

Aus der
Universitätsklinik für Urologie Tübingen

**Wachstumsverhalten und Charakterisierung von in vitro-3D-
Zellkulturen des Harnblasenkarzinoms**

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

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

**vorgelegt von
Schneider, Johannes Maximilian**

2025

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Stenzl

2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Stubenrauch

Tag der Disputation: 09.04.2024

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Das Harnblasenkarzinom	2
1.1.1 Makro- und Mikroskopische Grundlagen der Harnblase	2
1.1.2 Epidemiologie	3
1.1.3 Ätiologie und Pathophysiologie	5
1.1.4 Klinik	7
1.1.5 Diagnostik	8
1.1.6 Histopathologie und Stadieneinteilung	9
1.1.7 Therapie	10
1.2 In-vitro und In-vivo Forschung am Urothelzellkarzinom	14
1.2.1 2D-Zellkultur an Zelllinien	14
1.2.2 3D-Zellkultur	16
1.2.3 Immunhistochemische Marker	20
1.3 Zielsetzung dieser Dissertation	23
2 Material und Methoden	25
2.1 Chemikalien und Reagenzien	25
2.1.1 Medien für Zellkultur und Charakterisierung	26
2.2 Geräte und Verbrauchsmittel	28
2.2.1 Geräte	28
2.2.2 Verbrauchsmittel	29
2.3 Probengewinnung	29
2.3.1 TUR-B (Transurethrale Resektion Blasentumor)	30
2.3.2 Zystektomie (Vollständige Entfernung der Harnblase)	30
2.3.3 Probentransport	30
2.4 Zellkultur	31

2.4.1	Isolierung der Tumorzellen	31
2.4.2	Dreidimensionale Zellkultur	32
2.4.3	Organoidkultur passagieren	33
2.4.4	Organoidkultur einfrieren	33
2.4.5	Organoidkultur auftauen	34
2.4.6	Medienwechsel	34
2.4.7	Mikroskopie und Vermessung von Organoiden	34
2.4.8	Auswertung der Größen-Messdaten	35
2.5	Charakterisierung	35
2.5.1	Antikörper	35
2.5.2	Herstellung von Kryoschnitten (Organoide)	36
2.5.3	Herstellung von Paraffinschnitten (Organoide)	36
2.5.4	Herstellung von Paraffinschnitten (Originaltumor)	38
2.5.5	3D-Immunfluoreszenz Färbung	38
2.5.6	Färbemethoden	39
2.6	Auswertung der Originaltumor-Färbungen	41
2.6.1	Digitalisierung der Objektträger	41
2.6.2	Digitale Mikroskopie und Bildexport in NDP.view2 – Software	41
2.6.3	Expressionsanalyse mittels Histoscore	42
3	Ergebnisse	43
3.1	Zellkultur	43
3.1.1	Übersicht aufgearbeiteter Proben	43
3.1.2	Gruppeneinteilung in „stabile bzw. variable Proliferation“	44
3.1.3	Limitationen der 3D-Zellkultur	45
3.1.4	Bilddokumentation	46
3.1.5	Wachstumskurven	48
3.2	Histologische Charakterisierung	54
3.2.1	Zellkultur-Ebene	54
3.2.2	Originaltumor-Ebene	58
3.3	Klinische Daten	75
4	Diskussion	77

4.1	Einfluss der Probeneigenschaften auf das Wachstumsverhalten in Zellkultur	77
4.2	BME als 3D-Matrix für Tumormodelle des Urothelzellkarzinoms	80
4.3	Wachstumsverläufe	81
4.4	Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Markerexpression bezogen auf das Wachstumsverhalten	83
4.4.1	Hohe GATA3-Expression als Charakteristikum der urothelialen Tumorzellen	83
4.4.2	Diffuse Ki-67 Verteilung als Zeichen von Stroma-unabhängiger Proliferation	83
4.4.3	Keine wesentlichen Unterschiede in der FGFR-3-Expression	85
4.4.4	Veränderte Zytokeratin-Expression als Zeichen für höheres Tumorstadium und Tumorigrad	85
4.4.5	p53- und p63-Expression lassen nur teilweise auf Wachstumsverhalten rückschließen	86
4.4.6	Unterschiedliche CD44-Expression lässt nicht auf das Wachstumsverhalten schließen	88
4.5	Zusammenhang Pathologischer Befund und Wachstumsverhalten	88
4.6	Schlussfolgerung	89
5	Zusammenfassung	91
6	Anhang	93
6.1	IHC-Bilder und Histoscore Auswertung „stabile Proliferation“	93
6.2	IHC-Bilder und Histoscore Auswertung „variable Proliferation“	104
7	Literaturverzeichnis	113
8	Erklärung zum Eigenanteil	121
9	Veröffentlichungen	122
10	Danksagung	122

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verteilung der Inzidenzen von Harnblasenkrebs weltweit. Zitiert aus: (Bray, Ferlay et al. 2018)	3
Abbildung 2: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2018; zitiert aus: Krebs in Deutschland für 2017/2018. 13. Ausgabe. S. 24. Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2021 (GEKID 2021)	4
Abbildung 3: Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten nach Geschlecht von 1999 - 2018/2019; Angaben je 100.000 (alter Europastandard); zitiert aus: Krebs in Deutschland für 2017/2018. 13. Ausgabe. S. 119. Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2021 (GEKID 2021).....	5
Abbildung 4: Klinische Einteilung des Harnblasenkarzinoms. Zitiert aus: (Tran, Xiao et al. 2021, S. 105)	9
Abbildung 5: Benötigte Materialien zur Aufarbeitung des Frishtumorgewebes (15 ml Zentrifugationsröhrchen mit rötlicher Flüssigkeit).	32
Abbildung 6: Paraffinblock mit Zellen zu BCO#185 1. Passage eingespannt im Mikrotom. An der Stelle, an der eigentlich das Zellpellet liegen sollte, wies der Block eine Luftblase auf (Bild links). Auch die weißlichen Stellen (Bild rechts) konnten nicht als paraffin-fixierte Organoide unter dem Mikroskop identifiziert werden.	46
Abbildung 7: Bilddokumentation BCO#140 3. Passage - Tag 2 bis 13 (D2 bis D13). Rotes Quadrat = Ausschnitt für 10x-Vergrößerung. Rote Zahl mit Klammer = Größenvermessung (nach Möglichkeit desselben Organoids). Oben Links Angabe des Tages (D2-13) und des entsprechenden Wells auf Zellkulturplatte zum Wiederauffinden der Stelle.....	47
Abbildung 8: Wachstumskurven der Organoid-Gruppe "stabile Proliferation" 0. Passage	48
Abbildung 9: Wachstumskurven der Organoid-Gruppe "variable Proliferation" 0. Passage. Das vermessene Organoid zu BCO#185 war zu D9 nicht mehr	

aufzufinden und hatte sich vermutlich aufgelöst. Dies wird durch den Nullwert an D9 repräsentiert.	49
Abbildung 10: Wachstumskurven der Organoid-Gruppe "stabile Proliferation" 1. Passage. Das anfangs vermessene Organoid zu BCO#154 war zu D15 nicht mehr aufzufinden. Dies wird durch den Nullwert an D15 repräsentiert. Im Anschluss wurde die Kultur in die nächste Passage überführt.	50
Abbildung 11: Wachstumskurven der Organoid-Gruppe "variable Proliferation" 1. Passage. Das anfangs vermessene Organoid zu BCO#208 war zum Zeitpunkt D13 nicht mehr aufzufinden. Dies wird durch den Nullwert am D13 repräsentiert. Im Anschluss wurde ein neues Organoid vermessen, das kontinuierlich Zuwachs um 40 µm zeigte.	51
Abbildung 13: Wachstumskurven der Organoid-Gruppe "stabile Proliferation" 2. Passage.	52
Abbildung 13: Wachstumskurven der Organoid-Gruppe "variable Proliferation" 2. Passage	52
Abbildung 14: Wachstumskurven der Organoid-Gruppe "stabile Proliferation" 3. Passage	53
Abbildung 15: BCO#122 0.P. - 3D-Immunfluoreszenz für CK5 und CK8/18 an Chamberslides. Dargestellt sind die drei genutzten Fluoreszenzkanäle blau (DAPI, Kerne), grün (CK5) und rot (CK8/18), sowie die Überlagerung der drei Fluoreszenzen. Vergrößerung 40x.	55
Abbildung 16: BCO#127 1.P. – 12 µm Kryoschnitt - Immunfluoreszenzfärbung für GATA3 und AE1AE3 . Dargestellt sind die drei genutzten Fluoreszenzkanäle blau (DAPI, Kerne), grün (GATA3) und rot (AE1AE3), sowie die Überlagerung der drei Fluoreszenzen. Vergrößerung 40x.	56
Abbildung 17: BCO#147 4.P. – 3 µm Paraffinschnitt - Immunfluoreszenzfärbung für GATA3 und AE1AE3 (Bilder freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Nizar Lipke). Dargestellt sind die drei genutzten Fluoreszenzkanäle blau (DAPI, Kerne), grün (GATA3) und rot (AE1AE3), sowie die Überlagerung der drei Fluoreszenzen. Vergrößerung 40x.	57
Abbildung 18: IHC Originaltumor K31055/20-2 (BCO#136). Paraffinschnitt 2,5 µm. Gelbes Quadrat in A zeigt Ausschnitt von B – J. A – H/E (5x – Maßstab: 500	

µm) + B – H/E (20x/Maßstab: 100 µm). C - CK7. D - CK20. E - GATA3. F - FGFR3. G - p53. H - p63. I - Ki47. J - CD44 (je 20x/Maßstab: 100 µm).....	58
Abbildung 19: Originaltumor zu BCO#140 Ausschnitt 2. Paraffinschnitt 2,5 µm. IHC-Färbung für CD44 (Bild links) und CK7 (Bild rechts). Es ist ein gegensätzliches Expressionsmuster für CD44 und CK7 zu beobachten. CD44-positive Zellen sind negativ für CK7 und umgekehrt.....	61
Abbildung 20: Gegenüberstellung unterschiedlicher Zellmorphologie. Oben - Originaltumor BCO#140 Ausschnitt 3. Unten - Originaltumor BCO#154-mal. Jeweils H/E-Färbung. Vergrößerung 20x. Maßstab: 100 µm.....	63
Abbildung 21: Grafische Darstellung der Markerexpression anhand des Histocores für Gruppe "stabile Proliferation". Da bei BCO#140 über das gesamte Präparat unterschiedliche Expressionsmuster beobachtet wurden, sind insgesamt drei Bildausschnitte (A1-3) analysiert worden.	64
Abbildung 22: IHC Originaltumor K12179/21-1 (BCO#180). Paraffinschnitt 2,5 µm. Gelbes Quadrat in A zeigt Ausschnitt von B – J. A – H/E (5x – Maßstab: 500 µm) + B – H/E (20x/Maßstab: 100 µm). C - CK7. D - CK20. E - GATA3. F - FGFR3. G - p53. H - p63. I - Ki47. J - CD44 (je 20x/Maßstab: 100 µm). Die Übersichtsabbildungen der H/E- und IHC-Färbungen sowie die zugehörigen Auswertungstabellen für die übrigen Originaltumore dieser Gruppe finden sich im Anhang unter 6.2.	65
Abbildung 23: Originaltumor zu BCO#189 Ausschnitt 1. Paraffinschnitt 2,5 µm. H/E-Färbung. Dicht gedrängte, klein geformte Zellen in der basalen Schicht. Gegen luminal Urothelzellen mit größeren Zellkörpern Vergrößerung 20x. Maßstab: 100 µm	67
Abbildung 24: Originaltumor zu BCO#189 Ausschnitt 2. Paraffinschnitt 2,5 µm. IHC-Färbung für GATA3 in nahezu allen Kernen vorhanden. Lediglich luminal gelegene Kerne scheinen schwächer gefärbt zu sein. Vergrößerung 20x. Maßstab: 100 µm	68
Abbildung 25: Originaltumor zu BCO#189 Ausschnitt 2. Paraffinschnitt 2,5 µm. IHC-Färbung für CK7 (Bild oben) und CK20 (Bild unten). Neben einer stark ausgeprägten Expression von CK7 über das gesamte Urothel) findet sich eine	

eher in den luminalen Zellschichten zu lokalisierende schwache CK20-Expression. Vergrößerung 20x. Maßstab: 100 µm	69
Abbildung 26: Originaltumor zu BCO#189. Paraffinschnitt 2,5 µm. IHC-Färbung für Ki67 für Ausschnitt 1 (oben) und Ausschnitt 2 (unten). Auffallend ist die durchgehende, ausschließlich basal vorhandene Expression von Ki67 in Ausschnitt 1, während in Ausschnitt 2 nur einzelne Urothel- und Stromazellen angefärbt sind. Vergrößerung 20x. Maßstab: 100 µm	70
Abbildung 27: Originaltumor zu BCO#208. Paraffinschnitt 2,5 µm. Die IHC-Färbung für p53 zeigt die am meisten ausgeprägte Expression innerhalb der Gruppe „variable Proliferation“ über alle Zellschichten hinweg. Vergrößerung 20x. Maßstab: 100 µm	71
Abbildung 28: Grafische Darstellung der Markerexpression anhand des Histocores für Gruppe "variable Proliferation". Wegen variabler Expression einzelner Marker im Präparat zu BCO#189, wurden analog zu BCO#140 zwei Bildausschnitte (A1-2) analysiert.	73
Abbildung 29: BCO#147 0. Passage an Tag 25. Links: Übersichtsaufnahme (10x); Rechts: 10x Vergrößerung des in der Übersicht mit rotem Quadrat markierten Bildausschnittes. Größtes vermessenes Organoid mit 200 µm Durchmesser.....	82
Abbildung 30: IHC Originaltumor K31506/20-3 (BCO#140) – Ausschnitt 1. Paraffinschnitt 2,5 µm. Gelbes Quadrat in A zeigt Ausschnitt von B – J. A – H/E (5x – Maßstab: 500 µm) + B – H/E (20x/Maßstab: 100 µm). C - CK7. D - CK20. E - GATA3. F - FGFR3. G - p53. H - p63. I - Ki47. J - CD44 (je 20x/Maßstab: 100 µm). Stärkste Expression von p63 und CD44 über alle Schichten. GATA3 mittelstark über alle Schichten. Ki67 diffus verteilt. Keine Expression für CK7, CK20, FGFR3, p53.	93
Abbildung 31: IHC Originaltumor K31506/20-3 (BCO#140) – Ausschnitt 2. Paraffinschnitt 2,5 µm. Gelbes Quadrat in A zeigt Ausschnitt von B – J. A – H/E (5x – Maßstab: 500 µm) + B – H/E (20x/Maßstab: 100 µm). C - CK7. D - CK20. E - GATA3. F - FGFR3. G - p53. H - p63. I - Ki47. J - CD44 (je 20x/Maßstab: 100 µm). Unterschiedlich intensive Anfärbbarkeit der Urothelzellen für H/E (B: links – schwach, rechts – stark). Stärkste Expression von CK7, GATA3, CD44 über alle	

Zellschichten. CK7 verhält sich gegensätzlich zu CD44. GATA3 (E) rechts stark, links schwächer. p63 ebenfalls stark und nur basal. Ki67-Expression diffus verteilt. Keine Expression von CK20, FGFR3, p53..... 95

Abbildung 32: IHC Originaltumor K31506/20-3 (BCO#140) – Ausschnitt 3. Paraffinschnitt 2,5 µm. Gelbes Quadrat in A zeigt Ausschnitt von B – J. A – H/E (5x – Maßstab: 500 µm) + B – H/E (20x/Maßstab: 100 µm). C - CK7. D - CK20. E - GATA3. F - FGFR3. G - p53. H - p63. I - Ki47. J - CD44 (je 20x/Maßstab: 100 µm). Zellen innerhalb der Urothelschichten morphologisch zum großen Teil kleiner und unregelmäßiger geformt als in Ausschnitt 1 und 2. Kräftige Anfärbbarkeit aller Zellen innerhalb des Urothels für H/E. Stärkste Expression von CK7 in Urothelzellen von größerer Morphologie (C – rechts). Ebenfalls stärkste Expression von Ki67 über alle Schichten. Schwache Expression von CD44 in CK7-positiven Zellen und in basalen Zellschichten. Keine Expression von CK20, GATA3, FGFR3, p53, p63..... 97

Abbildung 33: IHC Originaltumor K1375/21-5 (BCO#147). Paraffinschnitt 2,5 µm. Gelbes Quadrat in A zeigt Ausschnitt von B – J. A – H/E (5x – Maßstab: 500 µm) + B – H/E (20x/Maßstab: 100 µm). C - CK7. D - CK20. E - GATA3. F - FGFR3. G - p53. H - p63. I - Ki47. J - CD44 (je 20x/Maßstab: 100 µm). 99

Abbildung 34: IHC Originaltumor K2946/21-5 (BCO#154-ben.). Paraffinschnitt 2,5 µm. Gelbes Quadrat in A zeigt Ausschnitt von B – J. A – H/E (5x – Maßstab: 500 µm) + B – H/E (20x/Maßstab: 100 µm). C - CK7. D - CK20. E - GATA3. F - FGFR3. G - p53. H - p63. I - Ki47. J - CD44 (je 20x/Maßstab: 100 µm)..... 101

Abbildung 35: IHC Originaltumor K2946/21-13 (BCO#154-mal.). Paraffinschnitt 2,5 µm. Gelbes Quadrat in A zeigt Ausschnitt von B – J. A – H/E (5x – Maßstab: 500 µm) + B – H/E (20x/Maßstab: 100 µm). C - CK7. D - CK20. E - GATA3. F - FGFR3. G - p53. H - p63. I - Ki47. J - CD44 (je 20x/Maßstab: 100 µm)..... 103

Abbildung 36: IHC Originaltumor K13430/21-1 (BCO#185). Paraffinschnitt 2,5 µm. Gelbes Quadrat in A zeigt Ausschnitt von B – J. A – H/E (5x – Maßstab: 500 µm) + B – H/E (20x/Maßstab: 100 µm). C - CK7. D - CK20. E - GATA3. F - FGFR3. G - p53. H - p63. I - Ki47. J - CD44 (je 20x/Maßstab: 100 µm)..... 105

Abbildung 37: IHC Originaltumor K14073/21-8 (BCO#189) – Ausschnitt 1. Paraffinschnitt 2,5 µm. Gelbes Quadrat in A zeigt Ausschnitt von B – J. A – H/E

(5x – Maßstab: 500 µm) + B – H/E (20x/Maßstab: 100 µm). C - CK7. D - CK20. E - GATA3. F - FGFR3. G - p53. H - p63. I - Ki47. J - CD44 (je 20x/Maßstab: 100 µm).....	107
Abbildung 38: IHC Originaltumor K14073/21-8 (BCO#189) – Ausschnitt 2. Paraffinschnitt 2,5 µm. Gelbes Quadrat in A zeigt Ausschnitt von B – J. A – H/E (5x – Maßstab: 500 µm) + B – H/E (20x/Maßstab: 100 µm). C - CK7. D - CK20. E - GATA3. F - FGFR3. G - p53. H - p63. I - Ki47. J - CD44 (je 20x/Maßstab: 100 µm).....	109
Abbildung 39: IHC Originaltumor K17393/21-1 (BCO#208). Paraffinschnitt 2,5 µm. Gelbes Quadrat in A zeigt Ausschnitt von B – J. A – H/E (5x – Maßstab: 500 µm) + B – H/E (20x/Maßstab: 100 µm). C - CK7. D - CK20. E - GATA3. F - FGFR3. G - p53. H - p63. I - Ki47. J - CD44 (je 20x/Maßstab: 100 µm).....	111

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ausschnitt aus „WHO Global Health Estimates: Leading causes of death“ UND „Leading causes of DALYs“ aus dem Jahr 2019; DALY, disability-adjusted-life-years.	1
Tabelle 2: Liste der Grundmedien und deren Herstellern	25
Tabelle 3: Liste der Medienzusätze und deren Hersteller.....	25
Tabelle 4: Liste der Enzyme und deren Hersteller	26
Tabelle 5: Liste sonstiger Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller	26
Tabelle 6: Liste der Geräte mit Herstellerinformationen	28
Tabelle 7: Liste der Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller.....	29
Tabelle 8: Auflistung Antikörper für Immunhistochemie.....	35
Tabelle 9: Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen. C = Chamberslides, K = Kryoschnitte	36
Tabelle 10: Programmablauf Gewebeeinfiltration.....	37
Tabelle 11: Programmablauf TissueTek Prisma Plus H/E-Färbemaschine.....	40
Tabelle 12: Histoscore Bewertungssystem.....	42
Tabelle 13: Zusammenfassung aller Proben, die nach Protokoll in einer Organoidkultur angesetzt wurden. Einzelne Proben (grau hinterlegt) sind nachträglich aus tiefgefrorener Einzelzellsuspension aus dem Stickstofftank	

aufgetaut worden und wurden deshalb nicht gewogen. Die Herkunft des ursprünglichen Ausgangsmaterials, das zugehörige Gewicht und die Anzahl der Passagen in der Primärkultur sind bei diesen Kulturen in Klammern gesetzt. Für BCO#134 wurden nur kleinste Gewebefetzen überliefert, die aus technischen nicht gewogen werden konnten. Cx = Zystektomie, TUR-B = Transurethrale Resektion Blasen tumor, NUE = Nephroureterektomie.	43
Tabelle 14: Anzahl der Organoidkulturen, die die jeweilige Passage erreicht haben. BCO#140, BCO#147 und BCO#154-mal. werden in dieser Auflistung nicht berücksichtigt. Von ihnen ist bekannt, dass sie > 5 Passagen erreicht haben.	44
Tabelle 15: Gruppeneinteilung für weitere Analyse	45
Tabelle 16: Histoscore-Auswertung K31055/20-2 (BCO#136)	59
Tabelle 17: K31055/20-2 (BCO#136). Markerexpression über die drei Schichten des Urothels: Basale, intermediäre und superfizielle Zellschicht. War die Expression keiner der Schichten eindeutig zuzuordnen, wurde die Kategorie „diffus“ vergeben. Für Auswertungstabellen der übrigen Tumore siehe Anhang.	60
Tabelle 18: Gegenüberstellung der durchschnittlichen Histoscore-Punkte beider Gruppen. Die Punktzahlen aller analysierten Bildausschnitte wurden addiert und durch die Anzahl der Bildausschnitte geteilt („stabile Proliferation“ sieben Bildausschnitte; „variable Proliferation“ fünf Bildausschnitte).	73
Tabelle 19: Ergebnisse der pathologischen Untersuchung der korrespondierenden Originaltumoren - Gruppe „stabile Proliferation“. Das Gewebe von BCO#140 und BCO#154 stammt aus zwei Operationen desselben Patienten im Abstand von zwei Monaten. NUE = Nephroureterektomie. ¹ Alter zum Zeitpunkt der Probenentnahme.....	75
Tabelle 20: Ergebnisse der pathologischen Untersuchung der korrespondierenden Originaltumoren - Gruppe „variable Proliferation“. ¹ Alter zum Zeitpunkt der Probenentnahme.	76
Tabelle 21 Auflistung aller persönlich betreuten Kulturen (inkl. BCO#136 von Nizar Lipke) sortiert nach Anzahl der Passagen. Gewicht von BCO#134 war nicht messbar. Bei Proben, die aus gefrorener Einzelzellsuspension aufgetaut wurden	

(grau hinterlegt), bezieht sich die Gewichtsangabe auf das Gewicht des Ursprunggewebes der Primärkultur.	79
Tabelle 22: Histoscore-Auswertung K31506/20-3 (BCO#140) – Ausschnitt 1..	93
Tabelle 23: K31506/20-3 (BCO#140) – Ausschnitt 1. Markerexpression über die drei Schichten des Urothels: Basale, intermediäre und superfizielle Zellschicht. War die Expression keiner der Schichten eindeutig zuzuordnen, wurde die Kategorie „diffus“ vergeben.....	94
Tabelle 24: Histoscore-Auswertung K31506/20-3 (BCO#140) – Ausschnitt 2..	95
Tabelle 25: K31506/20-3 (BCO#140) – Ausschnitt 2. Markerexpression über die drei Schichten des Urothels: Basale, intermediäre und superfizielle Zellschicht.	96
Tabelle 26: Histoscore-Auswertung K31506/20-3 (BCO#140) – Ausschnitt 3..	97
Tabelle 27: K31506/20-3 (BCO#140) – Ausschnitt 3. Markerexpression über die drei Schichten des Urothels: Basale, intermediäre und superfizielle Zellschicht.	98
Tabelle 28: Histoscore-Auswertung K1375/21-5 (BCO#147)	99
Tabelle 29: K1375/21-5 (BCO#147). Markerexpression über die drei Schichten des Urothels: Basale, intermediäre und superfizielle Zellschicht. Für dieses Präparat konnte keine Polarität bzw. kein eindeutiges Urothel mit allen Schichten identifiziert werden. Deshalb wurde dieser Originaltumor nicht hinsichtlich der Polarität ausgewertet.	100
Tabelle 30: Histoscore-Auswertung K2946/21-5 (BCO#154-ben.)	101
Tabelle 31: K2946/21-5 (BCO#154-ben.). Markerexpression über die drei Schichten des Urothels: Basale, intermediäre und superfizielle Zellschicht....	102
Tabelle 32: Histoscore-Auswertung K2946/21-5 (BCO#154-mal.)	103
Tabelle 33: K2946/21-13 (BCO#154-mal.). Markerexpression über die drei Schichten des Urothels: Basale, intermediäre und superfizielle Zellschicht....	104
Tabelle 34: Histoscore-Auswertung K12179/21-1 (BCO#180)	104
Tabelle 35: K12179/21-1 (BCO#180). Markerexpression über die drei Schichten des Urothels: Basale, intermediäre und superfizielle Zellschicht.....	105
Tabelle 36: Histoscore-Auswertung K13430/21-1 (BCO#185)	106

Tabelle 37: K13430/21-1 (BCO#185). Markerexpression über die drei Schichten des Urothels: Basale, intermediäre und superfizielle Zellschicht.....	106
Tabelle 38: Histoscore-Auswertung K14073/21-8 (BCO#189) – Ausschnitt 1	107
Tabelle 39: K14073/21-8 (BCO#189) – Ausschnitt 1. Markerexpression über die drei Schichten des Urothels: Basale, intermediäre und superfizielle Zellschicht.	108
Tabelle 40: Histoscore-Auswertung K14073/21-8 (BCO#189) – Ausschnitt 2	109
Tabelle 41: K14073/21-8 (BCO#189) – Ausschnitt 2. Markerexpression über die drei Schichten des Urothels: Basale, intermediäre und superfizielle Zellschicht.	110
Tabelle 42: Histoscore-Auswertung K17393/21-1 (BCO#208)	111
Tabelle 43: K17393/21-1 (BCO#208). Markerexpression über die drei Schichten des Urothels: Basale, intermediäre und superfizielle Zellschicht.....	112

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ben.	benigne
BSA	Bovines Serumalbumin
mal.	maligne
PBS	phosphate-buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
RT	Raumtemperatur

1 Einleitung

Für den Erhalt und die stetige Verbesserung der menschlichen Gesundheit ist es wichtig die Auslöser für Krankheiten zu kennen und deren Stellenwert in einem globalen Kontext einordnen zu können. Krebserkrankungen spielen dabei weltweit betrachtet eine besondere Rolle. Im Jahr 2019 konnten 17% der weltweiten Gesamtmortalität auf maligne Neoplasien zurückgeführt werden. Häufiger waren nur noch Tode durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen mit 32,2% (WHO 2019, "Leading causes of death 2000-2019"). Nicht nur die hohe Mortalität, sondern auch die Einschränkung der Lebensqualität durch Krebserkrankungen macht die Relevanz dieser deutlich. Als anerkanntes Maß für die Beeinträchtigung durch Krankheit gelten die „disability-adjusted life years“ – kurz DALYs. Auch hier zählen maligne Neoplasien zu den Top 3 Krankheiten, die die meisten DALYs weltweit verursachen (WHO 2019, "Leading causes of DALYs 2000-2019"). Um die Therapie und Früherkennung von Krebserkrankungen zu verbessern, bedarf es einem besonderen Augenmerk auf die onkologische Forschung.

Tabelle 1: Ausschnitt aus „WHO Global Health Estimates: Leading causes of death“ UND „Leading causes of DALYs“ aus dem Jahr 2019; DALY, disability-adjusted-life-years.

	Mortalität (absolut in Mio.)	Mortalität (relativ in %)	DALYs (in Mio.)	DALYs (in %)
Gesamt	55,416	100	2531,710	100
Herz-Kreislauf- Erkrankungen	17,864	32,2	388,295	15,0
Maligne Neoplasien (gesamt)	9,435	17,0	245,349	9,7
Atemwegserkrankungen	4,137	7,5	106,478	4,0

Im Bereich der urologischen Onkologie sticht das Harnblasenkarzinom mit einem besonders hohen Rate an Rezidiv-Fällen hervor und das trotz Jahrzehnte langer Forschung. Diese Art von Erkrankungen mit hoher Rezidiv-Rate sind zunächst aus medizinischer Sicht für Betroffene sehr belastend, setzen aber auch aus

ökonomischer Sicht das Gesundheitssystem durch nötige Diagnostik und Therapie massiv unter Druck. Unter anderem aus diesem Grund soll diese Arbeit einen kleinen Teil zum Feld der Forschung am Harnblasenkarzinom beitragen, um Schaden und Leid für Mensch und Gesellschaft in Zukunft zu reduzieren.

1.1 Das Harnblasenkarzinom

1.1.1 Makro- und Mikroskopische Grundlagen der Harnblase

Die Harnblase befindet sich extra- bzw. präperitoneal im kleinen Becken direkt dorsal der Symphyse. Die kraniale Fläche ist dabei mit Peritoneum bedeckt. Die Größe dieses glattmuskulären Hohlorgans variiert je nach Füllungszustand und kann beim gesunden Erwachsenen bis zu 500 ml betragen. Über die zwei dorsokaudal einmündenden Uretren wird der von der Niere produzierten Harn ein- und über die kaudal mündende Urethra wieder ausgeleitet. Die Blasenwand besteht zum größten Teil aus drei Schichten glatter Muskulatur mit unterschiedlichen Faserzügen.

Von innen wird die Harnblase durch ein spezialisiertes mehrschichtiges Epithel ausgekleidet. Da die Anzahl der Zellschichten je nach Füllungszustand der Blase variiert, wird es auch Übergangsepithel oder Urothel genannt. Das Urothel besteht im Wesentlichen aus drei Zellschichten: Superfizial-, Intermediär- und Basalzellschicht. Die Superfizialzellschicht wird aus einer einzigen Lage von Zellen gebildet, die über tight-junctions in Verbindung stehen. Da diese Zellen so den toxischen Urin gegenüber dem Körperinneren abschirmen werden sie auch „Schirmzellen“ genannt. Darüber hinaus spielen diese Zellen eine wichtige Rolle in der Anpassung des Urothels an unterschiedliche Füllungsvolumina, da sie über oberflächlich gelegene Vesikel variabel Zellmembranbestandteile ein- oder auslagern können und somit die Innenfläche der Blase entsprechend vergrößern oder verkleinern. Die darunter gelegene Intermediärzellschicht besteht aus birnenförmigen Zellen, die sich je nach Füllungsvolumen zu einer oder mehreren Schichten übereinander anlagern. Die Basalzellen organisieren sich wieder einschichtig und beinhalten vor allem Stammzellen, die für die Regeneration des Urothels von Bedeutung sind (Dalghi, Montalbetti et al. 2020)

1.1.2 Epidemiologie

Mit etwa 550.000 neu registrierten Fällen machte das Harnblasenkarzinom im Jahr 2018 etwa 3% aller Krebsdiagnosen weltweit aus. Bei der Verteilung dieser Fälle auf die verschiedenen Kontinente (siehe Abbildung 1) fällt auf, dass die niedrigsten Inzidenzen in Entwicklungs- und Schwellenländern in Afrika, Südamerika und Asien zu finden sind (Bray, Ferlay et al. 2018).

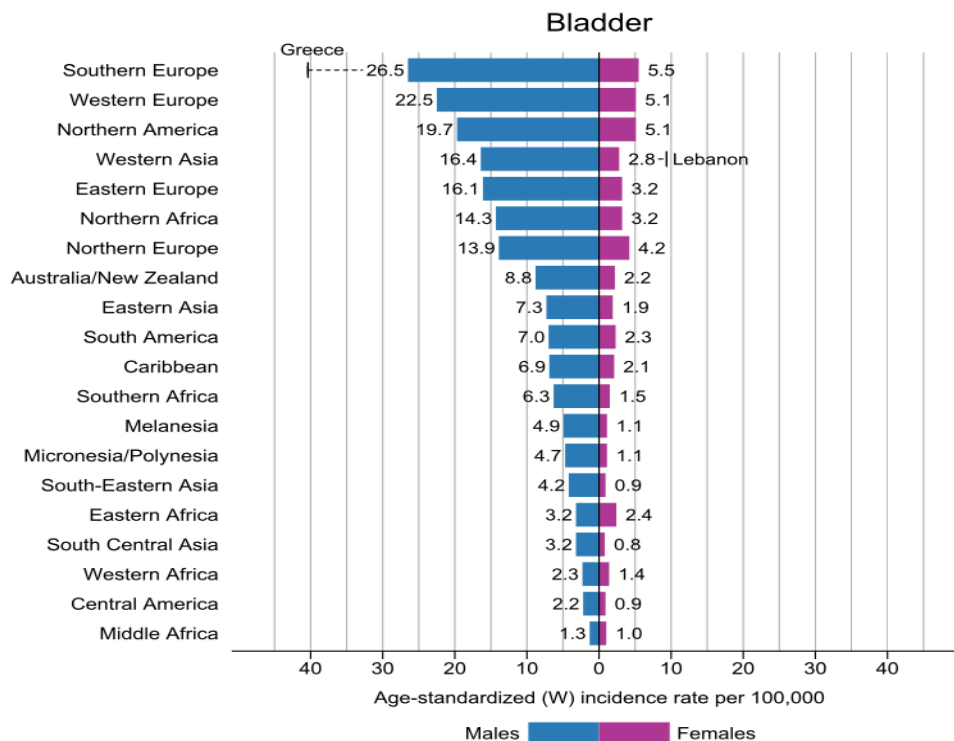


Abbildung 1: Verteilung der Inzidenzen von Harnblasenkrebs weltweit. Zitiert aus: (Bray, Ferlay et al. 2018)

In epidemiologischen Studien zum Thema Harnblasenkrebs konnte eine signifikante Korrelation zwischen Neuerkrankungen in einem Land und dem jeweiligen „human development index“ (HDI) – ein Maß für den Entwicklungsstand eines Landes – belegt werden. Eine Erklärung hierfür ist die möglicherweise geringere Exposition gegenüber Risikofaktoren (z.B. industrielle Giftstoffe, Tabakkonsum) in diesen Ländern im Vergleich zu industrialisierten Ländern der westlichen Welt (Saginala, Barsouk et al. 2020). (für Risikofaktoren siehe Ätiologie und Pathophysiologie) In einem Industrieland wie Deutschland lässt sich diese Beobachtung bestätigen. Im Jahr 2018 machten 18.270 neu

diagnostizierte Fälle von Harnblasenkrebs ca. 3,7% aller Krebsneuerkrankungen aus, womit der Anteil über dem weltweiten Durchschnitt von 3% lag (GEKID 2021). Ebenfalls über dem weltweiten Durchschnitt liegen die USA, wo im Jahr 2019 4,6% aller neu Krebsdiagnosen auf Harnblasenkarzinome zurückzuführen waren. Bei der Interpretation der höheren Inzidenz- und Prävalenz-Zahlen in Industrieländern sollte allerdings auch die bessere Ausstattung und der allgemein leichtere Zugang zur Gesundheitsinfrastruktur berücksichtigt werden, wodurch automatisch mehr Neuerkrankungen entdeckt werden können.

Insgesamt gibt eine deutliche Differenz in der Geschlechterverteilung der Erkrankung, wobei Männer von einem bis zu vierfach erhöhten Risiko gegenüber Frauen betroffen sind. Abbildung 2 zeigt, dass die Harnblase eine deutlich häufigere Tumorlokalisation beim Mann ist.

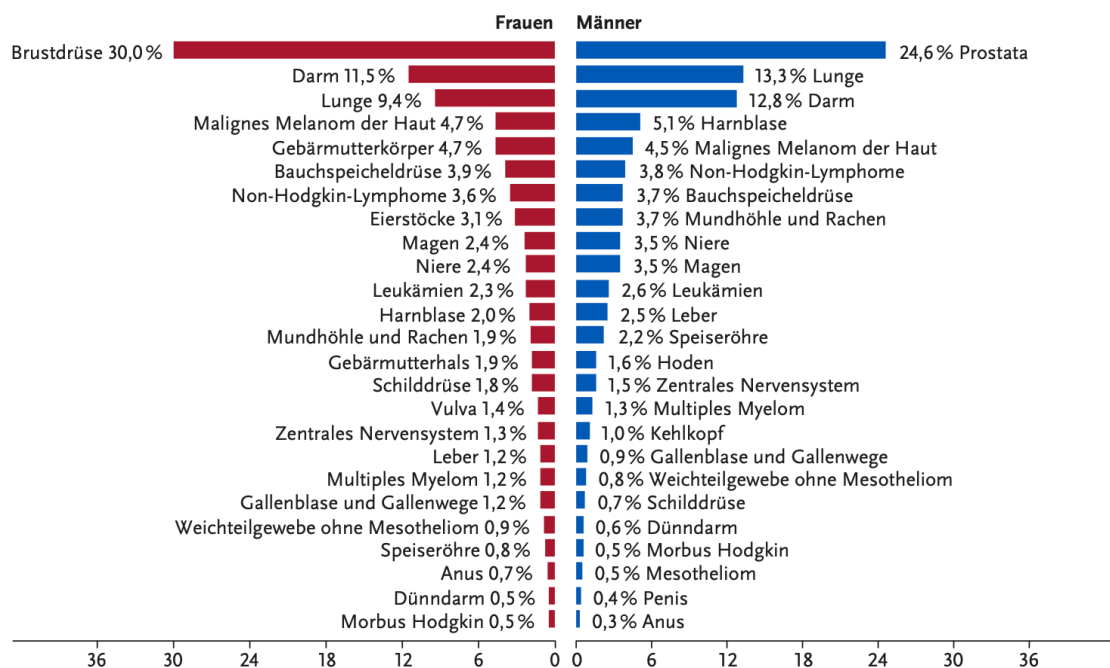


Abbildung 2: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2018; zitiert aus: Krebs in Deutschland für 2017/2018. 13. Ausgabe. S. 24. Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2021 (GEKID 2021)

Dieser Unterschied erklärt sich am ehesten durch die geschlechterspezifischen Unterschiede bei der Intensität von Tabakkonsum, welcher als einer der größten Risikofaktoren für das Harnblasenkarzinom angesehen wird (Saginala, Barsouk

et al. 2020). Allgemein handelt es sich um eine Erkrankung des höheren Lebensalters. Daten aus den USA zeigten, dass über 90% der Patient*innen mit der Diagnose „Harnblasenkarzinom“ 55 Jahre und älter sind. Das Durchschnittsalter bei Diagnosestellung liegt bei 73 Jahren (Saginala, Barsouk et al. 2020). Der hohe Altersgipfel ist ein weiterer Grund dafür, warum in westlichen Ländern mit einer tendenziell höheren Lebenserwartung auch die Inzidenz für maligne Erkrankungen der Harnblase höher ist, als in Ländern mit niedrigerer Lebenserwartung.

Über die letzten 20 Jahre gesehen erkennt man in der altersstandardisierten Bevölkerung Deutschlands eine rückläufige Inzidenz- und Sterberate bei Männern (siehe Abbildung 3), während die von Frauen weitestgehend gleichgeblieben ist. Diese Beobachtung führt man, wie bereits erwähnt, auf bessere Maßnahmen beim Arbeitsschutz bzgl. beruflicher Exposition gegenüber Giftstoffen als auch auf einen Rückgang beim Tabakkonsum zurück.

1.1.3 Ätiologie und Pathophysiologie

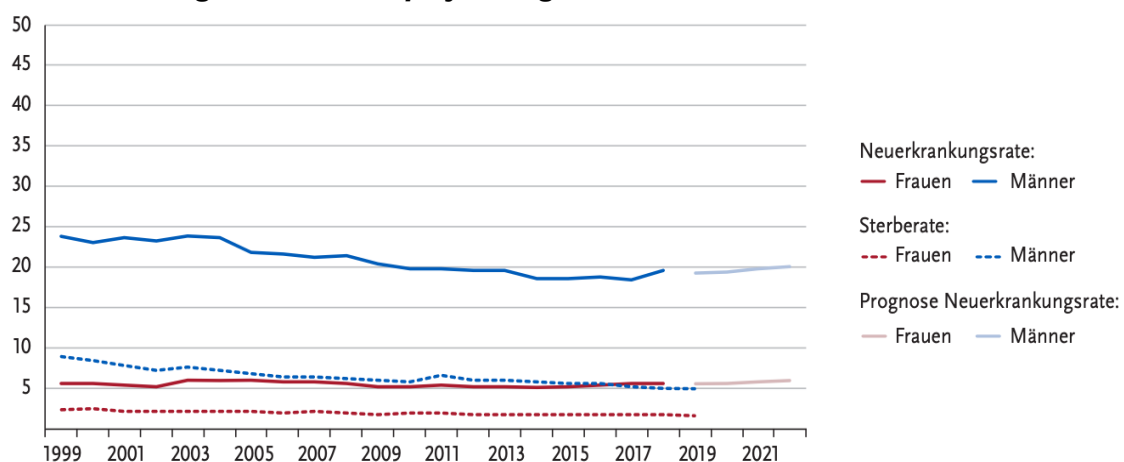


Abbildung 3: Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten nach Geschlecht von 1999 - 2018/2019; Angaben je 100.000 (alter Europastandard); zitiert aus: Krebs in Deutschland für 2017/2018. 13. Ausgabe. S. 119. Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.). Berlin, 2021 (GEKID 2021)

Neben der Regulation des Flüssigkeitshaushalts sind die Nieren und ableitenden Harnwege (Ureter, Harnblase, Urethra) für die Beseitigung von giftigen Substanzen zuständig, die im Stoffwechsel anfallen oder von außen auf den

Körper einwirken (z.B. Rauchen). Die Harnblase dient dabei als Reservoir für eine Flüssigkeit (Urin), in der diese Stoffe hoch konzentriert sind. Als Folge stehen die spezialisierten Urothelzellen permanent in der Auseinandersetzung mit potenziell zytotoxischen und krebserregenden Substanzen, was erklärt, dass die malignen Erkrankungen der Harnblase zu einem großen Teil auf die Exposition gegenüber Giftstoffen zurückzuführen sind.

