

Aus der
Universitätsklinik für Urologie

**Expression von Nectin-4 und Trop-2
in Blasentumororganoiden**

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

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

vorgelegt von

Rödiger, Nina Dorothee

2026

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Stenzl

2. Berichterstatter: Professor Dr. A. D. Hartkopf

Tag der Disputation: 08.08.2024

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	1
Abkürzungsverzeichnis.....	4
1 Einleitung	6
1.1 Physiologie der Harnblase	6
1.2 Harnblasenkarzinom	7
1.2.1 Epidemiologie, Ätiologie und Prognose	7
1.2.2 Symptome und Diagnostik	7
1.2.3 Klassifikationen	8
1.2.3.1 WHO - Klassifikationen.....	8
1.2.3.2 TNM-Klassifikation.....	11
1.2.3.3 Weitere Klassifikationen	12
1.2.4 Therapie	12
1.2.4.1 TUR-B.....	13
1.2.4.2 Chemotherapie.....	13
1.2.4.3 BCG-Instillation	13
1.2.4.4 Zystektomie	14
1.2.4.5 Weitere Therapieansätze	14
1.3 Nectin-4.....	14
1.3.1 Nectin-4 und Urothelkarzinom	15
1.3.2 Nectin-4 und Enfortumab-Vedotin.....	15
1.4 Trop-2.....	16
1.4.1 Trop-2 und Urothelkarzinom	16
1.4.2 Trop-2 und Sacituzumab-Govitecan.....	16
1.5 Tumormodelle für Diagnostik, Therapie und Etablierung.....	17
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	19
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Material.....	20
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmittel.....	20
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	22
2.1.3 Medien und Lösungen	25
2.1.4 Antikörper für Immunfärbungen.....	28
2.1.5 Primer für qRT-PCR.....	28
2.1.6 Zelllinien	29

2.1.7	Blasentumororganoide und Primärtumore.....	29
2.2	Methoden.....	31
2.2.1	Probengewinnung.....	31
2.2.2	2D-Kultivierung.....	31
2.2.2.1	Auftauen der Zellen von Tumorzelllinien für 2D-Kultur.....	31
2.2.2.2	Passagieren von Tumorzelllinien in 2D-Kultur.....	31
2.2.2.3	Passagieren von HBLAKs in 2D-Kultur.....	32
2.2.3	3D-Kultivierung.....	32
2.2.3.1	Aufbereitung der Tumorgewebeprobe zur 3D-Kultivierung.....	32
2.2.3.2	Überführung der 2D-Kulturen in 3D-Kultur.....	34
2.2.3.3	Passagieren von Tumorproben in 3D-Kultur.....	34
2.2.4	Methoden mit Paraffinschnitten.....	35
2.2.4.1	Zellen und Organoide für Paraffinschnitte fixieren.....	35
2.2.4.2	Zellen und Organoide in Histogel einbetten.....	36
2.2.4.3	Paraffineinbettung.....	37
2.2.4.4	Paraffinschnitte anfertigen.....	37
2.2.4.5	Immunhistochemiefärbungen an Paraffinschnitten.....	37
2.2.4.6	Immunfluoreszenzfärbungen an Paraffinschnitten.....	39
2.2.5	Methoden mit RNA-Extrakten.....	39
2.2.5.1	Auflösen von BME zur RNA-Extraktion.....	39
2.2.5.2	RNA-Extraktion.....	40
2.2.5.3	Umschreiben von RNA in cDNA.....	41
2.2.5.4	Primer-Mix herstellen.....	42
2.2.5.5	qRT-PCR.....	42
2.2.5.6	Bestimmung von Primer-Effizienzen.....	43
2.2.5.7	Gelelektrophorese.....	44
3	Ergebnisse.....	45
3.1	Vorarbeiten zur Etablierung der Methode 1 (qRT-PCR).....	45
3.2	qRT-PCR an Tumorzelllinien u. Kultivierung geeigneter Zelllinien.....	47
3.3	Vorarbeiten zur Etablierung der Methode 2 (IFL).....	51
3.3.1	Immunhistochemiefärbungen an Zelllinien.....	51
3.3.2	Immunfluoreszenzfärbungen an Zelllinien.....	55
3.4	Nachweis der Nectin-4- u. Trop-2-Expression in BCOs und Originaltumoren mittels Immunfluoreszenzfärbung.....	59
3.4.1	Patientenprobe 1: BCO #140 P2 vs. BCO #140 P10 vs. BCO #140 P2360	

3.4.2	Patientenprobe 2: BCO #154 P1 vs. BCO #154 P8 vs. BCO #154 P21..	65
3.4.3	Patientenprobe 3: BCO #267 P10	70
3.4.4	Patientenprobe 4: BCO #270 P9.....	75
3.4.5	Patientenprobe 5: BCO #287 P14	79
3.4.6	Patientenprobe 6: BCO #297 P5.....	83
3.4.7	Patientenprobe 7: BCO #300 P5.....	87
3.5	Nachweis der Nectin-4- u. Trop-2-Expression in den BCOs mittels qRT-PCR 91	
3.6	Übersicht der Ergebnisse	93
4	Diskussion	95
5	Zusammenfassung.....	102
6	Literaturverzeichnis	104
7	Erklärung zum Eigenanteil	113
8	Kongressbeitrag.....	114

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Grading nach WHO 1973 vs. WHO 2004/2022 (Sylvester et al., 2021)	9
Abbildung 2: WHO-Klassifikation d. Tumore des urothelialen Traktes (Humphrey et al., 2016) 10	
Abbildung 3: Schmelzkurve des nicht-funktionierenden Nectin-4-Primers	45
Abbildung 4: Schmelzkurve des verwendeten Nectin-4-Primers	46
Abbildung 5: Schmelzkurve des verwendeten Trop-2-Primers	46
Abbildung 6: Gelelektrophorese mit 100 bp DNA Ladder zum Vergleich	47
Abbildung 7: Expression von Nectin-4 und Trop-2 in Tumorzelllinien anhand einer qRT-PCR .	48
Abbildung 8: RT4 in 2D-Kultur am 4. Tag	49
Abbildung 9: UM-UC-6 in 2D-Kultur am 4. Tag	49
Abbildung 10: HBLAK in 2D-Kultur am 7. Tag	49
Abbildung 11: RT4 in 3D-Kultur am 4. Tag	50
Abbildung 12: RT4 in 3D-Kultur am 7. Tag	50
Abbildung 13: UM-UC-6 in 3D-Kultur am 5. Tag	50
Abbildung 14: UM-UC 6 in 3D-Kultur am 7. Tag	50
Abbildung 15: HBLAK in 3D-Kultur am 4. Tag	50
Abbildung 16: HBLAK in 3D-Kultur am 7. Tag	50
Abbildung 17: IHC mit Anti-Nectin-4-AK in 2D-Kultur von RT4	52
Abbildung 18: IHC mit Anti-Nectin-4-AK in 3D-Kultur von RT4	52
Abbildung 19: IHC mit Anti-Trop-2-AK in 2D-Kultur von RT4	52
Abbildung 20: IHC mit Anti-Trop-2-AK in 3D-Kultur von RT4	52
Abbildung 21: Negativkontrolle der IHC in 2D-Kultur von RT4	52
Abbildung 22: Negativkontrolle der IHC in 3D-Kultur von RT4	52
Abbildung 23: IHC mit Anti-Nectin-4-AK in 2D-Kultur von UM-UC-6	53
Abbildung 24: IHC mit Anti-Nectin-4-AK in 3D-Kultur von UM-UC-6	53
Abbildung 25: IHC mit Anti-Trop-2-AK in 2D-Kultur von UM-UC-6	53
Abbildung 26: IHC mit Anti-Trop-2-AK in 3D-Kultur von UM-UC-6	53
Abbildung 27: Negativkontrolle der IHC in 2D-Kultur von UM-UC-6	53
Abbildung 28: Negativkontrolle der IHC in 3D-Kultur von UM-UC-6	53
Abbildung 29: IHC mit Anti-Nectin-4-AK in 2D-Kultur von HBLAK	54
Abbildung 30: IHC mit Anti-Nectin-4-AK in 3D-Kultur von HBLAK	54
Abbildung 31: IHC mit Anti-Trop-2-AK in 2D-Kultur von HBLAK	54
Abbildung 32: IHC mit Anti-Trop-2-AK in 3D-Kultur von HBLAK	54
Abbildung 33: Negativkontrolle der IHC in 2D-Kultur von HBLAK	54
Abbildung 34: Negativkontrolle der IHC in 3D-Kultur von HBLAK	54
Abbildung 35: IFL mit Anti-Nectin-4-AK in 2D-Kultur von RT4	56
Abbildung 36: IFL mit Anti-Nectin-4-AK in 3D-Kultur von RT4	56
Abbildung 37: IFL mit Anti-Trop-2-AK in 2D-Kultur von RT4	56
Abbildung 38: IFL mit Anti-Trop-2-AK in 3D-Kultur von RT4	56
Abbildung 39: Negativkontrolle der IFL in 2D-Kultur von RT4	56
Abbildung 40: Negativkontrolle der IFL in 3D-Kultur von RT4	56
Abbildung 41: IFL mit Anti-Nectin-4-AK in 2D-Kultur von UM-UC-6	57
Abbildung 42: IFL mit Anti-Nectin-4-AK in 3D-Kultur von UM-UC-6	57
Abbildung 43: IFL mit Anti-Trop-2-AK in 2D-Kultur von UM-UC-6	57
Abbildung 44: IFL mit Anti-Trop-2-AK in 3D-Kultur von UM-UC-6	57
Abbildung 45: Negativkontrolle der IFL in 2D-Kultur von UM-UC-6	57
Abbildung 46: Negativkontrolle der IFL in 3D-Kultur von UM-UC-6	57
Abbildung 47: IFL mit Anti-Nectin-4-AK in 2D-Kultur von HBLAK	58
Abbildung 48: IFL mit Anti-Nectin-4-AK in 3D-Kultur von HBLAK	58
Abbildung 49: IFL mit Anti-Trop-2-AK in 2D-Kultur von HBLAK	58
Abbildung 50: IFL mit Anti-Trop-2-AK in 3D-Kultur von HBLAK	58
Abbildung 51: Negativkontrolle der IFL in 2D-Kultur von HBLAK	58

Abbildung 52: Negativkontrolle der IFL in 3D-Kultur von HBLAK	58
Abbildung 53: HE-Färbung des low grade NMIBC von Probe 1 mit 2,5x-Vergrößerung	60
Abbildung 54: HE-Färbung des low grade NMIBC von Probe 1 mit 10x-Vergrößerung	60
Abbildung 55: HE-Färbung des low grade NMIBC von Probe 1 mit 40x-Vergrößerung	60
Abbildung 56: HE-Färbung des high grade NMIBC von Probe 1 mit 2,5x-Vergrößerung	61
Abbildung 57: HE-Färbung des high grade NMIBC von Probe 1 mit 10x-Vergrößerung	61
Abbildung 58: HE-Färbung des high grade NMIBC von Probe 1 mit 40x-Vergrößerung	61
Abbildung 59: BCOs von Probe 1 während der Kultivierung in der 7. Passage an Tag 13	62
Abbildung 60: HE-Färbung des high grade MIBC von Probe 2 mit 2,5x-Vergrößerung	65
Abbildung 61: HE-Färbung des high grade MIBC von Probe 2 mit 10x-Vergrößerung	65
Abbildung 62: HE-Färbung des high grade MIBC von Probe 2 mit 40x-Vergrößerung	65
Abbildung 63: HE-Färbung des kleinzelligen MIBC von Probe 2 mit 2,5x-Vergrößerung	66
Abbildung 64: HE-Färbung des kleinzelligen MIBC von Probe 2 mit 10x-Vergrößerung	66
Abbildung 65: HE-Färbung des kleinzelligen MIBC von Probe 2 mit 40x-Vergrößerung	66
Abbildung 66: BCOs von Probe 2 während der Kultivierung in der 7. Passage an Tag 13	67
Abbildung 67: HE-Färbung des low grade NMIBC von Probe 3 mit 2,5x-Vergrößerung	70
Abbildung 68: HE-Färbung des low grade NMIBC von Probe 3 mit 10x-Vergrößerung	70
Abbildung 69: HE-Färbung des low grade NMIBC von Probe 3 mit 40x-Vergrößerung	70
Abbildung 70: HE-Färbung des high grade NMIBC von Probe 3 mit 2,5x-Vergrößerung	71
Abbildung 71: HE-Färbung des high grade NMIBC von Probe 3 mit 10x-Vergrößerung	71
Abbildung 72: HE-Färbung des high grade NMIBC von Probe 3 mit 40x-Vergrößerung	71
Abbildung 73: BCOs von Probe 3 während der Kultivierung in der 12. Passage an Tag 10	72
Abbildung 74: HE-Färbung des high grade MIBC von Probe 4 mit 2,5x-Vergrößerung	75
Abbildung 75: HE-Färbung des high grade MIBC von Probe 4 mit 10x-Vergrößerung	75
Abbildung 76: HE-Färbung des high grade MIBC von Probe 4 mit 40x-Vergrößerung	75
Abbildung 77: BCOs von Probe 4 während der Kultivierung in der 28. Passage an Tag 10	76
Abbildung 78: HE-Färbung des high grade NMIBC von Probe 5 mit 2,5x-Vergrößerung	79
Abbildung 79: HE-Färbung des high grade NMIBC von Probe 5 mit 10x-Vergrößerung	79
Abbildung 80: HE-Färbung des high grade NMIBC von Probe 5 mit 40x-Vergrößerung	79
Abbildung 81: BCOs von Probe 5 während der Kultivierung in der 29. Passage an Tag 6	80
Abbildung 82: HE-Färbung des low grade NMIBC von Probe 6 mit 2,5x-Vergrößerung	83
Abbildung 83: HE-Färbung des low grade NMIBC von Probe 6 mit 10x-Vergrößerung	83
Abbildung 84: HE-Färbung des low grade NMIBC von Probe 6 mit 40x-Vergrößerung	83
Abbildung 85: BCOs von Probe 6 während der Kultivierung in der 5. Passage an Tag 7	84
Abbildung 86: HE-Färbung des low grade NMIBC von Probe 7 mit 2,5x-Vergrößerung	87
Abbildung 87: HE-Färbung des low grade NMIBC von Probe 7 mit 10x-Vergrößerung	87
Abbildung 88: HE-Färbung des low grade NMIBC von Probe 7 mit 40x-Vergrößerung	87
Abbildung 89: BCOs von Probe 7 während der Kultivierung in der 11. Passage an Tag 11	88
Abbildung 90: Nectin-4-Gen-Expression der BCOs	91
Abbildung 91: Trop-2-Gen-Expression der BCOs	92
Abbildung 92: Vergleich der Nectin-4- und Trop-2-Gen-Expression der BCOs	92
Tabelle 1: TNM-Klassifikation - Harnblasenkarzinom (Leitlinienprogramm-Onkologie, 2020) ...	12
Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte und Verbrauchsmittel mit Herstellern	22
Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien mit Herstellern	25
Tabelle 4: Zusammensetzung der verwendeten Medien und Lösungen	27
Tabelle 5: Verwendete Antikörper für die Immunfärbungen und ihre Hersteller	28
Tabelle 6: Verwendete Primer für qRT-PCR und ihre Sequenzen	29
Tabelle 7: Verwendete Zelllinien und ihre Hersteller	29
Tabelle 8: Verwendete Blasentumororganoide und die vorliegenden Proben	30
Tabelle 9: Nectin-4-Expression in Originaltumor (Spalte 1 u. 2) und BCOs (Spalte 3-5) von Probe 1 mittels IFL	63

Tabelle 10: Trop-2-Expression in Originaltumor (Spalte 1 u. 2) und BCOs (Spalte 3-5) von Probe 1 mittels IFL	63
Tabelle 11: Negativkontrolle der IFL von Probe 1	64
Tabelle 12: Nectin-4-Expression in Originaltumor (Spalte 1 u. 2) und BCOs (Spalte 3-5) von Probe 2 mittels IFL	68
Tabelle 13: Trop-2-Expression in Originaltumor (Spalte 1 u. 2) und BCOs (Spalte 3-5) von Probe 2 mittels IFL	68
Tabelle 14: Negativkontrolle der IFL von Probe 2	69
Tabelle 15: Nectin-4-Expression in Originaltumor (Spalte 1 u. 2) und BCOs (Spalte 3) von Probe 3 mittels IFL	73
Tabelle 16: Trop-2-Expression in Originaltumor (Spalte 1 u. 2) und BCOs (Spalte 3) von Probe 3 mittels IFL	73
Tabelle 17: Negativkontrolle der IFL von Probe 3	74
Tabelle 18: Nectin-4-Expression in Originaltumor (Spalte 1) und BCOs (Spalte 2) von Probe 4 mittels IFL	77
Tabelle 19: Trop-2-Expression in Originaltumor (Spalte 1) und BCOs (Spalte 2) von Probe 4 mittels IFL	77
Tabelle 20: Negativkontrolle der IFL von Probe 4	78
Tabelle 21: Nectin-4-Expression im Originaltumor von Probe 5 mittels IFL	81
Tabelle 22: Trop-2-Expression im Originaltumor von Probe 5 mittels IFL	81
Tabelle 23: Negativkontrolle der IFL von Probe 5	82
Tabelle 24: Nectin-4-Expression in Originaltumor von Probe 6 mittels IFL	85
Tabelle 25: Trop-2-Expression in Originaltumor von Probe 6 mittels IFL	85
Tabelle 26: Negativkontrolle der IFL von Probe 6	85
Tabelle 27: Nectin-4-Expression in Originaltumor (Spalte 1) und BCOs (Spalte 2) von Probe 7 mittels IFL	89
Tabelle 28: Trop-2-Expression in Originaltumor (Spalte 1) und BCOs (Spalte 2) von Probe 7 mittels IFL	89
Tabelle 29: Negativkontrolle der IFL von Probe 7	90
Tabelle 30: Übersicht der Ergebnisse	93

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
ACTA	Actin assembly-inducing protein
AK	Antikörper
AT	Österreich
BCG	Bacille-Calmette-Guerin
BCO	Blasenkarzinom-Organoid
Bel.-Zeit.	Belichtungszeit
BME	Basement Membrane Extrakt
Bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bspw.	beispielsweise
BTM	Blasentumororganoidmedium nach AG Aicher
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHE	Schweiz
CIS	Carcinoma in situ
CnT-PR	Epithelial Proliferation Medium von Cell-n-Tec
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
csFCS	Charcoal-stripped Fötales Kälberserum
CT	Computertomografie
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Depec	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethyl-sufoxid
dNTP	desoxy-Nukleosid-Triphosphat
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EAU	European Association of Urology
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ESMO	Europäische Gesellschaft für Urology
ESP	Spanien
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
g	Erdschwerebeschleunigung
G	Grad der Tumordifferenzierung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBLAK	immortalisierte Zellen der menschlichen Blase
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCM	Hepatocyte Culture Media, BCO-Medium nach Lee et. al
HE	Hämatoxylin-Eosin

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl) - 1-piperazinyl) -ethansulfonsäure
HG	high grade
HRP	Horseradish-Peroxidase
IFL	Immunfluoreszenzfärbung
IHC	Immunhistochemiefärbung
JPN	Japan
kl. zell.	kleinzellig
LG	low grade
LVA	Lettland
m	Milli
M	Molare Masse in Gramm pro Mol
MEM	Modified Eagle Medium
MIBC	muskelinvasives Blasenkarzinom
mM	Millimol
MMAE	Monomethyl-Auristatin E
MRT	Magnetresonanztomographie
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NMIBC	nicht-muskelinvasives Blasenkarzinom
NTC	no template control
NTW	Non-Template Water
p bei TNM	pathologisches Stadium
P	Passage
PBS	Phosphate Buffered Saline
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PubMed	Public Medicine
qRT-PCR	Quantitative real-time polymerase chain reaction
RNA	Ribonukleinsäure
ROCK	Rho-Kinase
Rpm	Rounds per minute
RW1	RNA-Waschpuffer
S3	Leitlinie nach allen Elementen systematischer Entwicklung
shRNA	short hairpin RNA
smc	smooth muscle cells
SN-38	aktiver Metabolit des Zytostatikums Irinotecan
SNP	single nucleotide Polymorphismen
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Temp.	Temperatur
TMN	Tumor, nodes, metastasis
TRIS	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TROP-2	Trophoblast cell surface antigen
TUR-B	Transurethrale Resektion der Blase
UICC	Union for International Cancer Control
UK	Vereinigtes Königreich
USA	United States of America
WHO	World Health Organisation
xg	relative Zentrifugalkraft
Y	Rho-Kinase-Inhibitor Y-27632

1 Einleitung

1.1 Physiologie der Harnblase

Die Harnblase ist ein Hohlorgan, welches sich im kleinen Becken hinter dem Os pubis und vor dem Rectum bzw. bei Frauen vor der Vagina befindet. Der von den Nieren produzierte Harn wird über die Harnleiter in die Harnblase geführt und dort bis zur Miktion gespeichert. Nach kaudal mündet die Harnblase trichterförmig in die Harnröhre, über die der Harn ausgeschieden wird.

Der Wandaufbau der Harnblase wird von innen nach außen gegliedert in Mukosa, Muscularis und Adventitia. Besonders ist dabei das so genannte Urothel, welches die Harnblase von innen auskleidet und an die Bedingungen in der Harnblase angepasst ist. Es ist ein mehrschichtiges Epithel bestehend aus Basal-, Intermediär-, sowie Superfizialschicht und ermöglicht durch Variieren der Epithelhöhe und Zellform die Größenänderungen der Harnblase. Die oberflächlichen Deckzellen enthalten in ihrem Zytoplasma Vesikel mit Membranmaterial, welches sie bei Füllung der Harnblase in die apikale Zellmembran einfügen und im ungedehnten Zustand auch wieder endozytieren. Außerdem trennen die Deckzellen das unterliegende Gewebe von dem Harn mit Tight-junctions. Die apikale Membran muss dabei widerstandsfähig sein und enthält dafür spezielle Transmembranproteine, die Uroplakine.

Die Muscularis besteht aus dem Musculus detrusor vesicae mit drei unterschiedlich verlaufenden Schichten und die Adventitia verankert als eine bindegewebige Schicht die Harnblase in der Umgebung.

Die Blutversorgung der Harnblase erfolgt über Äste der Arteria bzw. Vena iliaca interna. Innerviert wird die Harnblase vom Sympathikus über den Nervus hypogastricus, welcher den Musculus detrusor entspannt und den inneren Schließmuskel aktiviert. Dem gegenüber steht die Innervation durch den Parasympathikus aus dem 2. bis 4. Segment im sakralen Abschnitt des Rückenmarks, welche durch die Kontraktion des Musculus detrusors, sowie der Entspannung des inneren Schließmuskels die Miktion einleitet. Der Nervus pudendus innerviert als Teil des willkürlichen Nervensystems den Musculus urethralis und ermöglicht eine bewusst gesteuerte Miktion.

1.2 Harnblasenkarzinom

1.2.1 Epidemiologie, Ätiologie und Prognose

Das Harnblasenkarzinom ist in Deutschland die viert häufigste Krebserkrankung bei Männern und die siebt häufigste bei Frauen (IARC, 2020). Dabei ist die Inzidenz seit 2000 schwankend, aber steigend (IARC, 2020). Die Mortalität ist seit 1970 bei Männern insgesamt unverändert und bei Frauen gestiegen. Auch weltweit ist das Harnblasenkarzinom unter den zehn häufigsten Karzinomen, wobei die meisten Fälle in Europa und Nordamerika auftreten (IARC, 2020).

Das Rauchen von Tabak ist der Hauptrisikofaktor für die Entstehung eines Harnblasenkarzinoms. Dabei steigt das Risiko mit der Dauer und der Anzahl der gerauchten Zigaretten (IARC, 2004). Dies gilt sowohl für aktuell Rauchende, als auch für ehemalige Raucher, sowie für alle Formen des Rauchens (Zigaretten, Zigarren, Pfeife etc.) (Al-Zalabani et al., 2016). Bei Patienten mit chronischer Harnblaseninfektion ist das Risiko eines Harnblasenkarzinoms erhöht, sowie nach einer Strahlentherapie im kleinen Becken. Studien zeigten, dass Diabetes mellitus ebenfalls mit einem gesteigerten Risiko assoziiert ist (Xu et al., 2013). Es gibt Berufsgruppen mit erhöhtem Harnblasenkarzinomrisiko, bei denen ein Blasentumor möglicherweise als Berufskrankheit eingestuft wird. Dazu zählen unter anderem die Maler und Lackierer, Friseure, Arbeiter der Gummiindustrie, Bergleute, Busfahrer (Reulen et al., 2008).

Prognostisch relevant ist die Lage des Tumors (Dutta et al., 2016), sowie die unterschiedlichen histologischen Subtypen mit jeweils unterschiedlichen Prognosen. Das kleinzellige Blasenkarzinom hat eine schlechtere Prognose als das urotheliale Blasenkarzinom (Celik et al., 2016). Negativ beeinflusst wird die Prognose außerdem durch infiltratives Wachstum, wodurch laut einer Studie die mittlere Überlebenszeit stark reduziert wird (Jimenez et al., 2000).

1.2.2 Symptome und Diagnostik

Die Symptome eines Blasentumors ähneln häufig denen einer Blasenentzündung. Dies kann die Diagnosestellung verzögern (Farling, 2017). Die meisten Patienten weisen eine schmerzlose Makrohämaturie auf. Eine ausgeprägte Hämaturie ist dabei mit einem fortgeschrittenem Krankheitsstadium assoziiert.

(Ramirez et al., 2016). Laut der S3-Leitlinien für Harnblasenkarzinome besteht der Verdacht auf einen Blasentumor außerdem bei einer Mikrohämaturie, positiver Urinzytologie oder unspezifischen Reizsymptomen (Leitlinienprogramm-Onkologie, 2020). In seltenen Fällen wird der Blasentumor durch Nierenversagen aufgrund von Obstruktionen symptomatisch (Griffiths and Cancer, 2013). Es gibt keine Marker für ein Screening, allerdings kann bei Hochrisikopatienten durch Urinuntersuchungen möglicherweise eine Malignität früher erkannt werden (Leitlinienprogramm-Onkologie, 2020).

Die Primärdiagnostik erfolgt im Allgemeinen mittels Sonografie und Weißlicht-Zystoskopie. Besteht eine positive Harnzytologie ohne Nachweis eines Carcinoma in situ der Harnblase, sollte eine Tumorsuche in den oberen Harnwegen erfolgen (Leitlinienprogramm-Onkologie, 2020). Eine photodynamische Zystoskopie ist im Vergleich zur Weißlicht-Zystoskopie effektiver in der Detektion von Blasentumoren (Mowatt et al., 2011). Sie sollte ergänzend eingesetzt werden bei multifokalen Tumoren, high-grade Tumoren in der Vorgeschichte oder Verdacht auf Carcinoma in situ. Bei zystoskopischem Verdacht auf ein Harnblasenkarzinom wird eine histologische Sicherung eingeleitet (Leitlinienprogramm-Onkologie, 2020).

Studien zeigten, dass für eine Tumorstadiendifferenzierung MRT-Aufnahmen geeignet sind und vor allem bei der Anwendung von diffusionsgewichteten Aufnahmen die Sensitivität und Spezifität gesteigert wird (Huang et al., 2018). Für die Überwachung von Lungen-, Leber- und Lymphknotenmetastasen ist eine kontrastverstärkte CT-Aufnahme indiziert. Zur Kontrolle von Knochenmetastasen kommt eine Knochenszintigraphie zum Einsatz (Heidenreich et al., 2010).

1.2.3 Klassifikationen

1.2.3.1 WHO - Klassifikationen

1973 entwickelte die Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation, WHO) ein System, um Blasentumore anhand histopathologischer Merkmale, wie Zelltypen, Nekrosen und Mitosen, in drei Grade (G) einzuteilen (Grading). Dabei waren G1-Tumore gut differenziert und zeigten wenige Atypien, während G3-Tumore kaum differenziert waren und viele pathologische Merkmale aufwiesen.

Anhand dieses Gradings sollten prognostische Aussagen über die Progression und Rezidive getroffen werden können (Mostofi et al., 1973).

2004 wurde dieses System überarbeitet und mehr histopathologische Merkmale berücksichtigt, um die Reproduzierbarkeit des Gradings zu steigern. G1-Tumore wurden dann als papillär-urotheliale Neoplasien mit geringen Malignitätsrisiko (PUNLMP) oder als niedriggradiges, papilläres Urothelkarzinom eingestuft. G2-Tumore wurden unterteilt in niedrig- und hochgradige Karzinome (LG/HG) und G3-Tumore waren die hochgradigen Urothelkarzinome. In Abbildung 1 sind diese beiden Varianten gegenübergestellt und die oben beschriebene, veränderte Grad-Einteilung graphisch veranschaulicht. 2016 wurde das Grading-System ohne einschneidende Veränderungen aktualisiert (Humphrey et al., 2016). Die S3-Leitlinie empfiehlt die Verwendung beider WHO-Klassifikationssysteme aus 1973 und 2004/2022, vor allem bei invasiv-wachsenden Tumoren (Leitlinienprogramm-Onkologie, 2020).

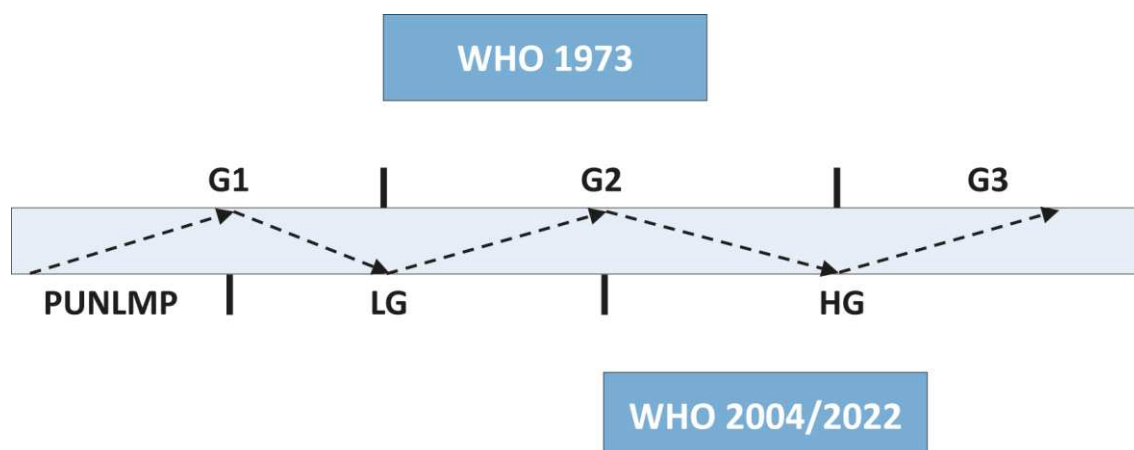


Abbildung 1: Grading nach WHO 1973 vs. WHO 2004/2022 (Sylvester et al., 2021)

1973 teilte die WHO Blasenkarzinome anhand histopathologischer Merkmale in drei Grade (G) 1-3 ein, während die 2004 und 2022 überarbeitete Einteilung jene in papillär-urotheliale Neoplasien mit geringen Malignitätsrisiko (PUNLMP), niedriggradige (LG) und hochgradige (HG) Karzinome einteilte. Die Überschneidungspunkte dieser Klassifikationen sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

Basierend auf den WHO-Klassifikationen und weiteren Risikofaktoren, wie Alter der Patienten und Anzahl bzw. Größe der Tumore, werden Risikogruppen unterteilt. Low-risk-Tumore sind erstmalige, einzelne Ta/G1-Tumore, die kleiner als 3

cm und kein CIS sind. Intermediate-risk-Tumore sind alle Karzinome zwischen der low- und der high-risk-Gruppe. High-risk-Tumore sind alle T1/G3-Tumore und alle CIS. Je mehr Risikofaktoren begleitend vorliegen, desto höher ist das Risiko und die entsprechende Gruppenzuteilung (Sylvester et al., 2021).

2016 veröffentlichte die WHO die vierte Edition der Klassifikation von urothelialen Tumoren anhand ihrer Morphologie und Genetik. Dabei wurden die Tumore basierend auf ihren unterschiedlichen Differenzierungen und genetischen Varianten unterschieden (Humphrey et al., 2016). Eine Auflistung jener Tumorsubtypen ist in Abbildung 2 zu sehen.

Urothelial tumours		Neuroendocrine tumours	
<i>Infiltrating urothelial carcinoma</i>	8120/3	Small cell neuroendocrine carcinoma	8041/3
Nested, including large nested		Large cell neuroendocrine carcinoma	8013/3
Microcystic		Well-differentiated neuroendocrine tumour	8240/3
Micropapillary	8131/3	Paraganglioma	8693/1
Lymphoepithelioma-like	8082/3		
Plasmacytoid / signet ring cell / diffuse		Melanocytic tumours	
Sarcomatoid	8122/3	Malignant melanoma	8720/3
Giant cell	8031/3	Naevus	8720/0
Poorly differentiated	8020/3	Melanosis	
Lipid-rich			
Clear cell		Mesenchymal tumours	
		Rhabdomyosarcoma	8900/3
<i>Non-invasive urothelial neoplasms</i>		Leiomyosarcoma	8890/3
Urothelial carcinoma in situ	8120/2	Angiosarcoma	9120/3
Non-invasive papillary urothelial carcinoma, low-grade	8130/2	Inflammatory myofibroblastic tumour	8825/1
Non-invasive papillary urothelial carcinoma, high-grade	8130/2	Perivascular epithelioid cell tumour	
Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential	8130/1	Benign	8714/0
Urothelial papilloma	8120/0	Malignant	8714/3
Inverted urothelial papilloma	8121/0	Solitary fibrous tumour	8815/1
Urothelial proliferation of uncertain malignant potential		Leiomyoma	8890/0
Urothelial dysplasia		Haemangioma	9120/0
		Granular cell tumour	9580/0
		Neurofibroma	9540/0
Squamous cell neoplasms		Urothelial tract haematopoietic and lymphoid tumours	
Pure squamous cell carcinoma	8070/3		
Verrucous carcinoma	8051/3	Miscellaneous tumours	
Squamous cell papilloma	8052/0	Carcinoma of Skene, Cowper, and Littre glands	8140/3
Glandular neoplasms		Metastatic tumours and tumours extending from other organs	
Adenocarcinoma, NOS	8140/3	Epithelial tumours of the upper urinary tract	
Enteric	8144/3	Tumours arising in a bladder diverticulum	
Mucinous	8480/3	Urothelial tumours of the urethra	
Mixed	8140/3		
Villous adenoma	8261/0		
Urachal carcinoma	8010/3		
Tumours of Müllerian type			
Clear cell carcinoma	8310/3		
Endometrioid carcinoma	8380/3		

The morphology codes are from the International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) [917A]. Behaviour is coded /0 for benign tumours; /1 for unspecified, borderline, or uncertain behaviour; /2 for carcinoma in situ and grade III intraepithelial neoplasia; and /3 for malignant tumours. The classification is modified from the previous WHO classification [756A], taking into account changes in our understanding of these lesions.

Abbildung 2: WHO-Klassifikation d. Tumore des urothelialen Traktes (Humphrey et al., 2016)

Die WHO klassifiziert urotheliale Tumoren anhand ihrer Morphologie und Genetik in die oben aufgelisteten Subtypen.

1.2.3.2 TNM-Klassifikation

Auch für das Staging von Blasen Tumoren entwickelte die Union for International Cancer Control (UICC) eine TNM-Klassifikation. Die aktuelle Version wurde 2016 veröffentlicht und ist die 8. Edition (Brierley et al., 2016). Die Bedeutung der einzelnen Stadien wird in der Tabelle 1 beschrieben.

Basierend auf der TNM-Klassifikation erfolgt die Unterteilung der Blasen Tumore in nicht-muskelinvasiv und muskelinvasiv, welche für die weitere Diagnostik und Therapie von Bedeutung ist. Dabei gelten alle Karzinome der Blase ab pT2 als muskelinvasiv (Leitlinienprogramm-Onkologie, 2020).

T	Primärtumor
TX	Primärtumor kann nicht bewertet werden
T0	Kein Nachweis von Primärtumor
Ta	Nicht-muskelinvasives papilläres Karzinom
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor dringt in subepitheliales Bindegewebe ein
T2	Tumor dringt in Muscularis propria ein
T2a	Tumor dringt in oberflächliche Muscularis propria ein (innere Hälfte)
T2b	Tumor dringt tief in Muscularis propria ein (äußere Hälfte)
T3	Tumor dringt in perivesikales Gewebe ein:
T3a	Mikroskopisch
T3b	Makroskopisch (Extravesikale Masse)
T4	Tumor dringt in eines der folgenden ein: Prostatastroma, Samenbläschen, Uterus, Vagina, Beckenwand
T4a	Tumor dringt ein in Prostatastroma, Samenbläschen, Uterus oder Vagina
T4b	Tumor dringt ein in Beckenwand oder Abdominalwand
N	Regionäre Lymphknoten
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht bewertet werden
N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen

N1	Metastase(n) in einem Lymphknoten des kleinen Beckens
N2	Metastase(n) in multiplen Lymphknoten des kleinen Beckens
N3	Metastase(n) der Lymphknoten an der Arteria iliaca communis

M Fernmetastasen

M0	Keine Fernmetastasen
M1a	Metastasen in nichtregionäre Lymphknoten
M1b	Andere Fernmetastasen

Tabelle 1: TNM-Klassifikation - Harnblasenkarzinom (Leitlinienprogramm-Onkologie, 2020)

Anhand der TNM-Klassifikation erfolgt das Staging von Blasentumoren, welches für die weitere Diagnostik und Therapie von Bedeutung ist. Die Bedeutungen der verwendeten Abkürzungen lassen sich der Tabelle 1 entnehmen.

1.2.3.3 Weitere Klassifikationen

Studien analysierten Blasenkarzinome auf Transkriptomebene und unterschieden darauf basierend Subtypen mit luminalen oder basalen Eigenschaften. Zu den luminalen Merkmalen gehörte unter anderem eine hohe Expression von Uroplakinen und Zellzyklusgenen. Bei den Tumoren des basalen Subtyps waren Gene der Histonmodifikation und Chromosomorganisation induziert, sowie Marker für undifferenzierte Zellen und Stamm- bzw. Basalzellmarker (CD44) hochreguliert (Hedegaard et al., 2016).

1.2.4 Therapie

Um den Therapieerfolg zu maximieren und eine Tumorprogression bzw. ein Rezidiv zu vermeiden, ist es wichtig, dass der Patient nicht raucht. Eine Aufklärung darüber sollte mit jedem Patienten geführt werden (Rink et al., 2012). Allgemein wird die Therapie des Harnblasenkarzinoms in einem multidisziplinären Tumorboard, bestehend aus Urologen, sowie Pathologen und Radiologen, besprochen und richtet sich vor allem nach dem Tumor-Staging und -Grading, sowie nach dem Befinden und Willen des Patienten (Kurpad et al., 2011).

1.2.4.1 TUR-B

Besteht der Verdacht auf ein Harnblasenkarzinom, wird eine transurethrale Resektion des Blasentumors (TUR-B) durchgeführt. Jene erfolgt mit einer monopolaren oder bipolaren Schlinge und wenn möglich ist eine vollständige Resektion anzustreben. Das Resektionsmaterial wird anschließend analysiert und der histopathologische Befund in die individuelle Therapieplanung einbezogen (Oswald et al., 2022, Leitlinienprogramm-Onkologie, 2020).

1.2.4.2 Chemotherapie

Im Anschluss an die TUR-B wird eine einmalige, intravesikale Chemotherapie innerhalb von 24 Stunden empfohlen, um zirkulierende Tumorzellen, sowie potenzielle Tumorreste zu zerstören. Verwendet wird dabei Mitomycin C, Epirubicin, Pirarubicin, Doxorubicin, Gemcitabin oder Thiotepa. Voraussetzung ist, dass eine ausgeprägte Blutung und Blasenperforation ausgeschlossen wurden (Leitlinienprogramm-Onkologie, 2020). Standard ist die Cisplatin-basierte Chemotherapie mit Gemcitabin und Carboplatin, welche allerdings kontraindiziert ist bei sehr eingeschränktem physischem Zustand, bei stark ausgeprägter Nieren- oder Herzinsuffizienz, sowie bei Vorliegen eines eingeschränkten Hörvermögens (Galsky et al., 2011). Ob im Anschluss weitere Chemotherapie erfolgen soll, ist abhängig von dem Risikostatus (Leitlinienprogramm-Onkologie, 2020).

1.2.4.3 BCG-Instillation

Erfolgte bei einem high-risk Tumor keine Zystektomie, ist eine BCG-Instillation bis zur Remission und anschließender Erhaltungstherapie für ein bis drei Jahre indiziert. Auf die gleiche Weise wird ein alleiniges Carcinoma in situ therapiert (Leitlinienprogramm-Onkologie, 2020). Eine BCG-Instillation verhindert besser als eine Chemotherapie das Wiederauftreten des Tumors, aber durch BCG entstehen mehr Nebenwirkungen, wie z.B. Zystitis, Hämaturie, Fieber oder Arthritis. Kontraindiziert ist eine BCG-Instillation in den ersten zwei Wochen nach der TUR-B, sowie bei sichtbarer Hämaturie oder symptomatischem Harnwegsinfekt (Malmström et al., 2009, Lamm et al., 2000, EAU, 2023).

1.2.4.4 Zystektomie

Die Entscheidung für eine Zystektomie sollte ausführlich mit dem Patienten besprochen und gemeinsam gefällt werden. Dabei müssen stets die Risiken, die Morbidität des Patienten und der Einfluss auf die Lebensqualität abgewogen werden. Eine radikale Zystektomie ist unter anderem für Patienten mit einem hohen Risiko einer Tumorprogression oder mit einem BCG-resistenten Tumor eine Option (Turker et al., 2012, Raj et al., 2007, EAU, 2023).

Standardmäßig wird die radikale Zystektomie vor allem bei muskel-invasiv wachsenden Harnblasentumoren in Erwägung gezogen. Im Rahmen der Operation werden auch angrenzende Organe, wie Uterus und Prostata, entfernt (Leitlinienprogramm-Onkologie, 2020).

1.2.4.5 Weitere Therapieansätze

Radiotherapie kann ebenfalls eine Option in der Therapieplanung sein. Allerdings ist die Datenlage bezüglich der Wirksamkeit nicht eindeutig und daher sollte ihr Einsatz individuell beurteilt werden (El-Monim et al., 2013, Iwata et al., 2019).

Pembrolizumab und Atezolizumab sind PD1-Inhibitoren, welche bereits in Phase II- und III-Studien vielversprechende Ergebnisse erzielten (Balar et al., 2017a, Balar et al., 2017b). Die Wirksamkeit der FGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren Erdafitinib und Infigratinib bei der Therapie von Blasenkarzinomen wird ebenfalls in Studien untersucht (Siefker-Radtke et al., 2022).

Des Weiteren wurden Antikörper-Wirkstoff-Konjugate entwickelt, von denen bereits zwei von der FDA genehmigt wurden: Enfortumab-Vedotin, ein Antikörper gegen Nectin-4 mit Monomethyl-Auristatin als Konjugat, sowie Sacituzumab-Govitecan, ein Antikörper gegen Trop-2 mit dem aktiven Metaboliten von Irinotecan als Konjugat. Deren Zielproteine wurden in dieser Arbeit untersucht, daher werden diese Medikamente in einem eigenen Kapitel kurz vorgestellt (Chang et al., 2021, Tagawa et al., 2021).

1.3 Nectin-4

Nectine sind Immunglobulin-ähnliche Zelladhäsionsmoleküle und arbeiten, anders als Cadherine, Calcium-unabhängig (Nakanishi and Takai, 2004). Sie

befinden sich beim Menschen transmembranär in Adhärenzverbindungen von Epithelien, Fibroblasten und Nervensynapsen (Samanta and Almo, 2015). Es gibt Nectin-1 bis -4, die von den Poliovirusrezeptor-verwandten Genen 1 bis 4 kodiert werden und daher auch bekannt sind als PVRL-1 bis -4. Bei Herpes- und Maserninfektionen sind Nectine bei dem Viruseintritt involviert. Während Nectin-1 bis -3 beim Erwachsenen physiologisch vorliegen, zeigten Untersuchungen, dass Nectin-4 nur in plazentarem und embryonalem Gewebe vorkommt. Allerdings wurde bei verschiedenen Tumorarten, inkl. Blasen Tumoren, eine erhöhte Nectin-4-Expression festgestellt (Challita-Eid et al., 2016).

