

Aus der  
Universitätsklinik für Urologie

**Wirkung von Serumkomponenten auf das Wachstum und  
die Stabilität von humanen Blasentumor-Organoiden**

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

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

**vorgelegt von**

**Fundel, Lea-Madlen**

**2026**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. B. Amend

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

Tag der Disputation: 13.12.2023

Für meine Großeltern, meine Geschwister, Mama, Papa, Flo und Merlin

Ohne euch wäre das alles nie möglich gewesen

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung	10
1.1 Die Harnblase	11
1.2 Das Harnblasenkarzinom	12
1.2.1 Allgemeines	12
1.2.2 Diagnostik	15
1.2.3 Therapie	16
1.3 Organoide als 3D-Kultur	21
1.3.1 Allgemeine Grundlagen	21
1.3.2 In der Literatur verwendete Kulturmedien	22
1.4 Zielsetzung der Arbeit	24
2 Material und Methoden	26
2.1 Chemikalien, Reagenzien und Antikörper	26
2.2 Primer	28
2.3 Geräte und Verbrauchsmittel	29
2.4 Humane Blasentumororganoide, Zell- und Tumorklinien	30
2.5 Kulturmedien	31
2.6 Zweidimensionale Zellkulturen und Splitting	33
2.6.1 Variante 1 in Zellkulturflaschen	33
2.6.2 Variante 2 in 6-Well-Platten	34
2.7 Dreidimensionale Zellkulturen	35
2.7.1 Probengewinnung	35
2.7.2 Verdau von Tumorgewebe zu Einzelzellen	35
2.7.3 Dreidimensionale Zellkultur zur Generierung von Organoiden	38
2.7.4 Passage von Organoiden	39
2.8 Zellen einfrieren	40
2.9 Zellen auftauen	41

2.10	Zellzählung	41
2.11	Immunhistochemischer Nachweis des epithelialen Phänotyps humaner Urothelzellen	42
2.11.1	Kultivierung der Zellen auf Chamber Slides	42
2.11.2	Fixierung	43
2.11.3	Permeabilisierung	43
2.11.4	Immunhistochemische Färbung	44
2.12	WST-1-Proliferation-Assay	45
2.13	Expressions-Vergleich 2D- vs. 3D-Zellkulturen	46
2.13.1	Matrigelauflösen zur RNA-Extraktion	46
2.13.2	RNA-Extraktion	47
2.13.3	Umschreiben von RNA in cDNA	48
2.13.4	Quantitative PCR im LC480	49
2.14	3D-Cell-Viability-Assay	52
2.15	Versuchsdurchführungen	53
2.15.1	Vergleich verschiedener Medienansätze	53
2.15.2	Proliferationsassays an Zell- und Tumorkulturen in zweidimensionalen Zellkulturen	54
2.15.3	Proliferationsassays an Zell- und Tumorkulturen in dreidimensionalen Zellkulturen	60
2.15.4	3D-Cell-Viability-Assay an humanen Blasentumororganoiden	64
3	Ergebnisse	68
3.1	Vergleich verschiedener Medienansätze	68
3.2	Proliferationsassays an Zell- und Tumorkulturen in zweidimensionalen Zellkulturen	75
3.2.1	Bestimmung der Duplikationsraten	75
3.2.2	AE1/AE3-Färbung zum Nachweis des epithelialen Phänotyps an HBLAKs	86
3.2.3	WST-1-Proliferation-Assay	88
3.3	Proliferationsassays an Zell- und Tumorkulturen in dreidimensionalen Zellkulturen	106
3.3.1	Expressionsvergleich zwischen zwei- und dreidimensionalen Zellkulturen	106

3.3.2	3D-Cell-Viability-Assay an Zell- und Tumorlinien _____	109
3.4	3D-Cell-Viability-Assay an humanen Blasentumororganoiden ____	116
4	Diskussion _____	121
4.1	Vergleich verschiedener Medienansätze_____	121
4.2	Proliferationsassays an Zell- und Tumorlinien in zweidimensionalen Zellkulturen _____	123
4.2.1	Bestimmung der Duplikationsraten und AE1/AE3-Färbung zum Nachweis des epithelialen Phänotyps an HBLAKs _____	123
4.2.2	WST-1-Proliferation-Assay _____	125
4.3	Proliferationsassays an Zell- und Tumorlinien in dreidimensionalen Zellkulturen _____	129
4.3.1	Expressionsvergleich zwischen zwei- und dreidimensionalen Zellkulturen _____	129
4.3.2	3D-Cell-Viability-Assay an Zell- und Tumorlinien _____	130
4.4	3D-Cell-Viability-Assay an humanen Blasentumororganoiden ____	132
4.5	Ausblick_____	135
5	Zusammenfassung _____	136
6	Literaturverzeichnis _____	138
7	Erklärung zum Eigenanteil _____	144
8	Danksagung_____	145

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2018 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs) (entnommen aus URL: <a href="https://www.krebsdaten.de/Krebs/SharedDocs/Grafiken/krebsarten_neuerkrankungen_prozent.png?__blob=poster">https://www.krebsdaten.de/Krebs/SharedDocs/Grafiken/krebsarten_neuerkrankungen_prozent.png?__blob=poster</a> am 06.07.2022).....	12
<b>Abbildung 2:</b> Pipettierschema zur Bestimmung der Zellzahl mittels WST-1-Assay .....	57
<b>Abbildung 3:</b> Pipettierschema der Proliferationsassays an Zell- und Tumorlinien mit Wachstumsfaktoren mittels WST-1-Assay .....	59
<b>Abbildung 4:</b> Pipettierschemata der Proliferationsassays an Zell- und Tumorlinien mit Wachstumsfaktoren mittels 3D-Cell-Viability-Assay.....	62
<b>Abbildung 5:</b> Pipettierschemata der Proliferationsassays an humanen Blasentumororganoiden mit Wachstumsfaktoren mittels 3D-Cell-Viability-Assay .....	66
<b>Abbildung 6:</b> BCO#147 P7 in BTM (links) und HCM nach Lee et al. (rechts) an Tag 5 .....	69
<b>Abbildung 7:</b> Auswertung Medienvergleich BCO#147 P7 .....	70
<b>Abbildung 8:</b> BCO#154 P5 in BTM (links) und HCM nach Lee et al. (rechts) an Tag 10 .....	71
<b>Abbildung 9:</b> Auswertung Medienvergleich BCO#154 P5 .....	72
<b>Abbildung 10:</b> BCO#270 P2 in BTM (links) und HCM nach Lee et al. (rechts) an Tag 10 .....	73
<b>Abbildung 11:</b> Auswertung Medienvergleich BCO#270 P2.....	74
<b>Abbildung 12:</b> Bestimmung der Duplikationsrate der Tumorlinie UM-UC-15..	76
<b>Abbildung 13:</b> Kultivierung der Tumorlinie UM-UC-15 in MEM (Standardkulturmedium).....	77
<b>Abbildung 14:</b> Bestimmung der Duplikationsrate der Tumorlinie HT1197 .....	79
<b>Abbildung 15:</b> Kultivierung der Tumorlinie HT1197 in MEM (Standardkulturmedium).....	80
<b>Abbildung 16:</b> Bestimmung der Duplikationsrate der Zelllinie HBLAKs .....	83