Eine zentrale Rolle spielt dabei der Tabakkonsum, welcher in 50-60% der Fälle als Verursacher des Harnblasenkrebs gilt. Das Rauchen im Allgemeinen erhöht das Risiko für die Erkrankung um den Faktor 3 bis 4. Als Pathomechanismus wird eine permanente Entzündung und DNA-Schädigung durch im Zigarettenrauch enthaltene Giftstoffe wie β -Naphthylamine und polyzyklisch-aromatische Kohlenwasserstoffverbindungen (PAK) vermutet (Saginala, Barsouk et al. 2020).

Als zweithäufigster vermeidbarer Risikofaktor (18% der Fälle) wird die berufliche Giftstoffexposition in der Industrie (v.a. Farb-, Lack-, Gummi-, Metall-Produkte) für das Auftreten von Blasenkrebs verantwortlich gemacht. Dabei gelten – neben den bereits erwähnten PAK – aromatische Amine und Chlorkohlenwasserstoffe als bekannte Toxine. Sowohl beim Kontakt mit Giftstoffen am Arbeitsplatz als auch durch Tabakkonsum wird eine lange Latenzperiode von bis zu 30 Jahren zwischen erster Exposition und Krankheitsdiagnose beobachtet (Saginala, Barsouk et al. 2020).

Berufliche Giftexposition und Rauchen sind also die zwei größten Risikofaktoren für das Auftreten von Harnblasenkrebs. Insgesamt sind 81% der Fälle auf solche vermeidbaren Risikofaktoren zurückzuführen, was deutlich macht, warum Arbeitsschutz und groß angelegte Aufklärungsprogramme gegen Tabakkonsum für die Prävention der Erkrankung von großer Bedeutung sind (Al-Zalabani, Stewart et al. 2016).

Neben der Ätiologie durch Giftstoffe ist eine parasitäre Wurminfektion als Verursacher von Blasenkrebs zu nennen. Plattwürmer der Spezies *Schistosomiasis haematobium* (SH) nutzen für Ihre Vermehrung Menschen und Süßwasserschlangen als Wirte und sind in tropischen Ländern endemisch (Zaghloul 2012). Mit 240 Mio. Infektionen weltweit zählt SH direkt nach *Malaria*

zu den am meisten gefürchteten tropischen Erregern (Saginala, Barsouk et al. 2020). Der Zusammenhang zwischen einer Infektion mit *SH* und Harnblasenkrebs wurde bereits 1911 durch den Arzt A.R. Ferguson in Ägypten beschrieben. Er beobachtete eine vergleichbar hohe Inzidenz von malignen Erkrankungen der Harnblase und brachte sie mit der Irritation der Blase durch die Eier des Parasiten in Verbindung, die er durch Gewebeanalysen von Körperspendern nachweisen konnte (Ferguson 1911). Aus weiteren epidemiologischen Studien der letzten 100 Jahre weiß man, dass die Inzidenz von *SH* und diese von Harnblasenkrebs eng miteinander korrelieren. In einer großen retrospektiven Analyse von fast 10.000 Probanden in Ägypten, wo allgemein eine sehr hohe Inzidenz an malignen Erkrankungen der Harnblase vorherrscht, konnte man mit dem Rückgang von *SH*-Infektionen durch Präventionsprogramme (großflächiger Einsatz von antiparasitären Medikamenten) im Zeitraum zwischen 1970 und 2007 ebenfalls einen Rückgang des Neuauftretens von Blasenkrebs beobachten (Gouda, Mokhtar et al. 2007). Ein eindeutiger Pathomechanismus, der direkt auf die Infektion mit *SH* zurückzuführen ist, konnte bisher nicht geklärt werden. Es ist aber bekannt, dass die Würmer über den Kontakt mit Süßwasser den Menschen befallen und über mehrere Stationen in das venöse Gefäßsystem der Harnblase wandern. Wie bereits von Ferguson beschrieben vermehren sie sich dort und legen ihre Eier in der Blasenwand ab, wo diese über den Urin wieder ausgeschieden werden. Man vermutet, dass durch die Besiedelung permanente Inflammation, Fibrosierung und bakterielle Super-Infektionen begünstigt werden und die Infektion mit *SH* auf diese Weise zur Entstehung von Harnblasenkrebs beiträgt. Dabei handelt es meist um die histologische Differenzierung als Plattenepithelkarzinom, welches durch ein aggressiveres Tumorwachstum charakterisiert ist (siehe 1.1.6 Histopathologie und Stadieneinteilung) (Zaghloul 2012).

1.1.4 Klinik

In den frühen Stadien macht sich das Harnblasenkarzinom meistens durch das charakteristische Leitsymptom der schmerzlosen Makrohämaturie (seltener auch Mikrohämaturie) bemerkbar. Darüber hinaus beschreiben Patient*innen oft Blasenfunktionsstörungen wie Dysurie, Pollakisurie, Nykturie oder

Kontinenzstörungen. Während die weitere Klinik und die körperliche Untersuchung meist unauffällig bleibt, zeigen in der Regel nur Erkrankungen im fortgeschrittenen metastasierten Stadium Symptome wie abdominale Beschwerden, Hautveränderungen oder Tumorkachexie (DeGeorge, Holt et al. 2017).

1.1.5 Diagnostik

Für die Sicherung der Diagnose stehen eine fokussierte Anamnese mit klinischen Symptomen und die körperliche Untersuchung an erster Stelle. Im weiteren Verlauf stellt die transurethrale Zystoskopie mit histologischer Sicherung des potenziell malignen Gewebes den absoluten Goldstandard dar. Daneben stehen verschiedene bildgebende, urinzytologische und auch biomarkerbasierte Verfahren zur Verfügung, von denen bisher allerdings keines in Sensitivität und Spezifität der Zystoskopie überlegen ist. Nach den aktuellen EAU Leitlinien von 2021 sind für die Bildgebung CT Urographie (CTU) und Sonografie Mittel der Wahl (Babjuk, Burger et al. 2022). Die CTU ist dabei insofern der Sonografie überlegen, da sie ebenfalls adäquate Beurteilung der oberen ableitenden Harnwege (Nieren, Urethren) zulässt. Dennoch sind positive Befunde in der CTU kritisch zu betrachten, da oft mit benignen Läsionen (z.B. Inflammation, benigne Prostatahyperplasie) verwechselt werden können (Trinh, Glazer et al. 2018).

Auch die Ergebnisse der Urinzytologie – der Analyse von Urin auf tumorsuspekte Zellen mittels Mikroskopie – können durch benigne Konstellationen verfälscht werden. Während die hohe Spezifität von bis zu 90% zu den Stärken des Verfahrens zählt, lässt die schwache Sensitivität von nur 48% nicht zu, die diagnostische Zystoskopie damit zu ersetzen (Babjuk, Burger et al. 2022). Dies ist u.a. der Tatsache geschuldet, dass die Urinzytologie stark vom Untersucher und dessen Fachkompetenz abhängig ist (Raitanen, Aine et al. 2002). Um diesem Problem zu begegnen, wurden biomarkerbasierte Tests (z.B. Nachweis von Nuclear Matrix Protein 22 im Urin) entwickelt, die mit standardisierten Methoden objektifizierbare Ergebnisse liefern können. Sowohl die Urinzytologie als auch die Biomarker-Verfahren zeigen schwache Sensitivität in der Erkennung

von low-grade Tumoren. Die Kombination beider Verfahren miteinander ist ein Ansatz, um dieses Defizit auszugleichen (Yafi, Brimo et al. 2015).

Trotz der vermeidlichen Schwächen der urinbasierten Diagnostik werden sich Weiterentwicklungen auf diesem Gebiet lohnen. Denn diese nicht-invasiven Testverfahren könnten – richtig angewandt – kostenintensive und komplikationsbehaftete Zystoskopien ersetzen.

1.1.6 Histopathologie und Stadieneinteilung

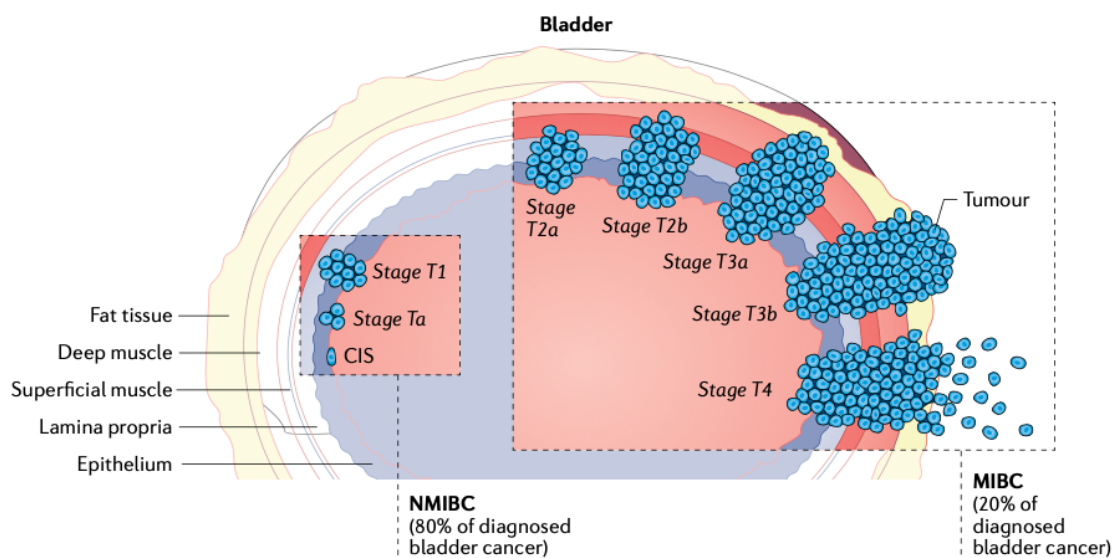


Abbildung 4: Klinische Einteilung des Harnblasenkarzinoms. Zitiert aus: (Tran, Xiao et al. 2021, S. 105)

Das Staging des Harnblasenkarzinoms erfolgt nach dem bekannten TNM-System der *Union internationale contre le cancer (UICC)*. Dabei wird in der klinisch relevanten Einteilung zwischen nicht-muskelinvasiven (NMIBC; pTis, pTa, pT1) und muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen (MIBC; $\geq$ pT2) unterschieden (siehe Abbildung 4). Zur besseren Risikostratifizierung und als Entscheidungsgrundlage für die Therapie sollten die Tumoren nach der WHO Klassifikation von 2016 bei der pathologischen Befundung in die Grading-Kategorien *high-grade (HG)* und *low-grade (LG)* eingeteilt werden. Diese Einteilung erfolgt auf Grundlage von zytomorphologischen Kriterien (z.B. Kernatypien, Polarität). Während MIBC per se als *HG* zu werten sind, ist die Unterscheidung zwischen *HG* und *LG* vor allem beim NMIBC für das weitere Vorgehen von Relevanz (Compérat, Burger et al. 2019).

Darüber hinaus können Harnblasenkarzinome verschiedenen histologischen Typen zugeordnet werden. Bezogen auf die westlich entwickelte Welt machen dabei Urothelzellkarzinome mit mehr als 90% den größten Anteil aus. Weitaus geringere Anteile halten die Differenzierungen als Plattenepithelkarzinom (2,7%) und Adenokarzinom (1,4%), wobei der häufigste Grund für Plattenepithelkarzinome eine Infektion mit *Schistosomiasis* ist. Dies erklärt auch, dass der Anteil an Plattenepithelkarzinomen der Blase in Endemiegebieten dieses Parasiten bedeutend höher ausfällt. Die Bestimmung des histologischen Typs ist u.a. deshalb von Relevanz, weil die Nicht-Urothelzellkarzinome oft mit aggressiverem Wachstum und schlechterer Prognose einhergehen (Chalasan, Chin et al. 2009).

1.1.7 Therapie

Da das Urothelzellkarzinom bzgl. Ausbreitung und Aggressivität ein individuell variables Erscheinungsbild zeigt, erfordert es eine ebenso vielfältige Auswahl an Behandlungsmöglichkeiten. Die Bandbreite erstreckt sich dabei von der reinen Überwachung bis hin zur operativen radikalen Zystektomie. Für die Auswahl der richtigen Therapie ist das Zusammentragen von möglichst allen Informationen über Tumorentität, Ausbreitung und Krankheitsvorgeschichte entscheidend. Verallgemeinert gesagt richtet sich die Art der Behandlung nach den Kategorien NMIBC und MIBC.

Da es bei der Gruppe der NMIBC um Tumoren handelt, die auf das Urothel und die darunter gelegene Lamina propria beschränkt sind und somit auch ein geringes Metastasierungsrisiko mit sich tragen, stellt die transurethrale Resektion des Blasentumors (TUR-B) ein effektives Verfahren zur lokal-operativen Behandlung dar. Während die TUR-B die erste Gelegenheit bietet, um Gewebeproben für die pathologische Diagnostik zu gewinnen, können im selben Eingriff alle sichtbaren Tumoranteile mittels Elektroschlinge oder Laser entfernt werden. Eine qualitativ hochwertige TUR-B ist für das pathologische Staging von zentraler Bedeutung. In einer klinisch retrospektiven Arbeit konnten die Erfahrung des Operators sowie das Vorhanden- bzw. Nicht-Vorhandensein von

Detrusormuskulatur im Resektionspräparat als Qualitätskriterium für die TUR-B identifiziert werden. Man hat unter 473 Patient*innen bei Vorhandensein von Detrusormuskulatur weniger Rezidive bei der ersten Kontrollzystoskopie nach drei Monaten beobachtet, als wenn keine Detrusormuskulatur in der ersten TUR-B reseziert wurde (Mariappan, Finney et al. 2012). Mit der Identifizierung solcher Qualitätsparameter wird eine zentrale Herausforderung der Kategorie NMIBC und auch eine Limitation der TUR-B adressiert. Diese besteht darin, dass bei nicht-invasiven Tumoren in bis zu 40 % der Fälle ein sog. „understaging“ vorgenommen wird, was bedeutet, dass die aus der Diagnostik abgeleitete Information zur Ausbreitung nicht der Wirklichkeit entspricht und somit ein zu geringes Risiko der Erkrankung angenommen wird (DUTTA, SMITH et al. 2001). Durch qualitative Marker, wie das Vorhanden bzw. Nicht-Vorhandensein von Detrusormuskulatur, wird das Risiko ein MIBC zu übersehen verringert und es kann früher die korrekte, ggf. radikalere Therapie eingeleitet werden.

Während der natürliche Zugang über die Harnröhre zur Harnblase einerseits eine elegante Möglichkeit zur minimalinvasiven operativen Behandlung mittels TUR-B bietet, kann das Urothelkarzinom auf dem genau selben Weg lokal mit Antitumormedikamenten behandelt werden. Diese können so ohne große systemische Effekte genau am Ort des malignen Geschehens in hohen Konzentrationen appliziert werden und dort größtmögliche Wirkung entfalten. Schon seit fast 50 Jahren in der Therapie des NMIBC etabliert und in vielen Studien bestätigt ist die lokale Behandlung mit den lebenden Mykobakterien des Stammes *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG). Dieser Stamm ging aus einer Kultur des *Mycobacterium bovis* – Pathogen der bovinen Tuberkulose - hervor. Auch wenn die genauen Mechanismen der Antitumoreffekte dieser Therapie bis heute noch nicht abschließend geklärt sind, spricht der heutige Forschungsstand stark für eine immunmodulatorische Wirkung. Nach Einbringung in die Harnblase interagieren die Mykobakterien mit den Urothelzellen und setzen eine Immunkaskade in Gang, wodurch die Krebszellen durch körpereigene Immunzellen bekämpft werden. Somit ist die Therapie mit BCG einer der frühen Vorreiter der onkologischen Immuntherapie (Brandau and Suttman 2007). Im Vergleich zur intravesikalen Anwendung von gängigen Chemotherapeutika (z.B.

Mitomycin C) konnte die Überlegenheit der *BCG*-Therapie in Reduktion der Wahrscheinlichkeit für Tumorrezidive gezeigt werden (Malmström, Sylvester et al. 2009). Dieser Effekt besteht allerdings nur, wenn neben der Induktionstherapie direkt im Anschluss an die TUR-B eine Erhaltungstherapie über ein Jahr fortgeführt wird (Böhle and Bock 2004). Die Behandlungsindikation für die intravesikale Anwendung von *BCG* richtet sich neben Patient*innen mit *intermediate-risk* NMIBC v.a. an diejenigen mit *high-risk* NMIBC, wozu auch das Carcinoma in situ (CIS) zählt (Brandau and Suttman 2007). Da diese oberflächlichen Läsionen in der herkömmlichen TUR-B nur schwer zu identifizieren sind und oft an mehreren Stellen des Urothels gleichzeitig vorkommen, ist die Behandlung der gesamten Schleimhaut mittels *BCG*-Instillation beim Vorliegen eines CIS eine wirksame Option.

Eine weitere Herausforderung, die die Behandlung des NMIBC mit sich bringt, ist die hohe Rate an Rezidiv-Tumoren und die Wahrscheinlichkeit zur Progression zur Gruppe der MIBC. Analysen von älteren Patient*innen-Daten zwischen 1979 und 1989, wo zwar die *BCG*-Instillation noch kein Standard, aber dafür die TUR-B bereits gut etabliert war, zeigen, dass das Risiko für ein Rezidiv bei NMIBC in den ersten fünf Jahren nach der initialen Tumorsektion zwischen 31 und 78% lag. Die breite Streuung des Risikos erklärt sich durch die Einteilung der Patient*innen in unterschiedliche Risikokategorien, die v.a. über histopathologische und klinische Parameter wie z.B. T-Kategorie, Grading-Kategorie oder Tumorgroße definiert wurden (Sylvester, van der Meijden et al. 2006). Um eine mögliche Progression zum MIBC zu vermeiden, gilt es im klinischen Alltag innerhalb der Gruppe der nicht-invasiven Tumoren diejenigen mit einem hohen Risiko für Rezidive und Progression zu identifizieren und daraufhin frühzeitig invasivere Maßnahmen zur Behandlung in Erwägung zu ziehen. So können auch Patient*innen aus der Hochrisikogruppe von NMIBC von einer frühzeitigen radikalen Zystektomie (sog. Frühzystektomie) profitieren (Herr and Sogani 2001).

Im Behandlungskonzept des MIBC stellt die offene radikale Zystektomie nach aktueller deutscher Leitlinie die Standardtherapie dar. Dabei werden die

Harnblase mit unmittelbar umliegenden Nachbarorganen, beim Mann Prostata und Samenblasen, bei der Frau Uterus, Adnexe und ggf. vordere Vaginalwand zusammen entfernt. Zusätzlich wird standardmäßig eine beidseitige Lymphadenektomie vollzogen. Für Patient*innen, die sich für eine Operation entweder nicht eigenen oder diese nicht wünschen, steht daneben noch das multimodale Konzept bestehend aus Chemotherapie, Bestrahlung und ggf. Salvage-Zystektomie zur Verfügung (Leitlinienprogramm Onkologie Deutsche Krebsgesellschaft 2020).

Wie bei anderen Krebserkrankungen auch, besteht die Möglichkeit, ergänzend zur Operation eine neoadjuvante bzw. adjuvante Chemotherapie zu verabreichen. Da die existierenden Studien zur Wirksamkeit der Chemotherapie nur sehr geringe Effekte nachweisen und da es auch allgemein in diesem Feld – insbesondere im direkten Vergleich zwischen neoadjuvanter und adjuvanter Therapie – an Evidenz fehlt, wird in der aktuellen DGU Leitlinie lediglich folgender Expertenkonsens empfohlen: „Patienten mit muskelinvasivem Harnblasenkarzinom ($\geq T2$) sollen über die Möglichkeiten einer neoadjuvanten oder adjuvanten Chemotherapie unter Berücksichtigung ihrer individuellen Situation aufgeklärt werden.“ (Leitlinienprogramm Onkologie Deutsche Krebsgesellschaft 2020, S. 213). Sowohl für die neoadjuvante als auch für die adjuvante Chemotherapie werden Cisplatin-basierte Regime wie MVAC (Methotrexat, Vinblastin, Doxorubicin, Cisplatin) oder GC (Gemcitabin, Cisplatin) in der klinischen Routine beim MIBC eingesetzt. Während Patienten mit bereits bekanntem Hochrisikoprofil vor Zystektomie von der neoadjuvanten Behandlung profitieren können, bleibt die adjuvante Chemotherapie v.a. denjenigen vorbehalten, bei denen sich erst bei Zystektomie ein Hochrisikoprofil ergibt (Bellmunt and Gupta 2023, Rosenberg, Mouw et al. 2023). Für Patient*innen, die aufgrund von Komorbiditäten (z.B. Niereninsuffizienz) nicht für eine zytotoxische Cisplatin-basierte Therapie in Frage kommen, stehen verschiedene antikörperbasierte Immuntherapien zur Verfügung (z.B. Pembrolizumab, Atezolizumab, Nivolumab). Zur Wirksamkeit für die neoadjuvante Gabe dieser Antikörper gibt es z.B. für Nivolumab eine Phase-II-Studie, die in Kombination mit Cisplatin-basierter Chemotherapie sehr gute Ansprechraten zeigt (Gupta,

Sonpavde et al. 2020). Für den postoperativen Einsatz der Immuntherapeutika gibt es ebenfalls Evidenz, die einen positiven Effekt auf das disease-free-survival (DFS) belegt (Rosenberg, Mouw et al. 2023). Da unter den Patient*innen, die prinzipiell für eine Zystektomie in Frage kommen, einige aufgrund von Komorbiditäten für eine Chemotherapie ungeeignet sind, stellt die Immuntherapie mit ihrem geringeren Nebenwirkungsprofil eine wichtige Säule in der perioperativen medikamentösen Behandlung des Harnblasenkarzinoms dar (Dash, Galsky et al. 2006).

Hinzu kommt, dass ein Großteil der Patient*innen, die für eine radikale Zystektomie in Frage kommen, aufgrund von eingeschränkter Nierenfunktion ($GFR < 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$) und anderen Komorbiditäten von vornherein keine nephrotoxischen Chemotherapeutika wie Cisplatin erhalten können (Dash, Galsky et al. 2006).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in der heutigen Therapie des Harnblasenkarzinoms eine breite Palette an nicht-invasiven und invasiven Methoden zur Verfügung steht. Entscheidend für eine erfolgreiche Therapie ist die richtige Einschätzung des Risikos für den jeweiligen Patienten*in und die Abstimmung in einem multiprofessionellen Team (Urologie, Radiologie, Pathologie).

1.2 In-vitro und In-vivo Forschung am Urothelzellkarzinom

Um die Tumorbilogie und die zellulären Mechanismen genauer nachvollziehen zu können, werden Tumormodelle benötigt, die möglichst exakt die Realität des Urothelzellkarzinoms nachbilden. Bis heute kann keines der existierenden Tumormodelle dieses Kriterium zu 100% erfüllen, sodass Erkenntnisse in der Grundlagenforschung anhand von verschiedenen Modellen gewonnen werden.

1.2.1 2D-Zellkultur an Zelllinien

Eine der am längsten etablierten in-vitro Verfahren, beispielsweise zur Untersuchung der malignen Veränderungen von Krebszellen, ist die Zellkultur in Petrischalen mit flüssigem Nährmedium. Die Zellen für die Primärkultur werden

dabei aus Frischtumorgewebe gewonnen, im Brutschrank kultiviert und bei ausreichender Zellvermehrung in die nächste Passage transferiert. Bereits 1970 wurde über eine der ersten erfolgreichen Zelllinien aus Frischtumorgewebe der Harnblase berichtet, die über 80 Passagen kultiviert werden konnte. Histomorphologische Analysen und Untersuchung der Zelllinie auf Chromosomenebene ergaben, dass sich ab der 5. Passage keine nennenswerten Veränderungen mehr ergaben und die Zelllinie in diesen Parametern dem Originaltumor ähnelte (Rigby and Franks 1970). Durch Vorteile wie einfache Handhabung, Kostengunst und Verfügbarkeit für Hochdurchsatzmethoden stellt das Modell der Zelllinien heute einen festen Standard in der Grundlagenforschung des Urothelzellkarzinoms dar, anhand dessen wegweisende Erkenntnisse gewonnen werden können. So konnte von Lamont et. al im Jahr 2011 gezeigt werden, dass FGF-Rezeptor-Inhibitoren das Wachstum von etablierten Tumorzelllinien mit bekannter FGF-Rezeptor-Mutation in der Zellkultur wirksam inhibieren. Damit konnte erste Evidenz für die Wirksamkeit einer neuen zielgerichteten medikamentösen Krebstherapie gewonnen werden (Lamont, Tomlinson et al. 2011). Trotz der vielen Vorteile sollte bei Experimenten mit der herkömmlichen Zellkultur auch deren Limitationen berücksichtigt werden. Über die Passagen können durch zufällig auftretende genetische Veränderungen und Selektionsmechanismen Subpopulationen von Zellen entstehen, die den Originaltumor nicht mehr ausreichend abbilden. Diese Gefahr besteht insbesondere bei hoher Passagenanzahl und suboptimalen Bedingungen in der Zellkultur (z.B. Mangel an Nährstoffen). Des Weiteren stammt ein großer Teil der heute etablierten urothelialen Tumorzelllinien aus *high grade* Tumoren und es gibt nur wenige Modelle, an denen das *low grade* Szenario erforscht werden kann (Zuiverloon, de Jong et al. 2018). Auch bezüglich der möglichen Zell-Zell-Interaktion ist dieses Modell kritisch zu betrachten. Um wachsen zu können, sind Urothelzellen auf Adhäsion angewiesen, welche in der Petrischale mit flüssigem Medium nur am Boden möglich ist. Dadurch entsteht ein zweidimensionaler Zellrasen mit homogener Verteilung von Nährmedium, was für gleichmäßiges und beständiges Wachstum sorgt. Allerdings existiert in der in-vivo Situation oft eine ungleiche

Verteilung von Nährstoffen mit Gradienten über mehrere Zellschichten. Dieses fehlende in-vivo-Charakteristikum und die fehlende Interaktion mit weiteren Nachbarzellen im dreidimensionalen Raum sind eine wesentliche Limitation der 2D-Zellkultur und eine mögliche Erklärung, warum die meisten Zelllinien in diesem Modell keine Differenzierung zeigen (Duval, Grover et al. 2017). Um der in-vivo Situation in diesen Aspekten näher zu kommen, versucht man 3D-Zellkultur-Modelle zu entwickeln.

1.2.2 3D-Zellkultur

Für die 3D-Zellkultur wird ein Gerüst benötigt, an dem sich die Zellen anheften und in alle drei Raumrichtungen organisieren können. In-vivo wird dieses Gerüst durch die Extrazelluläre Matrix (EZM) gebildet. Während es die Mikro- und Nanotechnologie möglich gemacht hat, solche Gerüste auf Basis von künstlichen Polymeren herzustellen (z.B. Organ-on-Chip), bieten kollagenhaltige Hydrogele eine Möglichkeit, Zellen in einer Umgebung zu kultivieren, die die EZM der in-vivo Situation besser simulieren kann (Duval, Grover et al. 2017). Weil diese Hydrogele aus Proteinen der EZM (z.B. Kollagen Typ IV) bestehen, kann eine Zelle nicht nur mit ihren nächstgelegenen Nachbarzelle, sondern auch mit Molekülen ihres umgebenden Gerüsts interagieren. Dieses Charakteristikum bringt die 3D-Zellkultur mit kollagenhaltigen Hydrogelen der Realität einen weiteren Schritt näher (Pineda, Nerem et al. 2013). Dass sich Zellen in 3D-Kultur realistischer verhalten als in 2D-Kultur, konnte anhand von vier Zelllinien des Endometriumkarzinoms gezeigt werden. Chitcholtan und Kollegen verglichen die zwei Modelle hinsichtlich Proliferationsrate und Expression verschiedener Proteine. Zwar zeigten Zellen dabei im 2D-Modell eine deutlich gesteigerte Proliferationsaktivität, allerdings konnte durch den Nachweis einer höheren und differenzierteren Expression von β 1- und β 4-Integrinen – von Membranproteinen, durch die Zellen in der umgebenden EZM verankert sind – im 3D-Modell auf eine deutlich realistischere Organisation und Polarisation der Zellen geschlossen werden (Chitcholtan, Asselin et al. 2013). Dennoch ist die Wahl, ob die zweidimensionale oder dreidimensionale Zellkultur die Realität exakter abbildet, stark vom Ursprung der zu kultivierenden Zellen abhängig. So ist es bspw.

möglich, ein realistisches Modell von Lungenepithel auch in der 2D-Zellkultur nachzuempfinden (Duval, Grover et al. 2017).

Nachdem verschiedene Ansätze für die 3D-Zellkultur über die letzten Jahrzehnte getestet und evaluiert wurden, stellt die Organoidkultur auf Matrigel™ den heutigen Goldstandard für urologische Tumoren dar (Tse, Zhao et al. 2022). Nachdem der Begriff „Organoid“ lange eher unspezifisch genutzt wurde, hat die Arbeitsgruppe um Lancaster 2014 die Bedeutung in einer Definition präzisiert: „A collection of organ-specific cell types that develops from stem cells or organ progenitors and self-organizes through cell sorting and spatially restricted lineage commitment in a manner similar to in vivo.“ (Lancaster and Knoblich 2014; S. 1, Box 1). Diese Definition charakterisiert Organoide durch die Entwicklung aus differenzierungsfähigen Vorläuferzellen zu Zellformationen bestehend aus unterschiedlichen Zelltypen sowie durch die Nachempfindung von funktionellen Eigenschaften des entsprechenden Organs (z.B. Sekretion, Filtration). Damit werden sie zu den weniger komplex konstruierten Sphäroiden abgegrenzt, die eher lose dreidimensionale Zellansammlungen darstellen. Als ideale Umgebung für die Organoidzellkultur hat sich das Matrigel™ herausgestellt. Die erste Vorläufersubstanz des Matrigel™ wurde 1985 von Kleinman und Kollegen aus Tumorgewebe eines Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Sarkoms isoliert und besteht zu großen Teilen aus Laminin, Kollagen Typ IV, Entactin und Heparansulfat-Proteoglycanen (Kleinman, McGarvey et al. 1986). Heute wird Matrigel™ aus EHS-Tumoren von dafür gezüchteten Mäusen gewonnen.

1.2.2.1 Organoidkultur des Harnblasenkarzinoms und Anwendungsgebiete

Neben herkömmlichen Zelllinien sind erfolgreiche Ansätze mit pluripotenten Stammzellen und mit humanem Frischtumorgewebe als Ausgangsmaterial für die 3D-Zellkultur des Harnblasenkarzinoms beschrieben. Dabei kann Frischtumorgewebe sowohl aus TUR-B- sowie Zystektomie-Präparaten verwendet werden (Tse, Zhao et al. 2022). Über die letzten drei Jahrzehnte existieren mehrere Berichte über erfolgreiche 3D-Zellkulturen aus Frischtumorgewebe von Patient*innen mit Harnblasenkrebs. Dabei konnte zunächst beobachtet werden, dass die isolierten Tumorzellen als

dreidimensionale Cluster in flüssigem Medium zu bis zu 500 µm großen Gebilden heranwachsen. Diese Sphäroide bestanden aus zwei morphologisch unterschiedlichen Zelltypen – Stroma- und Epithelzellen – und erfüllten damit bereits ein Kriterium für „Organoide“ (Burgués, Gómez et al. 2007). Erfolgreiche systematische Ansätze für die Organoidzellkultur in Matrigel™ aus malignem Harnblasengewebe wurden in den vergangenen Jahren von Pauli et al., Lee et al. und Mullenders et al. beschrieben (Pauli, Hopkins et al. 2017, Lee, Hu et al. 2018, Mullenders, de Jongh et al. 2019). Eine Organoidkultur galt den Autoren nach dann als erfolgreich, wenn über mindestens fünf Passagen lebende Zellen und Zellwachstum beobachtet wurden. Allen drei Arbeiten gemeinsam war ein Enzymverdau mit Kollagenase und eine Vereinzelung der Zellen mittels Trypsins in der Verarbeitung des primären Gewebes, um die Tumorstammzellen zu extrahieren.

Die bisher etablierten Organoidlinien wurden v.a. für in-vitro-Medikamententestungen und als Basis für in-vivo-Xenografts in Mäusen verwendet. Der Großteil der aktuell laufenden Forschung besteht allerdings aus der Validierung dieses neuen Tumormodells im Vergleich zu den jeweiligen Originaltumoren. Dafür charakterisierte man die Organoide und Originaltumoren in den oben genannten Studien sowohl auf DNA, RNA und Protein-Ebene als auch hinsichtlich histomorphologischer und immunhistochemischer Kriterien.

Vor allem aber wird die Rolle der Tumororganoide als in-vitro-Modell zur Medikamententestung in Zukunft von wesentlicher Bedeutung sein. Die aktuellen Therapieleitlinien des Harnblasenkarzinoms richten sich v.a. nach der Invasivität des Tumors, welche anhand der TNM-Klassifikation bestimmt wird. Dabei beobachtet man allerdings insbesondere bei der Wirksamkeit von neoadjuvanten bzw. adjuvanten Chemotherapeutika erhebliche Unterschiede. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Harnblasenkarzinome aufgrund ihrer hohen Mutationslast im Vergleich zu anderen Tumoren eine sehr heterogene Gruppe hinsichtlich genetischer und morphologischer Vielfalt bilden (Alexandrov, Nik-Zainal et al. 2013). Es wurden zwar schon Versuche unternommen, eine molekularpathologische Klassifizierung für Harnblasenkarzinome zu etablieren,

diese konnte sich allerdings bisher nicht im klinischen Alltag durchsetzen (Sjödahl, Lauss et al. 2012, Sjödahl, Lövgren et al. 2013). Eine Zellkultur, die direkt aus entnommenem Tumorgewebe gewonnen wird, hat den Vorteil, dass sie die in-vivo-Situation mit dem patientenspezifischen Mutationsprofil in-vitro möglichst originalgetreu nachbildet. Darum eignen sich Tumororganoide aus Patientenmaterial beim Harnblasenkarzinom besonders gut dafür, um das Ansprechen auf verschiedene Chemotherapeutika und zielgerichtete Therapien patientenspezifisch zu untersuchen. Diese Untersuchungen erfolgen anhand sogenannter Zytotoxizitäts-Assays und stellen eine kostengünstige Möglichkeit zur in-vitro-Medikamententestung dar. Hierzu gibt es bereits auch Studien, die diese Methode anhand der Ergebnisse aus in-vivo-Modellen validieren. Dort wurden die Medikamente Mäusen verabreicht, denen man zuvor Organoide injiziert hatte (sogenannte „patient-derived xenograft“ – PDX) und es konnte eine bedeutende Übereinstimmung mit dem Ansprechverhalten in Zytotoxizitäts-Assays gefunden werden (Lee, Hu et al. 2018, Amaral, Zimmermann et al. 2020). Bei der in-vitro-Untersuchung von Immuntherapeutika, die auch beim Harnblasenkarzinom zum Einsatz kommen, stößt das Organoidmodell bisher noch an seine Grenzen. Da die notwendigen Immunzellen meist nicht enthalten sind, kann das Mikromilieu des Tumors nicht simuliert werden. Allerdings ist die Forschung hinsichtlich dieser Limitation auch nicht mehr weit von einer Lösung entfernt. Neal et al. gelang es in einem Organoidmodell Zellen von insgesamt 19 verschiedenen Tumorentitäten in Kokultur mit Immunzellen wachsen zu lassen. Bei der in-vitro-Testung von Nivolumab (Anti-PD-1-Antikörper) zeigte sich auch bei einem Versuchsansatz mit malignen Urothelzellen, dass die Immunzellen zur Tumorbekämpfung aktiviert werden konnten (Neal, Li et al. 2018).

Als patientenspezifisches und kostengünstiges Tumormodell werden Organoidkulturen des Harnblasenkarzinoms also auch zunehmend an Bedeutung für den klinischen Alltag gewinnen, da anhand der Anwendungsgebiete auch wichtige Therapieentscheidungen validiert werden können.

1.2.3 Immunhistochemische Marker

CK7 und CK20

Bei Zytokeratinen (CK) handelt es sich um Polypeptide, die als Intermediärfilamente zum Zytoskelett der Zelle gehören und somit wichtige Strukturfunktion erfüllen. Heute sind insgesamt 20 Subtypen bekannt, die vor allem in Zellen mit epithelialer Differenzierung vorzufinden sind und dabei gewebsspezifische Expressionsmuster aufweisen. In benignem Urothel wird über folgende Subtypen berichtet: CK7, CK8, CK18, CK19, CK20 (Southgate, Harnden et al. 1999). Für die Gewebeanalysen in der vorliegenden Arbeit wurden CK7 und CK20 näher untersucht. Während sich CK7 in Analysen von benignem Urothel über alle Zellschichten nachweisen lässt, beschränkt sich die Expression von CK20 auf die Schicht der superfizialen Zellen und einzelnen Intermediär-Zellen (Southgate, Harnden et al. 1999). Zudem hat man Hinweise gefunden, die darauf deuten, dass die Abweichung der klassischen Expression von CK20 über das Urothel als prädiktiver Marker für die Rezidiv-Wahrscheinlichkeit bei Urothelzellkarzinomen herangezogen werden kann (Harnden, Allam et al. 1995).

GATA3

Bei GATA3 handelt es sich um einen Zink-Finger-Protein, dessen Funktion zunächst als Transkriptionsfaktor in der Hämatopoese beschreiben wurde. Weitere Untersuchungen zeigten, dass dieser Transkriptionsfaktor auch eine wichtige Rolle für die Differenzierung von Zellen in anderen Geweben spielt. In Bezug auf das Urothelzellkarzinom weisen neuere Analysen eine hohe Positivitätsrate (87,9%, vgl. (Wang, Yang et al. 2020)) für GATA3 in IHC-Färbungen von Primärtumoren auf. Verglichen zu benignem Urothel wird die Expression in malignem Gewebe auf mRNA-Ebene als höher und auf Proteinebene allerdings als niedriger beschrieben. Zur spezifischen Funktion des Transkriptionsfaktors im Urothelzellkarzinom haben Wang et al. durch in-vitro-Versuche Hinweise darauf gefunden, dass die Überexpression von GATA3 eine Rolle im Arrest des Zellzyklus spielen kann und ebenso die Proliferation von Krebszelllinien hemmt (Wang, Yang et al. 2020).

FGFR-3

Als Teil der Transmembran-Tyrosin-Kinase-Rezeptoren ist der "Fibroblast-Growth-Factor-Receptor-3" (FGFR-3) bei der Aktivierung von Zellen durch das Zytokin FGF beteiligt. Es ist bekannt, dass die FGFR-3-Mutationen ein charakteristisches Merkmal für die niedermaligne Gruppe der NMIBC sind (van Rhijn, van der Kwast et al. 2004). Für den Großteil (> 85%) der NMIBC wird in der Studie von Sjö Dahl und Kolleg*innen ein homogenes Färbemuster für FGFR-3 beschrieben (Sjö Dahl, Lövgren et al. 2013). Bei IHC-Färbungen von Geweben aus primären MIBC werden jedoch nur 29 % der Gewebeproben mit charakteristischen Veränderungen der FGFR-3 Expression beschrieben (Guancial, Werner et al. 2014).

p53

Neben der FGFR-3-Mutation wurden Mutationen im Tumorsupressorgen p53 in Urothelzellkarzinom beschrieben. Dabei tritt diese Genmutation v.a. in der Gruppe der NMIBC HG- und CIS-Tumoren sowie MIBC auf (van Rhijn, van der Kwast et al. 2004). In seiner Funktion ist p53 in verschiedenen zentralen Schaltstellen des Zellzyklus mit involviert. In einer Metaanalyse mit insgesamt 3421 Patient*innen konnte nachgewiesen werden, dass auch die Positivitätsrate für p53 in IHC-Färbungen mit dem pathologischen Stadium korreliert. V.a. für T1 HG Tumoren scheint die p53-Positivität dabei einen prädiktiven Marker für Progressions- und Rezidiv-Wahrscheinlichkeit darzustellen. Dies unterstreicht den klinischen Nutzen dieses Markers für das Übergangsstadium zwischen NMIBC und MIBC, weil so Patient*innen mit einem höheren Risiko potentiell früher erkannt werden können (Goebell, Groshen et al. 2010).

p63

Als Teil der p53 Genfamilie ist auch p63 über die Aktivierung von teilweise gleichen Zielgenen wie p53 an der Regulation des Zellzyklus mit beteiligt und zeigt als Transkriptionsfaktor ein herkömmliches nukleäres Färbemuster in der IHC. Die Expression von p63 auf mRNA Ebene scheint bei malignen Läsionen der Harnblase eher vermindert im Vergleich zu benignem Gewebe (Park, Lee et

al. 2000). In normalem Urothel ist p63 ausschließlich basal exprimiert (El-Gendi and Abu-Sheasha 2018).

In der Analyse der IHC-Färbungen von 100 Urothelzellkarzinomen durch El-Gendi und Abu-Sheasha wurde zunächst gezeigt, dass sich zwischen NMIBC und MIBC kein signifikanter Unterschied in der p63-Expression ausmachen lässt (El-Gendi and Abu-Sheasha 2018). Diese sowie eine weitere Studie von Compérat et. al konnten beide auch keinen Zusammenhang von p63 und Tumorigrad feststellen. Die Studie von Compérat et. al untersuchte 158 Primärtumore aus TUR-B und Zystektomie-Operationen und stellte die p63-Expression nicht der Unterscheidung zwischen NMIBC und MIBC sondern einer feineren Unterteilung des Tumorstadiums gegenüber (Kategorien: pTa, pT1, $\geq$ pT2). Hier kommen die Autoren zum Ergebnis, dass sich bei dieser exakteren Betrachtung des Tumorstadiums durchaus ein Zusammenhang herstellen lässt. Der Zusammenhang besteht darin, dass eine niedrigere p63-Expression mit einem höheren Tumorstadium einhergeht (Compérat, Camparo et al. 2006). Passend zu diesem Befund konnten El-Gendi und Abu-Sheasha hinsichtlich des klinischen Outcomes innerhalb ihrer Stichprobe den Nachweis erbringen, dass weniger als 35% p63-positiven Zellen in der IHC-Färbung als prognostisch auf eine signifikant erhöhte Rezidiv-Wahrscheinlichkeit hindeuten (El-Gendi and Abu-Sheasha 2018).