1.3.1 Nectin-4 und Urothelkarzinom

Nectin-4 ist stark exprimiert in verschiedenen Histologien des Harnblasenkarzinoms, sowohl im Primärtumor, als auch in Metastasen (Ghali et al., 2022). Eine Überexpression von Nectin-4 ist assoziiert mit verschiedenen Aspekten der Tumorphorprogression, wie Proliferation, Angiogenese, Metastasierung und schlechter Prognose (Chatterjee et al., 2021).

Experimente mit Ovarialkarzinomzellen zeigten, dass jene Zellen mit Nectin-4 shRNA-Knockdown kleinere und lockere Zellverbände formten als unveränderte Tumorzellen. Daraus lässt sich schließen, dass Nectin-4 wichtig für die Formation von Sphäroiden ist (Boylan et al., 2020).

1.3.2 Nectin-4 und Enfortumab-Vedotin

Enfortumab-Vedotin ist das erste Antikörper-Wirkstoff-Konjugat, das Nectin-4 bindet. Es ist ein menschlicher, monoklonaler Anti-Nectin-4-Antikörper gebunden an Monomethyl-Auristatin E (MMAE) (Heath and Rosenberg, 2021). MMAE ist eine synthetische antineoplastische Substanz, die durch Blockierung der Tubulin-Polymerisation die Mitose hemmt. Aufgrund der Toxizität von MMAE kann es nicht ungebunden als Medikament eingesetzt werden (Hingorani et al., 2022). Außerdem zeigt Enfortumab-Vedotin einen Bystander-Effekt, indem das permeable MMAE von Nectin-4-positiven Zellen in benachbarte Nectin-4-negative Zellen gelangt (Liu et al., 2020). Demnach ist es essenziell für die Wirkung von Enfortumab-Vedotin, dass der Tumor Nectin-4 exprimiert. Je stärker Nectin-4

exprimiert wird, desto stärker ist die Wirkung von Enfortumab-Vedotin (Fan et al., 2022). Gleichzeitig führt eine Herunterregulierung der Nectin-4-Expression zu einer Enfortumab-Vedotin-Resistenz (Chu et al., 2021).

Die Nebenwirkungen waren meistens moderat und umfassten unter anderem maculopapilären Hautausschläge, Fatigue, Alopezie, Übelkeit und periphere Neuropathie (Rosenberg et al., 2019, Heath and Rosenberg, 2021).

2019 wurde Enfortumab-Vedotin von der Food and Drug Administration (FDA) zugelassen (Heath and Rosenberg, 2021). Im April 2022 wurde Enfortumab-Vedotin auch von der European Medicines Agency (EMA) für die Therapie von fortgeschrittenem oder metastasiertem Urothelkarzinom nach platinbasierter Chemotherapie oder Immuntherapie zugelassen. Das Medikament wird unter dem Namen Padcev vermarktet (EMA, 2022) und ist seit Juni 2022 in Deutschland erhältlich (Maucher, 2022).

1.4 Trop-2

Trop-2 ist das humane Trophoblast-Zelloberflächen-Antigen 2 und ist ein epitheliales Transmembranprotein (Fan et al., 2022). Es reguliert Zell-Zell-Adhäsion, Zellproliferation und -mobilität (D'Angelo et al., 2022). Trop-2 ist physiologisch stark exprimiert unter anderem in Geweben der Haut, der Prostata, der Nieren, sowie in der Brust und dem Uterus. Aber auch in einigen Tumoren, inklusive dem Blasenkarzinom, wurde eine erhöhte Trop-2-Expression detektiert (Stepan et al., 2011).

1.4.1 Trop-2 und Urothelkarzinom

Eine hohe Trop-2-Expression wurde in den größten Tumoren gefunden, korreliert mit vermehrter Metastasierung (Dum et al., 2022) und ist assoziiert mit aggressivem Wachstum und schlechter Prognose (D'Angelo et al., 2022).

1.4.2 Trop-2 und Sacituzumab-Govitecan

Sacituzumab-Govitecan ist ebenfalls ein Antikörper-Wirkstoff-Konjugat, bestehend aus einem monoklonalen Antikörper gegen Trop-2 und SN-38 als Wirkstoff. SN-38 ist der aktive Metabolit von dem Zytostatikum Irinotecan, der die nukleäre

Topoisomerase 1 inhibiert und dadurch Doppelstrangbrüche während der Mitose induziert (Alt et al., 2020). Folglich hätte SN-38 auch ohne Trop-2 oder den Antikörper eine Wirkung. Allerdings zeigten Studien, dass der Verlust von Trop-2 zu einem reduzierten Effekt durch Sacituzumab-Govitecan führte (D'Angelo et al., 2022). Das Anschlagen auf die Therapie mit Sacituzumab-Govitecan wurde des Weiteren beeinflusst durch das DNA-Reparatursystem mittels Homologe Rekombination in den Zielzellen, denn es konnte eine gesteigerte Wirkung beobachtet werden bei Tumoren mit insuffizienten DNA-Reparatursystem (Bilim et al., 2022). Als Nebenwirkungen aufgetreten sind Neutropenie, Leukopenie und Anämie, sowie Diarrhoe (D'Angelo et al., 2022).

Sacituzumab-Govitecan wurde von der FDA 2020 für Brusttumore und 2021 für Urothelkarzinome zugelassen (Vranic and Gatalica, 2022).

In Europa wurde das Medikament 2021 von der EMA für die Behandlung von lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem triple-negativen Mammakarzinom nach zwei vorherig versuchten systemischen Therapien zugelassen. Aktuell (November 2023) ist das Medikament in Europa für die Urologie allerdings nur im Rahmen von Studien einsetzbar und noch nicht von der EMA freigegeben für die Behandlung von Urothelkarzinomen. In den EAU- und NCCN-Leitlinien wird Sacituzumab-Govitecan bereits als Alternative bei Therapieversagen angegeben. In den S3- und ESMO-Leitlinien findet man noch keine Erwähnung von Sacituzumab-Govitecan (Krauter et al., 2023).

Es ist davon auszugehen, dass sich die Antikörper-Wirkstoff-Konjugate nicht gegenseitig in ihrer Wirksamkeit einschränken, da sie auf unterschiedliche Antigene abzielen und verschiedene Wirkstoffe transportieren (Chou et al., 2022).

Auch die Kombination von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten mit Immuncheckpoint-Inhibitoren sollte in Erwägung gezogen werden, da ihre Wirkung möglicherweise synergistisch ist (D'Angelo et al., 2022).

1.5 Tumormodelle für Diagnostik, Therapie und Etablierung

Tumormodelle sind wichtig, um die Vorgänge bei der Tumorprogression, Metastasierung und Rezidiventstehung zu analysieren (Tse et al., 2022), sowie um die Veränderungen, die ein Tumor während einer Therapie durchläuft, besser zu

verstehen (Liu et al., 2022). In-Vitro-Modelle eignen sich außerdem, um prädikative Biomarker herauszufinden (Wang et al., 2017). Basierend auf den Tumormodellen können dann Medikamente entwickelt und evaluiert werden (Lee et al., 2018).

Zunächst wurden 2D-Kulturen von Tumorzellen etabliert. Diese sind zwar günstiger und schneller wachsend, aber stellen den Ursprungstumor zu stark vereinfacht dar. Häufig verlieren sie während der Kultivierung die Heterogenität, die im Tumor vorkam und bieten nicht das Tumormikroenvironment (Gunti et al., 2021). Um diesen Limitationen entgegenzuwirken wurden Mausmodelle und Xenografts aus Patientenproben verwendet, welche die Histologie des Tumors besser darstellten. Diese Tumormodelle waren sehr teuer, spiegelten die Biologie des menschlichen Tumors nicht genau wider und ermöglichten kaum genetische Manipulationen für weitere Untersuchungen (Wang et al., 2017). Außerdem wurden für die Xenografts meistens immunsupprimierte Mäuse verwendet, wobei es dann die Rekonstruktion des Immunsystems bedarf (Gunti et al., 2021).

3D-Organoidmodelle können die Probleme der 2D-Kultur beheben und bieten eine neue Möglichkeit, um urologische Karzinome zu erforschen. Tumorzellen, die in 3D-Kultur gewachsen sind, behielten ihre Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen und ähneln somit dem Originaltumor mehr als Tumorzellen in zweidimensionaler Kultur (Pauli et al., 2017). Sato et al. waren 2009 eine der ersten Forschungsgruppen, die den Begriff 'Organoid' verwendeten und bezeichneten damit selbst-organisierende und Originalgewebe-ähnliche Zellstrukturen, die in vitro aus einer Stammzelle entstanden ist (Sato et al., 2009). Eingeschränkt wird die Vergleichbarkeit allerdings dadurch, dass die Organoide keine Nerven, Blutgefäße und Immunzellen enthalten (Wang et al., 2017). In Zukunft kann das Organoidmodell möglicherweise mit Co-Kulturen aus Stroma- und Immunzellen erweitert werden, um die Umgebung des Tumors noch genauer darzustellen und präzisere Medikamententestungen durchzuführen (Tse et al., 2022). Damit Organoide effektiv in den klinischen Alltag etabliert werden können, ist es wichtig die Zeit zwischen der Probenentnahme und der erfolgreichen Kultivierung zu reduzieren. Wenn dies erreicht ist, sollen Organoide aus Patientenproben genutzt werden, um jeweils das Medikamentenansprechen eines Tumors zu testen und

so eine individualisierte Medizin praktizieren zu können (van de Wetering et al., 2015).

Zellkulturen von normalen Urothelzellen sind wichtig, um die Physiologie des Gewebes und die Funktion von Veränderungen in Tumoren zu untersuchen. Sie dienen außerdem als Kontrolle z.B. um die Tumorspezifität von neuen Medikamenten zu überprüfen. Eine derartige Zellreihe sind die HBLAKs, die vom normalen Blasengewebe abstammen und viele Marker von physiologischem Urothel exprimieren. Diese immortalisierten Zellen verändern ihre Proliferation und Morphologie beim Passagieren nicht und eignen sich daher für eine langfristige Kultivierung (Hoffmann et al., 2016).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das Harnblasenkarzinom gehört zu den häufigsten Tumorerkrankungen (IARC, 2020) und es bedarf weiterhin Forschung, um die Tumorgenese besser zu verstehen und weitere Ansatzpunkte für Therapien zu entwickeln. Für dieses Vorhaben werden Tumormodelle im Labor entwickelt, welche allerdings zurzeit noch Einschränkungen in ihrer Umsetzbarkeit und Vergleichbarkeit aufweisen. Ein Ansatz der Tumormodelle sind Organoide, die aus Karzinomproben der Patienten kultiviert werden (Wang et al., 2017).

Nectin-4 und Trop-2 werden häufig in Blasentumoren vermehrt exprimiert, weshalb bereits passende Antikörper-Wirkstoff-Konjugate konstruiert wurden (Enfortumab-Vedotin und Sacituzumab-Govitecan) (D'Angelo et al., 2022). Bei Analysen mit Ovarialkarzinom-Organoiden wirkte Nectin-4 als Adhäsionsmolekül fördernd für die Bildung von Organoiden (Boylan et al., 2020).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Nectin-4- und Trop-2-Expression der Blasentumororganoiden und ihrer Originaltumore zu bestimmen und miteinander zu vergleichen. Dabei werden womöglich mehrere Passagen der BCOs berücksichtigt. Es soll ermittelt werden, ob sich das Nectin-4- und Trop-2-Expressionsmuster im Laufe der Langzeitkultivierung verändert und welche Passagen mehr Ähnlichkeit zum Originaltumor aufweisen. Zudem wird in dieser Arbeit untersucht, ob die Expression von Nectin-4 und Trop-2 mit dem Tumorstadium assoziiert ist und ob sie einen Einfluss auf die Formation von Organoiden hat.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmittel

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte und Verbrauchsmittel sind in der Tabelle 2 mit dem jeweiligen Hersteller aufgelistet.

Bezeichnung	Hersteller
24-Well Zellkultur-Platte Cellstar®	Grainer bio-one, Kremsmünster, AT
Collection Tubes (1,5 ml, 2 ml)	Qiagen, Hilden, DE
Combi-Spin FVL-2400N	bioSan, Riga, LVA
Cryomold	Sakura Finetek, Staufen, DE
Deckgläser	R. Langenbrinck, Emmendingen, DE
Dual-Timer C5080	TFA Dostmann, Wertheim, DE
Einbettkassette	R. Langenbrinck, Emmendingen, DE
Einmal-Nitril-Untersuchungshandschuhe	Joza®, München, DE
Einwegskalpell	Feather®, Osaka, JPN
Electrophoresis Power Supply 601	Amersham plc, Amersham, UK
Feuchte Kammer	LabArt, Waldbüttelbrunn, DE
Gelsystem 40-0708	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, DE
Hämozytometer C-Chip Neubauer-Improved	NanoEnTek, Seoul, Südkorea
HeraCell Vios 250i CO ₂ Inkubator	Thermo Fischer Scientific™, Waltham, USA
Heraeus Multifuge 3SR+	Thermo Fischer Scientific™, Waltham, USA
Injekt®-F Einmalfeindosierspritzen	B. Braun SE, Melsungen, DE
Kryoröhrchen	Thermo Fischer Scientific™, Waltham, USA
Kühlschränke	Bosch, Stuttgart, DE
LightCycler® 480 96-Well-Platte	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
LightCycler® 480 II	Roche, Mannheim, DE

Magnetrührer	Heidolph Instruments, Schwabach, DE
Microlance 0,7 mm x 30 mm	Becton Dickinson, Fraga, ESP
Mikroreaktionsgefäß (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf SE, Hamburg, DE
Mikroskop Axio Vert.A1	Zeiss, Oberkochen, DE
Mikroskop Axiophot	Zeiss, Oberkochen, DE
Mikroskop Axiovert 200M	Zeiss, Oberkochen, DE
Mikroskop Primovert	Zeiss, Oberkochen, DE
Mikrotom-Klinge S35	Feather®, Osaka, Japan
Mikrowelle	Sharp, Osaka, Japan
NanoPhotometer® NP80	Implen, München, DE
Paraffinausgießstation Leica EG 1150 C	Leica Biosystems, Nußloch, DE
Paraffin-Streckbad GFL® 1052	GFL, Burgwedel, DE
Petrischale	Greiner bio-one, Kremsmünster, AT
Pipette Research (Plus)/Reference	Eppendorf SE, Hamburg, DE
Pipettenspitzen (mit und ohne Filter)	Biosphere® / Sarstedt / Greiner bio-one
Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann®, Eberstadt, DE
Präzisionswaage	Kern & Sohn, Balingen, DE
Rotationsmikrotom Leica RM2125RT	Leica Biosystems, Nußloch, DE
Schüttelwasserbad	GFL, Burgwedel, DE
Serologische Pipette (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Nest® / Falcon® / Greiner bio-one
Sicherheitswerkbank MSC-Advantage™	Thermo Fischer Scientific™, Waltham, USA
SuperFrost® Plus Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen, DE
Thermocycler UNO II	Biometra®, Göttingen, DE
Thermomixer comfort	Eppendorf SE, Hamburg, DE
UV-Transilluminator Biometra TI 1	Biometra, Göttingen, DE

Vakuum-Absaugsystem HLC	Knf, Sursee, Schweiz
Vortexer MS1 Minishaker	IKA, Staufen, DE
Zellkulturflasche 250 ml, Blue Plug Seal Cap, Tissue Culture Treatment	Corning-Falcon®, Durham USA
Zellkulturflasche CellBIND™ Surface	Corning, Wiesbaden, DE
Zellsieb EASYstrainer™	Greiner bio-one, Kremsmünster, AT
Zentrifuge Centrifuge 5424	Eppendorf SE, Hamburg, DE
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3SR+	Thermo Fischer Scientific™, Waltham, USA
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich, Tuttlingen, DE
Zentrifugenröhrchen (15ml, 50ml)	Greiner bio-one, Kremsmünster, AT

Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte und Verbrauchsmittel mit Herstellern

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien, die im Rahmen dieser Dissertation zur Anwendung kamen, wurden in der Tabelle 3 mit dem jeweiligen Hersteller dokumentiert.

Bezeichnung	Hersteller
A83-01	STEMCELL Tech., Köln, DE
Accutase® Solution	Sigma-Aldrich®, St.-Louis, USA
Advanced DMEM/F12	Gibco, von Fisher Scientific, Waltham, USA
Advantage® RT-for-PCR Kit (Inhalt: oligo dt Primer, DEPC-treated water, 5x Reaction Buffer, Recombinant RNase Inhibitor, dNTP Mix und Reverse Transcriptase)	TaKaRa Bio Inc., Kusatsu, JPN
Ampuwa	Fresenius, Bad Homburg, DE
Aprotinin	Merck, Darmstadt, DE
B27-Supplement	Gibco, von Fisher Scientific, Waltham, USA
Beta-Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt, DE
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific, Oldendorf, DE

Boric Acid	Sigma-Aldrich®, St.-Louis, USA
Bp-Ladder	Invitrogen, von Fisher Scientific, Waltham, USA
Bromophenol blue	AppliChem, Darmstadt, DE
BSA 25 %	Gibco, von Fisher Scientific, Waltham, USA
CnT-Prime	CellnTec, Bern, CHE
Collagenase	STEMCELL Tech., Köln, DE
Cultrex® Growth Factor Reduced BME	R&D Systems, Minneapolis, USA
DAPI	Sigma-Aldrich®, St.-Louis, USA
Descosept sensitive	Dr. Schumacher GmbH, Maisfeld, DE
Dispase	STEMCELL Tech., Köln, DE
DPBS	Sigma-Aldrich®, St.-Louis, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DMSO)	AppliChem, Darmstadt, DE
eBioscience™ 1x RBC Lysis Buffer	Invitrogen, von Fisher Scientific, Waltham, USA
EDTA-Na ₂	Sigma-Aldrich®, St.-Louis, USA
Ethanol	SAV Liquid Production, Flintsbach am Inn, DE
FCS	Sigma-Aldrich®, St.-Louis, USA
FGF-2/ -7 / -10	PeproTech, Hamburg, DE
Fluorescence Mounting Medium	Dako, Carpinteria, USA
Gel Red Nucleic Acid, Gel stain	Biotium, Fremont, USA
Glutamax	Invitrogen, von Fisher Scientific, Waltham, USA
Glycerol	Sigma-Aldrich®, St.-Louis, USA
H ₂ O ₂ - Lösung 3 %	Aug. Hedinger, Stuttgart, DE
HBSS	Sigma-Aldrich®, St.-Louis, USA
HCM Kit	Corning, Wiesbaden, DE

Hematoxylin QS	Vector Laboratories, Burlingame, USA
HEPES	Gibco, von Fisher Scientific, Waltham, USA
Histogel	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
L-Glutamin	Biochrom, Berlin, DE
LightCycler 480 SYBR Green I Master-Kit (Inhalt: SybrGreen und NTW)	Roche, Mannheim, DE
Liquid DAB+ Substrate Chromogen System	Dako, Carpinteria, USA
Matrigel® Growth Factor Reduced BME	Corning, Wiesbaden, DE
MEM mit Earle´s Salzen	Bio&SELL, Feucht/Nürnberg, DE
MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X)	Gibco, von Fisher Scientific, Waltham, USA
N-Acetylcystein	Sigma-Aldrich®, St.-Louis, USA
Natriumacetat	SERVA Electrophoresis, Heidelberg, DE
Nicotinamid	Sigma-Aldrich®, St.-Louis, USA
NTW	Roche, Mannheim, DE
Paraffin	McCormick, St. Louis, USA
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, DE
PBS Tabletten pH 7.2	Medicago AB, Uppsala, Schweden
Penicillin und Streptomycin	Gibco, von Fisher Scientific, Waltham, USA
Primocin	InvivoGen, Toulouse, FRA
Recombinant Human EGF	PeproTech, Hamburg, DE
RNeasy® Mini Kit (Inhalt: RLT-Puffer, RNase-free water, RW1-Puffer und RPE-Puffer)	Quiagen, Hilden, DE

ROCK-Inhibitor Y-27632	Hycultec, Beutelsbach, DE
smc	PromoCell, Heidelberg, DE
Tris base	AppliChem, Darmstadt, DE
Trypanblau	Lonza, Basel, CHE
TrypLE™ Select (1x)	Gibco, von Fisher Scientific, Waltham, USA
Trypsin-EDTA Solution	Sigma-Aldrich®, St.-Louis, USA
VectaMount® Permanent Mounting Medium	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Xylol	AppliChem, Darmstadt, DE
ZytoChem-Plus HRP Polymer-Kit (Inhalt: BlockingSolution, PostBlock, HRP-Polymer)	Zytomed Systems, Berlin, DE

Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien mit Herstellern

2.1.3 Medien und Lösungen

Wie die verwendeten Medien und Lösungen zusammengesetzt sind, lässt sich der Tabelle 4 entnehmen.

Bezeichnung	Zusammensetzung
100 bp-Ladder Mix	30 µL bp-Ladder + 50 µL ddH ₂ O + 80 µL Ladepuffer (siehe unten)
Blasentumororganoidmedium nach AG Aicher	22,5 ml L-RN conditioned Medium + 22 ml Advanced DMEM/F12 + 2,5 ml 5 % csFCS + 1 ml B27-Supplement + 500 µl Glutamax (100X) + 500 µl HEPES (1 M) + 500 µl Nicotinamid (1 M) + 125 µl N-Acetylcystein (500 mM in PBS) + 50 µl A83-01 (5 mM in DMSO)

	<ul style="list-style-type: none"> + 50 µl Primocin (50 mg/ml) + 50 µl FGF-10 (100 µg/ml) + 25 µl FGF-7 (50 µg/ml) + 12,5 µl FGF-2 (50 µg/ml) + 5 µl Y-27632 (100 mM in PBS) + 0,5 µl EGF (500 µM)
Blasentumororganoidmedium nach (Lee et al., 2018)	<p>500 ml Hepatocyte Defined Medium aus dem Hepatocyte Culture Media Kit</p> <ul style="list-style-type: none"> + 5 ml Glutamax (100X) + 1 ml Primocin (50mg/ml) + 5 µg EGF <p>→für Grundmedium 47,5 ml abnehmen</p> <ul style="list-style-type: none"> + 2,5 ml 5% csFCS <p>→für fertiges Kulturmedium 50 ml Grundmedium abnehmen</p> <ul style="list-style-type: none"> + 5 µl Y-27632 (100 mM in PBS)
Ladepuffer	<ul style="list-style-type: none"> 5 ml Glycerol + 250 µL 40x TAE buffer + Spatelspitze Bromophenol blue + 3,75 ml H₂O
L-Cell Medium	<ul style="list-style-type: none"> DMEM + 10 % FCS + 1% Pen/Strep
L-Selections Medium	L-Cell Medium + 50 µg/ml G418
L-Cell Conditioning Medium	<ul style="list-style-type: none"> Advanced DMEM/F12 + 1 % Pen/Strep + 1 % HEPES + 1 % L-Glutamin

L-RN conditioned Medium (R = R-Spondin, N = Noggin)	Herstellung im Labor mittels L-Cell Medium, L-Selections Medium, L-Cell Conditioning Medium und Kultivierung von L-Cells
Standardkulturmedium für Tumorzellen	450ml MEM mit Earle's Salzen + 50 ml FCS + 5 ml Pen/Strep + 5 ml Glutamax 100X + 5 ml MEM Non-Essential Amino Acids Solution
TAE-Puffer 40x	193,6 g Tris base (1,6 M) + 108,9 g Natriumacetat x 3 H ₂ O (0,8 M) + 7,44 g EDTA-Na ₂ x 2 H ₂ O (20mM) pH auf 7,2 einstellen mit Essigsäure Mit H ₂ O auf 1 L auffüllen
TBE-Puffer 20x	121 g Tris base (1M) + 61,7 g Boric Acid (1M) + 7,44 g EDTA-Na ²⁺ x 2 H ₂ O (20mM) Mit H ₂ O auf 1 L auffüllen
Transportmedium	HBSS 500 mL + 5 mL HEPES (1M) + 1667 µL Aprotinin + 5 mL Pen/Strep (1%)
Workingmedium	45ml Advanced DMEM/F12 + 5 ml FCS + 0,5 ml Pen/Strep + 0,5 ml Glutamax 100X + 5 µl Y-27632 (100 mM in PBS)

Tabelle 4: Zusammensetzung der verwendeten Medien und Lösungen

2.1.4 Antikörper für Immunfärbungen

Die für die Immunfärbungen verwendeten Antikörper und der jeweilige Hersteller wurden in der Tabelle 5 aufgelistet.

Bezeichnung	Hersteller
anti-h Nectin-4 AF2659	R&D Systems, Minneapolis, USA
anti-h TROP-2 AF 650	R&D Systems, Minneapolis, USA
Polyclonal Rabbit Anti-Goat Immunoglobulins/HRP	Dako, Carpinteria, USA
Alexa Fluor 488 rabbit-anti-goat IgG A11078	Invitrogen, von Fisher Scientific, Waltham, USA

Tabelle 5: Verwendete Antikörper für die Immunfärbungen und ihre Hersteller

2.1.5 Primer für qRT-PCR

Die verwendeten Primer wurden bei Eurofins Genomics, Ebersberg, DE bestellt. Für jeden Primer lassen sich das Zielgen und die Sequenz, sowie die Annealing-Temperatur und die Access number der Tabelle 6 entnehmen. Bei der Positivkontrolle der qRT-PCR wurde der QuantiTect® Primer Assay Hs_ACTA2_1-SG von Qiagen, Hilden, DE verwendet.

Zielgen	Sequenzen (5' → 3')	Annealing-Temp. [°C]	Access number
β-Actin	Forward: AACTGGGACGACATGGAGAA Reverse: ATACCCCTCGTAGATGGGCA	60	NM_001101.5
GAPDH	Forward: GCTCTCCAGAACATCATCCCTGCC Reverse: CGTTGTCATACCAGGAAATGAGCTT	60	NM_002046.7
Nectin-4	Forward: CAAATCTGTGGCACATTGG Reverse: GCTGACATGGCAGACGTAGA (Boylan et al., 2017)	58	NM_030916.3

TROP-2	Forward: ACAACGATGGCCTCTACGAC Reverse: GTCCAGGTCTGAGTGGT TGAA (Sun et al., 2021)	60	NM_002353.3
--------	--	----	-------------

Tabelle 6: Verwendete Primer für qRT-PCR und ihre Sequenzen

2.1.6 Zelllinien

Bei einigen Experimenten im Rahmen dieser Arbeit wurden Zelllinien verwendet. Jene sind in der Tabelle 7 zusammen mit ihrem Hersteller aufgelistet.

Bezeichnung	Hersteller
HBLAK	CellnTec, Bern, CHE
HT-1197	American Type Culture Collection, Virginia, USA
RT4	American Type Culture Collection, Virginia, USA
RT-112	Cell Lines Service, Eppelheim, DE
T24	American Type Culture Collection, Virginia, USA
UM-UC-6	ECACC General Cell Collection, Nr. 08090503, Houston, USA
UM-UC-9	ECACC General Cell Collection, Nr. 08090505, Houston, USA
UM-UC-14	ECACC General Cell Collection, Nr. 08090509, Houston, USA

Tabelle 7: Verwendete Zelllinien und ihre Hersteller

2.1.7 Blasentumororganoide und Primärtumore

In der Tabelle 8 sind die Patienten anonymisiert mit den Nummern 1 – 6, sowie die daraus entstandenen Blasentumororganoide mit der im Labor verwendeten Nummerierung aufgelistet. In dieser Arbeit wurden alle Blasentumororganoid- und Primärtumorproben, die Ende Januar 2023 dem Forschungslabor der Universitätsklinik für Urologie in Tübingen entweder als Paraffinschnitt oder als

RNA-Extrakt vorlagen, für die Analysen verwendet. Dass nicht von allen BCOs Paraffinschnitte bzw. RNA-Extrakte vorlagen, ist der unzureichenden Menge an Organoiden in manchen Kulturen geschuldet. Teilweise musste dann die gesamte Organoidmenge beim Passagieren für die nachfolgende Passage verwendet werden und es konnten parallel keine Paraffinschnitte oder RNA-Extrakte angefertigt werden. Welche Proben zur Verfügung standen und aus welchen Passagen jene stammten, wurde in der untenstehenden Tabelle 8 dokumentiert. Der Tabelle lässt sich außerdem entnehmen, dass die Blasentumororganoide #140 und #154 von demselben Patienten stammen.

Patient	BCO-Nr.	Paraffinschnitte von BCOs in div. Passagen	RNA bzw. cDNA von BCOs in div. Passagen
1	#140	2, 10, 23	3, 7, 11
1	#154	1, 8, 21	2, 7, 22+24
2	#267	10	8, 12+15
3	#270	9	4, 5-7, 10
4	#287		14
5	#297		5
6	#300	4	4

Tabelle 8: Verwendete Blasentumororganoide und die vorliegenden Proben

2.2 Methoden

2.2.1 Probengewinnung

Die im Labor verwendeten Tumorproben wurden in der Klinik für Urologie des Universitätskrankenhauses in Tübingen durch transurethrale Resektionen der Harnblase oder Zystektomien gewonnen.

Die analysierten Blasentumororganoide lagen im Labor in Kultur vor, oder waren von vorherigen Doktoranten in Zusammenarbeit mit den medizin-technischen Assistenten bereits in Paraffinblöcken bzw. als RNA konserviert worden. Die Tumorzelllinien RT4, UM-UC-6 und HBLAK lagen eingefroren im Stickstofftank vor. Die Studie wurde von der Ethikkommission unter dem Aktenzeichen 804/2020B02 genehmigt. Alle relevanten Vorgaben zum ethischen Umgang mit Proben aus menschlichem Gewebe wurden uneingeschränkt beachtet. Die Studie wurde dem entsprechend durchgeführt.

2.2.2 2D-Kultivierung

2.2.2.1 Auftauen der Zellen von Tumorzelllinien für 2D-Kultur

Eingefrorene Zellen können aufgetaut und erneut in Kultur genommen werden. Zunächst wurde 20 ml warmes MEM in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Die Zellen wurden aus dem Stickstofftank entnommen und auf Eis transportiert. Zum Auftauen wurde das Kryoröhrchen im 37 °C warmen Wasserbad so lange geschwenkt bis nur noch ein kleiner Eiskern übrig blieb. Dann wurden die Zellen schnellstmöglich in das mit MEM vorbereitete Zentrifugenröhrchen umgefüllt. Das Zentrifugenröhrchen wurde im Anschluss bei 150 g und Raumtemperatur für 7 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Mit 10 ml MEM wurde nun das Zellpellet resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Alle 2-3 Tage erfolgte ein Medienwechsel.

2.2.2.2 Passagieren von Tumorzelllinien in 2D-Kultur

Als sich die Zellen so stark vermehrt hatten, dass sie mit einer Dichte von 70 – 80 % den Boden der Zellkulturflasche bedeckten, musste die Zellzahl pro

Zellkulturflasche reduziert werden, um ein Absterben der Tumorzellen zu vermeiden. Dafür wurde als erstes das Kulturmedium aus der Zellkulturflasche abgesaugt und durch 10 ml warmes PBS ersetzt. Nach 5 Minuten wurde dies ebenfalls wieder entfernt. Zum Ablösen der Tumorzellen wurde 3 ml Trypsin-EDTA in die Flasche pipettiert und für 5 – 10 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Durch Beklopfen der Flasche und anschließendem Mikroskopieren wurde das Ablösen der Zellen überprüft. Im Anschluss wurden 7 ml MEM in die Zellkulturflasche gegeben und die Zellsuspension in ein 50 ml – Zentrifugenröhrchen überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei Raumtemperatur und 480 g für 7 Minuten. In der Zwischenzeit wurde Kulturmedium entsprechend des Splittingverhältnisses in eine neue Zellkulturflasche vorgelegt. Beispielsweise 8 ml Medium bei einem Splittingverhältnis von 1:5. Nach Beendigung der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und der Zellpellet in 10 ml MEM resuspendiert. Mit der Zellsuspension wurde dann die neue Zellkulturflasche auf 10 ml abgefüllt – im oben genannten Fall folglich mit 2 ml Zellsuspension auf 8 ml MEM. In den folgenden Tagen wurde die Zellkulturflasche bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, täglich die Dichte per Mikroskop überwacht, sowie alle 2 – 3 Tage die 10 ml Kulturmedium mit frischem MEM ersetzt.

2.2.2.3 Passagieren von HBLAKs in 2D-Kultur

Das Passagieren der HBLAKs in 2D-Kultur erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie bei Tumorzelllinien (siehe 2.2.2.2). Allerdings wurde bei den HBLAKs 4 ml Accutase statt 3 ml Trypsin-EDTA verwendet, sowie CnT-Prime als Kulturmedium eingesetzt. Außerdem erfolgte die Zentrifugation mit 200 g für 5 Minuten und es wurden andere Zellkulturflaschen (mit CellBIND™ Surface) verwendet.

2.2.3 3D-Kultivierung

2.2.3.1 Aufbereitung der Tumorgewebeprobe zur 3D-Kultivierung

Die gewonnenen Tumorproben wurden in Transportmedium gelagert aus der Klinik zum Labor weitergeleitet. Zunächst wurde die Probe gewogen. Dafür wurde das Transportmedium in ein 15 ml -Zentrifugenröhrchen pipettiert und das

Gewebestück in eine Petrischale überführt. Überstehendes Transportmedium in der Petrischale wurde abpipettiert und ebenfalls in das 15 ml -Zentrifugenröhrchen gesammelt. Mit einer leeren Petrischale wurde die Waage austariert und anschließend das Gewicht der Probe ermittelt, sowie dokumentiert. Hiernach wurde 1 ml Workingmedium in die Petrischale gegeben und das Gewebe mit zwei sterilen Skalpellenspitzen so klein wie möglich geschnitten. Das zerkleinerte Gewebe wurde dann mit einer 5 ml-Pipette in das 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Um Sicherzustellen, dass alle Gewebestücke übertragen wurden, wurde die Petrischale mit Workingmedium gespült und jenes ebenfalls dem 15 ml-Zentrifugenröhrchen hinzugefügt. Es folgte eine Zentrifugation bei 480 g und Raumtemperatur für 10 Minuten. Der Überstand wurde abgesaugt und das Gewebepellet in entsprechender Menge PBS + Y resuspendiert. Dabei gilt 1000 µl pro 100 mg Gewebe. Als zweites wurde 15 µl Collagenase pro 100 mg Gewebe ergänzt. Das 15 ml - Zentrifugenröhrchen wurde anschließend für 30 Minuten in einem 37 °C warmen Wasserbad inkubiert, wobei die Probe alle 15 Minuten geschwenkt wurde. Nach Ablauf der 30 Minuten und einem zweiten Mal schwenken wurde erneut dieselbe Menge Collagenase in das 15 ml - Zentrifugenröhrchen dazu gegeben und es folgte eine weitere Inkubationszeit von 30 Minuten in einem 37 °C warmen Wasserbad mit Schwenken der Probe alle 15 Minuten. Nachfolgend wurde das verdaute Gewebe durch ein 100 µm Zellsieb in ein 50 ml - Zentrifugenröhrchen filtriert. Das Filtrat wurde bei 480 g und Raumtemperatur für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Hiernach wurde das Zellpellet in 2 ml Lysepuffer resuspendiert und je nach Intensität der Rotfärbung für 2-6 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde 3 ml Workingmedium ergänzt und die Probe bei 480 g und Raumtemperatur für 10 Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, wurde das Zellpellet in der benötigten Menge Workingmedium resuspendiert und auf Eis gestellt. Als Richtwert diente dabei das Gewicht der Tumorseite. Aus 100 mg Gewebeprobe wurden zwei Dome angesetzt und pro geplantem Dome wurde 10 µl Workingmedium verwendet. Als nächstes wurde die benötigte Menge Matrigel BME bestimmt und langsam ohne Luftblasen mit der Zellsuspension resuspendiert. Pro 10 µl Zellsuspension bedarf es 30 µl Matrigel BME + 10µl Matrigel BME als Puffer. Anschließend wurden die

Domes in eine 24-Well-Platte ausplattiert. Dabei wurden für jeden Dome 40 µl der Probe mittig und ohne Luftblasen bis auf den ersten Druckpunkt in ein Well pipettiert. Die Platte wurde nachfolgend umgedreht und für 30 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Hiernach wurde die Platte wieder umgedreht, leicht angekippt und in den unteren Rand, ohne die Domes zu berühren 500 µl Kulturmedium in die verwendeten Wells pipettiert. Um ein Verdunsten des Kulturmediums vorzubeugen, wurden die umliegenden Wells mit 1 ml PBS aufgefüllt. Kultiviert wurden die Tumorzellen bei 37 °C und 5 % CO₂.

2.2.3.2 Überführung der 2D-Kulturen in 3D-Kultur

Zum Überführen der Tumorzelllinien und HBLAKs aus den 2D-Kulturen in 3D-Kulturen, mussten die Zellen wie beim Passagieren zunächst mit Trypsin-EDTA bzw. Accutase gelöst und das Zellpellet nach der Zentrifugation in 10 ml Medium (MEM bzw. CnT-Prime) resuspendiert werden (siehe 2.2.2.2 und 2.2.2.3). Danach wurde die Zellanzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Es wurden 20.000 Zellen pro Dome benötigt und 4 Domes gesetzt. Das Volumen, das entsprechend der gezählten Zellkonzentration die benötigte Anzahl an Zellen enthält, wurde in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen pipettiert und abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand bis auf das benötigte Volumen von 10 µl Zellsuspension pro Dome abpipettiert und pro Dome 30 µl Matrigel BME, sowie pro Ansatz 10 µl Matrigel BME als Puffer, hinzugefügt. Abschließend wurden die Domes wie in 2.2.3.1 beschrieben in die 24-Well-Platte gesetzt und mit MEM bzw. CnT-Prime als Medium abgedeckt.

2.2.3.3 Passagieren von Tumorproben in 3D-Kultur

Wurde mikroskopisch festgestellt, dass die Zellen in den Domes dicht und hochkonzentriert vorliegen, wurde die Kultur gesplittet. Dies ist notwendig, um das Absterben der Zellen zu vermeiden, da Platz und Nährstoffe bei zu hoher Dichte möglicherweise nicht ausreichen.

Vorab wurden repräsentative Domes zur Dokumentation fotografiert. Als erstes wurde das Medium aus den zu splittenden Wells abgenommen und in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Um sicherzustellen, dass möglichst wenige Zellen

in den Wells verblieben, wurden diese dreimal mit 1 ml PBS pro Well gewaschen. Dabei wurden die Domes mit der Pipettenspitze abgekratzt, resuspendiert und das PBS ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen gegeben. Es folgte eine Zentrifugation bei 480 g und Raumtemperatur für 10 Minuten und ein Absaugen des Überstandes. Danach wurde 1 ml TrypLE im Stoß dazugegeben und für ca. 3 Minuten im 37 °C warmen Wasserbad inkubiert. Die Zellen wurden mit einer Doppelspitze (blaue + gelbe Pipettenspitze) langsam resuspendiert. Hiernach wurde das 15ml Zentrifugenröhrchen auf 10 ml mit warmen Workingmedium aufgefüllt und bei 480 g und Raumtemperatur für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in der benötigten Menge Workingmedium resuspendiert. Pro Dome wurden 10 µl Workingmedium verwendet. Wie viele Domes gesetzt wurden, richtete sich nach der Zellanzahl. Zum Zählen wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Zwischenzeitlich wurde die Probe nun auf Eis gelagert und die benötigte Menge BME bestimmt. Pro 10 µl Zellsuspension, beziehungsweise pro Dome, wurden 30 µl BME benötigt. Es sollte 10 µl BME mehr verwendet werden, um sicherzustellen, dass ausreichend vorhanden ist. Die berechnete Menge BME wurde nun zu der Zellsuspension dazu pipettiert und luftblasenfrei resuspendiert. Für jeden Dome wurden 40 µl der Zell-BME-Suspension in die Mitte eines Wells einer 24-Well-Platte bis zum ersten Druckpunkt pipettiert. Im Weiteren wurde die Platte umgedreht und für 30 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. In der Zeit fingen die Domes an sich zu verfestigen. Abschließend wurde nach 30 Minuten die Platte zurückgedreht und pro Well 500 µl Kulturmedium am Rand und ohne die Domes zu berühren hinzu pipettiert. Um ein Verdunsten des Kulturmediums vorzubeugen, wurden die umliegenden Wells mit 1 ml PBS aufgefüllt. Kultiviert wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂. Zweimal pro Woche erfolgte ein Medienwechsel oder eine Zugabe von 100 µl frischem Medium pro Well.

2.2.4 Methoden mit Paraffinschnitten

2.2.4.1 Zellen und Organoide für Paraffinschnitte fixieren

Um aus 3D-Kulturen zunächst die Domes von der 24-Well-Platte abzulösen, wurden 100 µl Dispase in jeden Well zum Kulturmedium pipettiert und die 24-Well-

Platte für eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die im Medium gelösten Organoide wurden in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Zur Sicherstellung, dass möglichst wenige Organoide in den Wells verbleiben, wurden diese im Anschluss dreimal mit 1ml PBS + 0,1 % BSA ausgewaschen und ebenfalls in das 15ml-Zentrifugenröhrchen pipettiert.

Bei 2D-Kulturen wurde vorab das Kulturmedium abgesaugt und anschließend die Zellen mittels 3 ml Trypsin-EDTA und einer Inkubationszeit von 7 Minuten abgelöst. Diese Zellsuspension wurde dann mit 7ml MEM verdünnt und ebenfalls in ein 15ml-Zentrifugenröhrchen überführt.

Es folgte eine Zentrifugation des 15 ml-Zentrifugenröhrchens bei 150 g und Raumtemperatur für zwei Minuten. Danach wurde der Überstand aus Medium vorsichtig mit einer Absaugung abgenommen und das übrig gebliebene Organoidpellet mit 500 µl 4 %-Paraformaldehyd resuspendiert. Die Fixierung erfolgte in dem 15 ml Zentrifugenröhrchen über Nacht bei 4 °C.

2.2.4.2 Zellen und Organoide in Histogel einbetten

Um die in Paraformaldehyd fixierten Zellen und Organoide für das Gießen von Paraffinblöcken vorzubereiten, mussten jene vorab in Histogel eingebettet werden. Dies erfolgte indem zunächst das Histogel mit Hilfe eines Thermomix auf 70°C erhitzt und somit verflüssigt wurde. Das 15 ml Zentrifugenröhrchen mit den in Paraformaldehyd fixierten Zellen und Organoiden wurde bei 200 g und Raumtemperatur für zwei Minuten zentrifugiert und der Überstand mit einer Absaugung entfernt. Im Anschluss wurde das Zellpellet in 300 µl Histogel resuspendiert und dieses Fixiergut in ein Cryomold pipettiert. Dies sollte möglichst zügig und ohne Luftblasen erfolgen. Für 15 Minuten wurde das Cryomold bei 4 °C gelagert, so dass sich das Histogel wieder verfestigt. Sobald das Histogel ausgehärtet war, wurde es in eine mit Probenamen und Datum beschrifteten Einbettkassette überführt. Hierfür eignet es sich einen kleinen Spatel zur Hilfe zu nehmen und das Cryomold vorab mit einer Schere an den vier Ecken zur Mitte hin einzuschneiden. Die verschlossene Einbettkassette wurde in 70 % Ethanol unter einem Abzug bis zur Paraffineinbettung gelagert. Diese sollte innerhalb der nächsten sieben Tage erfolgen.

2.2.4.3 Paraffineinbettung

Vorab müssen die Proben mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert werden. Dies wurde mit einem Gewebeeinfiltrationsautomaten im Institut für Pathologie der Universität Tübingen durchgeführt. Danach wurde der Histogel-Block in eine quadratische Metallform überführt und mit flüssigem Paraffin übergossen. Der Deckel der Einbettungskassette wurde verworfen. Das Unterteil wurde mit der Unterseite auf den Histogel-Block in der Metallform gelegt und ebenfalls mit Paraffin übergossen. Um das Aushärten des Paraffins herbeizuführen, wurde die Metallform mit der Probe auf Eis gestellt. Als das Paraffin vollständig verfestigt war, wurde die Metallform entfernt.