<b>Abbildung 17:</b> Bestimmung der Duplikationsrate der Zelllinie HBLAKs (Tag 2 der ersten Passage) .....	84
<b>Abbildung 18:</b> Kultivierung der Zelllinie HBLAKs in Cnt-P (Standardkulturmedium) .....	84
<b>Abbildung 19:</b> Auswertung Bestimmung der Duplikationsraten .....	85
<b>Abbildung 20:</b> Negativ- und Positivkontrolle der AE1/AE3-Färbung an der Zelllinie HBLAKs.....	87
<b>Abbildung 21:</b> AE1/AE3-Färbung an der Zelllinie HBLAKs.....	87
<b>Abbildung 22:</b> Bestimmung der Zellzahl mittels WST-1-Assay .....	89
<b>Abbildung 23:</b> Auswertung Bestimmung der Zellzahl mittels WST-1-Assay an der Zelllinie HBLAKs an Tag 7 .....	90
<b>Abbildung 24:</b> Auswertung Bestimmung der Zellzahl mittels WST-1-Assay an der Tumorlinie UM-UC-15 .....	91
<b>Abbildung 25 (a)-(i):</b> Auswertung Proliferationsassay mit Wachstumsfaktoren mittels WST-1-Assay für die Zelllinie HBLAKs .....	98
<b>Abbildung 26 (a)-(i):</b> Auswertung Proliferationsassay mit Wachstumsfaktoren mittels WST-1-Assay für die Tumorlinie UM-UC-15 .....	104
<b>Abbildung 27:</b> Auswertung Expressionsvergleich zwischen zwei- und dreidimensionalen Zellkulturen an der Zelllinie HBLAKs .....	107
<b>Abbildung 28:</b> Auswertung Expressionsvergleich zwischen zwei- und dreidimensionalen Zellkulturen an der Tumorlinie UM-UC-15 .....	108
<b>Abbildung 29:</b> 3D-Cell-Viability-Assay an der Zelllinie HBLAKs an Tag 7 ....	111
<b>Abbildung 30:</b> 3D-Cell-Viability-Assay an der Zelllinie HBLAKs an Tag 7 ....	112
<b>Abbildung 31:</b> 3D-Cell-Viability-Assay an der Tumorlinie UM-UC-15 an Tag 7 .....	113
<b>Abbildung 32:</b> 3D-Cell-Viability-Assay an der Tumorlinie UM-UC-15 an Tag 7 .....	114
<b>Abbildung 33:</b> Viability-Assay für die Zelllinie HBLAKs (a) und die Tumorlinie UM-UC-15 (b).....	115
<b>Abbildung 34:</b> 3D-Cell-Viability-Assay an der humanen Blasentumororganoidlinie BCO#270 in der elften Passage an Tag 7.....	118

**Abbildung 35:** 3D-Cell-Viability-Assay an der humanen  
Blasentumororganoidlinie BCO#270 in der elften Passage an Tag 7..... 119

**Abbildung 36:** Auswertung Proliferationsassay mit Wachstumsfaktoren mittels  
3D-Cell-Viability-Assay für die Blasentumororganoidlinie BCO#270 in der elften  
Passage ..... 120

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms (entnommen aus der aktuellen S3-Leitlinie Harnblasenkarzinom [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Langversion 2.0, März 2020]).....	14
<b>Tabelle 2:</b> Liste der Chemikalien, Reagenzien und Antikörper mit Herstellern	26
<b>Tabelle 3:</b> Liste der verwendeten Primer .....	28
<b>Tabelle 4:</b> Liste der Geräte und Verbrauchsmittel mit Herstellern.....	29
<b>Tabelle 5:</b> Liste der verwendeten Zell- und Tumorlinien .....	30
<b>Tabelle 6:</b> Liste der verwendeten Kulturmedien und deren Zusammensetzung .....	31
<b>Tabelle 7:</b> Splitting-Verhältnisse bei zweidimensionalen Zellkulturen.....	34
<b>Tabelle 8:</b> Zusammensetzung des Master Mix für Umschreiben von RNA in cDNA.....	49
<b>Tabelle 9:</b> verwendete Primer für quantitative PCR im LC480.....	51
<b>Tabelle 10:</b> Einstellungen der qRT-PCR für CD47_2, FGFR-3 und CD276 ....	51
<b>Tabelle 11:</b> Einstellungen der qRT-PCR für CD24, CD44 und PD-L1 .....	51
<b>Tabelle 12:</b> Reagenzien für qRT-PCR.....	51
<b>Tabelle 13:</b> Auflistung der verwendeten Wachstumsfaktoren und ihrer Konzentrationen .....	59
<b>Tabelle 14:</b> Auflistung der verwendeten Nährmedienansätze.....	63
<b>Tabelle 15:</b> Auflistung der verwendeten Nährmedienansätze .....	67
<b>Tabelle 16:</b> Auflistung der verwendeten Wachstumsfaktoren und ihrer Konzentrationen .....	92
<b>Tabelle 17:</b> Auflistung der ausgewählten Wachstumsfaktoren und ihrer Konzentrationen .....	105
<b>Tabelle 18:</b> Auflistung der verwendeten Nährmedienansätze.....	109
<b>Tabelle 19:</b> Auflistung der verwendeten Nährmedienansätze .....	116

## Abkürzungsverzeichnis

<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BCO</b>	Bladder cancer organoid
<b>Bzw.</b>	Beziehungsweise
<b>cDNA</b>	complementary Desoxyribonukleinsäure
<b>cm</b>	Zentimeter
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor
<b>FBS</b>	Fetal bovine serum
<b>csFBS</b>	Charcoal-stripped fetal bovine serum (ggf. auch als FCS bezeichnet)
<b>FGF 2/7/10</b>	Fibroblast growth factor 2/7/10
<b>Ggf.</b>	Gegebenenfalls
<b>HGF</b>	Hepatocyte growth factor
<b>IGF-1</b>	Insulin growth factor 1
<b>mg</b>	Milligramm
<b>Min</b>	Minuten
<b>ml</b>	Milliliter
<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>µM</b>	Mikromolar
<b>µm</b>	Mikrometer
<b>mm</b>	Millimeter
<b>mM</b>	Millimolar
<b>mRNA</b>	Messenger Ribonukleinsäure
<b>ng</b>	Nanogramm
<b>nm</b>	Nanometer
<b>P</b>	Passage

<b>(D)PBS</b>	(Dulbecco's ) Phosphate-buffered saline
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion
<b>qRT-PCR</b>	quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>rpm</b>	Revolutions per minute
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>Sec</b>	Sekunden
<b>s.o.</b>	Siehe oben
<b>TGF-β1</b>	Transforming growth factor beta 1
<b>TUR-B</b>	Transurethrale Resektion der Blase
<b>z.B.</b>	Zum Beispiel
<b>z.T.</b>	Zum Teil

## 1 Einleitung

Die erfolgreiche Behandlung onkologischer Erkrankungen erfordert heutzutage einen multidisziplinären sowohl diagnostischen als auch therapeutischen Einsatz (Illert et al., 2023). Insbesondere die Fortschritte der letzten Jahre haben gezeigt, dass Tumoren unterschiedlicher Patienten keineswegs vergleichbar sind, sondern sich in verschiedenen Aspekten unterscheiden. Und selbst Primärtumor und Metastase eines Patienten sind nicht identisch, sondern können eine unterschiedlich ausgeprägte Heterogenität aufweisen (Katiyar et al., 2023). Mit den heutigen Möglichkeiten des Next-Generation-Sequencing stehen rasch verfügbare und effiziente Methoden zur Prädiktion möglicher Therapieoptionen zur Verfügung, die in Deutschland allerdings nur bei entsprechender karzinomspezifischer Zulassung oder nach Ausreizung der therapeutischen Möglichkeiten hinsichtlich einer Kostenübernahme gedeckt sind. Nachteilig ist, dass genetische Variationen so zwar eindeutig nachgewiesen werden können, Rückschlüsse aus diesen genetischen Variationen beispielsweise hinsichtlich der Wirksamkeit entsprechender Medikamente allerdings nicht zwangsläufig garantiert sind.