Ki-67

Ki-67 gilt als klassischer Proliferationsmarker und färbt diejenigen Zellen nukleär an, die sich zum Zeitpunkt der Fixierung in Teilung befanden. Während benignes Urothel keine Anfärbbarkeit für Ki-67 zeigt, konnte in einer Studie von Compérat und Kolleg*innen bei 75/157 (47%) Harnblasentumoren eine Reaktivität in den IHC-Färbungen nachgewiesen werden. Dabei wurde ebenfalls gezeigt, dass Tumoren im Stadium pT1 und $\geq$ pT2 eine signifikant höhere Positivitätsrate aufweisen als Tumoren im Stadium pTa (Compérat, Camparo et al. 2006). In einer weiteren Arbeit zur IHC an Harnblasentumoren wurde neben der erhöhten Positivitätsrate für Ki-67 in Tumoren höherer Stadien auch eine abweichende Verteilung der anfärbbaren Zellen über das gesamte Urothel beschrieben.

Während sich in NMIBC die Expression von Ki-67 eher auf die basalen Zellreihen beschränkte, erschien die Expression in MIBC eher diffus über alle Schichten des Urothels verteilt. Die Autoren schließen draus, dass die Zellen von invasiven und aggressiveren Tumoren möglicherweise schon so weit mutiert sind, dass sie unabhängig von Signalen des Tumorstromas wachsen können (Sjödahl, Lövgren et al. 2013).

CD44

Das Transmembranprotein „Cluster of differentiation“ (CD) 44 ist ein anerkannter Marker für Tumorstammzellen. Der Proteinkomplex ist in vielen kritischen Vorgängen mit involviert, die mit der Beweglichkeit, der Invasion und Zell-Zell-Interaktion von Tumorzellen assoziiert sind. Da diese Vorgänge für die Metastasierung von Tumoren eine wichtige Rolle spielen, liegt die Vermutung nahe, dass auch die CD44-Expression mit der Wahrscheinlichkeit für Metastasierung korreliert. Tatsächlich wurde der Zusammenhang zwischen CD44-Expression und vorhandenen Tumormetastasen anhand von IHC-Analysen von Harnblasenkarzinomen gezeigt, während die Korrelation von CD44 mit Tumorstadium und Grading-Kategorie bisher nicht belegt werden konnte (Hu, Zhang et al. 2020).

1.3 Zielsetzung dieser Dissertation

Aufgrund der noch sehr beschränkten Anzahl an Publikationen für die 3D-Zellkultur des Urothelkarzinoms soll in dieser Arbeit die Aufarbeitung, die Handhabung und Charakterisierung von Organoidzellkulturen aus Frischtumorgewebe der Harnblase experimentell untersucht werden. Dazu werden zunächst insgesamt 19 Patient*innenproben nach dem etablierten Protokoll (siehe 2.4.1 ff.) aufgearbeitet und das Wachstumsverhalten in der Zellkultur dokumentiert. Basierend auf diesen Daten werden zwei Gruppen gebildet. Eine Gruppe beinhaltet Organoidkulturen, die die 5. Passage und höher erreicht haben („stabile Proliferation“) und eine zweite umfasst Kulturen, die bereits vor der 5. Passage kein Wachstum mehr zeigten („variable Proliferation“). Diese beiden Gruppen werden anhand immunhistochemischer Färbungen des

Originaltumors und anhand der klinischen Daten der zugehörigen Patient*innen miteinander verglichen, um prädiktive Parameter zu identifizieren, die positiven bzw. negativen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von Organoidkulturen haben könnten.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2: Liste der Grundmedien und deren Herstellern

Gibco™ RPMI Medium 1640	Life Technologies Europe, NLD
Gibco™ DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Thermo Fisher Scientific, USA
Gibco™ Advanced DMEM/F12 (Reduced Serum Medium)	Thermo Fisher Scientific, USA

Tabelle 3: Liste der Medienzusätze und deren Hersteller

A83-01	Tocris - BioTechne, USA
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, DEU
Gibco™ BSA (Bovine Serum Albumin) 25%	Life Technologies Corporation, USA
Dimethyl sulfoxide Cell culture grade (DSMO)	AppliChem GmbH, DEU
Fetal Bovine Serum (FBS/csFBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, DEU
FGF-10	Pepro Tech, USA
FGF-2 (Recombinant Human FGF-basic)	Pepro Tech, USA
FGF-7 (Keratinocyte Growth Factor)	Pepro Tech, USA
Gibco™ B27-Supplement	Thermo Fisher Scientific, USA
Gibco™ PenStrep	Thermo Fisher Scientific, USA
Human EGF	Pepro Tech, USA
L-Glutamine	Bioswiss AG, CHE
N-Acetyl-L-Cystein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, DEU
Nicotinamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, DEU

Primocin (50mg/ml)	InvivoGen, FRA
Triton® X-100	Merck, DEU
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, DEU
Y-27632 (Rock-Inhibitor)	Hycultec GmbH, DEU

Tabelle 4: Liste der Enzyme und deren Hersteller

10x Kollagenase/Hyaluronidase (3000 U/ml, 1000 U/ml)	StemCell Technologies, USA
Dispase (ACF = Animal component free)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, DEU
Trypsin: Gibco™ TrypLE™ Express	Thermo Fisher Scientific, USA

Tabelle 5: Liste sonstiger Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller

Cultrex™ BME (Basement Membrane Extract), Type 2, PathClear™	Trevigen - BioTechne, USA
Dako Fluorescence Mounting Medium	Agilent Technologies, USA
Histogel	Thermo Fisher Scientific, USA
Tissue Freezing Medium	Leica Biosystems, AUS

2.1.1 Medien für Zellkultur und Charakterisierung

Zellkulturmedium: Blasen-Tumor-Medium (BTM) – ca. 50ml

- L-WRN conditioned Medium 25ml
- Advanced DMEM/F12 23ml
- B27-Supplement 1ml
- HEPES Natriumsalz-Lösung 1M 500µl
- Nicotinamid 500µl
- N-Acetylcystein 125µl

- A83-01 – 5mM in DMSO 50µl
- Primocin – 50mg/ml 50µl
- FGF-10 – 100µg/ml 50µl
- FGF-7 – 50µg/ml 25µl
- FGF-2 – 50µg/ml 12,5µl
- Y-27632 (Rock-Inhibitor) 100mM in PBS 5µl
- EGF – 500mM 0,5µl

Transportmedium

- HBSS NaHCO₃⁻ 500 ml
- HEPES Natriumsalz-Lösung 1M 5 ml
- PenStrep 5 ml
- 20 KIU/ml Aprotinin 1667µl

Arbeits- und Stoppmedium

- RPMI Medium 1640 + Glutamin/GlutaMax Grundmedium
- Fetal Bovine Serum (FBS) 10 %
- Pen/Strep 1%

Splittingmedium (Chamberslides)

- Advanced DMEM/F-12 50ml
- HEPES 500µl
- L-Glutamin 500µl

Blockierungslösung (Chamberslides)

- PBS Grundmedium
- Bovines Serum Albumin (BSA) 5%
- Triton® X-100 0,2%
- Tween 20 0,1%

2.2 Geräte und Verbrauchsmittel

2.2.1 Geräte

Tabelle 6: Liste der Geräte mit Herstellerinformationen

Deckglas-Automat: TissueTek Glas	Sakura Finetek Europe B.V., DEU
Färbeautomat: BenchMark ULTRA IHC/ISH System	Roche Diagnostics International AG, CHE
Feinwaage BL310	Sartorius Lab Instruments, DEU
Gewebeinfiltrationsautomat: Leica TP1020	Leica Biosystems GmbH, DEU
H/E-Färbeautomat: TissueTek Prisma Plus	Sakura Finetek Europe B.V., DEU
Kryotom: Leica CM1520	Leica Biosystems GmbH, DEU
Mikroskop 1: Axiophot (Fluoreszenz)	Carl Zeiss AG, DEU
Mikroskop 2: Axiovert 135	Carl Zeiss AG, DEU
Mikrotom: Leica RM2125RT	Leica Biosystems GmbH, DEU
Objekträgerscanner: NanoZoomer 2.0. HT	Hamamatsu Photonics GmbH, DEU
Parrafin Ausgießstation: Leica EG 1150 H / C	Leica Biosystems GmbH, DEU
Pipetierhilfe: Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, DEU
Rüttler: Thermomixer comfort	Eppendorf AG, DEU
Sterilbank: LAMINAIR HBB 2448	Heraeus Instruments, DEU
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, USA
Zentrifuge groß: Heraeus Multifuge 3SR+	Thermo Electron LED GmbH, DEU
Zentrifuge klein: Biofuge pico	Heraeus Instruments, DEU

2.2.2 Verbrauchsmittel

Tabelle 7: Liste der Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller

48 Well Zellkulturplatte	Corning Incorporated, USA
6 Well Zellkulturplatte	Greiner Bio One, DEU
70µm Zellsieb	Greiner Bio One, DEU
8-well Zellkulturkammern (Chamberslides)	Sarstedt AG&Co. KG, DEU
CryoTube Vials, 1.8ml	Thermo Fischer Scientific, USA
Paraffin-Einbettkassetten	R. Langenbrinck GmbH, DEU
Objektträger (Standard, Superfrost®)	R. Langenbrinck GmbH, DEU
Serologische Pipetten (10ml, 5ml)	Corning Incorporated, USA
Einmalskalpelle	Bbraun AG, DEU
Tissue-Tek CryoMold	Sakura Finetek Europe, NLD
Zellkulturschale (60x15mm)	Becton Dickinson GmbH, DEU
Reaktionsgefäß (1,5ml, 2ml)	Eppendorf AG, Hamburg, DEU
Zentrifugationsröhrchen (15ml, 50ml)	Thermo Fischer Scientific, USA

2.3 Probengewinnung

Das Ausgangsmaterial für die Organoidkultur wurde im Rahmen des von der DFG geförderten Graduiertenkollegs 2543 von der Abteilung für Urologie der Universitätsklinik Tübingen bereitgestellt. Dabei wurden die Präparate aus den nachfolgend geschilderten Eingriffen primär der pathologischen Diagnostik zugeführt und bei ausreichend Material für Forschungszwecke am Zentrum für medizinische Forschung Derendingen (ZMF) verwendet. Die Verwendung klinischer Proben wurde von der Ethikkommission unter AZ 804/2020/B02 genehmigt.

2.3.1 TUR-B (*Transurethrale Resektion Blasentumor*)

Der Zugang zum Operationsgebiet bei der TUR-B führt über die Urethra. Unter sterilen Arbeitsbedingungen führt der Operateur hier eine starre Kamera-Optik ein und kann die Blaseninnenwand einsehen. Um das gesamte Urothel der Blase adäquat beurteilen zu können, wird über den Arbeitskanal ein Spülkatheter-System angelegt, welches für eine ausreichende Füllung der Blase und Entfaltung der Schleimhaut sorgt. Nach Identifikation der Tumorareale, wurden diese mit einer Elektroschlinge, über die ein Hochfrequenzstrom fließt, reseziert. Durch kontinuierliches Spülen wurden die Tumorstücke aus der Blase entfernt und in erster Linie der pathologischen Diagnostik zugeführt. Überschüssiges Material wurde im Anschluss dem Forschungslabor der Urologie zur Verfügung gestellt.

2.3.2 Zystektomie (*Vollständige Entfernung der Harnblase*)

Bei gewissen Konstellationen von v.a. muskelinvasiven Blasentumoren kann die vollständige Entfernung der Harnblase die sicherste Therapie für die betroffenen Patient*innen darstellen. Dazu verschafft sich der Operateur entweder offen-chirurgisch oder laparoskopisch (i.d.R. roboter-assistiert) einen Zugang zur Blase. Ziel ist es dann die gesamte Blase und eventuell beteiligte Nachbarorgane zu entfernen. Bei diesem Verfahren wurde das gesamte Präparat zunächst in die OP-nahe pathologische Schnellschnittdiagnostik transportiert. Dort eröffnete der Pathologe die Blase und beurteilte die Tumordinfiltration, um mit dem Chirurgen unverzüglich das weitere Vorgehen abzusprechen. Nachdem die pathologische Diagnostik abgeschlossen war, konnten aus den makroskopisch beurteilbaren Tumorarealen des Urothels entsprechende Proben für die Forschung mit dem Skalpell herausgeschnitten werden.

2.3.3 Probentransport

Die für die Forschung zur Verfügung gestellten Proben wurden in einem OP-nahen Labor der Klinik in mit Transportmedium gefüllten 15 ml Zentrifugationsröhrchen verpackt und unmittelbar in das Labor der Urologie Tübingen (ZMF Derendingen) transportiert. Die Zeit von Entnahme bis zum Beginn der Verarbeitung im Labor betrug maximal 120 min.

2.4 Zellkultur

Falls nicht anders angegeben fanden alle Zentrifugationsschritte bei Raumtemperatur statt.

2.4.1 Isolierung der Tumorzellen

Abbildung 5 zeigt die Materialien, die zur Isolierung der Tumorzellen benötigt wurden. Im Labor überführte man das Frischtumorgewebe in eine Petrischale und bestimmte mittels einer Feinwaage das Probengewicht. Anschließend bedeckte man den Boden der Petrischale mit PBS und entfernte zunächst die offensichtlich verbrannten, dunklen Stellen, die durch die Stromapplikation zu Stande kamen. Darauf zerkleinerte man die Probe mit zwei sterilen Skalpellern in ca. 1mm große Stücke, um anschließend die Gewebestückchen durch mehrmaliges Spülen mit PBS über eine serologische Pipette in ein frisches 15 ml Zentrifugationsröhrchen zu überführen. Die Probe wurde für 10 min bei 480 g abzentrifugiert und das Gewebepellet in adäquater Menge Arbeitsmedium (1000µl/100mg Gewebe) aufgenommen. Um die Tumorzellen aus ihrer Gewebematrix zu lösen, folgte der Verdau mit der entsprechenden Menge Kollagenase/Hyaluronidase (15 µl/100 mg Gewebe) für 30 min bei 37 °C 5% CO₂ im Inkubator. Dabei wurde die Probe alle 10 min auf dem Vortex gemischt, um für eine gleichmäßige Verteilung der Gewebeteilchen zu sorgen. Dieser Vorgang wurde mit der gleichen Menge Kollagenase/Hyaluronidase für weitere 30 min wiederholt. Mit Hilfe eines 70 µm Zellsiebes wurde die Probe von allen größeren Geweberesten befreit und nach anschließender Zentrifugation für 5 min bei 150 g und Abnehmen des Überstandes in 1 ml Arbeitsmedium aufgenommen.

Ein Aliquot von 10 µl wurde mit 10 µl Trypanblau gemischt und für die Zellzählung in der Neubauerzählkammer verwendet. Je nach Ergebnis der Zählung stellte

man die Zellkonzentration auf 2×10^6 Zellen/ml durch Hinzufügen oder Zentrifugation und Abnehmen von Arbeitsmedium ein.



Abbildung 5: Benötigte Materialien zur Aufarbeitung des Frishtumorgewebes (15 ml Zentrifugationsröhrchen mit rötlicher Flüssigkeit).

2.4.2 Dreidimensionale Zellkultur

Im Gegensatz zur herkömmlichen 2D-Zellkultur wachsen die Zellen in Organoiden im dreidimensionalen Raum. Als Strukturgerüst für dieses Wachstum dient sogenanntes Basement Membrane Matrix (BME). Dieses ist bei 4 °C flüssig und polymerisiert bei 37 °C zu einer gelartigen Masse, in der sich die Zellverbünde organisieren.

Um die Tumorzellen in eine solche Umgebung zu überführen, mischte man die isolierten Tumorzellen mit gekühltem BME im Verhältnis 1:3 und goss das Gemisch in 20 µl Portionen in die Vertiefungen einer 48 Well Zellkulturplatte. Die dabei entstehenden Geltropfen – im Laboralltag auch Domes genannt – enthielten dank der zuvor eingestellten Konzentration je 20.000 Zellen. Unmittelbar danach drehte man die Platte auf den Kopf und ließ das BME für 15

– 30 min bei 37 °C auspolymerisieren. Die stabilen Domes konnten anschließend mit 250 µl Kulturmedium bedeckt werden und wurden bei 37 °C 5% CO₂ im Inkubator kultiviert.

2.4.3 Organoidkultur passagieren

Sich vermehrende Zellen benötigen über die Zeit mehr Platz bzw. lösen auch die dreidimensionale Struktur des BMEs auf. Um weiterhin gute Wachstumsbedingungen für die Zellen zu garantieren, brachte man sie im Rahmen des Passagierens in frisches BME und teilte sie je nach Zelldichte in einem definierten Verhältnis auf neue Wells aus. Zunächst fotografierte man die Organoidkultur, nahm das Kulturmedium mit einer Mikropipette ab und löste das BME in einer enzymkatalysierten Reaktion mit 100 µl Dispase II (1mg/ml) in 250 µl PBS pro Well für 60 min bei 37 °C 5% CO₂ auf. Die so freigelegten Organoide überführte man in frische 1,5 ml Zentrifugationsröhrchen und vereinzelte die Zellen mit 200 µl TrypLE pro Dome für 15 min bei 37 °C und 1400 rpm auf dem Rüttler. Um die enzymatische Reaktion zu stoppen, sammelte man den Inhalt aller Zentrifugationsröhrchen gemeinsam in einem 15ml Zentrifugationsröhrchen, in dem 1000 µl Stoppmedium pro Well vorgelegt waren. Die Zellen wurden für 5 min bei 150 g zentrifugiert und je nach Splittingverhältnis das Medium bis auf die Menge an benötigter Zellsuspension abgenommen. In den folgenden Schritten brachte man die Zellen wieder in die dreidimensionale Zellkultur wie in Punkt 2.4.2 beschrieben und berechnete die Menge an Zellsuspension und BME anhand des Splittingverhältnisses.

2.4.4 Organoidkultur einfrieren

Analog zum Passagieren (siehe 2.4.3) wurde das BME zunächst mit Dispase II aufgelöst und die freigelegten Organoide durch TrypLE-Enzymverdau auf dem Rüttler vereinzelt. Die Einzelzellsuspension überführte man in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen, um sie für 7 min bei 150 g zu zentrifugieren. Das Zellpellet wurde in 1 ml BTM resuspendiert und wie unter 2.4.1 beschrieben die Zellzahl auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt.

In zuvor beschrifteten CryoTube Vials mischte man 500 µl Einzelzellsuspension mit 500 µl Freezemedium und kühlte die einzufrierenden Zellen unverzüglich bei

-80 °C. Spätestens nach einer Woche verlagerte man die CryoTube Vials dauerhaft in den Flüssigstickstofftank bei -196 °C.

2.4.5 Organoidkultur auftauen

Zum erneuten Auftauen von Zellen überführte man den gesamten Inhalt eines tiefgekühlten CryoTube Vials in 10 ml Arbeitsmedium. Dazu schwenkte man die Röhrchen im Wasserbad bei 37 °C, bis die gefrorene Probe sich verflüssigt hatte. Nach Zentrifugation für 7 min bei 150 g und eventuell erneuter Einstellung der Zellzahl auf 2×10^6 Zellen/ml verarbeitete man die Einzelzellsuspension analog wie unter 2.4.2 beschrieben, um die Tumorzellen in 3D-Zellkultur zu überführen.

2.4.6 Medienwechsel

Um die Organoide mit frischen Nährstoffen zu versorgen, wurden die Medien in den 48-Well-Platten mindestens einmal wöchentlich gewechselt oder spätestens dann, wenn die gelblich veränderte Farbe des Mediums einen zu sauren pH-Wert anzeigte. Dafür nahm man mit einer Mikropipette das verbrauchte Kulturmedium ab und fügte mit einer frischen Pipettenspitze 250 µl frisches, vorgewärmtes BTM-Medium hinzu.

2.4.7 Mikroskopie und Vermessung von Organoiden

Um den Wachstumsverlauf zu dokumentieren, wurden die Organoide in den 48-Well-Platten unter dem Auflichtmikroskop *Axiovert 135* betrachtet. Man fotografierte jede Kultur an denselben Stellen mindestens zweimal pro Woche in 2,5- und 10-facher Vergrößerung mit der herstellereigenen Software *AxioVision LE*. Stellvertretend für eine Organoidkultur wurden dazu zwei bis drei Wells ausgewählt, in denen sich als erstes organoidähnliche Zellverbände zeigten.

Um das Wachstum objektivierbar darzustellen, wurden diese Zellverbände immer an der breitesten Stelle mit der Software vermessen und die Messdaten gemeinsam mit den Bildern exportiert. Zusätzlich übertrug man die Messdaten in eine Exceltabelle, die später als Grundlage für die Erstellung der Wachstumskurven diente.

2.4.8 Auswertung der Größen-Messdaten

Am Ende des Versuchszeitraumes lagen die Wachstumsverläufe in Form von Größenmesswerten für einzelne Organoiden der jeweiligen Kulturen in einer Exceltabelle als Rohdaten vor. Von Beginn bis zum Ende jeder Zellkultur wurden mindestens zwei bis maximal drei Organoiden in unterschiedlichen Wells mit Bild und Größenmesswert dokumentiert. Zwischen den Messzeitpunkten konnte es passieren, dass sich die ausgewählten Zellverbände selbst oder das BME auflösten und somit dieselbe Stelle in der Kultur für die Dokumentation nicht mehr auffindbar war. War dies der Fall, wurden diese Messreihen von der Auswertung ausgeschlossen. Für die Erstellung der Wachstumskurven in Excel wurden am Ende nur vollständige Messreihen berücksichtigt. Lagen innerhalb einer Organoidkultur mehrere vollständige Messreihen vor, wurde der Mittelwert gebildet und dieser graphisch in einem Liniendiagramm über die Zeit dargestellt.

2.5 Charakterisierung

2.5.1 Antikörper

Tabelle 8: Auflistung Antikörper für Immunhistochemie

Epitop	Klon	Spezies	Isotyp	Verdünnung	Hersteller (Bestellnummer)
CK7	OV-TL 12/30	Maus	IgG1, kappa	1:2000	Agilent (M7018)
CK20	K _s 20.8	Maus	IgG2a, kappa	1:400	Agilent (M7019)
GATA3	L50-823	Maus		ready to use	Roche (07107749001)
FGFR3	B-9	Maus	IgG2a, kappa	1:50	Santa Cruz Biotechnology (sc-13121)
p53	DO-7	Maus	IgG2b	1:400	Novocastra™ (NCL-L-p53-DO7)
p63	SFI-6	Maus	IgG	1:400	DCS (PI006C002)
Ki-67	MIB-1	Maus	IgG1, kappa	1:400	Agilent (M7240)
CD44	DF1485	Maus	IgG1, kappa	1:50	Agilent (M7082)

Tabelle 9: Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen. C = Chamberslides, K = Kryoschnitte

Epitop	Klon	Spezies	Isotyp	Verdünnung	Hersteller (Bestellnummer)
GATA3	polyklonal	Kaninchen	IgG	C: 1:200 K: 1:100	Abcam (ab106625)
CK5	polyklonal	Kaninchen	IgG	C: 1:200 K: 1:100	BioLegend (905503)
CK8/18	5D3	Maus	IgG1	C: 1:200 K: 1:100	Invitrogen (MA5-14088)

2.5.2 Herstellung von Kryoschnitten (Organoide)

Wie unter 2.4.3 beschrieben löste man das BME der zu fixierenden Organoidkultur auf und überführte sie unter mehrmaligem Ausspülen der Wells mit 0,1% BSA/PBS in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen. Dabei beschichtete man die Gefäße und Pipettenspitzen mit 0,1% BSA/PBS, um die Anhaftung von Organoiden an den Kunststoffoberflächen zu verhindern. Nach Zentrifugation bei 150 g für 2 min resuspendierte man das Pellet in 500 µl 4% PFA und überführte es in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß. Nach 30 min Inkubation bei RT fügte man 500 µl PBS hinzu und wartete weitere 15 min. Nach Zentrifugation bei 200 g für 1 min zog man das PFA/PBS-Gemisch vorsichtig ab und wusch die Zellen nochmal in 1 ml 0,1% BSA/PBS für 15 min. Zum Schluss erfolgte eine letzte Zentrifugation unter selben Bedingungen, wie im vorherigen Schritt, der Überstand wurde bis auf 50 µl abgenommen und das resuspendierte Zellpellet in einen vorbereiteten gekühlten Block aus Tissue-Tek überführt. Diesen Block ließ man bei -20 °C aushärten, um schließlich im Kryotom Schnitte von 5 – 20 µm Dicke anzufertigen. Die Kryoschnitte wurden auf zuvor beschriftete Objektträger aufgezogen und waren somit für die anschließende Färbung vorbereitet.

2.5.3 Herstellung von Paraffinschnitten (Organoide)

Zur Fixierung der Organoide für Paraffinschnitte folgte man analog den Schritten wie unter 2.5.4 beschrieben bis einschließlich der ersten Zentrifugation bei 150 g

für 2 min. Zur Zellfixierung überführte man das in 500 µl 4% PFA gelöste Zellpellet in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß und inkubierte bei RT für 40 min. Nach erneuter Zentrifugation bei 200 g für 2 min und Abnehmen des PFA-Überstandes resuspendierte man das Zellpellet in 300 µl flüssigem Histogel, welches man zuvor im Wasserbad auf 70 °C erwärmt hatte. Das Zell-Histogel-Gemisch ließ man im Kühlschrank in einer ca. 1 cm x 1 cm großen Cryomold ausreichend aushärten. Im Anschluss konnte der Block bis zur Paraffineinbettung in einer Einbettkassette in 70% Ethanol bei RT gelagert werden.

Zum Paraffinieren der Probe wurde im nächsten Schritt die Einbettkassette samt Histogelblock im Gewebeeinfiltrationsautomat nach folgendem Schema behandelt:

Tabelle 10: Programmablauf Gewebeeinfiltration

Ethanol 70%	1:30 h	Das insgesamt 17 h andauernde Programm begann zunächst mit einer aufsteigenden Ethanolreihe bis zur vollständigen Entwässerung der Probe. Da Paraffinwachs mit Ethanol nur sehr schlecht mischbar ist, verwendete man Zwischenlösungsmittel Xylol, welches sich sowohl in Ethanol als auch in Paraffin lösen lässt. Zum Schluss wurde das Xylol in drei Schritten vollständig durch Paraffin ersetzt.
Ethanol 70%	1:00 h	
Ethanol 96%	1:30 h	
Ethanol 96%	1:00 h	
Ethanol 100%	1:30 h	
Ethanol 100%	1:00 h	
Ethanol 100%	1:00 h	
Xylol	1:30 h	
Xylol	1:30 h	
Xylol	1:00 h	
Paraffin	1:30 h	
Paraffin	1:30 h	
Paraffin	1:30 h	

Nach Programmablauf wurde die mit Paraffin durchsetzte Probe in wannenförmigen Metall-Gußformen mit flüssigem Paraffin zum fertigen Block gegossen und die Einbettkassette als Träger aufgesetzt.

Am Mikrotom wurden vom fertigen Paraffin-Block Schnitte in 3 µm Dicke angefertigt und auf Superfrost® Objektträger aufgezogen.

2.5.4 Herstellung von Paraffinschnitten (Originaltumor)

Für die Analysen am Originaltumorgewebe unterstützte das Institut für Pathologie des UKT freundlicherweise mit Know-How und Gerätschaften.

Die zur jeweiligen Zellkultur korrespondierenden Paraffinblöcke wurden vom Institutsarchiv der Pathologie zur Verfügung gestellt. Man erstellte Schnitte von 2,5 µm Dicke und nahm diese auf Superfrost® Objektträger auf.

2.5.5 3D-Immunfluoreszenz Färbung

Um die Organoide in Ihrer 3D-Struktur zu betrachten, fixierte man sie in einem Objektträger mit ablösbarer Kulturkammer. Bei gut wachsenden Kulturen löste man das BME von 3-4 Wells in gleicher Weise wie unter 2.4.3 beschrieben auf und überführte die Zellen in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen. Um alle Organoide zu erfassen und das BME aus der Zellsuspension zu waschen, spülte man die Wells mit kaltem Splittingmedium und füllte das Zentrifugationsröhrchen anschließend ebenfalls mit Splittingmedium auf 12 ml auf. Nach anschließender Zentrifugation bei 150 g für 5 min wurde das Zellpellet in 1160 µl Splittingmedium gemischt mit 40 µl BME resuspendiert und auf die 8 Kammern mit je 150 µl verteilt. Durch die darauffolgende Inkubation für 2 h bei 37°C und 5% CO₂ gab das auspolymerisierte BME den Organoiden eine feste Struktur, in der sie dann mit 250 µl 4% PFA für 30 min bei Raumtemperatur fixiert werden konnten. Das PFA wurde abgenommen und die Zellen 3x für 5 min mit 250 µl PBS pro Kammer gewaschen. Die fixierten Organoide bereitete man mit 250 µl Blockierungslösung pro Kammer bei einer Inkubation für 30 –60 min bei 37 °C 5% CO₂ und einem einmaligen 5-minütigem Waschschrift mit 0,1% PBS-Tween 20 für die Färbung vor. Primär- wie Sekundärantikörper wurden entsprechend des Verdünnungsfaktors (siehe Tabelle 9) in 1% BSA/PBS angesetzt. 100 µl Primärantikörperlösung wurde für 1 h bei 37 °C 5% CO₂ inkubiert, anschließend 3x 3 min mit 250 µl pro Kammer gewaschen und der Sekundärantikörper für 1 h bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Um die fluoreszierende Eigenschaft der Antikörper zu erhalten, fanden alle Inkubationsschritte in möglichst lichtarmer Umgebung statt. Zum Schluss wusch man die Kammern noch 3x für 3 min mit

250 µl PBS und bedeckte die Probe mit Dako Mounting Medium und einem Deckglas.

2.5.6 Färbemethoden

2.5.6.1 Immunfluoreszenz

Färbungen mittels Immunfluoreszenz wurden ausschließlich an fixierten Kryoschnitten von Organoiden (siehe 2.5.2) durchgeführt. Die Kryoschnitte wurden auf Objektträgern über Nacht luftgetrocknet und bei 40 °C für 20 min auf einem Heizblock angebacken. Zur Fixierung behandelte man die Objektträger bei -20 °C für 5 min im Methanolbad und wusch diese anschließend mit 250 µl PBS pro Objektträger für 3 min.

Primär- sowie Sekundärantikörper wurden in jeweils definierter Verdünnung in 0,1% BSA/PBS (siehe Tabelle 9) angesetzt. Anschließend wurden die Organoide nach folgendem Schema gefärbt:

1. 100 µl Primärantikörper pro Objektträger
2. Inkubation bei 37 °C, 5% CO₂ für 60 min
3. Primärantikörper abschütten
4. Dreimaliges Waschen mit 250 µl PBS pro Objektträger für 3 min
5. 100 µl Sekundärantikörper pro Objektträger
6. Inkubation bei RT in feuchter Kammer für 60 min
7. Sekundärantikörper abschütten
8. Dreimaliges Waschen mit 250 µl PBS pro Objektträger für 3 min

Die noch leicht feuchten Objektträger bestückte man zum Schluss mittels einem Tropfen Fluorescence Mounting Medium mit einem Deckglas und lagerte sie in abgedunkelten Objektträgerboxen bis zur Mikroskopie.

2.5.6.2 Immunhistochemie

Zur qualitativen Analyse der Originaltumoren wurden immunhistochemische Färbungen anhand von acht verschiedenen Antikörpern durchgeführt (für Antikörper siehe Tabelle 8). Die Objektträger wurden im vollautomatisierten Färbeautomaten *BenchMark ULTRA IHC/ISH System* am Institut für Pathologie

in Tübingen durchgeführt. Als Nachweissystem für die Primärantikörper (Maus, Kaninchen) diente das *OptiView™ DAB IHC-Kit* von Roche Diagnostics.

Im Anschluss wurden alle gefärbten Gewebeschnitte für die Mikroskopie im *TissueTek Glas*-Automaten mit einem Deckglas versehen.

2.5.6.3 H/E-Färbung

Als Standard-Übersichtsfärbung erstellte man von jedem Originaltumor eine H/E-Färbung. Dazu wurden die Objektträger im *TissueTek Prisma Plus* vollautomatisch gefärbt und anschließend ebenfalls mit einem Deckglas versehen.

Tabelle 11: Programmablauf TissueTek Prisma Plus H/E-Färbemaschine

Trockenzeit	12:00 min
Xylol	2:30 min
Xylol	2:30 min
Alkohol 100%	1:00 min
Alkohol 96%	0:30 min
Alkohol 70%	0:30 min
aqua dest	0:30 min
Hämatoxylin	2:00 min
Hämatoxylin	4:00 min
Hämatoxylin	4:00 min
Leitungswasser	10:00 min
Eosin	0:30 min
Leitungswasser	0:10 min
Alkohol 70%	1:00 min
Alkohol 96%	1:00 min
Alkohol 100%	1:00 min
Alkohol 100%	1:00 min
Xylol	4:00 min

2.6 Auswertung der Originaltumor-Färbungen

2.6.1 Digitalisierung der Objektträger

Die gefärbten Schnitte aller Originaltumoren wurden mit dem Objektträger-Scanner *Nanozoomer 2.0 HT* von Hamamatsu semi-automatisch digitalisiert. Nachdem man die Objektträger in die Kassetten der Maschine einsortiert hatte, programmierte man den Scanvorgang in der herstellereigenen Software und setzte die relevanten Fokuspunkte für jedes Gewebestück. Anhand dieser Einstellungen erstellte der Maschine anschließend eine Bilddatei, in der die Gesamtheit des Gewebeschnittes mit bis zu 40-facher optischer Vergrößerung betrachtet werden konnte.

2.6.2 Digitale Mikroskopie und Bildexport in NDP.view2 – Software

Zur Analyse der digitalisierten Gewebeschnitte kam die herstellereigene *NDP.view2 Image viewing software* zum Einsatz. Zunächst verschaffte man sich in der H/E-Färbung eine Übersicht und suchte tumorsuspekte Areale des Urothels auf. Innerhalb dieser Areale wurde mit den Bildbearbeitungswerkzeugen der Software ein gelbes Quadrat so platziert, dass möglichst viele Urothelzellen durch das Quadrat eingefasst wurden. Die Größe des Quadrats entsprach dem vollen Bildausschnitt in einer 20-fachen Vergrößerung. Im Anschluss exportierte man Bilder als .jpeg- oder .tiff-Dateien in 2,5-, 5- und 20-facher Vergrößerung, die dieses Quadrat mit abbildeten. In den Bilddateien der IHC-Färbungen suchte man denselben Ausschnitt der tumorsuspekten Areale auf und setzte ein gleich großes Quadrat an die gleiche Stelle, wie in der H/E-Färbung. Auch hier exportierte man Bilder in 2,5-, 5-, und 20-facher Vergrößerung.

So erhielt man am Ende pro Originaltumor neun Bilder (1x H/E, 8x IHC-Färbungen) von derselben Region des Urothels in 20-facher Vergrößerung. Für die Auswertung wurden die Einzelbilder in einer PowerPoint-Präsentation übersichtlich zusammengefügt.

Fielen innerhalb eines Originaltumors in der H/E-Färbung oder den IHC-Färbungen mehrere Areale auf, die sich entweder morphologisch oder immunhistochemisch unterschiedlich darstellten, wurden diese nach dem beschriebenen Schema getrennt voneinander festgehalten.

2.6.3 Expressionsanalyse mittels Histoscore

Das Histoscore Bewertungssystem bietet eine Möglichkeit aus immunhistochemischen Färbungen objektivierbare Daten zur besseren Vergleichbarkeit zu extrahieren. Hierfür beurteilte man die Farbtintensität aller Urothelzellen innerhalb eines Bildausschnitts mit 20-facher Vergrößerung nach vier Stufen. Zusätzlich wurde der Anteil, den die Zellen der jeweiligen Stufe vom gesamten Urothel einnahmen, auf 5% genau angegeben. Alle umliegenden nicht-urothelialen Zellen blieben für die Auswertung unberücksichtigt.

Tabelle 12: Histoscore Bewertungssystem

Stufe	x	+	++	+++
Farbtintensität	Nicht vorhanden	Schwach	Mittel	Stark
Faktor	0	1	2	3

Unter Berücksichtigung des entsprechenden Faktors berechnete sich der Histoscore wie folgt:

$$\text{Histoscore} = 100 * (\text{Anteil „x“} * 0 + \text{Anteil „+“} * 1 + \text{Anteil „++“} * 2 + \text{Anteil „+++“} * 3)$$

Daraus ergab sich ein Wert zwischen 0 und 300 ohne Einheit, der zur Vergleichbarkeit der Färbungen untereinander herangezogen wurde.

Die Auswertung wurde von einem Medizinstudierenden im fortgeschrittenen klinischen Semester durchgeführt, der zuvor durch fachärztliches Personal des Pathologischen Instituts unterwiesen wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Zellkultur

3.1.1 Übersicht aufgearbeiteter Proben

Tabelle 13: Zusammenfassung aller Proben, die nach Protokoll in einer Organoidkultur angesetzt wurden. Einzelne Proben (grau hinterlegt) sind nachträglich aus tiefgefrorener Einzelzellsuspension aus dem Stickstofftank aufgetaut worden und wurden deshalb nicht gewogen. Die Herkunft des ursprünglichen Ausgangsmaterials, das zugehörige Gewicht und die Anzahl der Passagen in der Primärkultur sind bei diesen Kulturen in Klammern gesetzt. Für BCO#134 wurden nur kleinste Gewebefetzen überliefert, die aus technischen nicht gewogen werden konnten. Cx = Zystektomie, TUR-B = Transurethrale Resektion Blasentumor, NUE = Nephroureterektomie.

Kulturnummer	Datum	Ausgangsmaterial	Gewicht (in mg)	Passagen
BCO#126	2020-11-04	TUR-B	200	0
BCO#128	2020-11-18	TUR-B	490	1
BCO#130	2020-12-02	TUR-B	160	1
BCO#132	2020-12-04	TUR-B	310	0
BCO#134	2020-12-08	TUR-B	-	0
BCO#135	2020-12-14	Cx	250	1
BCO#137	2020-12-17	TUR-B	120	2
BCO#140	2021-06-25	Stickstofftank (TUR-B)	- (210)	3 (> 12)
BCO#143	2021-01-14	TUR-B	290	0
BCO#147	2021-06-18	Stickstofftank (NUE)	- (250)	2 (10)
BCO#154-mal.	2021-06-25	Stickstofftank (Cx)	- (270)	2 (8)
BCO#179.1	2021-05-11	TUR-B	130	1
BCO#179.2	2021-05-12	TUR-B	290	2
BCO#180	2021-05-14	TUR-B	1840	2
BCO#185	2021-05-26	TUR-B	900	2
BCO#185.1	2021-06-18	Stickstofftank (TUR-B)	- (900)	0
BCO#189	2021-06-02	TUR-B	60	2
BCO#199	2021-06-23	TUR-B	330	0
BCO#202-mal.	2021-06-25	Cx	610	0
BCO#203-ben.	2021-06-25	Cx	170	0
BCO#204	2021-06-28	Cx	450	1
BCO#208	2021-07-08	TUR-B	670	3

In Tabelle 13 sind alle 22 Organoidkulturen aufgelistet, die entweder aus Frischtumorgewebe (TUR-B, Cx) oder aus Rückstellproben aus dem Stickstofftank angesetzt wurden. Bei BCO#140, BCO#147 und BCO#154 handelt es sich um Kulturen, die bereits nach der Aufarbeitung des Frischtumorgewebes durch Nizar Lipke (Doktorand im selben Labor) eine stabile Proliferation gezeigt hatten. Deshalb wurden diese Organoidkulturen aus eingefrorenen Rückstellproben neu angesetzt und lediglich bis zur 2. bzw. 3. Passage untersucht. Es ist allerdings bekannt, dass die jeweiligen Primärkulturen bis zur 5. Passage und darüber hinaus kultiviert werden konnten. BCO#140, BCO#147 und BCO#154 bilden zusammen mit BCO#136 (Zellkultur durch Nizar Lipke) die Gruppe der stabilen Proliferation. Weil bei der Aufarbeitung von BCO#136 keine Rückstellproben gewonnen werden konnten, wurden keine weiteren Kulturversuche mit dieser Probe angesetzt.

Tabelle 14: Anzahl der Organoidkulturen, die die jeweilige Passage erreicht haben. BCO#140, BCO#147 und BCO#154-mal. werden in dieser Auflistung nicht berücksichtigt. Von ihnen ist bekannt, dass sie > 5 Passagen erreicht haben.

Passagen	0.	1.	2.	3.
Anzahl (n = 19)	8	5	5	1

Betrachtet man die Anzahl der Passagen aller Kulturen, die aus Frischtumorgewebe angesetzt wurden, wird deutlich, dass mehr als die Hälfte (n = 13) bereits nach der 1. Passage kein Wachstum mehr zeigten und deshalb verworfen wurden. Bei fünf Kulturen konnte sichtbares Wachstum bis zur 2. Passage beobachtet werden und nur eine Kultur erreichte während des Versuchszeitraums die 3. Passage.

3.1.2 Gruppeneinteilung in „stabile bzw. variable Proliferation“

Für alle weiteren Analysen wurden die beiden Gruppen „stabile Proliferation“ (≥ 5 . Passage) und „variable Proliferation“ (≤ 5 . Passage) miteinander verglichen. Tabelle 14 zeigt, dass keine der für diese Dissertation aufgearbeiteten Proben die 5. Passage oder höher erreicht hat. Deshalb wurde die Gruppe der „stabilen Proliferation“ durch vier Proben gebildet, die im Rahmen der Dissertation von Nizar Lipke die 5. Passage und höher erreicht haben. Soweit vorhanden, wurde

das Wachstum dieser Gruppe anhand von eingefrorenen Rückstellproben erneut untersucht. Für die Vergleichsgruppe der Organoidkulturen mit „variabler Proliferation“ wurden aus den 19 aufgearbeiteten Proben ebenfalls vier ausgewählt, für die eine weitestgehend lückenlose Dokumentation des Wachstumsverhaltens möglich war.