2.2.4.4 Paraffinschnitte anfertigen

Als Vorbereitung wurde ein Paraffin-Streckbad auf 40 °C erhitzt und Objektträger mit Probenamen, Datum und Nummerierung beschriftet. Für das Schneiden müssen die Paraffinblöcke kalt und somit hart sein. Dies kann sichergestellt werden, indem die Paraffinblöcke zwischen den Schnitten auf Eis gelagert werden. Der Paraffinblock wurde zum Schneiden in das Mikrotom eingespannt und parallel zum Messer ausgerichtet. Durch Betätigen des Handrads wurde der Paraffinblock quer zum Messer bewegt und es entstehen Schnitte mit der eingestellten Dicke. Hier wurde eine Dicke von 3 µm verwendet. Die Schnitte wurden dann auf das Streckbad überführt und von dort je zwei bis vier Schnitte auf einen Objektträger aufgezogen.

2.2.4.5 Immunhistochemiefärbungen an Paraffinschnitten

Für die Immunhistochemiefärbungen an Paraffinschnitten wurde das ZytoChem-Plus HRP Polymer-Kit verwendet. Vor dem Färben müssen die Schnitte vollständig getrocknet sein. Dafür wurden sie für 10 Minuten auf einen Magnetrührer mit Heizfunktion gelegt. Außerdem mussten die Schnitte entparaffiniert sein. Dafür durchliefen sie eine absteigende Alkoholreihe: 3x 15 Minuten in Xylol, 2x 3 Minuten in 100%igem Ethanol, 2x 3 Minuten in 96%igem Ethanol, 3 Minuten in 75%igem Ethanol, 5 Minuten in 30%igem Ethanol und 5 Minuten in destilliertem Wasser. Nach der Entparaffinierung und nach jedem folgenden Waschschrift

wurden die Objektträger mit einem Papiertuch um die Schnitte herum abgetrocknet und in eine feuchte Kammer gelegt. Da die endogene Peroxidase unspezifische Färbungen verursachen kann, wurde zunächst die Peroxidase-Aktivität durch 10 Minuten Inkubation mit 3%iger H_2O_2 -Lösung blockiert. Es folgte ein Waschen der Objektträger mit PBS als Waschpuffer für 2 Minuten. Anschließend wurde die BlockingSolution aus dem ZytoChem Plus HRP Polymer Kit, welche eine Hintergrundfärbung durch unspezifisches Binden der Antikörper am HRP-Polymer vorbeugt, aufgetragen und nach 5 Minuten ebenfalls mit PBS abgewaschen. Als nächstes inkubierten die Primärantikörper für 60 Minuten bei 37 °C und 5 % CO_2 . Die Primärantikörper wurden dafür im Verhältnis 1:20 mit PBS + 0,1 % BSA verdünnt und pro Objektträger wurden 100 µl Antikörper-Lösung verwendet. Außerdem wurde für jede Probe ein Objektträger mit PBS statt dem Primärantikörper als Negativkontrolle mitgefärbt. Im Anschluss wurde der Primärantikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Objektträger mit dem Verstärkungsreagenz PostBlock aus dem Kit für 20 Minuten benetzt. Nach anschließendem Waschen mit PBS wurden dann HRP-konjugierte, polyklonale Kaninchen-Gegen-Ziege-Immunglobuline 1:200 mit PBS + 0,1 % BSA verdünnt und als Sekundärantikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf allen Objektträgern inkubiert. Auch hiernach erfolgte Waschen mit PBS. Im nächsten Schritt wurde DAB für 10 Minuten aufgetragen. Dieses Substrat wurde dabei von dem Enzym HRP zu einem braunen Niederschlag umgesetzt und markiert daher unter dem Mikroskop die mit dem Zielgen positiven Stellen. Diese Reaktion wurde mit destilliertem Wasser abgestoppt und im Anschluss eine Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämatoxylin durchgeführt. Das Hämatoxylin inkubierte für 3 Minuten und wurde danach mit destilliertem Wasser abgewaschen. Es folgte dann das so genannte Bläuen, bei dem die Objektträger für 10 Minuten mit Leitungswasser gespült wurden. Durch den pH-Anstieg änderte sich die ursprüngliche rötlich-bräunliche Färbung des Hämatoxylin in die typische bläuliche Farbe. Zum Schluss wurden die Objektträger mit destilliertem Wasser gewaschen, getrocknet, sowie mit Fluorescence Mounting Medium und Deckgläsern eingedeckt.

2.2.4.6 Immunfluoreszenzfärbungen an Paraffinschnitten

Zunächst wurden die Antikörper in PBS + 0,1 % BSA verdünnt. Pro Objektträger wurden je 100 µl Primär- und Sekundärantikörper benötigt. Die Primärantikörper wurden im Verhältnis 1:20 verdünnt. Der Sekundärantikörper wurde im Verhältnis 1:1000 verdünnt und außerdem DAPI im Verhältnis 1:1000 hinzugefügt. Letztendlich wurde in 998 µl PBS 1 µl Sekundärantikörper und 1 µl DAPI gelöst. Um Sicherzustellen, dass die Schnitte vollständig getrocknet sind, wurden diese zunächst für 10 Minuten auf einen Magnetrührer mit Heizfunktion gelegt. Außerdem mussten die Schnitte entparaffiniert sein und durchliefen dafür eine absteigende Alkoholreihe: 3x 15 Minuten in Xylol, 2x 3 Minuten in 100%igem Ethanol, 2x 3 Minuten in 96%igem Ethanol, 3 Minuten in 75%igem Ethanol, 5 Minuten in 30%igem Ethanol und 5 Minuten in destilliertem Wasser. Nach der Entparaffinierung und nach jedem folgenden Waschschrift wurden die Objektträger mit einem Papiertuch um die Schnitte herum abgetrocknet und in eine feuchte Kammer gelegt. Als erstes wurde dann pro Objektträger 100 µl des Primärantikörpers gegen das zu detektierende Antigen aufgetragen. Außerdem wurde als Negativkontrolle pro Probe ein Objektträger mit PBS statt Primärantikörper mitgeführt. Es folgte die erste Inkubation in der feuchten Kammer bei 37 °C und 5 % CO₂ für eine Stunde. Im Anschluss wurde der Primärantikörper dreimal für drei Minuten mit PBS abgewaschen. Als nächstes wurde auf jeden Objektträger 100 µl Sekundärantikörper pipettiert. Dieser inkubiert für eine Stunde in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Danach wurden die Objektträger erneut dreimal für drei Minuten mit PBS gewaschen. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Mounting Medium und Deckgläsern eingedeckt.

2.2.5 Methoden mit RNA-Extrakten

2.2.5.1 Auflösen von BME zur RNA-Extraktion

Als Vorbereitung wurde die Zentrifuge auf 4 °C im Leerlauf runtergekühlt und außerhalb der Benutzung geschlossen gehalten, sowie die 24-Well-Platte mit den Domen für die RNA-Extraktion auf Eis gelegt. Das Medium wurde aus den Wells abgesaugt und in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurde in jedes Well 1 ml kaltes PBS pipettiert, mit der Pipettenspitze die Wells

abgekratzt und das PBS ebenfalls in dem 15 ml-Zentrifugenröhrchen gesammelt. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Danach wurde die Suspension bei 480 g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Pro Dome wurde 1 ml TrypLE hinzugefügt und das 15 ml - Zentrifugationsröhrchen gevortext. Für 15 Minuten wurde die Suspension in einem 37 °C warmen Wasserbad inkubiert und dabei alle 5 Minuten gevortext. Nachfolgend wurde die Flüssigkeit auf 12 ml mit kaltem PBS aufgefüllt und bei 1000 xg und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 200 µl abgesaugt und das 15 ml-Zentrifugenröhrchen auf 10 ml mit kaltem PBS aufgefüllt. Nach einem Vortexen folgte eine Zentrifugation bei 1200 xg und 4°C für 5 Minuten. Erneut wurde der Überstand bis auf ca. 200 µl abgesaugt und das 15 ml-Zentrifugenröhrchen auf 10 ml mit kaltem PBS aufgefüllt, sowie gevortext und bei 1200 xg und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Hinterher wurde der Überstand so genau wie möglich abgesaugt. Das Zellpellet wurde unter dem Abzug in 350 µl RLT-Puffer mit Mercaptoethanol resuspendiert und abschließend für mindestens eine Stunde bei -80°C eingefroren. In dieser Form ist die Probe für die Weiterverarbeitung bereit oder alternativ für mehrere Jahre bei – 80 °C haltbar.

2.2.5.2 RNA-Extraktion

Für die RNA-Extraktion wurde das RNeasyMini Kit (250) verwendet. Zunächst musste die Probe aufgetaut werden. Sobald sie aufgetaut war, wurde die Probe auf Eis gestellt. Es wurden 350 µl 70%iger Ethanol dazu pipettiert und mit einer Insulinspritze inklusive einer Injektionsnadel das Pellet fünfmal hoch- und runterpipettiert. Anschließend wurde mit der Spritze die Mischung in eine Spin-Säule überführt und jene bei 10.000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Nun wurden 350 µl RW1 auf die Säule gegeben und jene erneut bei 10.000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert, sowie der Durchfluss verworfen. Hiernach wurden 80 µl DNase-Gemisch auf die Membran gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 350 µl RW1 zu der DNase hinzugefügt und die Säule bei 10.000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss mitsamt Sammelröhrchen wurde verworfen und die Säule in ein neues Sammelröhrchen gestellt. Im folgenden Schritt wurden 500 µl RPE-Puffer

auf die Säule pipettiert und diese bei 10.000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert. Danach wurde der Durchfluss verworfen und erneut 500 µl RPE-Puffer auf die Säule pipettiert. Die Säule wurde jetzt für 2 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und direkt im Anschluss erneut für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Im Weiteren wurde die Säule in ein neues mit dem Probenamen beschriftetes Mikroreaktionsgefäß gestellt und 20 µl RNasefreies Wasser auf die Membran pipettiert. Es folgte eine einminütige Inkubation, sowie eine einminütige Zentrifugation bei 10.000 rpm. Der Durchfluss enthält dann die RNA. Der genaue RNA-Gehalt wurde mit dem NanoPhotometer® NP80 bestimmt und dokumentiert. Bis zur Umschreibung in cDNA wurde das RNA-Extrakt bei -80 °C gelagert.

2.2.5.3 Umschreiben von RNA in cDNA

Für das Umschreiben der RNA in cDNA wurde das Advantage® RT-for-PCR Kit verwendet. Alle Reagenzien wurden vorab gevortext, zentrifugiert und auf Eis gestellt. In ein 0,5 ml-Mikroreaktionsgefäß wurde depec-Wasser entsprechend der RNA-Konzentration in der Probe vorgelegt und das RNA-Volumen dazu pipettiert, sodass 12,5 µl RNA-depec-Wasser-Mischung mit insgesamt 1 µg RNA entsteht. Dem wurde 1 µl oligo-dt-Primer hinzugefügt und das Mikroreaktionsgefäß gevortext, zentrifugiert und auf Eis gestellt. In einem weiteren Reaktionsgefäß wurde der Master-Mix angesetzt. Dieser setzt sich zusammen aus 4 µl 5x Buffer und 0,5 µl RNase-Inhibitor, sowie 1 µl dNTP-Mix und 1 µl reverse Transkriptase. Die Mischung wurde gevortext, zentrifugiert und auf Eis gestellt. Als nächstes wurde der Thermocycler eingeschaltet und das benötigte Programm eingestellt. Dadurch heizt das Gerät auf 70 °C hoch. Bei einer Temperatur von 65 °C wurde das Aufheizen kurz pausiert und die Probe hineingestellt. Anschließend wurde das Programm fortgesetzt. Nachdem die Zieltemperatur erreicht wurde, sank diese nach ca. zwei Minuten wieder. Dann wurde die Probe herausgeholt und auf Eis gestellt. Im Weiteren wurde der Probe 6,5 µl Master-Mix hinzugefügt und das Mikroreaktionsgefäß gevortext, zentrifugiert und auf Eis gestellt. Nun wurde am Thermocycler das Programm für die RNA-Umschreibung ausgewählt und die Probe erneut reingestellt. Es lief die Umschreibung für 1h 7 min bei 42 °C. Nach

Beendigung des Programms wurde die Probe wieder auf Eis gestellt und 80 µl depec-Wasser ergänzt. Die Probe enthält nun cDNA und wurde bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

2.2.5.4 Primer-Mix herstellen

Die verwendeten Primer wurden nach Packungsbeilage mit NTW gelöst. Dafür wurden in ein Reaktionsgefäß 400 µl NTW mit je 50 µl forward-Primer und reverse-Primer gemischt.

2.2.5.5 qRT-PCR

Für die qRT-PCR wurde der LightCycler480 II und das LightCycler 480 SYBR Green I Master-Kit verwendet. Vorab wurde das Layout der 96-Well-Platte erstellt. Dabei befand sich unten rechts die Positivkontrolle, außerdem rechts für jeden Primer eine Negativkontrolle. Jede Probe erhielt eine Spalte und jeder Primer bzw. jedes Zielgen zwei Zeilen. Alle verwendeten Reagenzien wurden vorher gevortext, zentrifugiert und auf Eis gestellt. Für jedes Gen wurde ein Master-Mix hergestellt, welcher aus 10 µl SybrGreen, 2 µl PrimerMix aus forward und reverse Primer und 6 µl NTW besteht. Diese Mengenangaben wurden mit der Anzahl der verwendeten Wells inklusive NTC und 3 mehr als Puffer multipliziert und in entsprechender Menge in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert. Das Gemisch wurde gevortext, zentrifugiert und auf Eis gestellt. Als alle benötigten Materialien zusammengestellt waren, wurden die Proben und Primer in die Wells pipettiert. Zuerst wurden je 2 µl cDNA, ohne die Ränder zu berühren, bis zum zweiten Druckpunkt auf den Boden des Wells pipettiert. Dabei wurde zuerst cDNA von smooth muscle cells (smc) für die Positivkontrolle, dann NTC für die Negativkontrollen und zuletzt spaltenweise die cDNA der Proben aufgetragen. Anschließend wurden je 18 µl der MasterMixe der Primer in den entsprechenden Zeilen inklusive Negativkontrollen am Rand bis auf den ersten Druckpunkt dazu pipettiert. Sind alle Reagenzien auf die 96-Well-Platte pipettiert worden, wurde diese mit einer Folie abgeklebt und bei 1000 rpm für eine Minute abzentrifugiert.

Die fertige Platte konnte für eine Nacht bei -20 °C gelagert werden und wurde dann nach dem Auftauen erneut abzentrifugiert. Nach dem Laufen der PCR wurde die Platte erst beschriftet und für spätere Analysen bei -20 °C aufbewahrt. Die Vorgaben für die qRT-PCR wurden mit dem zum LightCycler480 II dazugehörigen Programm eingestellt. Die qRT-PCR lief mit 39 Zyklen und je nach Primer bei 58 °C oder 60 °C. Außerdem wurde jede Probe zusätzlich auf die Referenzgene GAPDH und beta-Actin untersucht, sodass im Anschluss eine korrekte Auswertung möglich war. Diese wurde ebenfalls mit dem Programm vom LightCycler480 II durchgeführt.

2.2.5.6 Bestimmung von Primer-Effizienzen

Für die Bestimmung der Primer-Effizienzen wurde zunächst ein cDNA-Pool, bestehend aus jeweils 20 µl cDNA von 8 verschiedenen Zelllinien, hergestellt. Die verwendeten Zelllinien waren UM-UC-6, UM-UC 9 und UM-UC 14, RT4 und RT-112, sowie HT-1197, T24 und HBLAK. Mit diesem cDNA-Pool wurde dann eine siebenstufige Verdünnungsreihe hergestellt, wobei von der einen zur nächsten Stufe jeweils im Verhältnis 1:2 mit 10 µl NTW verdünnt wurde. Diese sieben Verdünnungen von unverdünnt bis zum Verhältnis 1:64 stellten dann die sieben Proben da, die wie in 2.2.5.5 beschrieben in jeweils eine Spalte über zwei Zeilen auf die 96-Well-Platte pipettiert wurden. Für den zu untersuchenden Primer wurde wie in 2.2.5.5 erläutert ein Master-Mix hergestellt, welcher dann in den zwei Zeilen mit den Proben aufgetragen wurde. Unten rechts auf der 96-Well-Platte wurde auch hier eine Positivkontrolle mit smc und ACTA_2, sowie eine Negativkontrolle mit NTW und dem untersuchten Primer, aufgetragen. Nachdem die 96-Well-Platte vorbereitet war, lief die qRT-PCR über 39 Zyklen bei der benötigten Temperatur. Im Anschluss wurde mit Hilfe des LightCycler® 480 II-Programms die Effizienz bestimmt. Dieses hier beschriebene Vorgehen wurde zwei weitere Male an zwei verschiedenen Tagen unter den möglichst gleichen Bedingungen erneut durchgeführt. Aus den drei ermittelten Effizienzen wurde schließlich der Mittelwert gebildet und jener Wert gilt nun als Effizienz des Primers. Ein Primer mit einer 100%igen Effizienz würde eine Verdopplung der untersuchten Gensequenz

bei jedem Zyklus bewirken und damit eine Effizienz von 2 aufweisen. Als gut zu bewerten ist daher eine Effizienz zwischen 1,7 und 2,0.

2.2.5.7 Gelelektrophorese

Um das 2%ige Agarosegel für die Gelelektrophorese herzustellen, wurde 1 g Agarose in einem Erlenmeyerkolben abgewogen und 50 ml 1:20 verdünnter TBE-Puffer sowie ein Rührfisch hinzugegeben. Der Kolben wurde mit Frischhaltefolie abgedeckt und in einer Mikrowelle auf höchster Stufe so lange aufgeköcht bis keine Schlieren mehr zu sehen waren. Danach wurde der Erlenmeyerkolben auf einen Rührer gestellt, 5 µl Biotium hinzugefügt und die Flüssigkeit auf ca. 60 °C abgekühlt. Das Gel wurde dann in das Gelsystem gegossen, um es für 20-30 Minuten auspolymerisieren zu lassen. Anschließend wurde das Gelsystem mit TBE-Puffer aufgefüllt. 10 µl des zu untersuchenden PCR-Produkts aus der 96-Well-Platte wurde mit 4 µl Ladepuffer gemischt und 10 µl dieser Mischung in eine Tasche des Gels aufgetragen. Um später die Bandenlänge ablesen zu können wurde in eine Tasche 5 µl eines 100 Bp-Ladder-Mixes pipettiert. Als alle Proben aufgetragen waren, wurden die Plus- und Minuskabel an den passenden Stellen in dem Elektrophorese-Netzgerät eingesteckt und eine Spannung von 100 Volt eingestellt. Nun lief die blaue Bande aus dem PCR-Produkt vom Minus-Ende zum Plus-Ende, da die Phosphatreste der DNA negativ geladen sind. Dabei wanderten kleinere DNA-Fragmente schneller und weiter durch das Gel als Größere. Hat die Bande ca. $\frac{3}{4}$ des Gels durchlaufen, wurde die Spannung wieder entfernt. Mit Hilfe eines UV-Transilluminator und durch Vergleichen mit der mitgelaufenen Ladder-Bande konnte dann die Größe des PCR-Produkts in Basenpaaren abgelesen werden. Ein Primer repliziert im Rahmen der PCR eine bestimmte Gensequenz (siehe Tabelle 6), welche für eine bestimmte Anzahl an Basenpaaren codiert. So bilden die PCR-Produkte während der Gelelektrophorese entsprechend ihrer Basenpaarmenge spezifische Banden, welche mit der erwarteten Anzahl an Basenpaaren verglichen werden kann. Stimmen diese überein, so kann davon ausgegangen werden, dass der Primer funktioniert.

3 Ergebnisse

3.1 Vorarbeiten zur Etablierung der Methode 1 (qRT-PCR)

Um die Expression von Nectin-4 und Trop-2 in der RNA der Zelllinien und BCOs analysieren zu können, wurden Protokolle für die qRT-PCR mit Nectin-4- und Trop-2-Primern im Labor etabliert.

Dafür wurde eine Mischung aus der cDNA von verschiedenen Tumorzelllinien (UM-UC-6, UM-UC-9, UM-UC-14, RT4, RT-112, T24, HT1197, HBLAK) angefertigt und jener cDNA-Pool für PCRs mit den verschiedenen Primern verwendet.

In den Abbildungen 3 – 5 sind die Schmelzkurven der untersuchten Primer zu sehen. Der zuerst verwendete Nectin-4-Primer zeigte eine inhomogene Schmelzkurve (Abbildung 3), woraus geschlossen werden konnte, dass jener nicht funktionierte. Daher wurde ein zweites Protokoll getestet. Die für die weiteren Analysen verwendeten Nectin-4- und Trop-2-Primer wiesen nach der PCR eine homogene Schmelzkurve auf (Abbildung 4 u. 5), weshalb von ihrer Funktionalität ausgegangen wurde. Die Effizienz des funktionierenden Primers für Nectin-4 lag bei 1,74. Die ermittelte Effizienz des Trop-2-Primers lag bei 1,76.

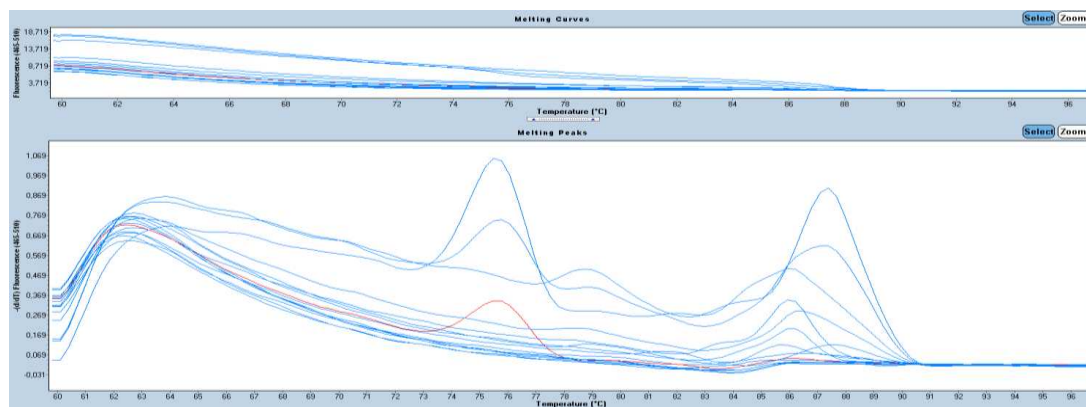


Abbildung 3: Schmelzkurve des nicht-funktionierenden Nectin-4-Primers

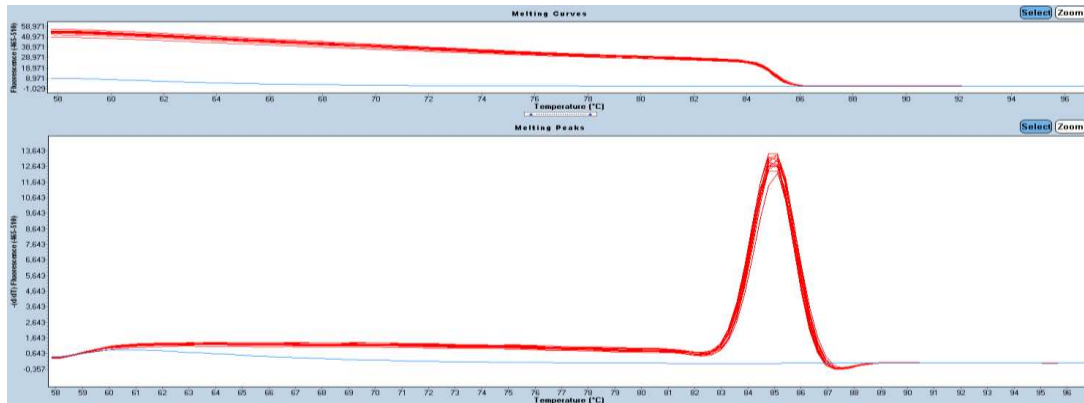


Abbildung 4: Schmelzkurve des verwendeten Nectin-4-Primers

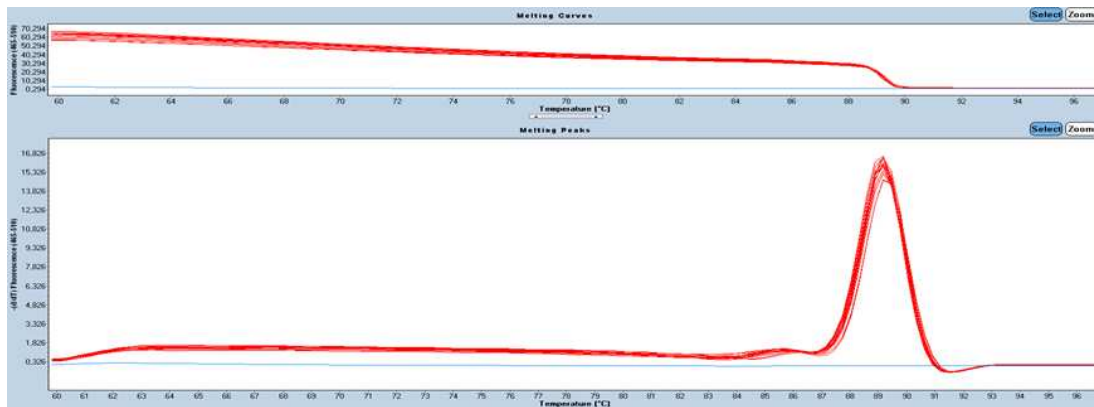


Abbildung 5: Schmelzkurve des verwendeten Trop-2-Primers

In den Abbildungen 3-5 sind die Schmelzkurven der untersuchten Primer zu sehen. Während der PCR mit SybrGreen wird dieser Farbstoff in die DNA-Doppelstränge eingebaut und sorgt dann für ein Fluoreszenzsignal, welches von dem Gerät detektiert werden kann. Die Sequenz, die ein Primer repliziert, hat entsprechend ihres Aufbaus eine spezifische Temperatur, bei der sich die DNA-Doppelstränge voneinander trennen und den fluoreszierenden Farbstoff wieder freisetzen. Daraus resultiert dann eine Abnahme des Fluoreszenzsignals. In jeder der Abbildungen 3-5 sind jeweils zwei Diagramme zu sehen. Bei dem oberen Diagramm wurde die Intensität des Fluoreszenzsignals in den Proben auf der y-Achse gegen die Temperatur in °C im aufsteigenden Verlauf auf der x-Achse aufgetragen. Die x-Achse des unteren Diagramms zeigt ebenfalls die Temperatur in °C. Während hier auf der y-Achse die Steigung der Kurven vom oberen Diagramm aufgetragen wurden. Die Schmelzkurve ist in dem oberen Diagramm zu sehen und weist einen sigmoidalen Verlauf. Der Wendepunkt markiert den so genannten Schmelzpunkt, an dem 50 % der DNA doppelsträngig und 50 % einzelsträngig vorliegen. Je nach Punkt erscheint in dem unteren Diagramm als Spitze im Graphen. Repliziert der PCR-Primer spezifisch eine Zielsequenz, ergeben sich in beiden Diagrammen für jede Probe ähnliche Kurvenverläufe (Abbildung 4 und 5). Erfolgt die Amplifikation hingegen unvollständig und unregelmäßig, ergeben sich für jede Probe verschiedene Kurvenverläufe und kein sequenzspezifischer Schmelzpunkt. Bei derartigem Ergebnis (Abbildung 3) ist von einer eingeschränkten Funktionalität des Primers auszugehen.

Zur weiteren Evaluierung des Protokolls wurde eine Gelelektrophorese mit dem PCR-Produkt der jeweiligen Primer durchgeführt. Der Nectin-4-Primer codiert für eine Sequenz mit 189 bp, während der Trop-2-Primer für eine Sequenz mit 224 bp codiert. Es zeigten sich wie erwartet Banden auf Höhe dieser Basenpaarmengen der Primersequenzen (Abbildung 6). Daraus lässt sich schließen, dass die Primer funktionieren und ihre Zielsequenz spezifisch und zuverlässig replizieren.

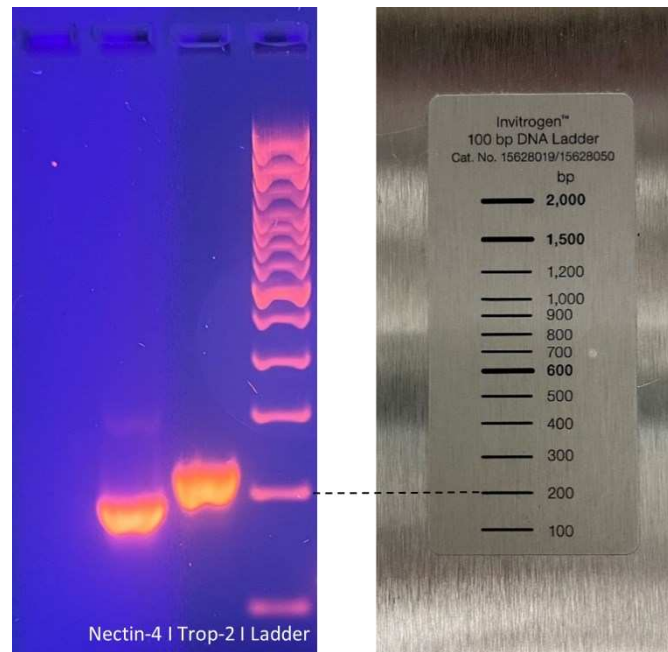


Abbildung 6: Gelelektrophorese mit 100 bp-DNA-Ladder zum Vergleich

In der Abbildung 6 ist die Kontrolle der erwarteten Produktlängen der PCR-Amplifikationen von Nectin-4 (189 bp; links) und Trop-2 (224 bp; Mitte) im Vergleich zur 100 bp-DNA-Ladder (rechts) durch Gelelektrophorese zu sehen. Die Amplifikate entsprechen den erwarteten Produktlängen.

3.2 qRT-PCR an Tumorzelllinien u. Kultivierung geeigneter Zelllinien

Mit den etablierten Protokollen wurden zunächst die Expression von Nectin-4 und Trop-2 mittels qRT-PCR in mehreren Tumorzelllinien bestimmt. In Abbildung 7 sind die PCR-Ergebnisse in einem Säulendiagramm dargestellt. Anhand von diesem Ergebnis wurde eine Auswahl für die anschließende Kultivierung getroffen. Es sollten die zwei Tumorzelllinien mit der höchsten Expression, sowie eine mit niedriger Expression als Negativkontrolle verwendet werden. Kultiviert wurde zunächst in 2D-Kultur und nach einmaligem Passagieren auch in 3D-Kultur. Basierend auf den Ergebnissen dieser qRT-PCR (Abb. 7) wurden UM-UC-6 und RT4

für die anschließende Kultivierung ausgewählt, da jene die meiste Expression von beiden Markern aufwiesen. HBLAK wurde für die Negativkontrolle festgelegt, da diese Zellen sowohl Nectin-4 als auch Trop-2 am wenigsten exprimierten.

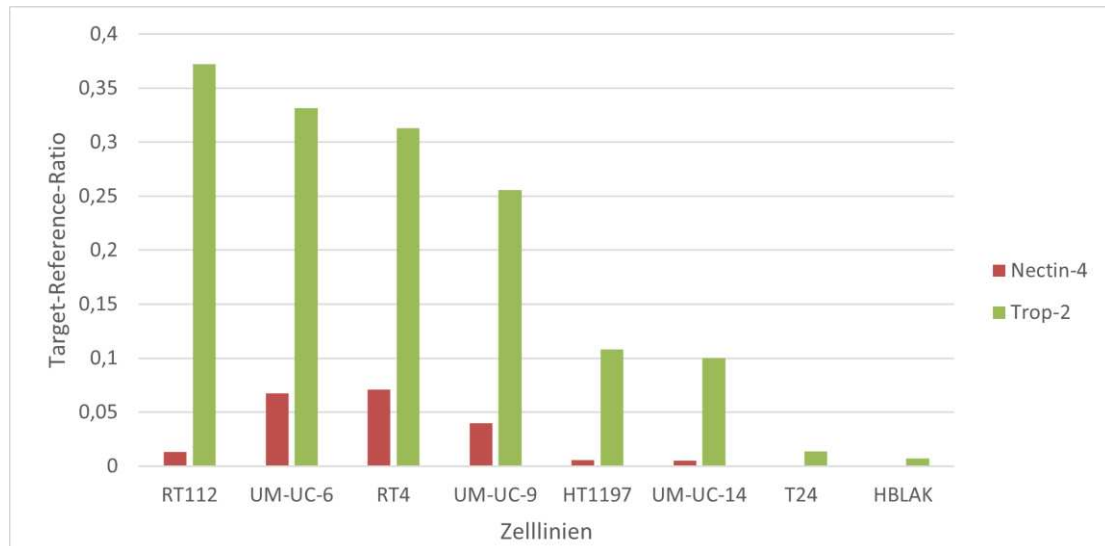


Abbildung 7: Expression von Nectin-4 und Trop-2 in Tumorzelllinien anhand einer qRT-PCR

In diesem Säulendiagramm sind die PCR-Ergebnisse der Expressionsanalyse von Nectin-4 und Trop-2 in Tumorzelllinien dargestellt. Auf der x-Achse stehen die untersuchten Tumorzelllinien und auf der y-Achse sind die Werte der Target-Reference-Ratios aufgetragen. Eine Target-Reference-Ratio beschreibt die Expression des Zielgens im Verhältnis zu der Expression von sogenannten Housekeeping-Genen, wie beispielsweise GAPDH und beta-Actin, die in jeder Zelle exprimiert werden. Dadurch sind die Expressionswerte verschiedener Proben auch bei unterschiedlichem RNA-Gehalt vergleichbar. Eine Target-Reference-Ratio von 0,4 bedeutet z.B., dass die Expression des Zielgens 0,4-fach der Expression des Referenzgens beträgt. Die roten Säulen zeigen die Nectin-4-Expression und die grünen Säulen die Expression von Trop-2. Es ist zu sehen, dass UM-UC-6 und RT4 beide Marker am stärksten exprimieren, während HBLAK Nectin-4 und Trop-2 am wenigsten aufwies.

Die Tumorzelllinien RT4 (Abb. 8), UM-UC-6 (Abb. 9) und HBLAK (Abb. 10) wurden zunächst in einer 2D-Kultur kultiviert. Durch regelmäßiges Mikroskopieren wurde das Zellwachstum kontrolliert, wobei ein flächendeckendes Zusammenwachsen der Tumorzellen beobachtet werden konnte (Abb. 8-10).

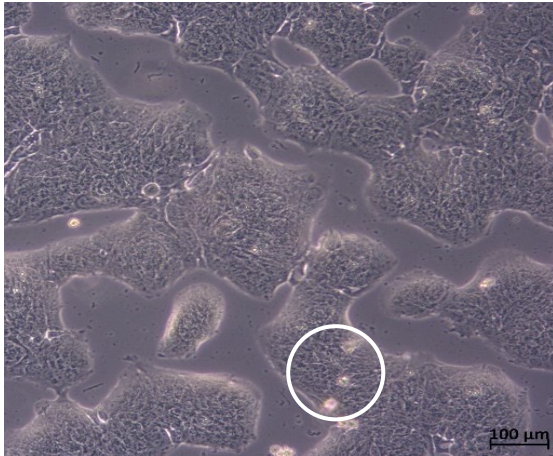


Abbildung 8: RT4 in 2D-Kultur am 4. Tag

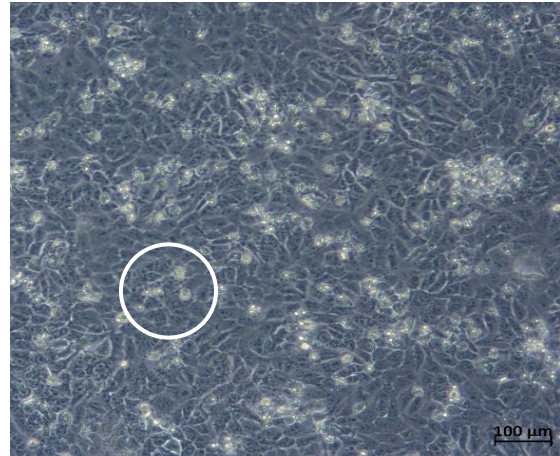


Abbildung 9: UM-UC-6 in 2D-Kultur am 4. Tag

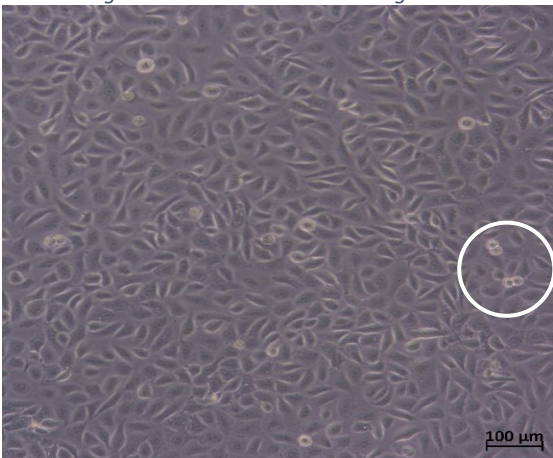


Abbildung 10: HBLAK in 2D-Kultur am 7. Tag

Die Abbildungen 8-10 zeigen Fotos der kultivierten Tumorzelllinien RT4 (Abb. 8), UM-UC-6 (Abb. 9) und HBLAK (Abb. 10) in der 2D-Kultur am 4. bzw. 7. Tag unter dem Mikroskop mit einer 100 µm-Legende in der unteren, rechten Ecke. Da nahezu überall, nebeneinander liegend Zellen zu sehen sind, kann davon ausgegangen werden, dass die Tumorzelllinien innerhalb weniger Tage flächendeckend zusammengewachsen sind. Die helleren Zellen (bspw. mit weißem Kreis markiert) sind abgestorbene Zellen, die nicht mehr adhären und sich frei im Medium befinden.

Bei dem zweiten Mal Passagieren der 2D-Kultur wurde ein Anteil der Tumorzellen in die 3D-Kultur überführt. Die Tumorzelllinien formten in der 3D-Kultur nach 4/5 Tagen Zellverbände, welche in den folgenden Tagen weiterwuchsen. Nach sieben Tagen hatten jene organoidähnliche Zellverbände mit einer Größe von teilweise über 100 µm im Durchmesser gebildet (Abb. 11-16).

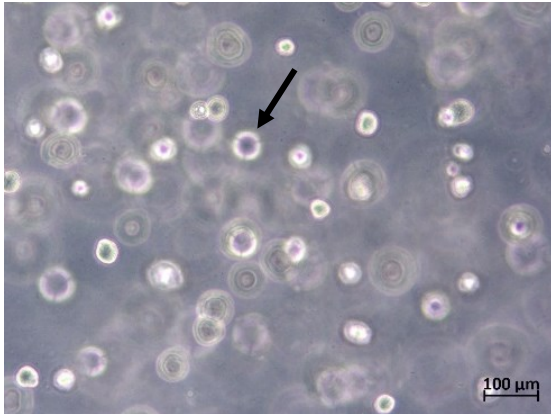


Abbildung 11: RT4 in 3D-Kultur am 4. Tag

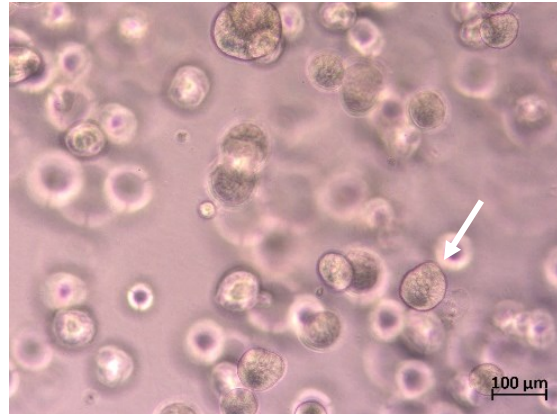


Abbildung 12: RT4 in 3D-Kultur am 7. Tag

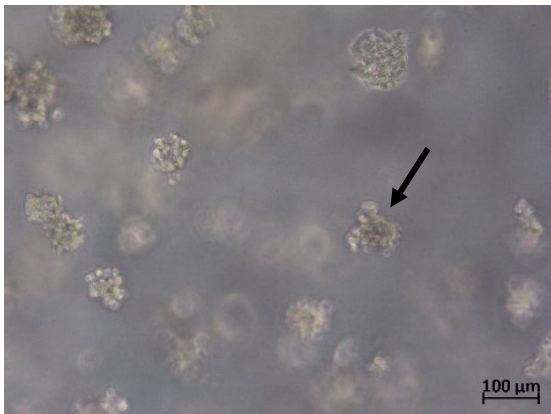


Abbildung 13: UM-UC-6 in 3D-Kultur am 5. Tag

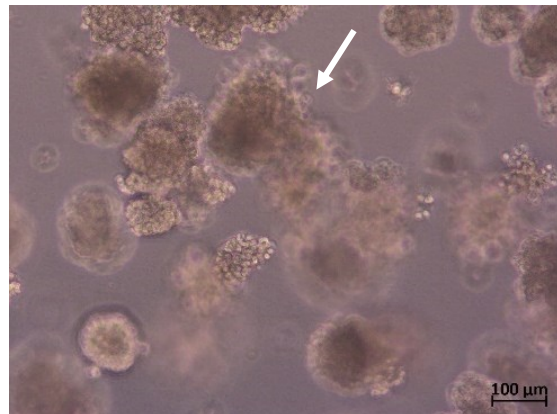


Abbildung 14: UM-UC 6 in 3D-Kultur am 7. Tag

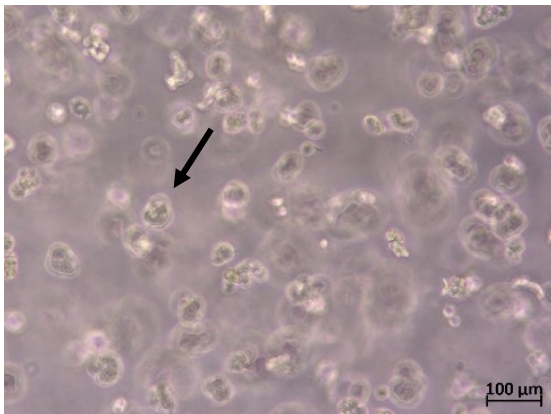


Abbildung 15: HBLAK in 3D-Kultur am 4. Tag

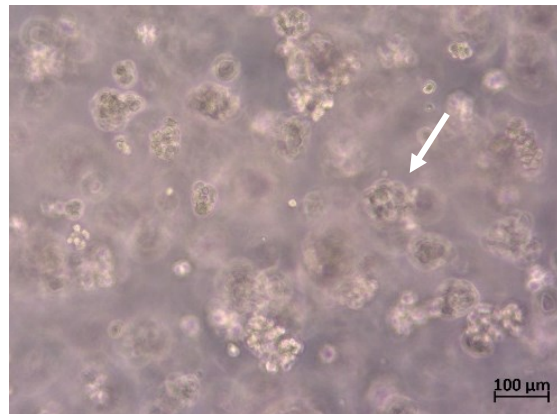


Abbildung 16: HBLAK in 3D-Kultur am 7. Tag

Die Abbildungen 11-16 zeigen Fotos der kultivierten Tumorzelllinien RT4 (Abb. 11 u. 12), UM-UC-6 (Abb. 13 u. 14) und HBLAK (Abb. 15 u. 16) in der 3D-Kultur einmal am 4. bzw. 5. (Abb. 11, 13, 15), sowie am 7. Tag (Abb. 12, 14, 16) unter dem Mikroskop mit einer 100 μm-Legende in der unteren, rechten Ecke. Es ist zu sehen, dass die Tumorzelllinien in der 3D-Kultur nach 4/5 Tagen Zellverbände formten (bspw. schwarze Pfeile), welche in den folgenden Tagen weiterwuchsen. Am 7. Tag sind organoidähnliche Zellverbände (bspw. weiße Pfeile) mit einer Größe von teilweise über 100 μm im Durchmesser erkennbar. Da es sich um eine Mikroskopie einer 3D-Kultur handelt, sind im Hintergrund weitere Zellformationen unscharf zu erkennen.

