Diese besitzen eine besonders hohe Anzahl an interzellulären Kontakten, vor allem *tight junctions*, um das darunterliegende Gewebe vor dem Urin „abzuschirmen“. Die intermediäre Zellschicht besteht überwiegend aus polyedrischen Zellen. Sie kann je nach Füllungszustand der Harnblase aus mehreren Schichten bestehen, da sich bei ungefüllter Blase mehrere Zellen der intermediären Schicht

übereinander schieben. Die basale Zellschicht besteht aus kuboid-förmigen Zellen. Sie liegen der Basalmembran unmittelbar auf und bilden somit die innerste Schicht des Urothels. Seit einigen Jahren ist bekannt, dass das Urothel zahlreiche interzelluläre Signalfunktionen besitzt, sodass es Einfluss auf die Immunantwort des Körpers nehmen und Stoffwechselprozesse beeinflussen kann (Lazzeri, 2006). Für all diese Aufgaben ist eine hohe Plastizität, insbesondere der Deckzellen, notwendig.

## 1.2 Harnblasenkarzinom

Wie in allen Geweben können auch in der Harnblase Zellen entarten und zu Karzinomen führen. In über 94 % sind diese in der Harnblase urothelialen Ursprungs (Kraywinkel et al., 2018). Die übrigen Malignome, wie Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome, machen den kleineren Anteil aus. Die Inzidenz des Harnblasenkarzinoms liegt in Deutschland verglichen zu anderen Tumoren bei Männern auf Rang Vier und bei Frauen auf Rang Vierzehn (siehe **Abbildung 2**). Das Verhältnis zwischen betroffenen Männern und Frauen beträgt rund 3:1 (Kraywinkel et al., 2018). Die relative 10-Jahres-Überlebensrate



**Abbildung 2:** Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2014 (Krebs in Deutschland 2013/2014, 11.Ausgabe., S. 16, Robert Koch Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e.V., 2014).

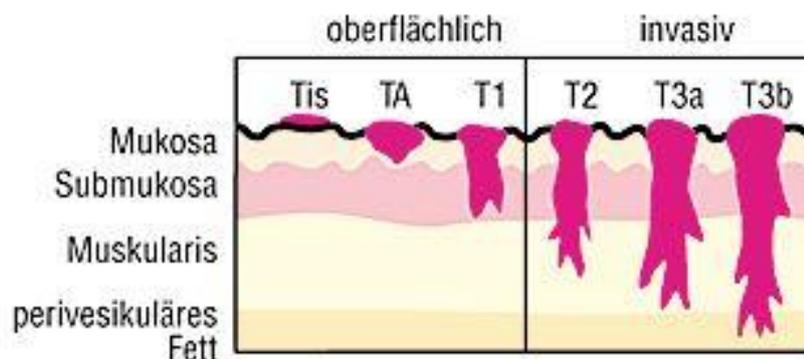
nach Erstdiagnose bei nicht-muskelinvasiven Tumoren liegt zwischen 63 % und 94 %, je nach Stadium und Differenzierungsgrad des Tumors zum entsprechenden Zeitpunkt. Bei den muskelinvasiven Tumoren liegt sie jedoch unter 40 %, und insgesamt verstarben rund 5700 Menschen im Jahr 2015 in Deutschland an einem Harnblasenkarzinom (Kraywinkel et al., 2018).

### 1.2.1 Diagnostik und Therapie

Die Therapie des Harnblasenkarzinoms ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Zunächst ist eine umfassende Diagnostik notwendig, welche die Entscheidung über die spätere Therapie bestimmt. Als primäre, klinische Leitsymptome stehen die Mikro- und Makrohämaturie, also das Auftreten von Blut im Urin, im Vordergrund. Weiterhin können Harnwegsinfekte auftreten oder seltener auch Miktionsstörungen, wie bspw. vermehrter Harndrang oder auch erschwertes Wasserlassen, die sogenannte *Dysurie*. Im fortgeschrittenen Stadium kommt es oftmals zur klassischen B-Symptomatik, welche sich in Gewichtsabnahme, Appetitsverlust und Nachtschweißigkeit äußert. Bei entsprechender Symptomatik werden zunächst Sonographie, Zytologie und Zystoskopie als apparative, diagnostische Verfahren genutzt. Bei weiterhin bestehendem Verdacht werden auch Probeentnahmen zur histologischen Analyse veranlasst. Die Tumorklassifikation erfolgt bei bestätigtem Tumorbefund mittels TNM-Klassifikation (Richie et al., 1998). Da die Urothelkarzinome den größten Anteil der Harnblasentumoren ausmachen, werden sich die folgenden Ausführungen ausschließlich mit diesen beschäftigen, auch wenn dies nicht jedes Mal explizit erwähnt wird.

Zunächst lassen sich die Tumoren in muskelinvasiv oder nicht-muskelinvasiv unterteilen, wobei Zweiteres rund 70 % der Harnblasentumoren ausmacht. Bei den deutlich häufigeren nicht-muskelinvasiven Formen sind die häufigsten Vertreter das papilläre Karzinom (TNM-Klassifikation: Ta) mit rund 70 % und das Carcinoma in situ (Tis) mit rund 10 % (Kirkali et al., 2005). Ist Zweiteres in das subepitheliale Bindegewebe eingedrungen, jedoch nicht muskelinvasiv, so zählt der Tumor noch zu den T1-Tumoren und macht rund 20 % der nicht-

muskelinvasiven Tumoren aus. Sobald der Einbruch in das Muskelgewebe, der Lamina muscularis propria, stattgefunden hat, wird der Tumor als T2 klassifiziert (siehe **Abbildung 3**). Durch eine Probenentnahme besteht im Weiteren die Möglichkeit, eine histopathologische Untersuchung durchzuführen. Das sogenannte *Grading* lässt Aussagen über das Risiko zur Progression des Malignoms sowie über die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs treffen (Sylvester et al., 2006). Die Einteilung erfolgt entsprechend der WHO-Klassifikation von 1973 in die Grade 1 – 3, wobei Grad 1 als hochdifferenziert gilt und prognostisch am günstigsten ist. Dementsprechend gelten G2 Karzinome als mäßig differenziert und G3 Karzinome als schlecht bis undifferenziert. Nach aktuellem Stand der S3-Leitlinien [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Langversion 1.1, 2016] soll sowohl für nicht-muskelinvasive als auch für muskelinvasive Karzinome der Harnblase eine Einteilung in nur zwei Kategorien durchgeführt werden, nämlich *low-grade* und *high-grade*. Muskelinvasive Karzinome werden dabei immer als high-grade eingestuft. Nicht-muskelinvasive Tumoren hingegen können je nach Differenzierungsmuster sowohl der high-grade als auch der low-grade Kategorie angehören. Zusätzlich dazu soll das zuvor genannte, dreistufige Gradingssystem angewandt werden, um bessere prognostische Aussagen treffen zu können. Auf weitere Einteilungen der Karzinome mittels Lymphknotenbefall, Metastasierung und weiteren Faktoren wird an dieser Stelle nicht weiter eingegangen.



**Abbildung 3:** TNM-Stadienklassifikation für Harnblasentumoren (Reiche et. al., 2003, Roche Lexikon Medizin, 5. Aufl., Urban & Fischer Verlag, München, Jena).

Die Unterscheidung zwischen muskelinvasiven und nicht-muskelinvasiven Tumoren ist maßgeblich entscheidend für die weitere Therapie. Da die individuelle Therapieentscheidung bei den zahlreichen, unterschiedlichen Tumoren sehr variabel ist und das Prozedere sehr komplex sein kann, beschränken wir uns hier auf die für die Arbeit relevanten Faktoren und Therapien. Diese sind die für die nicht-muskelinvasiven Tumoren hauptsächlich genutzte „Transurethrale Resektion der Blase“ (TUR-B) und die Zystektomie für die muskelinvasiven Tumoren.

### 1.2.2 TUR-B

Tumore, welche die Blasenmuskulatur nicht befallen haben, gelten als oberflächlich und werden in der TNM-Klassifikation von Ta (nicht-invasives, papilläres Karzinom) bis T1 eingestuft. Die Therapie der Wahl ist hierbei die TUR-B. Dieses Verfahren beinhaltet eine Resektion des tumorösen Gewebes mithilfe einer Elektroschlinge, welche das Gewebe unter Einsatz von elektrischem Strom schneidet. Als Zugang und Arbeitskanal bei diesem minimalinvasiven Verfahren dient die Harnröhre, wodurch das Resektoskop in die Harnblase eingeführt wird. Unter Stromapplikation wird das maligne Gewebe abgetragen und das gesunde Gewebe möglichst erhalten. Um eine vollständige Resektion zu sichern und ein *Understaging* auszuschließen, ist eine Nachresektion nach 4 – 6 Wochen bei Patienten mit mittlerer oder hoher Risikokonstellation empfohlen. Diese sind beispielsweise pT1 Karzinome und alle high-grade Karzinome mit Ausnahme des *Carcinoma in situ*.

Das *Carcinoma in situ* nimmt einen Sonderstatus unter den Harnblasenmalignomen ein. Die TUR-B wird hierbei nur diagnostisch verwendet. Als Therapie der Wahl werden sogenannte BCG-Instillationen (*Bacillus Calmette-Guérin*) angewandt [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Langversion 1.1, 2016]. Dabei werden attenuierte Tuberkuloseerreger in die Harnblase appliziert, die eine Entzündung auslösen und damit auch gegen die Karzinomzellen gerichtete, zytotoxische Mechanismen aktivieren. Da das *Carcinoma in situ* aber ein besonders hohes

Risiko zur Entartung aufweist, kann auch eine Zystektomie in Erwägung gezogen werden. Auch das Rezidivrisiko ist insbesondere bei nicht-invasiven low-grade Karzinomen hoch, sodass anschließende, engmaschige Verlaufskontrollen besonders wichtig sind.

### 1.2.3 Zystektomie

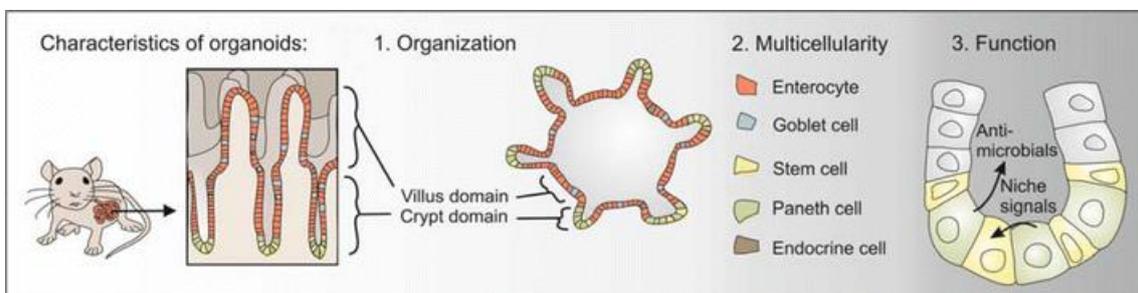
Im Gegensatz zu den nicht-muskelinvasiven Tumoren ist beim muskel-invasiven Harnblasenkarzinom die radikale Zystektomie in den meisten Fällen die Therapie der Wahl. Ab dem TNM-Stadium T2 haben die entarteten Zellen auch die *Lamina muscularis mucosae* befallen, wodurch eine Abschätzung der lateralen Tumorausdehnung in der Regel nicht möglich ist. Zudem besteht ein erheblich höheres Risiko der Metastasierung des Tumors in Lymphknoten und anliegende Organe bis hin zu fernliegenden Organen. Der Eingriff erfolgt laparoskopisch oder offenchirurgisch. Bei der radikalen Zystektomie werden sowohl die Harnblase als auch die pelvinen Lymphknoten entfernt. Bei männlichen Patienten werden zudem Prostata und Samenblasen entfernt und bei weiblichen Patienten werden die vordere Vaginalwand, der Uterus und ggf. auch die Adnexe entfernt. Als Ersatz für die Harnblase gibt es unterschiedliche Varianten der Harnableitung (Thuroff et al., 2012). Je nach Lage, Kontinenz und als Ersatz verwendetem Darmabschnitt werden die Harnableitungsverfahren eingeteilt. Zu den am häufigsten verwendeten Therapieoptionen zählen die (Ileum-)Neoblase und das Ileumkonduit (Bricker, 1950). Diese Verfahren können vielfältige Nebenwirkungen und Komplikationen mit sich bringen. Allgemeine Komplikationen wie Harnstau mit folgender Hydronephrose, Anastomoseninsuffizienzen oder Infektionen treten verhältnismäßig häufig auf (Hautmann et al., 2011). Zudem können bei Verfahren, welche eine Rekonstruktion aus Anteilen des Darms beinhalten, spezifische Komplikationen auftreten, da die Darmschleimhaut besondere Resorptionseigenschaften besitzt. Es kann hierbei zu Malabsorptionen, Elektrolytentgleisung und Exsikkose kommen. Umgekehrt können aufgrund der fehlenden Abschnitte im Intestinum auch Effekte, wie beispielsweise anhaltende Diarrhöen auftreten, welche von den

Patienten als sehr belastend empfunden werden. Nicht zuletzt bleibt zu erwähnen, dass auch trotz radikaler Zystektomie Rezidive auftreten und in einer palliativen Situation enden können. Um diese zahlreichen und oftmals schwerwiegenden Erkrankungen und Verläufe besser therapieren zu können, bedarf es weiterer Forschung in diesen Bereichen. Einen bereits bekannten und mittlerweile aufblühenden Forschungsansatz stellt das Organoidmodell dar.

## 1.3 Organoide und 3D Kultur

### 1.3.1 Grundlagen

Ein Organoid ist ein vereinfachtes Modell von einem Organ und wird in einer *in-vitro* 3D-Umgebung kultiviert (Drost and Clevers, 2018). Bei dieser Methode werden Bedingungen simuliert, welche denen des menschlichen Körpers deutlich ähnlicher sind als jene in einer klassischen, adhärenenten 2D-Kultur. Dies hängt mit den Eigenschaften des extrazellulären Matrix-Mediums zusammen, worin die Zellen eingebettet werden. Matrigel hat die Eigenschaft, dass es im polymerisierten Zustand eine formstabile und gleichzeitig leicht visköse Form annimmt (Kleinman and Martin, 2005). Dabei bleibt die Fähigkeit zur Diffusion erhalten und die eingebetteten Zellen können dadurch mit Medium versorgt werden. Das Medium kann entsprechend mit beliebigen Zusätzen ergänzt werden, welche untersucht werden sollen. Trotz der permanenten



**Abbildung 4:** Notwendige Eigenschaften zur Definition von Organoiden sind Selbstorganisation, Multizellularität und den Erhalt der Funktionen. In diesem Beispiel handelt es sich um ein intestinales Organoid aus adulten Stammzellen von Mäusen. (entnommen aus: Bartfeld, Clevers, 2017)

Weiterentwicklung der extrazellulären Matrix-Medien bilden diese die Realität bisher noch nicht optimal ab (Blow, 2009).

Die Grundlage aller Organoide ist das Vorhandensein von Stammzellen. Stammzellen haben die Eigenschaft, dass sie sowohl zur Selbsterneuerung fähig sind als auch Differenzierungen zu verschiedenen Gewebe- und Zelltypen durchlaufen können. Da Darmepithel eine hohe Teilungsrate und eine einfache Struktur aufweist, wird es häufig zur Untersuchung von Stammzellen genutzt (Clevers, 2013). Daher lässt sich auch das Konzept der Organoide am Beispiel eines intestinalen Organoids gut darstellen (siehe **Abbildung 4**). Der Dünndarm enthält Zotten und Krypten als spezifisches Merkmal, in welchen verschiedene Zelltypen in einer gewissen Anordnung organisiert sind. Um Organoide aus Dünndarmgewebe zu kultivieren, ist es notwendig, dass das Gewebe Stammzellen beinhaltet. Die Stammzellen des Dünndarmepithels befinden sich am Grund der Krypten (Marshman et al., 2002). Unter entsprechenden Wachstumsbedingungen differenzieren sich die Stammzellen zu den verschiedenen Zelltypen des Dünndarmgewebes und bilden zudem die Organisation des Ursprungsorgans ab. Hier lässt sich dies an der Bildung von zotten- und kriptenähnlichen Formationen erkennen. Ebenso differenzieren sich die Stammzellen zu spezialisierten Zellen des Dünndarmepithels, wie bspw. Enterozyten oder Panethzellen. Diese spezialisierten Zellen besitzen im menschlichen Dünndarm unterschiedliche Aufgaben und Funktionen. Auch diese konnten in den Organoiden nachgewiesen werden, sodass ein relativ realistisches „Mini-Modell“ des Ursprungsgewebes entsteht (Bartfeld and Clevers, 2017).

### 1.3.2 Die Rolle der Stammzellen

Organoide können aus adulten und aus embryonalen Stammzellen gezüchtet werden (Kretschmar and Clevers, 2016) und sowohl von gesunden Geweben als auch von malignen. Embryonale Stammzellen haben die Eigenschaft, dass sie sich zu Geweben aller drei Keimblätter differenzieren und somit alle Zellen des gesamten Organismus ausbilden können. Wie der Name schon verrät,

kommen sie beim Menschen nur in der frühen Phase der embryonalen Entwicklung vor und sind somit aus ethischen, rechtlichen und technischen Gründen schwer zu gewinnen. Adulte Stammzellen hingegen haben die Fähigkeit, sich zu allen Zelltypen des Gewebes, in dem sie vorkommen, zu differenzieren (Morrison et al., 1997). Weiterhin können Stammzellen asymmetrische Zellteilung vollziehen, wodurch sie sowohl der (Neu-)Bildung als auch der Reparatur eines Gewebes dienen können. Dazu besitzen sie, je nach Gewebetyp, eine besonders hohe Kapazität zur Selbst-Erneuerung (Morrison et al., 1997), was für die Kultivierung von Organoiden hilfreich sein kann. Organoide werden als vielversprechende Möglichkeit zur künftigen Bekämpfung von Tumoren gesehen (Huch et al., 2017). Dazu könnten beispielsweise Tumorgewebeproben der zu behandelnden Patienten entnommen werden und mithilfe der darin enthaltenen adulten Stammzellen Organoide kultiviert werden. Diese patientenspezifischen Organoide könnten aufgrund ihrer hohen Ähnlichkeit zum Originaltumor verwendet werden, um beispielsweise Medikamententests und Untersuchungen durchzuführen. Aus diesem Grund ist die Kultivierung von Organoiden, insbesondere aus adulten Stammzellen, ein relevantes Ziel.

### **1.3.3 Aktuelle Erfolge und Grenzen**

Es wurden bereits zahlreiche Organe wie Lunge, Leber, Brustdrüse, Colon, Prostata (Bartfeld and Clevers, 2017) und auch Harnblase in Organoidmodellen rekonstruiert (Lee et al., 2018). Der besondere Vorteil der 3D-Methode liegt darin, dass sich realistisch beobachten lässt, wie Stammzellen sich in ihrem Wachstum verhalten, beeinflussen lassen und im Falle von malignen Stammzellen auch stoppen bzw. therapieren lassen. Es ist offensichtlich, dass zahlreiche Faktoren diese Vorgänge beeinflussen, sodass es sehr schwierig ist, ein realistisches Mikromilieu zu simulieren. Ebenso werden interzelluläre Signalübertragungen durch Zellen der Mikroumgebung, wie z.B. Stromazellen, nicht berücksichtigt, was ein bekanntes Problem des Organoidmodells darstellt (Yoshida et al., 2018). Es konnte dennoch bereits gezeigt werden, dass Organoide aus gesundem und malignem Harnblasengewebe sehr vielversprechende Ergebnisse

hervorbringen. So konnte demonstriert werden, dass Organoide aus Blasentumoren vielfältige histopathologische und molekulare Eigenschaften ihrer Ausgangstumore ebenfalls ausprägen (Lee et al., 2018). Mit diesen Organoiden wurden bereits erste Medikamententests durchgeführt, womit ansatzweise prospektive Aussagen über Therapieergebnisse bei Patienten gemacht werden konnten. Vor diesem Hintergrund ist es wünschenswert, die Methode zur verlässlichen Generierung von Harnblasen-Organoiden weiterhin zu verbessern, um in Zukunft individualisierte Organoide von Blasenkrebspatienten zu kultivieren. Mit diesen Organoiden wäre man beispielsweise in der Lage, verschiedene Chemotherapeutika vorab zu testen und somit ein Ansprechen oder Nicht-Ansprechen zu prognostizieren. Damit könnte man den Patienten einerseits Nebenwirkungen einer Fehltherapie ersparen und gleichzeitig eine zielgerichtete Therapie mit der individuell besten Prognose beginnen.

### **1.3.4 Molekulare Subtypen**

Blasentumore lassen sich molekular in zwei wesentliche Subtypen unterteilen, welche als luminaler und basaler Subtyp bezeichnet werden (Choi et al., 2014). Diese Subtypen lassen sich durch Differenzierungsmarker unterscheiden (Yoshida et al., 2018). Der luminaler Subtyp wurde in der genannten Versuchsreihe auf die luminalen Marker Uroplakin 1a, forkhead box protein A1 (FOXA1) und peroxisome proliferator activator receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) hin untersucht. Der basale Subtyp hingegen exprimiert Cytokeratin 5 und Cytokeratin 14. Eine Problematik besteht noch darin, dass vor allem in adhärennten Zellkulturen aus malignem Blasengewebe eine Änderung des molekularen Subtyps stattfindet (Yoshida et al., 2018). Die Zelllinie T-MNU-1, welche vergleichend in einer adhärennten Kultur kultiviert wurde, zeigten in der qRT-PCR und in immunhistochemischen Färbungen eine Änderung des Subtyps der Zellen hin zum basalen Typ. In den Organoidkulturen hingegen konnte eine bessere Aufrechterhaltung der Subtypen der Originaltumore gezeigt werden.

Jedoch wurden im gleichen Jahr weitere Ergebnisse veröffentlicht, welche eine solche Änderung der Subtypen auch bei Organoiden mit einem Anteil von 64%

der Ansätze gezeigt haben (Lee et al., 2018). Hierbei wurde die Expression von Cytokeratin 5 als Marker für basale Zellen, Cytokeratin 8 als Marker für luminale Zellen und Cytokeratin 7 als Marker für alle urothelialen Zellen verwendet.

Zytoplasmatische Cytokeratine stellen als Komponenten der Intermediärfilamente einen zentralen Bestandteil des Zytoskeletts epithelialer Zellen dar. Die aktuell über 20 bekannten Cytokeratine lassen sich speziellen Geweben zuordnen und können bereits in vielen Bereichen als diagnostische Marker genutzt werden (Barak et al., 2004). Da das Epithel der Harnblase, wie zuvor beschrieben (siehe 1.1), drei Schichten oder mehr aufweist, lassen sich hier luminale und basale Zellen unterscheiden, welche jeweils spezifische Cytokeratine ausprägen (Castillo-Martin et al., 2010, Lee et al., 2018). Bekannte Cytokeratine des muskelinvasiven Blasenkarzinoms sind neben den zuvor genannten Cytokeratinen 5 und 8 beispielsweise auch Cytokeratin 6, 10 und 14 für basale Zellen und Cytokeratin 18 und 20 für luminale Zellen (Choi et al., 2014, Castillo-Martin et al., 2010).

Ähnlich wie bereits bei Brustkrebs bekannt, nehmen die unterschiedlichen Subtypen auch einen deutlichen Einfluss auf das klinische Ergebnis der Patienten mit *high-grade* Blasenkarzinomen (Damrauer et al., 2014). Dementsprechend ist eine genaue Analyse der Organoide auf molekularer Ebene ebenfalls notwendig, um den Einfluss der Wachstumsbedingungen auf die Subtypen der Organoide zu untersuchen und neue Erkenntnisse über die möglichen Veränderungen bei den Organoiden zu beobachten. Um dies zu ermöglichen, wurden in Teilen der vorliegenden Arbeit Immunfluoreszenzfärbungen genutzt, um mithilfe basaler und luminaler Marker, sowie Basalmembran- und Zelladhäsionsmolekülmarker, die Morphologie von Blasenorganoiden zu zeigen und beurteilen zu können. Zudem wurden jene Färbungen auch von malignem Harnblasengewebe angefertigt, welche mit den entsprechenden Organoiden verglichen werden können.

### 1.3.5 Kulturmedien

Die Zusammensetzung des hauptsächlich verwendeten Mediums für Blasenorganoide entstammt aus vorangegangenen Versuchen (Pauli et al., 2017) und wurde bereits mehrfach genutzt, um Organoide aus verschiedensten Geweben zu kultivieren. So wurde in einer großen Versuchsreihe ein definiertes Organoidmedium verwendet, welches sich aus DMEM, Glutamin, B27, den Antibiotika Penicillin, Streptomycin, Primocin und tumorspezifischen Wachstumsfaktoren zusammensetzte (Pauli et al., 2017). Hieraus konnte die Gruppe Organoide aus verschiedenen Ursprungstumorgeweben mit einer Erfolgsquote von 36.8 % (56/152) etablieren (Pauli et al., 2017). Dabei wurde eine Zelllinie, welche mindestens fünfmal passagiert werden konnte, als erfolgreich etabliert gewertet. Organoide aus Tumorgewebeproben von Harnblasen und Harnleitern konnten mit einer Erfolgsquote von 33.3% (8/24) etabliert werden.

Weitere Versuche einer anderen Gruppe im folgenden Jahr zeigten noch größere Erfolge (Lee et al., 2018). Durch den Einsatz von serumhaltigem Hepatozyten-Medium, welches charcoal-stripped fetal bovine serum, den epidermalen Wachstumsfaktor und den ROCK-Inhibitor „Y-27632“ zur Verbesserung der Zellvitalität enthielt, konnten 12/17 Tumorproben erfolgreich mindestens sechsmal passagiert werden. Bis zu 26 Passagen konnten zum Zeitpunkt der Veröffentlichung erreicht werden. Zudem war eine Kryokonservierung ohne nennenswerte Verluste der Teilungsfähigkeit nach dem Auftauen möglich (Lee et al., 2018). Als Grundlage der folgenden Versuche wurde die Zusammensetzung dieses Medium übernommen (siehe 2.6).