Tabelle 15: Gruppeneinteilung für weitere Analyse

„stabile Proliferation“	„variable Proliferation“
BCO#136	BCO#180
BCO#140	BCO#185
BCO#147	BCO#189
BCO#154-mal.	BCO#208

3.1.3 Limitationen der 3D-Zellkultur

Während der laufenden Experimente stellten sich zwei wesentliche Aspekte heraus, die die systematische Charakterisierung der Organoide erschwerten. Zum einen konnte beobachtet werden, dass sich die sogenannten Domes in den einzelnen Wells unvorhergesehen vom Boden der Zellkulturplatte ablösten und frei im Medium herum schwammen. Dadurch war es nicht mehr möglich, die Zellverbände für die Vermessung (siehe 2.4.7) wiederzufinden und es resultierten Lücken im Dokumentationsverlauf der Größenveränderung der Organoide. Die weitaus größere Limitation für Charakterisierung der Organoide war allerdings das beschränkte Wachstum. Für keine der eigens aufgearbeiteten Proben konnte genug Zellmaterial gewonnen werden, um es den histologischen, immunhistochemischen oder molekularen Analysen zuzuführen. Lediglich für BCO#185 war in der 1. Passage theoretisch genug Zellmaterial vorhanden, um einen Paraffinblock zu erstellen. Beim Erstellen der Dünnschnitte am Mikrotom konnten allerdings keine Organoide mehr gefunden werden. Vermutlich waren

die Zellen zu diffus im Block verteilt oder sie sind während der Arbeitsschritte zur Fixierung verloren gegangen (Abbildung 6).

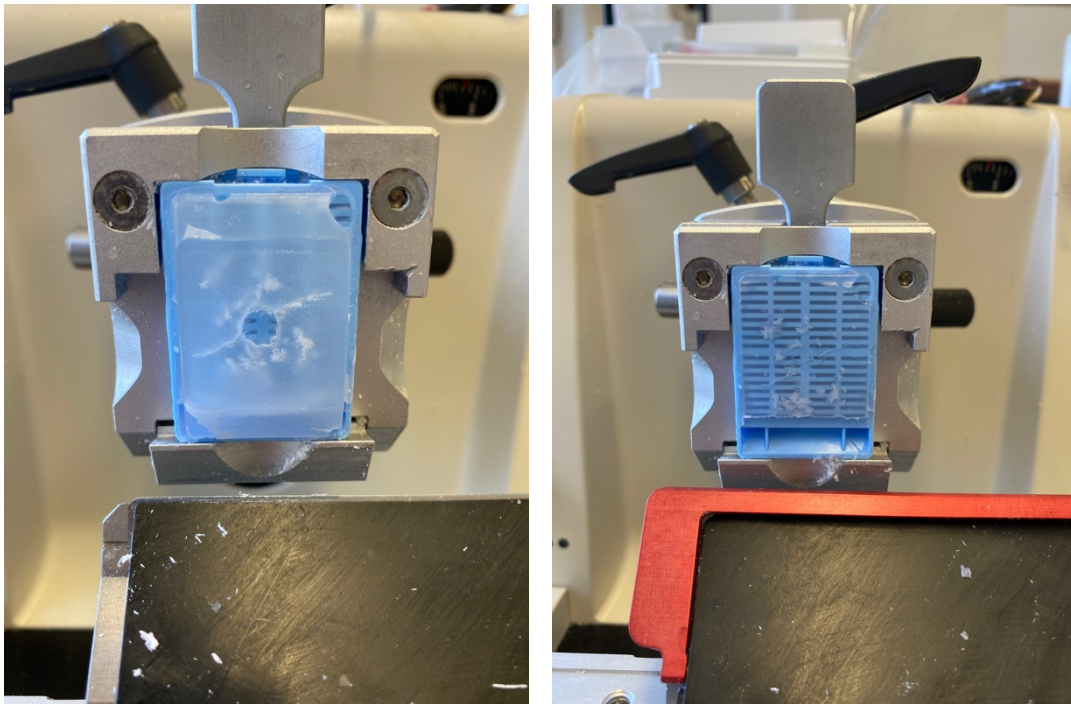


Abbildung 6: Paraffinblock mit Zellen zu BCO#185 1. Passage eingespannt im Mikrotom. An der Stelle, an der eigentlich das Zellpellet liegen sollte, wies der Block eine Luftblase auf (Bild links). Auch die weißlichen Stellen (Bild rechts) konnten nicht als paraffin-fixierte Organoide unter dem Mikroskop identifiziert werden.

3.1.4 Bilddokumentation

Abbildung 7 zeigt beispielhaft die Bilddokumentation von BCO#140 in der 3. Passage. Soweit möglich wurde für jede Vermessung derselbe Bereich des Domes wieder aufgesucht (Markierung rotes Quadrat) und die gleichen Zellverbände vermessen. Von Tag 2 bis Tag 13 kann sowohl in der 2,5- als auch in der 10-fachen Vergrößerung eine deutliche Verdichtung der Zellen beobachtet werden. An Tag 13 hatte sich das BME im Zentrum des Domes aufgelöst und die Zellen schwammen frei im Medium herum (siehe Limitationen 3.1.3). Am Rand des Domes war weiterhin dichtes Zellmaterial zu sehen.

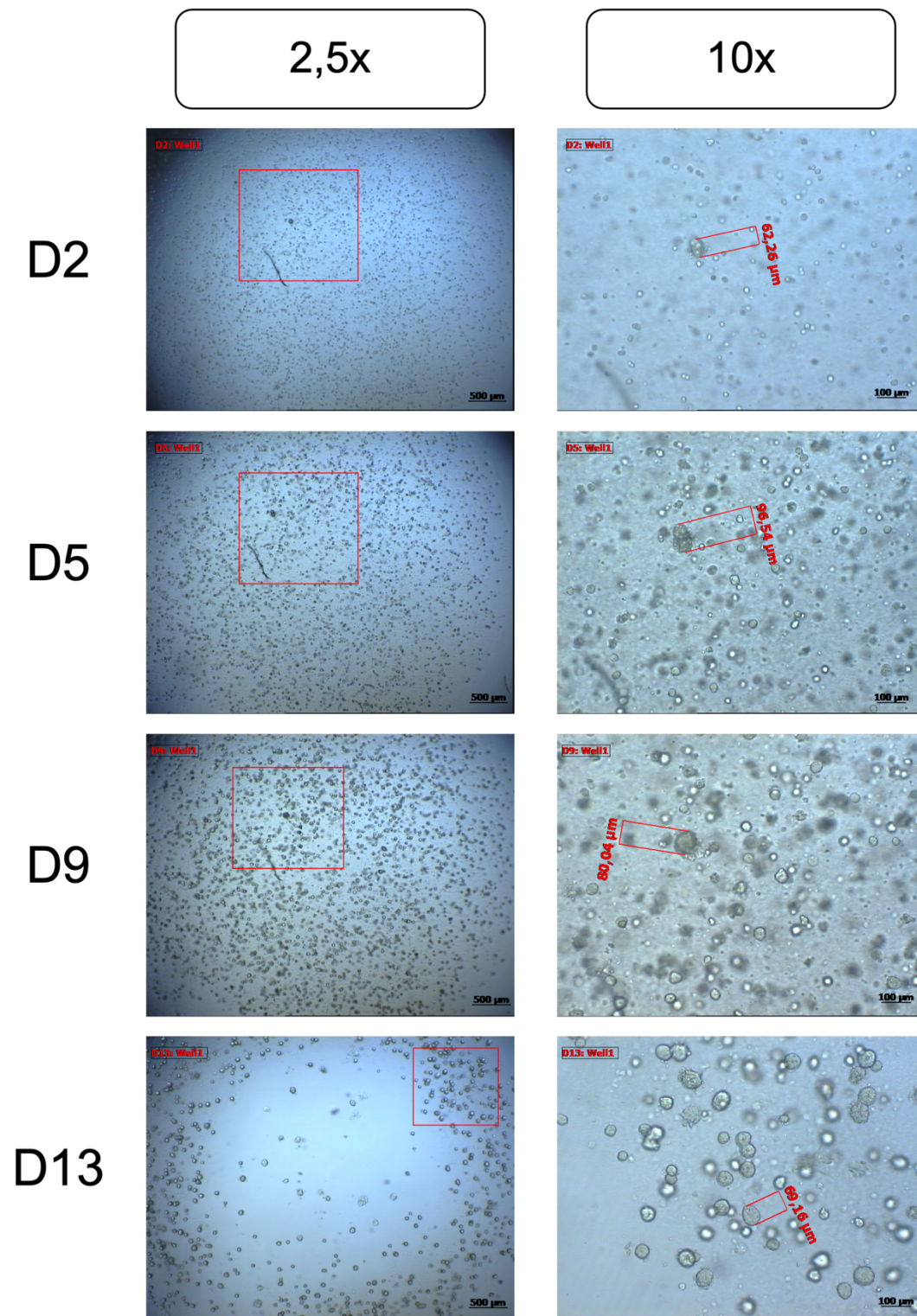


Abbildung 7: Bilddokumentation BCO#140 3. Passage - Tag 2 bis 13 (D2 bis D13). Rotes Quadrat = Ausschnitt für 10x-Vergrößerung. Rote Zahl mit Klammer = Größenvermessung (nach Möglichkeit desselben Organoids). Oben Links Angabe des Tages (D2-13) und des entsprechenden Wells auf Zellkulturplatte zum Wiederauffinden der Stelle.

3.1.5 Wachstumskurven

3.1.5.1 0. Passage

Um das Wachstum der Organoidkultur messbar zu machen, wurden stellvertretend für jede Kultur zwei bis maximal drei Organoide über den Zeitraum der Zellkultur mindestens zweimal wöchentlich vermessen und wie unter 2.4.8 beschrieben Wachstumskurven (Abbildung 8 bis Abbildung 14) für die beiden Gruppen „stabile Proliferation“ und „variable Proliferation“ erstellt. Die Liniendiagramme für die einzelnen Passagen zeigen die Größenzu- bzw. abnahme der Organoide von Beginn der Zellkultur (D0) bis zum Überführen in die nächsthöhere Passage oder Verwerfen der Kultur.

In der 0. Passage zeigt sich in der Gruppe „stabile Proliferation“ eine deutliche Größenzunahme von über 100% innerhalb von 13 Tagen (Abbildung 8). Diese findet in den beiden gemessenen Kulturen zeitversetzt statt. Für BCO#147 konnte nur eine vollständige Messreihe ab Tag 12 aufgenommen werden, weswegen keine Daten von Tag 1 bis 11 in die Auswertung mit eingeflossen sind.

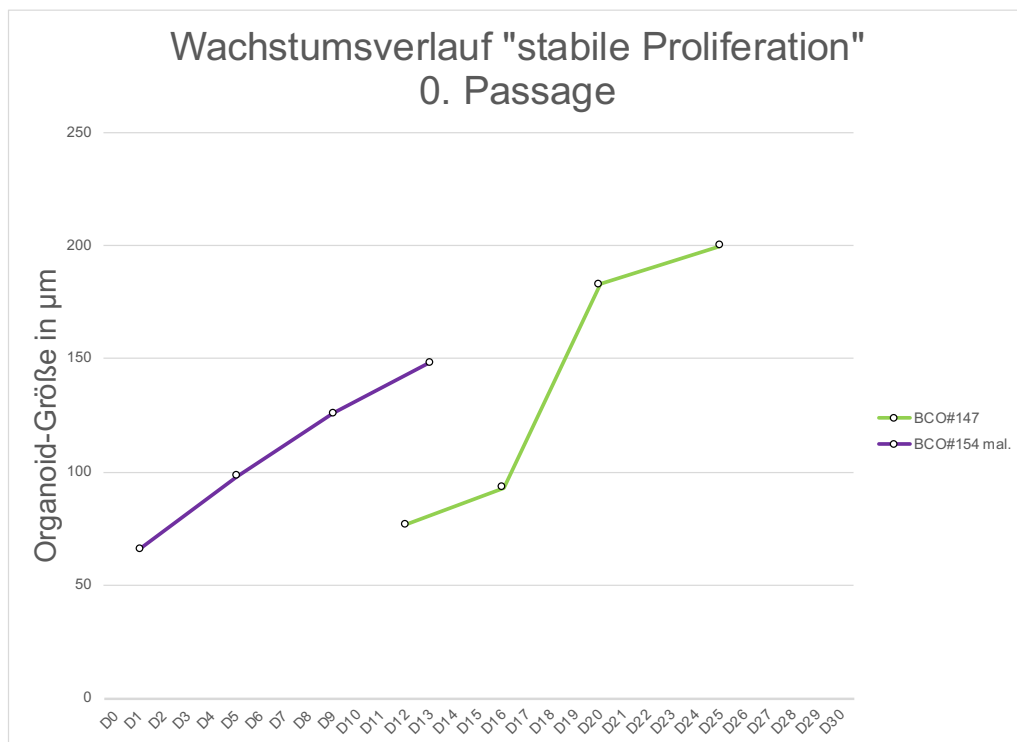


Abbildung 8: Wachstumskurven der Organoid-Gruppe "stabile Proliferation" 0. Passage

Wegen fehlender Rückstellproben für die 0. Passage wurde das Wachstum für BCO#140 nicht untersucht.

Für die Gruppe der „variablen Proliferation“ lässt sich zwar auch Wachstum beobachten allerdings nur mit bis zu 50 % Größenzunahme über einen Zeitraum von fünf bis neun Tagen (Abbildung 9). Weil man in der Mikroskopie bereits sehr früh beobachten konnte, wie sich die ersten Zellverbände wieder auflösten, überführte man alle Kulturen spätestens am Tag 9 in die nächste Passage, in der Hoffnung durch die Vereinzelung und neues Nährmedium bessere Wachstumsbedingungen zu schaffen. Der Nullwert in der Kurve zu BCO#185 zeigt die Auflösung des vermessenen Organoids an. Für BCO#189 existiert keine Bild- und Größendokumentation, weil sich das BME in allen Wells kurz nach der Aufarbeitung auflöste und somit eine systematische Mikroskopie nicht möglich war.

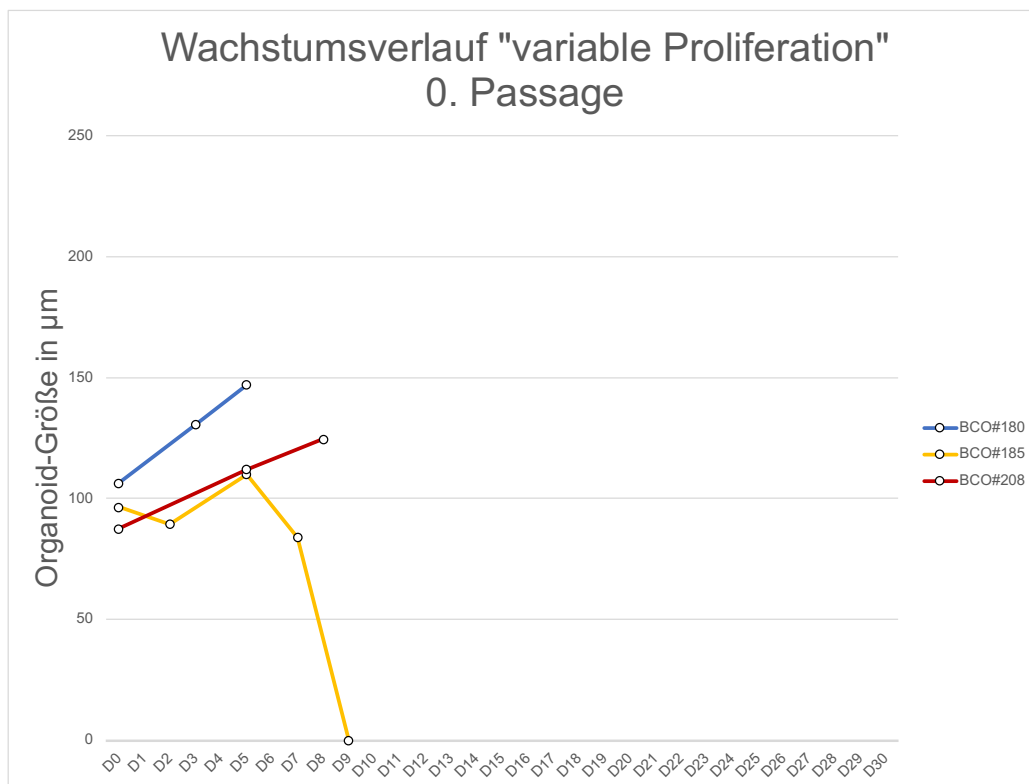


Abbildung 9: Wachstumskurven der Organoid-Gruppe "variable Proliferation" 0. Passage. Das vermessene Organoid zu BCO#185 war zu D9 nicht mehr aufzufinden und hatte sich vermutlich aufgelöst. Dies wird durch den Nullwert an D9 repräsentiert.

3.1.5.2 1. Passage

In der 1. Passage ist das Wachstum für BCO#154 weiterhin ersichtlich, allerdings stagnierte die Größe des Organoids in BCO#147 zwischen 100 und 130 μm (Abbildung 10). Lediglich bei BCO#140 kann eine Größenzunahme von über 100% beobachtet werden. Diese Kultur wurde aus einer Rückstellprobe der 1. Passage aufgetaut.

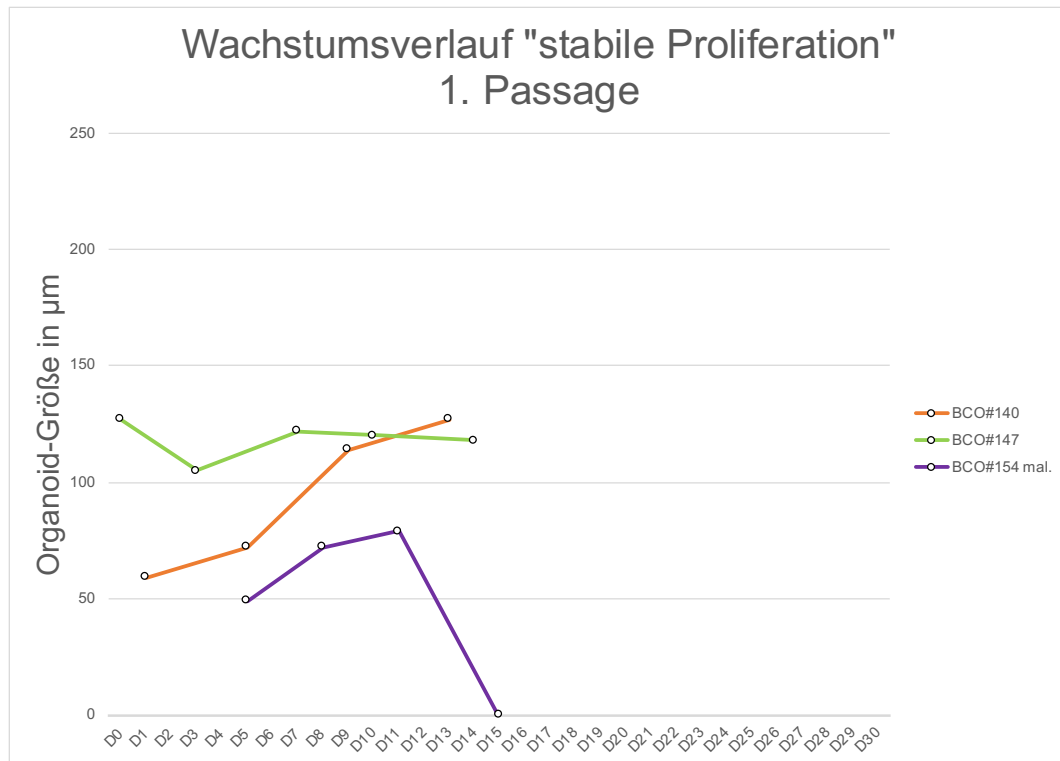


Abbildung 10: Wachstumskurven der Organoid-Gruppe "stabile Proliferation" 1. Passage. Das anfangs vermessene Organoid zu BCO#154 war zu D15 nicht mehr aufzufinden. Dies wird durch den Nullwert an D15 repräsentiert. Im Anschluss wurde die Kultur in die nächste Passage überführt.

In der Gruppe der „variablen Proliferation“ zeigt sich eine deutliche Stagnation und sogar Abnahme der Größenänderung. BCO#180 wuchs zunächst noch kontinuierlich über neun Tage um ca. 50 μm und zeigte dann aber wieder eine negative Wachstumstendenz (Abbildung 11). Bei BCO#208 zeichnete sich von Beginn der Messung an ein Negativtrend ab, bis sich das Organoid sogar komplett auflöste (Nullwert an Tag 13). Im Anschluss konnte für BCO#208 ein neues Organoid verfolgt werden, das von Tag 14 bis Tag 20 kontinuierlich um insgesamt 40 μm wuchs.

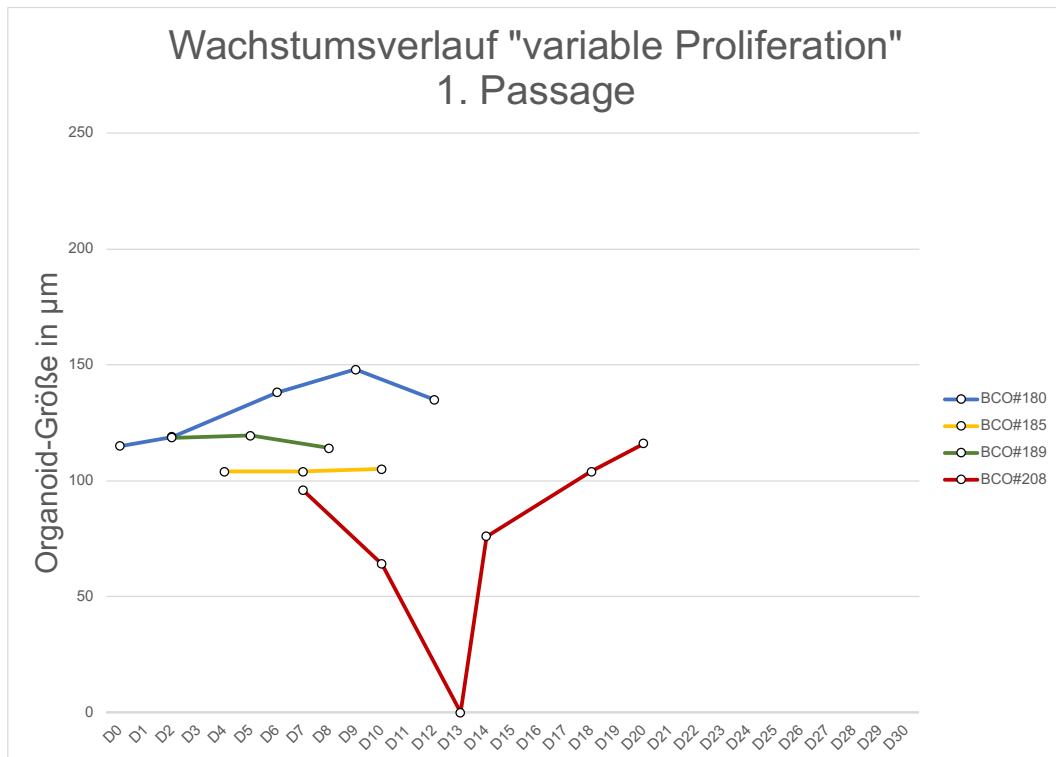


Abbildung 11: Wachstumskurven der Organoid-Gruppe "variable Proliferation" 1. Passage. Das anfangs vermessene Organoid zu BCO#208 war zum Zeitpunkt D13 nicht mehr aufzufinden. Dies wird durch den Nullwert am D13 repräsentiert. Im Anschluss wurde ein neues Organoid vermessen, das kontinuierlich Zuwachs um 40 µm zeigte.

3.1.5.3 2. Passage

Die Wachstumsverläufe der 2. Passage schließen an die Tendenzen aus der 1. Passage an. Stetige Größenzunahme zeigt weiterhin BCO#154 während für BCO#140 und BCO#147 nur zwei Messpunkte existieren, die allerdings auch einen positiven Wachstumstrend erkennen lassen (Abbildung 13). Die beiden letztgenannten Kulturen wurden zum Ende des Versuchszeitraums angesetzt und konnten aufgrund dessen nur bis Tag 6 bzw. Tag 8 vermessen werden.

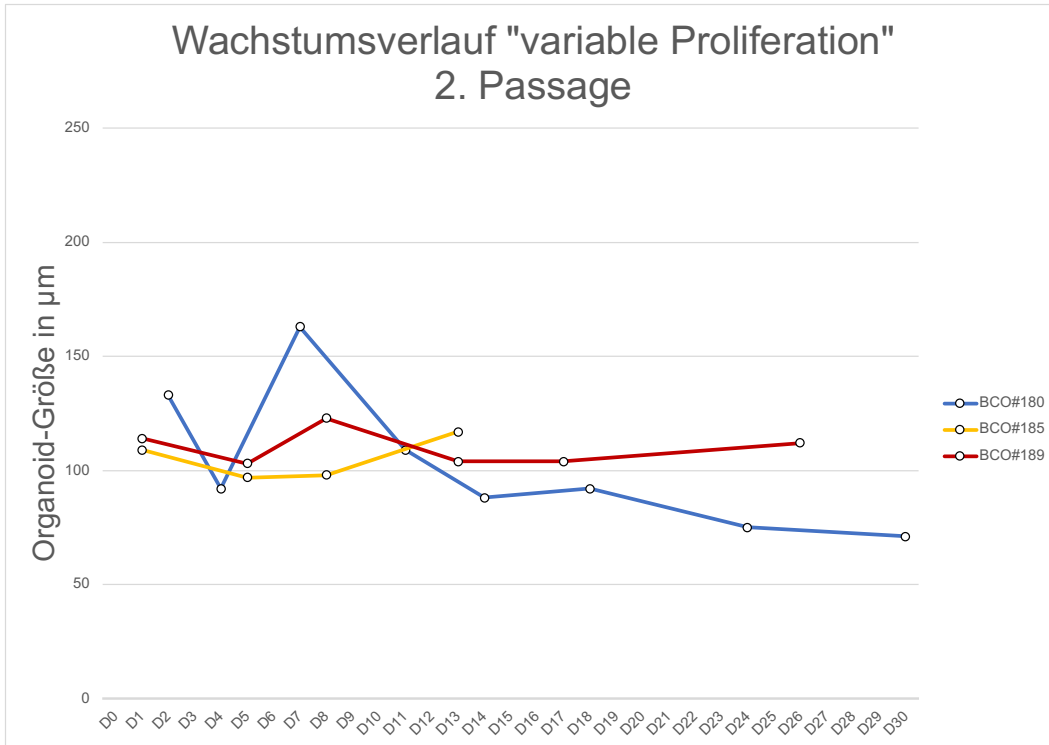


Abbildung 13: Wachstumskurven der Organoid-Gruppe "variable Proliferation" 2. Passage

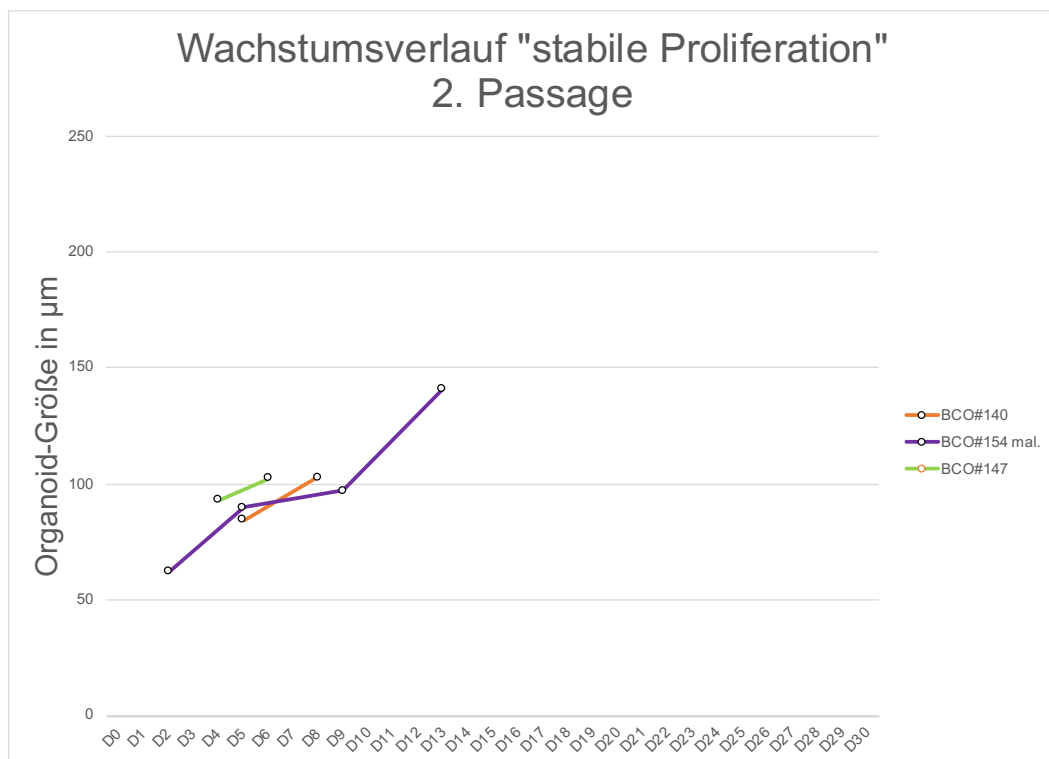


Abbildung 13: Wachstumskurven der Organoid-Gruppe "stabile Proliferation" 2. Passage.

In Abbildung 13 zeigen BCO#185 und BCO#189 erneut eine Stagnation bzw. Abnahme der Größenänderung (max. $\pm 30 \mu\text{m}$). BCO#180 weist eine diffuse Größenänderung bis Tag 18 auf und schrumpft ab dann bis Tag 30 kontinuierlich. BCO#208 wurde ebenfalls gegen Ende des Versuchszeitraums angesetzt und konnte in der 2. Passage nicht mehr verfolgt werden. Es gibt aber Hinweise aus einer parallelen Kultur desselben Tumors, dass ein zweites Aliquot dieses Tumors noch bis zur 3. Passage Wachstum zeigte, dann jedoch ebenfalls die weitere Proliferation einstellte.

BCO#140 konnte als einzige Kultur in der 3. Passage bzgl. des Wachstums untersucht werden. Die Größenzunahme des vermessenen Organoids war mit ca. $+ 20 \mu\text{m}$ gering, aber erkennbar (Abbildung 14). Betrachtet man die Zellkulturbilder (Abbildung 7) wird zudem ersichtlich, dass auch die umliegenden Zellverbände in dem gewählten Bildausschnitt von Tag 2 bis 13 sichtbar an Größe zunahmten. Die Kultur wurde zum Ende des Versuchszeitraums einer RNA-Extraktion für ein Projekt außerhalb dieser Dissertation zugeführt.

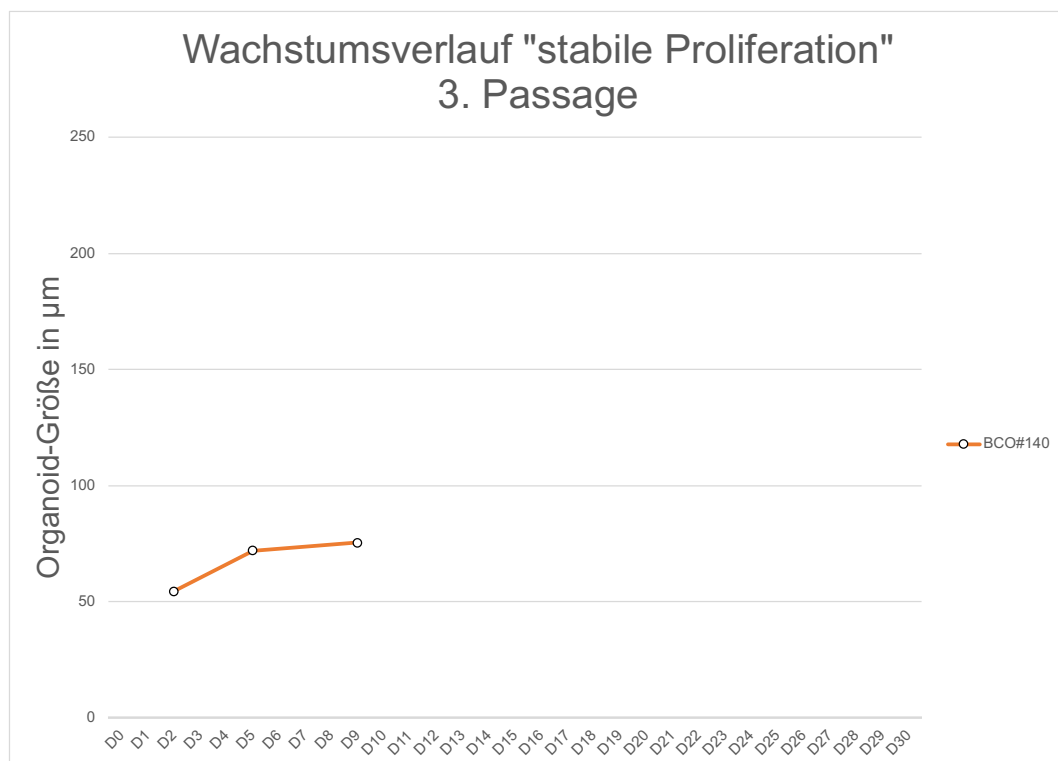


Abbildung 14: Wachstumskurven der Organoid-Gruppe "stabile Proliferation" 3. Passage

3.2 Histologische Charakterisierung

3.2.1 Zellkultur-Ebene

Wie unter 3.1.3 bereits erwähnt, konnte für keine der eigens betreuten Organoidkulturen ausreichend Zellmaterial für eine systematische Charakterisierung gewonnen werden. Deshalb werden unter diesem Punkt nur beispielhaft Abbildungen und Ergebnisse von Einzelversuchen dargelegt und deskriptiv beschrieben.

3.2.1.1 3D-Immunfluoreszenz – Chamberslides

Um Expression bestimmter Marker auf den Zellen im Kontext der räumlichen Struktur der Organoide zu analysieren, wurden 3D-Immunfluoreszenzfärbungen in Chamberslides durchgeführt. Abbildung 15 zeigt beispielhaft die Färbungen für die Antikörper CK5 und CK8/18 an der Kultur BCO#122 in der 0. Passage. Das typische membranös-zytoplasmatische Färbemuster für Zytokeratine scheint gut erhalten zu sein und auch die Kernfärbung (blau) zeigt scharf abgrenzbare Strukturen. Mit dieser Methode konnte somit die räumliche Expression verschiedener Marker gut beurteilt werden.

Die gezeigte Zellkultur BCO#122 wurde kurz vor dem Beginn meiner eigenen praktischen Versuche durch eine Kollegin aufgearbeitet und wird deshalb unter 3.1.1 nicht erwähnt. Die Chamberslides wurden in Zusammenarbeit mit Nizar Lipke angefertigt und ausgewertet.

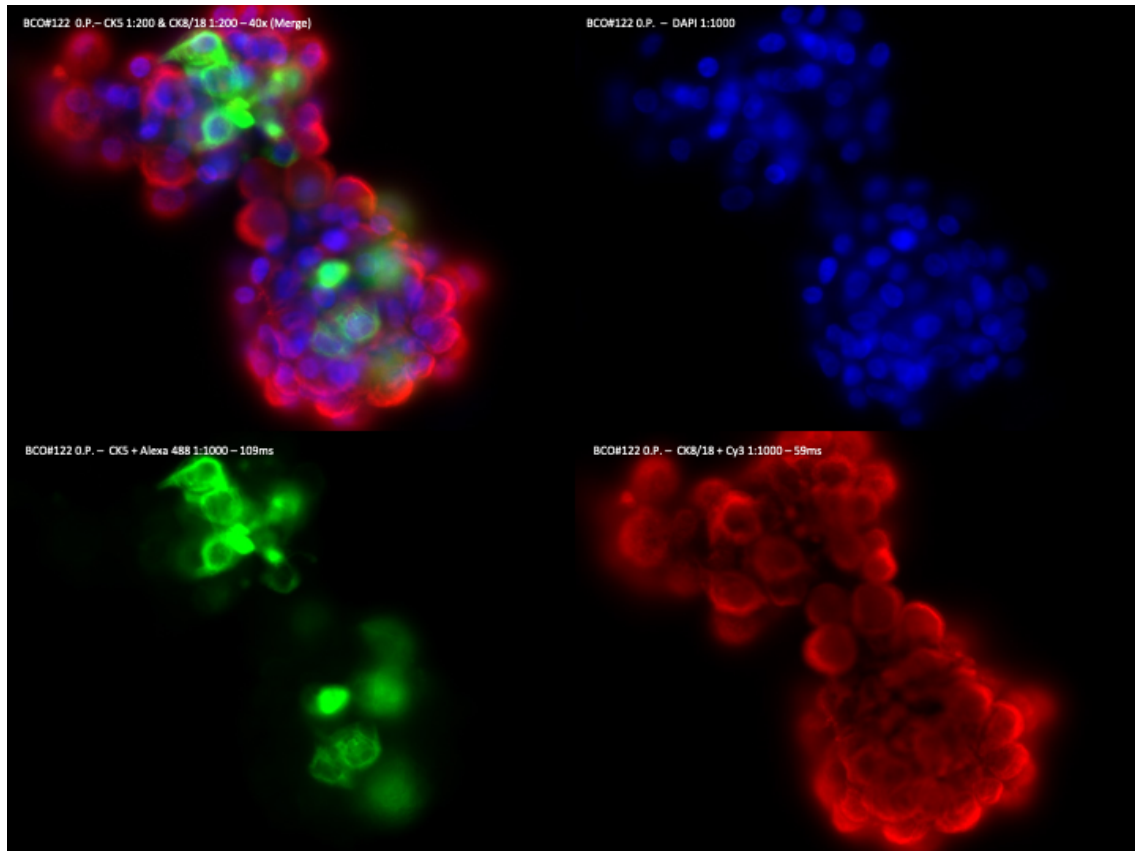


Abbildung 15: BCO#122 0.P. - 3D-Immunfluoreszenz für CK5 und CK8/18 an Chamberslides. Dargestellt sind die drei genutzten Fluoreszenzkanäle blau (DAPI, Kerne), grün (CK5) und rot (CK8/18), sowie die Überlagerung der drei Fluoreszenzen. Vergrößerung 40x.

3.2.1.2 Immunfluoreszenzfärbungen

Ein ursprüngliches Ziel dieser Doktorarbeit war auch, geeignete Methoden für die Charakterisierung der Organoide zu etablieren. Abbildung 16 und Abbildung 17 zeigen Immunfluoreszenzfärbungen an zwei verschiedenen Organoidkulturen im Kryoschnitt und im Paraffinschnitt gegenübergestellt. Es lässt sich feststellen, dass mit beiden Methoden Zellstrukturen angefärbt werden können. In Abbildung 17 sieht man, dass die Zytoarchitektur mit Zellkern, Zellmembran und Zytoplasmaraum im Paraffinschnitt sehr scharf begrenzt und gut erhalten scheint. Im Vergleich dazu sind die Zellgrenzen im Kryoschnitt (Abbildung 16) eher verschwommen dargestellt. Zum einen könnte dieser Unterschied damit begründet werden, dass der Paraffinschnitt nur $\frac{1}{4}$ der Dicke des Kryoschnitts (12 μm Kryoschnitt, 3 μm Paraffinschnitt) beträgt. Damit überlagern sich die Fluoreszenzen über die ganze Dicke des Schnitts und erzeugen dadurch ein

scheinbar unscharfes Bild. Eine geringere Schnittdicke war beim Kryoverfahren aus technischen Gründen nicht möglich. Zum anderen trägt die wesentlich aufwändigere Einbettungsmethode für den Paraffinschnitt zur Stabilität und zum Strukturerhalt der Probe bei, was sich ebenfalls günstig auf die Abbildungsschärfe auswirken könnte.

In der Zusammenschau lässt sich aber anhand dieser Gegenüberstellung sagen, dass der Paraffinschnitt im Vergleich zum Kryoschnitt definitiv die bessere Methode darstellt, um Organoide anhand der Zytoarchitektur und Expressionsmuster verschiedener Marker zu charakterisieren.

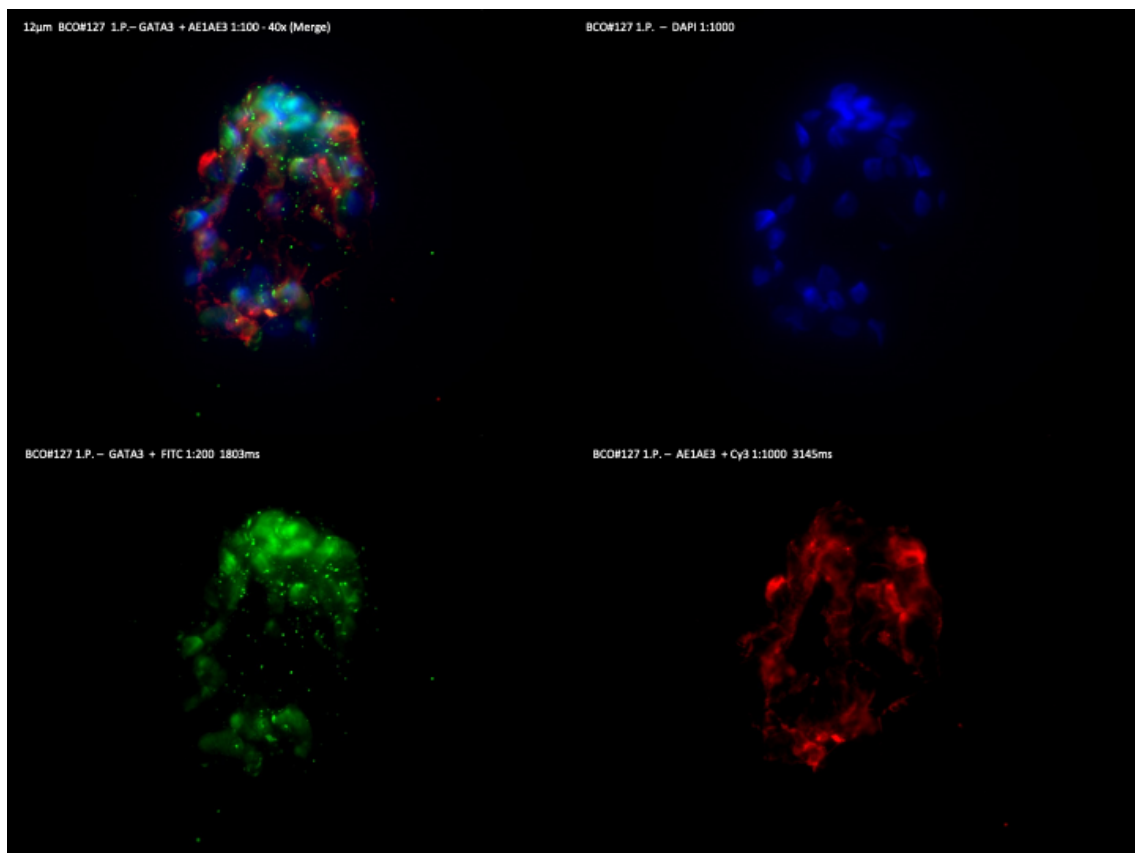


Abbildung 16: BCO#127 1.P. – 12 µm Kryoschnitt - Immunfluoreszenzfärbung für GATA3 und AE1AE3. Dargestellt sind die drei genutzten Fluoreszenzkanäle blau (DAPI, Kerne), grün (GATA3) und rot (AE1AE3), sowie die Überlagerung der drei Fluoreszenzen. Vergrößerung 40x.