3.3 Vorarbeiten zur Etablierung der Methode 2 (IFL)

Aus den 2D- und 3D-Kulturen wurden Paraffinblöcke und anschließend Paraffinschnitte auf Objektträgern angefertigt. Jene wurden verwendet, um mittels Immunhistochemiefärbungen (Abb. 17-34) die Protokolle für Immunfärbungen mit Antikörpern gegen Nectin-4 und Trop-2 zu etablieren. Anschließend wurden diese für Immunfluoreszenzfärbungen (Abb. 35-52) verwendet, um auch dort deren Funktionalität sicherzustellen.

3.3.1 Immunhistochemiefärbungen an Zelllinien

Bei den Immunhistochemiefärbungen an Paraffinschnitten von Proben der Zellkulturen (Abb. 17-34) färbten die verwendeten Antikörper die Marker Nectin-4 und Trop-2 bei den Proben von RT4 und UM-UC-6 zuverlässig in braun an (Abb. 17-20, Abb. 23-26). Erkennbar war sowohl eine membranöse (bspw. Abb. 20) als auch zytoplasmatische (bspw. Abb. 18) Anfärbung der Marker. Die Zellkörper zeigten sich durch Hämatoxylin bläulich. Außerdem erfolgte jeweils eine Färbung ohne Antikörper als Negativkontrolle (Abb. 21+22, Abb. 27+28, Abb. 33+34). Die Negativkontrolle wies wie erwartet keine bräunliche Färbung auf. Bei HBLAK-Proben wurde wie erwartet kaum Nectin-4 und Trop-2 bräunlich angefärbt (Abb. 29-32). Basierend auf diesen Färbeergebnissen wurde die Konsequenz gezogen, dass sich die verwendeten Anti-Nectin-4- und Anti-Trop-2-Antikörper sowohl in der 2D-Kultur als auch in der 3D-Kultur für die Immunhistochemie eignen.

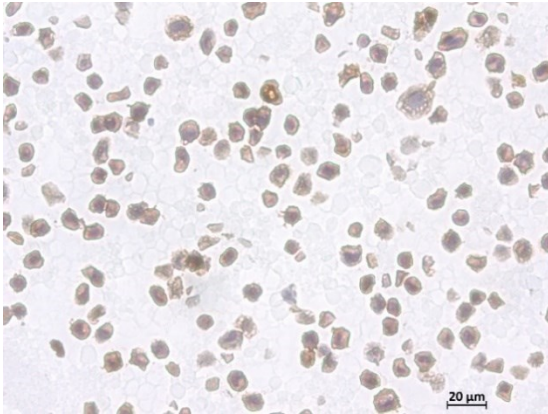


Abbildung 17: IHC mit Anti-Nectin-4-AK in 2D-Kultur von RT4

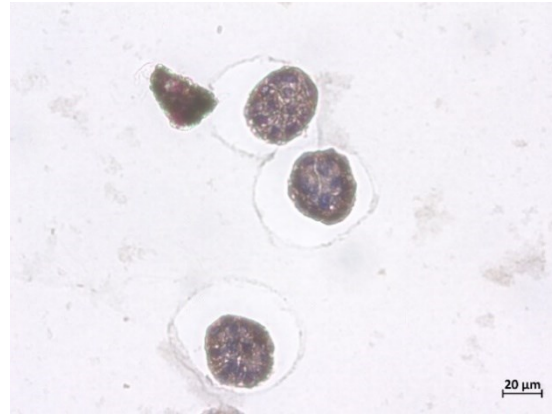


Abbildung 18: IHC mit Anti-Nectin-4-AK in 3D-Kultur von RT4

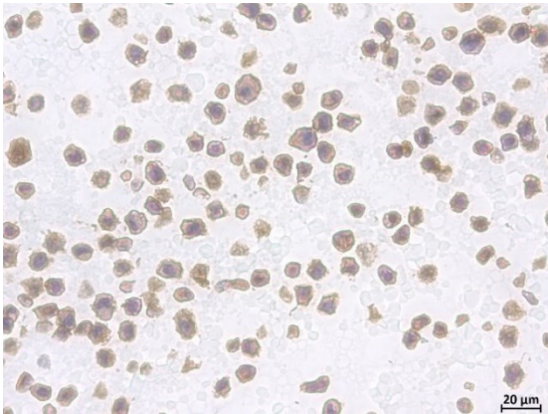


Abbildung 19: IHC mit Anti-Trop-2-AK in 2D-Kultur von RT4

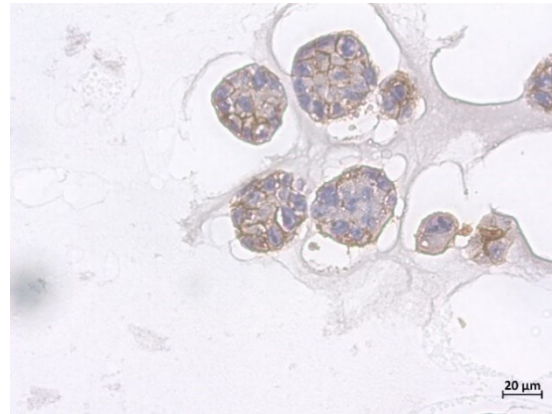


Abbildung 20: IHC mit Anti-Trop-2-AK in 3D-Kultur von RT4

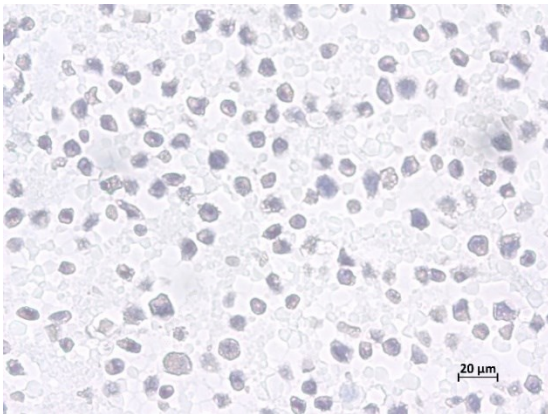


Abbildung 21: Negativkontrolle der IHC in 2D-Kultur von RT4

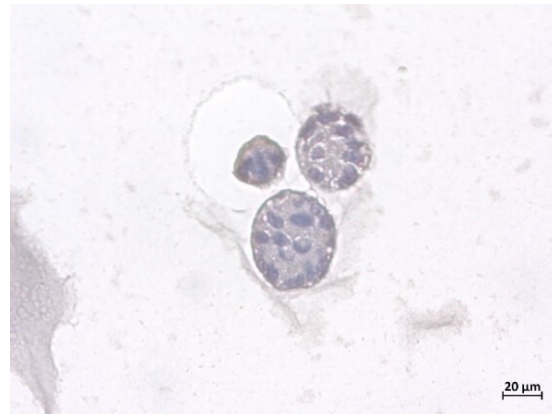


Abbildung 22: Negativkontrolle der IHC in 3D-Kultur von RT4

Die Abbildungen 17-22 zeigen die Ergebnisse der Immunhistochemiefärbungen an Paraffinschnitten der Tumorzelllinie RT4 in 2D- und in 3D-Kultur mit einem 20 µm-Maßstab. Untersucht wurde die Nectin-4- und die Trop-2-Expression (Abb. 17-20), welche bei der Immunhistochemiefärbung braun erscheint. Außerdem erfolgte eine Färbung ohne Antikörper als Negativkontrolle. Die Zellkerne sind mittels Hämatoxylin in blau angefärbt. Erkennbar ist eine membranbetonte (bspw. Abb. 20), aber auch zytosolisch vorkommende (bspw. Abb. 18) Expression bei der Marker. Die Negativkontrolle (Abb. 21+22) weist keine bräunliche Färbung auf.

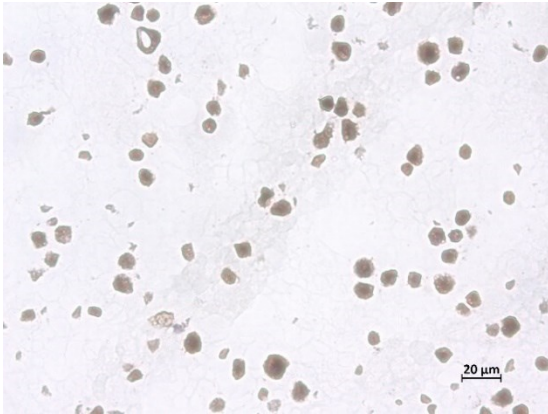


Abbildung 23: IHC mit Anti-Nectin-4-AK in 2D-Kultur von UM-UC-6

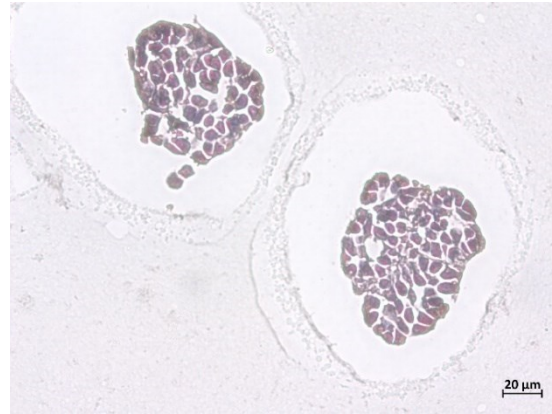


Abbildung 24: IHC mit Anti-Nectin-4-AK in 3D-Kultur von UM-UC-6

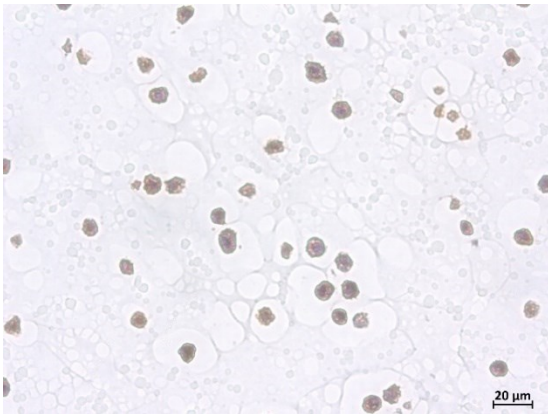


Abbildung 25: IHC mit Anti-Trop-2-AK in 2D-Kultur von UM-UC-6

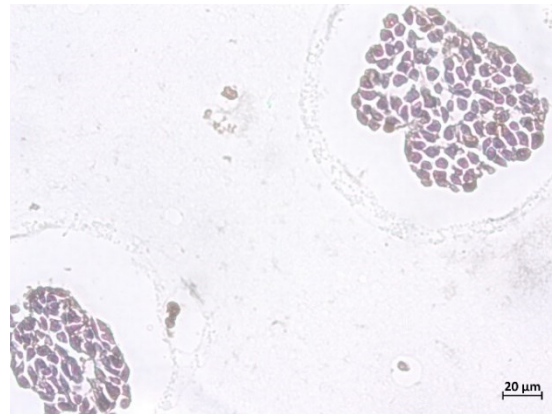


Abbildung 26: IHC mit Anti-Trop-2-AK in 3D-Kultur von UM-UC-6

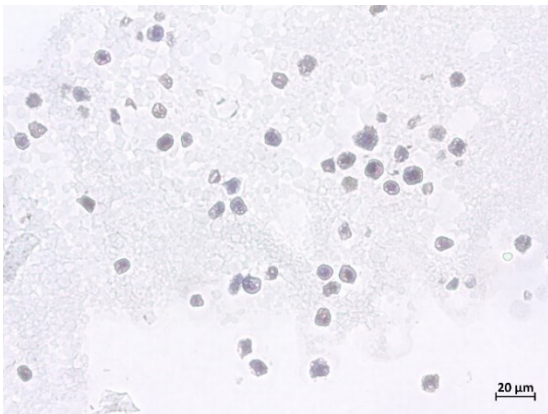


Abbildung 27: Negativkontrolle der IHC in 2D-Kultur von UM-UC-6

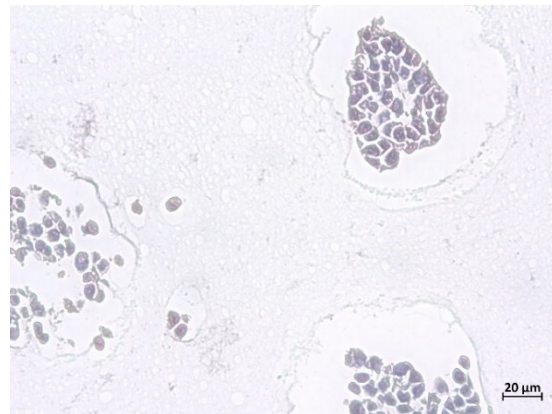


Abbildung 28: Negativkontrolle der IHC in 3D-Kultur von UM-UC-6

Auf den Abbildungen 23-28 sind die Ergebnisse der Immunhistochemiefärbungen an Paraffinschnitten der Tumorzelllinie UM-UC-6 in 2D- und in 3D-Kultur mit einem 20 µm-Maßstab dokumentiert. Die Zellkerne sind mittels Hämatoxylin in blau angefärbt. Die Färbungen mit Anti-Nectin-4- und Anti-Trop-2-Antikörper (Abb. 23-26) wiesen eine positive Expression durch bräunliche Anfärbung nach. Erkennbar ist diese Expression überwiegend im Bereich des Zytoplasms der Zellen. Bei der Negativkontrolle (Abb. 27+28) ohne Antikörper ist diese bräunliche Färbung nicht erkennbar.

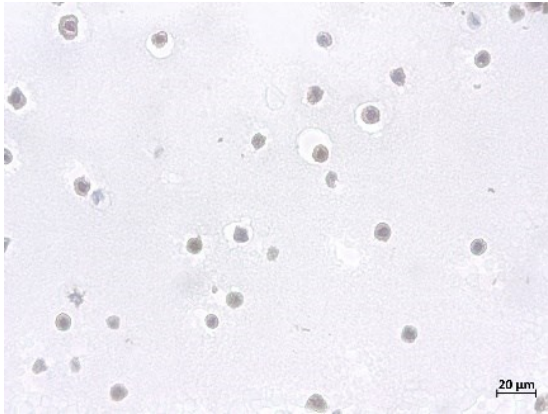


Abbildung 29: IHC mit Anti-Nectin-4-AK in 2D-Kultur von HBLAK

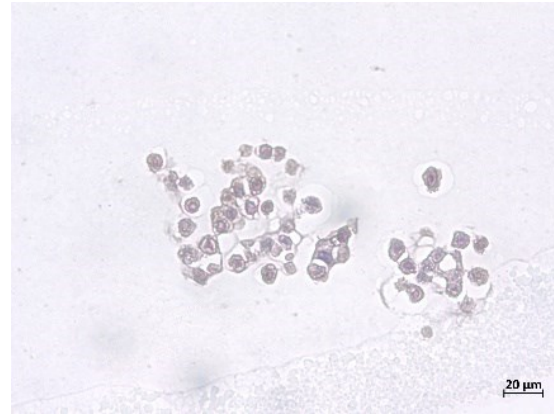


Abbildung 30: IHC mit Anti-Nectin-4-AK in 3D-Kultur von HBLAK

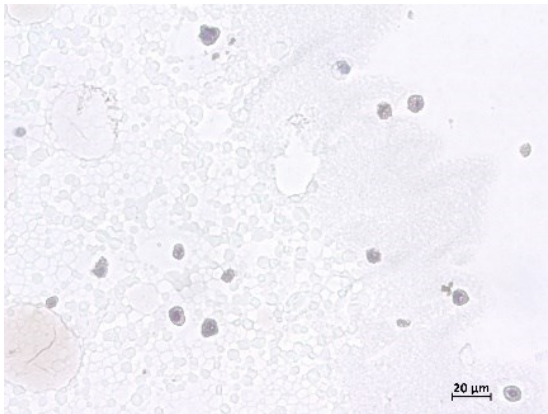


Abbildung 31: IHC mit Anti-Trop-2-AK in 2D-Kultur von HBLAK

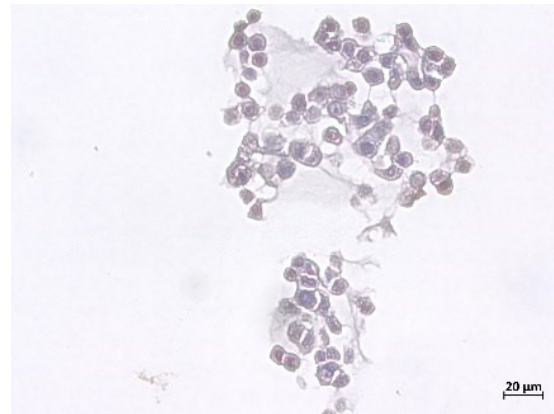


Abbildung 32: IHC mit Anti-Trop-2-AK in 3D-Kultur von HBLAK

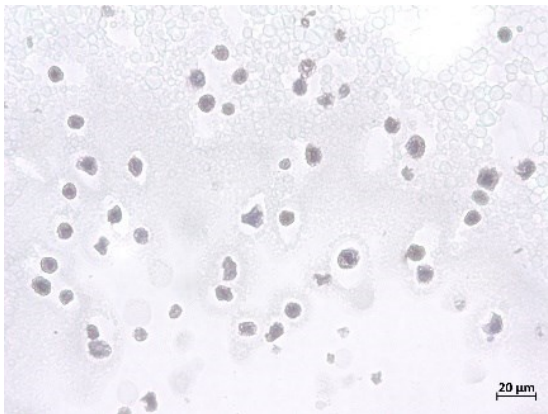


Abbildung 33: Negativkontrolle der IHC in 2D-Kultur von HBLAK

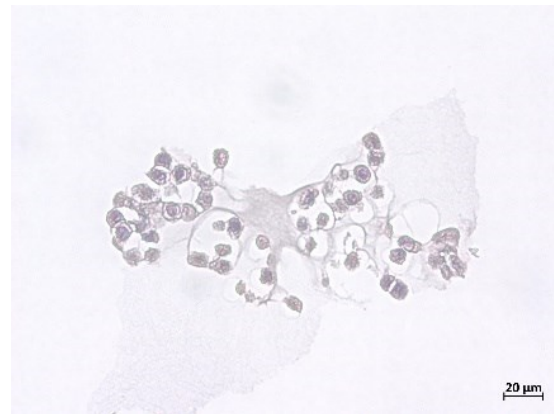


Abbildung 34: Negativkontrolle der IHC in 3D-Kultur von HBLAK

In den Abbildungen 29 – 34 sind die Ergebnisse der Immunhistochemiefärbungen an Paraffinschnitten der HBLAKs in 2D- und in 3D-Kultur mit einem 20 µm-Maßstab zu sehen. Die Zellkerne sind mittels Hämatoxylin in blau angefärbt. Eine positive Expression von Nectin-4 bzw. Trop-2 würde sich auch hier durch eine bräunliche Anfärbung in Erscheinung treten. Es fällt auf, dass die Färbungen mit Anti-Nectin-4- bzw. Anti-Trop-2-Antikörper (Abb. 29-32) dem Färbeargebnis der Negativkontrolle (Abb. 33+34) ähneln und keine bräunliche Verfärbung aufweisen. Demnach exprimieren die HBLAK-Proben wie erwartet kein Nectin-4 oder Trop-2.

3.3.2 Immunfluoreszenzfärbungen an Zelllinien

Im Rahmen der Immunfluoreszenzfärbung (Abb. 35-52) dienten die Antikörper als Primärantikörper und zeigten mit Hilfe des fluoreszierenden Sekundärantikörper die Expression von Nectin-4 bzw. Trop-2 in grün an. Die Zellkerne fluoreszierten in blau durch die Anfärbung mit DAPI. Auch hier konnte sowohl eine membranäre (bspw. Abb. 38) als auch eine zytoplasmatische (bspw. Abb. 42) Anfärbung der Marker beobachtet werden. Die Nectin-4- und Trop-2-exprimierenden Tumorzelllinien RT4 (Abb. 35-38) und UM-UC-6 (Abb. 41-44) zeigten wie erwartet grüne Fluoreszenz. Während HBLAK (Abb. 47-50) als Negativkontrolle ohne Nectin-4- und Trop-2-Expression erwartungsgemäß nur sehr wenig grün fluoreszierte, was wahrscheinlich auf ein Färbeartefakt (bspw. Abb. 40) zurückzuführen ist. Jenes Artefakt entsteht möglicherweise dadurch, dass Reste vom Sekundärantikörper, auch ohne einen Primärantikörper gebunden zu haben, auf dem Objektträger verbleiben.

Basierend auf diesen Färbeergebnissen wurden die verwendeten Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbungen sowohl an 2D-, als auch 3D-Kulturproben als geeignet eingestuft.

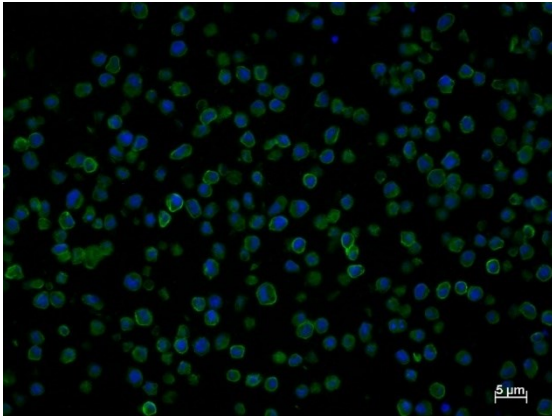


Abbildung 35: IFL mit Anti-Nectin-4-AK in 2D-Kultur von RT4

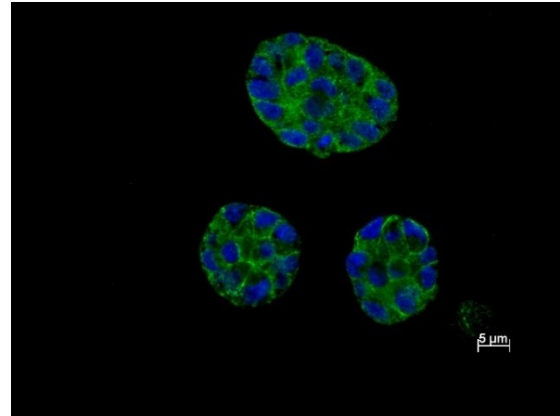


Abbildung 36: IFL mit Anti-Nectin-4-AK in 3D-Kultur von RT4

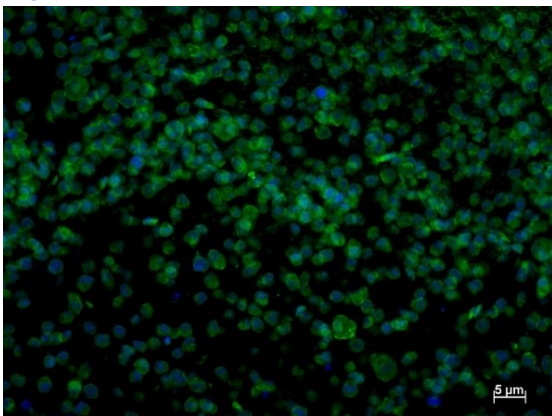


Abbildung 37: IFL mit Anti-Trop-2-AK in 2D-Kultur von RT4

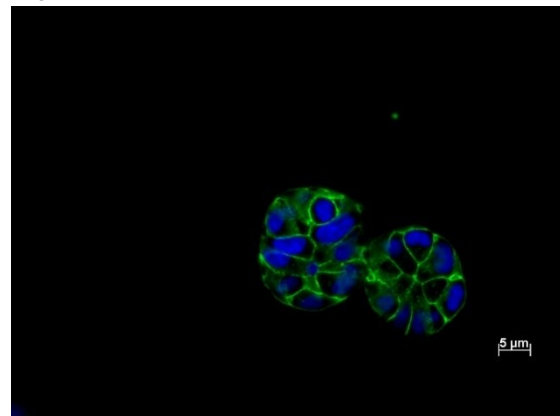


Abbildung 38: IFL mit Anti-Trop-2-AK in 3D-Kultur von RT4

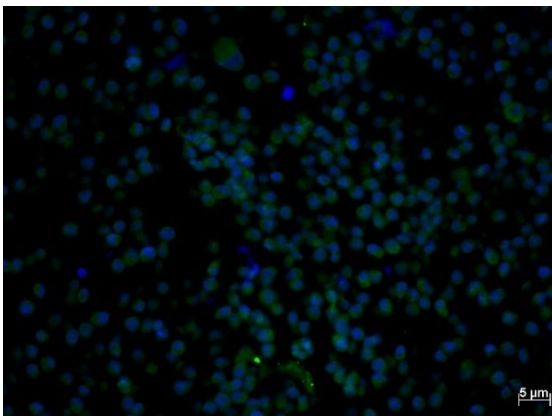


Abbildung 39: Negativkontrolle der IFL in 2D-Kultur von RT4

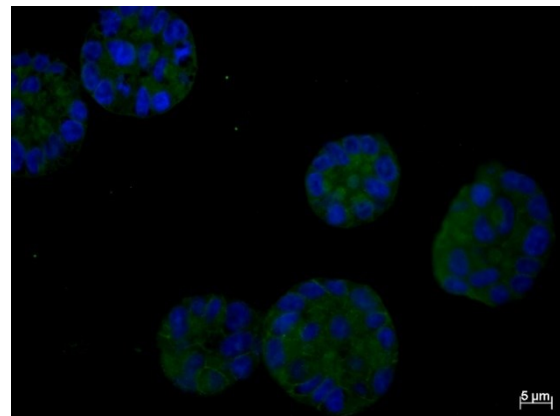


Abbildung 40: Negativkontrolle der IFL in 3D-Kultur von RT4

Die Abbildungen 35–40 zeigen die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen an Paraffinschnitten der Tumorzelllinie RT4 in 2D- und in 3D-Kultur mit einem 5 µm-Maßstab. Untersucht wurde die Nectin-4- und die Trop-2-Expression (Abb. 35-38), welche bei der Immunfluoreszenzfärbung grün erscheint. Die Zellkerne sind mittels DAPI in blau angefärbt. Erkennbar ist hier eine membran-betonte (bspw. Abb. 38), aber auch zytosolisch vorkommende (bspw. Abb. 36) Expression beider Marker. Außerdem erfolgte eine Färbung ohne Primärantikörper als Negativkontrolle (Abb. 39+40). Die Negativkontrolle weist wie erwartet lediglich eine dezente Grünfärbung auf, welche sich als Färbeartefakt bewerten lässt.

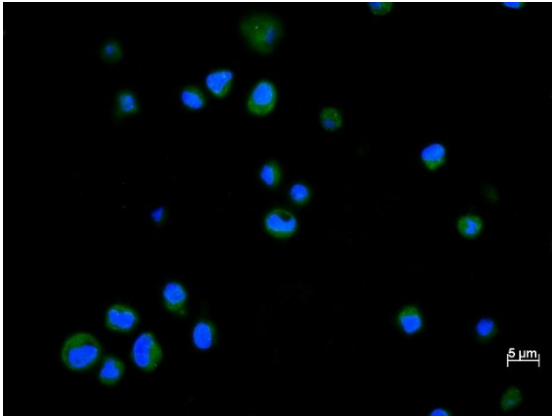


Abbildung 41: IFL mit Anti-Nectin-4-AK in 2D-Kultur von UM-UC-6

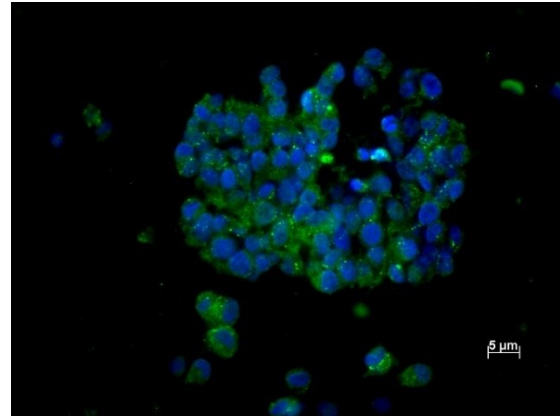


Abbildung 42: IFL mit Anti-Nectin-4-AK in 3D-Kultur von UM-UC-6

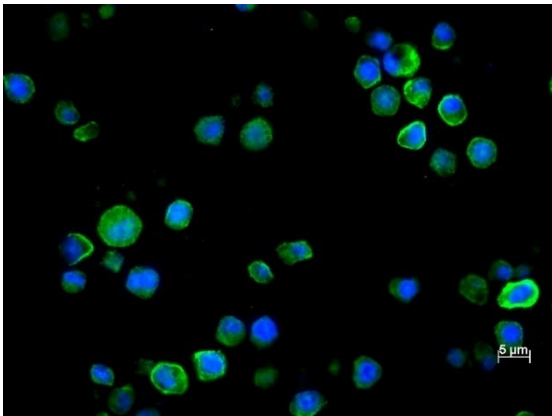


Abbildung 43: IFL mit Anti-Trop-2-AK in 2D-Kultur von UM-UC-6

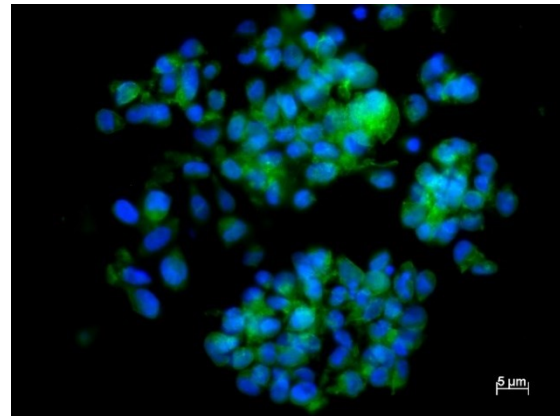


Abbildung 44: IFL mit Anti-Trop-2-AK in 3D-Kultur von UM-UC-6

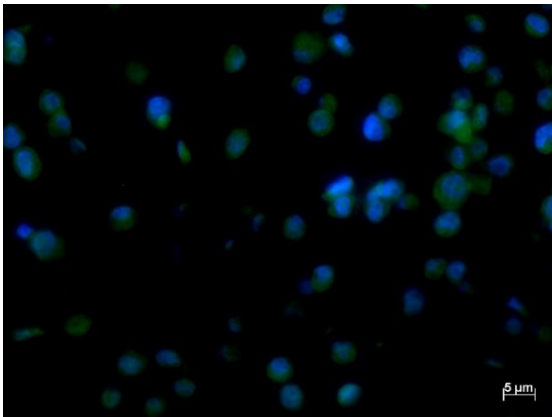


Abbildung 45: Negativkontrolle der IFL in 2D-Kultur von UM-UC-6

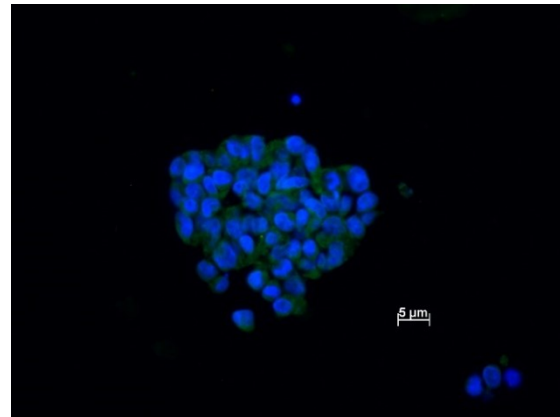


Abbildung 46: Negativkontrolle der IFL in 3D-Kultur von UM-UC-6

Auf den Abbildungen 41-46 sind die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen an Paraffinschnitten der Tumorzelllinie UM-UC-6 in 2D- und in 3D-Kultur mit einem 5 µm-Maßstab dokumentiert. Die Zellkerne sind mittels DAPI in blau angefärbt. Die Färbungen mit Anti-Nectin-4- und Anti-Trop-2-Antikörper (Abb. 41-44) wiesen eine positive Expression durch grünliche Anfärbung nach. Erkennbar ist diese Expression überwiegend im Bereich des Zytoplasmas der Zellen. Bei der Negativkontrolle (Abb. 45+46) ohne Antikörper ist keine als positiv zu bewertende grünliche Färbung erkennbar.

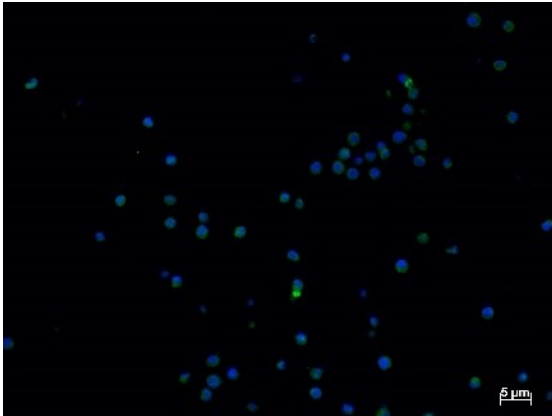


Abbildung 47: IFL mit Anti-Nectin-4-AK in 2D-Kultur von HBLAK

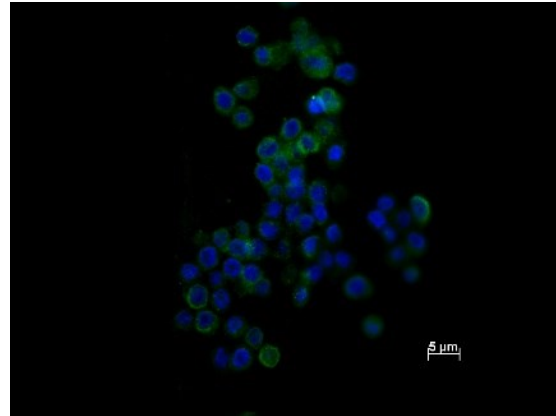


Abbildung 48: IFL mit Anti-Nectin-4-AK in 3D-Kultur von HBLAK

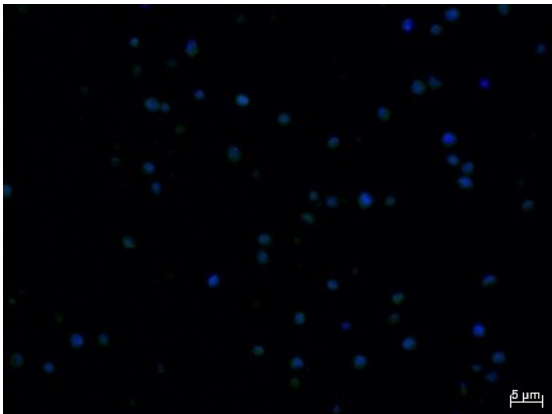


Abbildung 49: IFL mit Anti-Trop-2-AK in 2D-Kultur von HBLAK

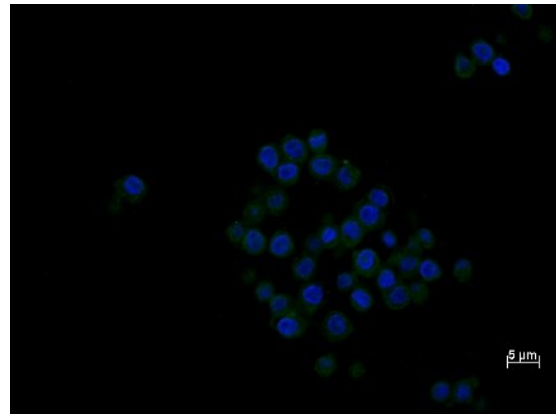


Abbildung 50: IFL mit Anti-Trop-2-AK in 3D-Kultur von HBLAK

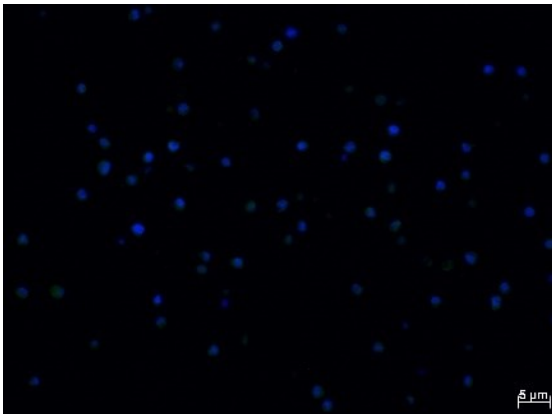


Abbildung 51: Negativkontrolle der IFL in 2D-Kultur von HBLAK

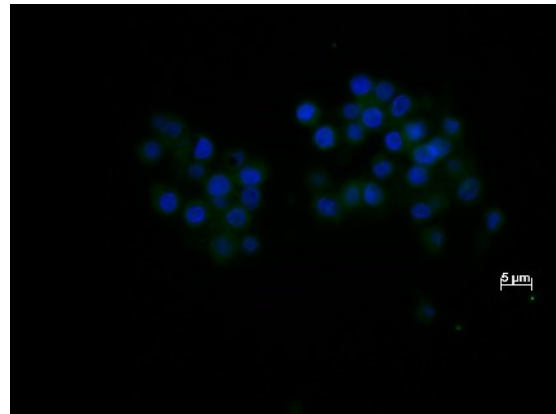


Abbildung 52: Negativkontrolle der IFL in 3D-Kultur von HBLAK

In den Abbildungen 47-52 sind die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen an Paraffinschnitten der HBLAKs in 2D- und in 3D-Kultur mit einem 5 µm-Maßstab zu sehen. Die Zellkerne sind mittels DAPI in blau angefärbt. Eine positive Expression von Nectin-4 bzw. Trop-2 würde auch hier durch eine grünliche Anfärbung in Erscheinung treten. Insgesamt fällt auf, dass die Färbungen mit Anti-Nectin-4- bzw. Anti-Trop-2-Antikörper (Abb. 47-50) dem Färbeargebnis der Negativkontrolle (Abb. 51+52) ähneln und kaum grüne Verfärbung aufweisen. Demnach exprimieren die HBLAK-Proben wie erwartet kaum Nectin-4 und Trop-2.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Anti-Nectin-4-Antikörper und der Anti-Trop-2-Antikörper sowohl in den 2D-Kulturen als auch in den 3D-Kulturen die Marker bei Expression binden und ein Anfärben ermöglichen. Somit wurde das Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung für die weiteren Analysen erfolgreich etabliert.

3.4 Nachweis der Nectin-4- u. Trop-2-Expression in BCOs und Originaltumoren mittels Immunfluoreszenzfärbung

Nachdem die Protokolle für den Nachweis von Nectin-4 und Trop-2 durch Färbungen etabliert waren, wurden diese eingesetzt, um die BCOs hinsichtlich ihrer Expression zu analysieren. Zudem wurden auch Paraffinschnitte der Originaltumore zum Vergleich gefärbt. Um zwischen normalem Gewebe und Tumor unterscheiden zu können, wurden die von der Pathologie angefertigten HE-Färbungen der Originaltumore zur Tumorlokalisation hinzugezogen und die entsprechenden Stellen fotografiert.

3.4.1 Patientenprobe 1: BCO #140 P2 vs. BCO #140 P10 vs. BCO #140 P23

Diese Probe entstammte von einem männlichen Patienten mit positiver Raucheranamnese, bei dem im Alter von 62 Jahren die Diagnose eines Harnblasenkarzinoms gestellt wurde. Mittels TUR-B wurde der Primärtumor entfernt. Bei dem Eingriff lag eine positive Urinzytologie vor und der Tumor wurde von der Pathologie als G3 high grade eingestuft. Das TNM-Stadium war pT1 + pTis, pN0, cM0, pL1, pV1.

Die HE-Färbung des Originaltumors zeigte ein nicht muskel-invasives Urothelkarzinom, welches in der Pathologie teilweise als low-grade (Abb. 53-55), teilweise als high-grade (Abb. 56-58) eingestuft wurde.

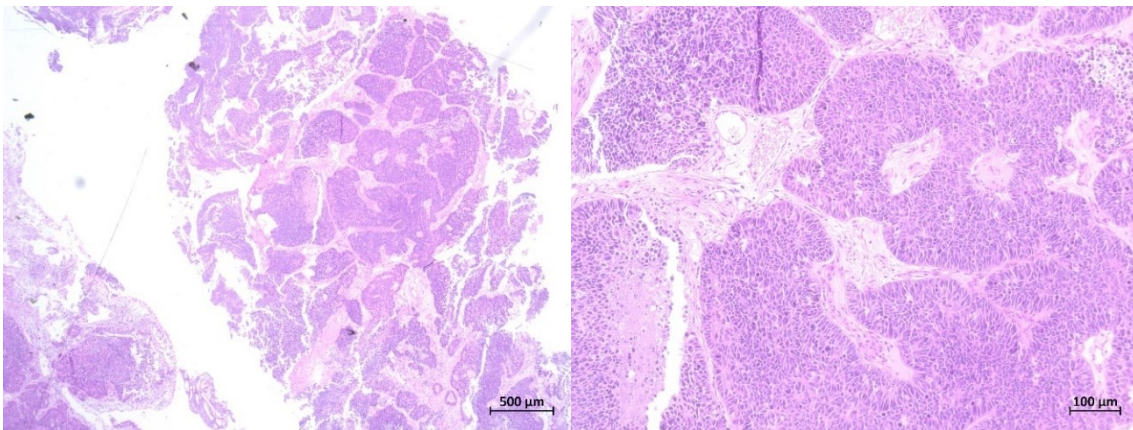


Abbildung 53: HE-Färbung des low grade NMIBC von Probe 1 mit 2,5x-Vergrößerung

Abbildung 54: HE-Färbung des low grade NMIBC von Probe 1 mit 10x-Vergrößerung

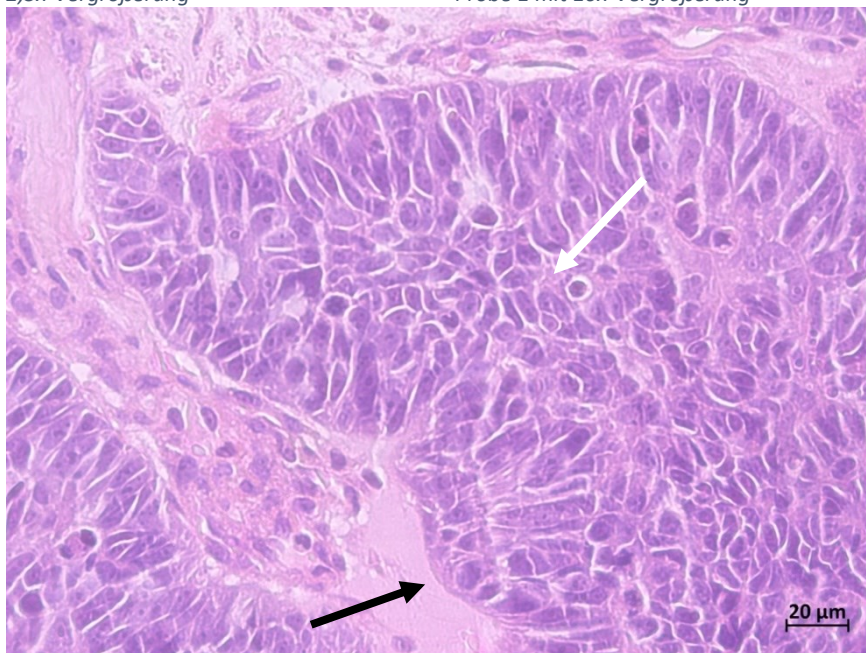


Abbildung 55: HE-Färbung des low grade NMIBC von Probe 1 mit 40x-Vergrößerung

In den Abbildungen 53 – 55 ist ein Ausschnitt des HE-gefärbten Tumorpräparates von Patient 1 mit verschiedenen Vergrößerungen zu sehen. Durch die HE-Färbung erscheinen sauren Strukturen, wie die Zellkerne, bläulich/lila, während basische Zellbestandteile, wie das Zytoplasma und das Kollagen, rötlich/rosa angefärbt sind. In diesem Bereich wurde der Tumor als low grade und nicht-muskelinvasiv eingestuft, da maligne Eigenschaften, wie Aufhebung der Urothel-typischen Schichtung des Epithels und veränderte Kern-Plasma-Relation (bspw. weißer Pfeil in Abb. 55), allerdings kein Durchdringen der epithelbegrenzenden Basalmembran (bspw. schwarzer Pfeil in Abb. 55) erkennbar sind.