Vergleichend dazu wurde ein definiertes Medium eingesetzt, welches bereits zuvor zur erfolgreichen Kultivierung von Prostataorganoiden genutzt wurde (Drost et al., 2016). Im Gegensatz zu dem vorher genannten Medium enthält dieses Medium zahlreiche, definierte Zusätze und kein Serum. Es wurde in der vorliegenden Arbeit als Vergleichsmedium verwendet, um zu zeigen, ob Unterschiede der Kulturen durch das Medium entstehen oder möglicherweise auch andere Faktoren besondere Auswirkungen auf das Wachstum der

Organoide haben. Denkbare Problemquellen wären beispielsweise die Entnahmetechnik bei der Probengewinnung, der Transport der Proben vom OP in das Labor oder der Verdau zu Einzelzellen.

### **1.3.6 Probengewinnung**

Die Gewebeproben wurden durch die Klinik für Urologie des Universitätsklinikum Tübingen bereitgestellt. Der Großteil der Eingriffe und somit der Proben wurden mittels TUR-B entnommen. Dies beinhaltet eine Resektion des Gewebes mithilfe einer Elektroschlinge (siehe 1.2.2). Dabei ist es praktisch unvermeidbar, dass auch das Gewebe, welches entnommen wird und für die Organoidkulturen verwendet wird, mit Strom in Kontakt kommt. Der Strom führt unvermeidlich zum Untergang der involvierten Zellen. Ob und inwiefern dies die Gewebeproben in ihrer Vitalität insgesamt beeinflusst, lässt sich nicht sicher sagen. Der Vorteil der Zystektomie in Bezug auf die Entnahmetechnik ist somit, dass ein Anteil erhalten bleibt, welcher nicht unmittelbar mit Strom in Kontakt kommt und dadurch vermutlich erheblich mehr intakte Zellen aufweist. Eine unmittelbare Kühlung des Gewebes nach der Entnahme soll die Stoffwechselaktivität der Zellen reduzieren, um diese während des Transports bis zur Verwendung im Labor möglichst wenigen Stressoren auszusetzen. Dies könnten beispielsweise Abfallprodukte zerstörter Zellen, Medikamente oder sonstige Zelltoxine sein, die während der Operation anfallen können.

### **1.3.7 Gewebeverdau**

Zum Verdau des Gewebes werden verschiedene Verfahren angewandt und miteinander verglichen, um herauszufinden, wie eine möglichst hohe Zellvitalität und gleichzeitig optimale Vereinzelung der Zellverbände erreicht werden kann. Als etablierte Methode (Chua et al., 2014) lässt sich der enzymatische Verdau in zwei Schritten mithilfe von Kollagenase/Hyaluronidase und Trypsin durchführen, um einerseits Bindegewebe zu spalten, welches in den Gewebeproben enthalten ist und andererseits die Zell-Zell-Kontakte zu lösen und so die Zellen zu

vereinzeln. Diese Methode wurde bereits erfolgreich für den Verdau von Prostatagewebe zur Gewinnung von Organoiden verwendet (Chua et al., 2014). Da Kollagenase Zellverbände lösen kann, ohne die Zellen selbst zu schädigen, sollten vergleichend auch Gewebeproben mit reiner Kollagenase Typ II für unterschiedliche Zeiträume verdaut werden. Zur Steigerung der Zellvitalität ist es förderlich, die Proben permanent in DMEM aufzubewahren und ebenfalls mit diesem die Waschvorgänge durchzuführen (Lee et al., 2018). Über die Größe der Tumorproben lässt sich aus den vorangegangenen Arbeiten wenig ableiten. Möglicherweise wäre eine Anpassung der Verdauzeiten an die Größe der Tumorproben als zu untersuchender Parameter denkbar. Auch der Verdau mit Trypsin bedarf besonderer Aufmerksamkeit, da das aggressive Enzym nur extrazelluläre Proteine spalten soll, ohne intrazelluläre Bestandteile zu beschädigen.

### 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das grundsätzliche Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Methode zur stabilen Generierung von Organoiden aus malignem Harnblasengewebe weiterzuentwickeln. Dazu wurden alle erhaltenen Gewebeproben durch enzymatischen Verdau möglichst schonend zu Einzelzellen aufgetrennt, um im weiteren Verlauf in 3D-Kultur zu wachsen. Hierbei wurden unterschiedliche Methoden des Gewebeverdaus genutzt und diese miteinander verglichen. Weiterhin wurden die Ansätze immer vergleichend in zwei unterschiedlichen Medien kultiviert, um mögliche Unterschiede herausstellen zu können. Die Grundlagen der Versuche und Zusammensetzung der Medien stützt sich vor allem auf bereits erfolgreich durchgeführte Experimente der Arbeitsgruppe von Prof. Clevers (Hubrecht Institute, Utrecht, Niederlande) und der Veröffentlichung von Lee et al. (2018). Größe, Anzahl und Wachstumszeitraum der Organoiden dienten als zentrale, zu beobachtende Kriterien für die Auswertungen der Experimente. Als klinische Aspekte wurden Geschlecht, Tumorstadium und Differenzierungsgrad (*Grading*) der Tumoren in die Auswertung miteinbezogen

und evaluiert. Sofern möglich wurden mehrere Passagen der Gewebeproben kultiviert und diese ebenfalls auf genannte Kriterien untersucht.

Die Kryokonservierung von Tumorproben war ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Dazu wurden die aus den Gewebeproben gewonnen Einzelzellen in ein definiertes Gefriermedium gegeben und in flüssigem Stickstoff konserviert, um eine Biobank aus Tumorproben für weitere Versuche zu erstellen. Weiterhin wurden Organoide mit ausreichender Größe und Stabilität aus der Kultur entnommen und nach Fixierung eingebettet. Mit Immunfluoreszenzfärbungen der Organoide wurden primäre morphologische Untersuchungen angestellt. Durch Nutzung epithelialer Marker sollte gezeigt werden, ob sich die Zellen innerhalb der Organoide repetitiv, gleichartig anordnen und die Organoide einen reproduzierbaren Aufbau sowie eine konstante Subtypenverteilung zeigen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Reagenzien

*Tabelle 1: Liste der Chemikalien und Hersteller*

A 83-01	Tocris, Wiesbaden-Nordenstadt, DE
Advanced DMEM/F12	Invitrogen, Karlsruhe, DE
B27 supplement	Gibco, Dreieich, DE
Basement Membrane Extract type II	Trevigen (Bio Techne, Wiesbaden-Nordenstadt, DE)
BSA (Bovine serum albumin)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, DE
Charcoal, dextran coated	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, DE
Kollagenase Typ II	STEMCELL Tech., Köln, DE
Kollagenase/Hyaluronidase 10X	STEMCELL Tech., Köln, DE
Dako mounting medium	DAKO (Agilent Tech.), Hamburg, DE
Dispase, ACF (Animal component free)	STEMCELL Tech., Köln, DE
DMSO (Dimethyl-sufoxid)	AppliChem, Darmstadt, DE
DPBS (Dulbecco's Phosphate-buffered saline)	Gibco, Dreieich, DE
EGF (Epidermal Growth Factor)	PeptoTech, Hamburg, DE
FBS (Fetal bovine serum)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, DE
FGF 7 (Fibroblast growth factor)	PeptoTech, Hamburg, DE
FGF 10	PeptoTech, Hamburg, DE
Glutamax 100X	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Hepatocyte complete medium	STEMCELL Tech., Köln, DE

HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Histogel	Thermo Fisher Scientific, Ulm, DE
Hepatocyte Culture Media Kit (HCM)	Corning, Wiesbaden, DE
Human Hepatocyte Maintenance Medium (HHMM) – Long Term	Primacyt, Schwerin, DE
Isopropanol	Merck, Darmstadt, DE
Magic Mark XP Western Protein Stand.	Thermo Fisher Scientific, Ulm, DE
Methanol	VWR International, Darmstadt, DE
N-Acetylcystein	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, DE
Nicotinamid	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, DE
Noggin	PeproTech, Hamburg, DE
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Primocin	Invitrogen, Karlsruhe, DE
R-Spondin-1 (RSPO1) – konditioniertes Medium	Selbst hergestellt
RPMI Medium 1640	Gibco, Dreieich, DE
SB202190	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, DE
SDS (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide)	AppliChem, Darmstadt, DE
Tissue-Tek	Sakura Finetek Germany, Staufen, DE
Triton-X-100	AppliChem, Darmstadt, DE
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, DE
Tween 20	AppliChem, Darmstadt, DE
Y-27632	AbMole (Hölzel-Diagnostika Handels GmbH, Köln, DE)
Zeocin™ Selection Agent	Thermo Fisher Scientific, Ulm, DE

## 2.2 Geräte und Verbrauchsmittel

*Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte und Verbrauchsmittel mit Herstellern*

24 Well Platte	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
48 Well Platte	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Biofuge fresco	Heraeus Holding, Hanau, DE
Cell Culture Treated 500 cm <sup>2</sup> Triple Flask™	Thermo Fisher Scientific, Ulm, DE
Centrifuge 5810R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Cryomold	Sakura Finetek Germany, Staufen, DE
Cryovials	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
EASYstrainer (100 µm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Filter (0.45 µm, 0.22 µm)	Merck, Darmstadt, DE
Immunopen	FUJIFILM Wako Chemicals Europe, Neuss, DE
Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Ulm, DE
Kammerobjektträger	Thermo Fisher Scientific, Ulm, DE
Li-COR Premium Chemiluminescent Kit	LI-COR Biosciences, Bad Homburg, DE
Mikroskop 1	Axiophot; Carl Zeiss Microscopy, Jena, DE
Mikroskop 2	Axiovert 200M; Carl Zeiss Microscopy, Jena, DE
Mikroskop 3	Axiovert 135; Carl Zeiss Microscopy, Jena, DE
„Mr. Frosty“ Einfrierbehälter	Thermo Fisher Scientific, Ulm, DE
Präzisionstücher	KIMTECH Science (VWR International, Darmstadt, DE)
Skalpell	B. Braun AG, Melsungen, DE
Tissue Freezing Medium	Leica Mikrosysteme Vertrieb, Wetzlar, DE

Zellkulturflasche (75ml)	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, CH
Zellkulturschale 40	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, CH

## 2.3 Antikörper

*Tabelle 3: Liste der verwendeten Antikörper*

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
Rabbit-anti-human CK 5, polyklonal	Biologend
Mouse-anti-human CK8/18, monoklonal	Thermo Fisher Scientific
Mouse-anti-human Integrin $\beta$ 1, monoklonal	Beckman Coulter
Rabbit-anti-human Perlecan, polyklonal	Prof. Gerd Klein
Goat-anti-mouse IgG (H+L) – Cy3	Jackson Immuno Research Laboratories (Dianova)
Goat-anti-rabbit IgG - Alexa Fluor 488	Jackson Immuno Research Laboratories (Dianova)
<b>Western Blot:</b>	
Mouse-anti-human HA, monoklonal	Thermo Fisher Scientific
Rabbit-anti-mouse Ig/HRP, polyklonal	Agilent Technologies (Dako)

## **2.4 Probengewinnung**

Zur Gewinnung von Tumorproben wurden, in Kooperation mit der Urologischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen, 32 Patienten ausgewählt, welche einen der unten genannten operativen Eingriffe erhielten. Die Einverständniserklärungen der Patienten, sowie das positive Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen (Nr. 105/2018BO2 und 869/2018BO2) lagen vor.

### **2.4.1 Transurethrale Resektion von Blasengewebe (TUR-B)**

Oberflächliche Harnblasentumoren können minimal-invasiv behandelt werden. Präoperativ wurden die Patienten standardmäßig vorbereitet. Zu Beginn des operativen Eingriffs wurde ein Zystoskop transurethral in die Harnblase eingeführt, um die Blasenschleimhaut systematisch zu evaluieren. Im Anschluss wird ein Resektoskop eingeführt, an dessen Ende sich eine Elektroschlinge befindet. Damit wurde der entsprechende Tumor unter Stromapplikation an seiner Basis mithilfe der Schlinge abgesetzt. In zweiten Schritt wurde das restliche Tumorgewebe so nachreseziert, dass kleine Anteile der gesunden Muskulatur ebenfalls entfernt wurden, um eine vollständige Resektion zu sichern. Die gewonnenen Resektate wurden primär für die pathologische Untersuchung des Gewebes verwendet und bei ausreichender Menge für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt. Dementsprechend ließen sich im Anschluss Auswertungen zu dem Einfluss des Tumorstadiums auf unsere Versuche vornehmen.

### **2.4.2 Zystektomie**

Bei den Patienten, die eine Zystektomie erhielten, wurden nach Entnahme der Blase manuell Proben für unser Projekt entnommen. Im Gegensatz zur TUR-B wurde dieses Verfahren ohne die Nutzung von elektrischem Strom durchgeführt.

Die Proben wurden anschließend durch pathologische Untersuchungen als maligne eingestuft, sodass es sich bei diesem Gewebe mit nahezu 100%iger Sicherheit um Tumoren handelte. Im weiteren Verlauf wurden die Proben identisch zu Proben aus der TUR-B behandelt.

## 2.5 Verdau von Tumorgewebe zu Einzelzellen

Die Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme schnell und gekühlt in Kulturmedium von der urologischen Abteilung der Universitätsklinik Tübingen in das Labor (Zentrum für medizinische Forschung) transportiert. Der Zeitrahmen von der Entnahme der Gewebeprobe bis zur Verarbeitung umfasste max. 120 min. Zunächst wurde das Tumorgewebe mithilfe von zwei Skalpelln in einer Petrischale geschnitten, sodass eine homogene, dickflüssige Masse entstand. Aufgrund der Operationstechnik wurde zur Entnahme der Proben elektrischer Strom verwendet, welcher an den Proben teilweise schwarz verfärbte Schnittränder erzeugte. Diese wurde soweit mittels eines Skalpells entfernt, dass makroskopisch keine verbrannten Stellen mehr erkennbar waren. Das Gewicht wurde mittels Feinwaage bestimmt. Die Gewebeprobe wurde in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Pro 50 µg Gewebe wurden anschließend 900 µl serumfreies Kulturmedium sowie 100 µl 10x Kollagenase/Hyaluronidase zugegeben. Der enzymatische Verdau wurde anschließend auf dem Schüttler mit 45 Umdrehungen/min bei 37 °C für 60 – 180 min durchgeführt. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 150 x g. Der Überstand wurde abgenommen, 1 ml TrypLE /150 mg Gewebe hinzugegeben und der Verdau für weitere 7 - 8 min bei 37 °C durchgeführt. Während dieses Verdau wurde die Suspension im Abstand von 2 - 3 min mehrfach durch Auf- und Abpipettieren durchmischt. Um den Verdau zu stoppen, wurde die Suspension mit serumhaltigem Kulturmedium gewaschen, für 5 min bei 150 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Suspension wurde danach dreimal durch ein 100 µm Zellsieb gegossen. Der Überstand wurde bis auf ca. 1 ml abgenommen und das Zellpellet vollständig resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl mittels Neubauer

Zählkammer bestimmt und die Zellen auf eine Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml verdünnt.

### (Serumhaltiges) Kulturmedium:

- HHMM als Grundmedium [enthält bereits hepatocyte growth factor (HGF) und EGF vom Hersteller und ist ca. 6 Monate haltbar]
  - o **ODER** Hepatocyte complete medium (HCM) als Grundmedium (+ 5 ng/ml EGF)
- 100 µg/ml Primocin
- 1x Glutamax
  
- [bei *serumhaltigem* Kulturmedium zusätzlich 5 % charcoal stripped fetal bovine serum (csFBS)]

### **2.5.1 Varianten**

Vergleichend zu dem genannten Verdauvorgang wurde bei 14 Ansätzen statt Kollagenase/Hyaluronidase das Enzym Kollagenase Typ II verwendet. Wiederum 7 dieser Ansätze wurden für 24 h auf dem Schüttler verdaut und anschließend für 12 – 15 min zusätzlich mit Trypsin, wie zuvor beschrieben. Die anderen 7 Ansätze wurden für 60 – 180 min ebenfalls auf dem Schüttler verdaut, jedoch ohne die anschließende Verwendung von Trypsin. Der sonstige Verdauvorgang wurde identisch durchgeführt.

### **2.6 Dreidimensionale Zellkultur**

Um Einzelzellen in eine 3D-Kultur zu bringen, wurde Matrigel im Verhältnis 3:1 zur Zellsuspension gemischt. Im Vorfeld ist eine besondere Vorbehandlung des Matrigels zu beachten. Matrigel muss langsam über Nacht von  $-80\text{ °C}$  auf  $4\text{ °C}$  aufgetaut werden, bevor es genutzt werden kann und darf zwischendurch nicht zu warm werden, um eine irreversible Verfestigung zu vermeiden. Alle Schritte,

die die Nutzung von Matrigel beinhalten, wurden deshalb auf Eis durchgeführt. Pro Gewebeprobe wurden, sofern ausreichend Material vorhanden war, 6 Wells einer 24 Well Platte angesetzt. Es wurden  $2 \times 10^4$  Zellen/Well verwendet und hierfür 10  $\mu\text{l}$  Zellsuspension ( $2 \times 10^6$  Zellen/ml) mit 30  $\mu\text{l}$  BME Typ II gemischt. Je 40  $\mu\text{l}$  dieser Suspension wurden zügig auf die 6 Wells mit einer 100  $\mu\text{l}$  Pipette aufgetragen, unverzüglich um  $180^\circ$  gewendet und kopfüber bei  $37^\circ\text{C}$  für 15 min inkubiert. Die besondere Eigenschaft von Matrigel ist, dass es bei  $4^\circ\text{C}$  viskös bis flüssig ist und bei Erwärmung auf  $37^\circ\text{C}$  zügig beginnt zu polymerisieren. Durch das Wenden der Platte wandern die Zellen langsam durch das Gel, während es zunehmend fest wird und werden dadurch in einer gleichmäßigen Verteilung fixiert. Da kein Kontakt zur Platte selbst besteht, wachsen die Zellen nicht adhärent, sondern frei in alle Richtungen. Nach Verfestigung der Tropfen wurden die Platten wieder um  $180^\circ$  gedreht und in jedes Well 650  $\mu\text{l}$  Organoidmedium gegeben. Danach wurden die Zellen bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  kultiviert. Alle drei Tage wurde 200  $\mu\text{l}$  frisches Organoidmedium pro Well hinzugegeben und alle sieben Tage wurden das gesamte Medium gewechselt. Da vergleichend ein zweites Medium getestet wurde, wurden beide Medien in identischen Intervallen gewechselt. Ab Tag 8 wurde in allen Ansätzen kein Y-27632 mehr zu den Medien zugegeben, sodass die Ansätze ohne Y-27632 weiter kultiviert wurden. Y-27632 ist ein Rho-Kinase-Inhibitor (*ROCK*-Inhibitor), welcher zur Proliferation von sowohl gesunden als auch tumorösen Epithelzellen verschiedener Gewebetypen beiträgt, ohne ihren Karyotyp zu verändern. Werden Zellen anschließend erneut ohne Y-27632 kultiviert, behalten sie weiterhin ihre Fähigkeit zu Differenzierung unverändert bei (Liu et al., 2012).

#### Organoidmedium:

- HHMM
- 100  $\mu\text{g/ml}$  Primocin
- 1x Glutamax
- 5 % csFBS
- 10  $\mu\text{M}$  Y-27632

## **2.7 Herstellung von Aktivkohle-behandeltem FBS (csFBS)**

Für die Zellkulturen wurden serumhaltige Medien genutzt. Um den Gehalt von verschiedenen Hormonen im FBS zu reduzieren, wurde das Serum vor der Nutzung mit Dextran-umhüllter Aktivkohle behandelt.

Zur Herstellung von csFBS wurde 1 g Aktivkohle (charcoal, dextran-coated, Sigma) in 50 ml hitzeinaktiviertes FBS gegeben und auf einem Schüttler bei 45 Umdrehungen/min für 12 h bei 4 °C vorsichtig gemischt. Die Hitzeinaktivierung wurde für 30 min bei 56 °C durchgeführt. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 2000 x g für 15 min bei Raumtemperatur, um anschließend den Überstand vollständig abnehmen zu können. Der Überstand wurde einmal mit einem 0.45 µm Filter gefiltert, um letzte Reste der Aktivkohle zu entfernen.

## **2.8 Gewinnung von R-Spondin-1-konditioniertem Medium**

Zur Herstellung des Prostata Mediums wurde R-Spondin-1-konditioniertes Medium benötigt.

Die Rspo1 293T Zelllinie wurde gezielt transfiziert, um R-Spondin 1 der Maus mit einem N-terminalen Hämagglutinin (HA) Epitop-Marker zu bilden (entnommen aus der Produktbeschreibung der Rspo1 293T Zelllinie von Cultrex, Katalognummer 3710-011-K). Zudem ist sie mit einem Maus IgG2a Fc-Fragment am C-terminalen Ende fusioniert. Das R-Spondin mit HA-Tag und IgG2a-Fragment weist eine Gesamtgröße von ca. 70 kDa auf. Dadurch lässt sich das Protein im Weiteren leicht charakterisieren. Das gebildete R-Spondin 1 ist ein 27 kDa großes Protein, welches aktivierend auf den Wnt/beta-Catenin Signalweg wirkt. Darüber kann die Erneuerung von intestinalen, epithelialen Stammzellen gefördert werden. Insbesondere fördert R-Spondin 1 das Überleben von Lgr5+ Stammzellen in Organoidkulturen, welche insbesondere im Gastrointestinaltrakt

ausgeprägt vorkommen (Produktbeschreibung der Rspo1 293T Zelllinie von Cultrex, Katalognummer 3710-011-K).

Die R-Spondin 1-produzierenden Zellen (Cultrex Rspo1 293T Zelllinie) wurden zunächst mit jeweils 10 ml Selektionsmedium in 75 ml Zellkulturflaschen für 5 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Selektionsmedium enthält das Breitbandantibiotikum Zeocin<sup>TM</sup>, welches bei den meisten Zelltypen durch Interkalation in die DNA zum Zelltod führt (Tsukuda and Miyazaki, 2013). Die R-Spondin 1-produzierenden Zellen wurden jedoch transfiziert und tragen eine Zeocin-Resistenz, sodass ausschließlich diese im Selektionsmedium überleben können. Am fünften Tag wurden die Zellen zweimal vorsichtig mit je 6 ml PBS (phosphate buffered saline) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 10 min mit 1.5 ml Accutase von der Flasche gelöst und dann mit 8.5 ml Selektionsmedium aufgefüllt, um die Reaktion zu stoppen. Die Zellsuspension wurde aus der Flasche entnommen, in ein Falcon überführt, für 10 min bei 150 x g zentrifugiert und anschließend in 10 ml neuem Selektionsmedium aufgenommen. Je 5 ml Zellsuspension wurden auf zwei Zellkulturflasche (75 ml) verteilt und mit weiteren 5 ml Selektionsmedium aufgefüllt. Die Zellen wurden dann weiterhin bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

Nach circa zwei Wochen wurden die Zellen gleichermaßen behandelt, allerdings abschließend auf eine dreilagige Zellkulturflasche (600 ml, Nunclon<sup>TM</sup>) verteilt und mit 100 ml Wachstumsmedium aufgefüllt. Die Zellen wurden für weitere 10 Tage ohne Medienwechsel kultiviert. Nach diesen 10 Tagen werden der Überstand und die abgelösten Zellen gänzlich abgenommen, in zwei 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 15 min mit 1000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und gefiltert (0.22 µm), um die restlichen Zellen und Verunreinigungen zu entfernen. Der Gehalt an R-Spondin 1 im konditionierten Medium wurde im weiteren Verlauf mittels Western Blot qualitativ bestimmt. Das hergestellte konditionierte Medium wurde aliquotiert und eingefroren, um weiteres Auftauen und Einfrieren im Wechsel zu vermeiden. Das konditionierte Medium wurde zur Herstellung weiterer Medien aufgetaut und genutzt.

Selektionsmedium:

- DMEM
- 10 % FBS
- 300 µl/ml Zeocin™

Wachstumsmedium:

- DMEM
- 10 % FBS

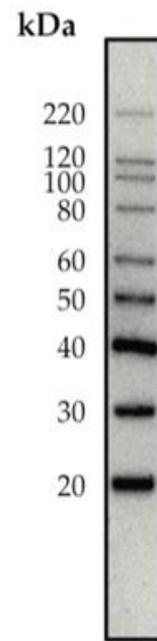
## 2.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Der Gehalt von R-Spondin 1 wurde mittels einer SDS-PAGE (Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) und eines Western Blots qualitativ gesichert. Dazu wurden zunächst die Proteine entsprechend ihrer molekularen Masse aufgetrennt. SDS ist ein negativ geladenes Tensid, das die Eigenladung der Proteine überdeckt. Da es in einem stabilen Verhältnis bindet, ist die Ladung proportional zur molekularen Masse der Proteine. Dementsprechend wird die Auftrennung nicht durch die Eigenladung der Proteine beeinflusst. Für die Gelelektrophorese wurde eine 1 mm Probenkammer mit 10 Taschen genutzt, sowie folgendes Gel:

*Table 4: Zusammensetzungen der verwendeten Gele*

<b>Bestandteile</b>	<b>10% Trenngel</b>	<b>3.9% Sammelgel</b>
30 % Acrylamid / 0.8 % Bisacrylamid	3.4 ml	600 µl
4x Tris-Cl / SDS	2.6 ml (pH 8.8)	1.2 ml (pH 6.8)
ddH <sub>2</sub> O	4.3 ml	2.8 ml
10 % APS	34 µl	23 µl
TEMED	7 µl	5 µl

Das Rspo1-konditionierte Medium wurde mit 6x Ladepuffer unter reduzierenden Bedingungen mit DTT gemischt und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Hierbei trennt DTT die Disulfidbrücken auf. Hiermit soll sichergestellt werden, dass die Auftrennung nicht durch die Proteinfaltung beeinflusst wird. Nach Zentrifugation wurden die Geltaschen mit je 20 µl des Rspo1-konditionierten Mediums in verschiedenen Verdünnungen und 6 µl des Molekulargewichtsmarkers (Magic Mark XP, **Abbildung 5**) beladen. Die Kammer wurde mit 1x SDS-Elektrophorese-Puffer aufgefüllt. Die Elektrophorese wurde für 10 min bei 100 V und 44 mA durchgeführt und anschließend für 60 min bei 125 V und 44 mA.