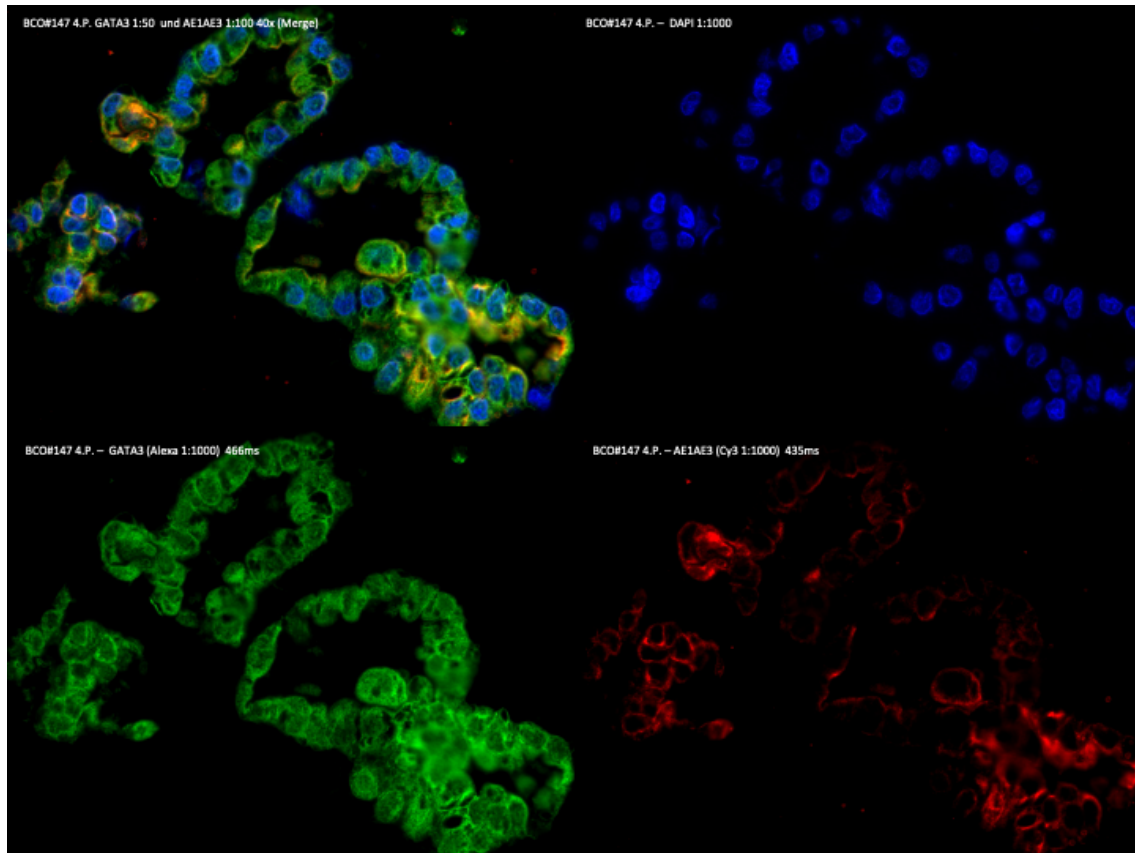


Abbildung 17: BCO#147 4.P. – 3 µm Paraffinschnitt - Immunfluoreszenzfärbung für GATA3 und AE1AE3 (Bilder freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Nizar Lipke). Dargestellt sind die drei genutzten Fluoreszenzkanäle blau (DAPI, Kerne), grün (GATA3) und rot (AE1AE3), sowie die Überlagerung der drei Fluoreszenzen. Vergrößerung 40x.

3.2.2 Originaltumor-Ebene

3.2.2.1 Auswertung H/E- und IHC-Färbungen Gruppe „stabile Proliferation“

3.2.2.1.1 Originaltumor zu BCO#136

Beispielhaft zeigt Abbildung 18 dieselbe Stelle des zur Organoid-Kultur BCO#136 korrespondierenden Originaltumors für die jeweiligen Einzelfärbungen (siehe Abbildungsbeschriftung) in der Zusammenschau. Die Übersichtsabbildungen der H/E- und IHC-Färbungen für die übrigen Originaltumore dieser Gruppe finden sich im Anhang unter Absatz 6.1.

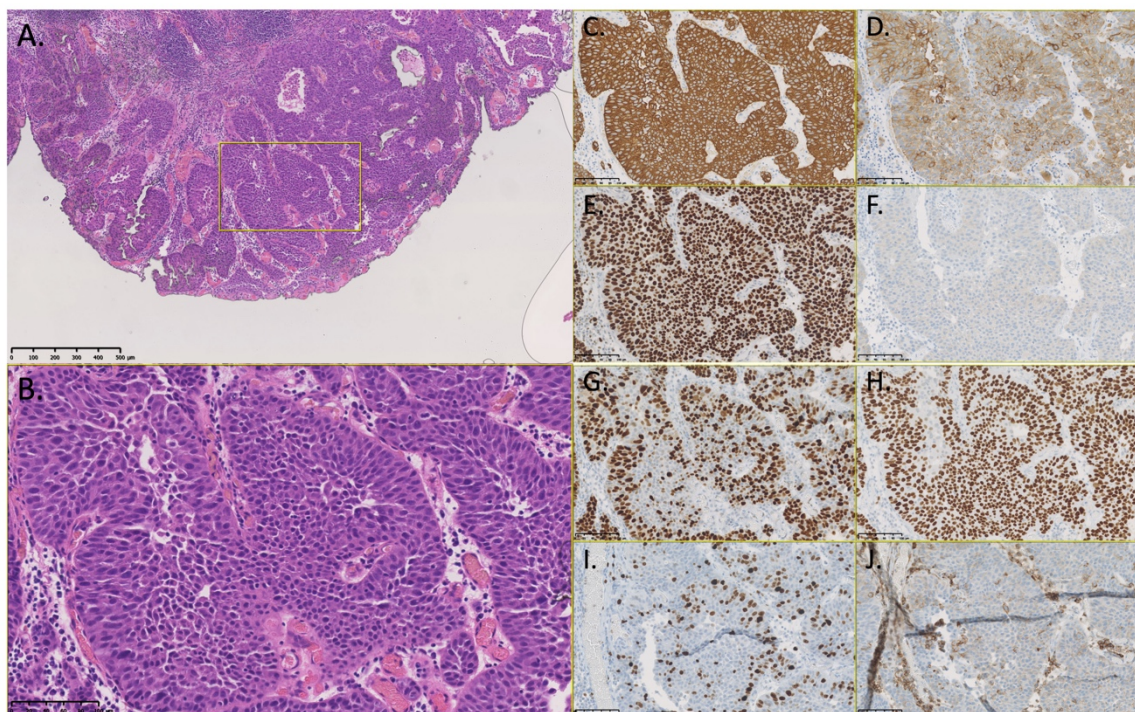


Abbildung 18: IHC Originaltumor K31055/20-2 (BCO#136). Paraffinschnitt 2,5 μ m. Gelbes Quadrat in A zeigt Ausschnitt von B – J. A – H/E (5x – Maßstab: 500 μ m) + B – H/E (20x/Maßstab: 100 μ m). C - CK7. D - CK20. E - GATA3. F - FGFR3. G - p53. H - p63. I - Ki47. J - CD44 (je 20x/Maßstab: 100 μ m).

Für Analyse des Originaltumors in Abbildung 18 wurde ein Ausschnitt gewählt, der in 20-facher Vergrößerung mehr als 90% Urothelzellen abbildet. Die IHC-Färbungen zeigen zunächst für jeden Antikörper eine Anfärbung im zu erwartenden Zellkompartiment (nukleär, zytoplasmatisch, membranös). Die stärkste Farbintensität zeigen die Marker CK7 (C – Histoscore 300) und GATA3 (E – Histoscore 300) über alle Schichten des Urothels, während FGFR3 (F) die

geringste Anfärbbarkeit (Histoscore 80) für den vorliegenden Tumor aufweist. Dennoch zeigt die Färbung für FGFR3 dieses Präparats die stärkste unter allen neun untersuchten Präparaten. Im Hinblick auf die Expressionsverteilung über die verschiedenen Urothelschichten fällt auf, dass sich die Färbung für CK20 (D) eher in den Intermediär- und Superficial-Zellen darstellt und die Tumorseitenproteine p53/p63 (G/H) sich eher in den Basal- und Intermediär-Zellen kräftig anfärben lassen (Tabelle 17). Ki67 (I) scheint eher diffus von basal bis luminal verteilt und zeigt dabei eine mittlere bis starke Intensität in ca. 20% aller abgebildeten Urothelzellen (Histoscore 50). Wegen Schnittartefakten eingeschränkt beurteilbar, aber dennoch sichtbar stellt sich eine schwache Expression von CD44 (J – Histoscore 80) über das gesamte Urothel dar.

Tabelle 16 und Tabelle 17 zeigen exemplarisch die objektifizierbare Auswertung der IHC-Markerauspression anhand des Histoscores sowie deren Verteilung über die Urothelschichten für den Originaltumor von BCO#136. Die Tabellen der übrigen Originaltumore finden sich ebenfalls im Anhang.

Tabelle 16: Histoscore-Auswertung K31055/20-2 (BCO#136)

IHC Originaltumor - K31055/20-2 (BCO#136)				
Antikörper	+	++	+++	Histoscore
CK7	0%	0%	100%	300
CK20	25%	60%	10%	175
GATA3	0%	0%	100%	300
FGFR3	80%	0%	0%	80
p53	0%	30%	50%	210
p63	0%	10%	80%	260
Ki-67	0%	10%	10%	50
CD44	80%	0%	0%	80

Tabelle 17: K31055/20-2 (BCO#136). Markerexpression über die drei Schichten des Urothels: Basale, intermediäre und superfizielle Zellschicht. War die Expression keiner der Schichten eindeutig zuzuordnen, wurde die Kategorie „diffus“ vergeben. Für Auswertungstabellen der übrigen Tumore siehe Anhang.

IHC Originaltumor - K31055/20-2 (BCO#136)					
Antikörper	Basal	Intermediär	Superficial	Diffus	Histoscore
CK7	ja	ja	ja		300
CK20	nein	ja	ja		175
GATA3	ja	ja	ja		300
FGFR3	ja	ja	ja		80
p53	ja	ja	nein		210
p63	ja	ja	nein		260
Ki-67				diffus	50
CD44	ja	ja	ja		80

3.2.2.1.2 Originaltumor zu BCO#140 (siehe Anhang - Abbildung 30 bis Abbildung 32)

Bei den IHC-Färbungen des Originaltumors zu BCO#140 fiel auf, dass einzelne Marker an unterschiedlichen Stellen des Urothels unterschiedlich starke Expression zeigten. Um die Tumorerheterogenität abzubilden, wurden drei Bildausschnitte des Präparats einzeln ausgewertet. In Ausschnitt 3 fielen die Urothelzellen im Vergleich zu Ausschnitt 1 und 2 (Abbildung 30 und Abbildung 31) zunächst durch eine veränderte Morphologie mit kleineren und unregelmäßiger geformten Zellen auf (siehe Abbildung 20). In allen drei Ausschnitten waren die Zellen innerhalb des Urothels negativ für CK20, FGFR3 und p53 (Histoscore 0-15). Dagegen war CD44 über das gesamte Präparat gleichmäßig exprimiert. Dabei zeigte sich in Ausschnitt 1 und 2 eine sehr starke Anfärbung über alle Urothelschichten (Histoscore 300 und 210), während in Ausschnitt 3 eine schwächere Anfärbung (Histoscore 60) v.a. in morphologisch größer geformten Zellen auffiel. CK7 zeigte in Ausschnitt 3 eine ähnliche Verteilung (Histoscore 150) wie CD44 dort, war in Ausschnitt 2 stark über alle Schichten (Histoscore 230) und in Ausschnitt 1 gar nicht exprimiert (Histoscore 5). In Abbildung 19 erkennt man, dass für CK7 und CD44 in Ausschnitt 2 ein gegensätzliches Färbemuster existierte. Während die linke Hälfte des Urothels für CD44 stark positiv und für CK7 negativ war, verhielt es sich für die rechte Hälfte des Urothels genau umgekehrt.

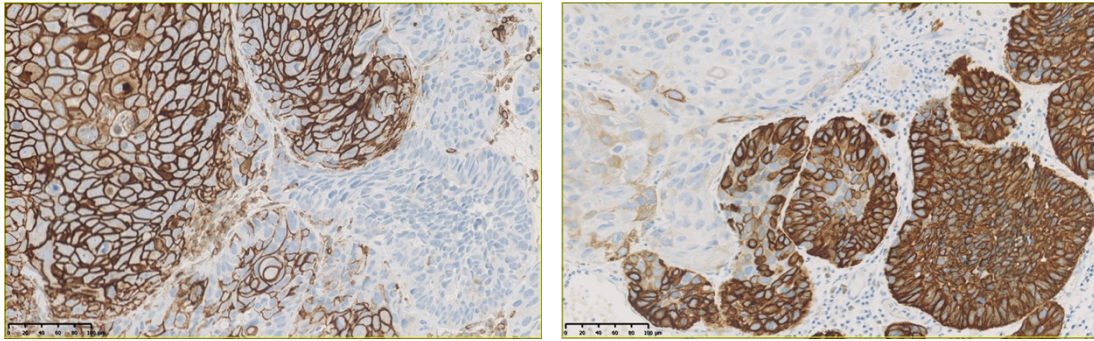


Abbildung 19: Originaltumor zu BCO#140 Ausschnitt 2. Paraffinschnitt 2,5 µm. IHC-Färbung für CD44 (Bild links) und CK7 (Bild rechts). Es ist ein gegensätzliches Expressionsmuster für CD44 und CK7 zu beobachten. CD44-positive Zellen sind negativ für CK7 und umgekehrt.

GATA3 und p63 waren nur in Ausschnitt 1 und 2 stark (Histoscore 190-290) über alle Schichten nachzuweisen, wobei p63 in Ausschnitt 2 v.a. basal vertreten war. Auffallend war die starke Expression von Ki67 über alle Zellschichten (Histoscore 240) in Ausschnitt 3 während Ki67 im übrigen Präparat eher diffus und schwächer exprimiert (Histoscore 45-50) vorkam.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Ausschnitte 1 und 2 bis auf CK7 generell über alle acht Marker hinweg sehr ähnlich waren. Ausschnitt 3 hingegen zeigte mit veränderter Zellmorphologie, vollständigem Fehlen von fünf aus acht Markern (CK20, GATA3, FGFR3, p53, p63) und dafür stärkster Expression von Ki67 die größten Abweichungen innerhalb des gesamten Präparats.

3.2.2.1.3 Originaltumor zu BCO#147 (siehe Anhang - Abbildung 33)

Das Präparat des Originaltumors zu BCO#147 zeigte eine schwache Anfärbbarkeit für H/E (siehe Abbildung 33). Es ließ sich keine eindeutige basal-superfizielle Polarität der Zellen abgrenzen. Dies könnte damit zusammenhängen, dass das Präparat aus einer Nephroureterektomie gewonnen wurde und somit das Gewebe auch aus Teilen des oberen Harntrakts (Niere, Ureter) stammen könnte. Stärkste Expression zeigte CK7 (Histoscore 260) und GATA3 (Histoscore 270). p53 war nur mit sehr schwacher Intensität (Histoscore 60) gleichmäßig über alle Zellen verteilt vertreten. Ki67 stellte sich diffus verteilt allerdings mit kräftig gefärbten Zellkernen dar. Für die übrigen Marker CK20, FGFR3, p63, CD44 ließ sich keine Expression feststellen.

3.2.2.1.4 Originaltumor zu BCO#154 benigne & maligne (siehe Anhang – Abbildung 34 und Abbildung 35)

Das korrespondierende Gewebe zur Organoidkultur BCO#154 stammt aus einer Zystektomie-Operation. Nach Beurteilung der vollständig entfernten Harnblase durch das Fachpersonal der Pathologie im Schnellschnittlabor, konnten zwei solide Gewebeproben zur Aufarbeitung als Organoidkultur zur Verfügung gestellt werden. Soweit durch die Pathologie zu diesem Zeitpunkt beurteilbar, stammte eine Probe aus dem mutmaßlichen Tumorareal (BCO#154-mal.) und die andere aus tumorfreier, gesunder Blasenwand (BCO#154-ben.). Erst im Nachhinein stellte sich heraus, dass es sich bei BCO#154 und der zuvor angesetzten Probe BCO#140 um denselben Patienten handelte.

In der Auswertung der Einzelfärbungen zeigte sich bei beiden Präparaten zunächst eine schwache Anfärbbarkeit des Urothels im H/E-Schnitt und gleich große, dicht stehende Zellen. Gemeinsam wiesen sowohl das „benigne“ als auch das „maligne“ Präparat starke Expression für CK7 und Ki67 (Histoscore 210-300) sowie eine fehlende Expression von FGFR3 auf. Zusätzlich ließ sich bei BCO#154-ben. eine starke Expression für CK20 und GATA3 (Histoscore 270-300) über das gesamte Urothel und eine mittelstarke Expression für p63 (Histoscore 135) in der basalen und intermediären Zellschicht nachweisen. Unterschiede zeigte auch die Expression von CD44 mit einer ausschließlich basal vorhandenen mittelstarken Expression (Histoscore 150) in der „benignen“ und einer über das gesamte Urothel verteilten schwachen Expression (Histoscore 80) in der „malignen“ Probe. Mit der fehlenden Expression von fünf aus acht Markern (CK20, GATA3, FGFR3, p53, p63) und den Expressionslevel für CK7, Ki67 und CD44 sowie deren Verteilung über das Urothel wies BCO#154-mal. große Ähnlichkeit mit Ausschnitt 3 des Originaltumors zu BCO#140 auf (Abbildung 32). Lediglich die unregelmäßige Zellmorphologie aus BCO#140 – Ausschnitt 3 ließ sich in BCO#154-mal. nicht wiederfinden (siehe Abbildung 20). Wie bereits erwähnt stammt das Gewebe für die Kulturen von BCO#154 und

BCO#140 vom selben Patienten. Dies könnte eine Erklärung für die gefundene Übereinstimmung in der Ausprägung einzelner Marker sein.

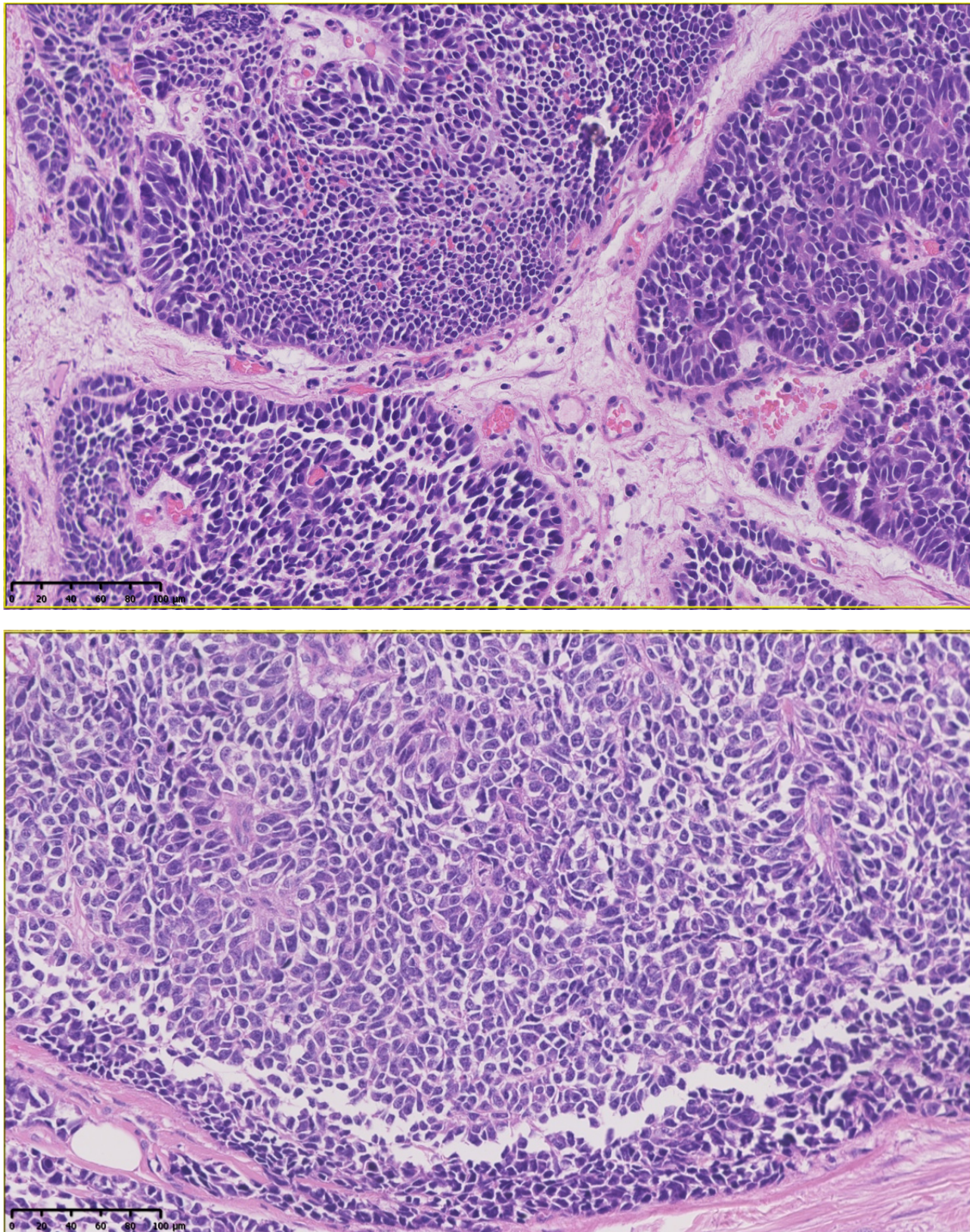


Abbildung 20: Gegenüberstellung unterschiedlicher Zellmorphologie. Oben - Originaltumor BCO#140 Ausschnitt 3. Unten - Originaltumor BCO#154-mal. Jeweils H/E-Färbung. Vergrößerung 20x. Maßstab: 100 µm.

3.2.2.1.5 Zusammenfassung Histoscores Originaltumore zu „stabile Proliferation“

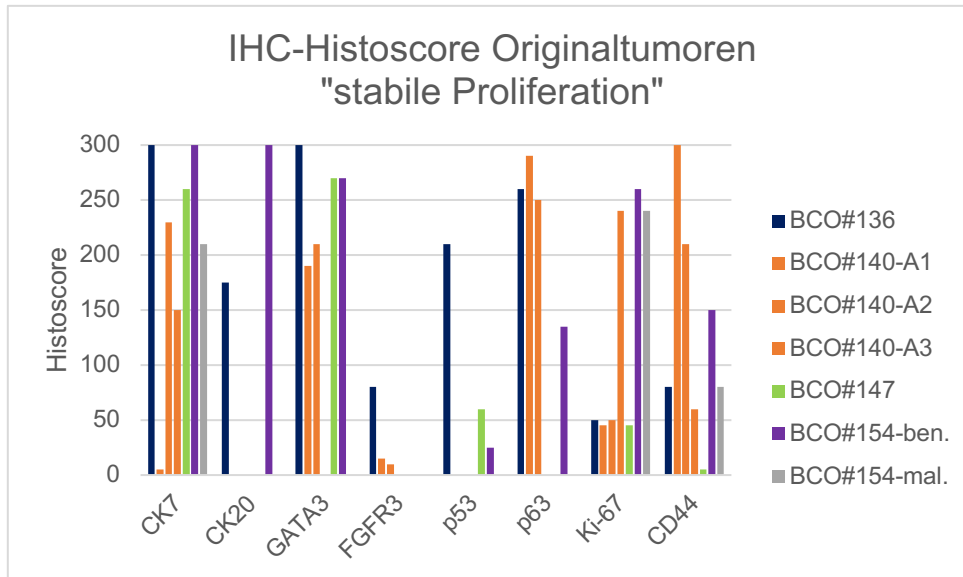


Abbildung 21: Grafische Darstellung der Markerexpression anhand des Histoscores für Gruppe "stabile Proliferation". Da bei BCO#140 über das gesamte Präparat unterschiedliche Expressionsmuster beobachtet wurden, sind insgesamt drei Bildausschnitte (A1-3) analysiert worden.

Abbildung 21 zeigt die Übersicht der Histoscores für die Originaltumoren zu den Organoidkulturen mit „stabiler Proliferation“. Mit jeweils > 200 Punkten im Histoscore in drei, vier bzw. fünf von sieben analysierten Bildausschnitten sind die Marker p63, GATA3 bzw. CK7 mitunter am stärksten ausgeprägt. Zeigten die untersuchten Ausschnitte eine positive Färbung für CK7 oder GATA3, war diese dabei immer in allen drei Zellschichten des Urothels nachweisbar. p63 konnte in drei von vier positiven Färbungen v.a. basal und intermediär lokalisiert werden und war nur beim zugehörigen Präparat zu BCO#140 in Ausschnitt 1 auch in luminalen Zellen zu sehen. Über alle Originaltumore dieser Gruppe stellt sich FGFR3 mit der geringsten Expression (Histoscore < 100 Punkte) dar. Über beide Gruppen (insgesamt 9 Präparate) hinweg ließ sich nur im Originaltumor zu BCO#136 eine schwach sichtbare Expression für FGFR3 (Histoscore 80) wahrnehmen. Bei den Markern p53 und CD44 kann eine sehr große Breite an Färbungsintensität beobachtet werden (Histoscore von 5 – 300 Punkte). Bei der qualitativen Analyse der Expressionsverteilung von CD44 fiel auf, dass sowohl bei schwacher als auch starker Expression der Tumorstammzellmarker über alle drei Schichten hinweg nachweisbar war. Ki67 zeigt entweder eine sehr niedrige

oder sehr hohe Expression bei entweder diffuser oder über alle drei Zellschichten vorhandener Verteilung.

3.2.2.2 Auswertung H/E- und IHC-Färbungen Gruppe „variable Proliferation“

3.2.2.2.1 Originaltumor zu BCO#180

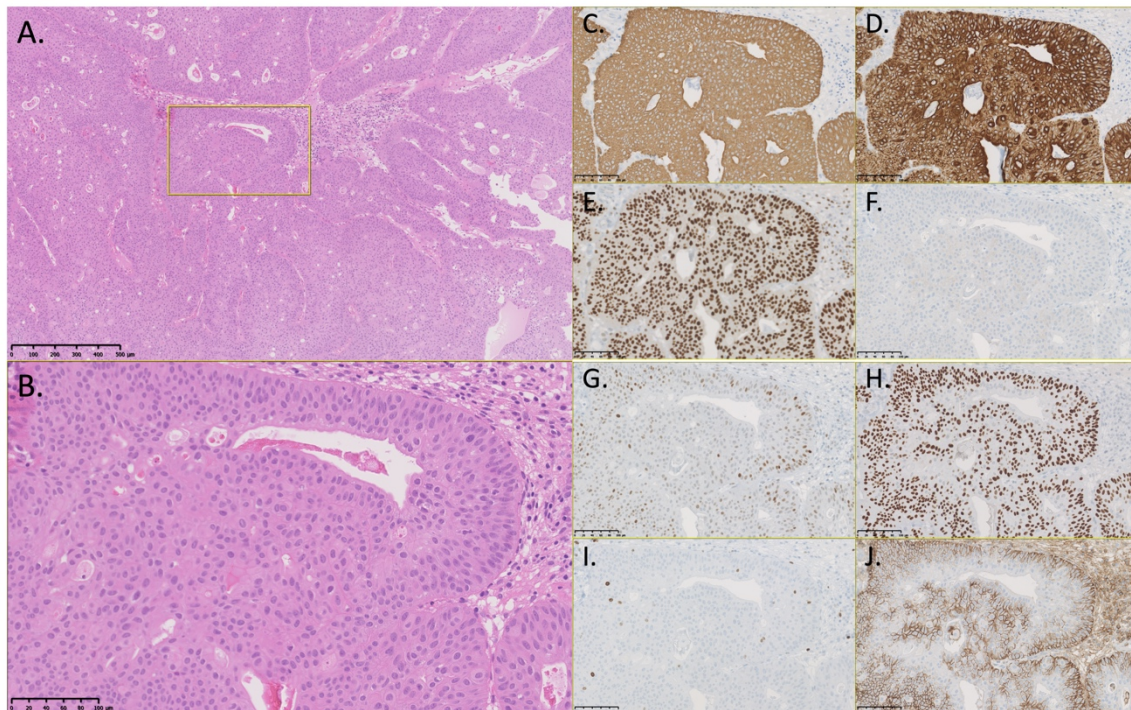


Abbildung 22: IHC Originaltumor K12179/21-1 (BCO#180). Paraffinschnitt 2,5 µm. Gelbes Quadrat in A zeigt Ausschnitt von B – J. A – H/E (5x – Maßstab: 500 µm) + B – H/E (20x/Maßstab: 100 µm). C - CK7. D - CK20. E - GATA3. F - FGFR3. G - p53. H - p63. I - Ki47. J - CD44 (je 20x/Maßstab: 100 µm). Die Übersichtsabbildungen der H/E- und IHC-Färbungen sowie die zugehörigen Auswertungstabellen für die übrigen Originaltumore dieser Gruppe finden sich im Anhang unter 6.2.

Die H/E-Färbung zum Originaltumor von BCO#180 (Abbildung 22) zeigte gleich große Urothelzellen mit homogener Morphologie untereinander. Über das gesamte Urothel hinweg gleichmäßig kräftig exprimiert (Histoscore 200-300) waren die Proteine CK7, CK20 und GATA3, wobei CK7 die schwächste Ausprägung unter den drei (Histoscore 200) aufwies. p63 fiel ebenfalls durch starke Expression auf (Histoscore 270), allerdings nur über die basale und intermediäre Zellschicht. Am wenigsten intensiv gefärbt zeigten sich p53 und Ki67 (Histoscore 50 und 10), wobei ersteres nur basal und zweiteres diffus verteilt war. In der IHC-Färbung für CD44 wurde eine mittelstarke Expression

(Histoscore 190) beobachtet, die von basaler bis zur intermediären Zellschicht stetig in der Intensität abnahm. Zusätzlich war CD44 auch großflächig in den Membranen der an das Urothel angrenzenden Stromazellen nachzuweisen. Für FGFR3 zeigte dieses Präparat keine Färbung.

3.2.2.2.2 Originaltumor zu BCO#185 (siehe Anhang - Abbildung 36)

Mit Histoscores von 280-300 wiesen die Marker CK7, GATA3 und p63 die stärkste Expression auf, die über alle Urothelzellschichten vorhanden war. Keine Anfärbbarkeit bestand für CK20 und FGFR3. Dafür war CK20 stark in Bereichen außerhalb des Urothels exprimiert, was auf Tumorzellen in tieferen Schichten hinweist. p53 zeigte sich mit mittelstarker Expression (Histoscore 160) in der Basal- und Intermediär-Zellschicht. Ähnlich wie bereits bei BCO#180 beobachtet, färbte der Antikörper für CD44 die Membranen und Zellgrenzen der basalen und intermediären Zellschicht mit abnehmender Intensität in Richtung luminal an. Ki67 zeigte sich erneut mit diffuser Verteilung und in nur einzelnen Zellen exprimiert (Histoscore 60).

3.2.2.2.3 Originaltumor zu BCO#189 (siehe Anhang - Abbildung 37 und Abbildung 38)

Da sich bei diesem Präparat - wie bereits bei BCO#140 der Fall - einzelne Marker unterschiedlich exprimiert zeigten, wurden zwei Bildausschnitte angefertigt und ausgewertet. In Ausschnitt 1 stellte sich das Urothel durch sehr dicht aneinander gedrängte Zellen in der basalen Schicht dar, die sich nach luminal mit größeren Zellkörpern und weiter auseinanderstehenden Zellkernen auflockerte (Abbildung 23).

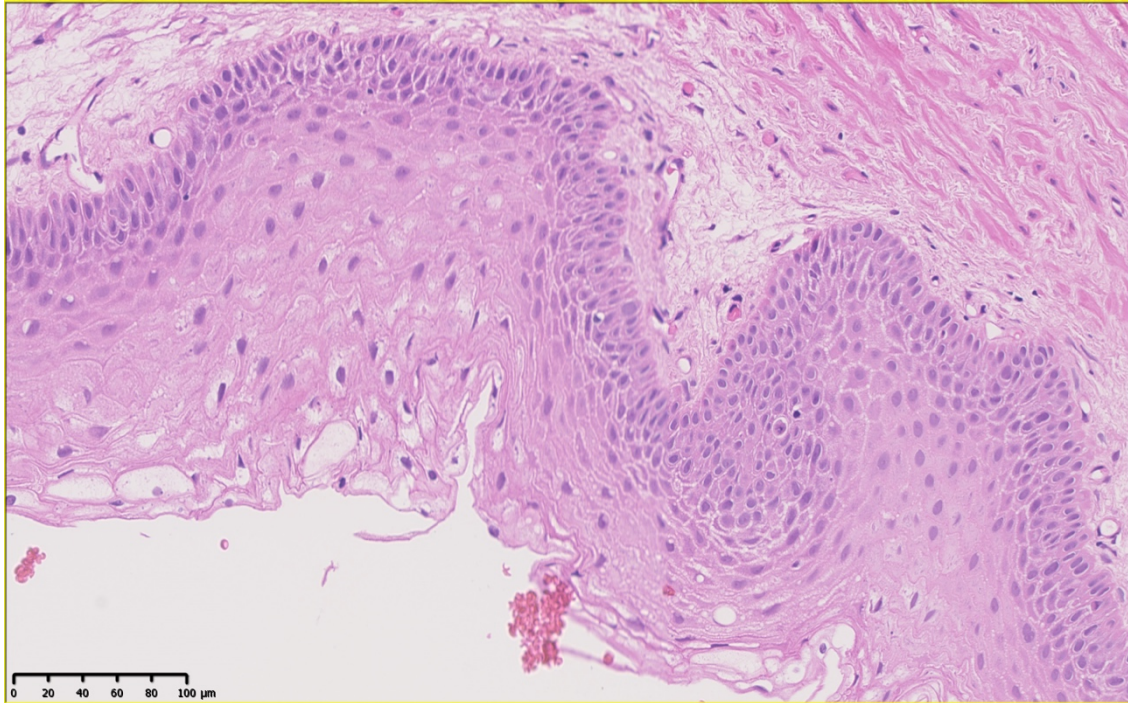


Abbildung 23: Originaltumor zu BCO#189 Ausschnitt 1. Paraffinschnitt 2,5 μm. H/E-Färbung. Dicht gedrängte, klein geformte Zellen in der basalen Schicht. Gegen luminal Urothelzellen mit größeren Zellkörpern Vergrößerung 20x. Maßstab: 100 μm

Im Ausschnitt 2 waren nur drei bis vier Zellschichten übereinander zu sehen, die weniger dicht gedrängt und regelmäßig geformt das Urothel bildeten (Abbildung 38).

Über die gesamte Schnittfläche überwiegend homogen exprimiert waren die Proteine GATA3, p53 und p63. p53 und p63 waren dabei streng basal zu finden, wobei p63 die stärkere Intensität (Histoscore 130-160) zeigte. GATA3 zeigte die stärkste einheitliche Expression über das Präparat (Histoscore 180-230) in nahezu allen Zellkernen innerhalb des Urothels. Lediglich die luminal gelegenen Zellkerne in Ausschnitt 2 waren weniger intensiv eingefärbt (Abbildung 24).

CD44 zeigte in beiden Ausschnitten eine ausgeprägte Färbung der basalen bis intermediären Zellschicht, während in Ausschnitt 2 zusätzlich die außerhalb des Urothel liegenden Stromazellen gleichmäßig intensiv gefärbt waren.

Größere Unterschiede innerhalb des Präparats fanden sich in der Expression der Zytokeratine und Ki67. In Ausschnitt 1 waren weder CK7 noch CK20 nachzuweisen, während in Ausschnitt 2 CK7 von allen Markern am stärksten

ausgeprägt war (Histoscore 300). Als Besonderheit unter allen Präparaten ließ sich CK20 sehr schwach nur luminal in Ausschnitt 2 nachweisen (Abbildung 25).

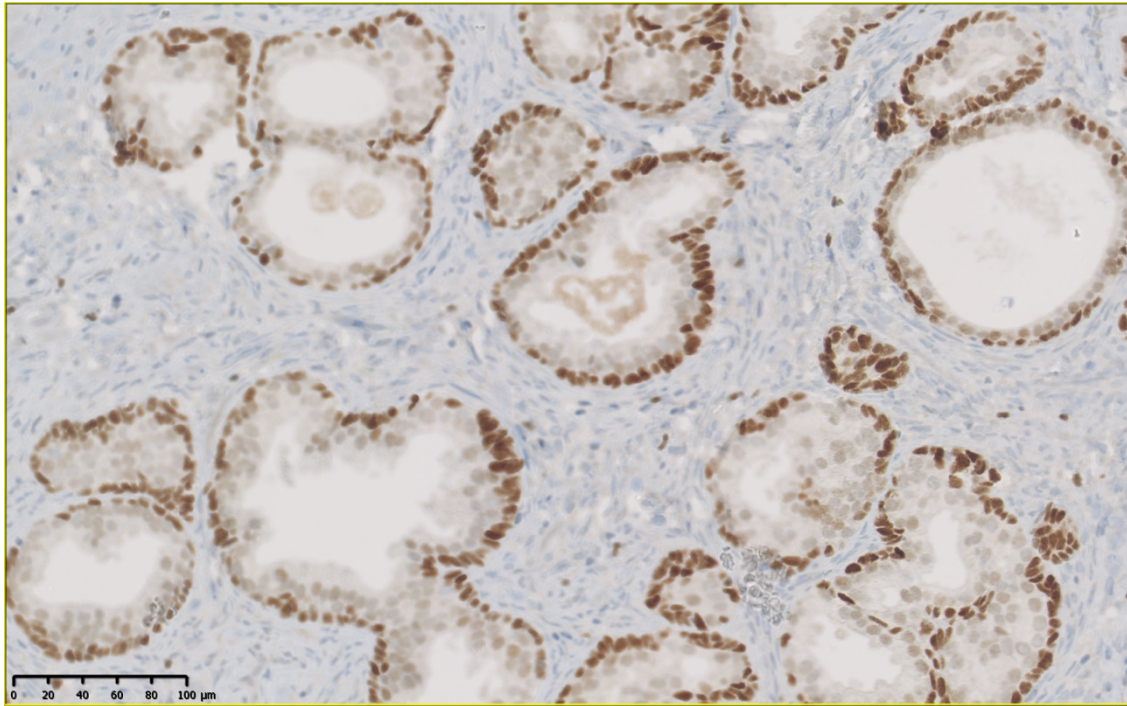


Abbildung 24: Originaltumor zu BCO#189 Ausschnitt 2. Paraffinschnitt 2,5 µm. IHC-Färbung für GATA3 in nahezu allen Kernen vorhanden. Lediglich luminal gelegene Kerne scheinen schwächer gefärbt zu sein. Vergrößerung 20x. Maßstab: 100 µm

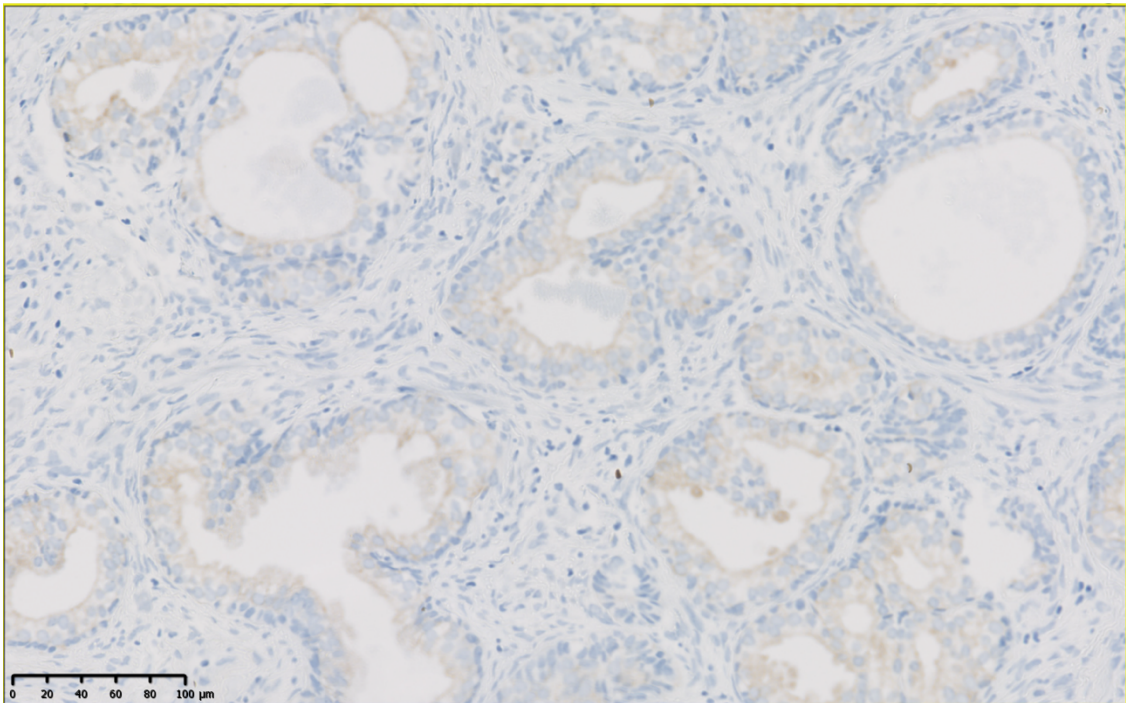
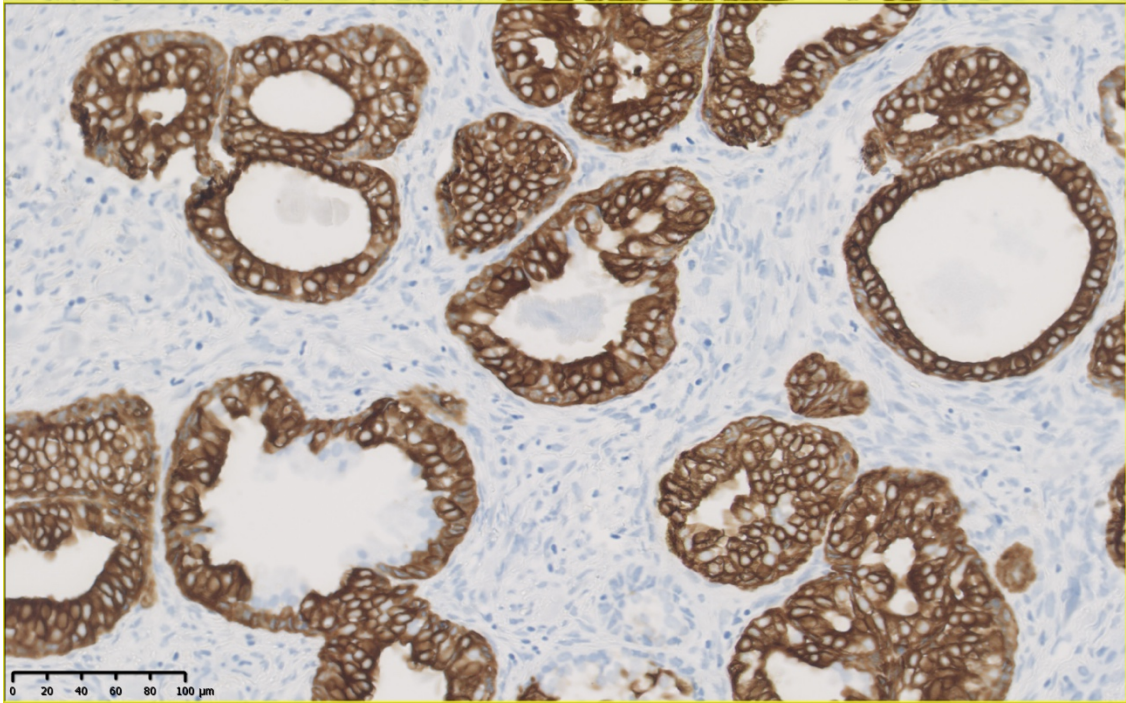


Abbildung 25: Originaltumor zu BCO#189 Ausschnitt 2. Paraffinschnitt 2,5 μm . IHC-Färbung für CK7 (Bild oben) und CK20 (Bild unten). Neben einer stark ausgeprägten Expression von CK7 über das gesamte Urothel) findet sich eine eher in den luminalen Zellschichten zu lokalisierende schwache CK20-Expression. Vergrößerung 20x. Maßstab: 100 μm

In Ausschnitt 2 bestand für Ki67 die aus den vorherigen zwei Präparaten bekannte schwache, diffus verteilte Expression (Histoscore 30). Im Gegensatz dazu zeigte Ausschnitt 1 gemessen am Histoscore mit 100 Punktwerten die stärkste Ausprägung innerhalb der Gruppe der „variablen Proliferation“. Diese war als zusätzliches Alleinstellungsmerkmalen unter allen analysierten Bildausschnitten nur streng basal vorhanden (Abbildung 26).