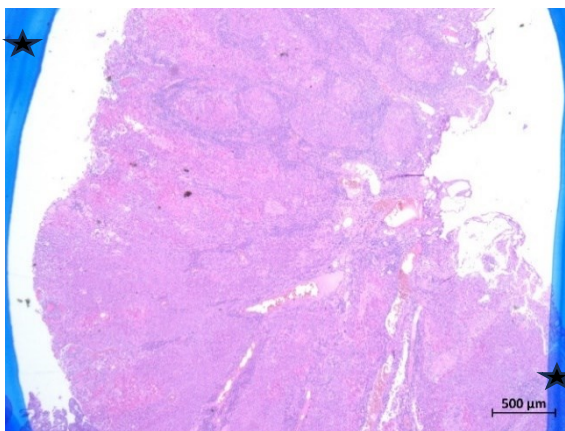


Abbildung 56: HE-Färbung des high grade NMIBC von Probe 1 mit 2,5x-Vergrößerung

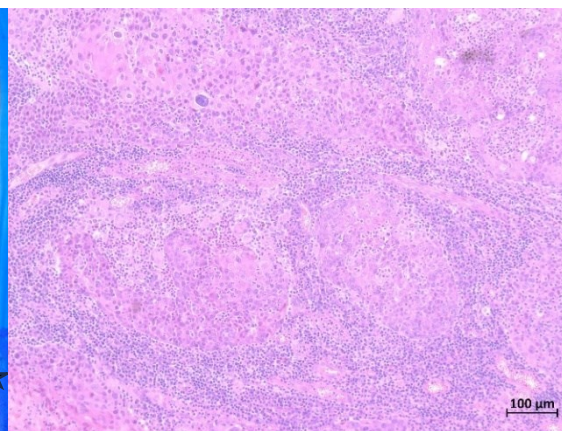


Abbildung 57: HE-Färbung des high grade NMIBC von Probe 1 mit 10x-Vergrößerung

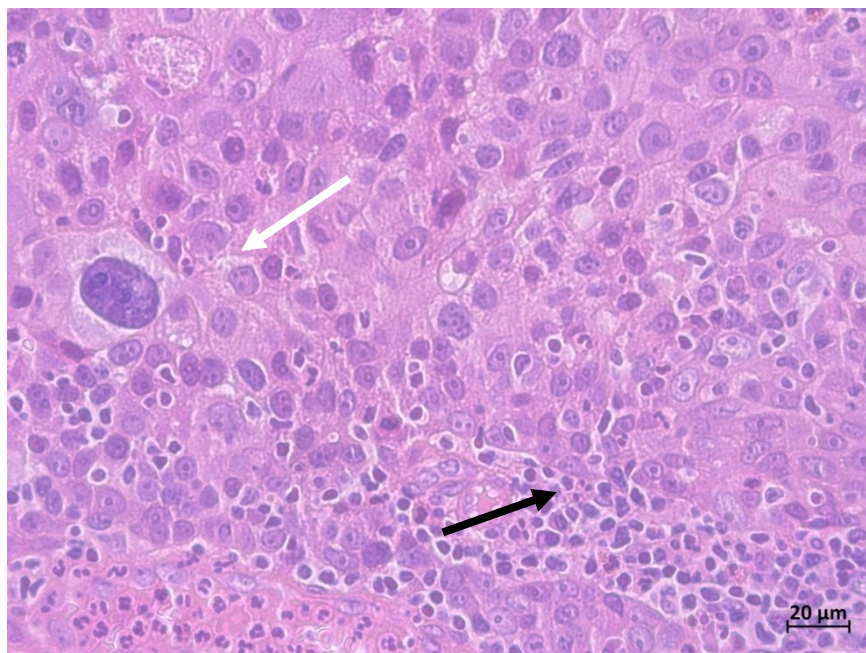


Abbildung 58: HE-Färbung des high grade NMIBC von Probe 1 mit 40x-Vergrößerung

Die Abbildungen 56-58 zeigen einen weiteren Ausschnitt des HE-gefärbten Tumorpräparates von Patient 1 mit verschiedenen Vergrößerungen. Durch die HE-Färbung erscheinen auch hier die Zellkerne bläulich/lila und das Zytoplasma, sowie das Kollagen, rötlich/rosa. In diesem Bereich wurde der Tumor als high grade eingestuft, da ausgeprägte Malignitätskriterien, wie unterschiedliche Zellkonformitäten als Zeichen einer Entdifferenzierung, Aufhebung der Urothel-typischen Schichtung des Epithels und Polaritätsverlust der Zellen erkennbar sind (bspw. weißer Pfeil in Abb. 58). Eine Basalmembran lässt sich teilweise nicht klar abgrenzen (bspw. schwarzer Pfeil in Abb. 58), was für ein Eindringen des Tumors bis in das subepitheliale Bindegewebe spricht (pT1). Die blauen Strukturen in der Abbildung 56 (schwarze Sterne in Abb. 56) sind Teile der Tumormarkierung mit blauem Stift auf dem Objektträger.

Dass diese beiden Bereiche eines Tumors unterschiedlich erscheinen, spricht für eine intratumorale Heterogenität, bei der einige Bereiche des Tumors weniger weit fortgeschritten sind als andere.

In 3D-Kultur teilten sich die Tumorzellen dieser Probe und wuchsen zu bis zu 100 μm großen Organoiden heran (Abb. 59). Jene Kultivierung wurde bis zur 29. Passage fortgesetzt.

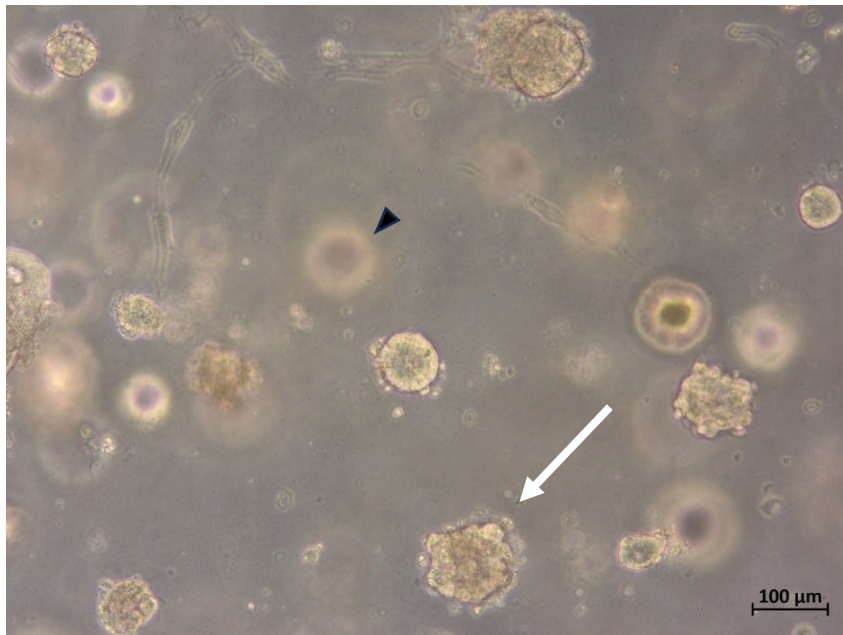


Abbildung 59: BCOs von Probe 1 während der Kultivierung in der 7. Passage an Tag 13

Die Abbildung 59 zeigt ein Foto der BCO-Kultur von Probe 1 in der 7. Passage am 13. Tag unter dem Mikroskop mit einem 100 μm -Maßstab unten rechts. Es sind mehrere runde Zellverbände, die durch Vermehrung der kultivierten Tumorzellen entstanden sind und als Organoiden bezeichnet werden, zu sehen (bspw. weißer Pfeil). Da es sich um eine Mikroskopie einer 3D-Kultur handelt, sind im Hintergrund weitere Zellformationen unscharf zu erkennen (bspw. schwarze Pfeilspitze).

Von den Organoiden der 2., 10. und 23. Passage wurden Paraffinschnitte angefertigt und mit Immunfluoreszenz hinsichtlich ihrer Nectin-4 und Trop-2-Expression untersucht (Tabellen 9-11).

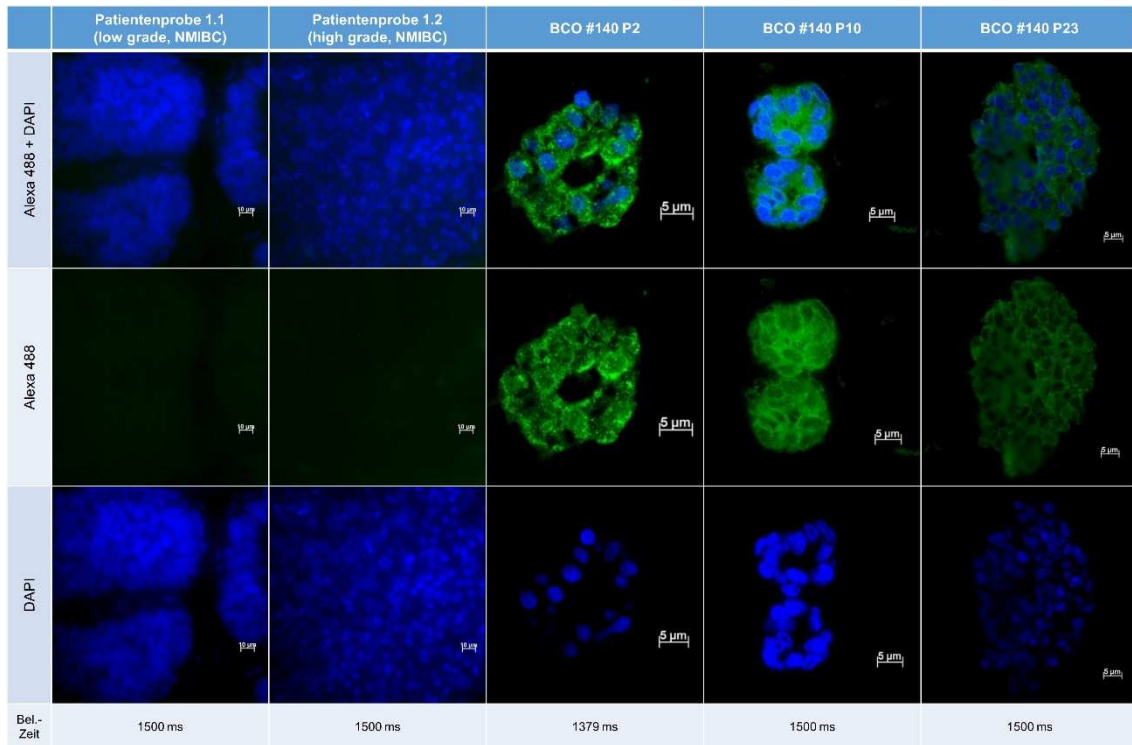


Tabelle 9: Nectin-4-Expression in Originaltumor (Spalte 1 u. 2) und BCOs (Spalte 3-5) von Probe 1 mittels IFL

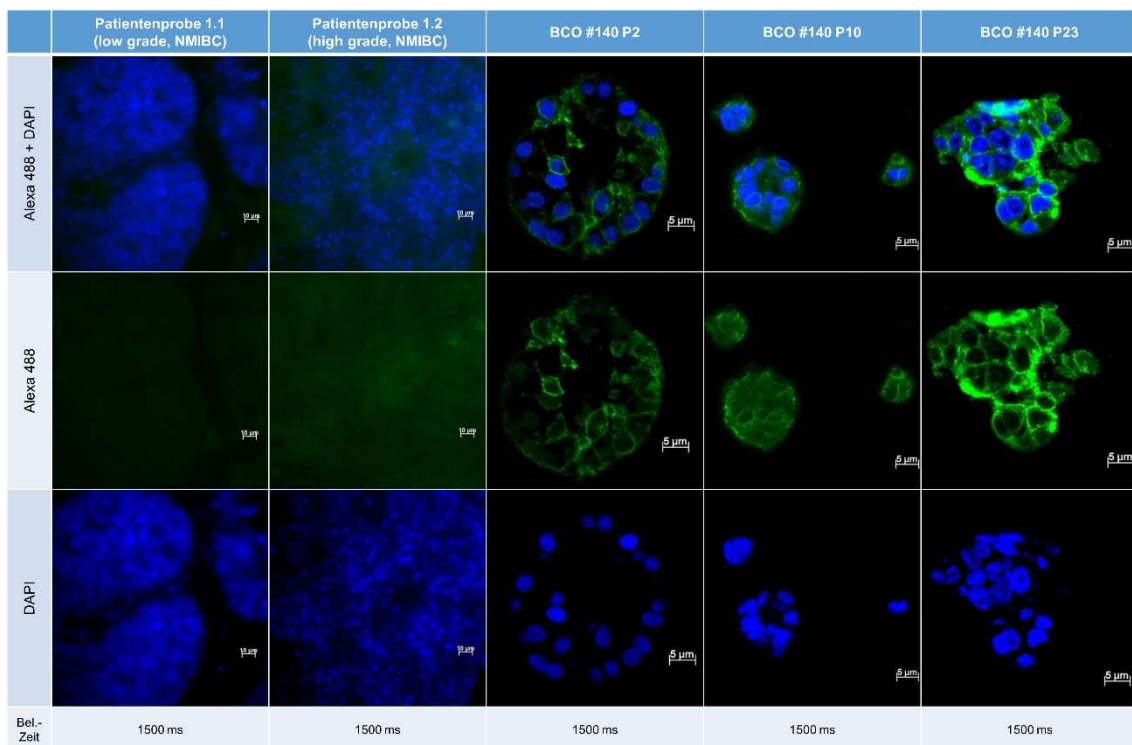


Tabelle 10: Trop-2-Expression in Originaltumor (Spalte 1 u. 2) und BCOs (Spalte 3-5) von Probe 1 mittels IFL

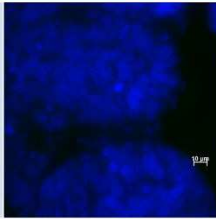
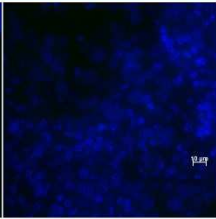
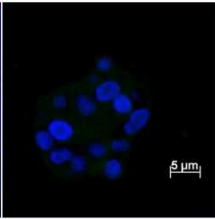
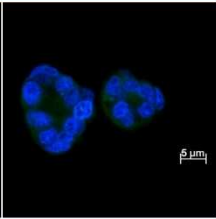
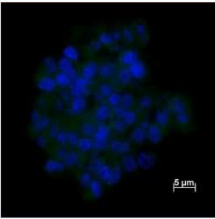
	Patientenprobe 1.1 (low grade, NMIBC)	Patientenprobe 1.2 (high grade, NMIBC)	BCO #140 P2	BCO #140 P10	BCO #140 P23
Alexa 488 + DAPI					
Bel.-Zeit	1500 ms	1500 ms	1500 ms	1500 ms	1500 ms

Tabelle 11: Negativkontrolle der IFL von Probe 1

In den Tabellen 9 und 10 ist das Färbeergebnis der Immunfluoreszenzfärbungen auf Nectin-4 und Trop-2 an dem Originaltumor (mit 10µm-Maßstab) und den Blasentumororganoiden (mit 5 µm-Maßstab) von Probe 1 zu sehen. Jede Spalte steht für eine Originaltumor- oder BCO-Probe, während die Mikroskopaufnahmen zeilenweise zunächst den Antikörper mit DAPI zusammen und anschließend jeweils einzeln abbilden. Alexa 488 ist dabei der Sekundärantikörper für die Färbung von Nectin-4 bzw. Trop-2 und zeigt die Expression dieser mittels grüner Fluoreszenz an. Durch DAPI erscheinen die Zellkerne in der Immunfluoreszenz blau. In der letzten Zeile der Tabellen wird die Belichtungszeit, mit der die Aufnahmen gemacht wurden, angegeben. Diese wurde von dem zum Fluoreszenzmikroskop gehörigen Computerprogramm ermittelt und übertragen. Zur Qualitätskontrolle der Färbungen wurde parallel eine Negativkontrolle ohne Primärantikörper durchgeführt. Das Ergebnis dieser ist in Tabelle 11 zu sehen und wurde auf die gleiche Weise lediglich mit einer Spalte für das Ergebnis mit dem Antikörper und DAPI zusammen dokumentiert.

Den Tabellen 9 und 10 lässt sich entnehmen, dass bei den Immunfluoreszenzfärbungen der Originaltumor sowohl in den low-grade als auch in den high-grade Arealen keine Nectin-4- und Trop-2-Expression zeigte. Die Organoiden exprimierten beide Marker, wobei die 23. Passage bei Nectin-4 (Tabelle 9) eine geringe und bei Trop-2 (Tabelle 10) eine stärkere Expression im Vergleich zu den vorherigen Passagen aufwies. Das Expressionsmuster beider Marker war membranös betont. Eine zusätzliche zytoplasmatische Anfärbung wurde vor allem bei Nectin-4 (Tabelle 9) festgestellt. Demnach lässt sich sagen, dass bei dieser Probe die Expressionsmuster in den Organoiden von denen in dem Originaltumor größtenteils abweichen. Die Passagen mit weniger und damit ähnlicherer Expression waren bei Nectin-4 die späteren und bei Trop-2 (Tabelle 10) die früheren Passagen. Die Mikroskopaufnahmen der Negativkontrollproben (Tabelle 11) zeigten wie zu erwarten keine grüne Fluoreszenz, was für eine korrekt durchgeführte Färbung und einen selektiven Sekundärantikörper spricht.

3.4.2 Patientenprobe 2: BCO #154 P1 vs. BCO #154 P8 vs. BCO #154 P21

Diese Probe entstammte von einem Rezidiv, welches bei dem Patienten von der Patientenprobe 1 (männlich, 62 J., Raucher) nach ca. 1,5 Monaten auftrat. Es wurde eine Zystektomie durchgeführt und der Tumor ebenfalls als G3 high grade eingestuft. Das TNM-Stadium war dann pT3b, pN0, cM0, pL1, pV1.

Hier zeigte die HE-Färbung des Originaltumors ein muskel-invasives Urothelkarzinom, welches in der Pathologie als high-grade eingestuft wurde (Abb. 60-62) und teilweise auch Merkmale eines kleinzelligen Karzinoms aufwies (Abb. 63-65).

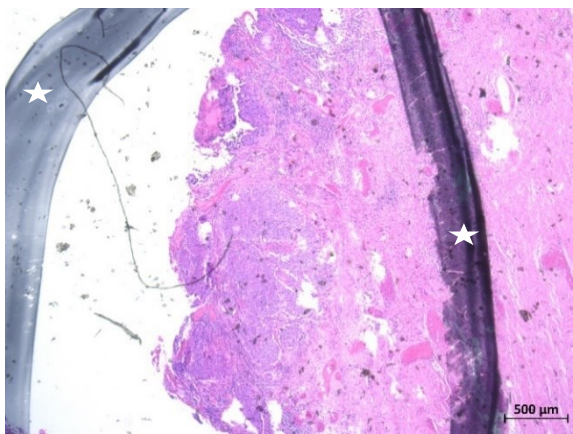


Abbildung 60: HE-Färbung des high grade MIBC von Probe 2 mit 2,5x-Vergrößerung

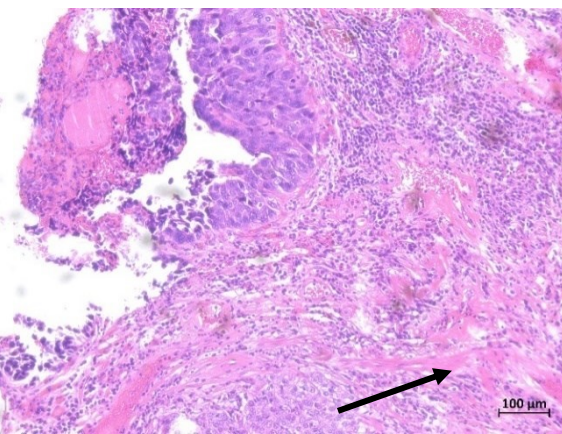


Abbildung 61: HE-Färbung des high grade MIBC von Probe 2 mit 10x-Vergrößerung

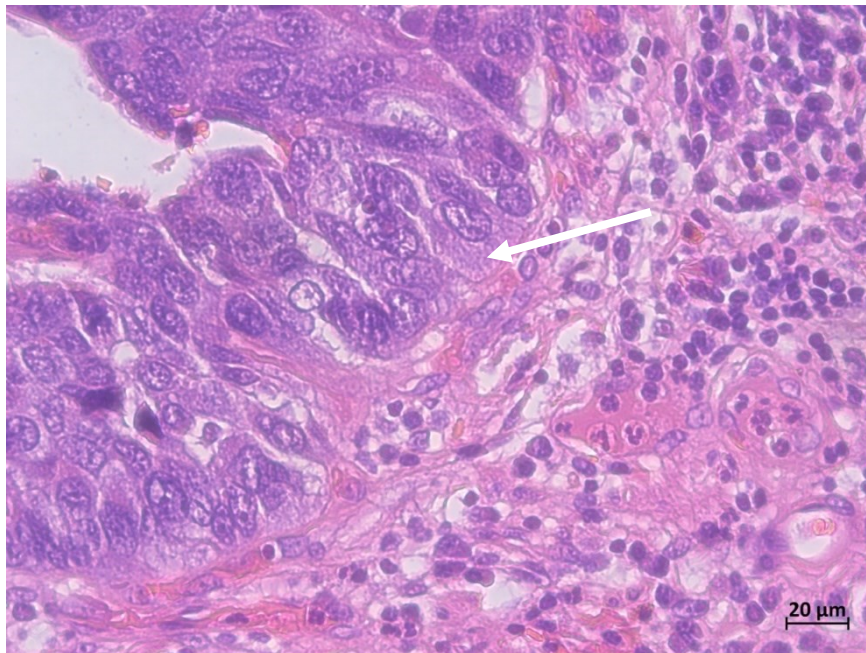


Abbildung 62: HE-Färbung des high grade MIBC von Probe 2 mit 40x-Vergrößerung

In den Abbildungen 60 – 62 ist ein Ausschnitt des HE-gefärbten Tumorpräparates von der Patientenprobe 2 mit verschiedenen Vergrößerungen zu sehen. Durch die HE-Färbung

erscheinen auch hier die Zellkerne bläulich/lila und das Zytoplasma, sowie das Kollagen, rötlich/rosa. In diesem Bereich wurde der Tumor als high grade und muskelinvasiv eingestuft, da entartete Zellen mit veränderter Kern-Plasma-Relation, von den üblichen Schichten abweichend (bspw. weißer Pfeil in Abb. 62) und bis in die Muscularis reichend (bspw. schwarzer Pfeil in Abb. 61) detektiert wurden. In Abbildung 60 sind außerdem Reste des schwarzen Stiftes (weiße Sterne in Abb. 60), mit dem der Tumor auf dem Objektträger markiert wurde, zu sehen.

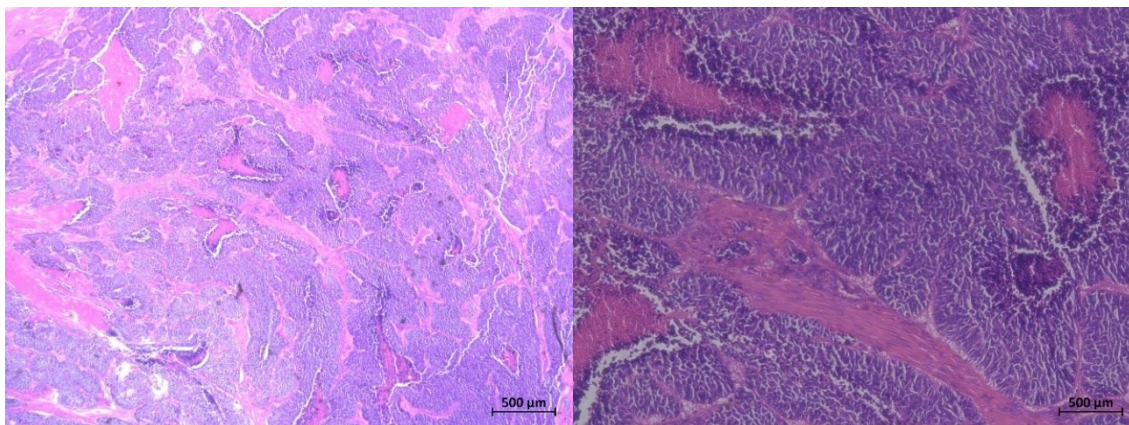


Abbildung 63: HE-Färbung des kleinzelligen MIBC von Probe 2 mit 2,5x-Vergrößerung

Abbildung 64: HE-Färbung des kleinzelligen MIBC von Probe 2 mit 10x-Vergrößerung

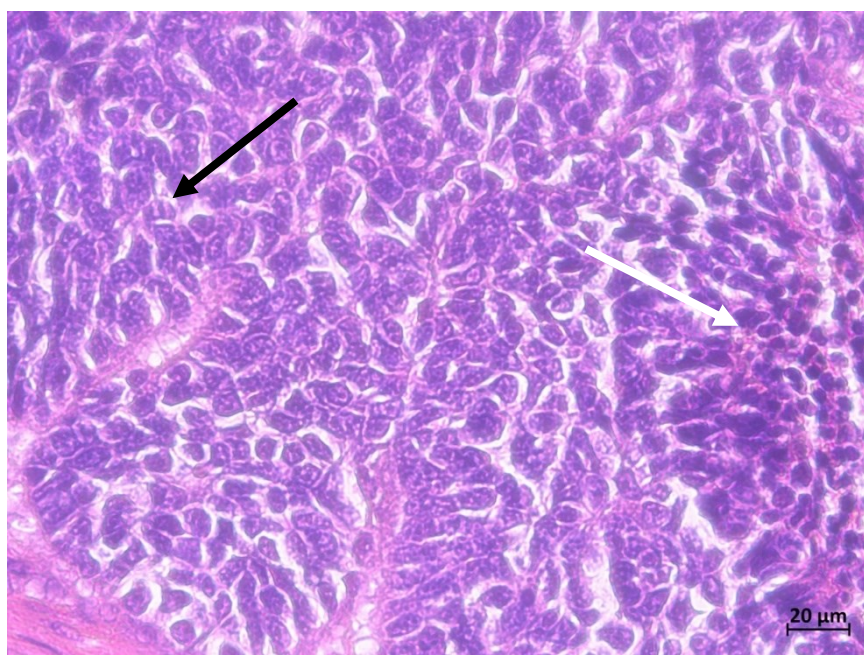


Abbildung 65: HE-Färbung des kleinzelligen MIBC von Probe 2 mit 40x-Vergrößerung

Die Abbildungen 63 - 65 zeigen einen Ausschnitt des HE-gefärbten Tumorpräparates von Patientenprobe 2 mit verschiedenen Vergrößerungen. Die Zellkerne sind hier ebenfalls bläulich/lila und das Zytoplasma, sowie das Kollagen, rötlich/rosa durch die HE-Färbung angefärbt. In diesem Bereich wurde der Tumor als kleinzellig bezeichnet, da die Urothelzellen klein, mit

vergrößerter Kern-Plasma-Relation und ohne erkennbare Schichten vorliegen (bspw. weißer Pfeil in Abb. 65). Das monomorphe Erscheinungsbild der Zellen (bspw. schwarzer Pfeil in Abb. 65) könnte außerdem auf eine reduzierte Differenzierung und damit auf eine Malignität der Zellen hindeuten.

Die Zellen dieser Probe konnten bis in die 23. Passage kultiviert werden. Dabei formten sie Organoide mit einer Größe von bis zu 70 μm (Abb. 66).

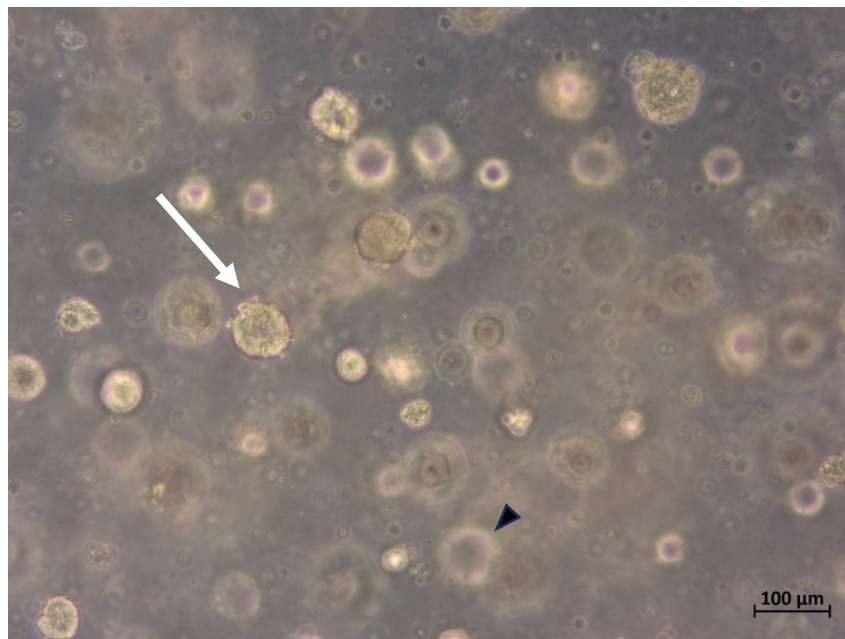


Abbildung 66: BCOs von Probe 2 während der Kultivierung in der 7. Passage an Tag 13

Ein Ausschnitt der Blasen-tumororganoidkultur von Probe 2 am 13. Tag der 7. Passage ist in Abbildung 66 mit einem 100 μm -Maßstab festgehalten. Es sind mehrere runde Zellverbände (Organoide) zu sehen (bspw. weißer Pfeil). Da es sich um eine Mikroskopie einer 3D-Kultur handelt, sind im Hintergrund weitere Zellformationen unscharf zu erkennen (bspw. schwarze Pfeilspitze).

Paraffinschnitte lagen von den Organoiden der 1., 8. und 21. Passage vor und wurden hinsichtlich ihrer Nectin-4 und Trop-2-Expression mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht (Tabellen 12-13).

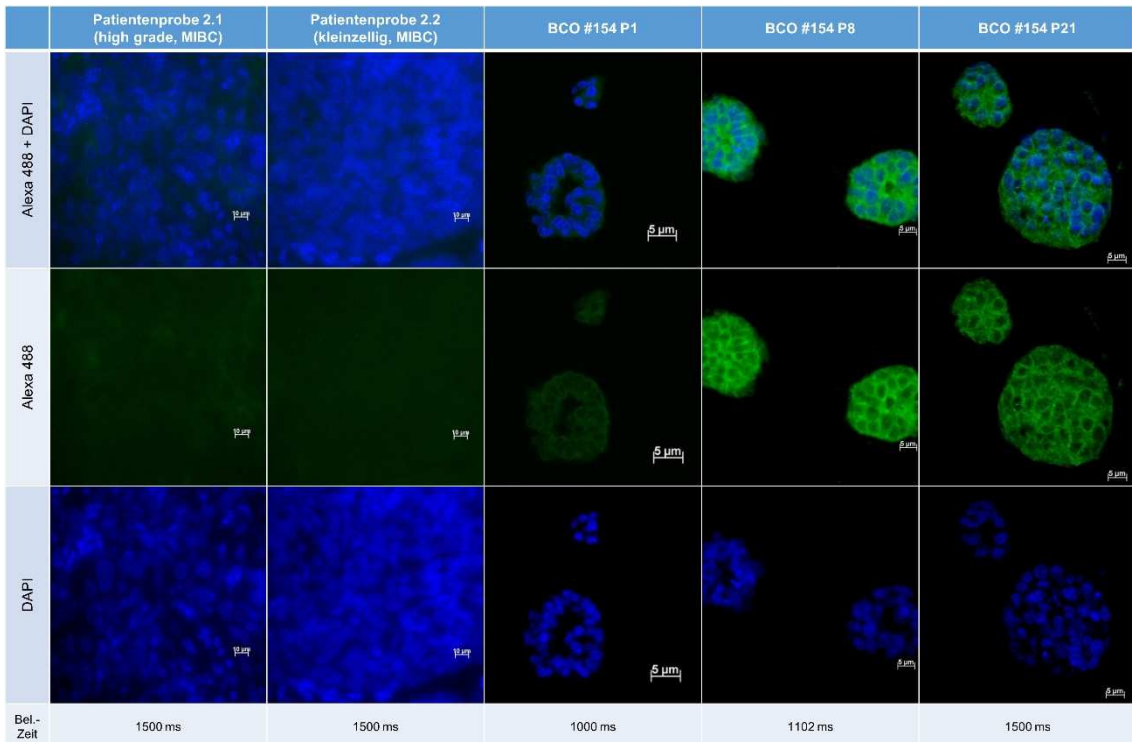


Tabelle 12: Nectin-4-Expression in Originaltumor (Spalte 1 u. 2) und BCOs (Spalte 3-5) von Probe 2 mittels IFL

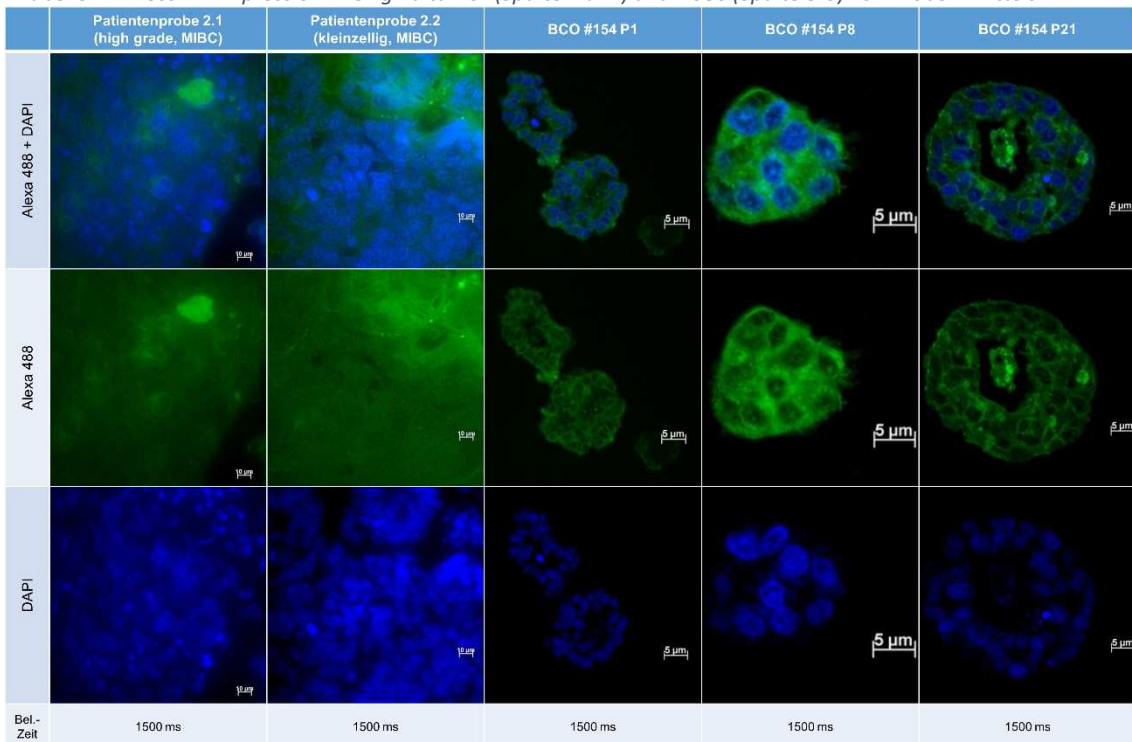


Tabelle 13: Trop-2-Expression in Originaltumor (Spalte 1 u. 2) und BCOs (Spalte 3-5) von Probe 2 mittels IFL

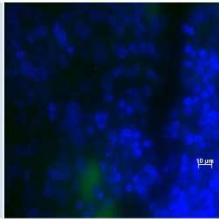
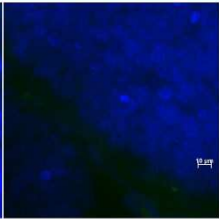
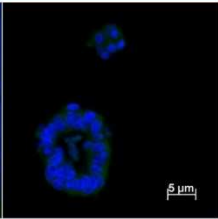
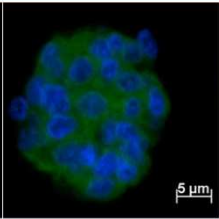
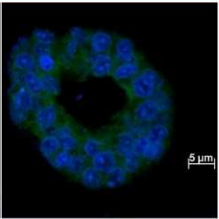
	Patientenprobe 2.1 (high grade, MIBC)	Patientenprobe 2.2 (kleinzellig, MIBC)	BCO #154 P1	BCO #154 P8	BCO #154 P21
Alexa 488 + DAPI					
Bel.-Zeit	1500 ms	1500 ms	1000 ms	1102 ms	1500 ms

Tabelle 14: Negativkontrolle der IFL von Probe 2

In den Tabellen 12 und 13 ist das Färbeergebnis der Immunfluoreszenzfärbungen auf Nectin-4 und Trop-2 an dem Originaltumor (mit 10 µm-Maßstab) und den Blasentumororganoiden (mit 5 µm-Maßstab) von Probe 2 zu sehen. Jede Spalte steht für eine Originaltumor- oder BCO-Probe, während die Mikroskopaufnahmen zeilenweise zunächst Antikörper und DAPI zusammen und anschließend jeweils einzeln abbilden. Dabei ist Alexa 488 der Sekundäntikörper für die Färbung von Nectin-4 bzw. Trop-2 und zeigt die Expression dieser mittels grüner Fluoreszenz an. Durch DAPI erscheinen die Zellkerne in der Immunfluoreszenz blau. In der letzten Zeile der Tabellen wird die Belichtungszeit, mit der die Aufnahmen gemacht wurden, angegeben. Diese wurde von dem zum Fluoreszenzmikroskop gehörigen Computerprogramm ermittelt und übertragen. Die Negativkontrolle ohne Primäntikörper wurde auch hier parallel durchgeführt und auf die gleiche Weise in Tabelle 14 lediglich mit einer Spalte für das Ergebnis mit dem Antikörper und DAPI zusammen dokumentiert.

Die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen, die in den Tabellen 12 und 13 zusammen getragen wurden, ergab, dass der Originaltumor im high-grade, sowie im kleinzelligen Bereich kein Nectin-4 und leicht Trop-2 exprimierte. Die dazugehörigen Organoiden zeigten in der ersten Passage ein ähnliches Expressionsmuster wie der Originaltumor. In der 8. und 21. Passage nahm die Nectin-4- und Trop-2-Expression in den Organoiden zu und wich damit zunehmend von der im Originaltumor ab. Das Expressionsmuster beider Marker war dabei membranös betont. Daraus lässt sich schließen, dass bei dieser Probe die Expressionsmuster in den Organoiden von dem in dem Originaltumor größtenteils abweichen. Allerdings konnte eine gewisse Ähnlichkeit, sowohl bei Nectin-4, als auch und bei Trop-2, in den frühen Passagen festgestellt werden. Die parallel durchgeführte Negativkontrolle ohne Primäntikörper (Tabelle 14) wies lediglich eine leichte grüne Fluoreszenz auf, welche als Färbeartefakt durch haftengebliebener Sekundäntikörper gewertet wurde.

3.4.3 Patientenprobe 3: BCO #267 P10

Diese Probe entstammte von einem männlichen Patienten mit positiver Raucheranamnese, bei dem im Alter von 73 Jahren die Diagnose eines Harnblasenkarzinoms gestellt wurde. Mittels TUR-B wurde der Primärtumor entfernt. Bei dem Eingriff lag eine positive Urinzytologie vor und der Tumor wurde von der Pathologie als G3 high grade eingestuft. Das TNM-Stadium war pT1 (weitere Angaben lagen nicht vor).

Anhand der HE-Färbung wurde der Originaltumor als ein nicht muskel-invasives Urothelkarzinom mit sowohl low grade (Abb. 67-69), als auch high grade Merkmalen (Abb. 70-72) klassifiziert.

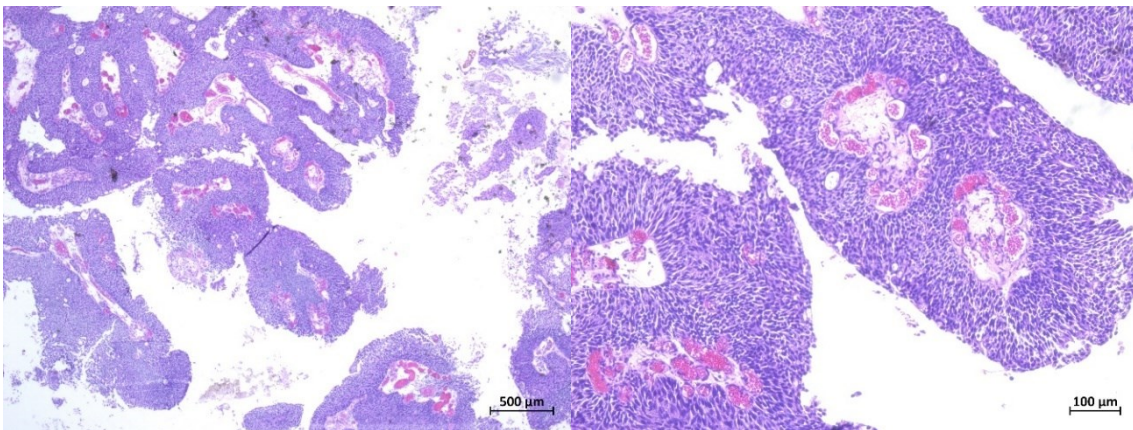


Abbildung 67: HE-Färbung des low grade NMIBC von Probe 3 mit 2,5x-Vergrößerung

Abbildung 68: HE-Färbung des low grade NMIBC von Probe 3 mit 10x-Vergrößerung

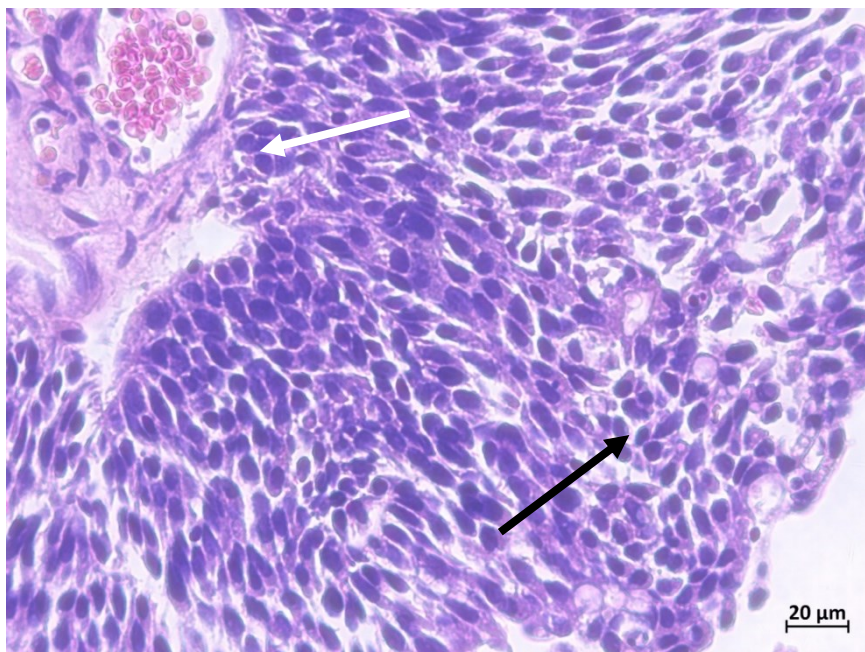


Abbildung 69: HE-Färbung des low grade NMIBC von Probe 3 mit 40x-Vergrößerung

In den Abbildungen 67 - 69 ist ein Ausschnitt des HE-gefärbten Tumorpräparates von der Patientenprobe 3 mit verschiedenen Vergrößerungen zu sehen. Bläulich/lila sind die Zellkerne, während das Zytoplasma und das Kollagen rötlich/rosa angefärbt sind. In diesem Bereich wurde der Tumor als low grade und nicht-muskelinvasiv eingestuft, da maligne Eigenschaften, wie Aufhebung der Urothel-typischen Schichtung des Epithels und veränderte Kern-Plasma-Relation (bspw. schwarzer Pfeil in Abb. 69), allerdings kein Durchdringen der epithelbegrenzenden Basalmembran (bspw. weißer Pfeil in Abb. 69) erkennbar sind.