„Organoide“ als dreidimensionale Zellkulturen stellen hierbei eine geeignete Möglichkeit zur Wirksamkeitsprüfung potentieller Therapieoptionen dar (Aboukheyr Es et al., 2018) und können aus unterschiedlichen Ausgangszellen kultiviert werden, wobei die Literatur unterschiedliche Effizienzzraten je nach Ursprungsorgan zeigt (Drost & Clevers, 2018). Im Vergleich zu anderen Tumorentitäten mit hoher Effizienz in der Kultivierung von Organoiden stellt die langfristige Kultur von Blasentumororganoiden in unserer Arbeitsgruppe, entgegen den Erwartungen der Literatur (Lee et al., 2018; Mullenders et al., 2019), jedoch eine Herausforderung dar. Entsprechend sind Faktoren zur Optimierung und Stabilisierung von Blasentumororganoidkulturen von hohem Interesse (siehe „1.4 Zielsetzung der Arbeit“).

Bevor aber weiter auf Organoiden als dreidimensionale Zellkulturen eingegangen werden kann (siehe ab „1.3 Organoiden als 3D-Kultur“), sollen wesentliche

grundlegende Aspekte zur humanen Harnblase gefolgt von Aspekten zu daraus abgeleiteten Harnblasenkarzinomen näher erläutert werden.

### **1.1 Die Harnblase**

Die Harnblase liegt subperitoneal im kleinen Becken und zählt gemeinsam mit Nieren, Ureteren und Urethra zum Harntrakt. Ureter, Harnblase und Urethra können weiter zusammengefasst werden als ableitende Harnwege. Die Harnblase übernimmt dabei als Reservoir für den gefilterten und aufkonzentrierten Endharn eine wichtige Speicherfunktion. Als Speicherorgan ist sie ständigen Schwankungen des pH-Werts des Urins ausgesetzt sowie toxischen Stoffwechselprodukten, welche über den Endharn ausgeschieden werden.

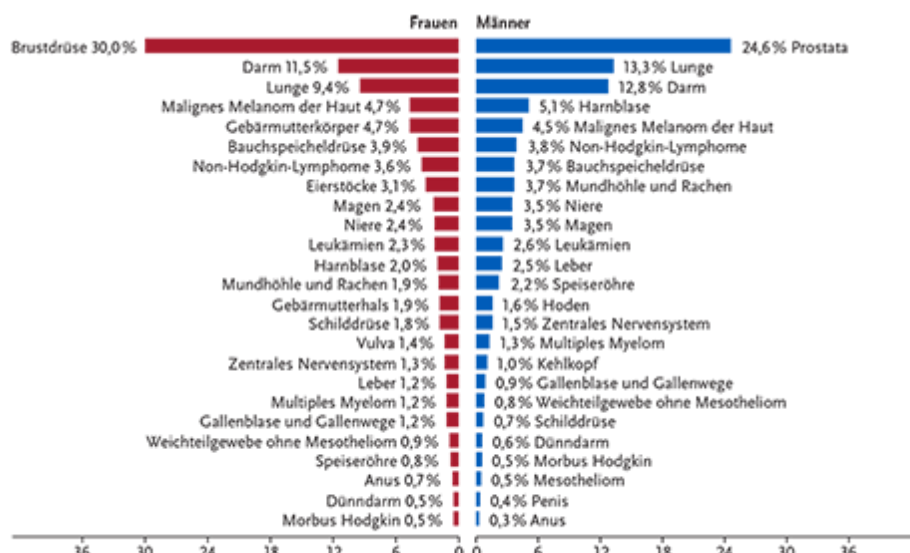
Zum Schutz vor den Einwirkungen des Harns ist der gesamte Harntrakt ab den Nierenkelchen bis zum proximalen Anteil der Urethra mit Urothel ausgekleidet. Das Urothel wird auch als Übergangsepithel bezeichnet. Es besteht von basal nach luminal aus einem „Stratum basale mit Kontakt zu einer basalen Membran, einem Stratum intermedium und einem Stratum superficiale mit großen hexagonalen Zellen [...], welche als Umbrella cells bezeichnet werden“(Birder, 2005). Es handelt sich um ein Epithel, das seine Höhe dem jeweiligen Füllungszustand der ableitenden Harnwege anzupassen vermag. Bei mit Harn gefüllter Blase umfasst das Urothel 3-4, im entleerten Zustand der Harnblase 5-7 Zelllagen.

Zum Schutz vor den Einwirkungen toxischer Stoffwechselprodukte sind im Urothel vor allem tight junctions als Zell-Zell-Kontakte ausgebildet, da sie die „[...] Diffusion von Ionen und gelösten Stoffen zwischen Zellen [reduzieren]“(Birder, 2005).

## 1.2 Das Harnblasenkarzinom

### 1.2.1 Allgemeines

Das Harnblasenkarzinom stellt eine maligne Entartung des Harntrakts dar. Es ist nach dem Prostatakarzinom die zweithäufigste Tumorentität des Urogenitaltraktes sowie das viert häufigste Karzinom des Mannes (siehe Abbildung 1). Vor dem 25.Lebensjahr sind die Erkrankungsraten für ein Harnblasenkarzinom bei Männern und Frauen annähernd gleich, nehmen dann mit steigendem Alter bei Männern stärker zu als bei Frauen. „Männer sind drei- bis viermal häufiger von einem Karzinom der Harnblase betroffen als Frauen“ (DeGeorge et al., 2017).



**Abbildung 1:** Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorklassifikationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2018 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs) (entnommen aus URL:

[https://www.krebsdaten.de/Krebs/SharedDocs/Grafiken/krebsarten\\_neuerkrankungen\\_prozent.png?\\_\\_blob=poster](https://www.krebsdaten.de/Krebs/SharedDocs/Grafiken/krebsarten_neuerkrankungen_prozent.png?__blob=poster) am 06.07.2022)

Zu den einzelnen Risikofaktoren des Harnblasenkarzinoms zählen demnach „das männliche Geschlecht, aber auch höheres Alter, berufliche Exposition gegenüber bestimmten Chemikalien, Bestrahlung des Beckens, Einnahme von Medikamenten wie Cyclophosphamid, chronische Blaseninfektion/-reizung, positive persönliche oder familiäre Anamnese für ein Harnblasenkarzinom und Zigaretten-/Tabakrauchen“ (DeGeorge et al., 2017). Das Rauchen ist dabei ein „Haupttrisikofaktor“ (Minoli et al., 2020). Laut der aktuellen S3-Leitlinie Harnblasenkarzinom [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche

Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Langversion 2.0, März 2020] und einem Bericht der International Agency for Research on Cancer IARC steigt das Harnblasenkarzinomrisiko sowohl mit der Dauer als auch mit der Menge der gerauchten Zigaretten an. Eine Beendigung des Rauchens hingegen kann zu einer Risikoreduktion führen.

Histologisch erfolgt eine Klassifikation des Harnblasenkarzinoms in Urothel-, Plattenepithel- und Adenokarzinome, wobei die „Mehrheit der Blasenkarzinome [...] Urothelkarzinome [sind]“ (Minoli et al., 2020). Seltener können auch Urachus-, kleinzellige und neuroendokrine Karzinome histologisch nachgewiesen werden. Bedingt durch die mehrheitlich vorkommenden Urothelkarzinome beziehen sich die nachfolgenden Erläuterungen auf diese Tumorentität, auch wenn dies nicht weiter explizit hervorgehoben wird.

Für das Staging bezogen auf die Infiltrationstiefe in der Blasenwand, den Lymphknoten- und Fernmetastasenstatus wird das Harnblasenkarzinom weiter durch die TNM-Klassifikation eingeteilt (siehe Tabelle 1). Infiltriert der Tumor die Harnblasenmuskulatur (ab T2) spricht man von einem muskelinvasiven Harnblasenkarzinom, ohne eine solche Infiltration von einem nicht-muskelinvasiven Karzinom.