**Abbildung 5:** Magic Mark™ XP Western Protein Standard (Thermo Fisher Scientific, USA).

#### Ladepuffer (6x):

- 7 ml            4x Tris-HCl/SDS-Puffer (pH 6.8)
- 1 g             SDS
- 0.93 g        DTT
- 1.2 mg        Bromphenolblau
- 3 ml            Glycerol

#### SDS-Elektrophorese-Puffer:

- 75.75 g        Tris Base
- 360.25 g      Glycin
- 25 g            SDS
- 5 l             ddH<sub>2</sub>O

## 2.10 Western Blot

Um die gewünschten Zielproteine zu detektieren, wurde ein Western Blot (Semi-Dry-Blot-System) durchgeführt. Hierzu wurden ein proteinspezifischer Primärantikörper, sowie ein Spezies-spezifischer, mit Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper verwendet. Die Polyvinylidenfluorid (PVDF) - Membran wurde für 10 sec in Methanol aktiviert, für 2 min in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend in CAPS-Puffer (3-Cyclohexylaminopropan-1-sulfonsäure-Puffer, pH 11) für 5 min neutralisiert. Für den Proteintransfer von der Anode hin zur Kathode wurde folgende Schichtung genutzt:

Zwei mit CAPS-Puffer getränkte Filterpapiere

PVDF Membran

SDS-Gel

Zwei mit CAPS-Puffer getränkte Filterpapiere

Der Transfer wurde für 55 min bei 25 V und 150 mA durchgeführt. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurde die Membran anschließend mit 5 % Milchpulver in PBS-T (phosphate-buffered saline - TWEEN 20) für 60 min bei 37 °C geblockt. Die Membran wurde mit dem Primärantikörper, verdünnt in 5 % Milchpulver mit PBS, bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Anschließend wurde die Membran für 10 min in 1x PBS-T, sowie dreimal für 10 min in 1x PBS gewaschen. Nun wurde der Zweitantikörper, verdünnt in 5 % Milchpulver mit PBS, auf die Membran gegeben und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Des Weiteren wurde die Membran erneut mehrfach gewaschen, zunächst mit 1x PBS-T für 10 min und anschließend dreimal mit 1x PBS für 10 min. Abschließend wurde die Detektion der Proteine mit dem Li-COR Premium Chemiluminescent Kit (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA) durchgeführt. Die Visualisierung der Banden erfolgte mit dem C-Digit Blot Scanner. Die verwendeten Antikörper wurden in **Tabelle 3** aufgeführt.

CAPS-Puffer:

- 1.1065 g CAPS
- 500 ml ddH<sub>2</sub>O

PBS-T:

- 0.1 % TWEEN 20 in 1x PBS

## 2.11 Herstellung von humanem Prostatakulturmedium

Vergleichend zu den Organoidkulturen im Organoid-Medium wurden auch Proben mit definiertem Prostatamedium (siehe **Tabelle 5**) angesetzt. Zur Herstellung von Prostatamedium wurde als Grundmedium advanced DMEM/F12 verwendet. Dazu wurden folgende Zusätze gegeben:

*Tabelle 5: Zusätze zur Herstellung von Prostatakulturmedium*

Zusatz	Stammlösung	Anteil/ml Medium
Nicotinamid	1 M in PBS	10 µl
B27 supplement	50 X	20 µl
RSPO1-konditioniertes Medium	-	100 µl
N-Acetyl-L-Cystein	500 mM in PBS	2.5 µl
Dihydrotestosteron	1 µM in Ethanol	1 µl
Noggin	100 µg/ml in PBS + 0.1 % (wt/vol) BSA	1 µl
SB202190	30 mM in DMSO	0.334 µl
A83-01	5 mM in DMSO	0.1 µl
FGF2	50 µg/ml in PBS + 0.1 % (wt/vol) BSA	0.1 µl

FGF10	0.1 mg/ml in PBS + 0.1 % (wt/vol) BSA	0.1 µl
Prostaglandin E2	10 mM in DMSO	0.1 µl
EGF	0.5 mg/ml in PBS + 0.1 % (wt/vol) BSA	0.01 µl
Primocin	50 mg/ml	2 µl
GlutaMax	100 X	10 µl
HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)	1 M	10 µl
Penicillin/Streptomycin	100 U/ml	10 µl

Nach der Zugabe aller Zusätze wurde das Medium steril filtriert (Porengröße 0.22 µm).

## 2.12 Einfrieren von Einzelzellen

Nach dem Einzelzellverdau wurde die verbleibende Zellsuspension für 5 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde sie im Verhältnis 1:1 mit Einfriermedium vermischt. Von der hergestellten Suspension wurden je 1000 µl auf ein Cryovial verteilt. Die Cryovials wurden in einen mit Isopropanol befüllten „Mr. Frosty“ Gefrierbehälter gestellt und auf -80 °C gebracht. Die Abkühlung erfolgte dadurch mit einem Temperaturabfall von 1 °C/min. Nach mindestens 48 h und spätestens einer Woche bei -80 °C wurden Cryovials aus den Gefrierbehältern in flüssigen Stickstoff überführt. Analog konnten auch Einzelzellsuspensionen aus Organoiden nach dem Splitting verwendet und kryokonserviert werden.

### Einfriermedium:

- 20 % DMSO
- 30 % FBS
- 50 % RPMI 1640

## 2.13 Auftauen von Einzelzellen

Zur Nutzung von kryokonservierten Zellen wurden diese zunächst aus dem flüssigen Stickstoff kommend im Wasserbad bei 37 °C schnell aufgetaut, bis nur noch ein kleines Eisstück im Cryovial zu erkennen war. Die gesamte Suspension wurde zügig in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und unmittelbar, tropfenweise mit kaltem Kulturmedium (siehe Kap. 2.5) auf 15 ml aufgefüllt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation mit 150 x g bei 22 °C für 5 min. Das Medium wurde danach vollständig abgenommen und das Pellet erneut mit frischem Kulturmedium resuspendiert. Das weitere Verfahren ist identisch wie jenes zur 3D-Zellkultur einer neuen Gewebeprobe (siehe Kap. 2.6).

## 2.14 Passagieren („Splitting“) von Organoiden

Ab einem Organoiddurchmesser von rund 250 µm wurden die Proben passagiert, d.h. erneut zu Einzelzellen oder kleinen Zellkonglomeraten enzymatisch verdaut. Anschließend wurden die Zellen erneut in BME eingesetzt und inkubiert. Dazu wurden vor dem „Splitting“ zunächst Fotos mithilfe des Axiovert 135-Mikroskop angefertigt und die Größe der Organoide dokumentiert. Anhand der Organoid- und Zelldichte wurde dann das Verhältnis für den „Split“ festgelegt. Zumeist wurden die Zellen aus einem Well auf je 2 bis 3 neue Wells aufgeteilt. Zunächst wurden 100 µl Dispase (1 mg/ml in PBS) pro Well hinzugegeben und für 45 – 60 min bei 37 °C inkubiert. Durch die Auflösung des Matrigels (BME Typ 2) lagen die Organoide wieder gelöst in Suspension vor und wurden im weiteren Verlauf durch mehrfaches, manuelles Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Weiterhin wurde die Zellsuspension aus den Platten in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit serumfreiem Kulturmedium (siehe Kap. 2.5) gewaschen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 150 x g für 5 min. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 1 ml TrypLE express / Well resuspendiert und für 3 - 7 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend

wurde die Suspension erneut mehrfach auf- und abpipettiert. Um den Verdau zu stoppen, wurde das 15 ml Falcon-Röhrchen mit serumhaltigem Kulturmedium auf 15 ml aufgefüllt und erneut bei 150 x g für 5 min zentrifugiert. Das Einsetzen der Zellen in BME erfolgte analog zur vorherigen Methode der 3D-Zellkultur (Kap. 2.6).

### **2.14.1 Variante**

Die oben genannte Methode zur Passagierung wurde ab Probe BLCA #15 durchgeführt. Bei den zuvor durchgeführten Passagen wurde keine Dispase verwendet. Stattdessen wurde 1 ml TrypLE express in jedes Well gegeben und auf- und abpipettiert, um den Dom aus Matrigel abzulösen. Die Platte wurde anschließend 10 – 12 min bei 37 °C inkubiert und alle 3 – 4 min mehrmals auf- und abpipettiert. Danach wurde die Suspension in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt, mit serumhaltigem Kulturmedium auf 15 ml aufgefüllt und erneut bei 150 x g für 5 min zentrifugiert. Das Einsetzen der Zellen in BME erfolgte analog zur vorherigen Methode der 3D-Zellkultur (Kap. 2.6).

## **2.15 Fixieren von Organoiden**

Um die Organoide zu konservieren und für spätere Versuche zu erhalten wurden sie nach dem Erreichen einer ausreichenden Anzahl und Größe mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Dazu wurden unter dem Mikroskop zunächst Fotos der entsprechenden Wells angefertigt. Das Matrigel wurde mit 100 µl Dispase / Well für 60 min bei 37 °C inkubiert und damit aufgelöst. Die Dispase wurde direkt in das bereits enthaltene Medium gegeben. Die abgelösten Organoide wurden gemeinsam in ein Falcon gegeben und dieses mit PBS aufgefüllt. Nach 3 - 5 min setzten sich die Organoide am Boden ab und das PBS wurde abgenommen. Anschließend wurden 2 ml 4 % PFA darauf gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Organoide zu fixieren. Danach wurden sie zweimal mit PBS gewaschen und je 15 min in PBS inkubiert.

Abschließend durchliefen die Organoide eine Alkoholreihe und wurden jeweils 15 min in 2 ml Ethanol (25 %, 50 %, 70 % in H<sub>2</sub>O) dehydratisiert. Die Lagerung erfolgte in 70 % Ethanol bei 4 °C. Hierin konnten die Organoide problemlos für einige Wochen gelagert werden.

## 2.16 Einbetten von Organoiden in Histogel

Um die Organoide für spätere Gefrierschnitte vorzubereiten, wurden sie in einen Tropfen aus Histogel eingebettet. Dazu wurden die in 70 % Ethanol fixierten Organoide dreimal für 30 min in 100 % Ethanol erneut dehydriert. Anschließend wurde das Falcon für 10 sec kurz zentrifugiert und anschließend das Ethanol größtenteils entfernt. Die Organoide wurden mit dem verbleibenden Ethanol in ein Eppendorfgefäß (1.5 ml) überführt und erneut kurz zentrifugiert, um das verbleibende Ethanol mithilfe einer Pipette (10 µl) zu entfernen.

Im Weiteren wurde ein Histogelgefäß (10 ml) in ein Becherglas mit Wasser gestellt, wobei der Deckel über Wasser blieb. Das Becherglas wurde für 30 - 60 sec bei 900 W in die Mikrowelle erhitzt, um das Histogel zu verflüssigen. Wenige Tropfen des flüssigen Histogels wurden anschließend auf die Organoide gegeben, vorsichtig vermischt und unmittelbar wieder in die Pipette aufgenommen. Die Suspension wurde direkt in die Mitte einer Kryoeinbettform gefüllt, ohne dabei die Ränder zu berühren. Zudem wurde der Tropfen mit 1 µl Trypanblau markiert. Kryoeinbettformen (Cryomold, Sakura) sind kleine Kunststoffformen, welche in der Mitte eine kleine Mulde haben, worin Proben für Kryostatschnitte fixiert werden können. Nach 3 - 4 min wurden weitere 300 µl Histogel in die Cryomold gegeben, sodass ein flacher Chip entstand, welcher die Organoide zentral fixiert enthielt. Der Histogel-Chip wurde für mindestens 2 h bei -20 °C gefroren und anschließend senkrecht in eine Aluminiumform (Ø 1 cm) gebracht und die Form daraufhin mit Tissue Tek freezing medium aufgefüllt. Zum Verfestigen wurde die Form auf -20 °C gelagert.

## 2.17 Kryostatschnitte und Immunfluoreszenzfärbung

Zur Charakterisierung wurden malignes Harnblasengewebe und Organoide mithilfe der Immunfluoreszenzfärbung markiert. Dazu mussten aus dem Gewebe und den eingebetteten Organoiden zunächst Gefrierschnitte mit einer Schnittdicke von 7  $\mu\text{m}$  angefertigt werden. Die Schnitte wurden, sofern möglich, zusammenhängend angefertigt. Das bedeutet, dass die Anzahl der verworfenen Schnitte möglichst geringgehalten wurde, um eine hohe Anzahl von Anschnitten und entsprechend Ebenen des jeweiligen Organoids zu erhalten. Die Schnitte wurden im Kryotom bei  $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$  hergestellt und unmittelbar danach auf Objektträger überführt (2 Schnitte / Objektträger). Diese wurden für mindestens 2 h bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

Zur immunologischen Markierung wurden die Schnitte auf dem Objektträger zunächst für 10 min bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  in Methanol fixiert. Anschließend wurden die Objektträger mit Präzisionstüchern abgetrocknet. Die Schnitte wurden nun mit einem „Immuno-Pen“ umkreist und einmal mit PBS gewaschen. Durch das Umkreisen mit dem Immuno-Pen entsteht eine hydrophobe Barriere, welche die Antikörper während der Inkubation nicht verlaufen lässt. Zur Verdünnung der primären Antikörper wurde 0.1 % PBS/BSA genutzt. Für die Einzelfärbungen wurden die Primär-Antikörper 1:100 verdünnt. Für die Doppelfärbungen wurden die Primär-Antikörper 1:200 verdünnt. Die verwendeten Antikörper wurden in der entsprechenden Tabelle aufgeführt (**Tabelle 3**: Liste der verwendeten Antikörper). Pro Schnitt wurden nun 100  $\mu\text{l}$  der Antikörper-Verdünnung auf den Objektträger gegeben und für 60 min in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden alle Antikörper-Lösungen mit einer Pipette sorgfältig abpipettiert. Die Objektträger wurden dreimal für 3 min in PBS auf dem Schüttler vorsichtig gewaschen. Nun wurden die sekundären Antikörper nach dem gleichen Verfahren aufgetragen, inkubiert und gewaschen. Die Fluorochrom-gekoppelten Sekundär-Antikörper wurden im Verhältnis 1:200 in DAPI-Lösung (1:2000 Verdünnung in 0.1 % PBS/BSA) verdünnt. Abschließend wurden die Objektträger mit Präzisionstüchern abgetrocknet und Einbettungsmedium (DAKO) wurde aufgetragen. Unmittelbar danach wurden

Deckgläser luftblasenfrei aufgelegt und die Objektträger bei 4 °C gelagert. Die Antikörper konnten während der Nutzung durchgehend auf Eis und dunkel gelagert werden. Die Objektträger wurden jeweils am Folgetag mithilfe des Fluoreszenzmikroskops fotografiert und mithilfe von Axiovision (Zeiss) analysiert.

## 2.18 Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung ganzer Organoide

Für die Fixierung der Organoide wurde zunächst 250 µl Medium / Well entnommen und 1 ml Splittingmedium / Well hinzugegeben. Anschließend wurde ca. 20x mit einer 1000 µl Pipette auf- und abpipettiert und im Anschluss erneut mit einer 100 µl Pipette. Danach wurden die Zellen in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit 12 ml kaltem Splittingmedium aufgefüllt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 150 x g und 22 °C für 5 min. Der Überstand wurde bis auf das Zellpellet vorsichtig abgenommen. Bei der Verwendung eines *Kammerobjektträgers* (8 Kammern) wurde das Zellpellet anschließend in einer Lösung aus 1160 µl Splittingmedium und 40 µl Matrigel aufgenommen. Somit ergeben sich 150 µl Organoidsuspension / Kammer auf dem Objektträger. Der befüllte Kammerobjektträger wurde nun für 2 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Inkubation wurden 250 µl 4 % PFA in jede Kammer hinzugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur unter dem Abzug inkubiert. Im Anschluss wurden 250 µl / Kammer abgenommen, 250 µl PBS / Kammer vorsichtig aufgetropft und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Waschvorgang wurde zwei weitere Male wiederholt. Danach wurde in jede Kammer 250 µl der Blockierungs- und Permeabilisierungslösung gegeben und für 1 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Blockierung wurde noch ein weiterer Waschvorgang mit PBS durchgeführt und anschließend konnten die Objektträger bei 4 °C gelagert werden.

Splitting Medium:

- Advanced DMEM/F-12
- 1x            HEPES
- 1x            Glutamax
- 100 µg/ml   Primocin

BSA Blockierungs- und Permeabilisierungslösung:

- 5 %            BSA
- 0.25 %       Triton-X-100
- 0.1 %        Tween 20

Zur immunologischen Markierung wurde zunächst das PBS aus den Kammern vollständig abgenommen. Zur Verdünnung der primären Antikörper wurde 1 % BSA/PBS-T (phosphate-buffered saline – TWEEN 20) genutzt. Die Primär-Antikörper wurden 1:200 verdünnt. Einzig der Integrin-β1-Antikörper wurde 1:100 verdünnt. Die verwendeten Antikörper wurden in der entsprechenden Tabelle aufgeführt (**Tabelle 3:** Liste der verwendeten Antikörper). Pro Kammer wurden 100 µl der Antikörper-Verdünnung auf den Objektträger gegeben und für 60 min in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden alle Antikörper-Lösungen mit einer Pipette sorgfältig abpipettiert. Die Objektträger wurden dreimal für 3 min mit 250 µl PBS / Kammer vorsichtig gewaschen. Nun wurden die sekundären AK nach dem gleichen Verfahren aufgetragen, inkubiert und gewaschen. Die Fluorochrom-gekoppelten Sekundär-Antikörper wurden im Verhältnis 1:1000 in DAPI-Lösung (1:1000 Verdünnung in 1 % BSA/PBS-T) verdünnt. Abschließend wurden die Kammern vorsichtig vom Objektträger gelöst, dieser mit Präzisionstüchern abgetrocknet und Einbettungsmedium (DAKO) wurde aufgetragen. Unmittelbar danach wurden Deckgläser luftblasenfrei aufgelegt und die Objektträger bei 4 °C gelagert. Die Antikörper wurden während der Nutzung durchgehend auf Eis und dunkel gelagert. Die Objektträger wurden jeweils am Folgetag mit dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert und mithilfe von Axiovision (Zeiss) analysiert.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Wachstum der Organoide

#### 3.1.1 Übersicht

Insgesamt wurden für die Versuche 32 Gewebeproben gewonnen. Von den 32 Proben konnten 27 verwendet werden. Die übrigen 5 konnten aufgrund von zu geringer Masse oder zu geringer Anzahl von Zellen nicht verwendet werden. Von

**Tabelle 6:** Übersicht aller erfolgreichen Ansätze mit Anzahl der Organoiden, Größe und Wachstumszeitraum

Probe	Organoiden/Well	Größe (µm)	Zeitraum (Wochen)	Organoiden/Well	Größe (µm)	Zeitraum (Wochen)
	Hepatozytenmedium			Prostatamedium		
BLCA #6	>10	100	>2	>10	50	>1
BLCA #8	<5	200	>1	>5	250	>1
BLCA #9	>10	100	>1	-	-	-
BLCA #12	>5	150	>1	>5	200	>1
BLCA #13	<5	50	<1	<5	50	<1
BLCA #15*	>10	300(-1000*)	>4	-	-	-
BLCA #18	<5	200	>3	<5	100	>1
BLCA #20	>5	100	>2	<5	100	>2
BLCA #21	>50	300	>1	>50	200	>2
BLCA #22	>5	300	>2	>5	150	>2
BLCA #24	>5	100	>1	-	-	-
BLCA #25	>5	100	>1	>5	50	<1
BLCA #26	<5	150	>1	>10	300	>2
BLCA #27	-	-	-	<5	50	>1
BLCA #28	-	-	-	<5	100	>2
BLCA #29	>5	150	>1	>10	300	>2
BLCA #31	<5	100	>1	<5	100	>1

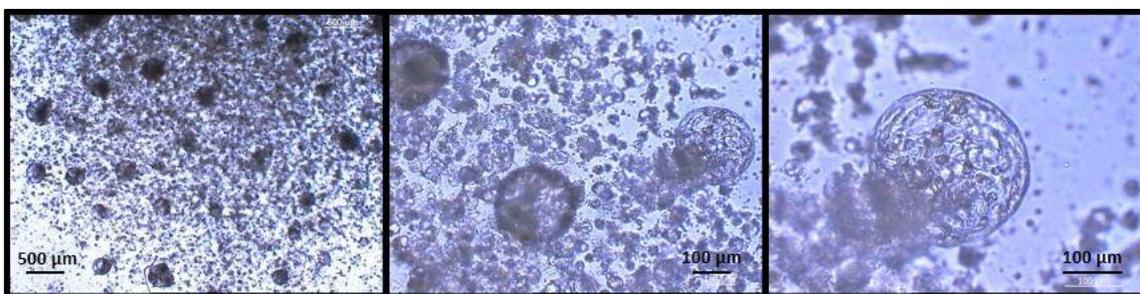
**Anmerkung:** Ansätze, welche mindestens ein Organoid enthielten, wurden als erfolgreich gewertet und in die Tabelle aufgenommen. Die Zellzahl pro Well wurde auf 20.000 normiert, sodass die Anzahl der Organoide jene ist, welche aus 20.000 Zellen gebildet wurde. Die Größe bezieht sich auf den maximalen Durchmesser des größten Organoids aus allen Wells des jeweiligen Ansatzes. Alle Werte wurden in 50er Schritten auf- oder abgerundet. \*BLCA #15, welches Gewebe einer Lymphknotenmetastase eines Blasenkarzinoms war, bildete nach über 4 Wochen Organoidnetze aus, welche einen Durchmesser von über 1000 µm aufwiesen (siehe **Abbildung 22**).

den 27 Proben ergaben 17 ein Organoidwachstum in einem oder beiden der verwendeten Medien. Dies entspricht einer Erfolgsquote von 63 %.

24 der 27 verwendeten Gewebeproben wurden jeweils in zwei Medien kultiviert. Die anderen 3 Proben wurden aufgrund geringer Zellzahlen nur in Hepatozytenmedium kultiviert, sodass sich insgesamt eine Anzahl von 51 Ansätzen ergab. In 29/51 Fällen (57 %) konnte ein Wachstum von Organoiden festgestellt und dieses ausgewertet werden (siehe **Tabelle 6**). Zur vergleichbaren Auswertung wurde das Wachstum der Organoide in regelmäßigen Abständen fotografisch dokumentiert. Dazu wurde das größte Organoid des jeweiligen Ansatzes fotografiert und ausgemessen. Weiterhin wurden Übersichtsaufnahmen angefertigt, um möglichst viele der vorhandenen Zellen und deren Wachstum im Verlauf beobachten und vergleichen zu können. Die Anzahl der Organoide wurde ausgezählt und pro Well angegeben. Da jedes Well zu Beginn 20.000 Zellen enthielt, ist die Anzahl somit normiert worden. Die Wachstumsdauer der Organoide wurde anhand ihres Größenwachstums festgestellt und in Wochen angegeben. Ist ein Organoid für beispielsweise 10 Tage gewachsen und anschließend nicht mehr größer geworden, so wurde die Wachstumsdauer als „>1 Woche“ dokumentiert.

### 3.1.2 Anzahl

Die Anzahl der gebildeten Organoide variierte deutlich. Von allen erfolgreichen Ansätzen enthielten die meisten Proben zwischen 5 und 10 Organoide/Well.



**Abbildung 6:** Probe BLCA #21.

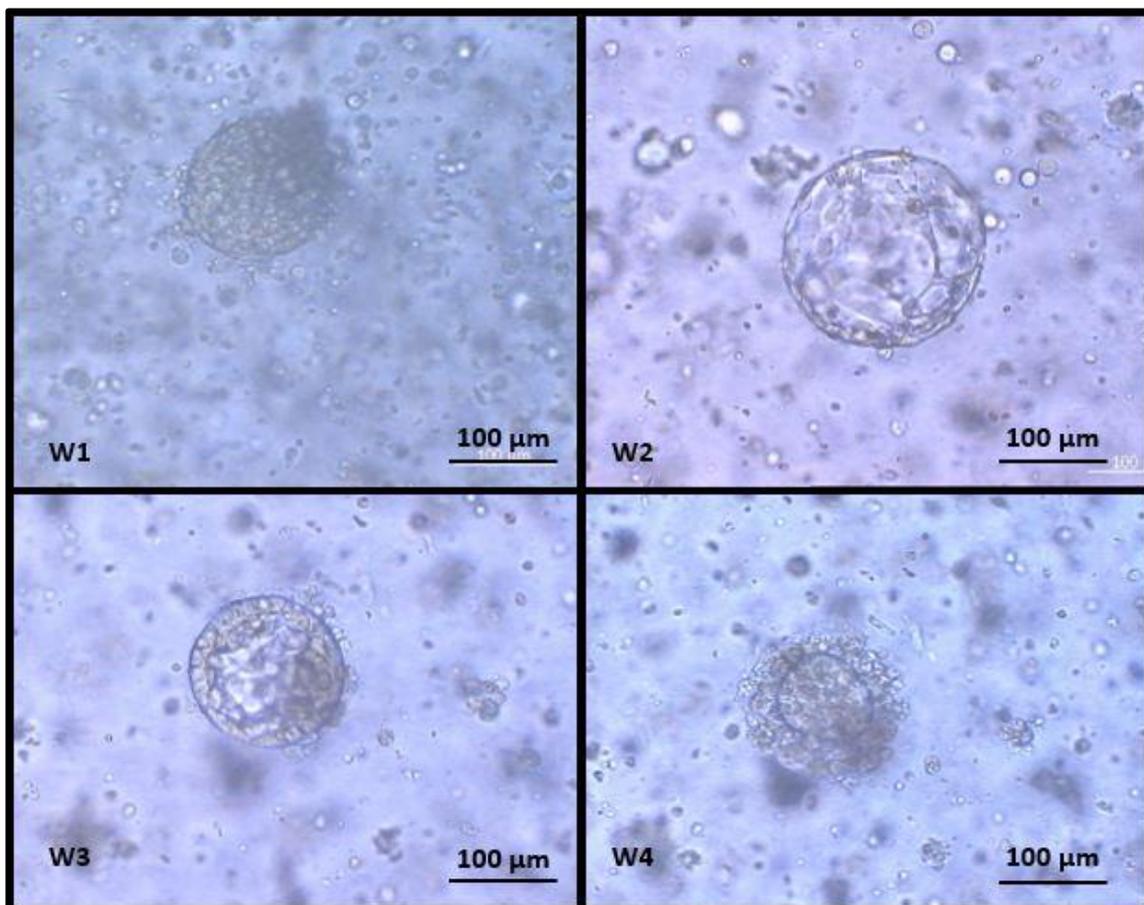
Der Ansatz enthielt an Tag 7 bereits über 50 Organoide/Well, welche eine Größe von bis zu 300 µm aufwiesen. Damit war dies die Probe mit der höchsten Anzahl an Organoiden.

Jedoch zeigten sich auch vereinzelt Ansätze mit nur einem Organoid. Die Probe, welche die meisten Organoiden ergab, erreichte eine Anzahl von über 50 Organoiden/Well (siehe **Abbildung 6**) in beiden Medien.