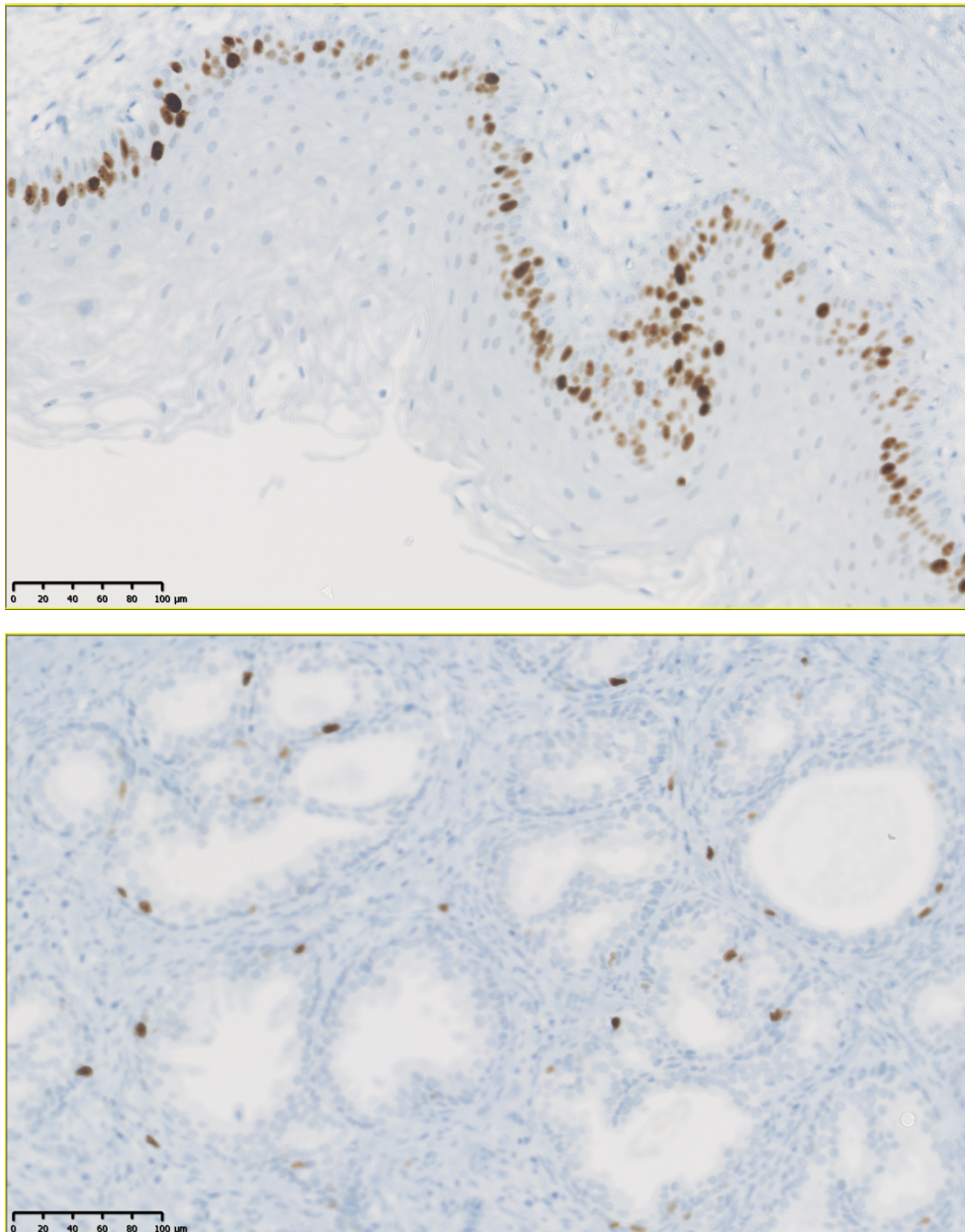


Abbildung 26: Originaltumor zu BCO#189. Paraffinschnitt 2,5 µm. IHC-Färbung für Ki67 für Ausschnitt 1 (oben) und Ausschnitt 2 (unten). Auffallend ist die durchgehende, ausschließlich basal vorhandene Expression von Ki67 in Ausschnitt 1, während in Ausschnitt 2 nur einzelne Urothel- und Stromazellen angefärbt sind. Vergrößerung 20x. Maßstab: 100 µm

Für FGFR3 konnten auch bei diesem Präparat keine Zellen innerhalb des Urothels angefärbt werden.

3.2.2.2.4 Originaltumor zu BCO#208 (Anhang - Abbildung 39)

Morphologisch stellten sich die Zellen des Urothels im H/E-Schnitt regelrecht geformt und gleichmäßig anfärbbar dar. Neben der innerhalb der Gruppe „variable Proliferation“ typisch stark ausgeprägten GATA3-Expression (Histoscore 300) und der fehlenden Expression für FGFR3, waren beim Originaltumor zu BCO#208 zugleich beide Zytokeratine kaum bis gar nicht nachzuweisen. In Abbildung 27 erkennt man, dass sich dieses Präparat zusätzlich durch die am meisten ausgeprägte p53-Expression über alle Zellschichten hinweg auszeichnete (Histoscore 300). p63 fand sich ähnlich intensiv (Histoscore 260) weiterhin nur basal. Wie bei der Mehrzahl dieser Gruppe waren Ki67 diffus, vereinzelt und CD44 intensiv, von basal nach luminal abnehmend ausgeprägt.

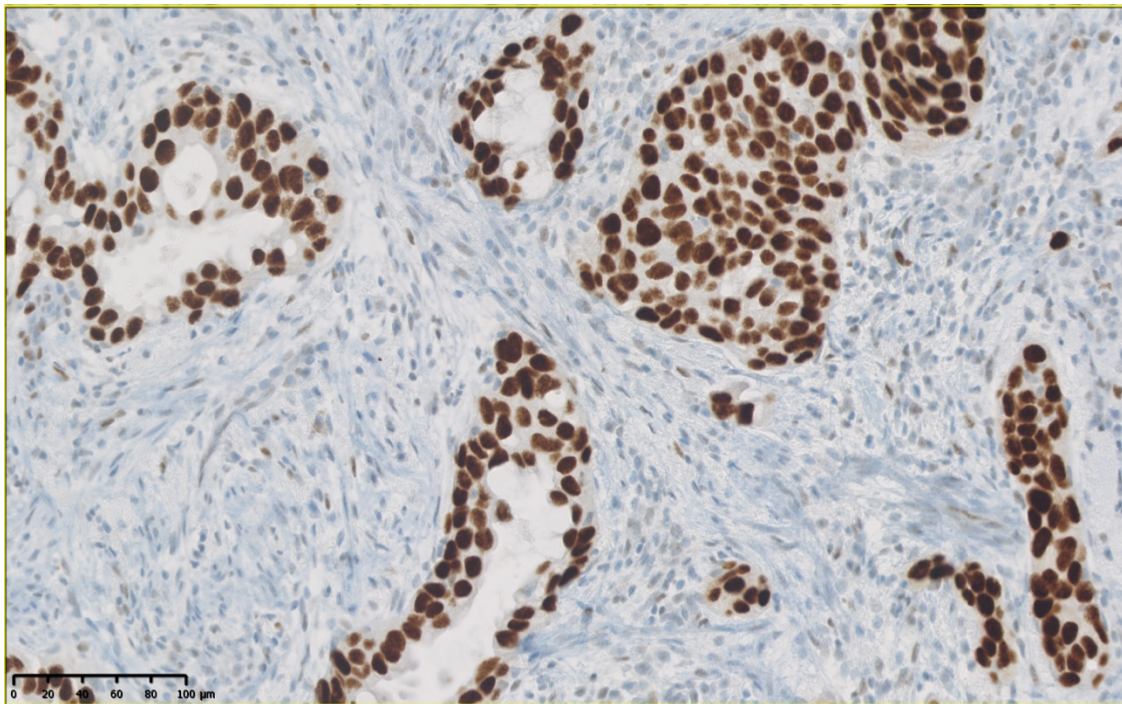


Abbildung 27: Originaltumor zu BCO#208. Paraffinschnitt 2,5 µm. Die IHC-Färbung für p53 zeigt die am meisten ausgeprägte Expression innerhalb der Gruppe „variable Proliferation“ über alle Zellschichten hinweg. Vergrößerung 20x. Maßstab: 100 µm

3.2.2.2.5 Zusammenfassung Histocores Originaltumore zu „variable Proliferation“

Für die Gruppe der Originaltumoren mit „variabler Expression“ in der korrespondierenden Organoidkultur stellt Abbildung 28 die Histocores für die einzelnen IHC-Färbungen gegenüber. In allen fünf analysierten Bildausschnitten der vier Originaltumore stellen sich die Marker GATA3, p63 und CD44 mit der am stärksten ausgeprägten Expression (Histocore 130-300) dar. Für p63 ist diese nur beim Originaltumor zu BCO#185 über alle Schichten zu sehen und sonst überwiegend basal lokalisiert. Für CD44 sind die Urothelzellen durchgängig am stärksten basal angefärbt, wobei die Intensität nach luminal immer abnimmt. Eine Expression von FGFR3 lässt sich in keinem der Gewebeschnitte nachweisen. Bei der Expression von Zytokeratinen zeichnet sich eine Konsistenz innerhalb der analysierten Proben ab. So geht beim Originaltumor zu BCO#208 eine geringe Expression von CK7 (Histocore 15) ebenfalls mit einer geringen Expression von CK20 (Histocore 20) einher und der Originaltumor von BCO#180 zeigt in beiden Markern eine hohe Expression (200-250 Punkte). Passend dazu zeigt das Gewebe zu BCO#189 in Ausschnitt 1 weder im einen noch im anderen Zytokeratin eine Färbung. Nur allein bei BCO#185 findet sich eine sehr starke Anfärbbarkeit für CK7 (Histocore 300) neben einer fehlenden Expression von CK20. Ähnlich wie in der Gruppe mit „stabiler Proliferation“ lassen sich innerhalb dieser Gruppe für das Tumorprotein p53 geringe bis hohe Expressionen finden, wobei diese v.a. basal lokalisiert ist. Nur BCO#208 zeigt für p53 die stärkste Ausprägung (Histocore 300) über alle Zellschichten. Für den Proliferationsmarker Ki67 berechnen sich die Histocores bis max. 100 Punkte und zeigen somit eine eher geringe Expression. Diese war überwiegend diffus im

Urothel verteilt und nur beim Originaltumor zu BCO#189 in Ausschnitt 1 streng basal vorhanden.

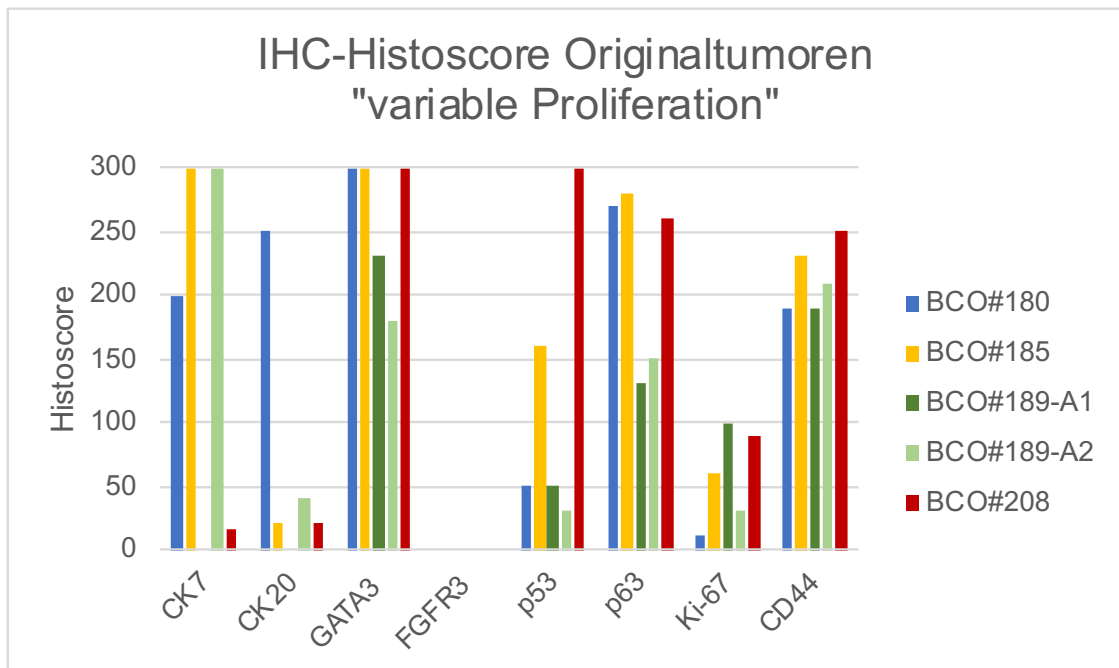


Abbildung 28: Grafische Darstellung der Markerexpression anhand des Histoscores für Gruppe "variable Proliferation". Wegen variabler Expression einzelner Marker im Präparat zu BCO#189, wurden analog zu BCO#140 zwei Bildausschnitte (A1-2) analysiert.

3.2.2.3 Vergleich der Marker-Expression beider Gruppen

Tabelle 18: Gegenüberstellung der durchschnittlichen Histoscore-Punkte beider Gruppen. Die Punktzahlen aller analysierten Bildausschnitte wurden addiert und durch die Anzahl der Bildausschnitte geteilt („stabile Proliferation“ sieben Bildausschnitte; „variable Proliferation“ fünf Bildausschnitte).

Histoscore Durchschnitt "stabile Proliferation"	
Antikörper	Histoscore
CK7	208
CK20	68
GATA3	177
FGFR3	15
p53	42
p63	134
Ki-67	133
CD44	126

Histoscore Durchschnitt "variable Proliferation"	
Antikörper	Histoscore
CK7	163
CK20	66
GATA3	262
FGFR3	0
p53	118
p63	218
Ki-67	58
CD44	214

Die größte Gemeinsamkeit zwischen den beiden Gruppen zeigt die Expression von GATA3. Diese ist mit > 180 Histoscore Punkten in 8/9 untersuchten Präparaten immer stark ausgeprägt und fehlt lediglich in BCO#154-mal. einmal vollständig.

Auch für Ki67 lassen sich in beiden Gruppen für jedes Präparat eine Färbung nachweisen, wobei diese in der Gruppe der „stabilen Proliferation“ in 3/5 Fällen intensiver ausgeprägt ist (Histoscore 240-260) und in allen anderen Fällen nur maximal 100 Punkte im Histoscore erreicht. Das Gewebe dieser drei intensiv gefärbten Präparate – BCO#140, BCO#154-mal. und -ben. – stammt allerdings auch vom selben Patienten aus zwei Operationen im Abstand von zwei Monaten (TUR-B und Zystektomie) und könnte die ähnlich hohe Expression erklären. Über beide Gruppen hinweg ist die Verteilung über die Urothelschichten für Ki67 eher diffus und kann nur im Ausschnitt 1 von BCO#189 deutlich basal lokalisiert werden (Abbildung 26 – oberes Bild).

Keine der Präparate mit „variabler Proliferation“ ist positiv für FGFR3. In der Vergleichsgruppe sind in 2/5 Fällen zumindest schwache Nachweise zu sehen – beide Proben von zwei verschiedenen Patient*innen.

Während die Zytokeratine CK7 und CK20 bei der Gruppe „variable Proliferation“ in allen fünf untersuchten Bildausschnitten entweder nur gemeinsam oder gar nicht vorkommen, exprimieren die Originaltumore der „stabilen Proliferation“ eher CK7 (5/5) als CK20 (2/5). Damit scheint die Abhängigkeit der Expression der beiden Zytoskelett-Proteine dort aufgehoben zu sein.

Die Ausprägung von p53 und p63 zeigt sich bei „variabler Proliferation“ in jeweils 4/4 Tumoren, wohingegen bei „stabiler Proliferation“ nur je 3/5 untersuchten Präparaten für diese Marker positiv sind. Beide Proteine sind überwiegend basal lokalisiert. p63 ist nur in jeweils einem Präparat pro Gruppe (BCO#140 Ausschnitt 1, BCO#185) auch in luminalen Zellen zu finden. Für p53 sind luminal Urothelzellen nur einmal in der Gruppe der „variablen Proliferation“ bei BCO#208

positiv. Dort ist zugleich die höchste Expression für p53 (Histoscore 300) von allen neun Präparaten der beiden Gruppen zu sehen.

Zuletzt findet sich zwischen den beiden Gruppen ein Unterschied in der Expression von CD44. In allen untersuchten Bildausschnitten konnte CD44 zwar nachgewiesen werden, jedoch ist diese bei „stabiler Proliferation“ mit deutlich größerer Streuung der Intensität verbunden (Histoscore 5-300) als bei „variabler Proliferation“ (Histoscore 190-250). Zusätzlich zeigt sich in den Bildausschnitten der Präparate mit „stabiler Proliferation“ für CD44 eine homogene Verteilung über das gesamte Urothel, während in der Vergleichsgruppe immer eine intensive basale Expression beobachtet wird, die nach luminal stetig abnimmt. In der Zusammenschau zeigen die durchschnittlichen Histoscores (siehe Tabelle 18), dass CD44 bei „stabiler Proliferation“ deutlich geringer ausgeprägt ist als bei „variabler Proliferation“ (Histoscore 126 bzw. 214).

3.3 Klinische Daten

Tabelle 19: Ergebnisse der pathologischen Untersuchung der korrespondierenden Originaltumoren - Gruppe „stabile Proliferation“. Das Gewebe von BCO#140 und BCO#154 stammt aus zwei Operationen desselben Patienten im Abstand von zwei Monaten. NUE = Nephroureterektomie. ¹Alter zum Zeitpunkt der Probenentnahme.

Kulturname	OP-Art	Passagen	Pathologischer Befund	Alter ¹
BCO#136	TUR-B	13	Muskelinvasives Urothelzellkarzinom pT2a G2, CIS	57
BCO#140	TUR-B	> 12	Kleinzelliges Karzinom der Harnblase pT1 G3/high grade, CIS	62
BCO#147	NUE	10	Mikropapilläres Urothelzellkarzinom des Nierenbeckenkelchsystems pT4 G2	59
BCO#154	Cx	8 (mal.) 7 (ben.)	Kleinzelliges Karzinom und Urothelzellkarzinom pT3b high grade, CIS	62

Tabelle 20: Ergebnisse der pathologischen Untersuchung der korrespondierenden Originaltumoren - Gruppe „variable Proliferation“. ¹Alter zum Zeitpunkt der Probenentnahme.

Kulturname	OP-Art	Passagen	Pathologischer Befund	Alter ¹
BCO#180	TUR-B	2	Nicht invasives, papilläres Urothelzellkarzinom pTa G2/low grade	79
BCO#185	TUR-B	2	Nicht invasives, papilläres Urothelzellkarzinom; Papillär Exophytisches, fokale stroma-invasive Urothelzellkarzinome pTa-pT1 G2-3/high grade	70
BCO#189	TUR-B	2	Papilläres Urothelzellkarzinom (Nicht-invasive und invasive Anteile) pTa G2/low grade pT1 G3/high grade	77
BCO#208	TUR-B	3	Muskelinvasives Urothelzellkarzinom pT2a G3/high grade	66

4 Diskussion

Ursprüngliches Ziel dieser Dissertation war es, die dreidimensionale Zellkultur (Organoidkultur) für malignes Harnblasengewebe zu etablieren und Sie als neuartiges Tumormodell zu validieren. Da die Mehrzahl der aufgearbeiteten Tumorproben nur geringes oder gar kein Wachstum in Zellkultur zeigten und nur fünf Proben insgesamt über die 5. Passage hinaus kultiviert werden konnten, wurde eine neue Fragestellung definiert. Neues Ziel war es eine Auswahl an Kulturen mit geringem Wachstum („variable Proliferation“) gegen diejenigen mit starkem Wachstum („stabile Proliferation“) zu vergleichen. Dazu wurden Wachstumsverhalten und immunhistochemische Färbungen des zugehörigen Originaltumors untersucht. Die gewonnen Erkenntnisse sollen im folgenden Abschnitt herausgearbeitet und diskutiert werden.

4.1 Einfluss der Probeneigenschaften auf das Wachstumsverhalten in Zellkultur

Nachdem man erkannt hatte, dass die meisten Tumorproben nicht erfolgreich kultiviert werden konnten, untersuchte man systematisch die möglichen Fehlerquellen. Das passende Zellkulturmedium sowie das Protokoll zur effizienten Gewebeaufarbeitung waren bereits in internen Vorversuchen durch Kolleg*innen in Anlehnung an die zwei Schlüsselpublikationen von Lee et al. und Mullenders et al. optimiert worden (Lee, Hu et al. 2018, Mullenders, de Jongh et al. 2019). Demnach suchte man im Entnahmeverfahren nach Optimierungspotential. Im Kern ging es darum, das Risiko zu minimieren, dass Tumorzellen im Zeitraum von Entnahme im OP bis zur Aufarbeitung im Labor zugrunde gehen. Bei der herkömmlichen TUR-B wird Hochfrequenzstrom zur Entfernung des Tumorgewebes eingesetzt. Dieser kann sich potenziell schädlich auf die Vitalität aller umliegenden Zellen auswirken. Um diesen Störfaktor möglichst auszuschließen, versuchte der Operateur – ohne dabei den Verlauf der Operation zu gefährden – noch vor der eigentlichen Arbeit mit der Elektroschlinge, eine Tumorprobe mittels einer Biopsiezange zu gewinnen (sog. "cold biopsy"). Dadurch könnten potenziell mehr vitale Tumorzellen für die

Aufarbeitung als Zellkultur zur Verfügung stehen. Entsprechende Daten zum Einfluss dieses Vorgehens auf das Wachstumsverhalten in Kultur konnten aufgrund der geringen Fallzahl nicht erhoben werden.

Da beim Entnahmeverfahren mittels Zystektomie vor allem mit dem Skalpell gearbeitet wird und kaum Strom zur Anwendung kommt, liegt die Vermutung nahe, dass die Zellvitalität bei diesem Verfahren besser erhalten bleibt. In der Analyse der aufgearbeiteten Gewebeproben und deren Herkunft (siehe Tabelle 13) lässt sich diese Vermutung hinsichtlich der erfolgreichen Passagenanzahl nicht bestätigen. Von sechs Ansätzen, die alle ohne Stromanwendung entnommen wurden (fünf Zystektomie und eine Nephroureterektomie), zeigten nur zwei (33 %) sichtbares Wachstum in Kultur (BCO#154-mal., BCO#147). Die übrigen (67 %) konnten höchstens einmal passagiert werden. Gegensätzliches zeigt die Arbeit von Mullenders et. al, die eine Biobank für Organoide aus Harnblasengewebe (maligne und benigne) erstellt haben. Eine Übersichtstabelle aus deren Publikation (Mullenders, de Jongh et al. 2019 , S. 4570) zeigt, dass aus 61 Zystektomie-Ansätzen nur 12 Kulturen (20 %) vor der 5. Passage das Wachstum einstellten. Während innerhalb dieser Gruppe also 49 der Proben (80 %) über die 5. Passage hinaus wuchsen waren es unter den TUR-B-Ansätzen dort nur fünf aus neun Kulturen (56 %), bei denen ein solch stetiges Wachstum zu beobachten war. Eine Limitation dieser Analyse liegt in der geringen Anzahl (n = 9) der TUR-B-Ansätze.

Eine mögliche Erklärung für die These, dass Zystektomie-Gewebeproben geringeres Wachstum als die TUR-B-Ansätze zeigen, liefert die Art der Vorbehandlung der entsprechenden Patient*innen. Während diejenigen Patient*innen, die eine TUR-B erhalten oft frisch diagnostiziert sind und allein durch die Operation behandelt werden, haben Zystektomie-Patient*innen oft schon eine längere Krankheitsgeschichte in Bezug auf Harnblasenkrebs hinter sich und sind ggf. mit neoadjuvanten Chemotherapeutika behandelt worden. Diese Medikamente wirken sich – im besten Interesse des Therapieerfolges – negativ auf die Vitalität der Tumorzellen aus und könnten ebenso negativ zu einem erfolgreichen Wachstum in Zellkultur beitragen.

Tabelle 21 Auflistung aller persönlich betreuten Kulturen (inkl. BCO#136 von Nizar Lipke) sortiert nach Anzahl der Passagen. Gewicht von BCO#134 war nicht messbar. Bei Proben, die aus gefrorener Einzelzellsuspension aufgetaut wurden (grau hinterlegt), bezieht sich die Gewichtsangabe auf das Gewicht des Ursprunggewebes der Primärkultur.

Kulturnummer	Ausgangsmaterial	Gewicht (in mg)	Passagen
BCO#126	TUR-B	200	0
BCO#132	TUR-B	310	0
BCO#134	TUR-B	-	0
BCO#143	TUR-B	290	0
BCO#185.1	Stickstofftank (TUR-B)	900	0
BCO#199	TUR-B	330	0
BCO#202-mal.	Cx	610	0
BCO#203-ben.	Cx	170	0
BCO#128	TUR-B	490	1
BCO#130	TUR-B	160	1
BCO#135	Cx	250	1
BCO#179.1	TUR-B	130	1
BCO#204	Cx	450	1
BCO#137	TUR-B	120	2
BCO#179.2	TUR-B	290	2
BCO#180	TUR-B	1840	2
BCO#185	TUR-B	900	2
BCO#189	TUR-B	60	2
BCO#208	TUR-B	670	3
BCO#154-mal.	Stickstofftank (Cx)	270	8
BCO#147	Stickstofftank (NUE)	250	10
BCO#140	Stickstofftank (TUR-B)	210	> 12
BCO#136	TUR-B	140	13

Im Laufe der Experimente stellte sich bzgl. der Probenbeschaffenheit die Frage, ob das Gewicht des Ursprunggewebes einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten haben könnte (siehe Tabelle 21). In diesem Punkt lassen die Daten weder eine Tendenz in die eine noch in die andere Richtung erkennen. Während BCO#140 als Kultur mit den meisten Passagen nur 210 mg wog, hat auch BCO#180 als schwerste Probe mit 1840 mg nur zwei Passagen erreicht. Es konnte also kein Anhalt für einen Zusammenhang zwischen Probengewicht

und Wachstumsverhalten gefunden werden. Das deutet darauf hin, dass weniger die Quantität, sondern vielmehr die Qualität der Probe entscheidend zur erfolgreichen Organoidkultur beitragen.

4.2 BME als 3D-Matrix für Tumormodelle des Urothelzellkarzinoms

Ein ideales Tumormodell stellt die in-vivo-Bedingungen möglichst nahe der in-vitro-Situation nach. Da mittlerweile bekannt ist, dass das Verhalten von Tumorzellen von weitaus mehr beeinflusst wird als nur durch die isolierte Interaktion der Zellen untereinander, ist es mit den heutigen Mitteln nahezu unmöglich das ideale Tumormodell zu entwickeln.

Als Weiterentwicklung der 2D-Zellkultur sorgt die in dieser Arbeit verwendete Matrix – Basement Membran Extract (BME) – für die Möglichkeit der dreidimensionalen Anordnung der Tumorzellen. Dass diese Eigenschaft dem Tumormodell die in-vivo Situation besser nachbildet, wurde bereits in der Einleitung beschrieben (siehe 1.2.2 3D-Zellkultur). Da die biochemische Zusammensetzung des BME sich v.a. für die Kultivierung von Zellen epithelialen Ursprungs eignet, ist es unter der Vielzahl an etablierten 3D-Matrizes sicherlich auch die passende Wahl für ein Tumormodell des Urothels (Lee, Mun et al. 2021). Dennoch können auch Tumorzellen in BME-Matrix aufgrund verschiedener Limitationen nicht als ideales Tumormodell dienen. Tumorzellen in-vivo werden durch umgebende Blutgefäße mit Nährstoffen versorgt und können durch verschiedene Mediatormoleküle (z.B. V-EGF) sogar deren Neubildung anregen, um damit die Nährstoffzufuhr zu erhöhen. Die Nährstoffversorgung von Tumororganoiden in BME-Matrix hingegen geschieht allein durch Diffusion vom umgebenden Kulturmedium hinein in das BME zu den dort liegenden Zellen. Damit liegt nur ein einfacher Konzentrationsgradient von Nährstoffen vor und die komplexe Nährstoffverteilung der in-vivo-Situation wird nicht berücksichtigt.

Im Weiteren zeigten die Zellkulturversuche dieser Dissertation auch noch eine andere Limitation des BME. Während zu Beginn die Zelldomes teilweise über mehrere Wochen hinweg stabil blieben, wurde in späteren Versuchen immer häufiger beobachtet, wie sich Teile des auspolymerisierten BME oder sogar

ganze Domes vom Grund der Zellkulturplatte lösten (siehe 3.1.3 Limitationen der 3D-Zellkultur). Dadurch war die Beurteilung des Wachstums erschwert und ebenso wurde die Einbettung der Zellen in die Matrix unkontrolliert gestört. Nachdem die Suche nach Fehlerquellen innerhalb der Verarbeitung des BME im Labor keine Erklärung lieferte, gehen wir heute davon aus, dass diese Beobachtung durch zwei verschiedene Aspekte begründet werden kann. Der erste bezieht sich auf die Stoffwechselaktivität der Tumorzellen. Die Expression von bestimmten Proteinen (z.B. Proteasen) könnte eine Zersetzung der BME-Strukturmoleküle bewirken. Als zweites sollte die unterschiedliche Qualität der einzelnen BME-Chargen berücksichtigt werden. Diese wird auch in der Literatur immer wieder erwähnt und liegt bei Betrachtung der Herstellung von BME auf der Hand (Lee, Mun et al. 2021). Wie unter 1.2.2 beschrieben wird BME aus EHS-Tumorzellen gewonnen und unterliegt durch den biologischen Ursprung immer einer gewissen Variabilität in der Zusammensetzung. Zusammengefasst liefern diese zwei Aspekte eine plausible Erklärung für die Ablösung der Domes.

4.3 Wachstumsverläufe

Vor Beurteilung der Wachstumsverläufe sind zweierlei Limitationen in Bezug auf die Datenerfassung zu erwähnen (siehe 2.4.7 Mikroskopie und Vermessung von Organoiden). Die Größenvermessung der Organoiden in der Zellkulturschale geschah an einem 2D-Auflichtmikroskop. Das Wachstum der dreidimensionalen Zellgebilde konnte also mit dieser Messmethode nicht vollständig erfasst werden. Wenn man aber davon ausgeht, dass die allermeisten Organoiden kugelförmig wachsen – also der Durchmesser in alle drei Raumebenen gleichmäßig zunimmt – bildet die Vermessung des einfachen Durchmessers im 2D-Auflichtmikroskop das Größenwachstum zumindest gut ab. Des Weiteren wurden die einzelnen Kulturen in den jeweiligen Passagen aus organisatorischen Gründen (u.a. auch weil die Kulturen unterschiedlich schnell wuchsen) zu unterschiedlichen Zeitpunkten angesetzt. Zwar waren alle Kulturen unter den gleichen Bedingungen gehalten und nach denselben standardisierten Protokollen verarbeitet worden, dennoch könnten die unterschiedlichen Zeiträume den direkten Vergleich der Kulturen in den jeweiligen Passagen beeinflusst haben.

Bei Betrachtung der Wachstumsverläufe (Abbildung 8 bis Abbildung 14) lässt sich deutlich der unterschiedliche Trend der beiden Gruppen erkennen. Während bei „stabiler Proliferation“ bei allen drei untersuchten Kulturen bis in die zweite Passage (für BCO#140 bis in die dritte Passage) ein positiver Wachstumstrend erhalten bleibt, stagniert das Wachstum bei „variabler Proliferation“ bereits nach der ersten Passage (Abbildung 11). In der nullten Passage kann v.a. für BCO#180 und BCO#208 eine Größenzunahme um bis zu 50 μm verzeichnet werden. Die Größenzunahme wird über die erste und zweite Passage allerdings immer geringer und beträgt nie mehr als 25 μm über 30 Tage. Nur in der Vergleichsgruppe finden sich Organoide mit über 100 μm Zuwachs in 10-15 Tagen. BCO#140 zeigte über drei Passagen hinweg das stärkste Wachstum. Für BCO#147 und BCO#154-mal. zeigt die erste Passage (Abbildung 10) einen kleinen Einbruch im Wachstumsverhalten, das sich aber in der zweiten Passage wieder erholt (Abbildung 13). Das größte Organoid mit ca. 200 μm Durchmesser enthielt die Kultur BCO#147 in der 0. Passage an Tag 25 (Abbildung 29). Diese

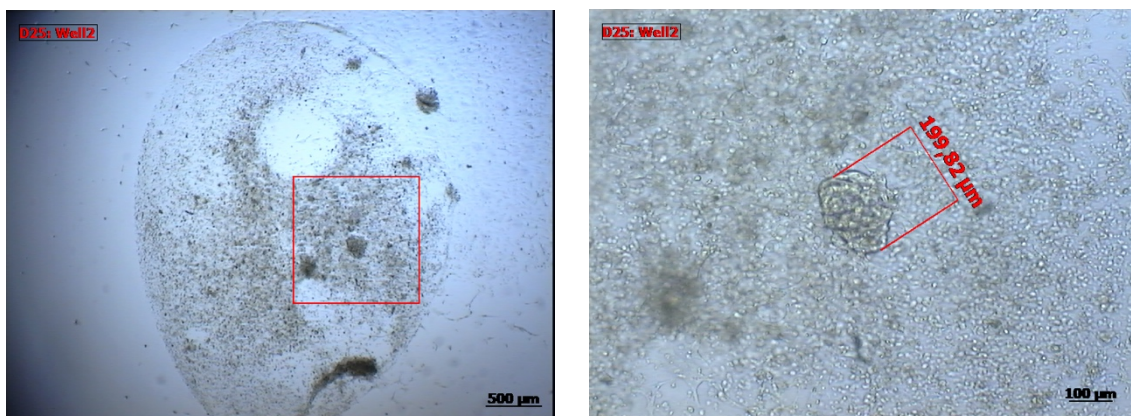


Abbildung 29: BCO#147 0. Passage an Tag 25. Links: Übersichtsaufnahme (10x); Rechts: 10x Vergrößerung des in der Übersicht mit rotem Quadrat markierten Bildausschnittes. Größtes vermessenes Organoid mit 200 μm Durchmesser.

beiden Beobachtungen zeigen, dass die Gruppe „stabile Proliferation“ – aufgetaut aus Rückstellproben – das Verhalten der Primärkultur reproduzieren können (vgl. Doktorarbeit Nizar Lipke).

In der Literatur existieren vergleichbare Experimente zum Wachstumsverhalten von Organoiden aus malignem Harnblasengewebe nur in Form von Drug-Assays. Diese Experimente werden an etablierten Organoidzellreihen (> 5. Passage) durchgeführt (Lee, Hu et al. 2018). Eine Einordnung der eigenen

Beobachtungen des Wachstumsverhaltens ist aufgrund fehlender Vergleichsarbeiten nicht möglich.

4.4 Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Markerexpression bezogen auf das Wachstumsverhalten

Die ausformulierte Gegenüberstellung der Markerexpression von beiden Gruppen findet sich unter Punkt 3.2.2.3.

4.4.1 Hohe GATA3-Expression als Charakteristikum der urothelialen Tumorzellen

Die größte Gemeinsamkeit zeigten die analysierten Präparate in einer hohen GATA3-Expression in 8/9 Originaltumoren. Nur im Präparat zu BCO#154-mal. fanden sich keine GATA-positiven Zellkerne. Damit reihen sich diese Ergebnisse in die Zahlen aus vergleichbaren Arbeiten ein. In einer IHC-Analyse von 107 Primärtumoren der Harnblase zeigten 94 (87,9 %) eine positive Färbung für GATA3 (Wang, Yang et al. 2020). Auch eine ältere Arbeit befand in der IHC-Färbung von 308 urothelialen Primärtumoren insgesamt 67 % als positiv, während die Färbungen für 20 weitere Tumorarten (z.B. Prostata, Lunge, Ovar) überwiegend negativ ausfielen. Damit erklärten die Autoren GATA3 als hochspezifisch für Urothelzellkarzinome (Higgins, Kaygusuz et al. 2007). In unserem Fall bestätigt die hohe Intensität also, dass es sich bei den untersuchten Originaltumoren um Primärtumoren des Urothels handelt. Es lässt sich zudem kein Hinweis auf Unterschiede in der GATA3-Expression zwischen den zwei Gruppen finden.

4.4.2 Diffuse Ki-67 Verteilung als Zeichen von Stroma-unabhängiger Proliferation

Der Antikörper für Ki-67 färbte 6/9 Originaltumoren mit einer Intensität von max. 100 Punkten im Histoscore. Die übrigen 3 Präparate (BCO#140, BCO#154-mal. und -ben.), die alle vom gleichen Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten stammten, zeigten eine intensivere Färbung (Histoscore 240-260). Starke Expression des Zellproliferationsmarkers findet sich also nur auf Seiten der Gruppe mit „stabiler Proliferation“. Die durchgängige Anfärbbarkeit der untersuchten Tumore für Ki-67 deckt sich mit den Zahlen in der Literatur, da sich

Ki-67 nur in malignem Harnblasengewebe nachweisen lässt (Compérat, Camparo et al. 2006). Darüber hinaus hat eine Arbeit von Sjö Dahl et. al hinsichtlich der Intensität und Verteilung der Ki-67-Expression einen signifikanten Unterschied zwischen Gruppen gefunden, die zuvor mittels Mikroarray in molekulare Subklassen unterteilt wurden. Während die Tumoren der Gruppe UroA (tendenziell $\leq T2$ und $\leq G2$) nur wenige Ki-67-positive Zellen ausschließlich in der basalen Schicht zeigten, waren Tumore der Gruppe UroB (tendenziell $\geq T2$ & $\geq G2$, schlechte Prognose) mit mehr positiven Zellen assoziiert, die zudem diffus im Urothel verteilt waren. In Ki-67-positiven Zellen, die sich auch in oberflächlichen Schichten finden, vermuten die Autoren, dass die Zellproliferation in Tumoren mit schlechter Prognose (UroB) unabhängig von Signalen des Tumorstromas stattfindet (Sjö Dahl, Lövgren et al. 2013). Die Expressionsverteilung in den Präparaten dieser Arbeit war überwiegend diffus und konnte nur einmal in einem Originaltumor der Gruppe mit „variabler Proliferation“ (BCO#189 – Ausschnitt 1, siehe Abbildung 26) streng basal verordnet werden. In der Gruppe der „stabilen Proliferation“ war die Verteilung von Ki-67 durchgängig diffus bzw. über mindestens Basal- und Intermediärzellschicht ausgeprägt. Dieser Befund könnte dafür sprechen, dass die Originaltumore mit „stabiler Proliferation“ zu den eher aggressiven Tumoren mit schlechter Prognose gehören. Deren Tumorzellen könnten möglicherweise auch höhere Proliferationsaktivität in Zellkultur zeigen, die unabhängig von Signalen der angrenzenden Stromazellen stattfinden kann. Tumore, bei denen Ki-67 ausschließlich basal exprimiert wird, sind nach der These von Sjö Dahl et. al in der Proliferationsaktivität auf die Stromazellen angewiesen. Da die Stromazellen und damit wachstumsfördernde Signale in einer Monozellkultur fehlen, könnte eine basale Ki-67 Expression im Originaltumor potenziell ungünstige Bedingungen für das Wachstum von Tumorzellen in einer Organoidkultur vorhersagen. Um diese These zu bestätigen, müssten noch weitere Tumore mit basaler Ki-67-Expression hinsichtlich des Wachstumsverhaltens oder auch als Ko-Kultur mit Stromazellen untersucht werden.