**Table 1: TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms (entnommen aus der aktuellen S3-Leitlinie Harnblasenkarzinom [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Langversion 2.0, März 2020])**

<b>Klassifikation</b>	<b>Ausdehnung</b>
<b>T</b>	<b>Primärtumor</b>
T0	Kein Nachweis von Primärtumor
Ta	Nicht-invasives papilläres Karzinom
Tis	Carcinoma in situ
T1	Infiltration bis in Lamina propria
T2	Infiltration bis in Harnblasenmuskulatur
T2a	Tumor dringt in oberflächliche Muskularis propria ein (innere Hälfte)
T2b	Tumor dringt tief in Muscularis propria ein (äußere Hälfte)
T3	Infiltration bis ins perivesikale Gewebe
T3a	Mikroskopische Infiltration ins perivesikale Gewebe
T3b	Makroskopische Infiltration ins perivesikale Gewebe
T4	Infiltration in Nachbarorgane
T4a	Infiltration in Prostatastroma, Samenbläschen, Uterus oder Vagina
T4b	Infiltration in Beckenwand oder Abdominalwand
<b>N</b>	<b>Regionäre Lymphknoten</b>
N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	Solitäre Metastasen in hypogastrischen, obturatorischen, externen iliakalen oder präsakralen Lymphknoten
N2	Multiple Metastasen in hypogastrischen, obturatorischen, externen iliakalen oder präsakralen Lymphknoten
N3	Lymphknotenmetastasen entlang der Aa. Iliacae communes
<b>M</b>	<b>Fernmetastasen</b>
M0	Keine Fernmetastasen
M1a	Fernmetastasen in nicht regionären Lymphknoten
M1b	Andere Fernmetastasen

Neben dem Staging erfolgt zusätzlich noch ein Grading. Das Grading beschreibt den histologischen Differenzierungsgrad des Tumors gegenüber dem Ursprungsgewebe und lässt Rückschlüsse auf die Malignität und somit die Prognose des Tumors zu. Als G1 wird ein Tumor bezeichnet, wenn er gut differenziert ist, also eine große Ähnlichkeit zum Ausgangsgewebe besitzt. G2

bedeutet mäßig differenziert und G3 wenig differenziert mit einem hohen Risiko für Malignität.

Zusammenfassend aus Staging und Grading können Harnblasentumore unterteilt werden in low-grade- und high-grade-Tumore, wobei muskelinvasive Tumore als high-grade definiert werden. Nicht-muskelinvasive Tumore hingegen können in beide Kategorien eingeteilt werden.

### **1.2.2 Diagnostik**

Das Karzinom der Harnblase manifestiert sich häufig zuerst durch eine schmerzlose Mikro- oder Makrohämaturie, d.h. durch mikroskopisch oder mit bloßem Auge sichtbare Blutbeimengungen im Urin. Im weiteren Krankheitsverlauf können dann Symptome wie Pollakisurie (häufiger Harndrang mit Entleerung kleiner Harnmengen), Dysurie (schmerzhafte Harnblasenentleerung) oder rezidivierende Infektionen der Harnblase auftreten. Im fortgeschrittenen Stadium sind neben einer B-Symptomatik mit Fieber, Nachtschweiß und ungewolltem Gewichtsverlust auch Flanken- und Knochenschmerzen sowie, bei Abflusshindernissen des Urins, das Vorhandensein einer Harnstauungsniere möglich.

Eine diagnostische Abklärung auf ein Harnblasenkarzinom sollte daher bei einer Hämaturie ohne benigne Ursache sowie bei rezidivierenden Harnwegsinfekten beim Mann erfolgen. Laut der aktuellen S3-Leitlinie Harnblasenkarzinom [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Langversion 2.0, März 2020] wird primär die Sonographie der Harnblase und des Harntrakts empfohlen. Mittels Sonographie kann der Tumorverdacht weiter gefestigt werden, ebenso können mögliche Begleitsymptome eines fortgeschrittenen Tumorstadiums beurteilt werden. Für den direkten Nachweis und die Diagnosesicherung wird eine Urethrozystoskopie durchgeführt. Erhärtet sich der Verdacht auf ein Harnblasenkarzinom in der Zystoskopie, sollte eine histologische Sicherung erfolgen.

Bei einem nicht-muskelinvasiven Harnblasentumor empfiehlt die aktuelle S3-Leitlinie Harnblasenkarzinom [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche

Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Langversion 2.0, März 2020] zur weiteren Abklärung des Lymphknoten- oder Fernmetastasenstatus „außer [der] Sonographie keine [weitere] bildgebende Abklärung des oberen Harntrakts [...]“ (S3-Leitlinie Harnblasenkarzinom [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Langversion 2.0, März 2020]). Dies wäre nur bei multiplen Tumoren oder bei einem Tumor, der im Bereich des Trigonums der Harnblase lokalisiert ist, indiziert. In einem solchen Fall kann eine CT-Urographie durchgeführt werden, alternativ auch ein MRT oder ein Ausscheidungsurogramm.

Bei einem muskelinvasiven Tumor soll laut der aktuellen S3-Leitlinie Harnblasenkarzinom [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Langversion 2.0, März 2020] hingegen zusätzlich für das weitere Staging nach TNM-Klassifikation (siehe Tabelle 1) ein Kontrastmittel-CT von Abdomen, Becken und Thorax gemacht werden. Eine Knochenszintigraphie kann optional durchgeführt werden, wenn sich klinisch der Verdacht auf mögliche Knochenmetastasen erhärtet.

### **1.2.3 Therapie**

Im Nachfolgenden werden die transurethrale Resektion der Blase und die radikale Zystektomie (Entfernung der gesamten Harnblase) als Therapieoptionen für Harnblasentumore näher erläutert, da durch diese Verfahren die Tumorproben für die Kultivierung von humanen Blasentumororganoiden im Labor generiert wurden. Weitere Therapieoptionen werden nicht explizit aufgeführt.

#### **1.2.3.1 Therapie des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms**

Therapie der Wahl bei nicht-muskelinvasiven Harnblasentumoren ist die sogenannte transurethrale Resektion der Blase, abgekürzt als TUR-B. Bei diesem operativen Eingriff wird mittels einer mono- oder bipolaren Elektroschlinge ein vorher in der Zystoskopie diagnostizierter Tumor reseziert. Dabei soll „eine Resektion kleiner Blasentumoren in toto“ angestrebt werden

(S3-Leitlinie Harnblasenkarzinom [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Langversion 2.0, März 2020], (Richterstetter et al., 2012), (Langbein et al., 2006), (Mariappan et al., 2012)). Laut der aktuellen S3-Leitlinie Harnblasenkarzinom [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Langversion 2.0, März 2020] ist eine Resektion des Tumors als sogenannte en-bloc-Resektion jedoch von verschiedenen Einflussfaktoren abhängig. Dazu zählen nicht nur die Lokalisation des Tumors, sondern auch dessen Größe und Eindringtiefe ins Gewebe. Auch bereits stattgefundene Vorresektionen in der Harnblase können weitere Resektionen beeinflussen.

Bei der Resektion des Tumors mittels Elektroschlinge muss darauf geachtet werden, dass mit dem Resektat sowohl der komplette Tumor abgetragen wird, als auch Gewebe des M.detrusor vesicae. Die histopathologische Mitbeurteilung des Detrusorgewebes ist entscheidend für die genaue Klassifikation des entnommenen Tumors. Es gilt, dass „das Fehlen von Muskulatur in den Präparaten der Erstresektion [...] die führende Ursache für ein Unterschätzen des Tumorstadiums [ist]“ (aktuelle S3-Leitlinie Harnblasenkarzinom [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Langversion 2.0, März 2020], (Sivalingam et al., 2005),(Vianello et al., 2011)).

Eine mögliche transurethrale Nachresektion kann innerhalb von vier bis sechs Wochen nach der primären TUR-B erfolgen. Ein früherer Zeitraum ist laut der aktuellen S3-Leitlinie Harnblasenkarzinom [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Langversion 2.0, März 2020] nicht indiziert, da bedingt durch die Voroperation das Risiko für eine Perforation erhöht ist und mögliche postoperative Veränderungen am Harnblasengewebe fälschlicherweise als tumorverdächtig interpretiert werden könnten.