Insgesamt konnten 8/29 erfolgreichen Ansätzen eine Anzahl von über 10 Organoiden/Well erreichen. Weitere 10 Ansätze erreichten zwischen 5 und 10 Organoiden/Well. Die übrigen 11 Ansätze enthielten unter 5 Organoiden/Well.

### 3.1.3 Größe und Wachstumszeitraum

Die Größe der Organoiden wurde täglich beobachtet und regelmäßig dokumentiert. In den meisten Fällen zeigte sich ein schnelles Wachstum von



**Abbildung 7:** Verlauf von BLCA 22 (Prostatamedium).

*Es ist ein Organoid in Woche 1 – 4 zu erkennen. In Woche 2 erreicht das Organoid seinen maximalen Durchmesser von ca. 150 µm. Ab dann wurde das Größenwachstum eingestellt und die Form weitestgehend beibehalten. Ab Woche 3 sind kleine Abschnürungen am Rand zu erkennen, welche dann in Woche 4 in die Auflösung des Organoids übergehen.*

Organoiden innerhalb der ersten Woche. Zwischen der zweiten und dritten Woche erreichten die Organoide meist ihre maximale Größe und behielten diese für ca. eine Woche bei. Anschließend begannen sie zu schrumpfen und einzelne Zellen lösten sich aus dem Verband heraus, bis sie schließlich komplett zerfielen (siehe **Abbildung 7**). Dies geschah meist ab der vierten Woche. Die durchschnittliche Größe der gemessenen Organoide betrug 150  $\mu\text{m}$ . Die gemessenen Durchmesser aller Ansätze variierten von 50  $\mu\text{m}$  bis 300  $\mu\text{m}$ .

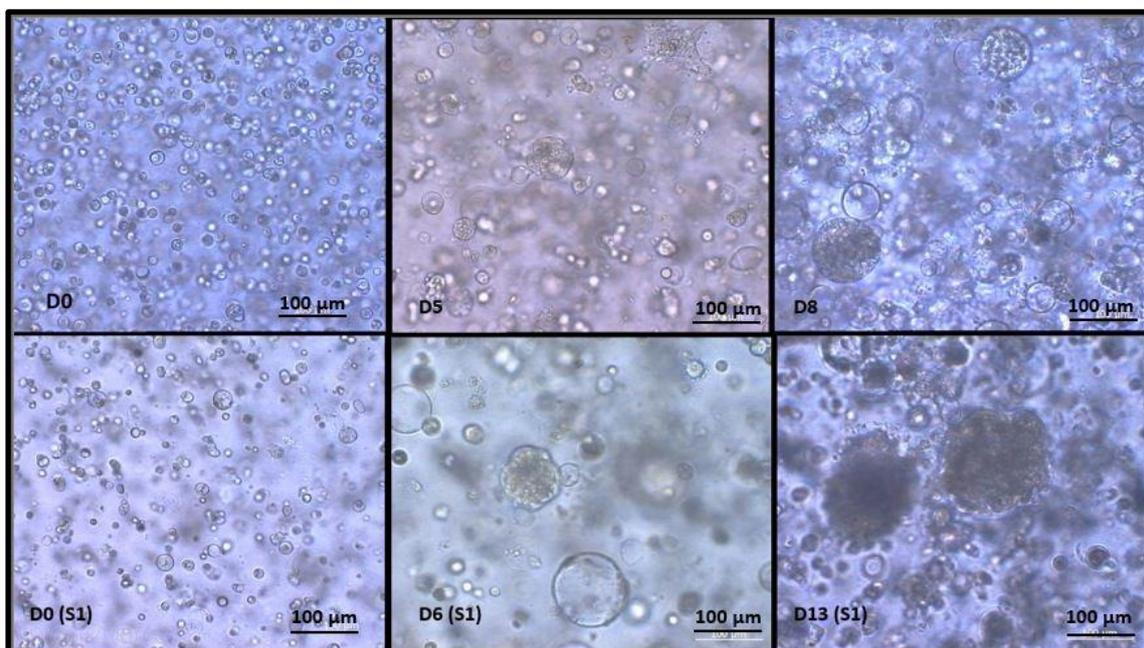
**Tabelle 7:** Übersicht aller erfolgreichen Ansätze, bei welchen eine Passagierung ("Splitting") durchgeführt wurde

Probe	Organoide/Well	Größe ( $\mu\text{m}$ )	Zeitraum (Wochen)	Organoide/Well	Größe ( $\mu\text{m}$ )	Zeitraum (Wochen)
	<b>Hepatozytenmedium</b>			<b>Prostatamedium</b>		
BLCA #8	<5	200	>1	>5	250	>1
BLCA #8 S1	-	-	-	-	-	-
BLCA #9	>10	100	>1	-	-	-
BLCA #9 S1	>10	200	>2			
BLCA #12	>5	150	>1	>5	200	>1
BLCA #12 S1	-	-	-			
BLCA #15*	>10	300 (-1000)	>4	-	-	-
BLCA #15 S1	<5	>1000	>3	-	-	-
BLCA #15 S2	<5	>1000	>3			
BLCA #18	<5	200	>3	<5	100	>1
BLCA #18 S1	-	-	-			
BLCA #21	>50	300	>1	>50	200	>2
BLCA #21 S1	>5	300	>1	<5	300	>2
BLCA #22	>5	300	>2	>5	150	>2
BLCA #22 S1	-	-	-			
BLCA #28 *	Netz	Netz	>2	<5	100	>2
BLCA #28 S1	<5	1000	>1			

**Anmerkung:** Bei 4/8 Proben konnte die Passagierung als erfolgreich gewertet werden, da sich im Verlauf wieder Organoide bildeten. Es ist zu erkennen, dass alle erfolgreichen Ansätze mehr als 10 Organoide/Well enthielten. \* BLCA #28 weicht davon ab. Hierbei handelte es sich um ein aufgetretenes Phänomen, bei dem sich neben Organoiden auch ein großes Netz an Zellen gebildet hatte. Nach der Passagierung bildete sich hieraus dann ein riesiges Organoid, welches weiterhin eine netzartige Struktur aufwies.

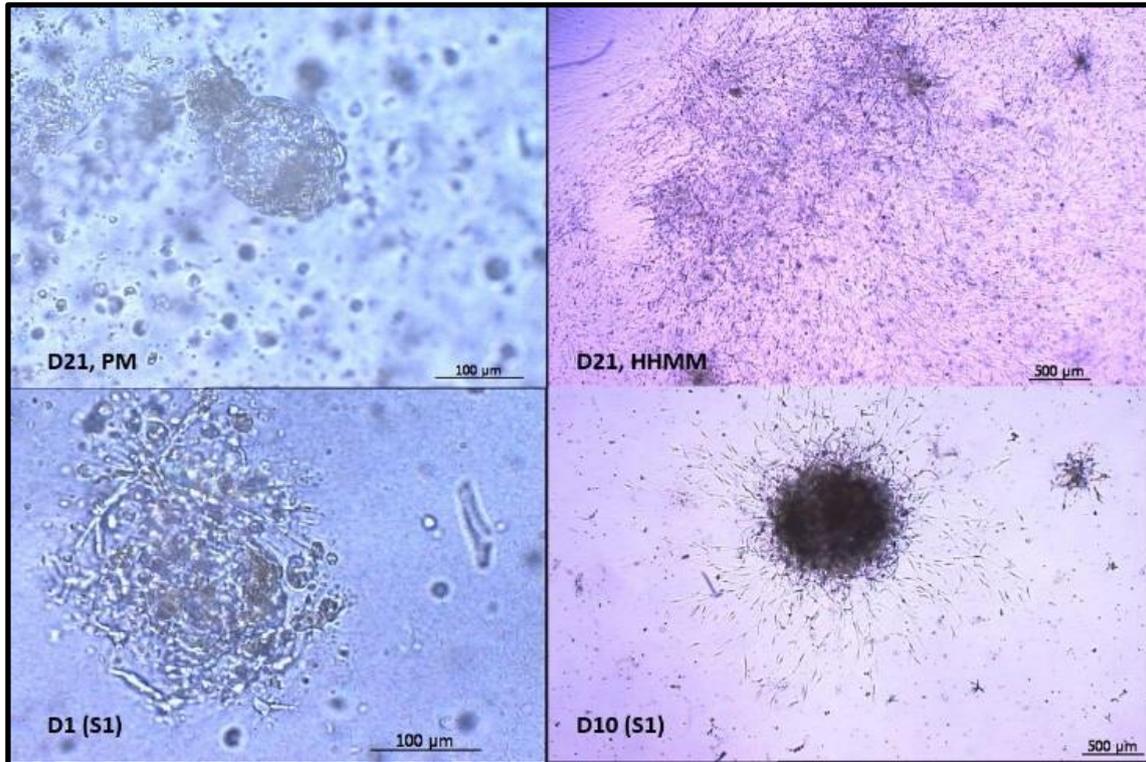
## 3.2 Passagierung

Erreichten die Organoide eine ausreichende Größe und/oder ausreichende Anzahl, so wurde versucht diese zu passagieren. Eine Passage bedeutet hierbei das Verdauen der Organoide zu Einzelzellen und das daraufhin erneute Einbringen der Zellen in Kultur, mit dem Ziel eine größere Anzahl an Organoiden wachsen zu lassen. Dies gelang in 4/8 Ansätzen erfolgreich (siehe **Tabelle 7**). Die Ansätze wurden mit „S“ („Split“), sowie der Passagiestufe bezeichnet, also bspw. „BLCA #8 S1“. Um die Vergleichbarkeit zwischen den Ansätzen besser zu erhalten, wurden alle passagierten Proben in Hepatozytenmedium kultiviert. Bei einer geringen Anzahl von Organoiden wurden auch Ansätze aus Hepatozytenmedium und Prostatamedium gemeinsam passagiert und anschließend im gleichen Medium kultiviert. Auffallend dabei war, dass alle Ansätze, welche eine Anzahl von <10/Well hatten, nicht erfolgreich passagiert werden konnten. Alle Ansätze mit >10/Well waren erfolgreich und bildeten auch nach der Passage wieder Organoide aus (siehe **Abbildung 8**).



**Abbildung 8:** Erfolgreiche Passagierung von BLCA #9.

*In der oberen Zeile ist die Entwicklung des Ansatzes in HCM zu erkennen. Nach 9 Tagen wurden die Organoide passagiert. In der unteren Zeile sind zunächst Einzelzellen an Tag 0, unmittelbar nach der Passage zu erkennen (links). Im weiteren Verlauf entwickelten diese sich erneut zu Organoiden mit einer Größe von bis zu 120 µm im Durchmesser an Tag 13 (rechts).*



**Abbildung 9:** Vergleich von BLCA #28 vor und nach der Passage.

*In der oberen Zeile sind zwei Abbildungen von BLCA #28 unmittelbar vor dem Split an Tag 21 zu erkennen. In PM ist ein Organoid zu erkennen und in HHMM sind große, netzartige Zellverbände zu erkennen. Nach der Passagierung (S1) lässt sich an Tag 1 in der zweiten Zeile links ein netzartiges Organoid erkennen. Dieses entwickelte sich schnell zu einem riesigen Organoid, welches in der unteren Zeile rechts an Tag 10 zu erkennen ist.*

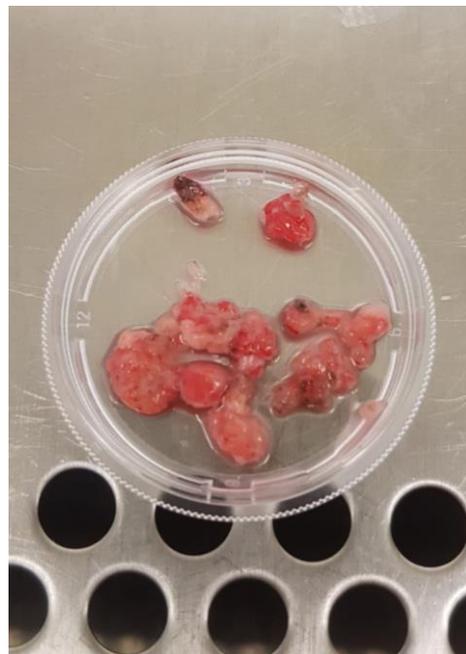
Die einzige Ausnahme hierbei stellt Probe BLCA #28 dar. Dieser Ansatz zeigte in HHMM kein Wachstum von Organoiden, aber dafür große, netzartige Zellverbände. Im PM bildeten sich hingegen Organoide, sodass beide Ansätze gemeinsam passagiert wurden. BLCA #28 S1 bleibt lange Zeit stabil in Kultur und bildete ein riesiges Organoid aus, welches zudem die netzartigen Strukturen beibehielt (siehe **Abbildung 9**). Von den untersuchten Faktoren war die Anzahl der Organoide/Well der wichtigste für eine erfolgreiche Passage. Die Größe machte keinen sichtlichen Unterschied zwischen Erfolg und Misserfolg. Beispielsweise hatten Proben mit Organoiden bis 300 µm Durchmesser und einer Anzahl von unter 10/Well teilweise keinen Erfolg. Demgegenüber konnte z.B. BLCA #9 mit >10 Organoiden/Well und einer maximalen Größe von nur 100 µm erfolgreich passagiert werden. Abschließend ist festzuhalten, dass kein Ansatz nach der Passage eine größere Anzahl an Organoiden entwickelte als davor.

Über den Einfluss des Wachstumszeitraums bis zur Passagierung lässt sich keine eindeutige Aussage treffen, da sich statistisch keine Korrelation zu Erfolg oder Misserfolg herstellen lässt. Jedoch war subjektiv wahrnehmbar, dass die Ansätze, welche innerhalb der ersten zwei Wochen gesplittet wurden, anschließend wieder schneller begonnen haben zu wachsen und auch die umgebenden Einzelzellen ein besseres Wachstum aufwiesen. Zudem ist zu sagen, dass die beiden Ansätze, welche erfolgreich passagiert wurden, ebenfalls innerhalb der ersten beiden Wochen gesplittet wurden. Die anderen beiden erfolgreich passagierten Ansätze waren jene, welche Netze ausgeprägt haben und in Kultur ohnehin länger stabil waren.

### 3.3 Gewebeverdau

#### 3.3.1 Verdau durch Kollagenase (lang)

Um die Gewebeproben zu Einzelzellen zu verdauen wurden sie mithilfe von Kollagenase Typ II enzymatisch verdaut. In den ersten Ansätzen wurde über eine Dauer von 24 h verdaut und anschließend zusätzlich 10 – 12 min mit Trypsin. Von diesen 7 Ansätzen waren 3 erfolgreich. Die Proben hatten alle ein Gewicht zwischen 40 mg und 1000 mg (Mittelwert: 280 mg) und nach dem Verdau eine Gesamtzellzahl zwischen 40.000 und 6.000.000 (Mittelwert: 2.300.000). Da einige Gewebeproben schwarz verfärbte Anteile aufwiesen, die höchstwahrscheinlich durch die Elektroschlinge bei der Entnahme entstanden, wurden die betroffenen Bereiche vor dem Verdau mithilfe eines Skalpell entfernt (siehe **Abbildung 10**).

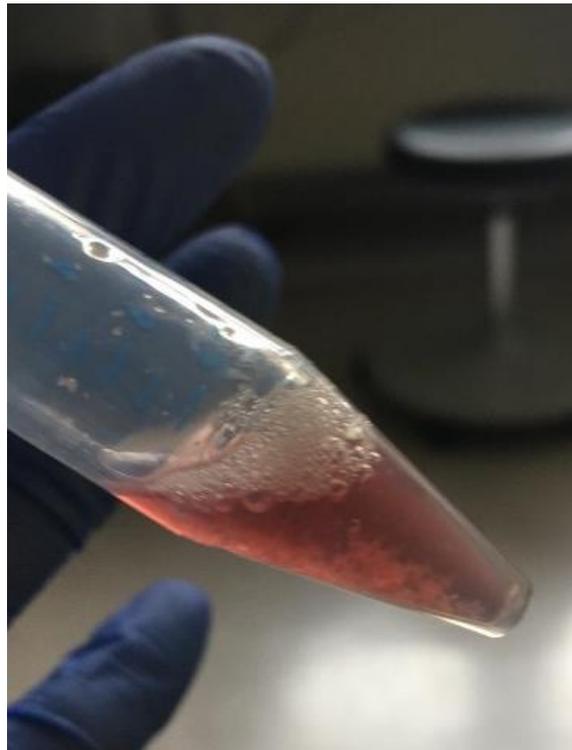


**Abbildung 10:** Gewebeprobe BLCA #25 vor dem Verdau. Es sind schwarz verfärbte Anteile des Gewebes zu erkennen.

Nach dem Einsetzen der Zellen in Matrigel war zu erkennen, dass alle Zellen als Einzelzellen vorlagen. Zudem waren die Ansätze auch nahezu frei von weiteren mikroskopisch sichtbaren Verunreinigungen (siehe **Abbildung 12**).

### 3.3.2 Verdau durch Kollagenase (kurz)

Vergleichend zu dem recht langen Verdau über 24 h wurden die folgenden 7 Gewebeproben lediglich zwischen 60 und 180 Minuten, je nach Größe der Gewebeprobe, mit Kollagenase Typ II verdaut. Der zusätzliche Trypsinverdau wurde hierbei gänzlich weggelassen. Dafür wurden die Proben nach dem Verdau dreimal durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 100 µm gegeben, in welchem sich noch unverdaute Bestandteile der Probe herausfiltern ließen (siehe **Abbildung 11**).

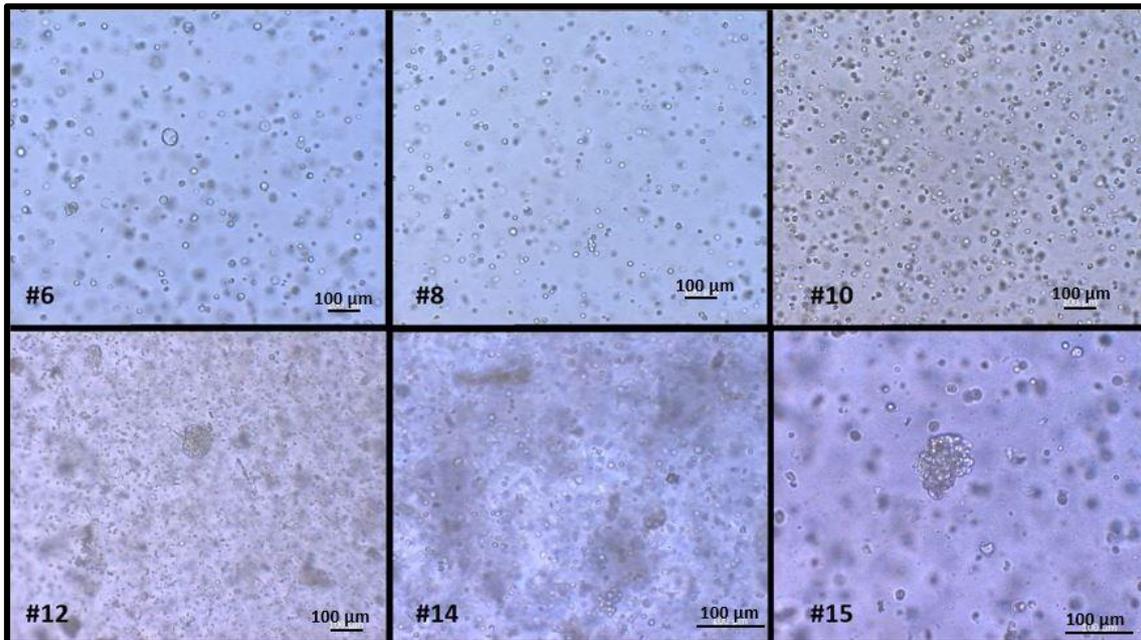


**Abbildung 11:** Probenröhrchen mit Geweberesten nach Kollagenaseverdau.

*Die hier schichtbaren Gewebereste wurden durch die Kollagenase nicht aufgelöst und sind im nächsten Schritt durch dreimaliges Filtern entfernt worden.*

Diese Methode ergab in 4/7 Proben ein erfolgreiches Ergebnis. Die Proben hatten alle ein Gewicht zwischen 14 mg und 880 mg (Mittelwert: 220

mg) und nach dem Verdau eine Gesamtzellzahl zwischen 120.000 und 2.500.000 (Mittelwert: 900.000). Die Zellen lagen hierbei überwiegend als Einzelzellen vor, jedoch waren zusätzlich immer wieder kleine Zellverbände zu erkennen. Die lösten sich auch im weiteren Verlauf nicht auf. Der Hintergrund der Ansätze war oftmals recht trüb und mit einigen Verunreinigungen bedeckt (siehe **Abbildung 12**).



**Abbildung 12:** Vergleichsaufnahmen der Ansätze nach langem und kurzem Kollagenaseverdau.

Die dargestellten Aufnahmen wurden alle innerhalb der ersten 3 Tage nach Kulturbeginn erstellt. In der oberen Zeile sind drei Ansätze zu sehen, welche 24 h mit Kollagenase verdaut wurden. Die Zellen liegen einzeln vor, es gibt wenig sichtbare Verunreinigungen und der Hintergrund ist klar. In der unteren Zeile sind drei Ansätze zu sehen, welche den kurzen Kollagenaseverdau durchliefen. Auch hier sind überwiegend Einzelzellen zu erkennen und zusätzlich kleine Zellverbände. Im Hintergrund sind Verunreinigungen zu erkennen, sowie leichte Trübungen.

### 3.3.3 Verdau durch Kollagenase/Hyaluronidase

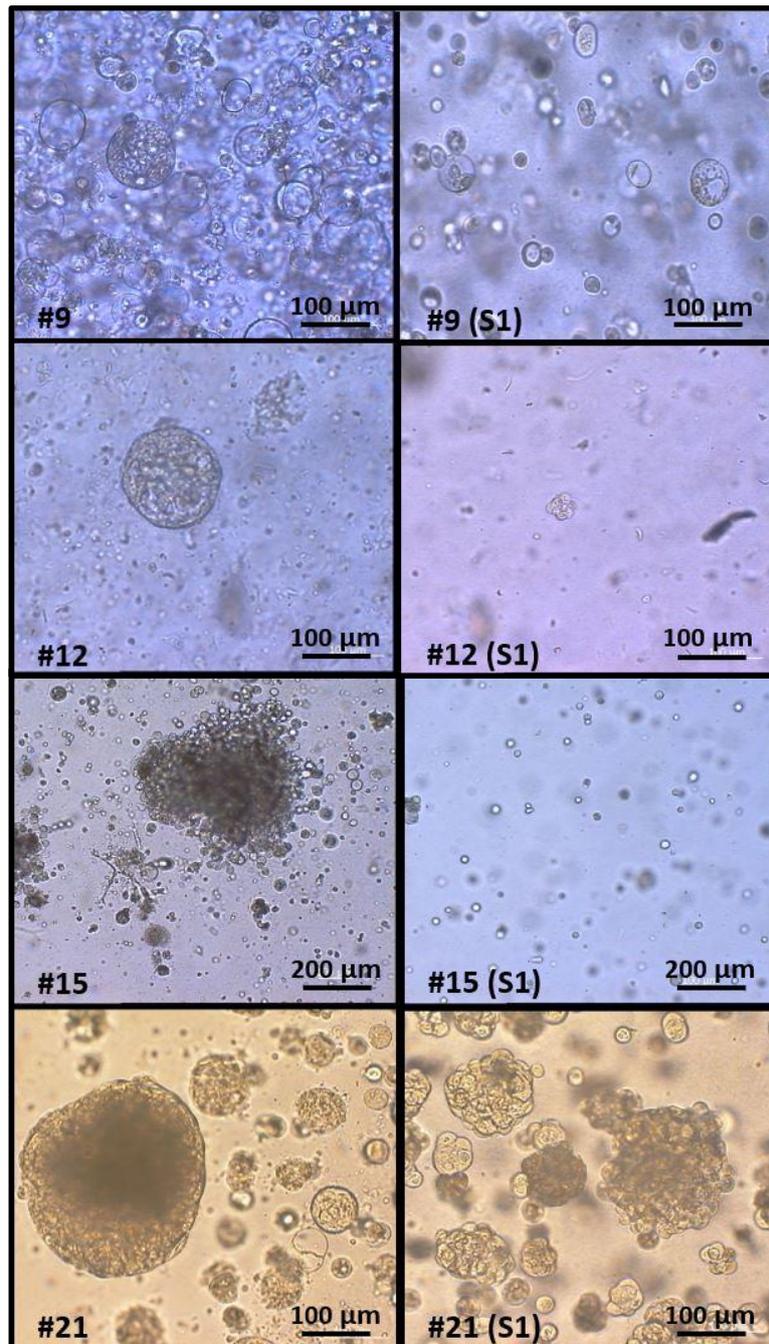
Die zweite Hälfte aller Gewebeproben wurde nicht mit Kollagenase Typ II verdaut, sondern stattdessen mit einem Enzymgemisch aus Kollagenase und Hyaluronidase. Um einen Kompromiss zwischen zu intensivem und zu schwachem Verdau zu erreichen, wurde hierbei für 60 – 180 Minuten verdaut und zudem anschließend für 5 – 8 min ein kurzer Trypsinverdau durchgeführt. Die Proben hatten alle ein Gewicht zwischen 1.2 mg und 600 mg [Mittelwert: 250 mg (ohne Ausreißer BLCA #22: 7600 mg)] und nach dem Verdau eine Gesamtzellzahl zwischen 40.000 und 5.000.000 [Mittelwert: 1.500.000 (ohne Ausreißer BLCA #22: 16.000.000 und BLCA #26: 18.000.000)].

Mit dieser Methode wurde ein deutlich besseres Ergebnis erzielt als zuvor. 10 von 14 Proben (71%) konnten als erfolgreiches gewertet werden. Die 4 erfolglosen Proben waren überwiegend sehr kleine Mengen von unter 80 mg

Gewebe. Alle 10 erfolgreichen Ansätze zeigten ein Größenwachstum für mindestens eine Woche und über 50 % sogar länger als 2 Wochen. Zudem nahm die durchschnittliche Maximalgröße der Organoide von 130  $\mu\text{m}$  (Kollagenaseverdau) auf 155  $\mu\text{m}$  mit dieser Methode zu. Die Anzahl der Organoide pro Well blieb unabhängig von der Verdaumethode relativ gleich.