4.4.3 Keine wesentlichen Unterschiede in der FGFR-3-Expression

Unter allen Markern ist FGFR-3 in beiden Gruppen mit Abstand am geringsten ausgeprägt (Durchschnittlicher Histoscore 15 bzw. 0, siehe Tabelle 18). Nur zwei Originaltumore (BCO#136, BCO#140) mit „stabiler Proliferation“ in Zellkultur zeigen eine schwache Färbung. Tomlinson et al. haben den Zusammenhang zwischen FGFR3-Expression und pathologischem Befund in 158 Fällen untersucht. Nach diesen Daten exprimiert gesundes Urothel FGFR-3 nur schwach in manchen oder allen Zellen, während der komplette Verlust von FGFR-3 mit einem höheren Tumorstadium korreliert. Gegenläufig setzen die Autoren eine Überexpression dieses Markers eher mit niedrigerem Tumorstadium in Verbindung (Tomlinson, Baldo et al. 2007). Orientiert man sich an den Färbemustern dieser Publikation, gleicht die Färbung von BCO#136 der Färbung für „normales Urothel“ (Färbemuster 1) und die von BCO#140 tendiert eher in Richtung „vollständiger Verlust“ (Färbemuster 0). Da aber sonst keine wesentlichen Unterschiede in den Färbungen für diesen Marker ausgemacht werden konnten, lässt sich aus den Daten keine Aussage in Bezug auf das Wachstumsverhalten treffen.

4.4.4 Veränderte Zytokeratin-Expression als Zeichen für höheres Tumorstadium und Tumorigradung

In Bezug auf die Zytokeratine fiel auf, dass die Originaltumore mit „variabler Proliferation“ überwiegend beide Subtypen CK7 und CK20 gemeinsam exprimierten, während die Tumoren der Vergleichsgruppe fast ausschließlich CK7-positiv waren und auf der anderen Seite in 3/5 Fällen gar keine Färbung für CK20 zeigten. Die Vermutung liegt also nahe, dass eine fehlende CK20-Expression ein prognostisch günstiger Faktor für ein gutes Wachstum in der Zellkultur sein könnte.

In normalem Urothel findet sich CK7 ubiquitär verteilt und CK20 in der oberflächlichen Zellschicht (Southgate, Harnden et al. 1999). Daten aus Ägypten bestätigen eine Korrelation einer veränderten Expression von Zytokeratinen in Urothelzellkarzinomen mit Tumorstadium und Tumorigradung. Hammam et. al schlossen aus der IHC-Untersuchung von 150 Primärtumoren, dass mit

zunehmendem Stadium und Grading die CK20-Expression eher ab- und die CK7-Expression eher zunimmt (Hammam, Wishahiz et al. 2014). Auch nach der molekularen Klassifizierung nach Sjö Dahl et. al geht in der Gruppe der UroB-Tumore (tendenziell $\geq T2$ & $\geq G2$, schlechte Prognose) eine veränderte bzw. fehlende CK20-Expression mit höherem Stadium und Grading einher (Sjö Dahl, Lövgren et al. 2013). Das Fehlen von CK20 in den 3/5 Originaltumoren mit „stabiler Proliferation“ und die durchschnittlich höhere Expression von CK7 (Histoscore 208 vs. 163, siehe Tabelle 18) könnte für diese Tumoren auf der Ebene der Proteinexpression ein Hinweis für höheres Stadium und Grading sein, auch wenn kein hohes Stadium und Grading direkt durch den pathologischen Befund auf histologischer Ebene bestätigt werden konnte, weil beispielsweise die invasiven Anteile durch das Raster der Routineuntersuchung gefallen sind. Höheres Stadium sowie höheres Grading spricht allgemein für aggressiveres Tumorwachstum, das sich auch in Zellkultur widerspiegeln könnte.

Die pathologischen Befunde der Originaltumore folgen den Erkenntnissen aus den Studien von Hammam und von Sjö Dahl. In der Gruppe der „stabilen Proliferation“ zeigen die Originaltumore mit vollständigem CK20-Verlust (BCO#140, BCO#147 bzw. BCO#154-mal.) in pathologischen Befundung entweder hohes Tumorstadium (pT1, pT4 bzw. pT3b) oder hohes Tumorigrad (G3/high grade, G2 bzw. high grade) oder eben auch beides gemeinsam (siehe 3.3 Klinische Daten). In der Vergleichsgruppe mit „variabler Proliferation“ hebt sich BCO#180 mit einer hohen CK20-Expression (Histoscore 250) deutlich von den übrigen ab (Histoscore 0-40). Während für den Originaltumor zu BCO#180 passend dazu im pathologischen Bericht nur Stadium pTa und Grading G2/low grade gelistet sind, entdeckte man in allen übrigen Originaltumoren dieser Gruppe durchgehend Anteile, die mit pT1, pT2a sowie G3/high grade beurteilt werden.

4.4.5 p53- und p63-Expression lassen nur teilweise auf Wachstumsverhalten rückschließen

Die p53 Expression zeigte in beiden Gruppen die gesamte Bandbreite mit Histoscores zwischen 0 und 300. Auffallend war, dass in der Gruppe der „stabilen

Proliferation“ zwei Präparate (BCO#140 und BCO#154-mal.) gänzlich negativ für dieses Protein blieben. Eine aktuelle Arbeit von Borowczak et. al beschreibt eine deutliche Korrelation ($p=0,0001$) für eine höhere p53-Expression in malignem Harnblasengewebe verglichen mit normalem Urothel. Innerhalb der 67 Harnblasenkarzinome, die per IHC und Histoscore analysiert wurden, ließ sich aber kein signifikanter Zusammenhang zwischen p53-Expression und Tumorstadium, Grading oder Invasivität herstellen. Die Studie befindet lediglich eine hohe p53-Expression (Histoscore ≥ 90) als prädiktiven Marker für eine ungünstige klinische Prognose (u.a. Überleben und Progression) und das auch nur für NMIBC (Borowczak, Szczerbowski et al. 2023). Die Relevanz der p53-Expression zur Vorhersage des klinischen Outcomes wird auch in weiteren Studien v.a. für NMIBC mit Staging T1 bestätigt (Llopis, Alcaraz et al. 2000, Goebell, Groshen et al. 2010, Ozyalvaçlı, Ozyalvacli et al. 2015). Da aber weiterhin nicht abschließend geklärt ist, wie die Aktivität des Tumorseiten 53 zum Verhalten des Tumors beiträgt, lässt sich aus den Ergebnissen zusammen mit der bestehenden Literatur keine Aussage über den Einfluss von veränderter p53-Expression auf das Wachstum in Zellkultur treffen. Die unterschiedlich hohe p53-Expression im Originaltumor scheint also in keiner der beiden Gruppen in Zusammenhang mit dem Wachstumsverhalten zu stehen.

Wie in der Einleitung bereits erwähnt (siehe 1.2.3), steht eine niedrigere p63-Expression für höheres Tumorstadium und schlechteres klinisches Outcome (Compérat, Camparo et al. 2006, El-Gendi and Abu-Sheasha 2018). Passend dazu ist die p63-Expression in 2/5 Präparaten mit „stabiler Proliferation“ (BCO#147, BCO#154-mal.) vollständig verloren und fehlt zusätzlich in Ausschnitt 3 von BCO#140. Alle Originaltumore der „variablen Proliferation“ exprimieren p63 mit mindestens 130 Punkten im Histoscore. Dieser Befund liefert einen weiteren Hinweis darauf, dass die Gruppe der „stabilen Proliferation“ eher aus Tumoren in hohem Stadium und mit aggressivem Wachstumsverhalten besteht, deren Zellen dieses Wachstumsverhalten auch in Zellkultur fortsetzen können.

4.4.6 Unterschiedliche CD44-Expression lässt nicht auf das Wachstumsverhalten schließen

Die deutlichen Unterschiede in der CD44-Expression zwischen den beiden Gruppen lassen sich nur schwer in bestehende Literatur zum Harnblasenkarzinom einordnen. Somit ist es nur bedingt möglich daraus Rückschlüsse auf das Wachstumsverhalten zu schließen. Eine ausführliche Metaanalyse hat die Bedeutung von CD44 für das Harnblasenkarzinom anhand von 14 Studien und zusätzlich anhand von Daten aus dem TCGA (The Cancer Genome Atlas) untersucht. Die Autoren kommen zu dem Ergebnis, dass die Expression von CD44 nicht mit klinischem Outcome (Rezidiv, Überleben usw.) korreliert und der Zusammenhang zu Tumorstadium und Grading noch nicht abschließend belegt werden kann. Als hochsignifikanten Unterschied hat diese Studie zwar herausgefunden, dass CD44 in normalem Urothel höher exprimiert wird als in malignem, allerdings ist dies für die vorliegende Fragestellung nicht hilfreich (Hu, Zhang et al. 2020).

4.5 Zusammenhang Pathologischer Befund und Wachstumsverhalten

Bei Betrachtung der pathologischen Befunde zeichnet sich sowohl bei Tumorstadium als auch Tumorgrading innerhalb beider Gruppen eine deutliche Tendenz ab (siehe Tabelle 19 und Tabelle 20). Unter den Originaltumoren mit „stabiler Proliferation“ werden 3 aus 4 Proben mit einem Stadium größer pT2 beschrieben und erhalten alle gemeinsam mindestens G2 bzw. high grade. Damit wird diese Gruppe von den invasiveren sowie stärker entarteten Urothelzellkarzinomen gebildet. Das Ursprungsgewebe der Kulturen mit „variabler Proliferation“ beinhaltet hingegen nur einen aus vier Tumoren, der als Stadium pT2a Tumor diagnostiziert (BCO#208), während die übrigen drei mit Stadium pTa bzw. pT1 als weniger invasiv befunden wurden. Bezüglich des Gradings finden sich bei „variabler Proliferation“ auch 2 von 4 Tumoren, die low grade Anteile aufweisen (BCO#180, BCO#189).

Diese Ergebnisse stützen die These, dass es zumindest einen indirekten Zusammenhang zwischen pathologischem Befund und Wachstumsverhalten der Tumorzellen als Organoide geben könnte. Demnach würde ein höheres

Tumorstadium und Tumorgrading auch die Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Organoidkultur erhöhen.

4.6 Schlussfolgerung

Die Versuche dieser Arbeit haben gezeigt, dass die Organoidzellkultur für malignes Harnblasengewebe noch am Anfang steht. Während solche Modelle für andere Gewebe schon gut etabliert sind, sind die Veröffentlichungen zu Experimenten mit Harnblasengewebe noch jung. Um auch für diese Tumorart ein nützliches Modell für Klinik und Forschung zu etablieren, sind noch mehrere Fragestellungen zu klären.

Neben einem schonenden Verfahren zur Gewebeentnahme, sollten auch noch weitere 3D-Matrizes außer BME getestet werden. Dabei sind vor allem Matrizes mit einer verlässlich konstanten Zusammensetzung interessant, um für mehr standardisierte Kulturbedingungen zu sorgen. Die Untersuchungen der Wachstumsverläufe waren aufgrund des Messverfahrens und weiteren Limitationen fehleranfällig und damit nur bedingt interpretierbar. Allerdings zeigen die Ergebnisse in jedem Fall, dass es einen deutlichen Unterschied im Wachstumsverhalten verschiedener Kulturen gibt. Mit Unterschieden in der Ki-67-Expression wurden in dieser Arbeit Hinweise darauf gefunden, dass die vielversprechenden Versuchsansätze der Kokultur mit Stromazellen oder mit sogenannten Feederzellen sinnvoll sein können. Vor allem weniger aggressive Tumore, die in der Zellteilung ggf. noch auf die Stroma-Interaktion angewiesen sind, könnten so auch über mehrere Passagen kultiviert werden. Die Ergebnisse zeigen im Weiteren, dass eine hohe CK7-Expression sowie das Fehlen von CK20 im Originaltumor eine positive Auswirkung auf das Wachstum in Zellkultur haben könnte. Um erfolgreiche Kulturen zu etablieren, könnte es also zukünftig auch sinnvoll sein, zuvor die Expression von CK7 und CK20 am Originaltumor zu untersuchen.

Auch wenn heute noch einige Fragestellungen offenstehen, wird sich weitere Forschung an Organoidmodellen des Harnblasenkarzinoms bezahlt machen. Denn wie viele Beispiele mit anderen Tumorentitäten zeigen, bringt es die

Forschung einen großen Schritt weit näher in Richtung des idealen Tumormodells.

5 Zusammenfassung

Als vierthäufigste Tumorart bei Männern und mit sehr hoher Rezidivrate stellt das Harnblasenkarzinom eine große Belastung für Mensch und Gesundheitssystem dar. Um die komplexen Vorgänge der Onkogenese sowie das allgemeine Verhalten dieser Tumorart zu erforschen, sind Modelle nötig, die die in-vivo Situation möglichst exakt nachbilden. Nach jahrzehntelanger Forschung an Zelllinien in einfacher 2D-Zellkultur gilt die 3D-Zellkultur als vielversprechender Ansatz für ein Modell, das ein Stück weit mehr der Realität entspricht. Die dreidimensionale Interaktion der Zellgebilde – sog. Organoide – sowohl zu benachbarten Tumorzellen als auch zum umgebenden Stroma wird als bedeutende Weiterentwicklung angesehen, nachdem die hohe Relevanz dieser Mechanismen in den letzten zwei Jahrzehnten immer mehr aufgedeckt wurde. Im Rahmen dieser Dissertation wurde an der Etablierung eines Organoidmodells aus humanem Harnblasengewebe gearbeitet. Anhand standardisierter Protokolle wurden insgesamt 22 Kulturen aus Primärgewebe bzw. tiefgefrorenen Rückstellproben angesetzt und deren Wachstumsverhalten über die Passagen hinweg beobachtet. Nachdem ein Großteil der Kulturen nur geringes Wachstum zeigte und nur wenige als Zelllinie über die fünfte Passage hinaus kultiviert werden konnten, wurden nachträglich die zugehörigen Originaltumore immunhistochemisch auf die Expression von acht verschiedenen Antikörpern untersucht. Insbesondere stellten diese Analysen auf Originaltumorebene eine unterschiedliche Expression von Ki-67 sowie CK7 und CK20 zwischen Kulturen mit „stabiler Proliferation“ und solchen mit „variabler Proliferation“ fest. Im Allgemeinen deutet die unterschiedliche Expression der meisten der acht Marker an, dass Primärgewebe mit höherem pathologischen Tumorstadium sowie Tumorgrading auch stabileres Wachstum in Organoidzellkultur zeigt. Speziell die unterschiedliche Expression von Ki-67 zwischen den beiden Gruppen liefert Hinweise darauf, dass bestimmte Tumore in ihrem Wachstum auf die Interaktion mit dem umliegenden Stroma angewiesen sind. Da diese Interaktion in der hier verwendeten Monozellkultur nicht gegeben war, sind möglicherweise weiterführende Versuche mit Stromazellen in Kokultur oder mit sogenannten Feederzellen zielführend. So könnten auch diese Tumore über mehrere

Passagen kultivieren werden. In Bezug auf die Gewebeaufarbeitung zeigt diese Arbeit, dass die Erhaltung der Zellvitalität durch schonende Entnahmeverfahren von zentraler Bedeutung für eine erfolgreiche Organoidzellkultur ist. Auch in der Wahl der idealen Matrix für die 3D-Zellkultur sind noch weitere Untersuchungen ausstehend, um für konstante Kulturbedingungen zu sorgen. Im Allgemeinen zeigen die Ergebnisse die Herausforderungen dieser neuartigen Methoden auf und bestätigt aber auch die 3D-Zellkultur des Harnblasenkarzinoms als bedeutsamen Meilenstein in der urologischen Onkologie. Denn nur durch realitätsnahe Tumormodelle wird es Forschung und Klinik in Zukunft möglich sein, die Versorgung der Patient*innen sowie den ökonomisch sinnvollen Einsatz von Ressourcen des Gesundheitssystems zu verbessern.

6 Anhang

6.1 IHC-Bilder und Histoscore Auswertung „stabile Proliferation“

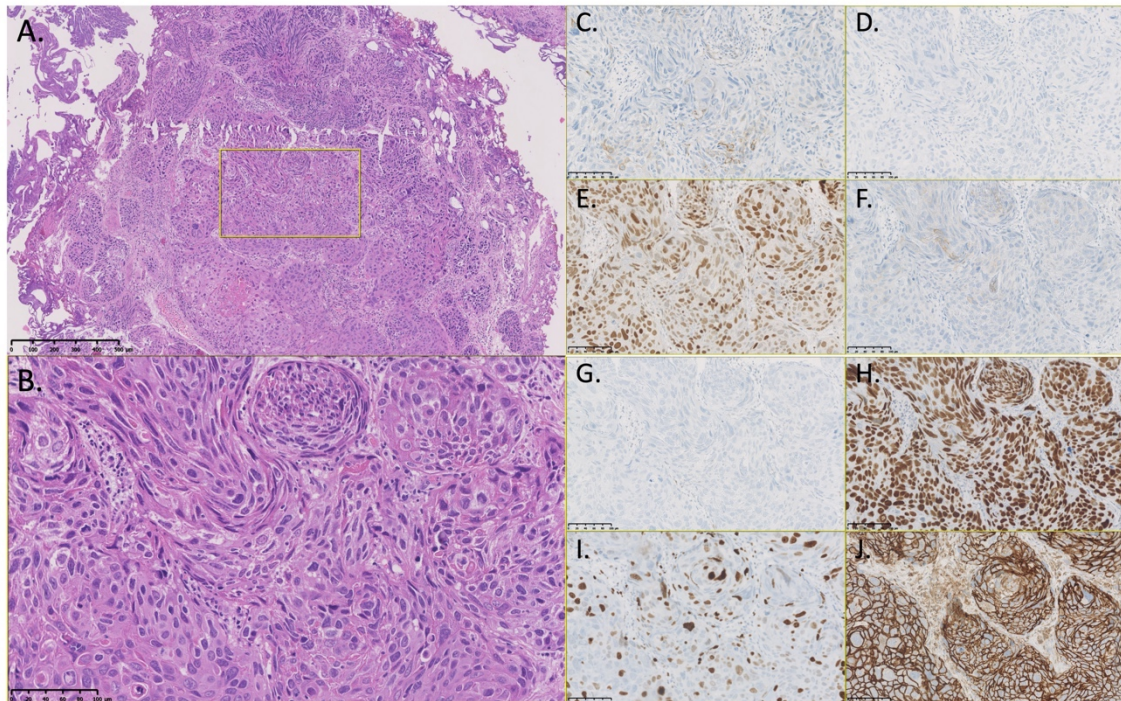


Abbildung 30: IHC Originaltumor K31506/20-3 (BCO#140) – Ausschnitt 1. Paraffinschnitt 2,5 μ m. Gelbes Quadrat in A zeigt Ausschnitt von B – J. A – H/E (5x – Maßstab: 500 μ m) + B – H/E (20x/Maßstab: 100 μ m). C - CK7. D - CK20. E - GATA3. F - FGFR3. G - p53. H - p63. I - Ki67. J - CD44 (je 20x/Maßstab: 100 μ m). Stärkste Expression von p63 und CD44 über alle Schichten. GATA3 mittelstark über alle Schichten. Ki67 diffus verteilt. Keine Expression für CK7, CK20, FGFR3, p53.

Tabelle 22: Histoscore-Auswertung K31506/20-3 (BCO#140) – Ausschnitt 1

IHC Originaltumor - K31506/20-3 (BCO#140) - Ausschnitt 1				
Antikörper	+	++	+++	Histoscore
CK7	5%	0%	0%	5
CK20	0%	0%	0%	0
GATA3	30%	50%	20%	190
FGFR3	15%	0%	0%	15
p53	0%	0%	0%	0
p63	0%	10%	90%	290
Ki-67	0%	15%	5%	45
CD44	0%	0%	100%	300

Tabelle 23: K31506/20-3 (BCO#140) – Ausschnitt 1. Markerexpression über die drei Schichten des Urothels: Basale, intermediäre und superfizielle Zellschicht. War die Expression keiner der Schichten eindeutig zuzuordnen, wurde die Kategorie „diffus“ vergeben.

IHC Originaltumor - K31506/20-3 (BCO#140) - Ausschnitt 1					
Antikörper	Basal	Intermediär	Superfizial	Diffus	Histoscore
CK7				diffus	5
CK20	nein	nein	nein		0
GATA3	ja	ja	ja		190
FGFR3	nein	nein	nein	diffus	15
p53	nein	nein	nein		0
p63	ja	ja	ja		290
Ki-67				diffus	45
CD44	ja	ja	ja		300

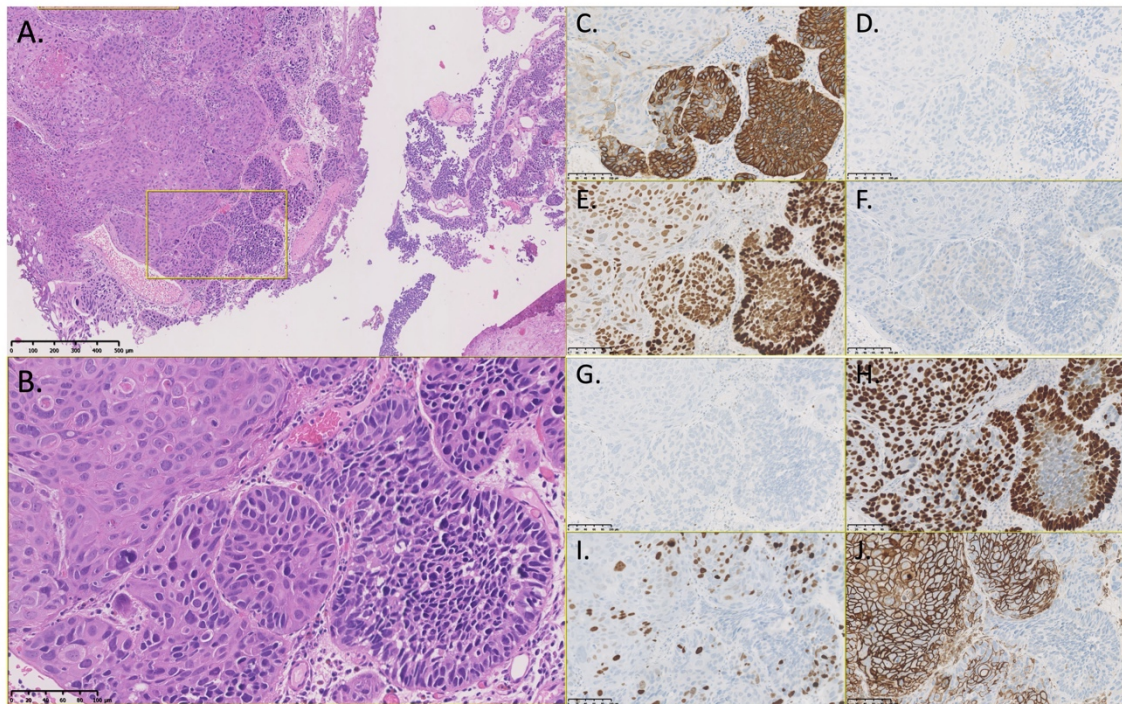


Abbildung 31: IHC Originaltumor K31506/20-3 (BCO#140) – Ausschnitt 2. Paraffinschnitt 2,5 µm. Gelbes Quadrat in A zeigt Ausschnitt von B – J. A – H/E (5x – Maßstab: 500 µm) + B – H/E (20x/Maßstab: 100 µm). C - CK7. D - CK20. E - GATA3. F - FGFR3. G - p53. H - p63. I - Ki47. J - CD44 (je 20x/Maßstab: 100 µm). Unterschiedlich intensive Anfärbbarkeit der Urothelzellen für H/E (B: links – schwach, rechts – stark). Stärkste Expression von CK7, GATA3, CD44 über alle Zellschichten. CK7 verhält sich gegensätzlich zu CD44. GATA3 (E) rechts stark, links schwächer. p63 ebenfalls stark und nur basal. Ki67-Expression diffus verteilt. Keine Expression von CK20, FGFR3, p53.

Tabelle 24: Histoscore-Auswertung K31506/20-3 (BCO#140) – Ausschnitt 2

IHC Originaltumor - K31506/20-3 (BCO#140) - Ausschnitt 2				
Antikörper	+	++	+++	Histoscore
CK7	30%	10%	60%	230
CK20	0%	0%	0%	0
GATA3	20%	50%	30%	210
FGFR3	10%	0%	0%	10
p53	0%	0%	0%	0
p63	10%	0%	80%	250
Ki-67	0%	10%	10%	50
CD44	0%	0%	70%	210

Tabelle 25: K31506/20-3 (BCO#140) – Ausschnitt 2. Markerexpression über die drei Schichten des Urothels: Basale, intermediäre und superfizielle Zellschicht.

IHC Originaltumor - K31506/20-3 (BCO#140) - Ausschnitt 2					
Antikörper	Basal	Intermediär	Superfizial	Diffus	Histoscore
CK7	ja	ja	ja		230
CK20	nein	nein	nein		0
GATA3	ja	ja	ja		210
FGFR3	nein	nein	nein		10
p53	nein	nein	nein		0
p63	ja	nein	nein		250
Ki-67				diffus	50
CD44	ja	ja	ja		210

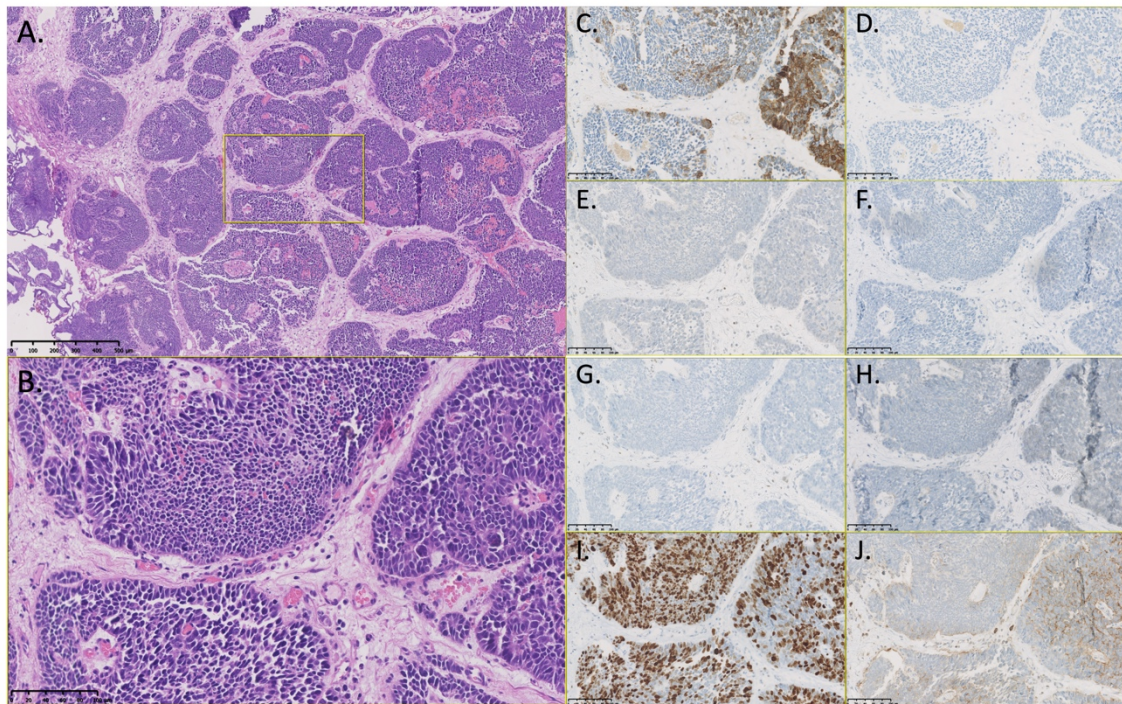


Abbildung 32: IHC Originaltumor K31506/20-3 (BCO#140) – Ausschnitt 3. Paraffinschnitt 2,5 µm. Gelbes Quadrat in A zeigt Ausschnitt von B – J. A – H/E (5x – Maßstab: 500 µm) + B – H/E (20x/Maßstab: 100 µm). C - CK7. D - CK20. E - GATA3. F - FGFR3. G - p53. H - p63. I - Ki47. J - CD44 (je 20x/Maßstab: 100 µm). Zellen innerhalb der Urothelschichten morphologisch zum großen Teil kleiner und unregelmäßiger geformt als in Ausschnitt 1 und 2. Kräftige Anfärbbarkeit aller Zellen innerhalb des Urothels für H/E. Stärkste Expression von CK7 in Urothelzellen von größerer Morphologie (C – rechts). Ebenfalls stärkste Expression von Ki67 über alle Schichten. Schwache Expression von CD44 in CK7-positiven Zellen und in basalen Zellschichten. Keine Expression von CK20, GATA3, FGFR3, p53, p63.

Tabelle 26: Histoscore-Auswertung K31506/20-3 (BCO#140) – Ausschnitt 3

IHC Originaltumor - K31506/20-3 (BCO#140) - Ausschnitt 3				
Antikörper	+	++	+++	Histoscore
CK7	30%	0%	40%	150
CK20	0%	0%	0%	0
GATA3	0%	0%	0%	0
FGFR3	0%	0%	0%	0
p53	0%	0%	0%	0
p63	0%	0%	0%	0
Ki-67	0%	30%	60%	240
CD44	20%	20%	0%	60

Tabelle 27: K31506/20-3 (BCO#140) – Ausschnitt 3. Markerexpression über die drei Schichten des Urothels: Basale, intermediäre und superfizielle Zellschicht.

IHC Originaltumor - K31506/20-3 (BCO#140) - Ausschnitt 3					
Antikörper	Basal	Intermediär	Superficial	Diffus	Histoscore
CK7	ja	ja	ja	diffus	150
CK20	nein	nein	nein		0
GATA3	nein	nein	nein		0
FGFR3	nein	nein	nein		0
p53	nein	nein	nein		0
p63	nein	nein	nein		0
Ki-67	ja	ja	ja		240
CD44	ja	ja	ja	diffus	60

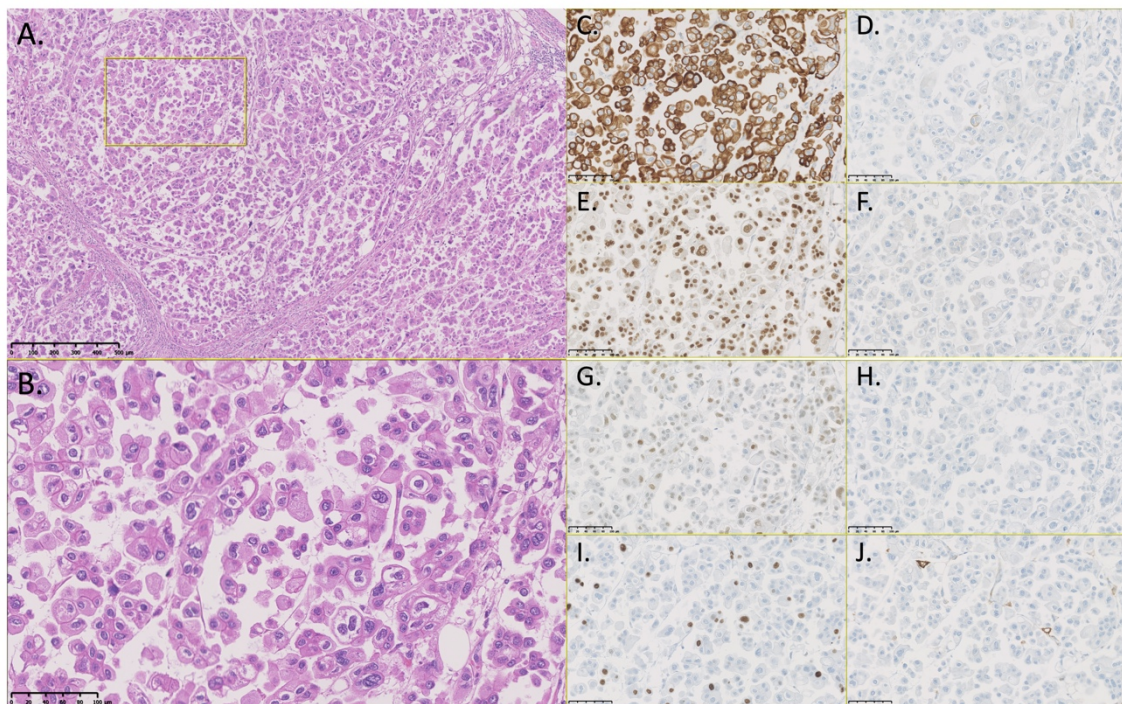


Abbildung 33: IHC Originaltumor K1375/21-5 (BCO#147). Paraffinschnitt 2,5 μ m. Gelbes Quadrat in A zeigt Ausschnitt von B – J. A – H/E (5x – Maßstab: 500 μ m) + B – H/E (20x/Maßstab: 100 μ m). C - CK7. D - CK20. E - GATA3. F - FGFR3. G - p53. H - p63. I - Ki47. J - CD44 (je 20x/Maßstab: 100 μ m).

Tabelle 28: Histoscore-Auswertung K1375/21-5 (BCO#147)

IHC Originaltumor - K1375/21-5 (BCO#147)				
Antikörper	+	++	+++	Histoscore
CK7	0%	40%	60%	260
CK20	0%	0%	0%	0
GATA3	0%	30%	70%	270
FGFR3	0%	0%	0%	0
p53	40%	10%	0%	60
p63	0%	0%	0%	0
Ki-67	0%	0%	15%	45
CD44	5%	0%	0%	5

Tabelle 29: K1375/21-5 (BCO#147). Markerexpression über die drei Schichten des Urothels: Basale, intermediäre und superfizielle Zellschicht. Für dieses Präparat konnte keine Polarität bzw. kein eindeutiges Urothel mit allen Schichten identifiziert werden. Deshalb wurde dieser Originaltumor nicht hinsichtlich der Polarität ausgewertet.

IHC Originaltumor - K1375/21-5 (BCO#147)					
Antikörper	Basal	Intermediär	Superfizial	Diffus	Histoscore
CK7					260
CK20					0
GATA3					270
FGFR3					0
p53					60
p63					0
Ki-67					45
CD44					5

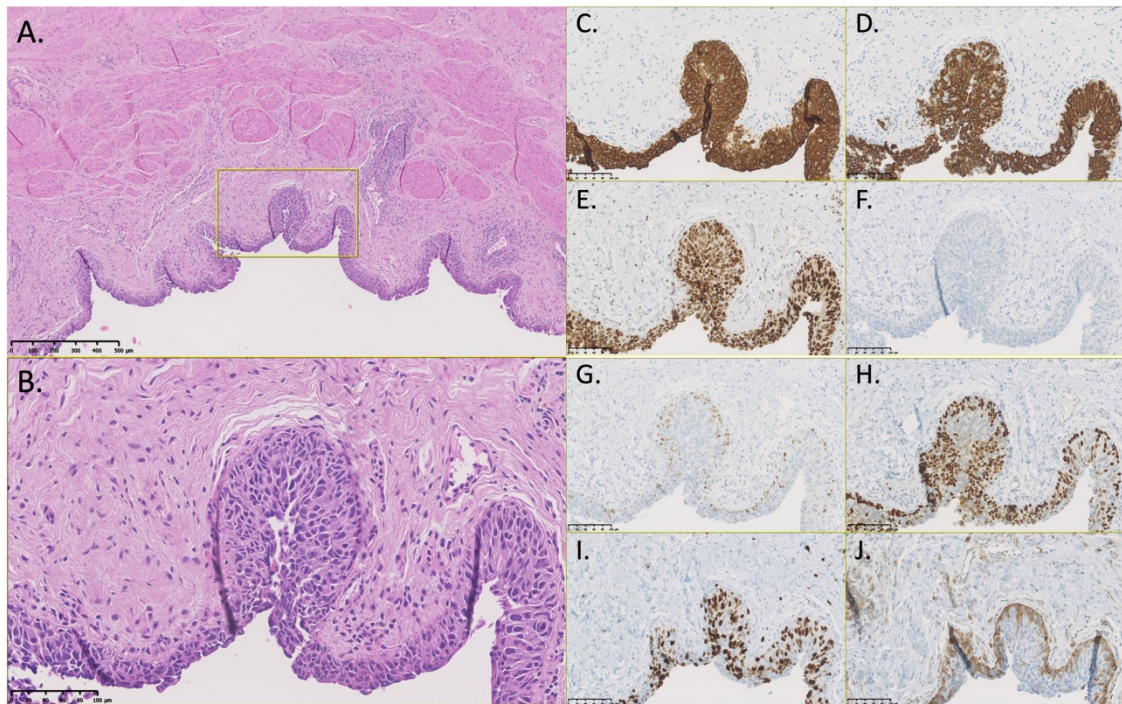


Abbildung 34: IHC Originaltumor K2946/21-5 (BCO#154-ben.). Paraffinschnitt 2,5 μ m. Gelbes Quadrat in A zeigt Ausschnitt von B – J. A – H/E (5x – Maßstab: 500 μ m) + B – H/E (20x/Maßstab: 100 μ m). C - CK7. D - CK20. E - GATA3. F - FGFR3. G - p53. H - p63. I - Ki47. J - CD44 (je 20x/Maßstab: 100 μ m).

Tabelle 30: Histoscore-Auswertung K2946/21-5 (BCO#154-ben.)

IHC Originaltumor - K2946/21-5 (BCO#154-ben.)				
Antikörper	+	++	+++	Histoscore
CK7	0%	0%	100%	300
CK20	0%	0%	100%	300
GATA3	0%	30%	70%	270
FGFR3	0%	0%	0%	0
p53	15%	5%	0%	25
p63	5%	20%	30%	135
Ki-67	0%	10%	80%	260
CD44	0%	0%	50%	150

Tabelle 31: K2946/21-5 (BCO#154-ben.). Markerexpression über die drei Schichten des Urothels: Basale, intermediäre und superfizielle Zellschicht.

IHC Originaltumor - K2946/21-5 (BCO#154-ben.)					
Antikörper	Basal	Intermediär	Superfizial	Diffus	Histoscore
CK7	ja	ja	ja		300
CK20	ja	ja	ja		300
GATA3	ja	ja	ja		270
FGFR3	nein	nein	nein		0
p53	ja	nein	nein		25
p63	ja	ja	nein		135
Ki-67	ja	ja	nein		260
CD44	ja	nein	nein		150

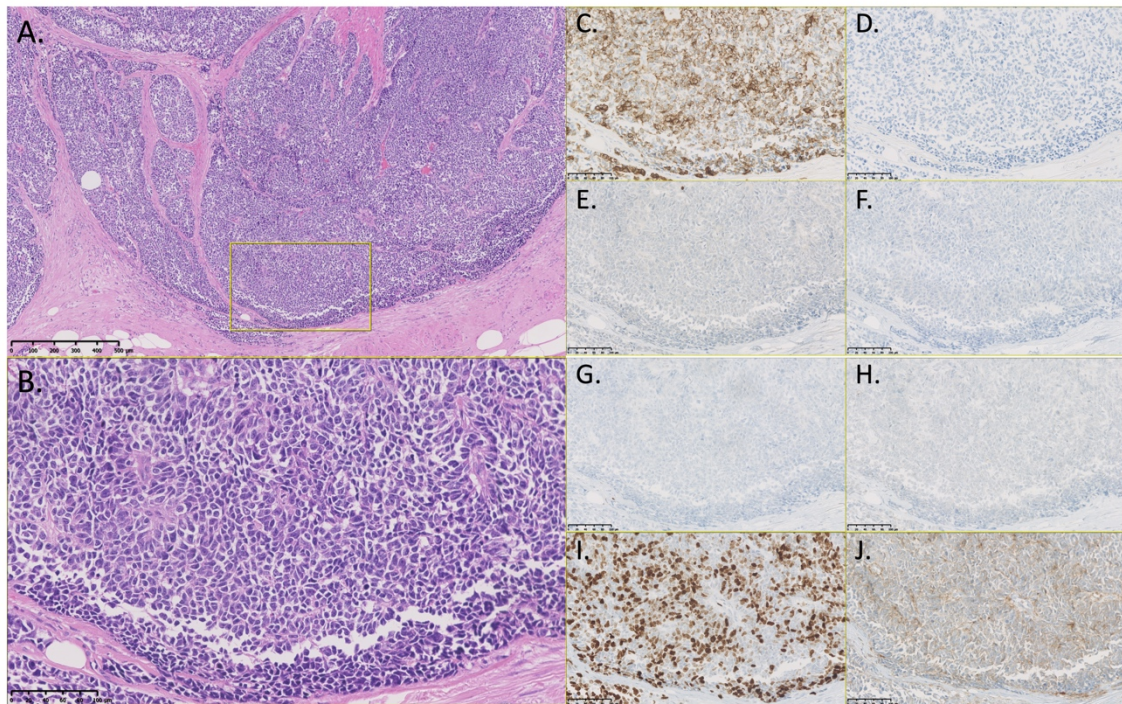


Abbildung 35: IHC Originaltumor K2946/21-13 (BCO#154-mal.). Paraffinschnitt 2,5 μ m. Gelbes Quadrat in A zeigt Ausschnitt von B – J. A – H/E (5x – Maßstab: 500 μ m) + B – H/E (20x/Maßstab: 100 μ m). C - CK7. D - CK20. E - GATA3. F - FGFR3. G - p53. H - p63. I - Ki47. J - CD44 (je 20x/Maßstab: 100 μ m).

Tabelle 32: Histoscore-Auswertung K2946/21-5 (BCO#154-mal.)

IHC Originaltumor - K2946/21-13 (BCO#154-mal.)				
Antikörper	+	++	+++	Histoscore
CK7	0%	60%	30%	210
CK20	0%	0%	0%	0
GATA3	0%	0%	0%	0
FGFR3	0%	0%	0%	0
p53	0%	0%	0%	0
p63	0%	0%	0%	0
Ki-67	0%	30%	60%	240
CD44	80%	0%	0%	80

Tabelle 33: K2946/21-13 (BCO#154-mal.). Markerexpression über die drei Schichten des Urothels: Basale, intermediäre und superfizielle Zellschicht.