Postoperativ kann abhängig von der Risikoeinschätzung des Tumors zusätzlich eine adjuvante Chemotherapie oder Immunmodulation durchgeführt werden.

Ausgenommen sind low-risk-Tumore. Bei intermediate-risk-Tumoren kann zwischen einer adjuvanten intravesikalen Chemotherapie-Instillation beispielsweise mit Mitomycin oder einer Instillationstherapie mit attenuierten Tuberkulose-Erregern (Bacillus Calmette-Guérin, BCG) abgewägt werden. Bei High-risk-Tumoren hingegen wird laut der aktuellen S3-Leitlinie Harnblasenkarzinom [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Langversion 2.0, März 2020] die intravesikale Instillation mit attenuierten Tuberkulose-Erregern empfohlen, falls keine Indikation zur Zystektomie (Entfernung der kompletten Harnblase) vorliegt.

Bei nicht-muskelinvasiven Harnblasentumoren kann, wenn sie als high-risk-Tumoren eingestuft wurden, auch eine Therapie mittels Zystektomie indiziert sein. Diese Therapieoption wird bei der Therapie des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms genauer erläutert (siehe „1.2.3.2 Therapie des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms“).

#### 1.2.3.2 Therapie des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms

Eine mögliche Therapieoption bei muskelinvasiven Harnblasentumoren ist die radikale Zystektomie mit pelviner Lymphadenektomie. Dies kann offenchirurgisch oder laparoskopisch erfolgen. Nach Empfehlung der aktuellen S3-Leitlinie Harnblasenkarzinom [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Langversion 2.0, März 2020] sollten beim Mann zusätzlich Nachbarorgane mit direktem Bezug zur Harnblase entnommen werden. Dazu zählen Prostata und Samenblasen. Bei Frauen sollen Uterus und ggf. die Adnexe (Ovarien und Tuben) und anteilig die vordere Vaginalwand entnommen werden. Ob eine Entfernung von Vaginalwand und Adnexen erforderlich ist, kann abhängig von der Tumorlokalisation/-ausdehnung und dem Menopausenstatus der Patientin entschieden werden. Eine beidseitige pelvine Lymphadenektomie ist im Rahmen einer radikalen Zystektomie grundsätzlich indiziert, da sie „das progressionsfreie, das tumorspezifische und das Gesamtüberleben [verbessert]“ (aktuelle S3-Leitlinie Harnblasenkarzinom [Leitlinienprogramm

Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Langversion 2.0, März 2020], (Abdollah et al., 2011), (Gray et al., 2014), (H. Herr et al., 2004),(H. W. Herr et al., 2004), (Nishiyama et al., 2004), (Power et al., 2012), (Rink et al., 2012),(Yafi et al., 2011)).

Eine radikale Zystektomie birgt als chirurgischer Eingriff nicht nur verschiedene Komplikationen, wie beispielsweise Blutungen, Infektionen oder Wundheilungsstörungen, sondern macht auch eine alternative Harnableitung erforderlich. Man unterscheidet zwischen inkontinenten und kontinenten Harnableitungen. Zu den inkontinenten Harnableitungen zählen Ureterokutaneostomie und Ileumkonduit, zu den kontinenten Harnableitungen Ureterosigmoidostomie als Form der transrektalen Harnableitung, katheterisierbare Pouchformen und sogenannte „orthotope Neblasen“. Im Folgenden wird genauer auf die Harnableitung mittels Neoblase eingegangen, da es sich um ein gängiges Verfahren an der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen Klinik für Urologie handelt. Für eine Neoblase wird ein ca. 40cm langes Stück des Patientendarms (Ileum oder Colon) verwendet. Durch verschiedene Schnitt- und Nahtführungen entsteht eine Art Darmtasche, welche als neues Reservoir für den Endharn dient und mit Urethra und Ureteren vernäht wird.

Durch die Anlage einer Neoblase kommt der Endharn jedoch nicht mehr mit Urothel, sondern dem einschichtigen Zylinderepithel des verwendeten Darmsegments in Kontakt. Es kann durch die spezifischen Resorptionseigenschaften dieses Oberflächenepithels zu Elektrolytentgleisungen, Exsikkose oder metabolischer Azidose kommen. Daher muss die Nierenfunktion des Patienten ausreichend sein, um solche Komplikationen ausgleichen zu können. Patienten/Patientinnen müssen zusätzlich über mögliche Infektionen mit Peritonealreizung, Anastomoseninsuffizienzen oder Komplikationen aufgrund der Darmresektion (Malabsorption, Diarrhö) aufgeklärt werden.

Als primär organerhaltende Alternative zur radikalen Zystektomie kann bei muskelinvasiven Tumoren auch eine transurethrale Resektion mittels

Elektroschlinge und anschließender Radiochemotherapie erfolgen (siehe „1.2.3.1 Therapie des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms“). Laut der aktuellen S3-Leitlinie Harnblasenkarzinom [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Langversion 2.0, März 2020] ist eine solche Therapieoption vor allem bei lokal begrenzten muskelinvasiven Tumoren, welche komplett entfernt werden können, möglich und dem Patienten/der Patientin anzubieten.

## **1.3 Organoide als 3D-Kultur**

### **1.3.1 Allgemeine Grundlagen**

Wie bereits unter „1.2.3 Therapie“ erläutert, setzt sich die Behandlung des Harnblasenkarzinoms nicht nur aus chirurgischen Verfahren wie einer TUR-B oder einer radikalen Zystektomie zusammen, sondern ergänzend auch aus Chemotherapien und intravesikalen Instillationen. In der heutigen Zeit der personalisierten Medizin ist es ein Ziel der Forschung, eine Vorabprognose abgeben zu können, ob das jeweilige Harnblasenkarzinom auf die verschiedenen Chemotherapeutika bzw. Instillationen ansprechen wird. So könnten den Patienten/Patientinnen gegen die Erkrankung wirkungslose Therapieansätze erspart werden, welche jedoch meist mit weitreichenden Nebenwirkungen assoziiert sind.

Häufig in Laboren verwendete zweidimensionale Zellkulturen bilden die komplexen Verhältnisse eines Karzinoms vermutlich nicht ausreichend ab, um für prognoserelevante Medikamentenscreens verwendet zu werden. Andere Modelle wie genetische Mausmodelle oder orthotope Xenotransplantate „sind [zwar] ein getreues Abbild der klinischen Manifestation, aber sie sind zeitaufwendig zu etablieren und in Kultur zu halten“ (Mullenders et al., 2019).

Organoide scheinen daher ein alternatives in-vitro-Modell zur Bekämpfung von Tumoren zu sein (Huch et al., 2017). Ein Organoid „ist eine miniaturisierte dreidimensionale (3D), multizelluläre, "von Stammzellen abgeleitete [...] Struktur", die [verschiedene] Merkmale aufweist, z. B. Zell-Zell-Interaktionen, Gewebepolarität, Hypoxie, Medikamentenpenetration und Nährstoffgradienten“ (Yoshida, Singh, et al., 2018). Aber auch Organoide weisen Limitationen auf, wie das Fehlen von Nerven, Blutgefäßen und Immunzellen (Clevers, 2016). Dennoch bilden sie die ursprünglichen Verhältnisse in vivo besser ab als zweidimensionale adhärente Zellkulturen (Yoshida, Singh, et al., 2018).

Einzelne Zellen zur Generierung von Organoiden können beispielsweise durch die mechanische Zerkleinerung und den enzymatischen Verdau von Gewebeproben gewonnen werden, wie auch im Labor (Zentrum für

Medizinische Forschung) etabliert (siehe „2.7.2 Verdau von Tumorgewebe zu Einzelzellen“).