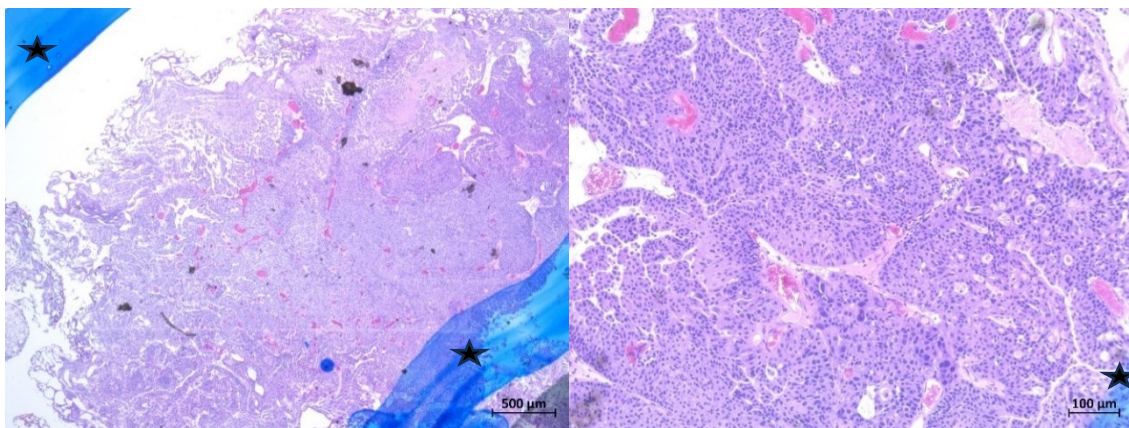


Abbildung 70: HE-Färbung des high grade NMIBC von Probe 3 mit 2,5x-Vergrößerung

Abbildung 71: HE-Färbung des high grade NMIBC von Probe 3 mit 10x-Vergrößerung

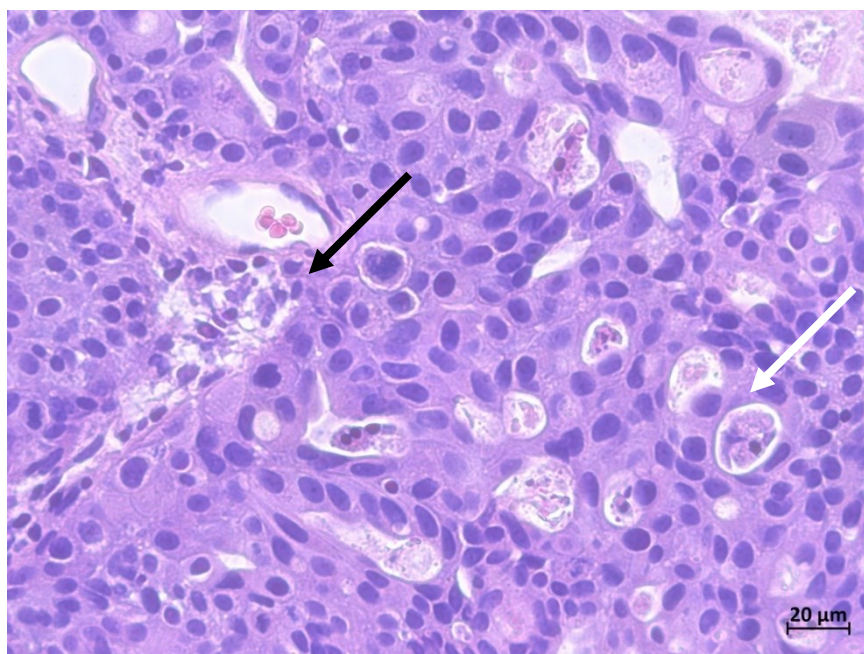


Abbildung 72: HE-Färbung des high grade NMIBC von Probe 3 mit 40x-Vergrößerung

Die Abbildungen 70 - 72 zeigen einen weiteren Ausschnitt des Tumorpräparates von Patientenprobe 3 mit verschiedenen Vergrößerungen. Durch die HE-Färbung erscheinen auch hier die Zellkerne bläulich/lila und das Zytoplasma, sowie das Kollagen, rötlich/rosa. In diesem Bereich wurde der Tumor als high grade eingestuft, da ausgeprägte Malignitätskriterien, wie

unterschiedliche Zellkonformitäten als Zeichen einer Entdifferenzierung, Aufhebung der Urothel-typischen Architektur des Epithels und Polaritätsverlust der Zellen erkennbar sind (bspw. weißer Pfeil in Abb. 72). Die polymorphen Tumorzellen überschreiten auch die Basalmembran (bspw. schwarzer Pfeil in Abb. 72) und sind bis in das subepitheliale Bindegewebe detektierbar (pT1). Die blauen Strukturen (mit schwarzen Sternen markiert) am Rand der Abbildungen 70 und 71 sind Teile der Tumormarkierung mit blauem Stift auf dem Objektträger.

In der 3D-Kultur konnten aus der Probe 3 Organoide bis in die 14. Passage kultiviert werden. Dabei erreichten die Organoide teilweise eine Größe von über 100 μm (Abb. 73).

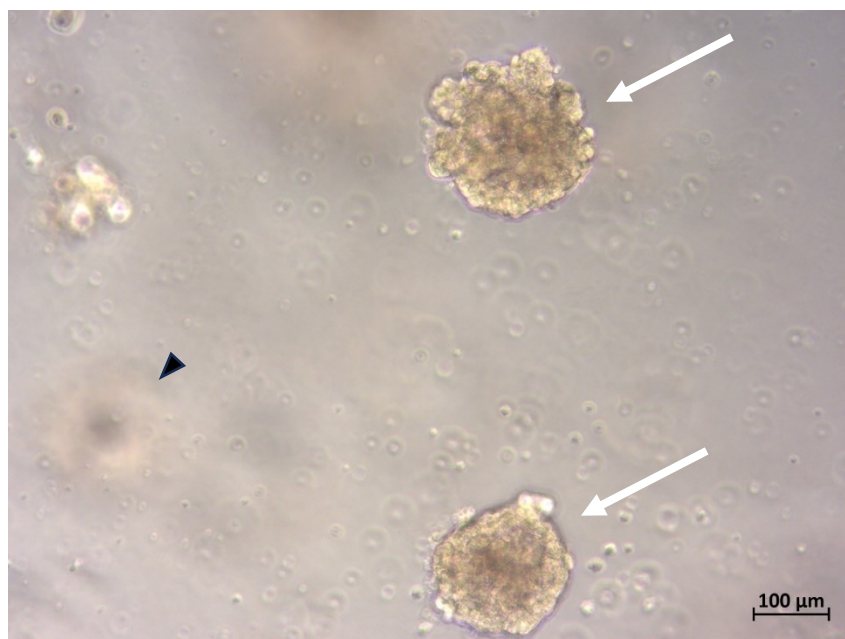


Abbildung 73: BCOs von Probe 3 während der Kultivierung in der 12. Passage an Tag 10

Eine Mikroskopaufnahme der Kultur von Probe 3 in der 12. Passage am 10 Tag ist in Abbildung 73 zu sehen und zeigt exemplarisch zwei Organoide (weiße Pfeile) der Patientenprobe 3 mit einem 100 μm – Maßstab unten rechts im Bild. Da es sich um eine Mikroskopie einer 3D-Kultur handelt, sind im Hintergrund weitere Zellformationen unscharf zu erkennen (bspw. schwarze Pfeilspitze).

Von den Organoiden in der 10. Passage konnten Paraffinschnitte für die Immunfluoreszenzfärbung angefertigt werden und wurden hinsichtlich ihrer Nectin-4 und Trop-2-Expression mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht (Tabellen 15-17).

	Patientenprobe 3.1 (low grade, NMIBC)	Patientenprobe 3.2 (high grade, NMIBC)	BCO #267 P10
Alexa 488 + DAPI			
Alexa 488			
DAPI			
Bel.-Zeit	1500 ms	1500 ms	1030 ms

Tabelle 15: Nectin-4-Expression in Originaltumor (Spalte 1 u. 2) und BCOs (Spalte 3) von Probe 3 mittels IFL

	Patientenprobe 3.1 (low grade, NMIBC)	Patientenprobe 3.2 (high grade, NMIBC)	BCO #267 P10
Alexa 488 + DAPI			
Alexa 488			
DAPI			
Bel.-Zeit	1500 ms	1500 ms	709 ms

Tabelle 16: Trop-2-Expression in Originaltumor (Spalte 1 u. 2) und BCOs (Spalte 3) von Probe 3 mittels IFL

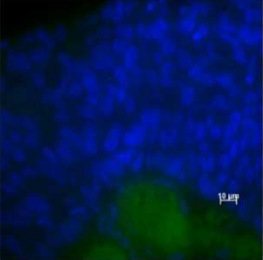
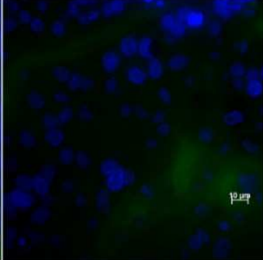
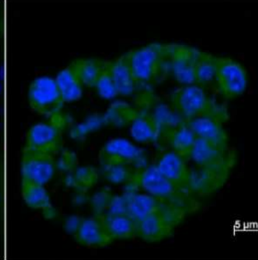
	Patientenprobe 3.1 (low grade, NMIBC)	Patientenprobe 3.2 (high grade, NMIBC)	BCO #267 P10
Alexa 488 + DAPI			
Bel.- Zeit	1500 ms	1500 ms	1030 ms

Tabelle 17: Negativkontrolle der IFL von Probe 3

Die Tabellen 15 und 16 zeigen das Färbeergebnis der Immunfluoreszenzfärbungen auf Nectin-4 und Trop-2 an dem Originaltumor (mit 10 µm-Maßstab) und den Blasentumororganoiden (mit 5 µm-Maßstab) von Probe 3. Jede Spalte steht für eine Originaltumor- oder BCO-Probe, während die Mikroskopaufnahmen zeilenweise zunächst Antikörper und DAPI zusammen und anschließend jeweils einzeln abbilden. Dabei ist Alexa 488 der Sekundärantikörper für die Färbung von Nectin-4 bzw. Trop-2 und zeigt die Expression dieser mittels grüner Fluoreszenz an. Durch DAPI erscheinen die Zellkerne in der Immunfluoreszenz blau. In der letzten Zeile der Tabellen wird die Belichtungszeit, mit der die Aufnahmen gemacht wurden, angegeben. Diese wurde von dem zum Fluoreszenzmikroskop gehörigen Computerprogramm ermittelt und übertragen. Die Tabelle 17 zeigt die dazugehörige Negativkontrolle ohne Primärantikörper, welche auf die gleiche Weise lediglich mit einer Spalte für das Ergebnis mit dem Antikörper und DAPI zusammen dokumentiert wurde.

Den Tabellen 15 und 16 lässt sich entnehmen, dass bei den Immunfluoreszenzfärbungen der Originaltumor in den low-grade Bereichen eine Expression von Trop-2 aufwies. Jene wurde in den high-grade Bereichen nicht detektiert. Nectin-4 exprimierte der Originaltumor in beiden untersuchten Bereichen nicht. Die Organoide exprimierten beide Marker in der 10. Passage stark und membranbetont. Größtenteils unterschieden sich demnach die Expressionsmuster in den Organoiden von dem in dem Originaltumor. Lediglich in den low-grade Arealen des Originaltumors wurde Trop-2 ähnlich wie in den dazugehörigen Organoiden exprimiert.

Die dazugehörige Negativkontrolle ohne Primärantikörper (Tabelle 17) zeigte, lediglich eine leichte grüne Fluoreszenz, die als Färbeartefakt gewertet wurde.

3.4.4 Patientenprobe 4: BCO #270 P9

Diese Probe entstammte von einer weiblichen Patientin mit negativer Raucheranamnese, bei der im Alter von 86 Jahren die Diagnose eines Harnblasenkarzinoms gestellt wurde. Mittels TUR-B wurde der Primärtumor entfernt. Bei dem Eingriff lag eine positive Urinzytologie vor und der Tumor wurde von der Pathologie als G3 high grade eingestuft. Das TNM-Stadium war pT2a, pN0, cM1, pL1, pV0.

In der HE-Färbung zeigte sich der Originaltumor als ein muskelinvasives Blasenkarzinom mit high-grade Differenzierung (Abb. 74-76).

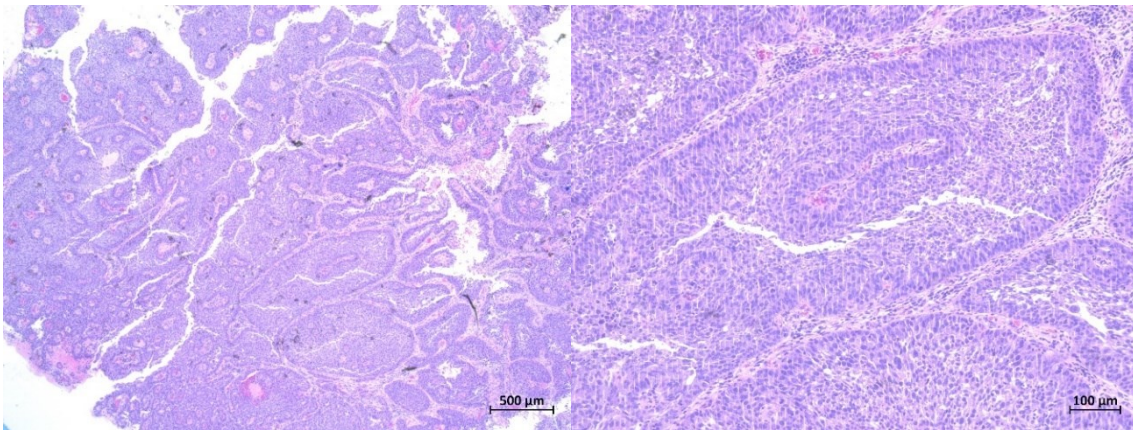


Abbildung 74: HE-Färbung des high grade MIBC von Probe 4 mit 2,5x-Vergrößerung

Abbildung 75: HE-Färbung des high grade MIBC von Probe 4 mit 10x-Vergrößerung

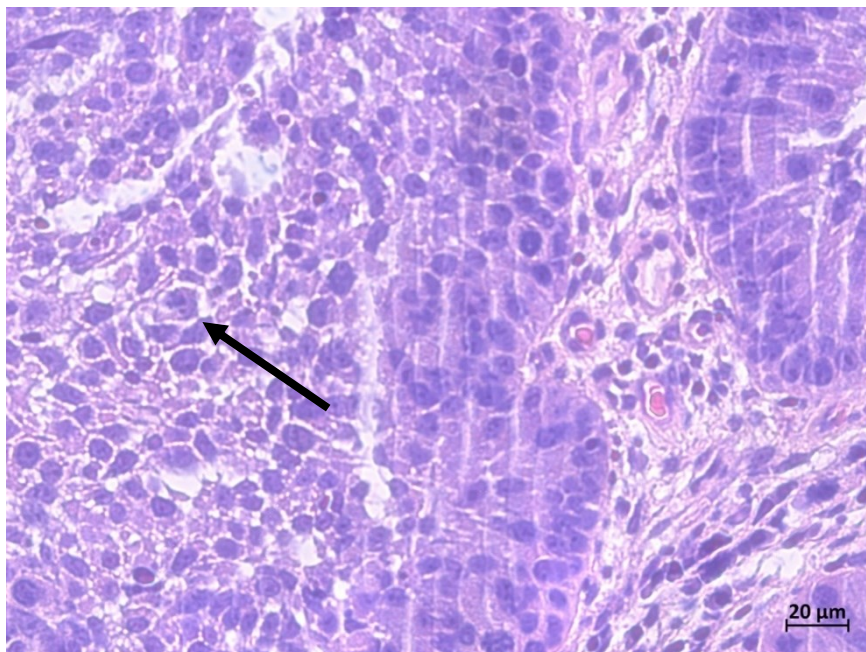


Abbildung 76: HE-Färbung des high grade MIBC von Probe 4 mit 40x-Vergrößerung

In den Abbildungen 74 - 76 ist ein Ausschnitt des Tumorpräparates von Patientenprobe 4 mit verschiedenen Vergrößerungen zu sehen. Durch die HE-Färbung sind die Zellkerne bläulich/lila und das Zytoplasma, sowie das Kollagen, rötlich/rosa angefärbt. In diesem Bereich wurde der Tumor als high grade eingestuft, da ausgeprägte Malignitätskriterien, wie veränderte Kern-Plasma-Relation, Zellkernatypien und Aufhebung der Urothel-typischen Architektur des Epithels erkennbar sind (bspw. schwarzer Pfeil in Abb. 76). Derartig entartete Tumorzellen wurden bis in die oberflächliche Muscularis propria detektiert und der Tumor daher als pT2a klassifiziert.

Die Tumorzellen dieser Probe wuchsen zu ca. 70 µm großen Organoiden (Abb. 77) heran und konnten bis in die 30. Passage kultiviert werden.

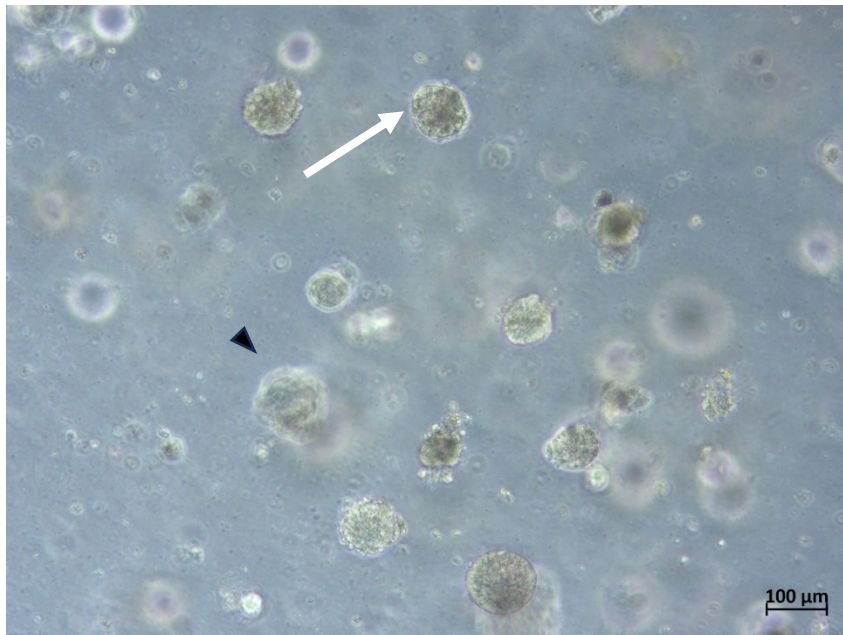


Abbildung 77: BCOs von Probe 4 während der Kultivierung in der 28. Passage an Tag 10

Die Abbildung 77 zeigt die Organoide der Probe 4 am 10. Tag in der 28. Passage unter dem Mikroskop mit einem 100 µm – Maßstab unten rechts im Bild. Es sind mehrere runde Zellverbände (Organoide) zu sehen (bspw. weißer Pfeil). Da es sich um eine Mikroskopie einer 3D-Kultur handelt, sind im Hintergrund weitere Zellformationen unscharf zu erkennen (bspw. schwarze Pfeilspitze).

Von den Organoiden der 9. Passage wurden Paraffinschnitte angefertigt und lagen für die Immunfluoreszenzfärbungen vor (Tabellen 18-20).

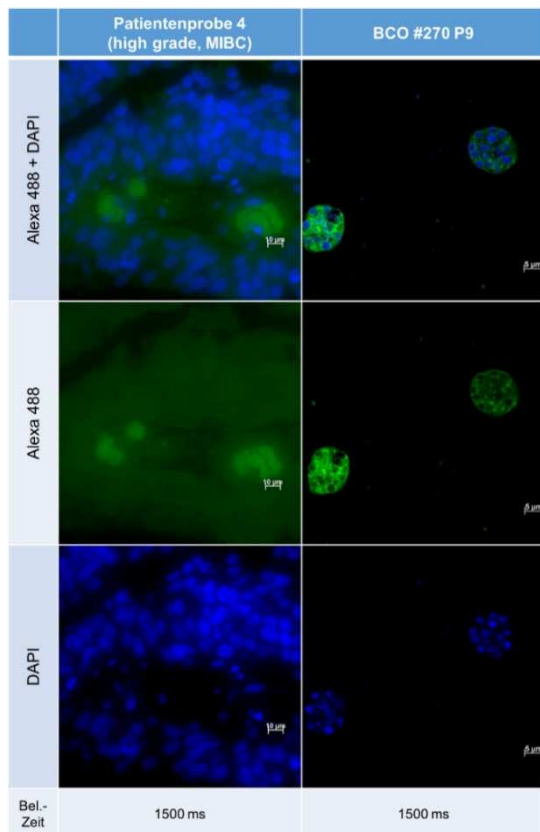


Tabelle 18: Nectin-4-Expression in Originaltumor (Spalte 1) und BCOs (Spalte 2) von Probe 4 mittels IFL

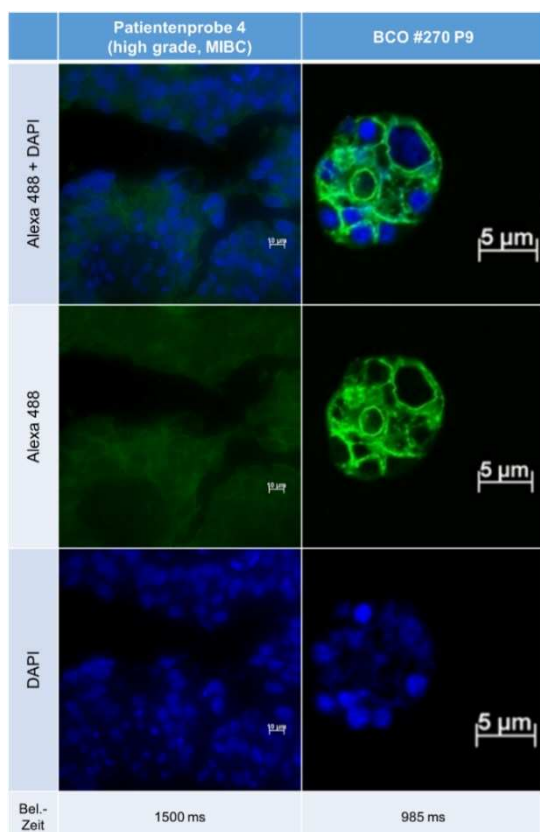


Tabelle 19: Trop-2-Expression in Originaltumor (Spalte 1) und BCOs (Spalte 2) von Probe 4 mittels IFL

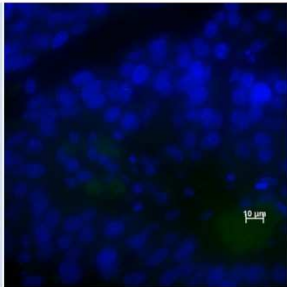
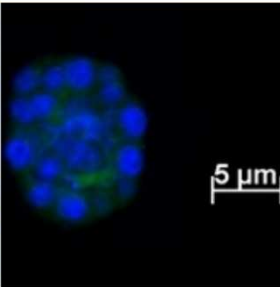
	Patientenprobe 4 (high grade, MIBC)	BCO #270 P9
Alexa 488 + DAPI		
Bel.- Zeit	1500 ms	1500 ms

Tabelle 20: Negativkontrolle der IFL von Probe 4

In den Tabellen 18 und 19 ist das Färbeergebnis der Immunfluoreszenzfärbungen auf Nectin-4 und Trop-2 an dem Originaltumor (mit 10 µm-Maßstab) und den Blasentumororganoiden (mit 5 µm-Maßstab) von Probe 4 zusammengetragen. Eine Spalte steht jeweils für die Originaltumor- bzw. BCO-Probe, während die Mikroskopaufnahmen zeilenweise zunächst Antikörper und DAPI zusammen und anschließend jeweils einzeln abbilden. Dabei ist Alexa 488 der Sekundärantikörper für die Färbung von Nectin-4 bzw. Trop-2 und zeigt die Expression dieser mittels grüner Fluoreszenz an. Durch DAPI erscheinen die Zellkerne in der Immunfluoreszenz blau. In der letzten Zeile der Tabellen wird die Belichtungszeit, mit der die Aufnahmen gemacht wurden, angegeben. Diese wurde von dem zum Fluoreszenzmikroskop gehörigen Computerprogramm ermittelt und übertragen. Die Tabelle 20 zeigt die dazugehörige Negativkontrolle ohne Primärantikörper, welche auf die gleiche Weise lediglich mit einer Spalte für das Ergebnis mit dem Antikörper und DAPI zusammen dokumentiert wurde.

Die Immunfluoreszenzfärbungen in den Tabellen 18 und 19 zeigen, dass der Originaltumor Nectin-4 und Trop-2 leicht exprimierte und die Organoide beide Marker stark exprimierten. Dabei wurden die Marker bei dem Originaltumor im Zytoplasma angefärbt, während die Expression in den Organoiden vor allem in der Membran detektiert wurde. Die Markerexpression in den Organoiden scheint bei dieser Probe insgesamt stärker als im Originaltumor zu sein.

Die Negativkontrolle der an Probe 4 durchgeführten Immunfluoreszenzfärbung ist in Tabelle 20 dokumentiert und wurde wie erwartet als negativ gewertet, da keine grüne Fluoreszenz wie bei den positiven Proben erkennbar ist.

3.4.5 Patientenprobe 5: BCO #287 P14

Diese Probe entstammte von einem männlichen Patienten mit negativer Raucheranamnese, bei dem im Alter von 55 Jahren die Diagnose eines Harnblasenkarzinoms gestellt wurde. Mittels TUR-B wurde der Primärtumor entfernt. Bei dem Eingriff lag eine positive Urinzytologie vor und der Tumor wurde von der Pathologie als G3 high grade eingestuft. Das TNM-Stadium war pT1 (weitere Angaben lagen nicht vor).

Das high-grade, nicht muskel-invasive Blasenkarzinom zeigte sich ebenfalls in der HE-Färbung des Originaltumors (Abb. 78-80).

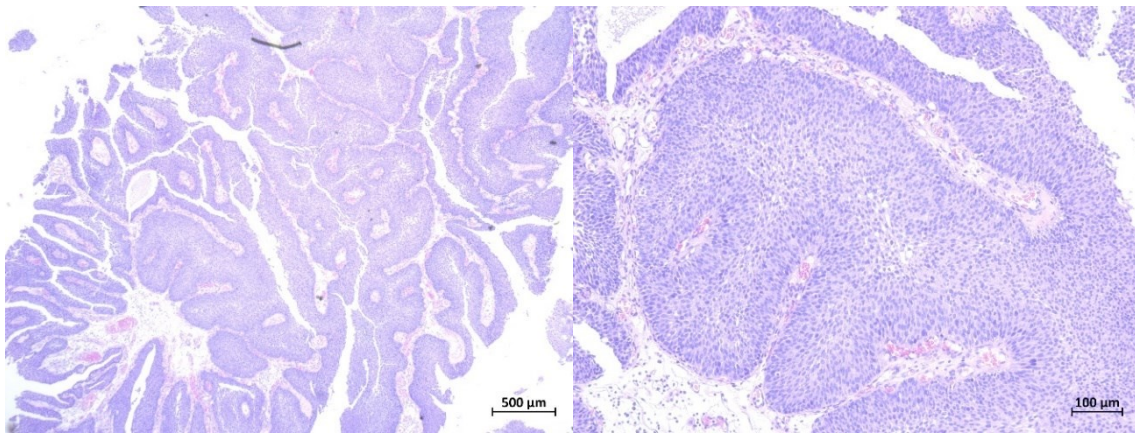


Abbildung 78: HE-Färbung des high grade NMIBC von Probe 5 mit 2,5x-Vergrößerung

Abbildung 79: HE-Färbung des high grade NMIBC von Probe 5 mit 10x-Vergrößerung

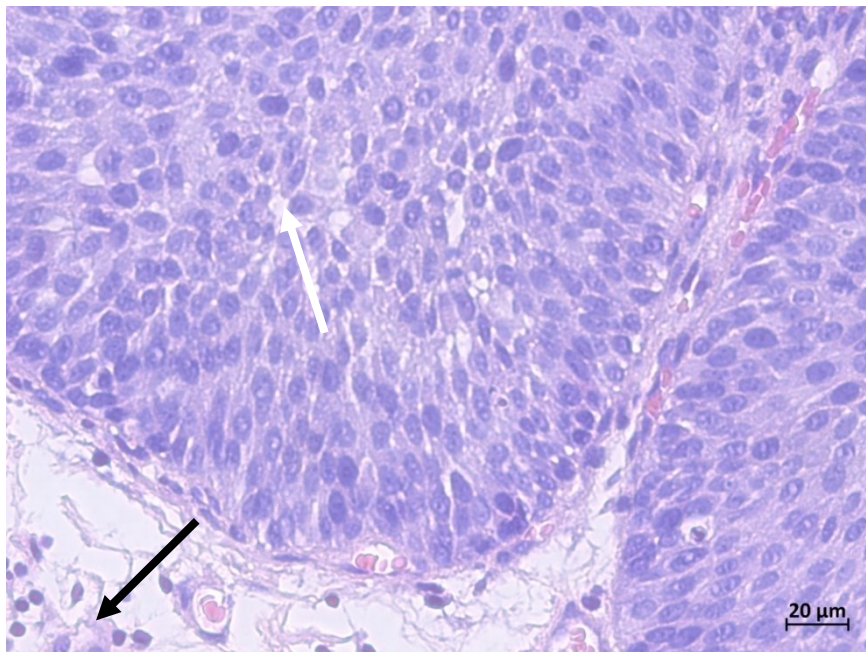


Abbildung 80: HE-Färbung des high grade NMIBC von Probe 5 mit 40x-Vergrößerung

Die Abbildungen 78 - 80 zeigen einen Ausschnitt des HE-gefärbten Tumorpräparates von Probe 5 mit verschiedenen Vergrößerungen. Durch die HE-Färbung erscheinen auch hier die Zellkerne bläulich/lila und das Zytoplasma, sowie das Kollagen, rötlich/rosa. Der Tumor wurde als high grade eingestuft, da ausgeprägte Malignitätskriterien, wie Aufhebung der Urothel-typischen Schichtung, sowie Polaritätsverlust der Zellen, erkennbar sind. Die Epithelzellen erscheinen vermehrt und monomorph, was auf eine geringe Differenzierung hinweist (bspw. weißer Pfeil in Abb. 80). Teilweise dringen die Tumorzellen bis in das subepitheliale Bindegewebe (bspw. schwarzer Pfeil in Abb. 80) ein (pT1).

Die Organoide, die von dieser Probe in 3D-Kultur gewachsen sind, erreichten eine Größe von über 100 µm und konnten bis in die 29. Passage kultiviert werden (Abb. 81).

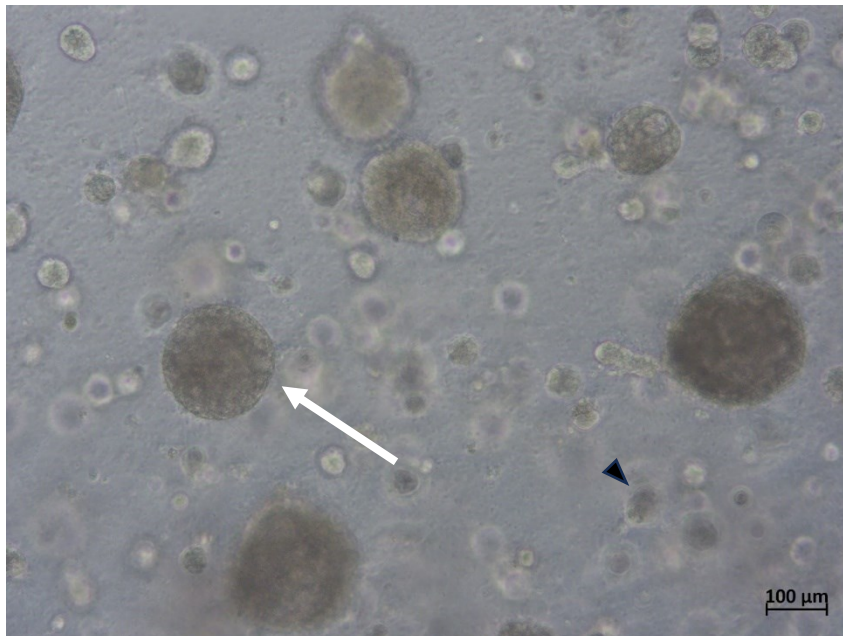


Abbildung 81: BCOs von Probe 5 während der Kultivierung in der 29. Passage an Tag 6

In Abbildung 81 sind jene Organoide von Probe 5 in der 29. Passage am 6. Tag unter dem Mikroskop mit einem 100 µm – Maßstab zu sehen. Erkennbar sind mehrere kleine, runde Zellformationen, aber auch runde, über 100 µm große Organoide (bspw. weißer Pfeil). Da es sich um eine Mikroskopie einer 3D-Kultur handelt, sind im Hintergrund weitere Zellformationen unscharf zu erkennen (bspw. schwarze Pfeilspitze).

Für die Analyse der Markerexpression lagen Paraffinschnitte von dem Originaltumor (Tabellen 21-23) und RNA-Extrakte von den Organoiden der 1. und 14. Passage vor. Letzteres wurde mittels PCR untersucht und die Ergebnisse in dem Kapitel 3.5 Expression in den BCOs mittels qRT-PCR dokumentiert. Aufgrund von unzureichender Organoidmenge konnten parallel zur Kultivierung keine Paraffinschnitte von den BCOs angefertigt werden.

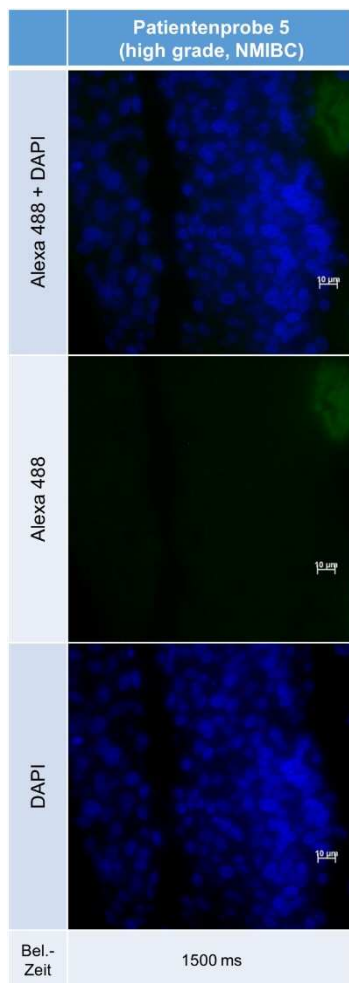


Tabelle 21: Nectin-4-Expression im Originaltumor von Probe 5 mittels IFL

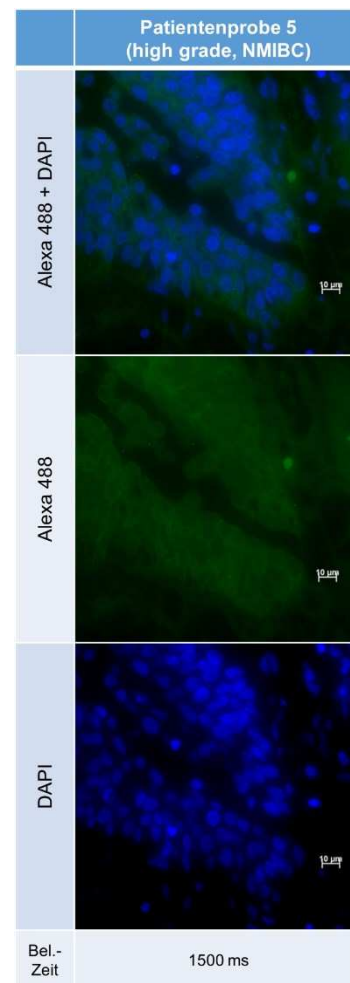


Tabelle 22: Trop-2-Expression im Originaltumor von Probe 5 mittels IFL

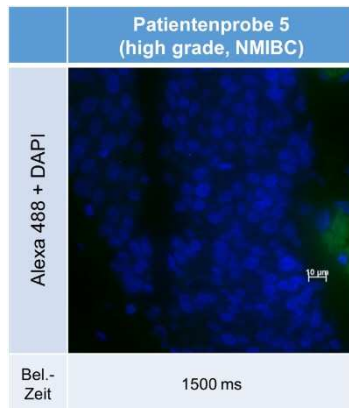


Tabelle 23: Negativkontrolle der IFL von Probe 5

Das Ergebnis der Immunfluoreszenzfärbung am Originaltumor von Probe 5 (mit 10 µm-Maßstab) ist in den Tabellen 21 und 22 zu sehen. Auch hier sind die Mikroskopaufnahmen zeilenweise zunächst mit dem Antikörper und DAPI zusammen und anschließend die jeweils einzeln abgebildet. Dabei ist Alexa 488 der Sekundärantikörper für die Färbung von Nectin-4 bzw. Trop-2 und zeigt die Expression dieser mittels grüner Fluoreszenz an. Durch DAPI erscheinen die Zellkerne in der Immunfluoreszenz blau. In der letzten Zeile der Tabellen wird die Belichtungszeit, mit der die Aufnahmen gemacht wurden, angegeben. Diese wurde von dem zum Fluoreszenzmikroskop gehörigen Computerprogramm ermittelt und übertragen. Die Tabelle 23 zeigt die dazugehörige Negativkontrolle ohne Primärantikörper, welche auf die gleiche Weise lediglich mit einer Spalte für das Ergebnis mit dem Antikörper und DAPI zusammen dokumentiert wurde.

Den Tabellen 21 und 22 lässt sich entnehmen, dass der Originaltumor basierend auf der Immunfluoreszenzfärbung kein Nectin-4 und leicht Trop-2 exprimierte. Auch hier bestätigte die als negativ zu bewertende Negativkontrolle eine korrekt durchgeführte Immunfluoreszenzfärbung (Tabelle 23), da sie wie erwartet keine grüne Fluoreszenz im Bereich der Zellen aufwies.

3.4.6 Patientenprobe 6: BCO #297 P5

Diese Probe entstammte von einer weiblichen Patientin mit negativer Raucheranamnese, bei der im Alter von 57 Jahren die Diagnose eines Harnblasenkarzinoms gestellt wurde. Mittels TUR-B wurde der Primärtumor entfernt. Bei dem Eingriff lag eine negative Urinzytologie vor und der Tumor wurde von der Pathologie als G2 low grade eingestuft. Das TNM-Stadium war pT1a (weitere Angaben lagen nicht vor).

In der HE-Färbung des Originaltumors (Abb. 82-84) konnte die Klassifizierung zum low grade, nicht muskel-invasivem Blasenkarzinom bestätigt werden.

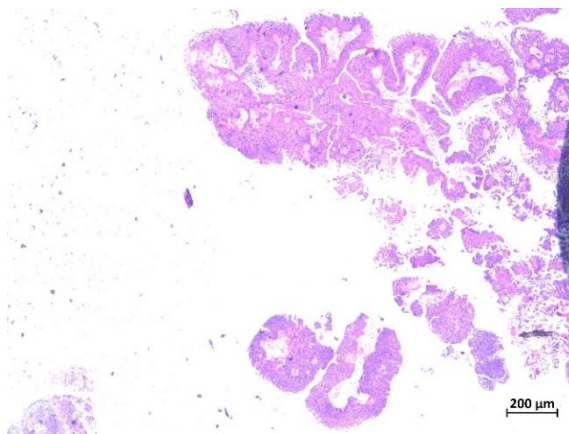


Abbildung 82: HE-Färbung des low grade NMIBC von Probe 6 mit 2,5x-Vergrößerung

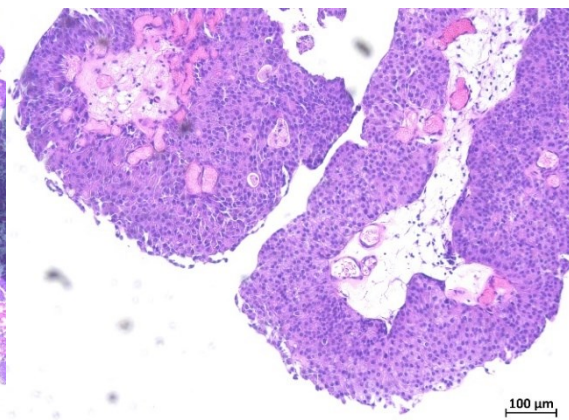


Abbildung 83: HE-Färbung des low grade NMIBC von Probe 6 mit 10x-Vergrößerung

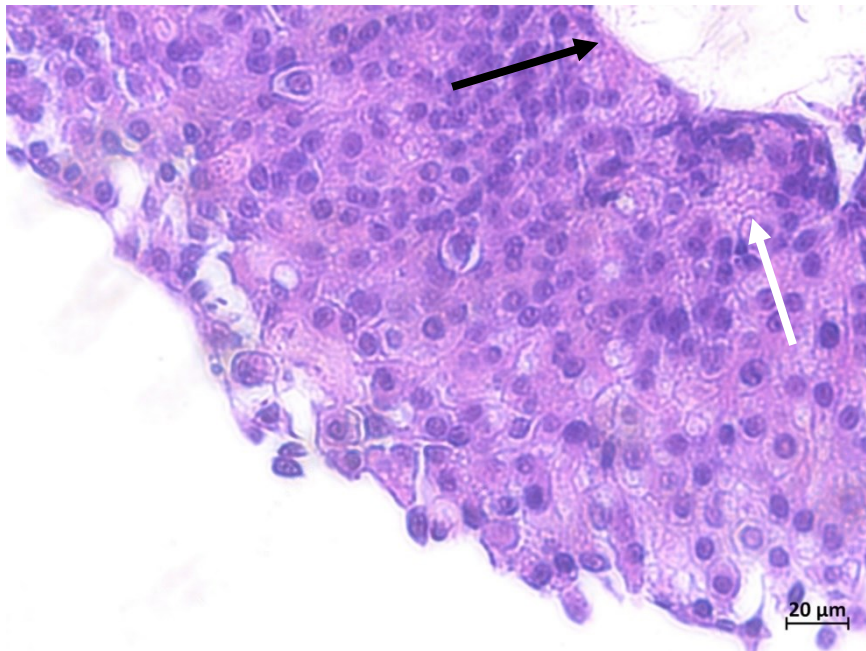


Abbildung 84: HE-Färbung des low grade NMIBC von Probe 6 mit 40x-Vergrößerung

In den Abbildungen 82 - 84 ist ein Ausschnitt des HE-gefärbten Tumorpräparates von Probe 6 mit verschiedenen Vergrößerungen zu sehen. Durch die HE-Färbung erscheinen die Zellkerne bläulich/lila, während das Zytoplasma und das Kollagen rötlich/rosa angefärbt sind. Der Tumor wurde als low grade und nicht-muskelinvasiv eingestuft, da maligne Eigenschaften, wie Aufhebung der Urothel-typischen Schichtung des Epithels und veränderte Kern-Plasma-Relation (bspw. weißer Pfeil in Abb. 84), allerdings die epithelbegrenzenden Basalmembran größtenteils nicht überschritten wurde (bspw. schwarzer Pfeil in Abb. 84).

Basierend auf den Tumorzellen dieser Probe wuchsen in der 3D-Kultur Organoide mit einer Größe von bis zu 100 µm, welche bis in die 6. Passage kultiviert wurden (Abb. 85).