### 3.3.4 Passagierung

Auch für die Passagierung der Organoide wurden zwei unterschiedliche Methoden angewandt, um diese zu vergleichen und einen möglichen, daraus resultierenden Einfluss des Verdaus auf die Erfolgsquote herauszufinden. Für die Passagierung der ersten 3 Ansätze wurde ein intensiver Verdau mit Trypsin verwendet (siehe 2.14.1). Eine dieser Passagen war erfolgreich. Die folgenden 7 Ansätze wurden dagegen mit Dispase und Trypsin sanfter verdaut (siehe 2.14). Von diesen Passagen waren 5 erfolgreich. Schaut man sich die Kulturen unmittelbar vor und nach der Passagierung an, so lassen sich Unterschiede erkennen (siehe **Abbildung 13**). Nach dem intensiven Verdau lagen nahezu alle Zellen wieder vereinzelt vor, wohingegen bei dem sanften Verdau immer noch kleine Zellverbände zu erkennen waren. Es war auffallend, dass besonders bei Ansätzen mit großen Organoiden ( $>250 \mu\text{m}$ ) auch nach dem sanften Verdau noch einige Organoide erkennbar waren, welche jedoch an ihrer Oberfläche „abgeschilfert“ wirkten. Wo zuvor eine einheitliche, glatte Kontur zu sehen war, wurden anschließend die Konturen von Einzelzellen sichtbar (siehe **Abbildung 13**, rechts unten). So entstand nach dem Verdau oftmals ein Mischbild aus überwiegend Einzelzellen und wenigen, kleinen Organoiden. In den meisten Fällen begannen insbesondere die kleinen Organoide erneut das Größenwachstum und seltener Einzelzellen. Dadurch ergab sich auch die gleichbleibende oder geringere Anzahl an Organoiden nach einer Passage. Eine Ausnahme von dieser Beobachtung stellt Probe BLCA #15 S1 dar. Hier konnte man eine Vereinzelung aller Organoide und Zellnetze durch die Passagierung sehen und ein anschließendes starkes Wachstum von neuen Organoiden aus Einzelzellen beobachten.



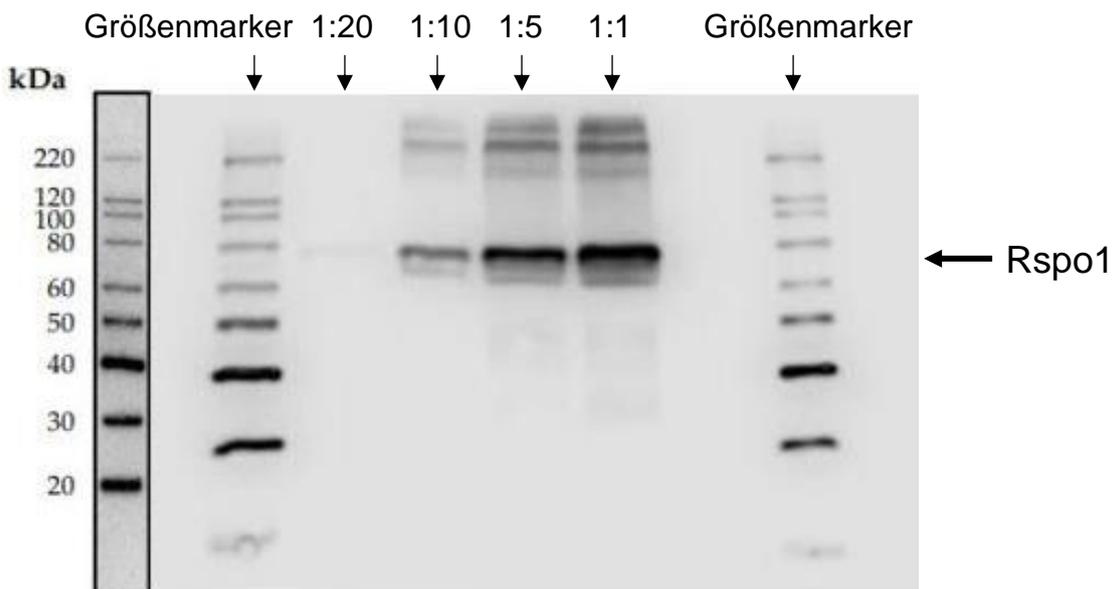
**Abbildung 13:** Vergleich von sanftem und intensivem Verdau bei der Passagierung verschiedener Organoidansätze.

In der linken Spalte sind vier Ansätze aus unterschiedlichen Proben zu erkennen, welche alle Organoide enthalten. Die Aufnahmen wurden alle unmittelbar vor der Passagierung aufgenommen. In der rechten Spalte sind die jeweils zugehörigen Ansätze unmittelbar nach der Passage zu erkennen. BLCA #9 und #12 sind mit der intensiven Methode verdaut worden und BLCA #15 und #21 sind mit der sanften Methode verdaut worden. In der ersten Zeile lässt sich erkennen, wie die vorher vorhandenen Organoide durch den Verdau zu Einzelzellen aufgetrennt wurden. In der zweiten Zeile sieht man nach der Passage einen kleinen verbliebenen Zellverband und nur wenige Einzelzellen. Hier wuchsen auch im Verlauf keine Organoide mehr. In der dritten Zeile ist BLCA #15 zu erkennen, welche durch den sanften Verdau vollständig in Einzelzellen gelöst wurde, welche im Verlauf in der Lage waren, erneut Organoide auszubilden. In der untersten Zeile sind links zahlreiche Organoide mit glatter Kontur zu sehen. Diese wurden durch den Verdau kleiner und lassen an ihrer Oberfläche einzelne Zellen erkennen. Es sind hier sowohl Organoide als auch Einzelzellen zu erkennen.

## 3.4 Medien

### 3.4.1 Western Blot

Das rekombinante R-Spondin 1 (*Rspo1*) konnte in konditionierten Zellkulturüberständen einer entsprechenden Zelllinie gewonnen werden. Zur Detektion von *Rspo1* in den Zellüberständen des konditionierten Mediums wurde eine SDS-Page mit anschließendem Western Blot durchgeführt. Es wurde eine Verdünnungsreihe mit den Verdünnungen 1:20, 1:10, 1:5 und 1:1 durchgeführt. Die Banden sind, wie erwartet, bei 70 kDa zu erkennen und die Intensität der Banden nahm innerhalb der Verdünnungsreihe ab (siehe **Abbildung 14**). Das konditionierte Medium konnte somit für die Erstellung des PM verwendet werden.



**Abbildung 14:** Western Blot zum Nachweis von R-Spondin.

Zu erkennen ist eine Verdünnungsreihe des R-Spondin-1-enthaltenden Mediums mit Verdünnungen von 1:20, 1:10, 1:5 und 1:1. Die beiden äußeren Banden zeigen den Größenmarker Magic Mark XP, welche aus 9 Markern besteht, deren Größen links angegeben sind. Wie unter 2.8 beschrieben weist das R-Spondin mit HA-Tag und IgG2a-Fragment eine Gesamtgröße von ca. 70 kDa auf.

### 3.4.2 Medienvergleich

Für den Vergleich der beiden Kulturmedien ließen sich 12 Proben verwenden. Bei diesen Proben waren beide Ansätze erfolgreich, sodass hier eine Auswertung des Wachstums durchgeführt werden konnte (siehe **Tabelle 8**). Bezogen auf die Anzahl der Organoide zeigte sich bei beiden Medien, dass häufig weniger als 10 Organoide pro Well enthalten waren. In Hepatozytenmedium gab es zudem zwei Ansätze, worin sich mehr als 10 Organoide gebildet haben. In Prostatamedium gab es sogar 4 Ansätze, welche mehr als 10 Organoide beinhalteten. Die Größe hat sich im Vergleich als auffälligster Faktor herausgestellt (siehe **Abbildung 15**).

Sie unterschied sich in 9/12 Proben voneinander. In HHMM bildeten sich in 5 Fällen größere Organoide aus und entsprechend umgekehrt konnte man in 4 Fällen größere Organoide im PM finden.

**Tabelle 8:** Vergleich der erfolgreichen Ansätze in Bezug auf das Wachstum in zwei unterschiedlichen Medien

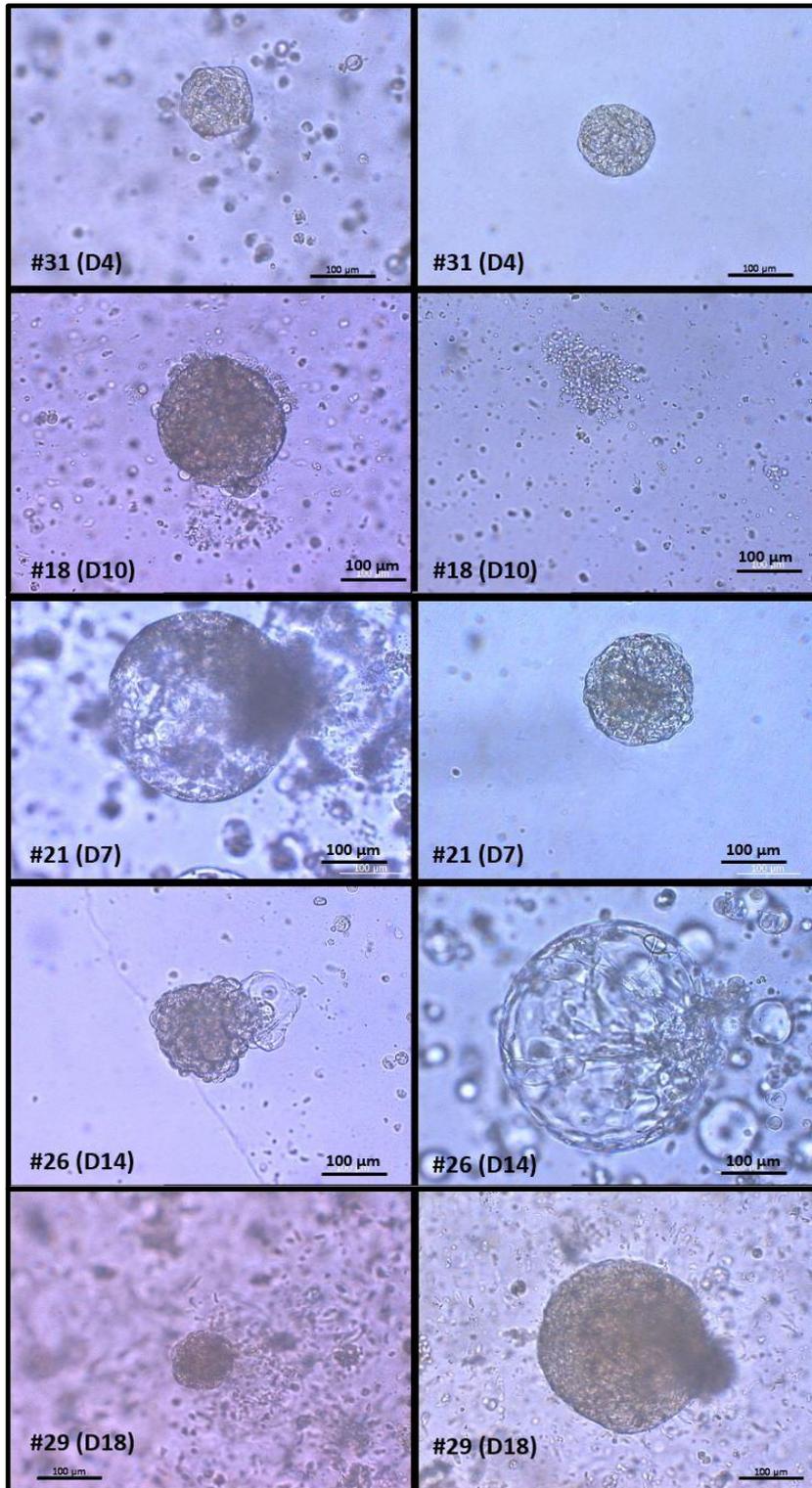
Probe	Organoide/Well	Größe (µm)	Zeitraum (Wochen)	Organoide/Well	Größe (µm)	Zeitraum (Wochen)
	Hepatozytenmedium			Prostatamedium		
BLCA #6	>10	100	>2	>10	50	>1
BLCA #8	<5	200	>1	>5	250	>1
BLCA #12	>5	150	>1	>5	200	>1
BLCA #13	<5	50	<1	<5	50	<1
BLCA #18	<5	200	>3	<5	100	>1
BLCA #20	>5	100	>2	<5	100	>2
BLCA #21	>50	300	>1	>50	200	>2
BLCA #22	>5	300	>2	>5	150	>2
BLCA #25	>5	100	>1	>5	50	<1
BLCA #26	<5	150	<2	>10	300	>2
BLCA #29	>5	150	>1	>10	300	>2
BLCA #31	<5	100	>1	<5	100	>1

**Anmerkung:** Es ist zu erkennen, dass die Proben entweder in beiden Medien gleich gewachsen sind (2/12 Proben, rot markiert) oder, dass die Proben in einem Medium mit größerer Anzahl und größerem Maximaldurchmesser gewachsen sind (10/12). Die grün-gefärbten Werte sind diejenigen, die im Vergleich beider Ansätze die besseren Ergebnisse erzielten. Da der Wachstumszeitraum in Korrelation zu der Größe gesehen werden muss, lassen sich die Ergebnisse nicht unmittelbar als „besser“ oder „schlechter“ bewerten. Die Proben BLCA #13 und #31 weisen in den bewerteten Kriterien keinerlei Unterschiede zwischen beiden Medien auf.

Bis auf die Probe BLCA #21, korrelierte die Größe der Organoide mit deren Wachstumsdauer in allen Fällen. Das bedeutet, dass im Medium, in dem die jeweiligen Ansätze besser gewachsen sind, zwar kein schnelleres, jedoch ein längeres und konstanteres Wachstum zu sehen war, wodurch die Organoide letztlich auch einen größeren Maximaldurchmesser erreichten. Bei BLCA #21 besteht in dieser Beziehung eine gegenläufige Korrelation. Die Probe ist in HHMM besser gewachsen als in PM und erreichte dort eine Maximalgröße von 300 µm innerhalb von 8 Tagen. Im PM benötigte die Probe für eine Maximalgröße von 200 µm hingegen über 2 Wochen. Insgesamt zeigte sich kein kontinuierlicher Unterschied zwischen den Kulturen beider Medien. Es lässt sich jedoch erkennen, dass die Proben meist in einem der Medien besser wachsen. Nur selten sind die Ergebnisse in beiden Ansätzen gleich.

## Hepatozytenmedium

## Prostatamedium



**Abbildung 15:** Gegenüberstellung von erfolgreichen Ansätzen in Hepatozytenmedium und Prostatamedium.

Jede Zeile zeigt eine Gewebeprobe, welche sowohl in HHMM (links) als auch in PM (rechts) Organoide ausgebildet hat. Die Aufnahmen wurden jeweils zum gleichen Zeitpunkt erstellt und zeigen das größte Organoid aus dem jeweiligen Ansatz zum genannten Zeitpunkt.

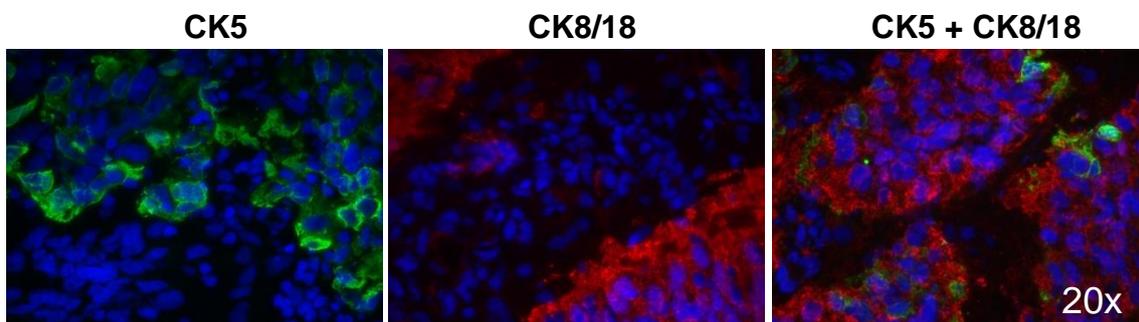
In der ersten Zeile ist eine Probe zu erkennen, welche in beiden Medien die gleichen Wachstumseigenschaften gezeigt hat. Auf beiden Aufnahmen ist ein ca. 100 µm großes Organoid an Tag 4 zu sehen, welches auch morphologisch nahezu gleich aussieht. In Zeile zwei ist der Unterschied zwischen den Aufnahmen deutlich zu erkennen. Während in HHMM an Tag 10 ein großes Organoid zu erkennen ist, hat sich in PM ein zuvor ca. 100 µm großes Organoid bereits aufgelöst. Zu erkennen sind nur noch die verbliebenen Zellreste. In der dritten Zeile sind zwei morphologisch ähnliche Organoide zu sehen. Jedoch fällt auf, dass das Organoid in HHMM ungefähr den doppelten Durchmesser des Organoids in PM aufweist und zudem im Hintergrund ein deutlich stärkeres Wachstum der umliegenden Zellen sichtbar ist. In der vierten Zeile ist BLCA #26 an Tag 14 zu sehen. Nun ist ein deutlich besseres Wachstum in PM Medium zu erkennen. Das Organoid ist

doppelt so groß wie sein Pendant in HHMM. Auch hier lässt sich im Hintergrund ein sichtlich besseres Wachstum weiterer Zellen erahnen. In der untersten Zeile ist ein Organoid an Tag 18 zu sehen, welches in Prostatamedium eine Größe von rund 300 µm erreichen konnte, während in HHMM ein bedeutend kleineres Organoid gewachsen ist. Im Hintergrund sind bei beiden Aufnahmen schon relativ wenig verbliebene Zellen zu erkennen, was sich oftmals als verlässlicher Indikator für die beginnende Auflösung der Organoide herausstellte.

## 3.5 Immunfluoreszenzfärbungen

### 3.5.1 Gewebeschnitte

Zum Vergleich von Expressionsmustern bestimmter Cytokeratine in malignem Harnblasengewebe mit jenen in Blasenorganoiden wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Die Gewebeschnitte der Probe BLCA #22 wurden mit Antikörpern gegen Cytokeratin 5 (CK5) und Cytokeratin 8/18 (CK8/18) markiert, um das Vorliegen von Zellen des basalen und des luminalen Subtyps nachzuweisen (siehe **Abbildung 16**). Zur Färbung der Zellkerne wurde in allen Aufnahmen DAPI verwendet. Anhand der Markierung war zu erkennen, dass unterschiedliche Zelltypen in der Gewebeprobe vorhanden waren, welche überwiegend gruppiert vorlagen. Nur selten fanden sich isolierte Zellen eines Subtyps. In der Doppelfärbung waren keine Überlagerungen zu erkennen, sodass sich praktisch jede markierte Zelle einem bestimmten Subtyp zuordnen ließ.



**Abbildung 16:** Immunfluoreszenzfärbungen von Gewebeschnitten aus BLCA #22.

*Es ist in allen Aufnahmen zu erkennen, dass im markierten Gewebe unterschiedliche Zelltypen vorhanden sind. Bestimmte Bereiche ließen sich mit CK5 oder mit CK8/18 markieren. In der Doppelfärbung (rechtes Bild) zeigt sich, dass keine Überlagerungen entstanden sind. Als Fluorochrom-gekoppelte Zweitantikörper wurden Alexa488 ( $\alpha$ -Kaninchen-AK, grün) und Cy3 ( $\alpha$ -Maus-AK, rot) verwendet. Die Bilder wurden mit dem 20x Objektiv aufgenommen. Zur Färbung der Zellkerne wurde in diesen und allen folgenden Aufnahmen DAPI verwendet.*

### 3.5.2 Organoidschnitte

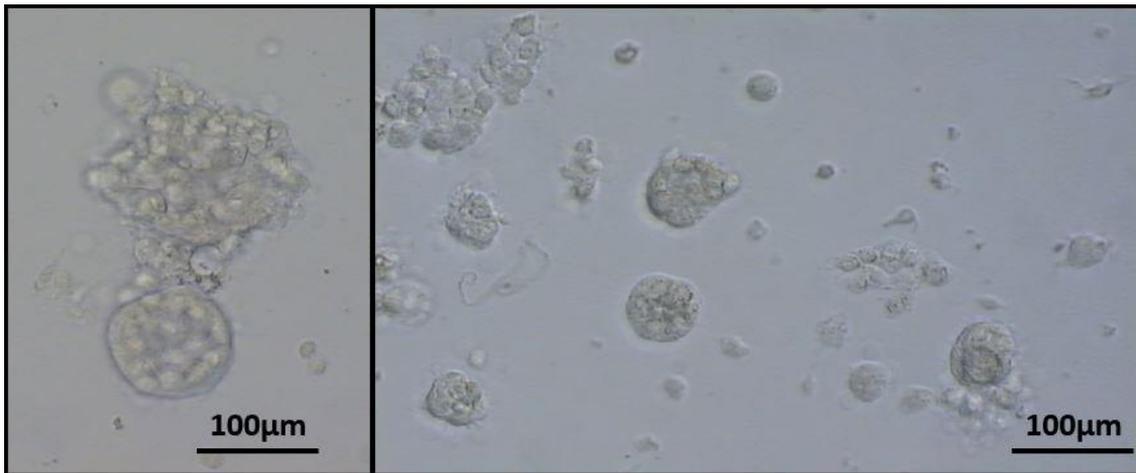
Zur besseren Beurteilung der Organoide wurden diese ebenfalls mittels Immunfluoreszenzfärbung markiert. In der ersten Versuchsreihe wurden hierfür die fixierten Gefrierschnitte verwendet. Es zeigte sich bei mehrfacher

Durchführung immer wieder ein deutliches Signal in den Negativkontrollen, die nur mit den Fluorochrom-gekoppelten Zweitantikörpern markiert worden waren, sodass die Aufnahmen nicht verwendet werden konnten. Nach jetzigem Kenntnisstand ist dies eine beobachtete Problematik nach Einbettung der Organoide in Histogel. Es lagen keinerlei eigene Vorerfahrungen zu der Färbungsmethode mit Histogel vor, sodass dieses Phänomen nicht abzusehen war.

Alternativ zu dieser Methode wurden in einer zweiten Versuchsreihe zu einem späteren Zeitpunkt Immunfluoreszenzfärbungen ganzer Organoide mithilfe einer anderen Methode durchgeführt, welche ohne Nutzung von Histogel umgesetzt werden konnte. Die dafür verwendeten Organoide entstammen einer Zelllinie (BCO #56), welche nicht im Zeitraum der zuvor genannten Proben kultiviert wurde. Dennoch wurden die identischen, in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Methoden und Kultivierungsbedingungen zur Generierung von Harnblasenorganoiden verwendet, sodass diese Organoide als gleichwertig zu betrachten sind.

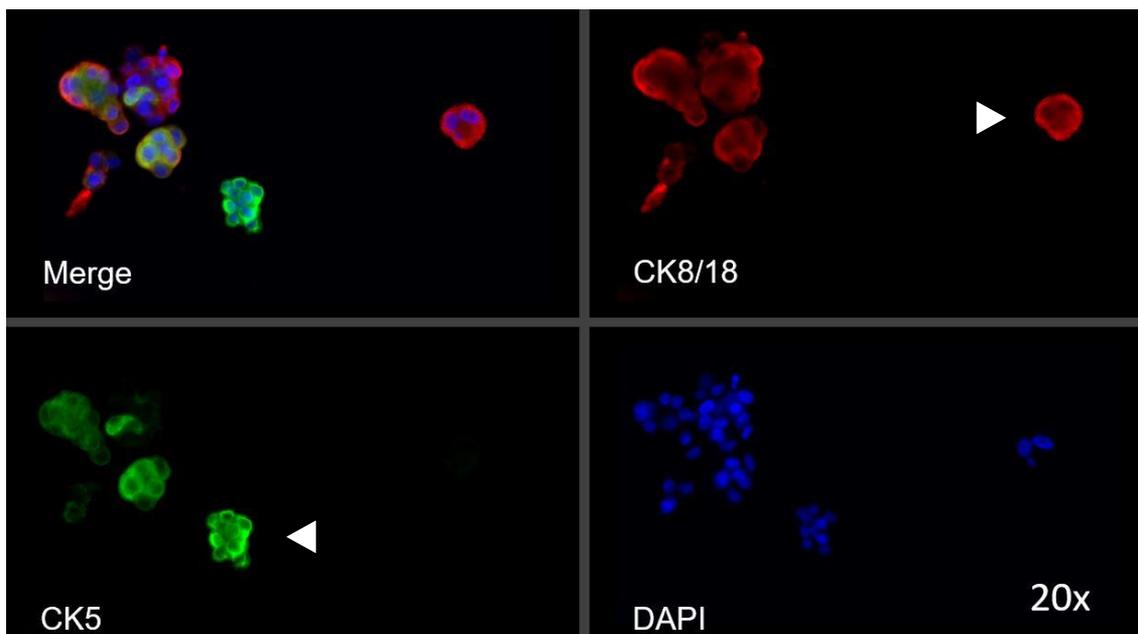
### 3.5.3 Ganze Organoide

Die gezeigten Organoide wurden in Passage 14 fixiert und anschließend für die Immunfluoreszenzfärbungen genutzt. Zu diesem Zeitpunkt waren zahlreiche Organoide mit einer Größe zwischen 50  $\mu\text{m}$  und 150  $\mu\text{m}$  vorhanden (siehe **Abbildung 17**). Wie auch die Gewebeschnitte wurden die Organoide zunächst mit den Antikörpern für basale und luminale Zellen markiert. Dabei zeigte sich, dass einige Organoide ausschließlich aus Zellen vom basalen Subtyp und andere ausschließlich aus Zellen vom luminalen Subtyp aufgebaut sind (siehe **Abbildung 18**). Der überwiegende Anteil der Organoide zeigte jedoch ein Mischbild von luminalen und basalen Zellen (siehe **Abbildung 19**). Insgesamt überwog der Anteil der basalen Zellen in dieser Gewebeprobe.