Um ein dreidimensionales Wachstum zu ermöglichen, werden die gewonnenen Einzelzellen anschließend in einer laminin-reichen künstlichen Extrazellulärmatrix eingebettet. Diese künstliche Extrazellulärmatrix wird als Matrigel bezeichnet. Es ermöglicht durch seine leicht visköse Beschaffenheit, welche es im polymerisierten Zustand annimmt, weiterhin die erforderliche Diffusion eines zur Ernährung der Zellen notwendigen Kulturmediums.

Um per definitionem von Organoiden sprechen zu können, muss nicht nur das dreidimensionale Wachstum im Zellverband vorliegen. Organoide müssen nach den allgemeinen Kriterien vorangegangener Forschungsarbeiten durch enzymatische Spaltung der Zell-Zell-Kontakte in Einzelzellen verdaut werden können und anschließend bei erneuter Einbettung in Matrigel wieder als Organoide auswachsen, insgesamt über sechs sogenannte Passagen ((Pauli et al., 2017), (Lee et al., 2018)).

Nach aktuellem Stand können nach diesen Kriterien Organoide aus den verschiedensten humanen, benignen wie auch malignen, Geweben erzeugt werden: aus Lunge, Leber, Brustdrüse, Colon, Prostata (Bartfeld & Clevers, 2017) und ebenfalls aus der Harnblase ((Mullenders et al., 2019), (Lee et al., 2018)).

### **1.3.2 In der Literatur verwendete Kulturmedien**

Ein wichtiger Bestandteil zur Etablierung von Organoiden aus Gewebeproben humaner Blasen Tumore stellt das Kulturmedium dar. Das Kulturmedium muss verschiedene Bedingungen erfüllen: es muss eine Grundversorgung der Zellen gewährleisten, aber auch Wachstumsfaktoren enthalten, welche eine Proliferation der Zellen stimulieren. Ein vornehmliches Problem bei der Festlegung eines einzigen Kulturmediums für alle Blasen tumororganoiden liegt aber darin begründet, dass „Harnblasenkarzinome [als Ausgangsgewebe] [...] eine sehr heterogene Erkrankung mit dem Vorhandensein einer großen Anzahl

an Mutationen [sind]“ ((Mullenders et al., 2019), (Cancer Genome Atlas Research, 2014), (Robertson et al., 2017)). Dies spiegelt sich auch in der Vielzahl an verwendeten Kulturmedien in der Literatur wider. Die vielversprechendsten Kulturmedien schienen die Medien nach Mullenders et al., 2019 und Lee et al., 2018 zu sein. Das Medium von Mullenders et al. baute auf dem Grundmedium Ad. DMEM/F12 auf, welchem die Wachstumsfaktoren FGF10 (100ng/ml), FGF7 (25ng/ml) und FGF2 (12,5ng/ml) sowie B27 Supplement, den Aktivin-Rezeptor-Like-Kinase-Inhibitor A83-01 (5 $\mu$ M), N-Acetylcystein (1,25mM) und Nicotinamid (10mM) zugegeben wird (Mullenders et al., 2019). Nach jeder Passage der Organoide wurde diesem Kulturmedium zudem der ROCK-Inhibitor Y-27632 (10 $\mu$ M) zugegeben, um Zelltod zu verhindern. Das Medium von Lee et al. nutzte als Grundmedium serumhaltiges Hepatozytenmedium, welches mit dem Wachstumsfaktor EGF (10ng/ml) und zusätzlich mit 5% charcoal-stripped fetal bovine serum, dem ROCK-Inhibitor Y-27632 (10 $\mu$ M) und Glutamax versetzt wird (Lee et al., 2018). Beide Forschungsgruppen konnten basierend auf diesen Kulturmedien humane Blasentumororganoide mit einer hohen Effizienz von bis zu 60-70% (Mullenders et al., 2019) und 70% (n = 12/17) (Lee et al., 2018) generieren, welche über die erforderlichen Passagen in Kultur gehalten, sogar kryokonserviert und erfolgreich nach Langzeitlagerung wieder aufgetaut werden konnten (Lee et al., 2018). Das im Labor (Zentrum für Medizinische Forschung) etablierte Kulturmedium ist vor allem durch eine vielseitige Zusammenstellung verschiedenster Zusätze und Wachstumsfaktoren charakterisiert (genaue Zusammensetzung siehe „2.5 Kulturmedien“ unter Blasentumororganoidmedium nach AG Aicher). Nach aktuellem Stand konnten Organoide aus humanem Blasenkarzinomgewebe nicht in ausreichender Effizienz wie bei Mullenders et al., 2019 oder Lee et al., 2018 generiert werden, was jedoch die Nutzung von Organoiden in der personalisierten Medizin beispielsweise für Medikamententestungen voraussetzt.

#### **1.4 Zielsetzung der Arbeit**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, ein nochmals verbessertes Kulturmedium für humane Blasentumororganoide mittels Proliferationsassays zu etablieren und es mit Kulturmedien, welche bislang im Labor verwendet wurden, zu vergleichen. Das Kulturmedium sollte eine deutliche Effizienzsteigerung bei der Generierung und Kultivierung der Organoide aufweisen und zudem einfach in der Herstellung sein. Durch die effizientere Generierung soll, wie bereits oben angesprochen, die Verwendung dieser dreidimensionalen Kulturen im Rahmen der personalisierten Medizin gewährleistet sein, die angestrebte einfache Herstellung des Kulturmediums soll zudem eine Zeitersparnis sowie die Minimierung möglicher Fehlerquellen im Herstellungsprozess ermöglichen.

Bedingt durch den Mangel an verfügbaren Organoidproben wurden die Proliferationsassays zuerst an Zell- und Tumorlinien durchgeführt. Die jeweiligen Zell- und Tumorlinien wurden entsprechend ihren Mutations- und Rezeptorprofilen ausgewählt und sollten ein breites Spektrum der Mutationen abdecken, welche auch in humanen Blasentumororganoiden nachgewiesen werden konnten.

Für die Proliferationsassays wurde ein Basismedium auf Grundlage verschiedener vorangegangener Forschungsarbeiten definiert, welchem Wachstumsfaktoren in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt wurden. Zu Beginn wurden die Assays in zweidimensionalen Zellkulturen durchgeführt, um vielversprechende Wachstumsfaktoren und deren Konzentration für nachfolgende Assays in dreidimensionalen Zellkulturen festzulegen. Die Proliferationsassays in dreidimensionalen Zellkulturen dienten der Testung der ausgewählten Wachstumsfaktoren sowohl als Einzelkomponente, als auch in Kombination. Um mögliche Unterschiede zwischen den Assays der zwei- und dreidimensionalen Zellkulturen erklären zu können, wurde mittels quantitativer PCR ein Vergleich der RNA-Expression zwischen beiden Kulturmodellen durchgeführt.