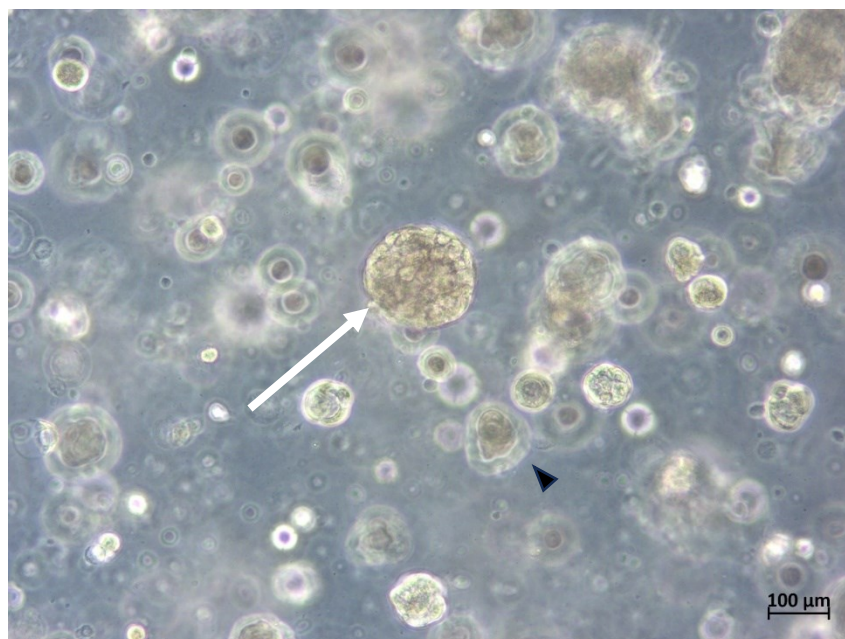


Abbildung 85: BCOs von Probe 6 während der Kultivierung in der 5. Passage an Tag 7

Die Abbildung 85 zeigt die Organoide der Probe 6 am 7. Tag der 5. Passage unter dem Mikroskop als runde Zellverbände (bspw. weißer Pfeil) und einen 100 µm Maßstab unten rechts im Bild. Da es sich um eine Mikroskopie einer 3D-Kultur handelt, sind im Hintergrund weitere Zellformationen unscharf zu erkennen (bspw. schwarze Pfeilspitze).

Für die Analyse der Markerexpression lagen Paraffinschnitte von dem Originaltumor (Tabellen 24-26) und RNA-Extrakte von den Organoiden der 5. Passage vor. Letzteres wurde mittels PCR untersucht und die Ergebnisse in dem Kapitel 3.5 Expression in den BCOs mittels qRT-PCR dokumentiert. Paraffinschnitte von den BCOs lagen aufgrund von unzureichender Organoidmenge nicht vor.

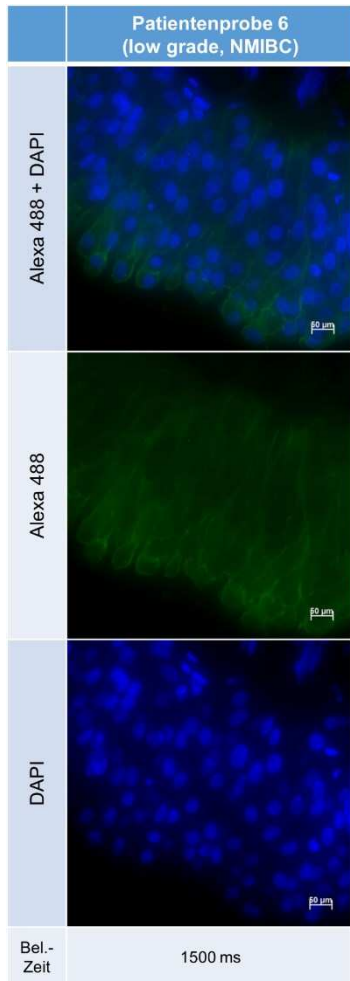


Tabelle 24: Nectin-4-Expression in Originaltumor von Probe 6 mittels IFL

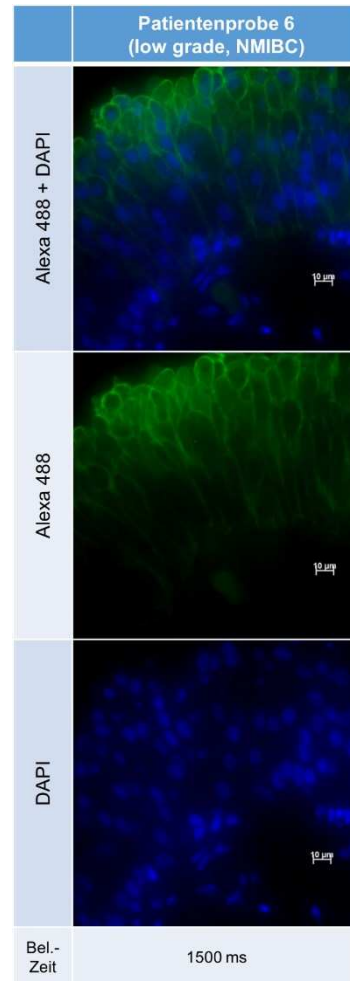


Tabelle 25: Trop-2-Expression in Originaltumor von Probe 6 mittels IFL

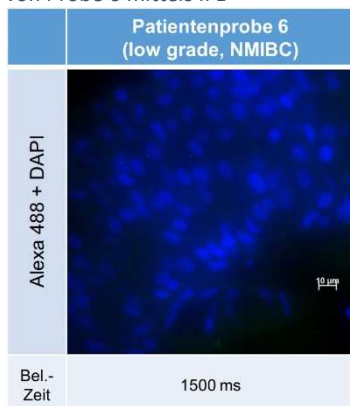


Tabelle 26: Negativkontrolle der IFL von Probe 6

Das Ergebnis der Immunfluoreszenzfärbung am Originaltumor von Probe 6 (mit 10 µm-Maßstab) ist in den Tabellen 24 und 25 zu sehen. Auch hier sind die Mikroskopaufnahmen zeilenweise zunächst mit dem Antikörper und DAPI zusammen und anschließend jeweils einzeln abgebildet. Dabei ist Alexa 488 der Sekundärintikörper für die Färbung von Nectin-4 bzw. Trop-2 und zeigt die Expression dieser mittels grüner Fluoreszenz an. Durch DAPI erscheinen die Zellkerne in der Immunfluoreszenz blau. In der letzten Zeile der Tabellen wird die Belichtungszeit, mit der die Aufnahmen gemacht wurden, angegeben. Diese wurde von dem zum Fluoreszenzmikroskop gehörigen Computerprogramm ermittelt und übertragen. Die Tabelle 26 zeigt die dazugehörige Negativkontrolle ohne Primärintikörper, welche auf die gleiche Weise lediglich mit einer Spalte für das Ergebnis mit dem Antikörper und DAPI zusammen dokumentiert wurde.

Bei der Analyse der Markerexpression in dem Originaltumor (Tabellen 24+25) wurde eine starke Nectin-4- und Trop-2-Expression festgestellt, die vor allem membran-betont war. Das Ergebnis der Negativkontrolle (Tabelle 26) wurde als negativ und somit verwendbar bewertet, da kein grünes Fluoreszenzsignal detektiert wurde.

3.4.7 Patientenprobe 7: BCO #300 P5

Diese Probe entstammte von einem männlichen Patienten mit positiver Raucheranamnese, bei dem im Alter von 56 Jahren die Diagnose eines Harnblasenkarzinoms gestellt wurde. Mittels TUR-B wurde der Primärtumor entfernt. Bei dem Eingriff lag eine positive Urinzytologie vor und der Tumor wurde von der Pathologie als G2 low grade eingestuft. Das TNM-Stadium war pT1a (weitere Angaben lagen nicht vor).

Die HE-Färbung des Originaltumors (Abb. 86-88) zeigte entsprechend der pathologischen Befundung einen nicht muskel-invasiven Blasentumor mit low-grade Differenzierung.

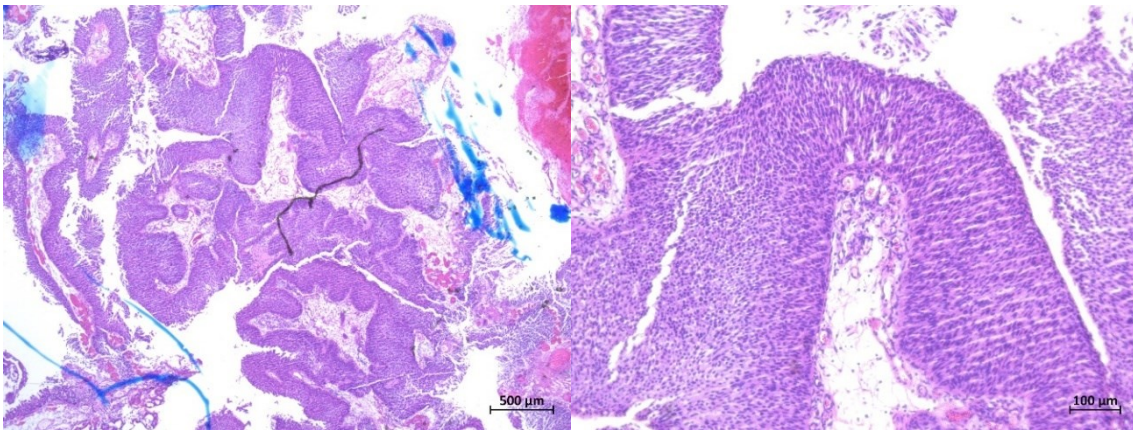


Abbildung 86: HE-Färbung des low grade NMIBC von Probe 7 mit 2,5x-Vergrößerung

Abbildung 87: HE-Färbung des low grade NMIBC von Probe 7 mit 10x-Vergrößerung

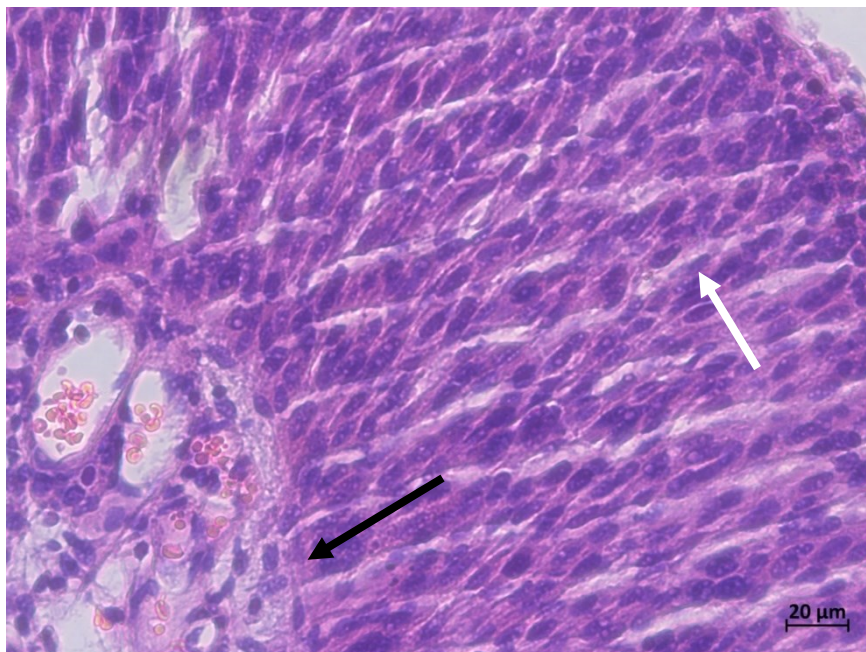


Abbildung 88: HE-Färbung des low grade NMIBC von Probe 7 mit 40x-Vergrößerung

In den Abbildungen 86 - 88 ist ein Ausschnitt des HE-gefärbten Tumorpräparates von Probe 7 mit verschiedenen Vergrößerungen zu sehen. Durch die HE-Färbung erscheinen die Zellkerne bläulich/lila, während das Zytoplasma und das Kollagen rötlich/rosa angefärbt sind. Der Tumor wurde als low grade und nicht-muskelinvasiv eingestuft, da maligne Eigenschaften, wie Aufhebung der Urothel-typischen Epithelarchitektur, vergrößerte Kern-Plasma-Relation und monomorphes Zellbild als Zeichen des reduzierten Differenzierungsgrades erkennbar sind (bspw. weißer Pfeil in Abb. 88). Die epithelbegrenzende Basalmembran wird von den Tumorzellen weitestgehend eingehalten und ggf. nur bis zum subepithelialen Bindegewebe (bspw. schwarzer Pfeil in Abb. 88) überschritten (pT1).

Die Organoide, die aus dieser Tumorprobe in der 3D-Kultur gewachsen sind, erreichten teilweise eine Größe von 100 µm und konnten bis in die 15. Passage kultiviert werden (Abb. 89).

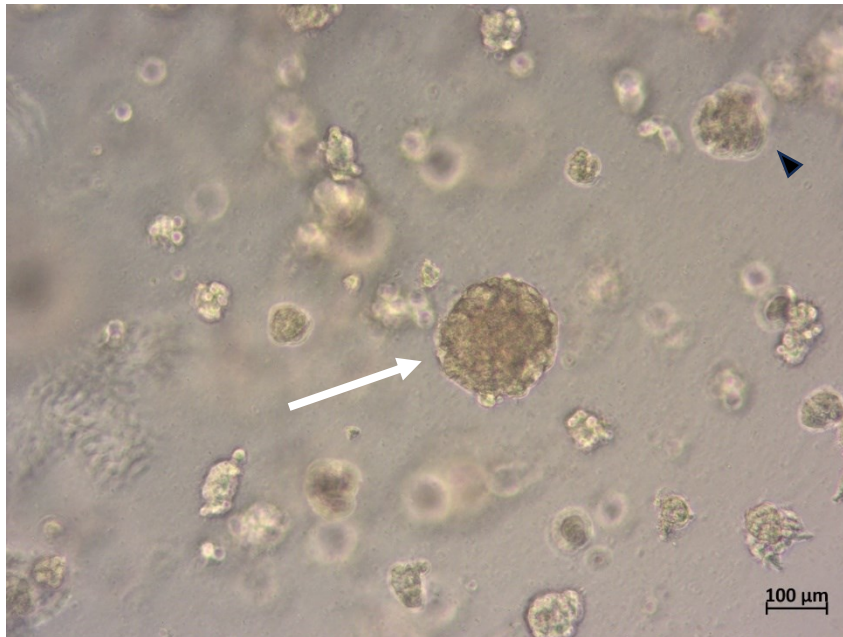


Abbildung 89: BCOs von Probe 7 während der Kultivierung in der 11. Passage an Tag 11

In der Abbildung 89 ist ein Foto der Organoide von Probe 7 (bspw. weißer Pfeil in der 11. Passage am 11. Tag unter dem Mikroskop mit einem 100 µm – Maßstab unten rechts am Bildrand zu sehen. Da es sich um eine Mikroskopie einer 3D-Kultur handelt, sind im Hintergrund weitere Zellformationen unscharf zu erkennen (bspw. schwarze Pfeilspitze).

Für die Analyse der Markerexpression lagen Paraffinschnitte von dem Originaltumor und den Organoiden in der 5. Passage vor (Tabellen 27-29).

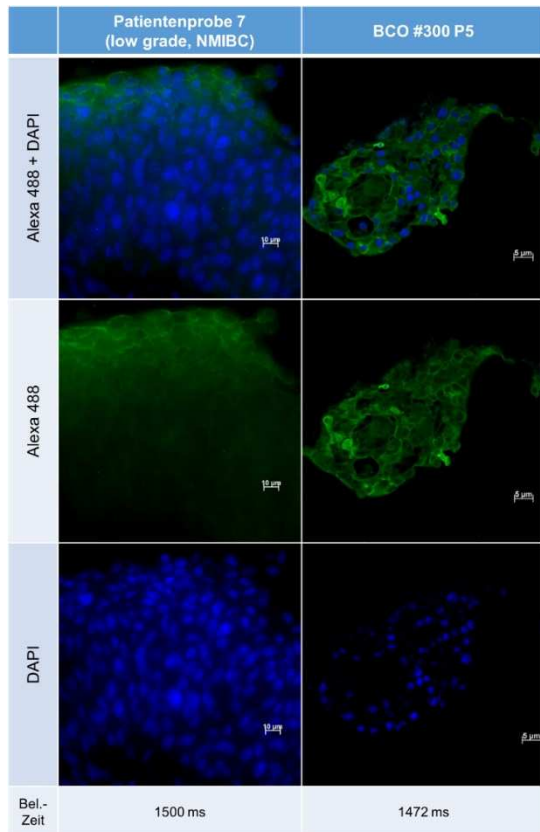


Tabelle 27: Nectin-4-Expression in Originaltumor (Spalte 1) und BCOs (Spalte 2) von Probe 7 mittels IFL

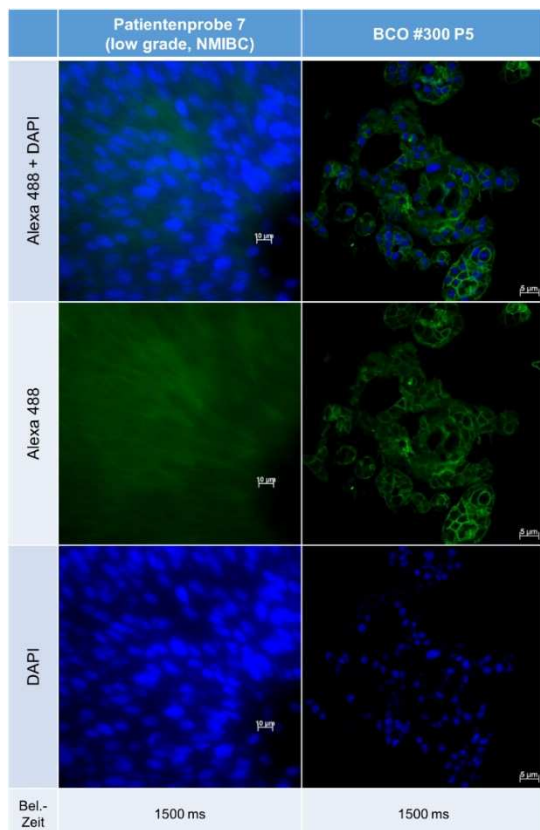


Tabelle 28: Trop-2-Expression in Originaltumor (Spalte 1) und BCOs (Spalte 2) von Probe 7 mittels IFL

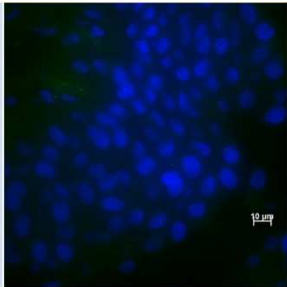
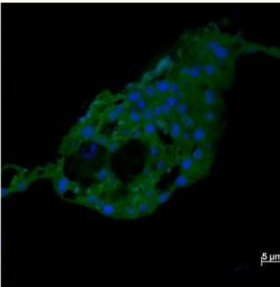
	Patientenprobe 7 (low grade, NMIBC)	BCO #300 P5
Alexa 488 + DAPI		
Bel.- Zeit	1500 ms	1500 ms

Tabelle 29: Negativkontrolle der IFL von Probe 7

In den Tabellen 27 und 28 ist das Färbeergebnis der Immunfluoreszenzfärbungen auf Nectin-4 und Trop-2 an dem Originaltumor (mit 10 µm-Maßstab) und den Blasentumororganoiden (mit 5 µm-Maßstab) von Probe 7 zusammengetragen. Eine Spalte steht jeweils für die Originaltumor- bzw. BCO-Probe, während die Mikroskopaufnahmen zeilenweise zunächst den Antikörper und DAPI zusammen und anschließend jeweils einzeln abbilden. Dabei ist Alexa 488 der Sekundärantikörper für die Färbung von Nectin-4 bzw. Trop-2 und zeigt die Expression dieser mittels grüner Fluoreszenz an. Durch DAPI erscheinen die Zellkerne in der Immunfluoreszenz blau. In der letzten Zeile der Tabellen wird die Belichtungszeit, mit der die Aufnahmen gemacht wurden, angegeben. Diese wurde von dem zum Fluoreszenzmikroskop gehörigen Computerprogramm ermittelt und übertragen. Die Tabelle 29 zeigt die dazugehörige Negativkontrolle ohne Primärantikörper, welche auf die gleiche Weise lediglich mit einer Spalte für das Ergebnis mit dem Antikörper und DAPI zusammen dokumentiert wurde.

Den Tabellen 27 und 28 lässt sich entnehmen, dass der Originaltumor Nectin-4 und Trop-2 leicht exprimierte, während die dazugehörigen Organoiden beide Marker stark aufwiesen. Dabei war das Expressionsmuster membranbetont und wies untereinander Ähnlichkeit auf. Die dazugehörige Negativkontrolle (Tabelle 29) wurde erfolgreich durchgeführt. Die leichte Grünfärbung wurde als Färbefakt durch am Objektträger hängengebliebenem Sekundärantikörper bewertet.

3.5 Nachweis der Nectin-4- u. Trop-2-Expression in den BCOs mittels qRT-PCR

Die etablierten Protokolle für die qRT-PCR mit Nectin-4- und Trop-2-Primern wurden angewendet, um die vorliegende RNA bzw. cDNA der BCOs bezüglich ihrer Expression von Nectin-4 und Trop-2 zu analysieren. Die Ergebnisse dieser PCR-Analysen sind in den Abbildungen 90 – 92 zu sehen.

Insgesamt standen für die qRT-PCR 15 Proben zur Verfügung. Bei der Auswertung der PCR ist zu sehen, dass Trop-2 in allen Proben mehr exprimiert wurde als Nectin-4 (Abb. 92). Der Mittelwert der Target-Reference-Ratio war bei Trop-2 0,4 und bei Nectin-4 0,04. Dabei lagen bei Trop-2 (Abb. 91) die Werte von sechs Proben oberhalb des Mittelwerts und bei Nectin-4 (Abb. 90) war dies bei vier Proben der Fall. Innerhalb einer Organoidreihe veränderten sich die Werte in den verschiedenen Passagen unregelmäßig. Es fiel auf, dass sich dabei die Werte von Nectin-4 und Trop-2 verhältnismäßig parallel zueinander veränderten (Abb. 92). Bei einer Probe war der Wert in der mittleren Passage (#140 P7) am höchsten. Zwei Proben veränderten im Verlauf die Expression leicht aufsteigend (#154 P2-P24) bzw. leicht absteigend (#270 P4-P10). Sowohl in der Organoidreihe #267, als auch bei #287, wurde in den späten Passagen (#267 P12-15 bzw. #287 P14) eine deutlich geringere Expression im Vergleich zu den frühen Passagen (#267 P8 bzw. #287 P1) festgestellt (Abb. 92).

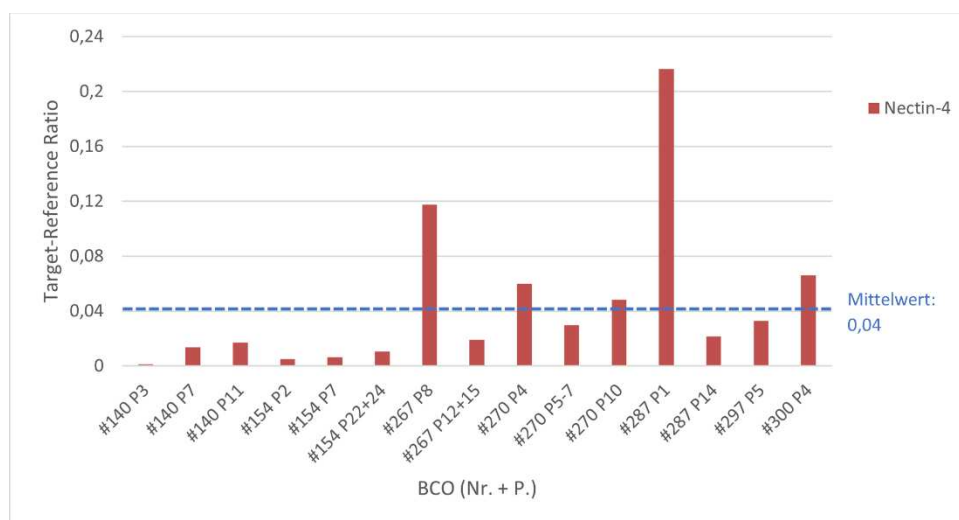


Abbildung 90: Nectin-4-Gen-Expression der BCOs

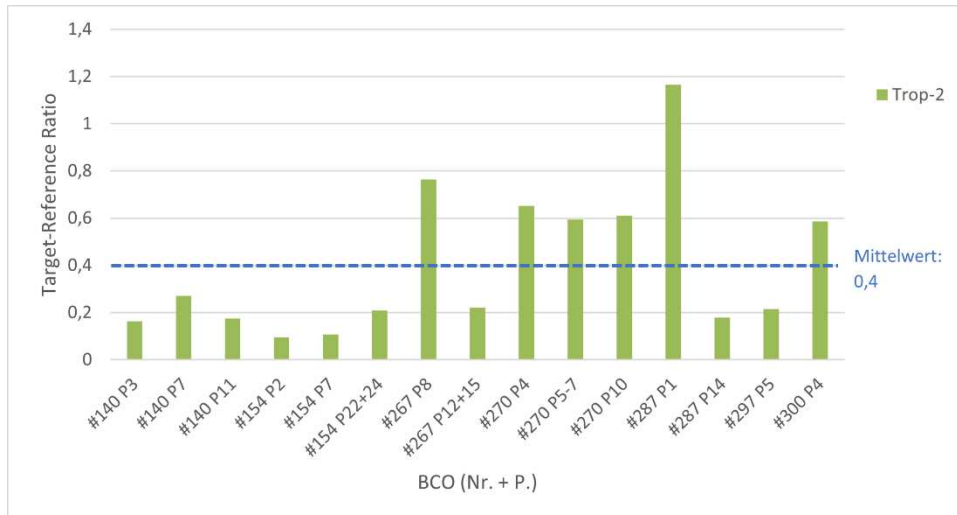


Abbildung 91: Trop-2-Gen-Expression der BCOs

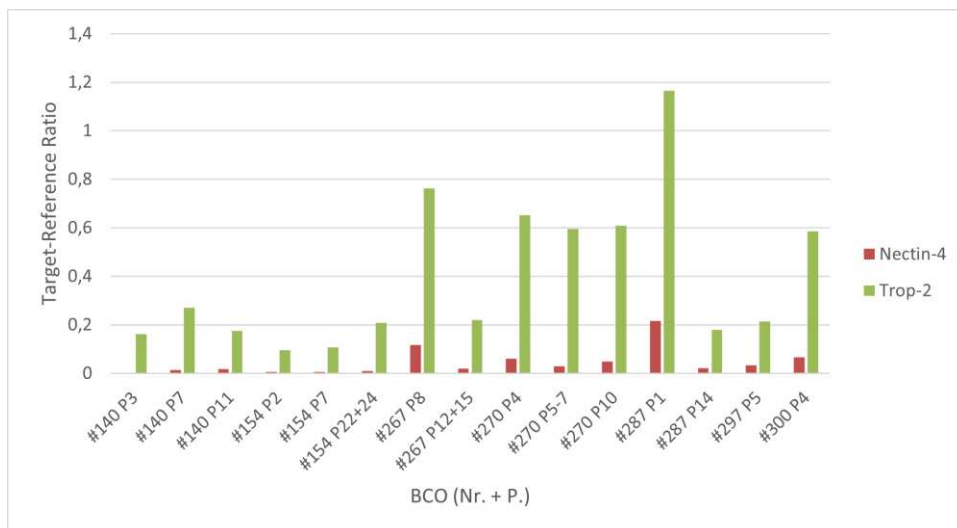


Abbildung 92: Vergleich der Nectin-4- und Trop-2-Gen-Expression der BCOs

In den Abbildungen 90-92 sind die Ergebnisse von den PCR-Analysen der BCOs zu sehen. Dabei wurden die BCO-Proben mit ihrer Nummer und Passage nebeneinander auf der x-Achse aufgelistet und ihre jeweiligen Target-Reference-Ratios als Säulen mit der entsprechenden Höhe auf der y-Achse dargestellt. Eine Target-Reference-Ratio beschreibt die Expression des Zielgens im Verhältnis zu der Expression von sogenannten Housekeeping-Genen, wie beispielsweise GAPDH und beta-Actin, die in jeder Zelle exprimiert werden. Die Expression von Nectin-4 wird mittels roter Säulen und die von Trop-2 mittels grüner Säulen dargestellt. Um einschätzen zu können, ob die Markerexpression besonders niedrig oder hoch ist, wurde jeweils ein Mittelwert aus den Target-Reference-Ratios von Nectin-4 und Trop-2 gebildet und dieser zum Vergleich als blaue, gestrichelte Linie in dem Säulendiagramm aufgetragen (Abb. 90 und 91). In Abbildung 92 wurden dann die Target-Reference-Ratios von Nectin-4 und Trop-2 jeder Probe nebeneinander abgebildet und verglichen.

3.6 Übersicht der Ergebnisse

Insgesamt betrachtet zeigten unsere Ergebnisse (Tabelle 30), dass die Originaltumore meistens kein bzw. leicht Nectin-4 exprimierten. Lediglich die Proben der low grade Tumore zeigten eine starke Nectin-4-Expression. Trop-2 exprimierten die meisten Originaltumore leicht. Auch hier stammten die Proben mit mehr Trop-2-Expression von low grade Tumoren ab.

Alle Organoide exprimierten Nectin-4 und Trop-2. Dabei war die Expression in den Organoiden stets stärker als in den Originaltumoren. Auf RNA-Ebene lag die jeweilige Target-Reference-Ratio meistens unterhalb des Mittelwerts aus allen Target-Reference-Ratios. Erhöhte Werte wurden in einer 1., 4., 8. und 10. Passage gemessen.

Patient		Originaltumor				Organoide					
Nr.	Patientendaten	Tumorstadium	Nectin-4		Trop-2		Max. P.	Nectin-4		Trop-2	
			IFL	IFL	IFL	IFL		RNA	IFL	RNA	
1	<ul style="list-style-type: none"> Männlich 62 J. Raucher 	<ul style="list-style-type: none"> High-grade G3 pT1 Pos. Zytologie 	LG	HG	LG	HG	29	P2	P3	P2	P3
								P10	P7	P10	P7
								P23	P11	P23	P11
2	<ul style="list-style-type: none"> Männlich 62 J. Raucher 	<ul style="list-style-type: none"> High-grade G3 pT3b Pos. Zytologie 	kl.zell.	HG	kl.zell.	HG	23	P1	P2	P1	P2
								P8	P7	P8	P7
								P21	P22+24	P21	P22+24
3	<ul style="list-style-type: none"> Männlich 73 J. Raucher 	<ul style="list-style-type: none"> High-grade G3 pT1 Pos. Zytologie 	LG	HG	LG	HG	14	P10	P8	P10	P8
									P12+15		P12+15
4	<ul style="list-style-type: none"> Weiblich 86 J. Raucher 	<ul style="list-style-type: none"> High-grade G3 pT2a Pos. Zytologie 	HG	HG	HG	HG	30	P9	P4	P9	P4
									P5-7		P5-7
									P10		P10
5	<ul style="list-style-type: none"> Männlich 55 J. Raucher 	<ul style="list-style-type: none"> High-grade G3 pT1 Pos. Zytologie 	HG	HG	HG	HG	29	n. a.	P1	n. a.	P1
									P14		P14
6	<ul style="list-style-type: none"> Weiblich 57 J. Nichtraucher 	<ul style="list-style-type: none"> Low-grade G2 pT1a Neg. Zytologie 	LG	LG	LG	LG	6	n. a.	P5	n. a.	P5
7	<ul style="list-style-type: none"> Männlich 56 J. Raucher 	<ul style="list-style-type: none"> Low-grade G2 pT1a Pos. Zytologie 	LG	LG	LG	LG	15	P5	P4	P5	P4

• IFL: Farbintensität
 • RNA: x-faches vom M

Keine Expression < 0,5
 Leichte Expression 0,5 – 1,0
 Mittelstarke Expression 1,1 – 1,5
 Starke Expression > 1,5
 n. a. = not available

Tabelle 30: Übersicht der Ergebnisse

In der Tabelle 30 sind die Ergebnisse zusammengetragen. Links stehen zunächst Daten über den Patienten (Probennummer, Geschlecht, Alter, Raucherstatus) und das Tumorstadium (Staging, Grading, Urinzytologie). Dann folgt in den nächsten Spalten die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung (IFL) an den Originaltumoren unterteilt in Nectin-4 und Trop-2. Dabei wurde entsprechend der Histologie zwischen low grade (LG), high grade (HG) und kleinzellig (kl. zell.) unterschieden. Rechts ist die Auswertung der Untersuchungen an den Organoiden zu sehen, welche die maximal erreichte Passage und dann jeweils für Nectin-4 und Trop-2 Immunfluoreszenzfärbungen- und PCR-Ergebnisse umfasst. Bei den Organoiden ist immer die Passage der untersuchten Probe angegeben. Die Darstellung der Expression erfolgte an der

unten zu sehenden Farbskalierung. In orange sind die Ergebnisse bezüglich der Nectin-4-Expression dargestellt, während die Ergebnisse der Trop-2-Expression in blau abgebildet werden. Je stärker die Expression detektiert wurde, desto stärker wurde die Farbintensität gewählt. Für die Auswertung der Expression auf RNA-Ebene, wurde ein Mittelwert aus den Target-Reference-Ratios gebildet und dann die Farbskalierung anhand des Verhältnisses zum Mittelwert festgelegt.

4 Diskussion

Unsere Ergebnisse zeigten, dass die Originaltumore die untersuchten Marker Nectin-4 und Trop-2 tendenziell wenig exprimierten. Die Proben mit vermehrter Expression stammten von low grade Tumoren. Die Organoide exprimierten Nectin-4 und Trop-2 immer in einem stärkeren Ausmaß als ihre Ursprungstumore. Auf RNA-Ebene zeichnete sich kein eindeutiger Trend ab, da erhöhte Expressionen sowohl in frühen, als auch in späteren Passagen, sowie sowohl in low grade, als auch in high grade Tumoren detektiert wurden.

Bezüglich der Frage, welche Passagen ähnlicher zum Originaltumor sind, schienen frühere Passagen ähnlicher zu sein. Die untersuchten frühen Passagen zeigten meistens weniger und damit ähnlichere Expression von Nectin-4 und Trop-2. Während ab der 5. Passage überwiegend eine stärkere Expression detektiert wurde.

Ein möglicher Grund für die abweichenden Expressionsmuster in den Organoiden könnte die Heterogenität der Tumore sein. In einer Tumorprobe können in verschiedenen Bereichen die Zellen unterschiedlich stark entartet sein. So kann eine Probe low-grade und nicht-invasiv sein und einige Millimeter weiter ist der Tumor möglicherweise schon fortgeschrittener und invasiv. Dies spiegelt sich auch in den Organoiden wider, die ebenfalls eine Heterogenität bei Histologie- und Immunfluoreszenz-Analysen aufwiesen (Meijer, 2021). Von einem Patienten können mehrere Organoidlinien kultiviert werden, die sich aufgrund der intratumoralen Heterogenität in ihren Eigenschaften unterscheiden. Beispielsweise können die Organoide die Zytokeratine CK 5 und CK 20 unterschiedlich stark exprimieren (Mullenders et al., 2019). Auch eine variierende Nectin-4- und Trop-2-Expression wäre dadurch eventuell erklärbar. Dass die Organoide diese Heterogenität des Ursprungtumors bewahren, ist wichtig, um als Tumormodell zu fungieren (Minoli et al., 2023, Meijer, 2021). Andererseits schränkt es möglicherweise auch die Vergleichbarkeit der Organoide zum Originaltumor ein, wenn durch die Organoidlinie nicht die Mehrheit des Originaltumors repräsentiert wird (Mullenders et al., 2019).

Während der Kultivierung der aufbereiteten Tumorzellen zu Organoiden selektieren sich eventuell die Zellen mit hoher Nectin-4- und Trop-2-Expression heraus.

Organoide zeigten während der Kultivierung ein klonales Wachstum, welches möglicherweise durch Selektionsdruck und die Aktivität von Onkogenen beeinflusst wird. Die genauen Prozesse, die zu dem klonalen Wachstum führen, müssen in weiteren Studien untersucht werden. Dabei können Organoiden mit experimentellen Manipulationen zum Einsatz kommen (Lee et al., 2018). Es könnte darauf beruhen, dass Nectin-4 als Adhäsionsprotein förderlich für die Formation von Zellverbänden wirkt und Trop-2 proliferativ und antiapoptotisch (Banerjee and Southgate, 2019). Folglich wäre dies auch ein Argument für die Bevorzugung früherer Passagen von BCOs als Tumormodell, wenn der Selektionseffekt noch möglichst wenige Auswirkungen hatte und die Expressionsmuster dem Originaltumor noch ähnlicher sind.

Jene phänotypische Plastizität im Laufe der Kultivierung von Organoiden wurde bereits in anderen Publikationen beschrieben und könnte ein natürlicher Prozess der Tumorprogression sein. Im Rahmen dessen scheinen sich einige Blasen-tumore vom luminalen zum basalen Subtyp umzuwandeln (Lee et al., 2018). CK 5 wäre dabei ein Marker für den basalen Subtyp und CK 20 hingegen für den luminalen. Die meisten Organoiden scheinen während der Kultivierung ihre luminalen Eigenschaften zu verlieren und eher basale Merkmale aufzuweisen (Said, 2019). Beim Umsetzen in Xenografts wurde ein Wandel zurück zum luminalen Subtyp beobachtet (Lee et al., 2018). Ein möglicher Schluss daraus ist, dass das Stroma und die in vivo existierende Extrazellulärmatrix für die Expression luminaler Marker von Nöten zu sein scheinen (Lee et al., 2018). Dies wäre ebenfalls ein Argument für den experimentellen Einsatz von früheren Passagen der Organoiden, wenn jene den Subtyp des Originaltumors noch möglichst gut abbilden. Außerdem könnte ein Kulturansatz inklusive Stromazellen die Übereinstimmung der Expressionsmuster in den Organoiden mit denen im Originaltumor steigern.

Denn die abweichenden Expressionsmuster können auch dadurch entstehen, dass die Tumorzellen im Rahmen der Kultivierung in ein anderes Milieu gelangen. Es wird bei der Kultivierung darauf geachtet, dass das Milieu möglichst ähnlich ist, zum Beispiel durch die Verwendung von speziellem Kulturmedium, welchem u.a. Wachstumsfaktoren, nicht-essenzielle Aminosäuren und ein Antibiotikum zugefügt wurden. Allerdings befinden sich in der 3D-Kultur keine Immun-

und Nervenzellen und nur wenige Stroma- und Endothelzellen, die in vivo eventuell das Tumorwachstum beeinflussen. Dass sich die Organoiden teilweise untereinander mehr ähneln als ihren Originaltumoren, könnte ebenfalls an der geringen Dichte von diesen Zellen oder auch am Medium und BME liegen (Lee et al., 2018). Um dem entgegenzuwirken, sollte die Möglichkeit einer Kultivierung inklusive dieser anderen Zelltypen etabliert werden. Dies würde dann außerdem der Erforschung des Effekts der Extrazellulärmatrix bei der Tumorprogression dienen (Wang et al., 2017).

Es lässt sich nicht ausschließen, dass sich in einer Organoidkultur bereits sowohl urotheliale, als auch stromale Zellen befinden, da beim Ansetzen einer Organoidkultur die vollständige Tumorprobe zunächst in einzelne Zellen zerteilt und die gesamte Zellsuspension kultiviert wird (Mullenders et al., 2019). Analysen zeigten, dass die Organoiden urotheliale Zellen mit Zytokeratinen und Blasen-tumor-Vorläuferzellen mit Stammzellmarkern (z.B. CD24, CD44), wie auch mesenchymale Zellen mit Vimentin und endotheliale Zellen mit Phalloidin enthalten (Wei et al., 2022).

Mehr Ähnlichkeit zwischen Organoiden und ihrem Originaltumoren wurde in anderen Studien festgestellt. Diese untersuchten allerdings andere Marker, die möglicherweise weniger durch die Kultivierung beeinflusst werden. Beispielsweise detektierten Lee et al. eine kohärente Expression von CK 5, CK 7, CK 8, Ki 67 und p53 beim Vergleich der Immunfluoreszenzfärbungen an den Organoiden und ihren Originaltumoren (Lee et al., 2018).

Andere Studien verwendeten eventuell auch andere Protokolle für die Kultivierung der Organoiden. Um hier eine Vergleichbarkeit sicherzustellen, wäre es wichtig, die Protokolle für die Kultivierung von Blasen-tumororganoiden zu optimieren und in allen Laboren zu standardisieren (Wang et al., 2017).

In unserer Studie wurden die Organoiden für die Immunfluoreszenzfärbung nach Extraktion aus dem Dome mit 4%igem Paraformaldehyd über Nacht inkubiert und anschließend in Histogel eingebettet. Um das Histogelpellet herum wurde dann nach der Entwässerung der Paraffinblock gegossen. Die Originaltumore hingegen, wurden in Formalin fixiert, entwässert und um die Probe herum der Paraffinblock gegossen. Es lässt sich in unserer Studie nicht ausschließen, dass die

unterschiedliche Aufbereitung der Proben einen Einfluss auf die Immunfluoreszenzfärbung haben und so zu den unterschiedlichen Färbeergebnissen beigetragen haben.

In der Literatur wurde oftmals eine Assoziation zwischen einer hohen Expression von Nectin-4 bzw. Trop-2 und einem fortgeschrittenem Tumorstadium beschrieben (Chatterjee et al., 2021, D'Angelo et al., 2022). Auch die Wirkung der neuen Antikörper-Wirkstoff-Konjugate Enfortumab-Vedotin und Sacituzumab-Govitecan, die Nectin-4 bzw. Trop-2 binden, beruht darauf, dass diese Marker in Blasenkarzinomen oft erhöht sind. In unserer Studie wurde die höchste Expression von Nectin-4 und Trop-2 in Proben der low-grade Tumore festgestellt. Möglicherweise liegt es an der kleinen Probenanzahl, dass sich an dieser Stelle die Ergebnisse unterscheiden. Andererseits wurde im September 2023 eine Studie von Klümper et al. veröffentlicht, die zu dem Ergebnis kam, dass sich die Expression von Nectin-4 im Laufe der Tumorprogression reduziert und bei mehr als einem Drittel der untersuchten Patienten mit metastasierten Urothelkarzinomen sogar fehlt (Klümper et al., 2023). Dem gegenüber stehen Untersuchungen von Vulsteke et al., die ergaben, dass die Therapie mit Enfortumab-Vedotin an Blasen-tumor-Patienten mit Gehirnmastasen eine rückläufige Entwicklung der Gehirnmastasen herbeiführen kann. Dies würde den Schluss nahelegen, dass die Gehirnmastasen durchaus auch Nectin-4 exprimieren (Vulsteke et al., 2023). Aktuell ist für die Gabe von Enfortumab-Vedotin keine Analyse der Nectin-4-Expression vorgeschrieben, da von einer ausreichenden Expression ausgegangen wird. Da allerdings eine schwache bzw. fehlende Nectin-4-Expression die Wirkung von Enfortumab-Vedotin reduziert bzw. aufhebt und Studien zufolge nicht immer eine ausreichende Nectin-4-Expression gegeben ist, sollte in Erwägung gezogen werden, vor der Enfortumab-Vedotin-Gabe den Nectin-4-Rezeptorstatus anhand von immunhistochemischen Untersuchungen oder zukünftig möglicherweise mit Nectin-4-PET/CT oder anhand von patientenabgeleiteten Organoiden zu bestimmen. Dadurch könnte ressourcensparender therapiert werden und bei Patienten mit unzureichender Nectin-4-Expression im Tumor direkt andere Therapeutika, wie z.B. das Sacituzumab-Govitecan, angewendet werden (Klümper et al., 2023).

Bei einer Analyse der Nectin-4- und Trop-2-Expression in Gewebeproben mit Korrelation zum histologischen Subtyp, wurde festgestellt, dass alle außer dem neuroendokrinen Subtyp beide Marker moderat stark exprimieren. Die Immunhistochemiefärbung zeigte neben der zu erwartenden membranösen Expression von Nectin-4 und Trop-2 auch eine starke Anfärbung der Marker im Zytoplasma. Auch in unserer Studie zeigte sich eine zytoplasmatische Expression von Nectin-4 und Trop-2 in den Organoiden. Dies könnte relevant sein für die Evaluation der Medikamente Enfortumab-Vedotin und Sacituzumab-Govitecan, die für ihre Wirkung die membranöse Expression von Nectin-4 bzw. Trop-2 nutzen. Ist in einem Tumor lediglich die zytoplasmatische Expression von Nectin-4 und Trop-2 erhöht, so ist wahrscheinlich von einer reduzierten Wirkung der Antikörper-Wirkstoff-Konjugate auszugehen. Die Relevanz der zytoplasmatischen Lokalisation der Medikamententargets sollte in weiteren Studien untersucht werden (Ghali et al., 2023).