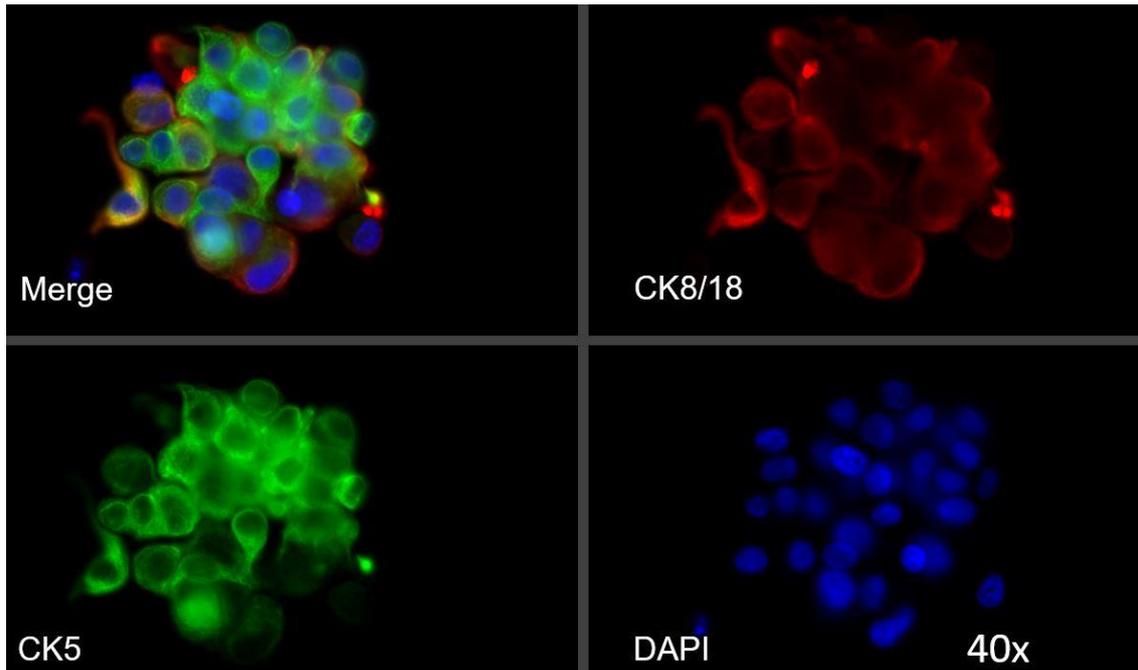
**Abbildung 17:** Organoide von BCO #56 unmittelbar vor der Fixierung.

In den beiden Aufnahmen sind zahlreiche Organoide zu erkennen, die einen Durchmesser von 50 – 150 µm aufweisen.



**Abbildung 18:** Immunfluoreszenzfärbungen von CK5 (basal) und CK8/18 (luminal) in Organoiden aus BCO #56.

Die Aufnahme wurde mit einem 20x Objektiv aufgenommen und zeigt 5 Organoide. Eins davon konnte nur mit dem CK5-Antikörper markiert werden (grün, Pfeilkopf). Ein weiteres konnte nur mit dem CK8/18-Antikörper markiert werden (rot, Pfeilkopf). Drei Organoide zeigen ein Signal bei beiden Antikörpern.

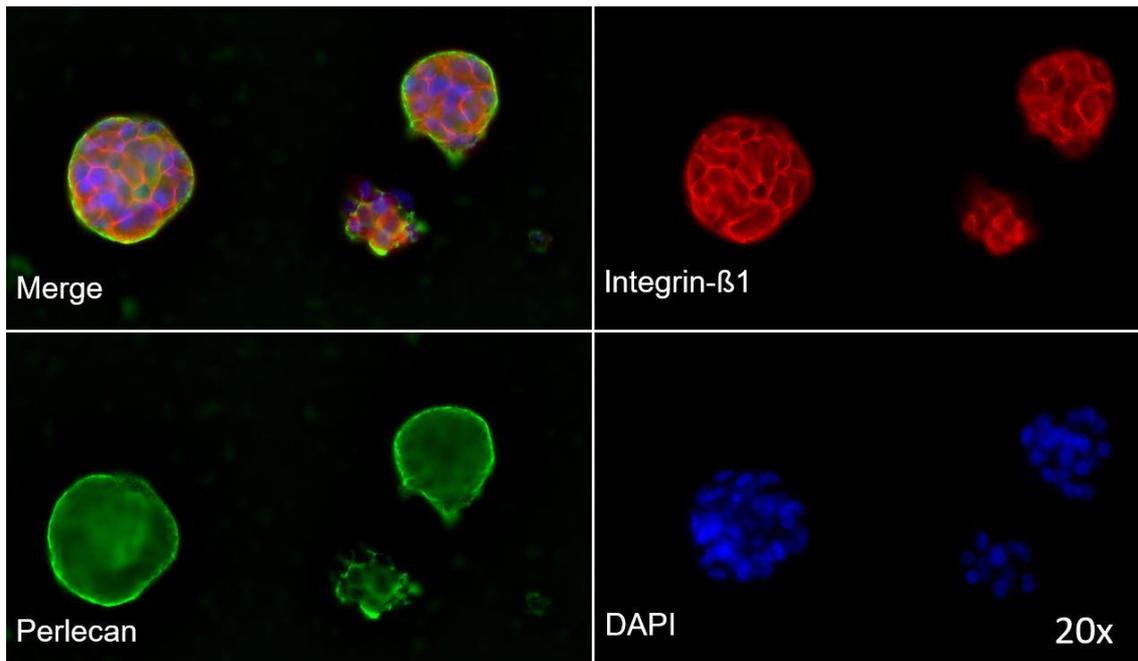


**Abbildung 19:** Organoid mit basalen **und** luminalen Zelltypen.

Die Aufnahme zeigt ein Organoid vom „blumenkohlartigen“ Typ, welches sowohl Signale für basale als auch luminale Marker zeigt. Es wurde ein 40x Objektiv verwendet.

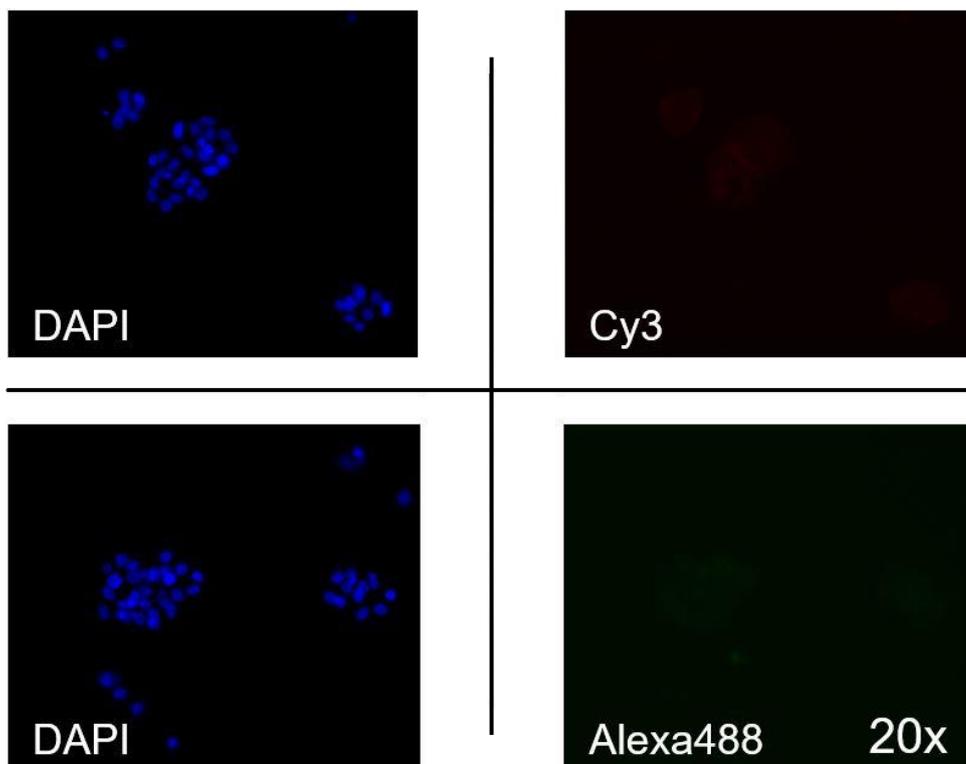
Um zu zeigen, dass die Organoide auch eine Basalmembran und stabile Zell-Zell-Kontakte ausbilden, wurden zudem Markierungen der Basalmembran (*Perlecan-AK*) und des Zelladhäsionsmoleküls *Integrin-β1* durchgeführt. Es konnte eine Basalmembran am äußeren Rand der Organoide gezeigt werden (siehe **Abbildung 20**) und auch eine Ausprägung von Zelladhäsionsmolekülen innerhalb der Organoide ließ sich darstellen. Unabhängig vom Subtyp prägte sich bei nahezu allen Organoiden eine gleichartige Morphologie in Bezug auf die markierten Proteine aus. Einige der Organoide zeigten auch die bereits bekannte „blumenkohlartige“ Form. Diese wiesen in den meisten Fällen eine eher diskontinuierliche Basalmembran auf, die oftmals ein schwächeres Signal bot als bei den kontinuierlichen Basalmembranen. *Integrin-β1* hingegen war in allen Organoiden gleichermaßen deutlich zu finden.

Die Negativkontrollen beider Sekundär-Antikörper waren negativ und zeigten keinerlei Signal in den entsprechenden Färbungen (siehe **Abbildung 21**).



**Abbildung 20:** Immunfluoreszenzfärbungen der Basalmembran und Integrin- $\beta$ 1.

Diese Aufnahme zeigt drei Organoide. Insbesondere bei den beiden größeren Organoiden lässt sich eine Basalmembran im Außenbereich jeweils deutlich erkennen. Zudem weisen alle drei Organoide Signale von Integrin- $\beta$ 1 im gesamten Organoid auf. Als Fluorochrom-gekoppelte Zweitantikörper wurden Alexa488 (grün) und Cy3 (rot) verwendet. Die Bilder wurden mit einem 20x Objektiv aufgenommen.



**Abbildung 21:** Negativkontrollen der Sekundär-Antikörper Cy3 (oben) und Alexa488 (unten).

In beiden Kontrollen ließen sich keine spezifischen Signale erkennen. Die Aufnahmen wurden mit einem 20x Objektiv erstellt.

## 3.6 Einflussfaktoren der Patienten

### 3.6.1 Geschlecht

Von allen erhaltenen Proben wurden 4 von weiblichen Patienten und die übrigen 28 Proben von männlichen Patienten entnommen. Von den Gewebeproben der weiblichen Patienten führten 5/8 Ansätzen in den beiden Kulturmedien zu einem erfolgreichen Ergebnis. Zwischen den Medien zeigten sich nur bei Probe #27 Unterschiede im Wachstum. Hier wuchs der Ansatz in PM besser als jener in HHMM. Weitere Unterschiede in den untersuchten Parametern ließen sich nicht nachweisen. Von den Proben der männlichen Patienten führten 24/43 zu einem erfolgreichen Ergebnis. Auch hier ließen sich keine signifikanten Unterschiede in den untersuchten Parametern nachweisen.

### 3.6.2 Tumorstadium und Grading

Bei allen Operationen wurden zur Diagnostik Gewebeproben entnommen und histopathologisch untersucht, um das Stadium und den Differenzierungsgrad (Grading) der Tumoren festzustellen.

Die Differenzierung der Zellen wurde bei der Auswertung in low-grade und high-grade eingeteilt. Bei 2 Proben wurde kein Grading durchgeführt und 3 Proben stellten sich als benigne heraus, sodass diese für die Auswertung des Gradings nicht verwendet wurden. Es zeigte sich, dass deutlich mehr low-grade Tumoren zu erfolgreichen Ansätzen führten als high-grade Tumoren (siehe **Tabelle 9**).

**Tabelle 9:** Verteilung von Erfolgen und Misserfolgen bei Proben aus low- und high-grade Tumoren

Differenzierung	Erfolg	Misserfolg
Low grade (G1 – G2)	9	1
High grade (G2 – G3)	7	5

**Anmerkung:** Bei 22 der eingesetzten Proben wurde ein pathohistologisches Grading durchgeführt. Hier ist zu erkennen, dass 9/10 der low-grade Tumoren ein erfolgreiches Ergebnis ergaben und hingegen nur 7/12 der high-grade Tumoren.

90 % der low-grade Tumoren zeigten Organoidbildung in Kultur. 4/9 der erfolgreichen Proben wurden mit Kollagenase verdaut. Die übrigen 5 Proben wurden mit Kollagenase/Hyaluronidase verdaut, sodass ein Einfluss der Verdau-Methode nicht ausschlaggebend zu sein schien. Aus den high-grade Tumoren wuchsen nur in 58 % der Proben Organoide.

In Bezug auf die TNM-Stadien der verwendeten Tumoren zeigten sich ebenfalls ausgeprägte Unterschiede im Hinblick auf die Erfolgsquote der Proben. 52 % der erhaltenen Tumorproben entstammen aus papillären Tumoren (Ta) und wiesen die mit Abstand höchste Erfolgsquote von 79 % auf (siehe **Tabelle 10**). Insgesamt hatten Proben aus nicht-muskelinvasiven Tumoren (Ta, Tis und T1) eine Erfolgsquote von 75 %. Muskelinvasive Tumoren (T2 und höher) hatten hingegen eine deutlich niedrigere Erfolgsquote von nur 25 %. Bei der histopathologischen Untersuchung stellten sich zudem 3 Proben als gutartig heraus, wovon eine Probe erfolgreich war.

**Tabelle 10:** Verteilung von Erfolgen und Misserfolgen gegliedert nach Stadium der Tumoren

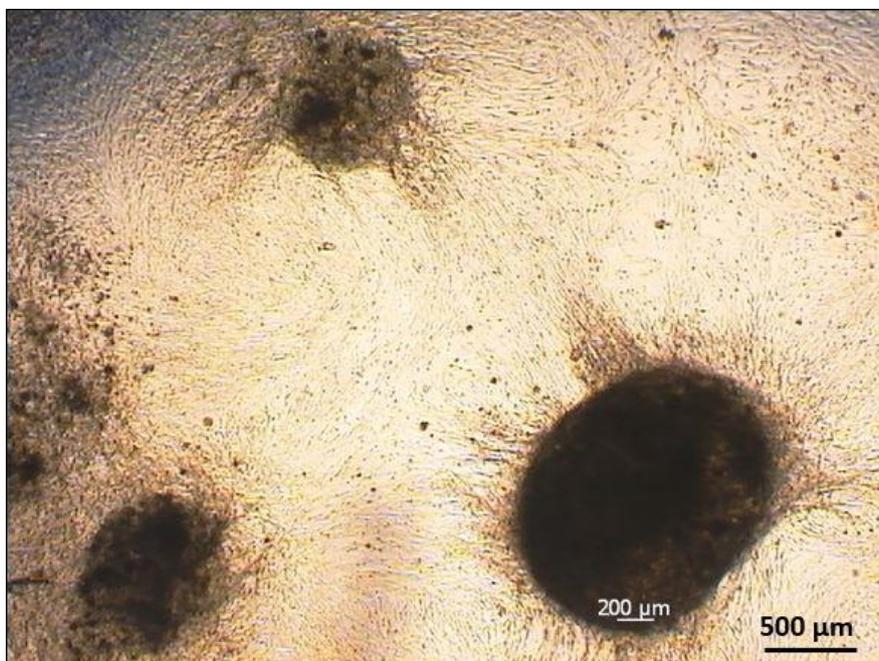
TNM-Stadium	Erfolg	Misserfolg
Ta	11	3
Tis	1	0
T1	3	2
T2 und höher	1	3
Benigne	1	2

**Anmerkung:** Alle eingesetzten Tumorproben wurden histopathologisch untersucht und nach TNM-Klassifikation eingestuft. Die meisten Proben (14/27) entstammen aus papillären Tumoren (Ta) und hatten eine Erfolgsquote von 79%. Eine Probe eines Carcinoma in situ (Tis) konnte ebenfalls kultiviert werden und war erfolgreich. Weiterhin waren 3/5 Proben aus T1-Tumoren erfolgreich. Muskelinvasive Tumoren (T2 und höher) bildeten nur in 1/4 Fällen Organoide. Zudem stellten sich 3 Proben bei der histologischen Untersuchung als benigne heraus. Eine dieser Proben bildete ebenfalls Organoide.

## 3.7 Phänomene

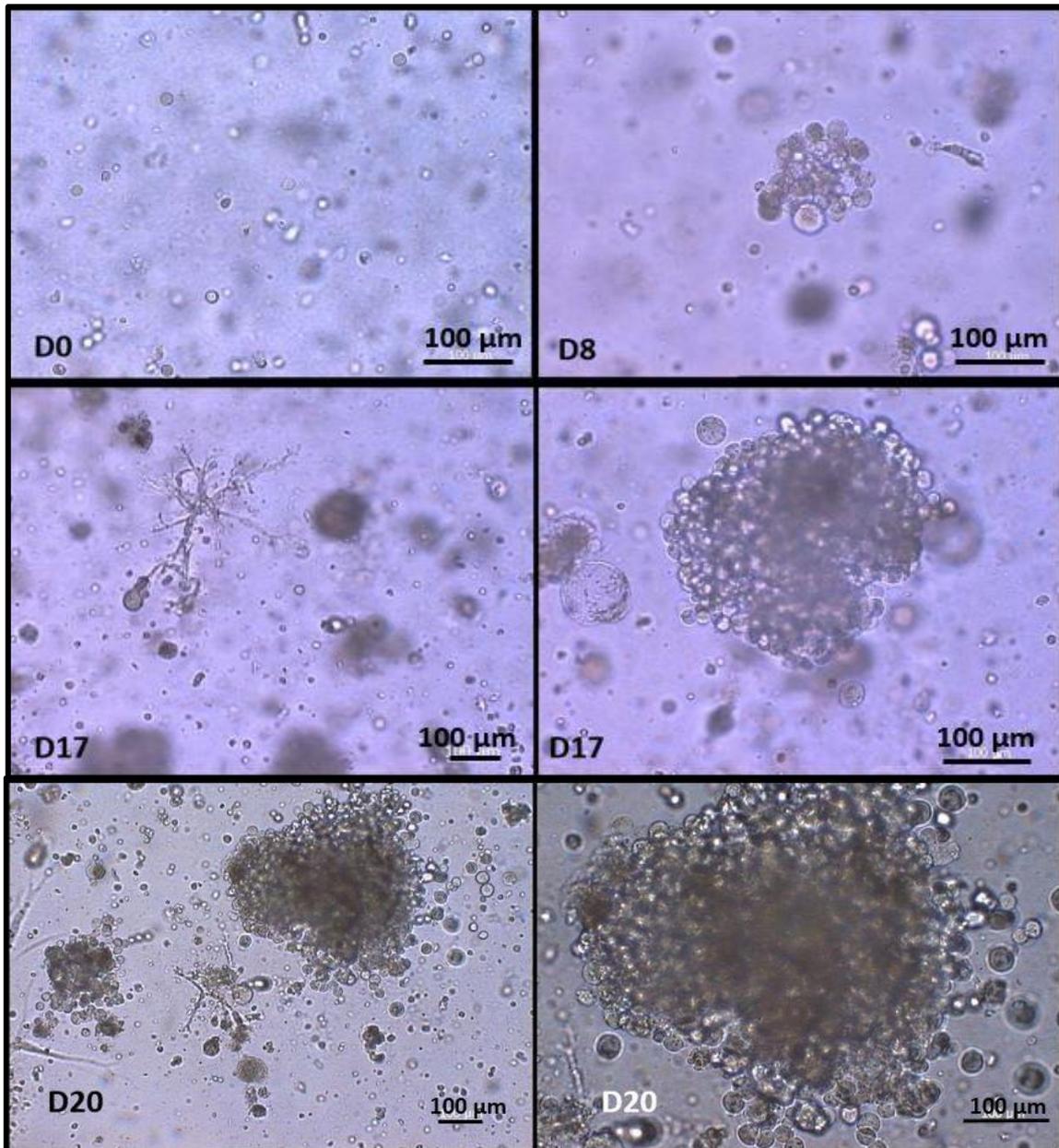
### 3.7.1 Lymphknotenmetastase

BLCA #15 ist eine Gewebeprobe, welche aus einer Lymphknotenmetastase eines Blasenkarzinoms entnommen wurde. Die Probe präsentierte ein besonderes Wachstum, welches sich von allen anderen Proben deutlich unterschied. Das Organoidwachstum war nur in HHMM erfolgreich. Nach dem Verdau des Gewebes blieben im Ansatz vereinzelt kleine Zellverbände erhalten, welche sich im Verlauf zu Organoiden entwickelten. Zudem entstanden auch einige Organoiden aus Einzelzellen. Die Organoiden erreichten ihre Maximalgröße, wie die meisten anderen Proben auch, nach über 2 Wochen. In diesem Ansatz wuchsen jedoch ab der dritten Woche weitere Zellen mit langen Ausläufern, welche die Organoiden zu stabilisieren schienen. Dadurch waren die Organoiden in der Lage weiterzuwachsen, sodass nach 5 Wochen zwar wenige, aber riesige Organoiden entstanden waren, welche Durchmesser von über 1000  $\mu\text{m}$  aufwiesen (siehe **Abbildung 22** und **Abbildung 23**).



**Abbildung 22:** BLCA #15 an Tag 35.

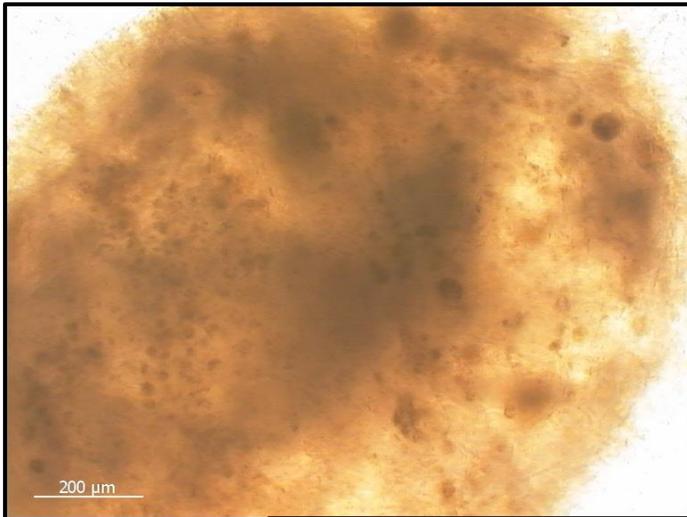
Zu erkennen sind mehrere Organoiden. Das größte Organoid weist eine Größe von über 1000  $\mu\text{m}$  auf. Zu erkennen sind die Ausläufer am Rand der Organoiden.



**Abbildung 23:** Zeitlicher Verlauf von BLCA #15.

*Es sind Aufnahmen von BLCA #15 zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu sehen. In der mittleren Zeile ist links ein beginnendes Netz aus Zellausläufern zu erkennen. In dem darunterliegenden Bild ist das gleiche Netz in der geringeren Vergrößerung zu erkennen und am linken Bildrand zudem noch weitere, deutlich größere Ausläufer eines weiteren Netzes. Die Aufnahme rechts unten zeigt ein Organoid mit „blumenkohlartiger Form unmittelbar vor der Passagierung.*

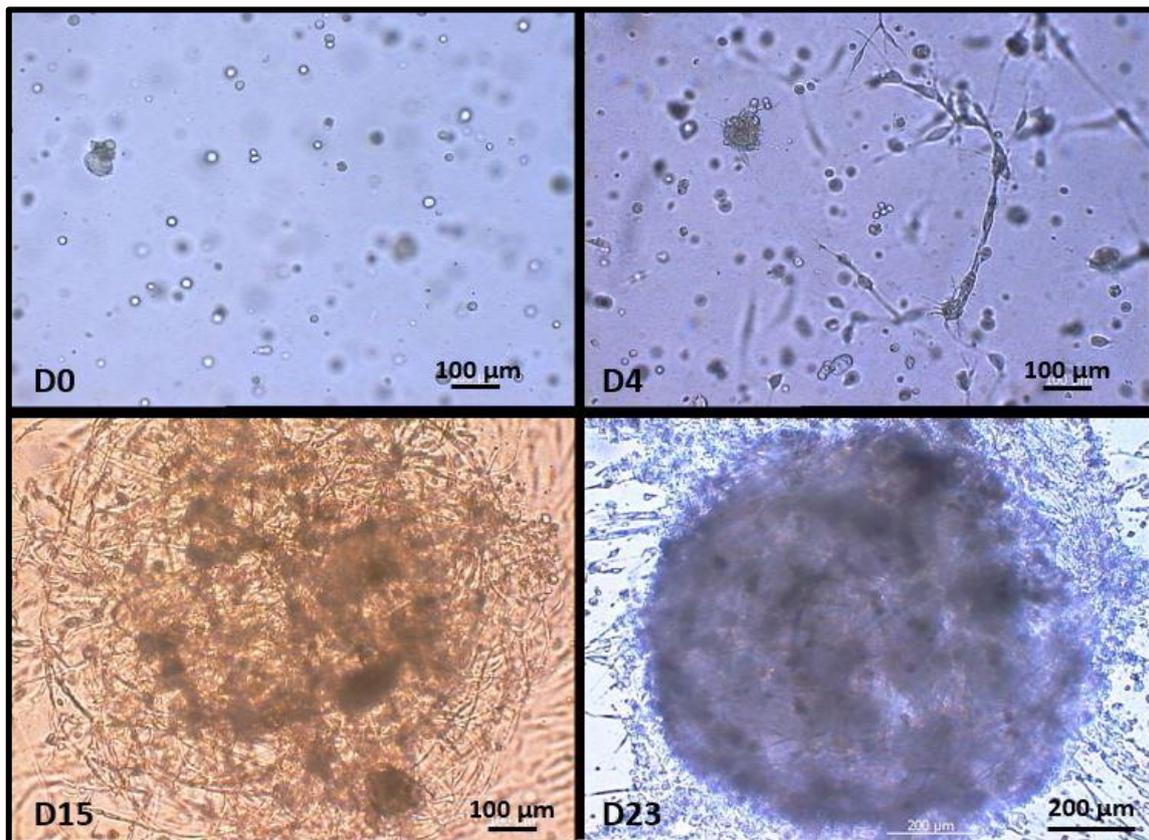
Bei entsprechender Vergrößerung war zu erkennen, dass die Zellen dieser Organoiden nicht so dicht gepackt waren, wie in anderen Proben, aber dafür stattdessen ein Netz aus Ausläufern besaßen. In diesem Netz lagen einzelne Zellen und Zellverbände miteinander verbunden vor (siehe **Abbildung 24**).



**Abbildung 24:** BLCA #15 an Tag 35 in hoher Vergrößerung.

Es sind einige einzelne Zellen innerhalb des Organoids zu erkennen.