Abschließend wurde ein Proliferationsassay an humanen Blasen-tumororganoiden durchgeführt. Mit diesen Ergebnissen wurden die Daten aus den dreidimensionalen Assays der Zell- und Tumorlinien verglichen. Es erfolgte auch ein Vergleich zwischen den getesteten Kulturmedienansätzen mit den bisher im Labor verwendeten Kulturmedien. Letztlich sollte ein neues Kulturmedium für die Blasen-tumororganoiden festgelegt werden. Kriterien für die Auswertung der einzelnen Versuchsabschnitte waren jeweils die mittels Absorptions- oder Lumineszenzmessung erhobenen Daten der Proliferationsassays und auch mikroskopisch dokumentierte morphologische Auffälligkeiten der Zellkulturen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Reagenzien und Antikörper

*Tabelle 2: Liste der Chemikalien, Reagenzien und Antikörper mit Herstellern*

Accutase	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, DE
Advanced DMEM / F12	Gibco, Dreieich, DE
Advantage® RT-for-PCR Kit (enthält oligo dt Primer, DEPC-treated water, 5x Reaction Buffer, Recombinant RNase Inhibitor, dNTP Mix und MMLV Reverse Transcriptase)	TaKaRa Bio Inc., Kusatsu, JPN
AE1/AE3 Antibody	Merck Millipore, Burlington, USA
Ampuwa	Fresenius, Bad Homburg, DE
Antibody Diluent with Background Reducing Components	Dako, Santa Clara, USA
A83-01	STEMCELL Tech., Köln, DE
Beta-Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt, DE
B27-Supplement	Gibco, Dreieich, DE
CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay	Promega Corporation, Madison, USA
CnT-Prime	CELLnTEC, Bern, CHE
Cultrex RGF BME, Type 2	R&D Systems, Minneapolis, USA
Dispase II	STEMCELL Tech., Köln, DE
DMSO (Dimethyl-sufoxid)	AppliChem, Darmstadt, DE
DPBS (Dulbecco's Phosphate-buffered saline)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, DE
Ethanol (70%)	AppliChem, Darmstadt, DE
FBS (Fetal bovine serum)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, DE
FGF-2, -7 und -10	PeproTech, Hamburg, DE
Glutamax 100X	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Hämatoxylin	Vector Labs, Newark, USA
Hepatocyte Culture Media Kit (HCM)	Corning, Wiesbaden, DE
HEPES	Invitrogen, Karlsruhe, DE
HRP-markiertes anti-mouse-Polymer	Dako, Santa Clara, USA
Kollagenase/Hyaluronidase 10X	STEMCELL Tech., Köln, DE

LightCycler 480 SYBR Green I Master-Kit (enthält SybrGreen, und Non Template Water)	Roche, Mannheim, DE
Liquid DAB+Substrate Chromogen System	Dako, Santa Clara, USA
Lysis Buffer	Invitrogen, Karlsruhe, DE
L-RN conditioned Medium	wird im ZMF durch MTA selbst hergestellt
Matrigel Basement Membrane Matrix	Corning, Wiesbaden, DE
Cultrex RGF BME, Type 2	R&D Systems, Minneapolis, USA
MEM mit Earle´s Salzen	Bio&SELL, Feucht/Nürnberg, DE
MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X)	Gibco, Dreieich, DE
N-Acetylcystein	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, DE
Nicotinamid	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, DE
Paraformaldehyd 4%	Morphisto, Offenbach am Main, DE
PBS tablets	Medicago, Uppsala, SWE
Pen/Strep	Gibco, Dreieich, DE
Primocin	InvivoGen, Toulouse, FRA
Recombinant Human EGF	PeproTech, Hamburg, DE
Recombinant Human Heregulin $\beta$ -1 (Neuregulin)	PeproTech, Hamburg, DE
Recombinant Human HGF	PeproTech, Hamburg, DE
Recombinant Human IGF-1	PeproTech, Hamburg, DE
Recombinant Human Noggin	PeproTech, Hamburg, DE
Recombinant Human R-Spondin-1	PeproTech, Hamburg, DE
RNase-Free DNase Set (50) (enthält DNase und RDD-Puffer)	Qiagen, Hilden, DE
RNeasy® Mini Kit (250) (enthält RLT-Puffer, RNase-free water, RW1-Puffer und RPE-Puffer)	Qiagen, Hilden, DE
Saponin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, DE
TrypLE Select (1X)	Gibco, Dreieich, DE
Trypanblau	Lonza, Basel, CHE

Trypsin-EDTA Solution	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, DE
VectaMount Permanent Mounting Medium	Vectors Labs, Burlingame, USA
WST-1 Reagenz	Roche, Mannheim, DE
Y-27632 (ROCK-Inhibitor)	Hycultec, Beutelsbach, DE

## 2.2 Primer

Die verwendeten Primer wurden von Eurofins Genomics, Ebersberg, DE bezogen. Für die positiv Kontrolle der quantitativen PCR wurde der QuantiTect®Primer Assay Hs\_ACTA2\_1-SG von Qiagen, Hilden, DE verwendet.

*Tabelle 3: Liste der verwendeten Primer*

Primer	Access.No.	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
Beta-Actin	NM_001101. 5	AACTGGGACGACATGG AGAA	ATACCCCTCGTAGATGG GCA
CD24	NM_013230. 3 (transkript variant 1)	TGAAGAACATGTGAGAG GTTTGAC	GAAAACCTGAATCTCCATT CCACAA
CD44	NM_000610. 4 (transcript variant 1)	CACAATCCAGGCAACTC CTA	TACTCTGCTGCGTTGTCA TT
CD47_2	NM_001777. 4 (transcript variant 1)	GGAGCCATTCTTTTCGT CCCA	ACACGCCGCAATACAGA GAC
CD276	NM_0010247 36.2 (transcript variant 1)	TTTCCTTTCCCCTCCTT CCTCC	TGTGACCAGCACATGCT TCC
FGFR-3	NM_000142. 5 (transcript variant 1)	GGCAGCATCCGGCAGA CGTAC	CTGAGGACAGCCTTGCG ATG
GAPDH	NM_002046. 7 (transcript variant 1)	GCTCTCCAGAACATCAT CCCTGCC	CGTTGTCATACCAGGAA ATGAGCTT
PD-L1	NM_014143.	GTACCTTGGCTTTGCCA	CCAACACCACAAGGAGG

	4 (transcript variant 1)	CAT	AGT
--	--------------------------	-----	-----

## 2.3 Geräte und Verbrauchsmittel

*Tabelle 4: Liste der Geräte und Verbrauchsmittel mit Herstellern*

BioTron BioMetra UNO II Thermocycler Thermoblock	Biometra, Jena, DE
Cellstar 15ml-Tubes	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Cellstar 50ml-Tubes	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Chamber Slide (8 Well Class Slide)	NUNC/ThermoFisher
CyroTubes Vials	Thermo Fisher Scientific, Ulm, DE
Deckgläser	R. Langenbrinck, Emmendingen, DE
Disposable Hemocytometer (Neubauerzählkammer)	KISKER Biotech, Steinfurt, DE
GloMax® Explorer Multimode Microplate Reader	Promega Corporation, Madison, USA
Injekt®-F Einwegspritze 1 ml mit luer- ansatz	B Braun, Melsungen, DE
Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Ulm, DE
LightCycler® 480 II	Roche, Mannheim, DE
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white	Roche, Mannheim, DE
Microlance 3 Kanüle 22G	Becton Dickinson, New Jersey, USA
Mikroskop	Primovert, Carl Zeiss Microscopy, Jena, DE
NanoPhotometer® NP80	Implen, München, DE
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Petrischale	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Skalpelle	pfm-medical, Köln, DE
Thermomixer comfort	eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Zellkulturflasche 250ml	Corning incorporated, Wiesbaden, DE
Zellkulturflasche 75cm <sup>2</sup> CellBIND	Corning incorporated, Wiesbaden, DE
Zellsieb 40µm	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE

Zellsieb 70µm	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Zellsieb 100µm	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Zentrifuge 1 „HERAEUS MULTIFUGE 3SR+“	Thermo Fisher Scientific, Ulm, DE
Zentrifuge 2 „Rotina 420R“	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, DE
Zentrifuge 3 „Centrifuge 5424“	eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
1,5 ml Reaction Tubes	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
0,5 ml Reaction Tubes	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
6-Well-Platten	NEST Biotechnology, Wuxi, CHN
6-Well-Platten CellBIND	Corning incorporated, Wiesbaden, DE
24-Well-Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE NEST Biotechnology, Wuxi, CHN
48-Well-Platten	Corning incorporated, Wiesbaden, DE
96-Well-Platten F-Bottom	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
96-Well-Platten F-Bottom CellBIND	Corning incorporated, Wiesbaden, DE
96-Well-Platten F-Bottom White	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
96-Well-Platten U-Bottom	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE

## 2.4 Humane Blasentumororganoide, Zell- und Tumorklinien

Alle in dieser Arbeit verwendeten humanen Blasentumororganoide (BCO#147, BCO#154 und BCO#270) wurden im Zentrum für Medizinische Forschung ZMF, Abteilung Urologie der AG Aicher aus Primärtumoren von Patienten/Patientinnen aufgearbeitet und etabliert.