Die Auswirkungen einer Nectin-4-Expression analysierten Boylan et. al. Sie stellten fest, dass Zellen mit Nectin-4-Knockdown keine Sphäroide formten, sowie langsamer migrierten und proliferierten als Zellen mit moderater Nectin-4-Expression. Letztere bildeten große und kompakte Sphäroide innerhalb von 24h. Interessanterweise führte wiederum eine erhöhte Nectin-4-Expression zu ähnlichen Ergebnissen wie bei den Nectin-4-Knockdown-Zellen. Nectin-4 scheint demnach auf diese biphasische Weise an der Migration, der Proliferation und der Formation von Zellverbänden beteiligt zu sein. Dass die Ursprungszellen mit moderater Nectin-4-Expression mehr epitheliale als mesenchymale Marker im Vergleich zu Nectin-4-Knockdown-Zellen exprimierten, könnte auf eine Beteiligung von Nectin-4 beim Wandel von epithelialen zu mesenchymalen Zellen zurückzuführen sein (Boylan et al., 2017). Auch in unseren Ergebnissen zeigt sich die Nectin-4-Expression förderlich für die Formation von Zellverbänden, da alle Organoide Nectin-4 exprimierten.

Trotz dieser Herausforderungen, die die Kultivierung und Anwendung von Organoiden bereithalten, eignen sie sich dennoch gut als Tumormodell. Im Gegensatz dazu weisen Tumorzelllinien einige Einschränkungen, wie zum Beispiel genetische Veränderung durch die Langzeitkultivierung oder die begrenzte Abbildung

der Verhältnisse in vivo, auf. Von Patienten abgeleitete Xenografts eignen sich schon besser als Tumormodell. Sie spiegeln die Histologie und das Medikamentenansprechen ausreichend wider, aber sind aufgrund unter anderem hoher Kosten, speziesspezifischer Unterschiede und eingeschränkter Zugänglichkeit für genetische Manipulationen begrenzt geeignet für Blasentumorforschung (Wang et al., 2017).

Langfristig sollen Blasentumororganoide der individuellen Medizin dienen, in dem an ihnen das Ansprechen auf Medikamente getestet und so die optimale Therapie für den Patienten zusammengestellt werden kann. Voraussetzung dafür ist, dass die Organoide in vitro das Medikamentenansprechen des Tumors im vivo abbilden. Ob dem so ist, muss in weiteren Studien belegt werden (Lee et al., 2018). Werden Blasentumororganoide verschiedenen Zytostatika ausgesetzt, zeigen sie individuelles Ansprechen auf die Medikamente. Dies zeigt, dass Organoide durchaus das Potenzial haben, das individuelle Therapieansprechen vorherzusagen (Said, 2019). Des Weiteren können Organoide für die Testung neuer Medikamente zum Einsatz kommen (Mullenders et al., 2019). An Organoiden können Marker für das Medikamentenansprechen identifiziert werden, wie z.B. Mutationsprofile, die die Wirksamkeit der Medikamente beeinflussen. Minoli et al. verwendeten auch die erste Passage der Organoide, um die Übereinstimmung der Organoide mit dem Originaltumor auf Genom- und Transkriptomebene zu bewahren. Sie führten eine Longitudinalstudie durch, die bestätigte, dass die vom Tumor des Patienten abgeleiteten Organoide das Medikamentenansprechen des Patienten widerspiegeln und Tumorevolution in vitro abbildeten (Minoli et al., 2023)

In Zukunft können außerdem Fortschritte im Bioingenieurwesen, wie beispielsweise mikrofluidische Geräte und Bioprinter, zur Standardisierung und erweitertem Einsatz von Organoiden beitragen (Medle et al., 2022). Doch auch schon jetzt können Organoide der Erforschung von Urothel dienen. So können die Regulation von Wachstum und Differenzierung in normalem und entarteten Urothel untersucht werden und die Signalwege zwischen Epithel und Stroma in den Blasentumororganoiden mit denen in normalen Urothel verglichen werden (Banerjee and Southgate, 2019).

Insgesamt lassen sich die festgestellten Expressionsmuster in dieser Studie gut erklären durch die Tumorerogenität in Blasenkarzinomen und dem Selektionseffekt durch unter anderem Nectin-4 und Trop-2 als Adhäsions- und Proliferationsmoleküle.

Es zeichnete sich die Tendenz zur Bevorzugung früherer Organoid-Passagen ab, um die Auswirkungen des Selektionseffekts und dem veränderten Milieu (in vivo vs. in vitro), sowie dem Wandel vom luminalen zum basalen Subtyp vorzubeugen.

Organoide können zuversichtlich als Tumormodell dienen und bieten u.a. die Möglichkeit die Evolution von Tumoren zu erforschen und Medikamente zu testen. Eine Vergleichbarkeit zum Originaltumor ist Voraussetzung für das Langzeitziel in der individuellen Therapieplanung zum Einsatz zu kommen und wurde bereits in oben genannten Studien erfolgreich untersucht. Für die Etablierung im klinischen Alltag bedarf es noch weitere Forschung, um die Kultivierung schneller und effizienter zu gestalten.

Die Ergebnisse ergänzen außerdem das Wissen über die Auswirkungen der Nectin-4- und Trop-2-Expression, welche förderlich für die Kultivierung von Organoiden zu sein scheint.

Um die Wirksamkeit von Enfortumab-Vedotin und Sacituzumab-Govitecan zu steigern, bedarf es weitere Analysen der Target-Expression. Dabei ist relevant bei welchen Tumorstadien die Expression erhöht ist, um möglicherweise die Zulassung der Medikamente auch für die Therapie von weniger fortgeschrittenen Urothelkarzinomen zu erweitern. Beachtet werden sollte auch, ob sich die Nectin-4- bzw. Trop-2-Expression in der Membran oder im Zytosol befindet, da wahrscheinlich nur die membranären Moleküle für die Antikörper-Wirkstoff-Konjugate zugänglich sind.

5 Zusammenfassung

Das Harnblasenkarzinom gehört zu den häufigsten Tumoren sowohl in Deutschland, als auch weltweit (IARC, 2020). Die Therapiemöglichkeiten sind inzwischen vielfältig. Dennoch bedarf es weiterhin viel Forschung, um die Tumorgenese besser zu verstehen und weitere Ansatzpunkte für eine Therapie zu entwickeln (Wang et al., 2017). Dafür kommen von Patienten abgeleitete Organoide zum Einsatz, die als in-vitro-Tumormodelle die individualisierte Medizin unterstützen sollen. Die in dieser Arbeit untersuchten Marker sind Nectin-4 und Trop-2 – die Zielstrukturen der Antikörper-Wirkstoff-Konjugate Enfortumab-Vedotin und Sacituzumab-Govitecan.

Wie ist das Expressionsmuster von Nectin-4 und Trop-2 in den Organoiden, sowie in den Originaltumoren und in welchen Passagen weisen die Organoide die meisten Ähnlichkeiten zum Originaltumor auf? Hat die Expression dieser Marker einen Einfluss auf die Kultivierung bzw. wie ist sie mit dem Tumorstadium assoziiert?

Es wurden mehrere Organoide kultiviert und parallel Paraffinschnitte und RNA-Extrakte angefertigt, um jene hinsichtlich ihrer Expression von Nectin-4 und Trop-2 mittels Immunfluoreszenzfärbungen und qRT-PCR zu untersuchen. Die dazugehörigen Originaltumoren wurden ebenfalls mittels Immunfluoreszenzfärbungen hinsichtlich ihrer Expression der beiden Marker analysiert.

Die Originaltumore exprimierten Nectin-4 und Trop-2 tendenziell wenig. Die Proben mit vermehrter Expression stammten von low grade Tumoren. Die Organoide wiesen immer eine stärkere Expression als ihre Ursprungstumore auf. Weniger und damit ähnlichere Expression wurde in früheren Passagen detektiert. Auf RNA-Ebene zeichnete sich kein eindeutiger Trend ab.

Die festgestellten Expressionsmuster in dieser Studie lassen sich gut erklären durch die Tumorheterogenität in Blasenkarzinomen und dem Selektionseffekt durch Nectin-4 und Trop-2 als Adhäsions- und Proliferationsmoleküle. Es zeichnete sich die Tendenz zur Bevorzugung früherer Organoid-Passagen ab, um die Auswirkungen des Selektionseffekts und dem veränderten Milieu (in vivo vs. in vitro), sowie dem Wandel vom luminalen zum basalen Subtyp vorzubeugen. Dass diese Studie eine erhöhte Nectin-4- und Trop-2-Expression eher bei low

grade Tumoren feststellte, liegt möglicherweise an der kleinen Probenanzahl oder zeigt einen ähnlichen Trend wie in der Studie von Klümper et al. beschrieben (Klümper et al., 2023). Nectin-4 scheint, wie von Boylan et al. beschrieben (Boylan et al., 2017), förderlich für die Formation von Zellverbänden zu sein, da bei den Analysen alle Organotide Nectin-4 exprimierten.

Organotide können als in-vitro 3D-Tumormodell dienen und eignen sich vor allem in den frühen Passagen für einen Vergleich zum Originaltumor. Nectin-4 und Trop-2 wirken sich positiv auf den Zusammenhalt von Organoiden aus. Wie die Expression dieser beiden Marker mit dem Tumorstadium assoziiert ist, lässt sich aus diesen Ergebnissen nicht eindeutig schließen und bedarf weitere Studien.

6 Literaturverzeichnis

- AL-ZALABANI, A. H., STEWART, K. F., WESSELIUS, A., SCHOLS, A. M. & ZEEGERS, M. P. 2016. Modifiable risk factors for the prevention of bladder cancer: a systematic review of meta-analyses. *Eur J Epidemiol*, 31, 811-51.
- ALT, M., STECCA, C., TOBIN, S., JIANG, D. M. & SRIDHAR, S. S. 2020. Enfortumab Vedotin in urothelial cancer. *Ther Adv Urol*, 12, 1756287220980192.
- BALAR, A. V., CASTELLANO, D., O'DONNELL, P. H., GRIVAS, P., VUKY, J., POWLES, T., PLIMACK, E. R., HAHN, N. M., DE WIT, R., PANG, L., SAVAGE, M. J., PERINI, R. F., KEEFE, S. M., BAJORIN, D. & BELLMUNT, J. 2017a. First-line pembrolizumab in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and unresectable or metastatic urothelial cancer (KEYNOTE-052): a multicentre, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol*, 18, 1483-1492.
- BALAR, A. V., GALSKY, M. D., ROSENBERG, J. E., POWLES, T., PETRYLAK, D. P., BELLMUNT, J., LORIOT, Y., NECCHI, A., HOFFMAN-CENSITS, J., PEREZ-GRACIA, J. L., DAWSON, N. A., VAN DER HEIJDEN, M. S., DREICER, R., SRINIVAS, S., RETZ, M. M., JOSEPH, R. W., DRAKAKI, A., VAISHAMPAYAN, U. N., SRIDHAR, S. S., QUINN, D. I., DURÁN, I., SHAFFER, D. R., EIGL, B. J., GRIVAS, P. D., YU, E. Y., LI, S., KADEL, E. E., 3RD, BOYD, Z., BOURGON, R., HEGDE, P. S., MARIATHASAN, S., THÅSTRÖM, A., ABIDOYE, O. O., FINE, G. D. & BAJORIN, D. F. 2017b. Atezolizumab as first-line treatment in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet*, 389, 67-76.
- BANERJEE, S. & SOUTHGATE, J. 2019. Bladder organoids: a step towards personalised cancer therapy? *Transl Androl Urol*, 8, S300-s302.
- BILIM, V., KUROKI, H., SHIRONO, Y., MURATA, M., HIRUMA, K. & TOMITA, Y. 2022. Advanced Bladder Cancer: Changing the Treatment Landscape. *Journal of Personalized Medicine*, 12, 1745.
- BOYLAN, K. L., BUCHANAN, P. C., MANION, R. D., SHUKLA, D. M., BRAUMBERGER, K., BRUGGEMEYER, C. & SKUBITZ, A. P. 2017. The expression of Nectin-4 on the surface of ovarian cancer cells alters their ability to adhere, migrate, aggregate, and proliferate. *Oncotarget*, 8, 9717-9738.
- BOYLAN, K. L. M., MANION, R. D., SHAH, H., SKUBITZ, K. M. & SKUBITZ, A. P. N. 2020. Inhibition of Ovarian Cancer Cell Spheroid Formation by Synthetic Peptides Derived from Nectin-4. *Int J Mol Sci*, 21.
- BRIERLEY, J., GOSPODAROWICZ, M. & WITTEKIND, C. 2016. *TNM Classification of Malignant Tumours, 8th Edition*, Union for International Cancer Control (UICC).
- CELIK, O., EKIN, G., IPEKCI, T., BUDAK, S. & ILBEY, Y. O. 2016. Diagnosis and treatment in primary bladder small cell carcinoma: Literature review. *Arch Ital Urol Androl*, 88, 52-5.
- CHALLITA-EID, P. M., SATPAYEV, D., YANG, P., AN, Z., MORRISON, K., SHOSTAK, Y., RAITANO, A., NADELL, R., LIU, W., LORTIE, D. R.,

- CAPO, L., VERLINSKY, A., LEAVITT, M., MALIK, F., AVIÑA, H., GUEVARA, C. I., DINH, N., KARKI, S., ANAND, B. S., PEREIRA, D. S., JOSEPH, I. B., DOÑATE, F., MORRISON, K. & STOVER, D. R. 2016. Enfortumab Vedotin Antibody-Drug Conjugate Targeting Nectin-4 Is a Highly Potent Therapeutic Agent in Multiple Preclinical Cancer Models. *Cancer Res*, 76, 3003-13.
- CHANG, E., WEINSTOCK, C., ZHANG, L., CHARLAB, R., DORFF, S. E., GONG, Y., HSU, V., LI, F., RICKS, T. K., SONG, P., TANG, S., WALDRON, P. E., YU, J., ZAHALKA, E., GOLDBERG, K. B., PAZDUR, R., THEORET, M. R., IBRAHIM, A. & BEAVER, J. A. 2021. FDA Approval Summary: Enfortumab Vedotin for Locally Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma. *Clin Cancer Res*, 27, 922-927.
- CHATTERJEE, S., SINHA, S. & KUNDU, C. N. 2021. Nectin cell adhesion molecule-4 (NECTIN-4): A potential target for cancer therapy. *European Journal of Pharmacology*, 911, 174516.
- CHOU, J., TREPKA, K., SJÖSTRÖM, M., EGUSA, E. A., CHU, C. E., ZHU, J., CHAN, E., GIBB, E. A., BADURA, M. L., CONTRERAS-SANZ, A., STOHR, B. A., MENG, M. V., PRUTHI, R. S., LOTAN, Y., BLACK, P. C., PORTEN, S. P., KOSHKIN, V. S., FRIEDLANDER, T. W. & FENG, F. Y. 2022. TROP2 Expression Across Molecular Subtypes of Urothelial Carcinoma and Enfortumab Vedotin-resistant Cells. *European Urology Oncology*.
- CHU, C. E., SJÖSTRÖM, M., EGUSA, E. A., GIBB, E. A., BADURA, M. L., ZHU, J., KOSHKIN, V. S., STOHR, B. A., MENG, M. V., PRUTHI, R. S., FRIEDLANDER, T. W., LOTAN, Y., BLACK, P. C., PORTEN, S. P., FENG, F. Y. & CHOU, J. 2021. Heterogeneity in NECTIN4 Expression Across Molecular Subtypes of Urothelial Cancer Mediates Sensitivity to Enfortumab Vedotin. *Clinical Cancer Research*, 27, 5123-5130.
- D'ANGELO, A., CHAPMAN, R., SIRICO, M., SOBHANI, N., CATALANO, M., MINI, E. & ROVIELLO, G. 2022. An update on antibody-drug conjugates in urothelial carcinoma: state of the art strategies and what comes next. *Cancer Chemother Pharmacol*, 90, 191-205.
- DUM, D., TAHERPOUR, N., MENZ, A., HÖFLMAYER, D., VÖLKELE, C., HINSCH, A., GORBOKON, N., LENNARTZ, M., HUBE-MAGG, C., FRAUNE, C., BERNREUTHER, C., LEBOK, P., CLAUDITZ, T. S., JACOBSEN, F., SAUTER, G., UHLIG, R., WILCZAK, W., STEURER, S., MINNER, S., MARX, A. H., SIMON, R., BURANDT, E., KRECH, T. & LUEBKE, A. M. 2022. Trophoblast Cell Surface Antigen 2 Expression in Human Tumors: A Tissue Microarray Study on 18,563 Tumors. *Pathobiology*, 89, 245-258.
- DUTTA, R., ABDELHALIM, A., MARTIN, J. W., VERNEZ, S. L., FALTAS, B., LOTAN, Y. & YOUSSEF, R. F. 2016. Effect of tumor location on survival in urinary bladder adenocarcinoma: A population-based analysis. *Urol Oncol*, 34, 531.e1-531.e6.
- EAU 2023. *EAU Guidelines Bladder Cancer*, European Association of Urology, Arnhem, Nederlande.
- EL-MONIM, H. A., EL-BARADIE, M. M., YOUNIS, A., RAGAB, Y., LABIB, A. & EL-ATTAR, I. 2013. A prospective randomized trial for postoperative vs.

- preoperative adjuvant radiotherapy for muscle-invasive bladder cancer. *Urol Oncol*, 31, 359-65.
- EMA. 2022. *EPAR - Medicine overview* [Online]. Available: https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/padcev-epar-medicine-overview_en.pdf [Accessed 06.07.2023].
- FAN, Y., LI, Q., SHEN, Q., LIU, Z., ZHANG, Z., HU, S., YU, W., HE, Z., HE, Q. & ZHANG, Q. 2022. Head-to-Head Comparison of the Expression Differences of NECTIN-4, TROP-2, and HER2 in Urothelial Carcinoma and Its Histologic Variants. *Front Oncol*, 12, 858865.
- FARLING, K. B. 2017. Bladder cancer: Risk factors, diagnosis, and management. *The Nurse Practitioner*, 42, 26-33.
- GALSKY, M. D., HAHN, N. M., ROSENBERG, J., SONPAVDE, G., HUTSON, T., OH, W. K., DREICER, R., VOGELZANG, N., STERNBERG, C. N., BAJORIN, D. F. & BELLMUNT, J. 2011. Treatment of patients with metastatic urothelial cancer "unfit" for Cisplatin-based chemotherapy. *J Clin Oncol*, 29, 2432-8.
- GHALI, F., ROUDIER, M., VAKAR-LOPEZ, F., GARCIA, J., WANG, Y., HA, G., GRIVAS, P., LEE, J., YU, E., MONTGOMERY, B., HSIEH, A., WRIGHT, J. & LAM, H.-M. 2022. PD53-09 ANTIBODY DRUG CONJUGATES AND VARIANT HISTOLOGY MUSCLE-INVASIVE BLADDER CANCER: ARE THE TARGETS PRESENT IN PRIMARY AND/OR METASTATIC TUMORS? *Journal of Urology*, 207, e913.
- GHALI, F., VAKAR-LOPEZ, F., ROUDIER, M. P., GARCIA, J., ARORA, S., CHENG, H. H., SCHWEIZER, M. T., HAFFNER, M. C., LEE, J. K., YU, E. Y., GRIVAS, P., MONTGOMERY, B., HSIEH, A. C., WRIGHT, J. L. & LAM, H. M. 2023. Metastatic Bladder Cancer Expression and Subcellular Localization of Nectin-4 and Trop-2 in Variant Histology: A Rapid Autopsy Study. *Clin Genitourin Cancer*.
- GRIFFITHS, T. R. L. & CANCER, O. B. O. A. O. B. 2013. Current perspectives in bladder cancer management. *International Journal of Clinical Practice*, 67, 435-448.
- GUNTI, S., HOKE, A. T. K., VU, K. P. & LONDON, N. R., JR. 2021. Organoid and Spheroid Tumor Models: Techniques and Applications. *Cancers (Basel)*, 13.
- HEATH, E. I. & ROSENBERG, J. E. 2021. The biology and rationale of targeting nectin-4 in urothelial carcinoma. *Nature Reviews Urology*, 18, 93-103.
- HEDEGAARD, J., LAMY, P., NORDENTOFT, I., ALGABA, F., HØYER, S., ULHØI, BENEDICTE P., VANG, S., REINERT, T., HERMANN, GREGERS G., MOGENSEN, K., THOMSEN, MATHILDE BORG H., NIELSEN, MORTEN M., MARQUEZ, M., SEGERSTEN, U., AINE, M., HÖGLUND, M., BIRKENKAMP-DEMTRÖDER, K., FRISTRUP, N., BORRE, M., HARTMANN, A., STÖHR, R., WACH, S., KECK, B., SEITZ, ANNA K., NAWROTH, R., MAURER, T., TULIC, C., SIMIC, T., JUNKER, K., HORSTMANN, M., HARVING, N., PETERSEN, ASTRID C., CALLE, M. L., STEYERBERG, EWOUT W., BEUKERS, W., VAN KESSEL, KIM E. M., JENSEN, JØRGEN B., PEDERSEN, JAKOB S., MALMSTRÖM, P.-U., MALATS, N., REAL, FRANCISCO X., ZWARTHOFF, ELLEN C., ØRNTTOFT, TORBEN F. & DYRSKJØT, L. 2016. Comprehensive

- Transcriptional Analysis of Early-Stage Urothelial Carcinoma. *Cancer Cell*, 30, 27-42.
- HEIDENREICH, A., ALBERS, P., CLASSEN, J., GRAEFEN, M., GSCHWEND, J., KOTZERKE, J., KREGE, S., LEHMANN, J., ROHDE, D., SCHMIDBERGER, H., UDER, M. & ZEEB, H. 2010. Imaging studies in metastatic urogenital cancer patients undergoing systemic therapy: recommendations of a multidisciplinary consensus meeting of the Association of Urological Oncology of the German Cancer Society. *Urol Int*, 85, 1-10.
- HINGORANI, D. V., ALLEVATO, M. M., CAMARGO, M. F., LESPERANCE, J., QURAIISHI, M. A., AGUILERA, J., FRANIAK-PIETRYGA, I., SCANDERBEG, D. J., WANG, Z., MOLINOLO, A. A., ALVARADO, D., SHARABI, A. B., BUI, J. D., COHEN, E. E. W., ADAMS, S. R., GUTKIND, J. S. & ADVANI, S. J. 2022. Monomethyl auristatin antibody and peptide drug conjugates for trimodal cancer chemo-radio-immunotherapy. *Nature Communications*, 13, 3869.
- HOFFMANN, M. J., KOUTSOGIANNOULI, E., SKOWRON, M. A., PINKERNEIL, M., NIEGISCH, G., BRANDT, A., STEPANOW, S., RIEDER, H. & SCHULZ, W. A. 2016. The New Immortalized Uroepithelial Cell Line HBLAK Contains Defined Genetic Aberrations Typical of Early Stage Urothelial Tumors. *Bladder Cancer*, 2, 449-463.
- HUANG, L., KONG, Q., LIU, Z., WANG, J., KANG, Z. & ZHU, Y. 2018. The Diagnostic Value of MR Imaging in Differentiating T Staging of Bladder Cancer: A Meta-Analysis. *Radiology*, 286, 502-511.
- HUMPHREY, P. A., MOCH, H., CUBILLA, A. L., ULBRIGHT, T. M. & REUTER, V. E. 2016. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol*, 70, 106-119.
- IARC 2004. Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 83, 1-1438.
- IARC. 2020. *Global Cancer Observatory* [Online]. Available: <https://gco.iarc.fr/> [Accessed 30.06.2023].
- IWATA, T., KIMURA, S., ABUFARAJ, M., JANISCH, F., KARAKIEWICZ, P. I., SEEBACHER, V., ROUPRËT, M., NASU, Y. & SHARIAT, S. F. 2019. The role of adjuvant radiotherapy after surgery for upper and lower urinary tract urothelial carcinoma: A systematic review. *Urol Oncol*, 37, 659-671.
- JIMENEZ, R. E., GHEILER, E., OSKANIAN, P., TIGUERT, R., SAKR, W., WOOD, D. P., JR., PONTES, J. E. & GRIGNON, D. J. 2000. Grading the invasive component of urothelial carcinoma of the bladder and its relationship with progression-free survival. *Am J Surg Pathol*, 24, 980-7.
- KLÜMPER, N., ECKSTEIN, M., KUNATH, F., HEIDEGGER, I., BECKER, C., RAUSCH, S. & FACHGRUPPE MOLEKULARE UROLOGIE DER ARBEITSGRUPPE UROLOGISCHE FORSCHUNG DER DEUTSCHEN GESELLSCHAFT FÜR, U. 2023. Gegen Nectin-4 gerichtete Antikörper-Wirkstoff-Konjugate als neue Behandlungsoption für Patienten mit metastasiertem Urothelkarzinom. *Die Urologie*.

- KRAUTER, J., GUST, K. & SHARIAT, S. 2023. Metastasiertes Urothelkarzinom – Spätlinientherapien. *Journal für Urologie und Urogynäkologie/Österreich*, 30, 60-65.
- KURPAD, R., KIM, W., RATHMELL, W. K., GODLEY, P., WHANG, Y., FIELDING, J., SMITH, L., PETTIFORD, A., SCHULTZ, H., NIELSEN, M., WALLEN, E. M. & PRUTHI, R. S. 2011. A multidisciplinary approach to the management of urologic malignancies: does it influence diagnostic and treatment decisions? *Urol Oncol*, 29, 378-82.
- LAMM, D. L., BLUMENSTEIN, B. A., CRISSMAN, J. D., MONTIE, J. E., GOTTESMAN, J. E., LOWE, B. A., SAROSDY, M. F., BOHL, R. D., GROSSMAN, H. B., BECK, T. M., LEIMERT, J. T. & CRAWFORD, E. D. 2000. Maintenance bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for recurrent TA, T1 and carcinoma in situ transitional cell carcinoma of the bladder: a randomized Southwest Oncology Group Study. *J Urol*, 163, 1124-9.
- LEE, S. H., HU, W., MATULAY, J. T., SILVA, M. V., OWCZAREK, T. B., KIM, K., CHUA, C. W., BARLOW, L. J., KANDOTH, C., WILLIAMS, A. B., BERGREN, S. K., PIETZAK, E. J., ANDERSON, C. B., BENSON, M. C., COLEMAN, J. A., TAYLOR, B. S., ABATE-SHEN, C., MCKIERNAN, J. M., AL-AHMADIE, H., SOLIT, D. B. & SHEN, M. M. 2018. Tumor Evolution and Drug Response in Patient-Derived Organoid Models of Bladder Cancer. *Cell*, 173, 515-528.e17.
- LEITLINIENPROGRAMM-ONKOLOGIE. 2020. *S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 2.0* [Online]. AWMF-Registrierungsnummer 032/038OL: AWMF, Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe. Available: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/harnblasenkarzinom/> [Accessed 30.06.2023].
- LIU, B. A., OLSON, D., SNEAD, K., GOSINK, J., TENN, E.-M., ZAVAL, M., CAO, A., SAHETYA, D., NESTEROVA, A., HENSLEY, K., COCHRAN, J., GARDAI, S. & LEWIS, T. S. 2020. Abstract 5581: Enfortumab vedotin, an anti-Nectin-4 ADC demonstrates bystander cell killing and immunogenic cell death anti-tumor activity mechanisms of action in urothelial cancers. *Cancer Research*, 80, 5581-5581.
- LIU, S., CHEN, X. & LIN, T. 2022. Emerging strategies for the improvement of chemotherapy in bladder cancer: Current knowledge and future perspectives. *J Adv Res*, 39, 187-202.
- MALMSTRÖM, P. U., SYLVESTER, R. J., CRAWFORD, D. E., FRIEDRICH, M., KREGE, S., RINTALA, E., SOLSONA, E., DI STASI, S. M. & WITJES, J. A. 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. *Eur Urol*, 56, 247-56.
- MAUCHER, I. 2022. *Neueinführung Padcev bei Urothelkarzinom* [Online]. Available: <https://www.gelbe-liste.de/neue-medikamente/padcev-urothelkarzinom> [Accessed 06.07.2023].
- MEDLE, B., SJÖDAHL, G., ERIKSSON, P., LIEBERG, F., HÖGLUND, M. & BERNARDO, C. 2022. Patient-Derived Bladder Cancer Organoid Models

- in Tumor Biology and Drug Testing: A Systematic Review. *Cancers (Basel)*, 14.
- MEIJER, R. P. 2021. Urothelial cancer organoids: a tool for bladder cancer research. *Pathologe*, 42, 165-169.
- MINOLI, M., CANTORE, T., HANHART, D., KIENER, M., FEDRIZZI, T., LA MANNA, F., KARKAMPOUNA, S., CHOUVARDAS, P., GENITSCH, V., RODRIGUEZ-CALERO, A., COMPÉRAT, E., KLIMA, I., GASPERINI, P., KISS, B., SEILER, R., DEMICHELIS, F., THALMANN, G. N. & KRUIHOF-DE JULIO, M. 2023. Bladder cancer organoids as a functional system to model different disease stages and therapy response. *Nat Commun*, 14, 2214.
- MOSTOFI, F. K., SOBIN, L. H., TORLONI, H. & WORLD HEALTH, O. 1973. Histological typing of urinary bladder tumours / F. K. Mostofi, in collaboration with L. H. Sobin, H. Torloni and pathologists in fourteen countries. Geneva: World Health Organization.
- MOWATT, G., N'DOW, J., VALE, L., NABI, G., BOACHIE, C., COOK, J. A., FRASER, C. & GRIFFITHS, T. R. 2011. Photodynamic diagnosis of bladder cancer compared with white light cystoscopy: Systematic review and meta-analysis. *Int J Technol Assess Health Care*, 27, 3-10.
- MULLENDERS, J., DE JONGH, E., BROUSALI, A., ROOSEN, M., BLOM, J. P. A., BEGTHEL, H., KORVING, J., JONGES, T., KRANENBURG, O., MEIJER, R. & CLEVERS, H. C. 2019. Mouse and human urothelial cancer organoids: A tool for bladder cancer research. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116, 4567-4574.
- NAKANISHI, H. & TAKAI, Y. 2004. Roles of nectins in cell adhesion, migration and polarization. *Biol Chem*, 385, 885-92.
- OSWALD, D., PALLAUF, M., HERRMANN, T. R. W., NETSCH, C., BECKER, B., LEHRICH, K., MIERNIK, A., SCHÖB, D. S., SIEVERT, K. D., GROSS, A. J., WESTPHAL, J., LUSUARDI, L. & DEININGER, S. 2022. [Transurethral resection of bladder tumors (TURBT)]. *Urologe A*, 61, 71-82.
- PAULI, C., HOPKINS, B. D., PRANDI, D., SHAW, R., FEDRIZZI, T., SBONER, A., SAILER, V., AUGELLO, M., PUCA, L., ROSATI, R., MCNARY, T. J., CHURAKOVA, Y., CHEUNG, C., TRISCOTT, J., PISAPIA, D., RAO, R., MOSQUERA, J. M., ROBINSON, B., FALTAS, B. M., EMERLING, B. E., GADI, V. K., BERNARD, B., ELEMENTO, O., BELTRAN, H., DEMICHELIS, F., KEMP, C. J., GRANDORI, C., CANTLEY, L. C. & RUBIN, M. A. 2017. Personalized In Vitro and In Vivo Cancer Models to Guide Precision Medicine. *Cancer Discovery*, 7, 462-477.
- RAJ, G. V., HERR, H., SERIO, A. M., DONAT, S. M., BOCHNER, B. H., VICKERS, A. J. & DALBAGNI, G. 2007. Treatment paradigm shift may improve survival of patients with high risk superficial bladder cancer. *J Urol*, 177, 1283-6; discussion 1286.
- RAMIREZ, D., GUPTA, A., CANTER, D., HARROW, B., DOBBS, R. W., KUCHEROV, V., MUELLER, E., STREPER, N., UHLMAN, M. A., SVATEK, R. S., MESSING, E. M. & LOTAN, Y. 2016. Microscopic haematuria at time of diagnosis is associated with lower disease stage in patients with newly diagnosed bladder cancer. *BJU Int*, 117, 783-6.

- REULEN, R. C., KELLEN, E., BUNTINX, F., BRINKMAN, M. & ZEEGERS, M. P. 2008. A meta-analysis on the association between bladder cancer and occupation. *Scand J Urol Nephrol Suppl*, 64-78.
- RINK, M., XYLINAS, E., BABJUK, M., HANSEN, J., PYCHA, A., COMPLOJ, E., LOTAN, Y., SUN, M., KARAKIEWICZ, P. I., ABDENNABI, J., FAJKOVIC, H., LOIDL, W., CHUN, F. K., FISCH, M., SCHERR, D. S. & SHARIAT, S. F. 2012. Impact of smoking on outcomes of patients with a history of recurrent nonmuscle invasive bladder cancer. *J Urol*, 188, 2120-7.
- ROSENBERG, J. E., O'DONNELL, P. H., BALAR, A. V., MCGREGOR, B. A., HEATH, E. I., YU, E. Y., GALSKY, M. D., HAHN, N. M., GARTNER, E. M., PINELLI, J. M., LIANG, S. Y., MELHEM-BERTRANDT, A. & PETRYLAK, D. P. 2019. Pivotal Trial of Enfortumab Vedotin in Urothelial Carcinoma After Platinum and Anti-Programmed Death 1/Programmed Death Ligand 1 Therapy. *J Clin Oncol*, 37, 2592-2600.
- SAID, N. 2019. Establishing and characterization of human and murine bladder cancer organoids. *Transl Androl Urol*, 8, S310-s313.
- SAMANTA, D. & ALMO, S. C. 2015. Nectin family of cell-adhesion molecules: structural and molecular aspects of function and specificity. *Cell Mol Life Sci*, 72, 645-58.
- SATO, T., VRIES, R. G., SNIPPERT, H. J., VAN DE WETERING, M., BARKER, N., STANGE, D. E., VAN ES, J. H., ABO, A., KUJALA, P., PETERS, P. J. & CLEVERS, H. 2009. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, 459, 262-265.
- SIEFKER-RADTKE, A. O., NECCHI, A., PARK, S. H., GARCÍA-DONAS, J., HUDDART, R. A., BURGESS, E. F., FLEMING, M. T., REZAZADEH KALEBASTY, A., MELLADO, B., VARLAMOV, S., JOSHI, M., DURAN, I., TAGAWA, S. T., ZAKHARIA, Y., AKAPAME, S., SANTIAGO-WALKER, A. E., MONGA, M., O'HAGAN, A. & LORIOT, Y. 2022. Efficacy and safety of erdafitinib in patients with locally advanced or metastatic urothelial carcinoma: long-term follow-up of a phase 2 study. *Lancet Oncol*, 23, 248-258.
- STEPAN, L. P., TRUEBLOOD, E. S., HALE, K., BABCOOK, J., BORGES, L. & SUTHERLAND, C. L. 2011. Expression of Trop2 cell surface glycoprotein in normal and tumor tissues: potential implications as a cancer therapeutic target. *J Histochem Cytochem*, 59, 701-10.
- SUN, H., CHEN, Q., LIU, W., LIU, Y., RUAN, S., ZHU, C., RUAN, Y., YING, S. & LIN, P. 2021. TROP2 modulates the progression in papillary thyroid carcinoma. *Journal of Cancer*, 12, 6883-6893.
- SYLVESTER, R. J., RODRÍGUEZ, O., HERNÁNDEZ, V., TURTURICA, D., BAUEROVÁ, L., BRUINS, H. M., BRÜNDL, J., VAN DER KWAST, T. H., BRISUDA, A., RUBIO-BRIONES, J., SELES, M., HENTSCHEL, A. E., KUSUMA, V. R. M., HUEBNER, N., COTTE, J., MERTENS, L. S., VOLANIS, D., CUSSENOT, O., SUBIELA HENRÍQUEZ, J. D., DE LA PEÑA, E., PISANO, F., PEŠL, M., VAN DER HEIJDEN, A. G., HERDEGEN, S., ZLOTTA, A. R., HACEK, J., CALATRAVA, A., MANNWEILER, S., BOSSCHIETER, J., ASHABERE, D., HAITEL, A., CÔTÉ, J. F., EL SHEIKH, S., LUNELLI, L., ALGABA, F., ALEMANY, I., SORIA, F., RUNNEBOOM, W., BREYER, J., NIEUWENHUIJZEN, J. A.,

- LLORENTE, C., MOLINARO, L., HULSBERGEN-VAN DE KAA, C. A., EVERT, M., KIEMENEY, L., N'DOW, J., PLASS, K., ČAPOUN, O., SOUKUP, V., DOMINGUEZ-ESCRIG, J. L., COHEN, D., PALOU, J., GONTERO, P., BURGER, M., ZIGEUNER, R., MOSTAFID, A. H., SHARIAT, S. F., ROUPRÊT, M., COMPÉRAT, E. M., BABJUK, M. & VAN RHIJN, B. W. G. 2021. European Association of Urology (EAU) Prognostic Factor Risk Groups for Non-muscle-invasive Bladder Cancer (NMIBC) Incorporating the WHO 2004/2016 and WHO 1973 Classification Systems for Grade: An Update from the EAU NMIBC Guidelines Panel. *Eur Urol*, 79, 480-488.
- TAGAWA, S. T., BALAR, A. V., PETRYLAK, D. P., KALEBASTY, A. R., LORIOT, Y., FLÉCHON, A., JAIN, R. K., AGARWAL, N., BUPATHI, M., BARTHELEMY, P., BEUZEBOC, P., PALMBOS, P., KYRIAKOPOULOS, C. E., POUESSEL, D., STERNBERG, C. N., HONG, Q., GOSWAMI, T., ITRI, L. M. & GRIVAS, P. 2021. TROPHY-U-01: A Phase II Open-Label Study of Sacituzumab Govitecan in Patients With Metastatic Urothelial Carcinoma Progressing After Platinum-Based Chemotherapy and Checkpoint Inhibitors. *J Clin Oncol*, 39, 2474-2485.
- TSE, R. T., ZHAO, H., WONG, C. Y., CHIU, P. K., TEOH, J. Y. & NG, C. F. 2022. Current status of organoid culture in urological malignancy. *Int J Urol*, 29, 102-113.
- TURKER, P., BOSTROM, P. J., WROCLAWSKI, M. L., VAN RHIJN, B., KORTEKANGAS, H., KUK, C., MIRTTI, T., FLESHNER, N. E., JEWETT, M. A., FINELLI, A., KWAST, T. V., EVANS, A., SWEET, J., LAATO, M. & ZLOTTA, A. R. 2012. Upstaging of urothelial cancer at the time of radical cystectomy: factors associated with upstaging and its effect on outcome. *BJU Int*, 110, 804-11.
- VAN DE WETERING, M., FRANCIES, HAYLEY E., FRANCIS, JOSHUA M., BOUNOVA, G., IORIO, F., PRONK, A., VAN HOUTT, W., VAN GORP, J., TAYLOR-WEINER, A., KESTER, L., MCLAREN-DOUGLAS, A., BLOKKER, J., JAKSANI, S., BARTFELD, S., VOLCKMAN, R., VAN SLUIS, P., LI, VIVIAN S. W., SEEPO, S., SEKHAR PEDAMALLU, C., CIBULSKIS, K., CARTER, SCOTT L., MCKENNA, A., LAWRENCE, MICHAEL S., LICHTENSTEIN, L., STEWART, C., KOSTER, J., VERSTEEG, R., VAN OUDENAARDEN, A., SAEZ-RODRIGUEZ, J., VRIES, ROBERT G. J., GETZ, G., WESSELS, L., STRATTON, MICHAEL R., MCDERMOTT, U., MEYERSON, M., GARNETT, MATHEW J. & CLEVERS, H. 2015. Prospective Derivation of a Living Organoid Biobank of Colorectal Cancer Patients. *Cell*, 161, 933-945.
- VRANIC, S. & GATALICA, Z. 2022. Trop-2 protein as a therapeutic target: A focused review on Trop-2-based antibody-drug conjugates and their predictive biomarkers. *Bosn J Basic Med Sci*, 22, 14-21.
- VULSTEKE, C., DE COCKER, L., GÓMEZ DE LIAÑO, A., MONTESDEOCA, C., DE MEULENAERE, A., CROES, L., DELOMBAERDE, D., SZABADOS, B. & POWLES, T. 2023. First Evidence of Activity of Enfortumab Vedotin on Brain Metastases in Urothelial Cancer Patients. *Pharmaceuticals (Basel)*, 16.

- WANG, S., GAO, D. & CHEN, Y. 2017. The potential of organoids in urological cancer research. *Nat Rev Urol*, 14, 401-414.
- WEI, Y., AMEND, B., TODENHÖFER, T., LIPKE, N., AICHER, W. K., FEND, F., STENZL, A. & HARLAND, N. 2022. Urinary Tract Tumor Organoids Reveal Eminent Differences in Drug Sensitivities When Compared to 2-Dimensional Culture Systems. *Int J Mol Sci*, 23.
- XU, X., WU, J., MAO, Y., ZHU, Y., HU, Z., XU, X., LIN, Y., CHEN, H., ZHENG, X., QIN, J. & XIE, L. 2013. Diabetes mellitus and risk of bladder cancer: a meta-analysis of cohort studies. *PLoS One*, 8, e58079.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Diese Arbeit wurde in der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen im Zentrum für Medizinische Forschung unter Betreuung von Prof. Dr. med. Dr. h.c. Arnulf Stenzl durchgeführt.

Die Konzeption der Studie wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. rer. nat. Wilhelm Aicher, dem Laborleiter und Universitätsprofessor für Experimentelle Urologie, und Dr. med. Simon Walz, Facharzt für Urologie an der Universitätsklinik für Urologie in Tübingen, erarbeitet.

Die oben beschriebenen Versuche wurden nach Einarbeitung durch Markus Kühns, Viktoria Kramer-Potapenja, Tanja Abruzzese, Cornelia Bock, Jasmin Knoll und Philipp Vollmer anhand der bereits im Labor etablierten Protokolle von mir eigenständig durchgeführt.

Analysiert wurden alle BCOs, die bis Januar 2023 in diesem Labor kultiviert werden konnten und als Paraffinblock und/oder RNA-Extrakt vorlagen. An der Probengewinnung waren maßgeblich Dr. med. Simon Walz, Dr. med. Niklas Harland, Prof. Dr. med. Dr. h.c. Arnulf Stenzl, PD Dr. med. Bastian Amend, Jörg Hennelotter und Dr. med. Aleksander Kielbik beteiligt. Die Aufbereitung und Kultivierung, sowie die Fixierung in Paraffin erfolgte durch die vorherigen Doktoranten Nizar Lipke, Paul Pollehne, Ruizhi Geng, Yi Wei, Johannes Schneider und Phillip Vollmer, sowie durch die Labormitarbeiter Viktoria Kramer-Potapenja, Markus Kühns und Christine Mayer. Die RNA der BCOs #140, #154, #267, #270 und #287 wurden von Phillip Vollmer extrahiert. Ich extrahierte die RNA der BCOs # 287, #297, sowie #300 und bereitete neu eintreffende Tumorproben für die Kultivierung auf.

Die in dieser Arbeit gezeigten Fotos und Tabellen wurden von mir eigenständig erstellt. Lediglich die Fotos der BCOs während der Kultivierung wurden von Viktoria Kramer-Potapenja (BCO #267, #270, #287, #297, #300) und Phillip Vollmer (BCO #140, #154) erstellt und von mir nach Absprache übernommen.

Die Effizienz des verwendeten PCR-Primers für Nectin-4 war bereits durch Vorarbeiten von Tanja Abruzzese im Labor bestimmt worden.

Die Paraffinblöcke und HE-Färbungen der Originaltumore, sowie deren Tumorkalisation und -einteilung erhielt ich von Dr. med. Massimo Granai, akademischer Mitarbeiter am Institut für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Tübingen. Ebenfalls erfolgte durch das Tübinger Institut für Pathologie die Entwässerung der Proben vor der Paraffineinbettung.

Die Patientendaten lagen größtenteils durch Vorarbeiten von Phillip Vollmer vor und wurden von mir zusammen mit Dr. med. Simon Walz ergänzt.

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

Tübingen, den 15.02.2024

Unterschrift Doktorandin

8 Kongressbeitrag

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden am 22.09.2023 auf dem Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie in Leipzig im Rahmen eines Vortrages mit dem Titel „Expression von Nectin-4 und Trop-2 in Blasentumororganoiden – Vergleichbarkeit zum Originaltumor und Veränderungen des Expressionsmusters in der Langzeitkultur“ vorgestellt.