Einige Wells von BLCA #15 wurden bereits an Tag 20 passagiert. Nach dem Verdau lagen die Organoide wieder als Einzelzellen vor. Es entwickelten sich nun bereits nach 4 Tagen erneut Zellen mit langen Ausläufern. Diese führten nach rund 2 Wochen zu großen Netzen, worin Organoide eingewachsen waren (siehe **Abbildung 25**).



**Abbildung 25:** Zeitlicher Verlauf von BLCA #15 S1.

Unmittelbar nach der Passagierung sind im Ansatz nur Einzelzellen zu erkennen (links oben). Bereits nach 4 Tagen bilden sich Zellausläufer, welche mehrere Zellen miteinander verbinden (rechts oben). Nach 15 Tagen ist ein großes Netz zu erkennen, welches sich bis Tag 23 verdichtet und zu einem riesigen Organoid entwickelt. Auch hier lassen sich innerhalb des Organoids noch einzelne Zellen erkennen.

Bereits nach 3 Wochen erreichten diese Verbände Durchmesser von über 1000  $\mu\text{m}$ . Auch diese Ansätze wurden passagiert und wuchsen nach dem gleichen Muster, wie zuvor bei BLCA #15 S1 beschrieben. Der Ansatz BLCA #15 S2 wuchs bis Woche 6 zu Organoiden von über 1000  $\mu\text{m}$  Durchmesser heran, welche sich zuletzt aus dem Matrigel herauslösten und frei im Medium geschwommen sind (siehe **Abbildung 26**).



**Abbildung 26:** BLCA #15 S2 an Tag 40.

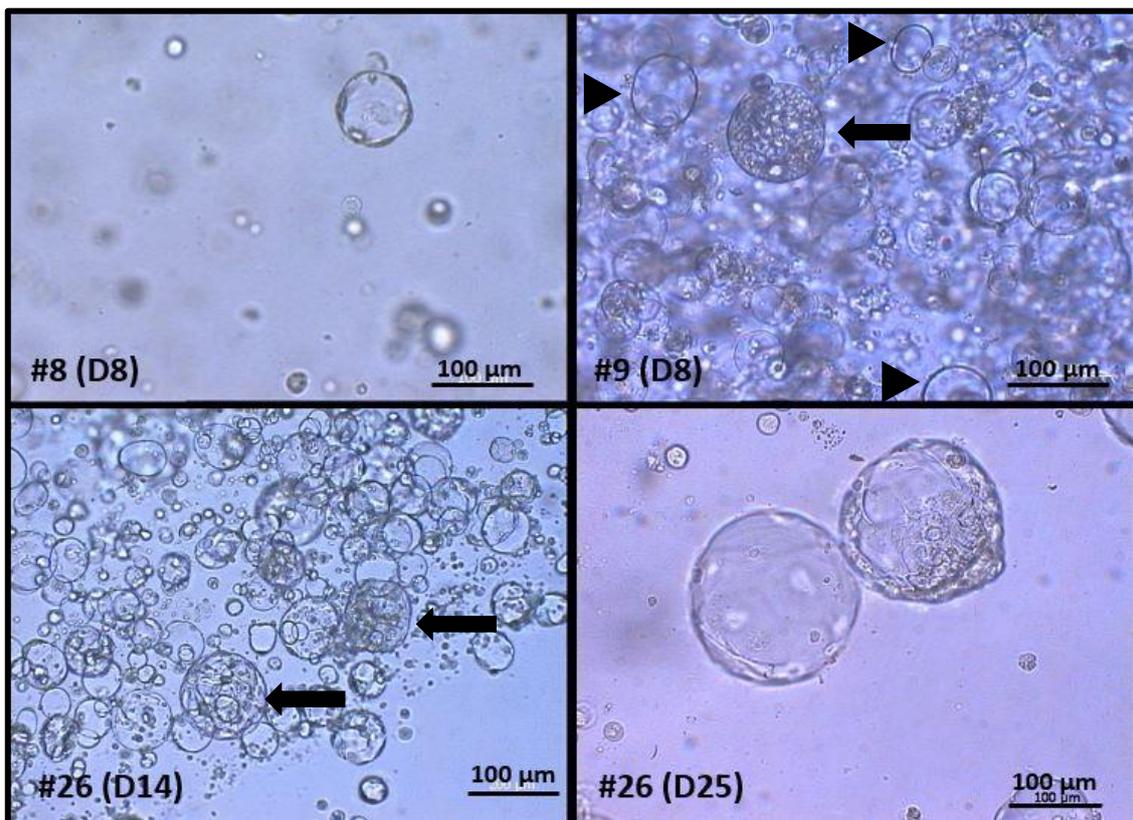
*Es sind zwei Organoide zu erkennen, welche frei im Kulturmedium schwimmen.*

Im Vergleich zu den Proben aus Blasen Tumoren ist diese Probe einer Metastase in allen ausgewerteten Parametern überlegen und wuchs nach der zweiten Passage als einziger Ansatz erfolgreich weiter.

### 3.7.2 „Blasenartige Zellen“

Ein weiteres Phänomen, welches im Verlauf der Kultivierung verschiedener Gewebeproben immer wieder auftrat, war die Bildung von blasenartigen Zellen. Diese Zellen wuchsen in 7 der 27 Proben. Meist waren sie von Beginn an in den Ansätzen enthalten und nahmen mit der Zeit an Größe zu. Einige dieser Einzelzellen entwickelten sich zu mehrkernigen Zellen (siehe **Abbildung 27**, links oben). Die blasenartigen Zellen waren in hoher Anzahl vorhanden und dominierten teilweise das Zellbild der entsprechenden Ansätze (rechts oben und links unten). Vereinzelt traten zudem Zellverbände auf, welche eine vergleichbare Morphologie wie Organoide aufwiesen und hohl zu sein schienen. Oftmals bildeten diese nach einiger Zeit „kappenartige Strukturen“ aus, welche sie dann an einem Pol dieses Zellverbands ablagerten. In jeweils einem Ansatz von BLCA #9 und BLCA #12 bildeten sich diese Zellen sogar nach einer

erfolgreichen Passage erneut und entwickelten sich identisch wie im entsprechenden ersten Ansatz. Auffällig war außerdem, dass sich das Phänomen unabhängig von Organoidwachstum zeigte. Das Zellbild zweier Ansätze, in denen keinerlei Organoid wuchsen, wurde durch diese Zellen dominiert. Die Ursache für dieses Phänomen und was es beeinflusst, konnte bisher nicht geklärt werden.



**Abbildung 27:** "Blasenartige Zellen" als Phänomen in verschiedenen Probenansätzen.

Oben links ist eine Zelle mit mehreren Kernen an Tag 8 zu erkennen, welche außen eine scharfe, klare Begrenzung aufweist und innen hohl erscheint. In der zweiten Aufnahme (rechts oben) ist mittig rechts ein Organoid zu erkennen. Im umliegenden Bereich sind zahlreiche „blasenartige Zellen“ (**Pfeilköpfe**) zu sehen, welche durch ihre klare, durchsichtige Form von dem Organoid (**Pfeil**) und anderen Zellen abzugrenzen sind. Im dritten Bild (links unten) ist der gesamte Ansatz durch diese Zellen geprägt. Dazwischen sind zwei Organoiden zu erkennen. Rechts unten sind zwei Zellverbände zu erkennen. An der Oberfläche des linken Verbands deuten sich auf der Oberfläche Zellen an, welche miteinander in einer schuppenartigen Form angeordnet sind. Auch Zellkerne sind innerhalb der einzelnen „Schuppen“ als kleine, hellere Flecken zu erkennen. Der rechte Zellverband zeigt eine Art „Pol“ aus verdichteten, dunklen Zellbestandteilen am unteren rechten Rand.

## 4 Diskussion

Organoidkulturen werden schon in naher Zukunft große Einflüsse auf die weitere Erforschung von Krankheiten, Medikamenten, Therapien und weiteren Bereichen der Medizin haben (Huch et al., 2017). Dass Organoide auch in der Erforschung von Harnblasentumoren als realistische Modelle dienen können, konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Es zeigte sich, dass Harnblasenorganoide aus verschiedenen Zelltypen bestehen, welche untereinander Adhärenzkontakte ausbilden und zudem eine gemeinsame Basalmembran besitzen, ähnlich wie im menschlichen Körper. Im Vergleich der Organoide mit dem Ausgangsgewebe war eine deutliche Ähnlichkeit in den Expressionsmustern der Cytokeratine zu erkennen. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass Organoide aus *low-grade* Tumoren ein besseres Wachstum zeigten als jene aus *high-grade* Tumoren. Ebenso erbrachten Proben von nicht-muskelinvasiven Tumoren, insbesondere papillären Tumoren, deutlich bessere Erfolgsquoten als entsprechende von muskelinvasiven Tumoren.

Da Organoide aus Stammzellen entstehen, haben sie das Potenzial, menschliche Organe mit all ihren spezialisierten Zelltypen, Organisationsformen und Funktionen *in vitro* auszubilden (Drost and Clevers, 2018). Um dies zu ermöglichen, sind jedoch Grundlagen und Bedingungen, wie im menschlichen Körper auch, notwendig. Dazu gehören eine entsprechende Extrazellulärmatrix, ein passendes Kulturmedium und das Vorhandensein der notwendigen (Stamm-)Zellen (Huch et al., 2017). In der vorliegenden Studie konnte im Vergleich zweier Medien keine Überlegenheit eines Mediums festgestellt werden. Dagegen zeigte sich im Vergleich verschiedener Verdaumethoden ein Vorteil bei der Nutzung von Kollagenase/Hyaluronidase und kurzen Inkubationszeiten gegenüber reiner Kollagenase und längeren Inkubationszeiten. Im Weiteren konnte festgestellt werden, dass die Organoide ihre maximale Größe nach

2 – 3 Wochen in Kultur erreichten und dies dementsprechend der bestmögliche Zeitpunkt war, um einen Ansatz erfolgreich zu passagieren.

Da zuvor keine eigene etablierte Methode zur Generierung von malignen Harnblasenorganoiden vorlag, wurde in dieser Studie das *Wachstum von Organoiden* als Kriterium für einen erfolgreichen Ansatz verwendet. Ansätze, in denen sich mindestens ein Organoid bildete wurden als erfolgreich gewertet. Die Erkenntnisse aus den Daten der vorliegenden Studie zu verschiedenen Bereichen der Harnblasenorganoiden werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

## 4.1 Organoidwachstum

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten bestätigen, dass die Methodik der Gruppe von Lee (Lee et al., 2018) grundlegend funktioniert und reproduzierbar ist. Von keiner weiteren Arbeitsgruppe in Tübingen oder weiteren Universitätsstandorten in Deutschland war eine Beschäftigung mit Organoiden aus Blasenkarzinomen bekannt, sodass keine praktischen Erfahrungen und ein entsprechender Austausch in diesem spezifischen Gebiet verfügbar waren. Dennoch lagen eigene Vorarbeiten mit Organoiden aus Mamma-Ca und Prostata-Ca vor, welche bereits vielversprechende Ergebnisse brachten. Die Methoden dafür waren bereits etabliert, sodass Vorerfahrungen daraus genutzt werden konnten. Die 2017 veröffentlichten Versuche von Pauli (Pauli et al., 2017) beschrieben eine Erfolgsquote von 33 % in Bezug auf die Etablierung von Organoidlinien (Def. siehe unten) aus Tumoren der Harnblase und Ureteren. Das hierbei verwendete Kulturmedium wurde von Lee und Mitarbeitern (2018) verwendet, modifiziert und führte anschließend in deren Arbeit zu einer deutlich besseren Erfolgsquote. Die verwendeten Informationen für die Generierung von Blasenorganoiden wurden daher gänzlich aus der genannten Veröffentlichung (Lee et al., 2018) entnommen und an mehreren Punkten auf die vorhandenen Bedingungen angepasst. Aufgrund dieser Vorarbeiten sollte es gut möglich sein, Organoidlinien zu erhalten. Die Gruppe von Lee etablierte in den letzten

9 Monaten der beschriebenen Versuchsreihe Organoidlinien mit einer Erfolgsquote von 70 %. Wie hoch die Quote der erfolgreich etablierten Linien insgesamt ist, bleibt in der Veröffentlichung jedoch unklar. Nach der dort beschriebenen Definition für eine Organoidlinie, welche besagt, dass mindestens 6 erfolgreiche Passagen durchlaufen sein müssen, ist es in der vorliegenden Arbeit nicht gelungen, eine Linie zu etablieren. Dennoch konnten ohne eigene Vorarbeiten zu Blasenorganoiden innerhalb von 6 Monaten, aus 61 % der Tumorgewebeprobe Organoide generiert und mehrere sogar passagiert werden. Die vorliegenden Ergebnisse zeigten, dass die Organoide meist eine Größe von rund 200  $\mu\text{m}$  erreichten, bevor sie begannen sich aufzulösen. Eine, wenn auch wenig wahrscheinliche Erklärung dafür könnte eine insuffiziente Versorgung mit Sauerstoff sein. Die allgemeine Diffusionsgrenze von Sauerstoff im menschlichen Gewebe liegt bei 100 - 200  $\mu\text{m}$  (Carmeliet and Jain, 2000). Bei einem deutlichen Überschreiten dieser Größe ist ein Wachstum von Blutgefäßen, die sogenannte Angiogenese notwendig, um die Versorgung eines Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen zu sichern. Wenige der Proben erreichten dennoch einen Durchmesser von über 1000  $\mu\text{m}$ , ohne sich aufzulösen. Diese Organoide bildeten netzartige, scheinbar lockere Zellverbände aus. Zudem waren Zellen zu erkennen, die lange Ausläufer besaßen und dadurch augenscheinlich einen Zusammenhalt gewährleisteten. Daher wäre es denkbar, dass diese Zellen Teile der Mikroumgebung, ähnlich wie im menschlichen Körper darstellen und dadurch einen positiven Einfluss auf das Wachstum der Organoide nehmen. Diese These wäre in weiteren Versuchen zu überprüfen und könnte beispielsweise durch Phänotypisierung der Zellen weitere Aufschlüsse geben.

In Bezug auf die Mikroumgebung spielt hier auch die Verwendung von Matrigel als Extrazellulärmatrix (ECM) eine tragende Rolle. Das verwendete Basalmembranextrakt (BME type II, Cultrex<sup>®</sup>) besteht unter anderem aus Lamininen und Kollagenen und soll eine möglichst natürliche Mikroumgebung für die Zellen darstellen. Jedoch wird es als Extrakt aus einem Tumorgewebe gewonnen und somit lässt sich nicht gewährleisten, dass keine Reste von Wachstumsfaktoren/Zytokinen enthalten sind und Einfluss auf das Wachstum der Organoide nehmen. Dies wäre auch eine mögliche Erklärung für das

unterschiedliche Wachstum in den verschiedenen Ansätzen. Für zukünftige Versuche, insbesondere mit dem Ziel auch einen klinischen Nutzen zu haben, wäre es sinnvoll synthetische Matrices zu verwenden, die ebenfalls möglichst realistische Mikromilieus darstellen (Gjorevski et al., 2016). Da jedoch nicht jede Zellkultur das gleiche Mikromilieu benötigt, könnte ein spezifisches „Organoid-BME“ oder sogar ein „Harnblasenorganoid-BME“ aus synthetischen Hydrogelen ein hilfreiches Werkzeug in der Organoidforschung darstellen. Bereits 2009 war es mithilfe von Polyethylenglycol-basierten (PEG) Hydrogelen möglich, unterschiedliche Signalmoleküle in die Matrices einzubauen und die Gele zudem mit unterschiedlichen Viskositäten zu designen (Blow, 2009).

Trotz aller präzisen, angegebenen Parameter ist es nicht ohne Weiteres möglich, Linien zu erhalten. Ein Mangel an Erfahrung mit Blasenorganoiden könnte hierbei möglicherweise ein limitierender Faktor gewesen sein. Da sich dennoch über die Dauer der Versuchsreihe eine gute Entwicklung gezeigt hat, war die Etablierung einer Linie, aufbauend auf die vorliegenden Ergebnisse, wenig später möglich (persönliche Nachricht von cand. med. Leander Schwaibold, Universität Tübingen).

## 4.2 Einfluss der Probenaufbereitung

Zu Beginn aller Versuche steht die Gewinnung von Gewebeproben. Damit ist dies auch der erste Schritt, welcher das Potenzial für Einwirkungen oder gar Fehler birgt, die später Einfluss auf manche Ergebnisse haben können. Die Entnahme der Proben mittels TUR-B beinhaltet die Applikation von Strom auf das Gewebe. Der überwiegende Anteil der Proben wurde mithilfe dieser Technik entnommen. Die Probeentnahmen bei den vorangegangenen Experimenten von Lee et al. (2018) wurden mithilfe der „Cold Loop Resection“, „Cold Cup Biopsy“ oder mittels Zystektomie durchgeführt, welche allesamt keinen elektrischen Strom zur Gewebeentnahme benötigen und dadurch auch keine übermäßige Hitzeentwicklung stattfindet. Eine Schädigung der Zellen durch Strom ist nicht

auszuschließen. Dafür spricht ebenfalls, dass auch die Gewebeproben von cand. med. Leander Schwaibold, welche ohne Stromanwendung entnommen wurden, zum aktuellen Stand bessere Ergebnisse erzielten (persönliche Mitteilung Ende 2019). Jedoch ist nicht anzunehmen, dass dies der hauptsächliche oder gar einzige Grund dafür ist, dass in der vorliegenden Arbeit keine Linien etabliert werden konnten. Beide Zystektomieproben brachten ebenfalls keine Organoidlinien hervor, obwohl diese bekanntermaßen ohne Zuhilfenahme einer Elektroschlinge entnommen werden. Somit müssen hierbei weitere Faktoren eine Rolle spielen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten, dass der Gewebeverdau mit Sicherheit auch Einfluss auf das Wachstum der Organoide nimmt. Unter den getesteten Verdaumethoden zeigte die Durchführung nach dem Protokoll von Lee et al. die besten Ergebnisse. Unter der Nutzung dieser Methode stieg die Erfolgsquote der Ansätze um rund 20 % an und auch die durchschnittliche Maximalgröße der Organoide nahm zu. Besonders auffällig war, dass insbesondere Ansätze, welche nach dem Verdau noch kleine Zellcluster enthielten, gute Ergebnisse zeigten. Eine bereits bekannte Schwachstelle des Organoidmodells ist das Fehlen von Zellen der Mikroumgebung (Yoshida et al., 2018). Möglicherweise werden genau diese Einflüsse und Zellinteraktionen durch kleine Cluster ermöglicht und tragen so zur Initiierung der Organoidbildung bei. Auch in den Experimenten von Lee haben sich Zellcluster von 2 - 10 Zellen in 50 – 80 % der Fälle ausdrücklich zu Organoiden formiert (Lee et al., 2018). Eine Verkürzung des Gewebeverdaus wäre zu erwägen, um die Anzahl an Zellclustern zu steigern. Die gleiche Überlegung könnte bei der Passagierung der Organoide in Betracht gezogen werden. Besonders der Verdau mit Trypsin bedarf kurzer Inkubationszeiten, damit das Enzym nur wenige extrazelluläre Proteine schädigt. Eine kürzere Inkubationszeit würde höchstwahrscheinlich auch zu einem höheren Anteil an Zellclustern führen und somit möglicherweise zu einer höheren Anzahl an Organoiden nach der Passagierung. Eine weitere Option des Verdaus wurde 2014 zur Kultivierung von Prostataorganoiden verwendet, bei der die Inkubation mit Kollagenase/Hyaluronidase über Nacht stattfand und zudem ein einstündiger Trypsinverdau in einer niedrigen

Konzentration und bei einer Temperatur von 4 °C durchgeführt wurde (Chua et al., 2014). Auch diese Methode brachte Organoidlinien hervor. Nach aktuellem Stand scheint jedoch der zweimalige Verdau mit reiner Kollagenase für je 30 Minuten die besten Ergebnisse zu erzielen (Mullenders et al., 2019). Laut den Ergebnissen dieser Gruppe wurden damit über 50 % der Proben erfolgreich zu stabilen Organoidlinien kultiviert. Da laut den vorliegenden Ergebnissen keine guten Bedingungen für das Wachstum von Organoiden mithilfe von einem kurzen Kollagenaseverdau geschaffen werden konnten, wäre eine mögliche Erklärung hierfür die Nutzung einer anderen Kollagenase. Während die vorliegenden Versuche mit Kollagenase Typ II durchgeführt wurden, verwendete die Gruppe von Mullenders et al. Kollagenase Typ I aus dem Bakterium *Clostridium histolyticum* in einer geringeren Konzentration. Zudem wurden die Proben zwischen den beiden kurzen Verdauvorgängen durch einen Filter mit 70 µm Porengröße gegeben. Auch dies könnte zu einem besseren Ergebnis der Ansätze geführt haben. Eine andere mögliche Erklärung wäre die ungenaue Angabe zur Zerkleinerung der Tumorproben. Laut Angaben der zuvor genannten Gruppe wurden die Gewebeproben vor dem Verdau in 1 - 2 mm große Stückchen zerschnitten. Die Größe der Stücke ist tatsächlich jedoch schwer anzugeben, da sie aufgrund der Ungleichmäßigkeit und teils fast schon flüssigen Konsistenz schwierig zu bestimmen ist. Insbesondere mit dem bloßen Auge lässt sich dies schwer feststellen, wie die vorliegenden Versuche zeigten. Größere Fragmente benötigen selbstverständlich längere Inkubationszeiten, was so zu einem schlechteren Verdau geführt haben könnte. Insgesamt lässt sich für zukünftige Studien sagen, dass Versuche, die viel händische Arbeit beinhalten, immer kleine Abweichungen aufweisen werden und daher durchaus mit der Erfahrung der durchführenden Personen variieren können. Alles in allem zeigten insbesondere kurze Verdauzeiten die besten Ergebnisse und Kollagenase von *Clostridium histolyticum* scheint zudem vielversprechende Ansätze für den Gewebeverdau von Blasentumorgewebe zu liefern.

### 4.3 Zellkulturmedien

Der Vergleich der beiden Zellkulturmedien brachte hervor, dass die Tumorproben fast immer in einem Medium besser wachsen. Jedoch ist kein Faktor erkennbar gewesen, welcher auf das präferierte Medium hinweist. Rund die Hälfte der Proben zeigte in Hepatozytenmedium ein erfolgreicherer Wachstum und die zweite Hälfte umgekehrt in Prostatamedium, scheinbar ohne jegliche Abhängigkeit von Verdaumethode, Geschlecht des Patienten, Tumorstadium oder dem Zeitpunkt, an dem die Versuche durchgeführt wurden. Daraus kann schlussgefolgert werden, dass weder zu Beginn der Versuchsreihe noch am Ende eines der Medien im Vergleich überlegen war.

Das verwendete Prostatamedium ist ein definiertes Medium, welches mithilfe von Vorarbeiten diverser Gruppen schließlich von Drost et al. (2016) zur Kultivierung von Prostataorganoiden verwendet wurde. Die Gruppe stellte fest, dass die Organoiden ihren Ursprungstumor genetisch und phänotypisch sehr stark ähneln. In den Versuchen wurde u.a. die Prostata von Mäusen aus deren Urogenitaltrakt entfernt und zur Generierung von Organoidkulturen verwendet. Anatomisch haben Prostata und Harnblase auch im menschlichen Körper eine unmittelbare Beziehung, sodass es möglich wäre, dass sich die Mikroumgebung beider Organe ebenfalls ähneln könnte. Dies wäre eine mögliche Erklärung für das Wachstum von Harnblasenorganoiden in Prostatamedium. Ein möglicher Ansatz aus den vorliegenden Ergebnissen wäre nun, die Kultivierung mit dem definierten Prostatamedium weiterhin zu verfolgen und um harnblasen-spezifische Faktoren zu erweitern. Denn vergleichend dazu beinhaltet das Hepatozytenmedium fetales Kälberserum und ist somit kein definiertes Medium. Da aber kein signifikanter Vorteil gegenüber dem definierten Medium erkennbar war, scheint das Prostatamedium die nötigen Wachstumsfaktoren zu enthalten, die für ein Organoidwachstum aus Blasentumorgewebe nötig sind. Im Übrigen wäre es aufgrund des Gehalts von tierischem Serum für die spätere klinische und therapeutische Verwendung ohnehin nicht geeignet.

Tatsächlich wurde kurz nach der Durchführung der vorliegenden Studie eine weitere Arbeit veröffentlicht, die ein definiertes Medium zur Kultivierung von Harnblasenorganoiden beinhaltet (Mullenders et al., 2019). In dieser Versuchsreihe konnten aus 58 % der verwendeten Proben (gesundes und malignes Harnblasengewebe) Organoidlinien generiert werden, welche bis zu über ein Jahr aufrechterhalten werden konnten. Das verwendete Medium enthielt bis auf einen Wachstumsfaktor (FGF-7) tatsächlich nur Zusätze, die auch im PM enthalten waren. Dies bestätigt im Nachhinein die vorliegenden Ergebnisse des durchgeführten Medienvergleichs. Es ist jedoch hinzuzufügen, dass laut persönlicher Mitteilung von cand. med. Leander Schwaibold (Universität Tübingen), die alleinige Umstellung und Verwendung des Mediums von Mullenders et al. nicht ausreichend sei, um bessere Ergebnisse zu erzielen. Stattdessen würden vor allem auch andere Faktoren, wie beispielsweise die Entnahmetechnik (siehe 4.2) eine entscheidende Rolle spielen.

#### **4.4 Subtypisierung mittels Immunfluoreszenzfärbung**

Bekanntermaßen gibt es beim muskelinvasiven Harnblasenkarzinom eine Unterscheidung zwischen einem basalen und einem luminalen Subtyp, welche auch Einfluss auf den Phänotyp des Tumors haben (Lee et al., 2018). Um diese Subtypen zu detektieren, wurden in der genannten Arbeit Antikörper gegen CK5 als Nachweis von basalen Zellen und Antikörper gegen CK8 als Nachweis von luminalen Zellen verwendet. Durch die Markierungen konnten die Organoiden in die Kategorien luminal, basal und gemischt eingeteilt werden. Der überwiegende Anteil der Organoiden konnte einem spezifischen Subtyp zugeordnet werden und nur ein kleiner Anteil wurde als gemischt bezeichnet.