IHC Originaltumor - K2946/21-13 (BCO#154-mal.)					
Antikörper	Basal	Intermediär	Superfizial	Diffus	Histoscore
CK7	ja	ja	ja		210
CK20	nein	nein	nein		0
GATA3	nein	nein	nein		0
FGFR3	nein	nein	nein		0
p53	nein	nein	nein		0
p63	nein	nein	nein		0
Ki-67	ja	ja	ja		240
CD44	ja	ja	ja		80

6.2 IHC-Bilder und Histoscore Auswertung „variable Proliferation“

Abbildung 22: IHC Originaltumor K12179/21-1 (BCO#180). Paraffinschnitt 2,5 µm. Gelbes Quadrat in A zeigt Ausschnitt von B – J. A – H/E (5x – Maßstab: 500 µm) + B – H/E (20x/Maßstab: 100 µm). C - CK7. D - CK20. E - GATA3. F - FGFR3. G - p53. H - p63. I - Ki47. J - CD44 (je 20x/Maßstab: 100 µm). Die Übersichtsabbildungen der H/E- und IHC-Färbungen sowie die zugehörigen Auswertungstabellen für die übrigen Originaltumore dieser Gruppe finden sich im Anhang unter 6.2.

Tabelle 34: Histoscore-Auswertung K12179/21-1 (BCO#180)

IHC Originaltumor - K12179/21-1 (BCO#180)				
Antikörper	+	++	+++	Histoscore
CK7	0%	100%	0%	200
CK20	0%	50%	50%	250
GATA3	0%	0%	100%	300
FGFR3	0%	0%	0%	0
p53	30%	10%	0%	50
p63	0%	0%	90%	270
Ki-67	0%	5%	0%	10
CD44	0%	80%	10%	190

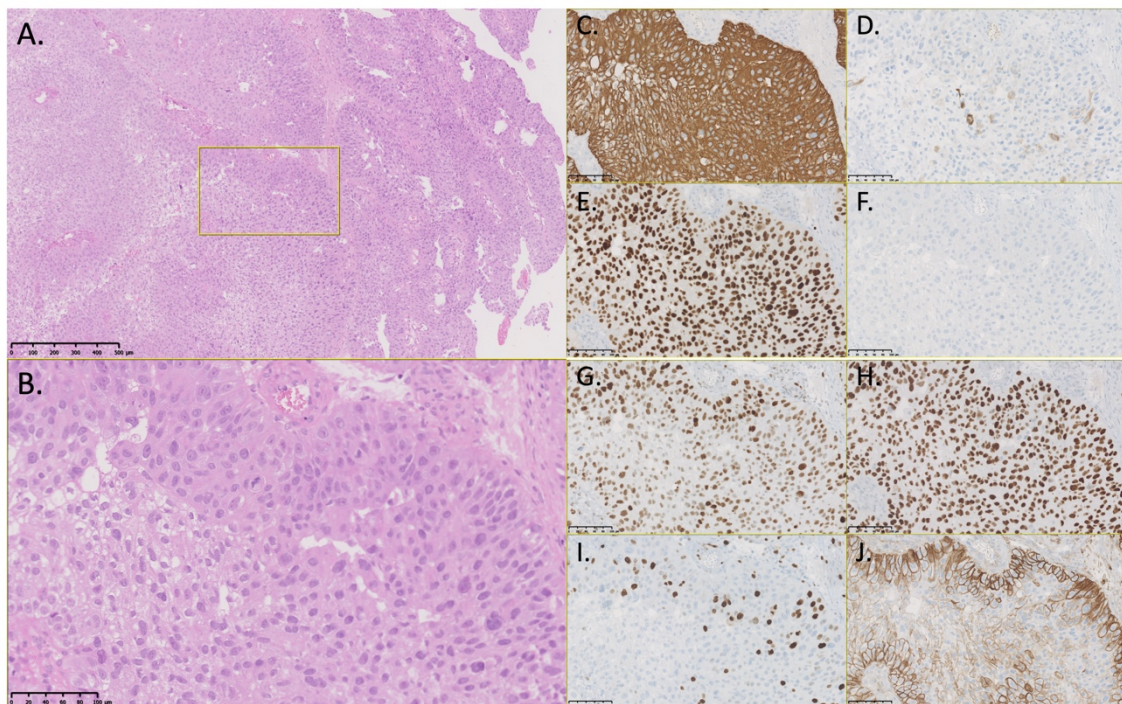


Abbildung 36: IHC Originaltumor K13430/21-1 (BCO#185). Paraffinschnitt 2,5 μ m. Gelbes Quadrat in A zeigt Ausschnitt von B – J. A – H/E (5x – Maßstab: 500 μ m) + B – H/E (20x/Maßstab: 100 μ m). C - CK7. D - CK20. E - GATA3. F - FGFR3. G - p53. H - p63. I - Ki47. J - CD44 (je 20x/Maßstab: 100 μ m).

Tabelle 35: K12179/21-1 (BCO#180). Markerexpression über die drei Schichten des Urothels: Basale, intermediäre und superfizielle Zellschicht.

IHC Originaltumor - K12179/21-1 (BCO#180)					
Antikörper	Basal	Intermediär	Superficial	Diffus	Histoscore
CK7	ja	ja	ja		200
CK20	ja	ja	ja		250
GATA3	ja	ja	ja		300
FGFR3	nein	nein	nein		0
p53	ja	nein	nein		50
p63	ja	ja	nein		270
Ki-67				diffus	10
CD44	ja	nein	nein		190

Tabelle 36: Histoscore-Auswertung K13430/21-1 (BCO#185)

IHC Originaltumor - K13430/21-1 (BCO#185)				
Antikörper	+	++	+++	Histoscore
CK7	0%	0%	100%	300
CK20	0%	10%	0%	20
GATA3	0%	0%	100%	300
FGFR3	0%	0%	0%	0
p53	60%	20%	20%	160
p63	0%	20%	80%	280
Ki-67	0%	0%	20%	60
CD44	0%	40%	50%	230

Tabelle 37: K13430/21-1 (BCO#185). Markerexpression über die drei Schichten des Urothels: Basale, intermediäre und superfizielle Zellschicht.

IHC Originaltumor - K13430/21-1 (BCO#185)					
Antikörper	Basal	Intermediär	Superficial	Diffus	Histoscore
CK7	ja	ja	ja		300
CK20				diffus	20
GATA3	ja	ja	ja		300
FGFR3	nein	nein	nein		0
p53	ja	ja	nein		160
p63	ja	ja	ja		280
Ki-67				diffus	60
CD44	ja	nein	nein		230

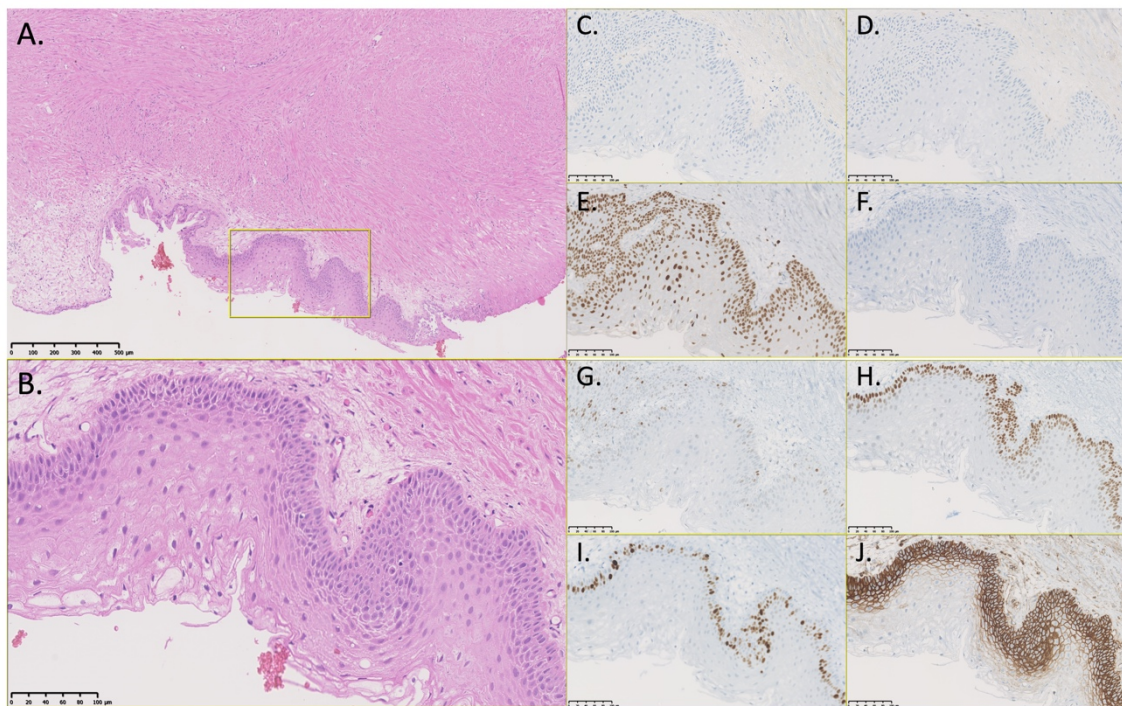


Abbildung 37: IHC Originaltumor K14073/21-8 (BCO#189) – Ausschnitt 1. Paraffinschnitt 2,5 µm. Gelbes Quadrat in A zeigt Ausschnitt von B – J. A – H/E (5x – Maßstab: 500 µm) + B – H/E (20x/Maßstab: 100 µm). C - CK7. D - CK20. E - GATA3. F - FGFR3. G - p53. H - p63. I - Ki47. J - CD44 (je 20x/Maßstab: 100 µm).

Tabelle 38: Histoscore-Auswertung K14073/21-8 (BCO#189) – Ausschnitt 1

IHC Originaltumor - K14073/21-8 (BCO#189) - Ausschnitt 1				
Antikörper	+	++	+++	Histoscore
CK7	0%	0%	0%	0
CK20	0%	0%	0%	0
GATA3	0%	70%	30%	230
FGFR3	0%	0%	0%	0
p53	0%	10%	10%	50
p63	0%	20%	30%	130
Ki-67	0%	20%	20%	100
CD44	0%	20%	50%	190

Tabelle 39: K14073/21-8 (BCO#189) – Ausschnitt 1. Markerexpression über die drei Schichten des Urothels: Basale, intermediäre und superfizielle Zellschicht.

IHC Originaltumor - K14073/21-8 (BCO#189) - Ausschnitt 1					
Antikörper	Basal	Intermediär	Superficial	Diffus	Histoscore
CK7	nein	nein	nein		0
CK20	nein	nein	nein		0
GATA3	ja	ja	ja		230
FGFR3	nein	nein	nein		0
p53	ja	nein	nein		50
p63	ja	nein	nein		130
Ki-67	ja	nein	nein		100
CD44	ja	ja	nein		190

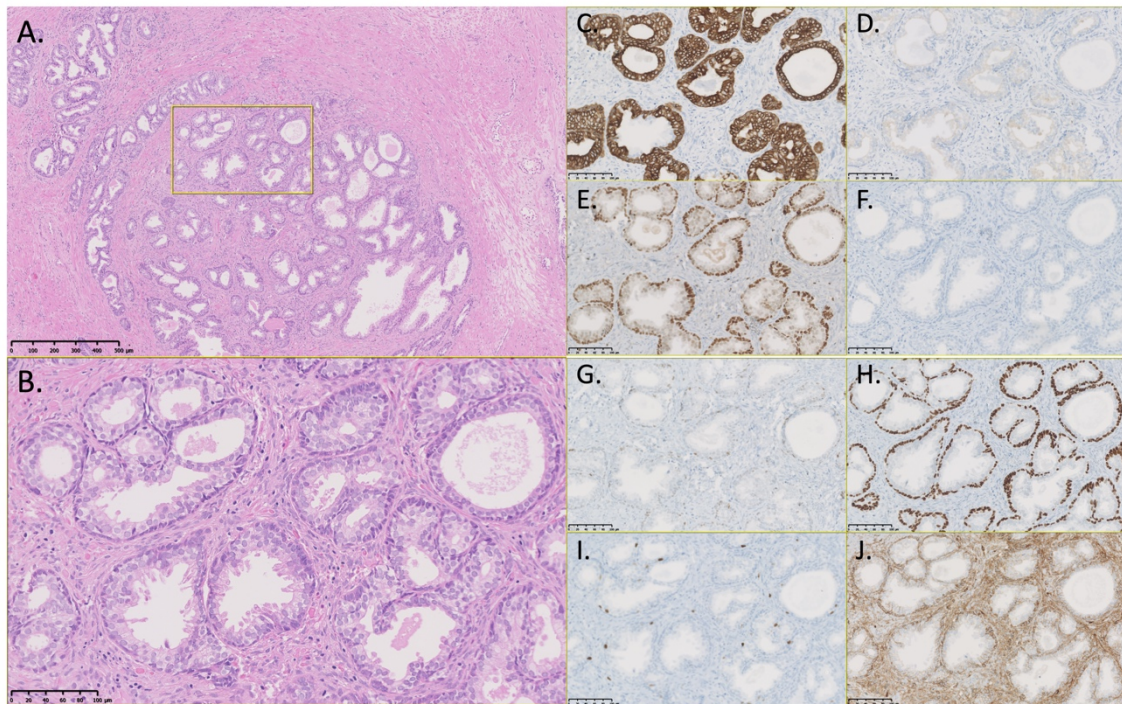


Abbildung 38: IHC Originaltumor K14073/21-8 (BCO#189) – Ausschnitt 2. Paraffinschnitt 2,5 µm. Gelbes Quadrat in A zeigt Ausschnitt von B – J. A – H/E (5x – Maßstab: 500 µm) + B – H/E (20x/Maßstab: 100 µm). C - CK7. D - CK20. E - GATA3. F - FGFR3. G - p53. H - p63. I - Ki47. J - CD44 (je 20x/Maßstab: 100 µm).

Tabelle 40: Histoscore-Auswertung K14073/21-8 (BCO#189) – Ausschnitt 2

IHC Originaltumor - K14073/21-8 (BCO#189) - Ausschnitt 2				
Antikörper	+	++	+++	Histoscore
CK7	0%	0%	100%	300
CK20	40%	0%	0%	40
GATA3	60%	0%	40%	180
FGFR3	0%	0%	0%	0
p53	10%	10%	0%	30
p63	0%	0%	50%	150
Ki-67	0%	0%	10%	30
CD44	0%	30%	50%	210

Tabelle 41: K14073/21-8 (BCO#189) – Ausschnitt 2. Markerexpression über die drei Schichten des Urothels: Basale, intermediäre und superfizielle Zellschicht.

IHC Originaltumor - K14073/21-8 (BCO#189) - Ausschnitt 2					
Antikörper	Basal	Intermediär	Superfizial	Diffus	Histoscore
CK7	ja	ja	ja		300
CK20	nein	nein	ja		40
GATA3	ja	ja	ja		180
FGFR3	nein	nein	nein		0
p53	ja	nein	nein		30
p63	ja	nein	nein		150
Ki-67				diffus	30
CD44	ja	nein	nein		210

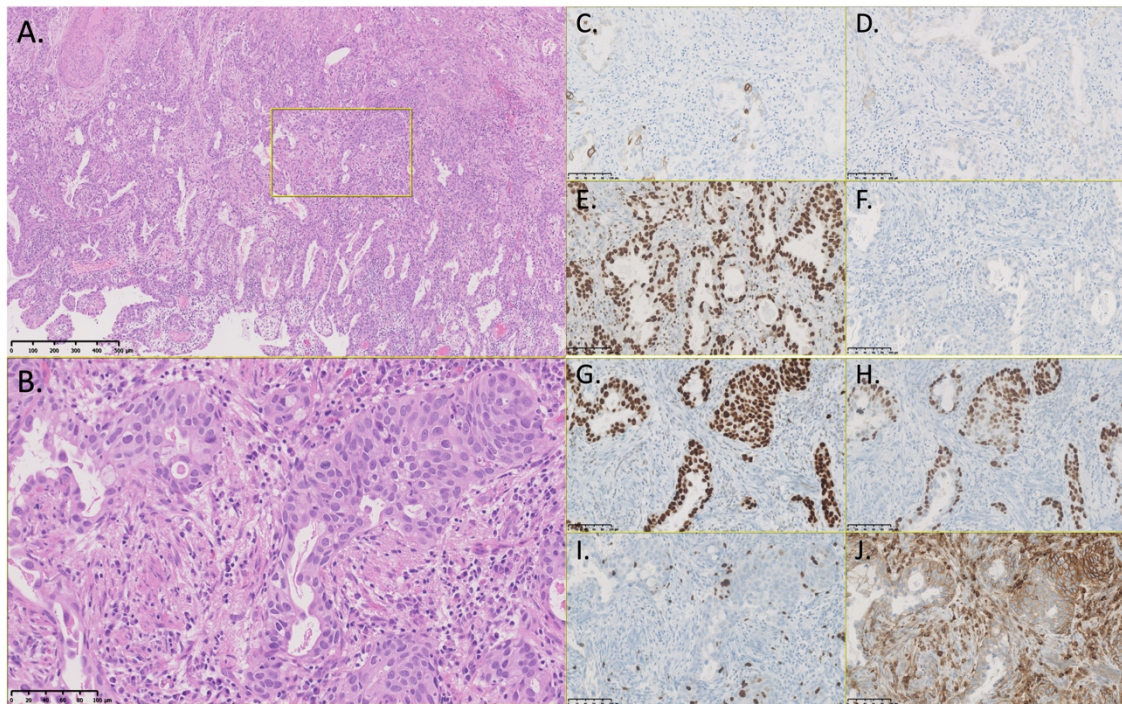


Abbildung 39: IHC Originaltumor K17393/21-1 (BCO#208). Paraffinschnitt 2,5 µm. Gelbes Quadrat in A zeigt Ausschnitt von B – J. A – H/E (5x – Maßstab: 500 µm) + B – H/E (20x/Maßstab: 100 µm). C - CK7. D - CK20. E - GATA3. F - FGFR3. G - p53. H - p63. I - Ki47. J - CD44 (je 20x/Maßstab: 100 µm).

Tabelle 42: Histoscore-Auswertung K17393/21-1 (BCO#208)

IHC Originaltumor - K17393/21-1 (BCO#208)				
Antikörper	+	++	+++	Histoscore
CK7	5%	5%	0%	15
CK20	20%	0%	0%	20
GATA3	0%	0%	100%	300
FGFR3	0%	0%	0%	0
p53	0%	0%	100%	300
p63	0%	10%	80%	260
Ki-67	0%	0%	30%	90
CD44	0%	20%	70%	250

Tabelle 43: K17393/21-1 (BCO#208). Markerexpression über die drei Schichten des Urothels: Basale, intermediäre und superfizielle Zellschicht.

IHC Originaltumor - K17393/21-1 (BCO#208)					
Antikörper	Basal	Intermediär	Superficial	Diffus	Histoscore
CK7				diffus	15
CK20				diffus	20
GATA3	ja	ja	ja		300
FGFR3	nein	nein	nein		0
p53	ja	ja	ja		300
p63	ja	ja	nein		260
Ki-67				diffus	90
CD44	ja	ja	nein		250

7 Literaturverzeichnis

Al-Zalabani, A. H., K. F. Stewart, A. Wesselius, A. M. Schols and M. P. Zeegers (2016). "Modifiable risk factors for the prevention of bladder cancer: a systematic review of meta-analyses." *Eur J Epidemiol* **31**(9): 811-851.

Alexandrov, L. B., S. Nik-Zainal, D. C. Wedge, S. A. Aparicio, S. Behjati, A. V. Biankin, G. R. Bignell, N. Bolli, A. Borg, A. L. Børresen-Dale, S. Boyault, B. Burkhardt, A. P. Butler, C. Caldas, H. R. Davies, C. Desmedt, R. Eils, J. E. Eyfjörd, J. A. Foekens, M. Greaves, F. Hosoda, B. Hutter, T. Illicic, S. Imbeaud, M. Imielinski, N. Jäger, D. T. Jones, D. Jones, S. Knappskog, M. Kool, S. R. Lakhani, C. López-Otín, S. Martin, N. C. Munshi, H. Nakamura, P. A. Northcott, M. Pajic, E. Papaemmanuil, A. Paradiso, J. V. Pearson, X. S. Puente, K. Raine, M. Ramakrishna, A. L. Richardson, J. Richter, P. Rosenstiel, M. Schlesner, T. N. Schumacher, P. N. Span, J. W. Teague, Y. Totoki, A. N. Tutt, R. Valdés-Mas, M. M. van Buuren, L. van 't Veer, A. Vincent-Salomon, N. Waddell, L. R. Yates, J. Zucman-Rossi, P. A. Futreal, U. McDermott, P. Lichter, M. Meyerson, S. M. Grimmond, R. Siebert, E. Campo, T. Shibata, S. M. Pfister, P. J. Campbell and M. R. Stratton (2013). "Signatures of mutational processes in human cancer." *Nature* **500**(7463): 415-421.

Amaral, R., M. Zimmermann, A.-H. Ma, H. Zhang, K. Swiech and C.-X. Pan (2020). "A Simple Three-Dimensional In Vitro Culture Mimicking the In Vivo-Like Cell Behavior of Bladder Patient-Derived Xenograft Models." *Cancers* **12**(5): 1304.

Babjuk, M., M. Burger, O. Capoun, D. Cohen, E. M. Compérat, J. L. Dominguez Escrig, P. Gontero, F. Liedberg, A. Masson-Lecomte, A. H. Mostafid, J. Palou, B. W. G. van Rhijn, M. Rouprêt, S. F. Shariat, T. Seisen, V. Soukup and R. J. Sylvester (2022). "European Association of Urology Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (Ta, T1, and Carcinoma in Situ)." *Eur Urol* **81**(1): 75-94.

Bellmunt, J. and S. Gupta. (2023). "Neoadjuvant treatment options for muscle-invasive urothelial bladder cancer." <https://www.uptodate.com/contents/neoadjuvant-treatment-options-for-muscle-invasive-urothelial-bladder-cancer#H18> (aufgerufen am 07.08.2023).

Böhle, A. and P. R. Bock (2004). "Intravesical bacille calmette-guérin versus mitomycin c in superficial bladder cancer: formal meta-analysis of comparative studies on tumor progression." *Urology* **63**(4): 682-686.

Borowczak, J., K. Szczerbowski, M. Maniewski, M. Zdrenka, P. Słupski, H. Andrusiewicz, J. Łysik-Miśkurka, P. Rutkiewicz, M. Bodnar and Ł. Szyłberg (2023). "The prognostic role of p53 and its correlation with CDK9 in urothelial carcinoma." *Clinical and Translational Oncology* **25**(3): 830-840.

Brandau, S. and H. Suttman (2007). "Thirty years of BCG immunotherapy for non-muscle invasive bladder cancer: A success story with room for improvement." Biomedicine & Pharmacotherapy **61**(6): 299-305.

Bray, F., J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre and A. Jemal (2018). "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries." CA Cancer J Clin **68**(6): 394-424.

Burgués, J. P., L. Gómez, J. L. Pontones, C. D. Vera, J. F. Jiménez-Cruz and M. Ozonas (2007). "A Chemosensitivity Test for Superficial Bladder Cancer Based on Three-Dimensional Culture of Tumour Spheroids." European Urology **51**(4): 962-970.

Chalasani, V., J. L. Chin and J. I. Izawa (2009). "Histologic variants of urothelial bladder cancer and nonurothelial histology in bladder cancer." Can Urol Assoc J **3**(6 Suppl 4): S193-198.

Chitcholtan, K., E. Asselin, S. Parent, P. H. Sykes and J. J. Evans (2013). "Differences in growth properties of endometrial cancer in three dimensional (3D) culture and 2D cell monolayer." Experimental Cell Research **319**(1): 75-87.

Compérat, E., P. Camparo, R. Haus, E. Chartier-Kastler, S. Bart, A. Delcourt, A. Houlgatte, R. François, F. Capron and A. Vieillefond (2006). "Immunohistochemical expression of p63, p53 and MIB-1 in urinary bladder carcinoma. A tissue microarray study of 158 cases." Virchows Archiv **448**(3): 319-324.

Compérat, E. M., M. Burger, P. Gontero, A. H. Mostafid, J. Palou, M. Rouprêt, B. W. G. van Rhijn, S. F. Shariat, R. J. Sylvester, R. Zigeuner and M. Babjuk (2019). "Grading of Urothelial Carcinoma and The New "World Health Organisation Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs 2016". " European Urology Focus **5**(3): 457-466.

Dalghi, M. G., N. Montalbetti, M. D. Carattino and G. Apodaca (2020). "The Urothelium: Life in a Liquid Environment." Physiol Rev **100**(4): 1621-1705.

Dash, A., M. D. Galsky, A. J. Vickers, A. M. Serio, T. M. Koppie, G. Dalbagni and B. H. Bochner (2006). "Impact of renal impairment on eligibility for adjuvant cisplatin-based chemotherapy in patients with urothelial carcinoma of the bladder." Cancer **107**(3): 506-513.

DeGeorge, K. C., H. R. Holt and S. C. Hodges (2017). "Bladder Cancer: Diagnosis and Treatment." Am Fam Physician **96**(8): 507-514.

DUTTA, S. C., J. A. SMITH, S. B. SHAPPELL, C. S. COFFEY, S. S. CHANG and M. S. COOKSON (2001). "CLINICAL UNDER STAGING OF HIGH RISK NONMUSCLE INVASIVE UROTHELIAL CARCINOMA TREATED WITH RADICAL CYSTECTOMY." Journal of Urology **166**(2): 490-493.

Duval, K., H. Grover, L. H. Han, Y. Mou, A. F. Pegoraro, J. Fredberg and Z. Chen (2017). "Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture." Physiology (Bethesda) **32**(4): 266-277.

El-Gendi, S. and G. Abu-Sheasha (2018). "Ki-67 and Cell Cycle Regulators p53, p63 and cyclinD1 as Prognostic Markers for Recurrence/ Progression of Bladder Urothelial Carcinoma." Pathol Oncol Res **24**(2): 309-322.

Ferguson, A. R. (1911). "Associated bilharziosis and primary malignant disease of the urinary bladder, with observations on a series of forty cases." The Journal of Pathology and Bacteriology **16**(1): 76-94.

GEKID, R. u. (2021). Krebs in Deutschland für 2017/2018 Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.). **13. Ausgabe.**

Goebell, P. J., S. G. Groshen and B. J. Schmitz-Dräger (2010). "p53 immunohistochemistry in bladder cancer—a new approach to an old question." Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations **28**(4): 377-388.

Gouda, I., N. Mokhtar, D. Bilal, T. El-Bolkainy and N. M. El-Bolkainy (2007). "Bilharziasis and bladder cancer: a time trend analysis of 9843 patients." J Egypt Natl Canc Inst **19**(2): 158-162.

Guancial, E. A., L. Werner, J. Bellmunt, A. Bamias, T. K. Choueiri, R. Ross, F. A. Schutz, R. S. Park, R. J. O'Brien, M. S. Hirsch, J. A. Barletta, D. M. Berman, R. Lis, M. Loda, E. C. Stack, L. A. Garraway, M. Riester, F. Michor, P. W. Kantoff and J. E. Rosenberg (2014). "FGFR3 expression in primary and metastatic urothelial carcinoma of the bladder." Cancer Med **3**(4): 835-844.

Gupta, S., G. Sonpavde, C. J. Weight, B. A. McGregor, S. Gupta, B. L. Maughan, X. X. Wei, E. Gibb, B. Thyagarajan, D. J. Einstein, C. B. Dechet, W. T. Lowrance, P. J. Murugan, K. L. Kilbridge, N. Agarwal, E. Davicioni, M. Eckstein, M. Mossanen, M. A. Preston and B. R. Konety (2020). "Results from BLASST-1 (Bladder Cancer Signal Seeking Trial) of nivolumab, gemcitabine, and cisplatin in muscle invasive bladder cancer (MIBC) undergoing cystectomy." Journal of Clinical Oncology **38**(6_suppl): 439-439.

Hammam, O., M. Wishahiz, H. Khalil, H. El Ganzouri, M. Badawy, A. Elkhquly and K. Elesaily (2014). "Expression of cytokeratin 7, 20, 14 in urothelial

carcinoma and squamous cell carcinoma of the Egyptian urinary bladder cancer." J Egypt Soc Parasitol **44**(3): 733-740.

Harnden, P., A. Allam, A. D. Joyce, A. Patel, P. Selby and J. Southgate (1995). "Cytokeratin 20 expression by non-invasive transitional cell carcinomas: potential for distinguishing recurrent from non-recurrent disease." Histopathology **27**(2): 169-174.

Herr, H. W. and P. C. Sogani (2001). "DOES EARLY CYSTECTOMY IMPROVE THE SURVIVAL OF PATIENTS WITH HIGH RISK SUPERFICIAL BLADDER TUMORS?" The Journal of Urology **166**(4): 1296-1299.

Higgins, J. P., G. Kaygusuz, L. Wang, K. Montgomery, V. Mason, S. X. Zhu, R. J. Marinelli, J. C. Presti, Jr., M. van de Rijn and J. D. Brooks (2007). "Placental S100 (S100P) and GATA3: markers for transitional epithelium and urothelial carcinoma discovered by complementary DNA microarray." Am J Surg Pathol **31**(5): 673-680.

Hu, Y., Y. Zhang, J. Gao, X. Lian and Y. Wang (2020). "The clinicopathological and prognostic value of CD44 expression in bladder cancer: a study based on meta-analysis and TCGA data." Bioengineered **11**(1): 572-581.

Kleinman, H. K., M. L. McGarvey, J. R. Hassell, V. L. Star, F. B. Cannon, G. W. Laurie and G. R. Martin (1986). "Basement membrane complexes with biological activity." Biochemistry **25**(2): 312-318.

Lamont, F. R., D. C. Tomlinson, P. A. Cooper, S. D. Shnyder, J. D. Chester and M. A. Knowles (2011). "Small molecule FGF receptor inhibitors block FGFR-dependent urothelial carcinoma growth in vitro and in vivo." British Journal of Cancer **104**(1): 75-82.

Lancaster, M. A. and J. A. Knoblich (2014). "Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies." Science **345**(6194): 1247125.

Lee, H. J., S. Mun, D. M. Pham and P. Kim (2021). "Extracellular Matrix-Based Hydrogels to Tailoring Tumor Organoids." ACS Biomaterials Science & Engineering **7**(9): 4128-4135.

Lee, S. H., W. Hu, J. T. Matulay, M. V. Silva, T. B. Owczarek, K. Kim, C. W. Chua, L. J. Barlow, C. Kandoth, A. B. Williams, S. K. Bergren, E. J. Pietzak, C. B. Anderson, M. C. Benson, J. A. Coleman, B. S. Taylor, C. Abate-Shen, J. M. McKiernan, H. Al-Ahmadie, D. B. Solit and M. M. Shen (2018). "Tumor Evolution and Drug Response in Patient-Derived Organoid Models of Bladder Cancer." Cell **173**(2): 515-528.e517.

Leitlinienprogramm Onkologie Deutsche Krebsgesellschaft, D. K., AWMF. (2020). "S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms." Langversion 2.0; AWMF-Registrierungsnummer 032/038OL

<https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/harnblasenkarzinom/> (aufgerufen am 05.09.2022).

Llopis, J., A. Alcaraz, M. J. Ribal, M. Solé, P. J. Ventura, M. A. Barranco, A. Rodriguez, J. M. Corral and P. Carretero (2000). "p53 expression predicts progression and poor survival in T1 bladder tumours." Eur Urol **37**(6): 644-653.

Malmström, P.-U., R. J. Sylvester, D. E. Crawford, M. Friedrich, S. Kroke, E. Rintala, E. Solsona, S. M. Di Stasi and J. A. Witjes (2009). "An Individual Patient Data Meta-Analysis of the Long-Term Outcome of Randomised Studies Comparing Intravesical Mitomycin C versus Bacillus Calmette-Guérin for Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer." European Urology **56**(2): 247-256.

Mariappan, P., S. M. Finney, E. Head, B. K. Somani, A. Zachou, G. Smith, S. F. Mishriki, J. N'Dow, K. M. Grigor and f. m. o. t. E. U. C. Group (2012). "Good quality white-light transurethral resection of bladder tumours (GQ-WLTURBT) with experienced surgeons performing complete resections and obtaining detrusor muscle reduces early recurrence in new non-muscle-invasive bladder cancer: validation across time and place and recommendation for benchmarking." BJU International **109**(11): 1666-1673.

Mullenders, J., E. de Jongh, A. Brousalı, M. Roosen, J. P. A. Blom, H. Begthel, J. Korving, T. Jonges, O. Kranenburg, R. Meijer and H. C. Clevers (2019). "Mouse and human urothelial cancer organoids: A tool for bladder cancer research." Proc Natl Acad Sci U S A **116**(10): 4567-4574.

Neal, J. T., X. Li, J. Zhu, V. Giangarra, C. L. Grzeskowiak, J. Ju, I. H. Liu, S.-H. Chiou, A. A. Salahudeen and A. R. Smith (2018). "Organoid modeling of the tumor immune microenvironment." Cell **175**(7): 1972-1988. e1916.

Ozyalvaçlı, G., M. E. Ozyalvacli and C. Yeşil (2015). "P53 May Still a Reliable Marker in Determining the Prognosis of Non- Muscle Urothelial Carcinomas." Acta Medica Anatolia **3**: 10-16.

Park, B.-J., S.-J. Lee, J. I. Kim, S.-J. Lee, C.-H. Lee, S.-G. Chang, J.-H. Park and S.-G. Chi (2000). "Frequent Alteration of p63 Expression in Human Primary Bladder Carcinomas." Cancer Research **60**(13): 3370-3374.

Pauli, C., B. D. Hopkins, D. Prandi, R. Shaw, T. Fedrizzi, A. Sboner, V. Sailer, M. Augello, L. Puca, R. Rosati, T. J. McNary, Y. Churakova, C. Cheung, J. Triscott, D. Pisapia, R. Rao, J. M. Mosquera, B. Robinson, B. M. Faltas, B. E. Emerling, V. K. Gadi, B. Bernard, O. Elemento, H. Beltran, F. Demichelis, C. J. Kemp, C.

Grandori, L. C. Cantley and M. A. Rubin (2017). "Personalized In Vitro and In Vivo Cancer Models to Guide Precision Medicine." Cancer Discov **7**(5): 462-477.

Pineda, E. T., R. M. Nerem and T. Ahsan (2013). "Differentiation Patterns of Embryonic Stem Cells in Two- versus Three-Dimensional Culture." Cells Tissues Organs **197**(5): 399-410.

Raitanen, M.-P., R. Aine, E. Rintala, J. Kallio, P. Rajala, H. Juusela and T. L. J. Tammela (2002). "Differences Between Local and Review Urinary Cytology in Diagnosis of Bladder Cancer. An Interobserver Multicenter Analysis." European Urology **41**(3): 284-289.

Rigby, C. C. and L. M. Franks (1970). "A Human Tissue Culture Cell Line from a Transitional Cell Tumour of the Urinary Bladder: Growth, Chromosome Pattern and Ultrastructure." British Journal of Cancer **24**(4): 746-754.

Rosenberg, J. E., K. W. Mouw and J. Bellmunt. (2023). "Adjuvant therapy for muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder." https://www.uptodate.com/contents/adjuvant-therapy-for-muscle-invasive-urothelial-carcinoma-of-the-bladder?topicRef=2991&source=see_link#H3855827241 (aufgerufen am 07.08.2023).

Saginala, K., A. Barsouk, J. S. Aluru, P. Rawla, S. A. Padala and A. Barsouk (2020). "Epidemiology of Bladder Cancer." Med Sci (Basel) **8**(1).

Sjödahl, G., M. Lauss, K. Lövgren, G. Chebil, S. Gudjonsson, S. Veerla, O. Patschan, M. Aine, M. Fernö, M. Ringnér, W. Månsson, F. Liedberg, D. Lindgren and M. Höglund (2012). "A molecular taxonomy for urothelial carcinoma." Clin Cancer Res **18**(12): 3377-3386.

Sjödahl, G., K. Lövgren, M. Lauss, O. Patschan, S. Gudjonsson, G. Chebil, M. Aine, P. Eriksson, W. Månsson, D. Lindgren, M. Fernö, F. Liedberg and M. Höglund (2013). "Toward a molecular pathologic classification of urothelial carcinoma." Am J Pathol **183**(3): 681-691.

Southgate, J., P. Harnden and L. K. Trejdosiewicz (1999). "Cytokeratin expression patterns in normal and malignant urothelium: a review of the biological and diagnostic implications." Histol Histopathol **14**(2): 657-664.

Sylvester, R. J., A. P. M. van der Meijden, W. Oosterlinck, J. A. Witjes, C. Bouffoux, L. Denis, D. W. W. Newling and K. Kurth (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." European Urology **49**(3): 466-477.

Tomlinson, D., O. Baldo, P. Harnden and M. Knowles (2007). "FGFR3 protein expression and its relationship to mutation status and prognostic variables in bladder cancer." The Journal of Pathology **213**(1): 91-98.

Tran, L., J. F. Xiao, N. Agarwal, J. E. Duex and D. Theodorescu (2021). "Advances in bladder cancer biology and therapy." Nat Rev Cancer **21**(2): 104-121.

Trinh, T. W., D. I. Glazer, C. A. Sadow, V. A. Sahni, N. L. Geller and S. G. Silverman (2018). "Bladder cancer diagnosis with CT urography: test characteristics and reasons for false-positive and false-negative results." Abdom Radiol (NY) **43**(3): 663-671.

Tse, R. T., H. Zhao, C. Y. Wong, P. K. Chiu, J. Y. Teoh and C. F. Ng (2022). "Current status of organoid culture in urological malignancy." Int J Urol **29**(2): 102-113.

van Rhijn, B. W., T. H. van der Kwast, A. N. Vis, W. J. Kirkels, E. R. Boevé, A. C. Jöbsis and E. C. Zwarthoff (2004). "FGFR3 and P53 characterize alternative genetic pathways in the pathogenesis of urothelial cell carcinoma." Cancer Res **64**(6): 1911-1914.

Wang, C., S. Yang, L. Jin, G. Dai, Q. Yao, H. Xiang, Y. Zhang, X. Liu and B. Xue (2020). "Biological and Clinical Significance of GATA3 Detected from TCGA Database and FFPE Sample in Bladder Cancer Patients." Onco Targets Ther **13**: 945-958.

WHO. (2019). "Global Health Estimates: Leading causes of DALYs 2000-2019." <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/global-health-estimates-leading-causes-of-dalys> (aufgerufen am 23.08.2022).

WHO. (2019). "Global Health Estimates: Leading causes of death 2000-2019." <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death> (aufgerufen am 23.08.2022).

Yafi, F. A., F. Brimo, J. Steinberg, A. G. Aprikian, S. Tanguay and W. Kassouf (2015). "Prospective analysis of sensitivity and specificity of urinary cytology and other urinary biomarkers for bladder cancer." Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations **33**(2): 66.e25-66.e31.

Zaghloul, M. S. (2012). "Bladder cancer and schistosomiasis." J Egypt Natl Canc Inst **24**(4): 151-159.

Zuiverloon, T. C. M., F. C. de Jong, J. C. Costello and D. Theodorescu (2018).
"Systematic Review: Characteristics and Preclinical Uses of Bladder
Cancer Cell Lines." Bladder Cancer **4**: 169-183.

8 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde am Zentrum für Medizinische Forschung und in der Klinik für Urologie unter Betreuung von Prof. Dr. med. Arnulf Stenzl durchgeführt. Sie ist Teil der Arbeiten des GRK2543 und wurde zum Teil durch ein DFG Stipendium gefördert.

Die Konzeption meiner Doktorarbeit erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Wilhelm Aicher (Laborleitung ZMF) und dem Clinician Scientist des GRK, Dr. med. Niklas Harland (Oberarzt, Urologie UKT).

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Christine Mayer von mir eigenständig und in Zusammenarbeit mit Nizar Lipke durchgeführt. Die H/E- und Immunhistochemischen Färbungen wurden von Fachpersonal des Routinelabors am Instiut für Pathologie angefertigt. Die Auswertung der Färbungen erfolgte durch mich nach Anleitung durch Frau Ivonne A. Montes-Mojarro, Institut für Pathologie UKT.

Abbildung 17 wurde freundlicherweise von Nizar Lipke zur Verfügung gestellt.

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

Tübingen, den

9 Veröffentlichungen

Ggf.: Simon Walz, Paul Pollehne, Ruizhi Geng, Johannes Schneider, Moritz Maas, Wilhelm K. Aicher, Arnulf Stenzl, Bastian Amend and Niklas Harland (2023). „*A protocol for organoids from the urine of human bladder cancer patients.*“ (Paper noch im Review Prozess, Stand 14.08.2023)

10 Danksagung

Mein Dank gilt insbesondere der Deutschen Forschungsgemeinschaft, deren Förderung in Form eines Promotionsstipendiums maßgeblich dazu beigetragen haben, dass diese Arbeit so durchgeführt werden konnte.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Mitarbeitenden des ZMF Tübingen, der OP-Abteilung der urologischen Klinik am UKT und des Pathologischen Instituts für die großartige Unterstützung von der Probengewinnung bis hin zur Durchführung der Experimente. Insbesondere zu erwähnen sind dabei Christine Meyer, Tanja Abruzzese, Cornelia Bock und Jasmin Knoll, die mir immer mit Rat und Tat in jeglicher Angelegenheit zur Seite standen. Hierbei gilt mein Dank auch allen Patient*innen, die durch ihre Gewebespende diese Experimente überhaupt erst möglich gemacht haben.

Ich danke Prof. Arnulf Stenzl für seine Betreuung dieser Doktorarbeit. Zudem möchte ich mich herzlich bei Prof. Wilhelm Aicher, Dr. Niklas Harland und Dr. Aleksander Kielbik bedanken, dass sie mit ihrem organisatorischen Geschick und fachlicher Kenntnis immer als persönliche Ansprechpartner zur Verfügung standen.

Vor allem möchte ich mich bedanken bei meinen Kollegen und Freunden Nizar Lipke und Paul Pollehne, durch deren Anwesenheit die Arbeit im Labor an heißen wie an kalten Tagen immer angenehm leicht von der Hand ging.

Abschließend danke ich allen, die mich auf dem Weg durch diese Arbeit begleitet haben, dabei insbesondere bei meinen Eltern, die mir mit ihrer großartigen Unterstützung das Medizinstudium ermöglicht haben.