In der vorliegenden Arbeit wurden diese Färbungen ebenfalls durchgeführt. Hier konnte die gleiche Einteilung verwendet werden und es zeigte sich, dass ebenfalls alle Organoiden einer Kategorie zugeordnet werden konnten. Der Anteil der gemischten Organoiden war hierbei allerdings der überwiegende. Zur

Markierung der luminalen Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit nicht nur CK8, sondern CK8/18 angefärbt. Das Cytokeratin 18, welches hier zusätzlich genutzt wurde, ist ein Marker für Urothelien und dient zudem als Tumormarker für high-grade Blasenkarzinome (Ramazan Sekeroglu et al., 2002). Er ist nicht spezifisch für luminalen Zellen des Urothels, was den höheren Anteil von Organoiden des gemischten Typs erklären könnte. Jedoch scheint CK18 keine Zellen vom basalen Typ zu markieren. Dies zeigte sich in den Färbungen der Gewebeschnitte. Hierbei gab es in der Doppelfärbung keinerlei Überlagerungen von CK5 und CK8/18, sondern alle Zellen der Probe konnten einer Kategorie zugeordnet werden.

Die in der ersten Versuchsreihe verwendeten Organoidschnitte konnten für die Auswertung nicht verwendet werden, da sich in den Negativkontrollen immer wieder unspezifische Signale zeigten. Die Signale konnten an allen Zellen der Organoiden detektiert werden, sodass die wahrscheinlichste Erklärung hierfür eine Autofluoreszenz des verwendeten Histogels ist. Die Gewebeschnitte und Färbungen der ganzen Organoiden, welche ohne Nutzung von Histogel angefertigt wurden, ergaben hingegen verwertbare Aufnahmen. Es konnte nachgewiesen werden, dass die kultivierten Organoiden unterschiedliche Zelltypen ausprägten und die von Lee und Mitarbeitern 2018 vorgeschriebene Subtypeneinteilung auch in der vorliegenden Arbeit angewendet werden konnte. Zudem konnte die Ausprägung einer Basalmembran im äußeren Bereich der Organoiden gezeigt werden. Eine zu erwartende Anlagerung von hauptsächlich basalen Zellen an die Basalmembran konnte bisher jedoch nicht nachgewiesen werden.

Es wäre interessant herauszufinden, ob sich die urothelialen Stammzellen in den Organoiden der Basalmembran anlagern, wie dies auch in der menschlichen Harnblase der Fall ist. Leider sind zum aktuellen Zeitpunkt keine Marker für urotheliale Stammzellen bekannt (Mullenders et al., 2019). Dies würde Aufschlüsse über die Entwicklung und Differenzierung der Blasenorganoiden geben und würde es ermöglichen, gezielter und womöglich effektiver Organoiden zu kultivieren.

## 4.5 Einfluss von Tumorstadium und Differenzierung

Eines der Hauptziele der Organoidforschung ist deren Überführung in die klinische Praxis und dadurch eine mögliche Revolutionierung der personalisierten Tumorthherapie. 2018 wurde gezeigt, dass Harnblasenorganoid die Eigenschaften der Originaltumor auf zellulärer und molekularer Ebene sehr gut repräsentieren können (Lee et al., 2018). Da kein Tumor exakt dem anderen gleicht, ist es von Nöten eine Methode zu entwickeln, welche ein möglichst weites Spektrum an Tumoren abdeckt. In der vorliegenden Studie wurden daher Daten zu den Tumorstadien und Differenzierungsgraden der verwendeten Proben im Hinblick auf ein erfolgreiches Wachstum ausgewertet. Wie zuvor erwähnt stellen nicht-muskelinvasive Tumoren mit einem Anteil von rund 70 % den Großteil aller urothelialen Harnblasentumoren dar. Darunter weisen die meisten ein papilläres Wachstum auf und sind gut differenziert (Pasin et al., 2008), sodass sie überwiegend als G1 oder G2 (low-grade) eingeteilt werden. Bekannterweise zeigen Proben von low-grade Tumoren und papillären Tumoren in Spheroidkulturen ein besseres Wachstum als high-grade und muskel-invasive Tumoren (Yoshida et al., 2015).

Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Studie auch für Organoidkulturen bestätigt werden. Die verwendeten Proben repräsentierten die Verhältnisse der weltweit registrierten Tumorzinidenzen insgesamt relativ gut. 85 % der Proben entstammen aus nicht-muskelinvasiven Tumoren. Davon zeigten 70 % ein papilläres Wachstum und 50 % aller Proben eine low-grade Differenzierung. Der durchschnittliche Anteil an weiblichen Patienten von rund 25 % in Deutschland wurde hier mit nur 16 % leicht unterrepräsentiert. Geschlechterspezifische Unterschiede ließen sich in den Versuchen nicht erkennen. Betrachtet man die Ergebnisse in Bezug auf die Stadienverteilung, so boten nicht-muskelinvasive Proben insgesamt eine Erfolgsquote von 75 %. Papilläre Proben erbrachten sogar eine Quote von 90 % und waren damit die erfolgreichsten, wie auch in den Spheroidkulturen der zuvor aufgeführten Veröffentlichung von Yoshida et al. Im Hinblick auf die Differenzierung der Proben konnten diese Ergebnisse ebenfalls

für die Organoidkulturen bestätigt werden. 90 % der Proben von low-grade Tumoren erbrachten Erfolge im Gegensatz zu 58 % bei high-grade Tumoren.

Aus diesen Erkenntnissen ergibt sich für das Organoidmodell eine besondere Stellung für die Tumorthherapie. Da sich die besten Erfolgsquoten bei den niedrigmalignen Tumoren zeigten und diese den größten Anteil ausmachen, ist die Chance für eine erfolgreiche Therapie auf Basis eines personalisierten Organoidansatzes aktuell durchaus hoch. Das bedeutet, dass das Tumorstadium und/oder die Differenzierung höchstwahrscheinlich einen großen Einfluss auf das Wachstum der daraus abgeleiteten Organoiden nimmt. Würde man in weiteren Studien Gründe für diesen Einfluss finden und nachweisen, so könnte man daraus möglicherweise eine Methode entwickeln, welche auch für muskelinvasive Tumoren hohe Erfolgsquoten erbringt. Dadurch könnte das Modell praktisch für alle Formen von Harnblasentumoren anwendbar gemacht werden.

#### **4.6 Exkurs: „Organoiden aus Lymphknotenmetastasen“**

Eine besondere Entdeckung ergab sich bei der Kultivierung einer Gewebeprobe, die aus einer Lymphknotenmetastase gewonnen wurde. Sie ergab mehrere Ansätze, welche sehr große Organoiden ausbildeten und in einer netzartigen Struktur zusammengelagert waren. Derartige Phänomene sind in aktuellen Veröffentlichungen zu Harnblasenorganoiden nicht beschrieben. Es wurden dennoch bereits Organoiden aus Tumormetastasen kultiviert, wie beispielsweise aus Metastasen von kolorektalen Karzinomen (Weeber et al., 2015). Dazu verglich man Organoiden aus Primärtumoren mit Organoiden aus Metastasen. Unterschiede in Bezug auf das Wachstumsmuster, die jenen der vorliegenden Arbeit entsprechen, sind dort jedoch nicht beschrieben worden. Eine mögliche Erklärung für die Entstehung der „Netze“ wäre das Vorhandensein von unterschiedlichen Zelltypen in der betreffenden Gewebeprobe. Es wäre denkbar, dass beispielsweise Fibroblasten in der Probe enthalten waren. Deren

Hauptaufgabe besteht bekanntermaßen darin, Interzellulärsubstanzen zu synthetisieren und dadurch die ECM von verschiedensten Geweben zu bilden. Fibroblasten könnten im Matrigel eine zweite, eigene ECM gebildet haben. Dies würde ebenfalls erklären, warum sich die riesigen Zellverbände nach mehrwöchiger Kultivierung aus dem Matrigel gelöst haben und im Medium frei flottiert sind. Möglicherweise hat eine eigene ECM die nötige Stabilität der Zellverbände aufrechterhalten und dadurch das übermäßige Wachstum ermöglicht. Durch eine Phänotypisierung der Zellen könnte die These in weiteren Versuchen überprüft werden. Die Fähigkeit zur mehrfachen Passagierung ist dadurch jedoch nicht vollständig erklärbar. Eine Fehlinterpretation der Zellverbände als Organoid sollte auch in Betracht gezogen werden. Da zu dieser Probe kein Nachweis von Organoiden durch bspw. immunhistochemische Färbungen durchgeführt wurde, lässt sich abschließend nicht sicher sagen, ob es sich bei den beobachteten Zellverbänden tatsächlich um Organoiden, wie man sie bisher kennt, handelte. Diese Nachweise wären zunächst zu erbringen, bevor stichhaltige Erklärungsansätze und Rückschlüsse aus dem beschriebenen Phänomen gezogen werden können. Dennoch ist die Einflussnahme von Zellen des umliegenden Mikromilieus, welche immer wieder als Limitierung des Organoidmodells betitelt wird, hierbei nicht auszuschließen und wäre ein interessanter Ansatzpunkt für weitere Studien.

## 4.7 Ausblick

Die aktuelle Datenlage beschreibt die aktuelle Rolle des Organoidmodells als ein mächtiges Werkzeug in der Erforschung von Tumorerkrankungen, deren Mikroumgebung und schließlich auch deren Behandlung (Clevers and Tuveson, 2019). Die ersten erfolgreichen Organoidmodelle wurden 2009 beschrieben (Sato et al., 2009), während seit über 50 Jahren bereits Xenotransplantatmodelle zur Erforschung verwendet werden. Diese beziehen im Vergleich zum Organoidmodell die Zellen und Signale des umgebenden Mikromilieus, welche Einfluss auf das Tumorwachstum haben, weitestgehend ein und bilden dieses recht realistisch ab (Bleijs et al., 2019).

Der Vorteil des Organoidmodells ist dagegen, dass eine schnelle und effiziente Kultivierung der Organoide bereits für viele Organe möglich ist. Dies ermöglicht auch, eine zeitnahe Untersuchung jeweiliger maligner Erkrankungen durchzuführen. Besonders in der präklinischen Anwendung haben Organoide bereits in Einzug in die Therapie von Patienten erhalten (Bleijs et al., 2019). 2013 wurde gezeigt, dass Organoid-basierte Tests zur Detektion von Patienten mit Cystischer Fibrose beitragen können (Dekkers et al., 2013). Zudem bildet die 3D-Matrix die Situation im menschlichen Körper wesentlich realistischer ab als in beispielsweise 2D-Kulturen. Die aktuelle Studienlage zeigt jedoch auch die derzeitigen Grenzen auf. Diese sind beispielsweise das Fehlen von Nerven, Blutgefäßen und Immunzellen in den Organoidkulturen (Clevers, 2016). Außerdem können trotz schneller Fortschritte in der Etablierung verschiedener Organoidkulturen noch längst nicht aus allen Organsystemen Organoide kultiviert werden. Speziell die Etablierung von Organoiden aus Harnblasentumoren ist im Gesamtvergleich noch recht jung und bietet daher die Chance für zahlreiche weitere Studien.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie lassen sich interessante Fragestellungen ableiten. Da zahlreiche Tumorproben unter Anwendung von elektrischem Strom entnommen wurden, wäre ein Vergleich von Proben, die mit und ohne Stromapplikation entnommen wurden, wünschenswert, um den

Einfluss dieses Faktors zu bestimmen. Weiterhin ist die Kultivierung von Blasenorganoiden im Vergleich zu anderen Gewebstypen aktuell weniger effizient, sodass eine Verbesserung der Kulturbedingungen respektive Medien für weitere Untersuchungen denkbar wäre. Da sich das Modell auf das Vorhandensein von Stammzellen stützt, könnte man außerdem durch immunhistochemische Marker, wie z.B. CK5 oder CD44 (Mullenders et al., 2019), die urothelialen Tumorstammzellen identifizieren und herausfinden, wo diese in den Organoiden liegen und wie diese sich im Verlauf des Wachstums entwickeln. Dies wäre eine hilfreiche Information für die langfristige Kultivierung von Organoiden und auch für die Erstellung von Biobanken, die personalisierte (Tumor-)Therapieverfahren eines Tages möglicherweise prägen werden.

## 5 Zusammenfassung

Die Organoidmodell hat in jüngster Vergangenheit Einzug in die Erforschung des Harnblasenkarzinoms gehalten. Muskelinvasive Tumoren der Harnblase sind heutzutage noch mit einer 10-Jahres-Überlebensrate von unter 40 % vergesellschaftet. Eine Therapie beinhaltet in den meisten Fällen die Entfernung der Harnblase (Zystektomie) und hat für die Patienten langfristige Einschränkungen der Lebensqualität zur Folge. Das Organoidmodell stellt einen erfolgsversprechenden Forschungsansatz dar, um neue Informationen über das Harnblasenkarzinom zu gewinnen, die Patientenversorgung damit weiter zu verbessern und möglicherweise individualisierte Tumortherapien zu etablieren. Denn Organoide erhalten bei ihrer Kultivierung große Teile der Eigenschaften ihrer Ausgangstumore, wie beispielsweise die Ausprägung verschiedener Subtypen. Die Grundlage für die Durchführung aller Versuche ist jedoch zunächst eine stabile und effektive Methode zur Generierung von Organoiden. Dies war auch der Fokus der vorliegenden Arbeit.

Insgesamt konnten aus 63 % (17/27) der verwendeten Gewebeproben Organoide kultiviert werden. In den meisten Fällen wurde eine Anzahl von 5 – 10 Organoiden pro Well erzielt. Die maximale Anzahl an Organoiden in einer Probe war über 50 Organoide pro Well. Den meisten Organoide erreichten ihre maximale Größe zwischen der zweiten und dritten Woche in Kultur. Die Größe der Organoide lag, unabhängig vom Medium, durchschnittlich zwischen 50 und 300 µm. Die Passagierung von Organoiden gelang bei 50 % (4/8) der Proben.

Der Verdau des Tumorgewebes mit Kollagenase/Hyaluronidase erbrachte mit einer Erfolgsquote von 71 % (10/14) bessere Ergebnisse als der Verdau mit Kollagenase, welcher nur in 50 % (7/14) erfolgreich war. Im Medienvergleich zwischen Hepatozyten- und Prostata-Medium zeigte sich kein Vorteil eines Mediums gegenüber dem anderen. Jedoch führte immer eines der beiden Medien zu einem besseren Wachstum.

Weiterhin wiesen *low-grade* Tumoren mit einer Erfolgsquote von 90 % (9/10) ein deutlich besseres Wachstum auf als die *high-grade* Tumoren mit 58 % (7/12). In Bezug auf die Invasivität zeigten sich ebenfalls Unterschiede in den Erfolgsquoten. Nicht-muskelinvasive Tumoren erbachten mit 75 % (15/20) eine deutliche höhere Erfolgsquote als muskelinvasive Tumoren mit 25 % (1/4). Insbesondere fielen die papillären Tumoren mit einer Erfolgsquote von 79 % (11/14) auf.

In den Immunfluoreszenzfärbungen konnten zwei verschiedene Subtypen mithilfe der Markierung von CK5 (basale Zellen) und CK8/18 (luminale Zellen) nachgewiesen werden. Im Vergleich zeigten die Organoide ähnliche Expressionsmuster wie die Gewebeschnitte des Ausgangsgewebes. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Organoide Basalmembranen und Integrin- $\beta$ 1 ausprägen.

Die durchgeführte Studie konnte wesentliche Erkenntnisse zu Methoden und Kultivierung von Harnblasenorganoiden erbringen und zudem Ergebnisse des aktuellen Forschungsstands bestätigen. Die Arbeit stützt daher die These, dass das Organoidmodell das Potenzial besitzt, in Zukunft großen Einfluss auf die Entwicklung personalisierter Therapien von Harnblasentumoren zu nehmen.

## Literaturverzeichnis

- BARAK, V., GOIKE, H., PANARETAKIS, K. W. & EINARSSON, R. 2004. Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. *Clin Biochem*, 37, 529-40.
- BARTFELD, S. & CLEVERS, H. 2017. Stem cell-derived organoids and their application for medical research and patient treatment. *J Mol Med (Berl)*, 95, 729-38.
- BLEIJS, M., VAN DE WETERING, M., CLEVERS, H. & DROST, J. 2019. Xenograft and organoid model systems in cancer research. *EMBO J*, 38, e101654.
- BLOW, N. 2009. Cell culture: building a better matrix. *Nature Methods*, 6, 619-22.
- BRICKER, E. M. 1950. Bladder substitution after pelvic evisceration. *Surg Clin North Am*, 30, 1511-21.
- CARMELIET, P. & JAIN, R. K. 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407, 249-57.
- CASTILLO-MARTIN, M., DOMINGO-DOMENECH, J., KARNI-SCHMIDT, O., MATOS, T. & CORDON-CARDO, C. 2010. Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis. *Urol Oncol*, 28, 401-8.
- CHOI, W., CZERNIAK, B., OCHOA, A., SU, X., SIEFKER-RADTKE, A., DINNEY, C. & MCCONKEY, D. J. 2014. Intrinsic basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer. *Nat Rev Urol*, 11, 400-10.
- 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.
- CLEVERS, H. 2013. The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell*, 154, 274-84.
- CLEVERS, H. 2016. Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell*, 165, 1586-97.
- CLEVERS, H. & TUVESON, D. A. 2019. Organoid Models for Cancer Research. *Annual Review of Cancer Biology*, 3, 223-34.
- DAMRAUER, J. S., HOADLEY, K. A., CHISM, D. D., FAN, C., TIGANELLI, C. J., WOBKER, S. E., YEH, J. J., MILOWSKY, M. I., IYER, G., PARKER, J. S. & KIM, W. Y. 2014. Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 3110-5.
- DEKKERS, J. F., WIEGERINCK, C. L., DE JONGE, H. R., BRONSVELD, I., JANSSENS, H. M., DE WINTER-DE GROOT, K. M., BRANDSMA, A. M., DE JONG, N. W., BIJVELDS, M. J., SCHOLTE, B. J., NIEUWENHUIS, E. E., VAN DEN BRINK, S., CLEVERS, H., VAN DER ENT, C. K., MIDDENDORP, S. & BEEKMAN, J. M. 2013. A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids. *Nat Med*, 19, 939-45.
- DROST, J. & CLEVERS, H. 2018. Organoids in cancer research. *Nat Rev Cancer*, 18, 407-18.

- DROST, J., KARTHAUS, W. R., GAO, D., DRIEHUIS, E., SAWYERS, C. L., CHEN, Y. & CLEVERS, H. 2016. Organoid culture systems for prostate epithelial and cancer tissue. *Nat Protoc*, 11, 347-58.
- GJOREVSKI, N., SACHS, N., MANFRIN, A., GIGER, S., BRAGINA, M. E., ORDONEZ-MORAN, P., CLEVERS, H. & LUTOLF, M. P. 2016. Designer matrices for intestinal stem cell and organoid culture. *Nature*, 539, 560-64.
- HAUTMANN, R. E., DE PETRICONI, R. C. & VOLKMER, B. G. 2011. 25 years of experience with 1,000 neobladders: long-term complications. *J Urol*, 185, 2207-12.
- HUCH, M., KNOBLICH, J. A., LUTOLF, M. P. & MARTINEZ-ARIAS, A. 2017. The hope and the hype of organoid research. *Development*, 144, 938-41.
- KIRKALI, Z., CHAN, T., MANOHARAN, M., ALGABA, F., BUSCH, C., CHENG, L., KIEMENEY, L., KRIEGMAIR, M., MONTIRONI, R., MURPHY, W. M., SESTERHENN, I. A., TACHIBANA, M. & WEIDER, J. 2005. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology*, 66, 4-34.
- KLEINMAN, H. K. & MARTIN, G. R. 2005. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol*, 15, 378-86.
- KRAYWINKEL, K., FIEBIG, J. & SCHULZ, B. 2018. Epidemiologie des Harnblasenkarzinoms in Deutschland. *Der Onkologe*, 01/2018, 6-13.
- KRETZSCHMAR, K. & CLEVERS, H. 2016. Organoids: Modeling Development and the Stem Cell Niche in a Dish. *Dev Cell*, 38, 590-600.
- LAZZERI, M. 2006. The physiological function of the urothelium--more than a simple barrier. *Urol Int*, 76, 289-95.
- 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, 515-28 e17.
- LIU, X., ORY, V., CHAPMAN, S., YUAN, H., ALBANESE, C., KALLAKURY, B., TIMOFEEVA, O. A., NEALON, C., DAKIC, A., SIMIC, V., HADDAD, B. R., RHIM, J. S., DRITSCHILO, A., RIEGEL, A., MCBRIDE, A. & SCHLEGEL, R. 2012. ROCK inhibitor and feeder cells induce the conditional reprogramming of epithelial cells. *Am J Pathol*, 180, 599-607.
- MARSHMAN, E., BOOTH, C. & POTTEN, C. S. 2002. The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays*, 24, 91-8.
- MORRISON, S. J., SHAH, N. M. & ANDERSON, D. J. 1997. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*, 88, 287-98.
- 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, 4567-74.
- PASIN, E., JOSEPHSON, D. Y., MITRA, A. P., COTE, R. J. & STEIN, J. P. 2008. Superficial bladder cancer: an update on etiology, molecular development, classification, and natural history. *Rev Urol*, 10, 31-43.

- PAULI, C., HOPKINS, B. D., PRANDI, D., SHAW, R., FEDRIZZI, T., SBONER, A., SAILER, V., AUGELLO, M., PUCA, L., ROSATI, R., MCNARY, T. J., CHURAKOVA, Y., CHEUNG, C., TRISCOTT, J., PISAPIA, D., RAO, R., MOSQUERA, J. M., ROBINSON, B., FALTAS, B. M., EMERLING, B. E., GADI, V. K., BERNARD, B., ELEMENTO, O., BELTRAN, H., DEMICHELIS, F., KEMP, C. J., GRANDORI, C., CANTLEY, L. C. & RUBIN, M. A. 2017. Personalized In Vitro and In Vivo Cancer Models to Guide Precision Medicine. *Cancer Discov*, 7, 462-77.
- RAMAZAN SEKEROGLU, M., AYDIN, S., DULGER, H., YILMAZ, Y., BAYRAKLI, H. & NOYAN, T. 2002. Diagnostic value of cytokeratin-18 as a tumor marker in bladder cancer. *Clin Biochem*, 35, 327-31.
- RICHIE, J. P., BONO, A., DENIS, L. J., JEWETT, M. A., KAKIZOE, T., KOTAKE, T., SHIRAI, T. & TEN KATE, F. J. 1998. Tumor, nodes, metastasis (TNM) classification of bladder cancer. *Urol Oncol*, 4, 90-3.
- SATO, T., VRIES, R. G., SNIPPERT, H. J., VAN DE WETERING, M., BARKER, N., STANGE, D. E., VAN ES, J. H., ABO, A., KUJALA, P., PETERS, P. J. & CLEVERS, H. 2009. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, 459, 262-65.
- SYLVESTER, R. J., VAN DER MEIJDEN, A. P., OOSTERLINCK, W., WITJES, J. A., BOUFFIOUX, C., DENIS, L., NEWLING, D. W. & KURTH, K. 2006. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol*, 49, 466-5; discussion 475-7.
- THUROFF, J. W., HAMPEL, C., LEICHT, W., GHEITH, M. K. & STEIN, R. 2012. [Indications for different types of urinary diversion]. *Urologe A*, 51, 473-6.
- TSUKUDA, M. & MIYAZAKI, K. 2013. DNA fragmentation caused by an overdose of Zeocin. *J Biosci Bioeng*, 116, 644-6.
- WEEBER, F., VAN DE WETERING, M., HOOGSTRAAT, M., DIJKSTRA, K. K., KRIJGSMAN, O., KUILMAN, T., GADELLAA-VAN HOOIJDONK, C. G., VAN DER VELDEN, D. L., PEEPER, D. S., CUPPEN, E. P., VRIES, R. G., CLEVERS, H. & VOEST, E. E. 2015. Preserved genetic diversity in organoids cultured from biopsies of human colorectal cancer metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 13308-11.
- YOSHIDA, T., OKUYAMA, H., NAKAYAMA, M., ENDO, H., NONOMURA, N., NISHIMURA, K. & INOUE, M. 2015. High-dose chemotherapeutics of intravesical chemotherapy rapidly induce mitochondrial dysfunction in bladder cancer-derived spheroids. *Cancer Sci*, 106, 69-77.
- YOSHIDA, T., SINGH, A. K., BISHAI, W. R., MCCONKEY, D. J. & BIVALACQUA, T. J. 2018. Organoid culture of bladder cancer cells. *Investig Clin Urol*, 59, 149-51.

## Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde von mir, Dominik Daub, im Universitätsklinikum Tübingen unter der Betreuung von Prof. Dr. Gerd Klein durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. Gerd Klein in Zusammenarbeit mit Dr. med. Niklas Harland.

Die Versuche und die statistische Auswertung wurden nach Einarbeitung von mir eigenständig durchgeführt.

Ich versichere, das Manuskript nach Anleitung von Prof. Dr. Gerd Klein selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Dominik Daub

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, herzlichst, für die großartige Unterstützung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Professor Gerd Klein, für die Überlassung des Themas, die wunderbare und sehr angenehme Betreuung während der gesamten Zeit sowie die große Mühe und Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bedanken bei:

Svenja Wingerter, für die unendliche Geduld und Unterstützung bei allen Fragen und Problemen, sowie für die kulinarischen Verfeinerungen des Laboralltags.

Herrn Dr. med. Niklas Harland, für die stets freundliche und sehr gute Betreuung des klinischen Bereichs meiner Arbeit.

Herrn Dr. rer. nat. André Koch und seinen MitarbeiterInnen für die Unterstützung und den hilfreichen Austausch, sowie für die Bereitstellung von Materialien.

Frau Rita Kapoor für die gute Einarbeitung und Hilfestellung, für ein stets offenes Ohr bei Fragen und für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor.

Allen Mitarbeitern und Kollegen im ZMF, die meine Zeit dort besonders gemacht haben und mir auf meinem Weg weitergeholfen haben.

Herrn Helmut Wolf, der wesentlich dazu beigetragen hat, dass ich diesen Weg eingeschlagen habe, meine Persönlichkeit besonders mitgeprägt hat und mir bis heute immer einen hilfreichen Ratschlag geben konnte.

Meinen Freunden, die immer für mich da sind und hinter mir stehen. Ohne euch wäre ich nicht der, der ich bin.

Meinen Eltern, die immer an mich glauben und mich so oft bestärkt haben, dass ich auch in den schwierigen Phasen wieder schnell zurück auf die richtige Spur gefunden habe. Ohne euch wäre ich nicht da, wo ich jetzt bin.

*>> Nur wer seinen eigenen Weg geht, kann Fußspuren hinterlassen. <<*

*-unbekannt-*