*Table 5: Liste der verwendeten Zell- und Tumorklinien*

HBLAKs	CELLnTEC advanced cell systems, Bern, CHE
HT1197	American Type Culture Collection, Manassas, USA
UM-UC-15	ECACC General Cell Collection (Accession CVCL_R742) Zur Verfügung gestellt durch Dr. Peter Black, CAN

## 2.5 Kulturmedien

*Tabelle 6: Liste der verwendeten Kulturmedien und deren Zusammensetzung*

Standardkulturmedium für Tumorlinien	450ml MEM mit Earle´s Salzen +50ml csFBS +5ml Pen/Strep +5ml Glutamax 100X +5ml MEM Non-Essential Amino Acids Solution
Standardkulturmedium für die Zelllinie HBLAKs	500ml CnT-Prime +5ml Pen/Strep +5ml Glutamax 100X
Blasentumororganoidmedium nach AG Aicher (im Weiteren abgekürzt als BTM)	22,5ml L-RN conditioned Medium +22ml Advanced DMEM/F12 +2,5ml csFBS +1ml B27-Supplement +500µl Glutamax 100X +500µl HEPES – 1 M +500µl Nicotinamid – 1 M +125µl N-Acetylcystein – 500 mM in PBS +50µl A83-01 – 5 mM in DMSO +50µl Primocin – 50 mg/ml +50µl FGF-10 – 100 µg/ml +25µl FGF-7 – 50 µg/ml +12,5µl FGF-2 – 50 µg/ml +5µl Y-27632 – 100 mM in PBS +0,5µl EGF – 500 µM
Blasentumororganoidmedium nach Lee et al. (im Weiteren abgekürzt als HCM nach Lee et al.)	500ml Hepatocyte Defined Medium aus Hepatocyte Culture Media Kit +5ml Glutamax 100X +1ml Primocin – 50mg/ml +5µg EGF (wird vom Hersteller mitgeliefert)

	<p>→für fertiges Kulturmedium 47,5ml abnehmen</p> <p>+2,5ml csFBS</p> <p>+5µl Y-27632 – 100 mM in PBS</p>
Workingmedium	<p>45ml Advanced DMEM/F12</p> <p>+5ml csFBS</p> <p>+0,5ml Pen/Strep</p> <p>+0,5ml Glutamax 100X</p> <p>+5µl Y-27632 – 100 mM in PBS</p>
Mangelmedium 1 (für Proliferationsassays in zweidimensionalen Zellkulturen)	<p>500ml Advanced DMEM/F12</p> <p>+5ml Pen/Strep</p> <p>+5ml Glutamax 100X</p>
Vollmedium 1 (für Proliferationsassays in zweidimensionalen Zellkulturen)	<p>450ml Advanced DMEM/F12</p> <p>+5ml Pen/Strep</p> <p>+5ml Glutamax 100X</p> <p>+50ml csFBS</p>
Mangelmedium 2 (für Proliferationsassays in dreidimensionalen Zellkulturen)	<p>50ml Advanced DMEM/F12</p> <p>+0,5ml Pen/Strep</p> <p>+0,5ml Glutamax 100X</p> <p>+5µl Y-27632 – 100 mM in PBS</p>
Vollmedium 2 (für Proliferationsassays in dreidimensionalen Zellkulturen)	<p>45ml Advanced DMEM/F12</p> <p>+0,5ml Pen/Strep</p> <p>+0,5ml Glutamax 100X</p> <p>+5ml csFBS</p> <p>+5µl Y-27632 – 100 mM in PBS</p>

## **2.6 Zweidimensionale Zellkulturen und Splitting**

Die Methoden wurden aus den etablierten Protokollen des Labors übernommen.

### **2.6.1 Variante 1 in Zellkulturflaschen**

Zellen in zweidimensionalen Kulturen wuchsen am Boden der jeweiligen Kulturflasche, bis sich ein adhärenter Zellrasen gebildet hatte. Bei einer Konfluenz von 90-100% erfolgte ein Umsetzen der Zellen.

Zuerst wurde eine neue Zellkulturflasche bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator vorgewärmt. Bei dem Splitting der Zelllinie HBLAKs war darauf zu achten, dass CellBIND Zellkulturflaschen 75cm<sup>2</sup> verwendet werden müssen.

Aus der umzusetzenden Zellkulturflasche wurde mittels Pasteurpipette vorsichtig das Nährmedium abgenommen und verworfen. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit 7-10ml warmem PBS, welches ebenfalls mittels Pasteurpipette abgenommen wurde. Der nachfolgende Schritt des Ablösens der adhärennten Zellen unterschied sich je nach kultivierter Zellart: Tumorkulturen wie UM-UC-15 und HT1197 wurden nach dem Waschvorgang mit 3ml Trypsin-EDTA benetzt, wohingegen Zellkulturen wie HBLAKs mit 4ml Accutase behandelt wurden. Anschließend wurden beide Ansätze im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, bis sich die Zellen vom Flaschenboden gelöst hatten. Danach wurden 7ml des Zellkulturen-/Tumorkulturen typischen Standardkulturmediums (siehe „2.5 Kulturmedien“) mit einer 10-ml-Pipette zu pipettiert und die so entstandene Zellsuspension in ein 50-ml-Röhrchen überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt, welcher sich wieder abhängig von der jeweiligen Zellart unterschied: Tumorkulturen wurden bei 480 x g, 7Min und RT (Beschleunigung 9/9, Bremse 9/9) zentrifugiert, Zellkulturen wie HBLAKs bei 200 x g, 5Min und RT (Beschleunigung 9/9, Bremse 2/9).

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand mittels Pasteurpipette bis auf das am Boden befindliche Zellpellet abgenommen. Das Zellpellet wurde dann in 10ml des entsprechenden Standardkulturmediums mittels einer 10-ml-Pipette resuspendiert, bei HBLAKs in 15ml des entsprechenden Standardkulturmediums. Entsprechend des angedachten Splittingverhältnisses

wurde in der vorherig vorgewärmten Zellkulturflasche Standardkulturmedium vorgelegt und ein Teil des resuspendierten Zellpellets mit einer 5- oder 10-ml-Pipette ausgesät.

*Tabelle 7: Splitting-Verhältnisse bei zweidimensionalen Zellkulturen*

<b>Splittingverhältnis</b>	<b>Standardkulturmedium</b>	<b>Zellsuspension</b>
1:10	Bei Tumorlinien: 9ml Bei HBLAKs: 13,5ml	Bei Tumorlinien: 1ml Bei HBLAKs: 1,5ml
1:5	Bei Tumorlinien: 8ml Bei HBLAKs: 12ml	Bei Tumorlinien: 2ml Bei HBLAKs: 3ml

Abschließend wurde die Zellkulturflasche im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Zweimal wöchentlich erfolgte ein Nährmediumwechsel.

### **2.6.2 Variante 2 in 6-Well-Platten**

Für ein Umsetzen der konfluenten Zellen in 6-Well-Platten wurde ebenfalls zuerst eine neue 6-Well-Platte vorgewärmt. Bei dem Splitting der Zelllinie HBLAKs war darauf zu achten, dass CellBIND 6-Well-Platten verwendet werden müssen.

Mittels Pasteurpipette wurde das Kulturmedium aus den Wells vorsichtig abgenommen und verworfen. Danach wurden die Wells mit je 2ml PBS gewaschen, welches ebenfalls mit einer Pasteurpipette abgenommen wurde. Die Wells wurden mit je 1ml Trypsin-EDTA für Tumorlinien wie UMC-UC-15 und HT1197 bzw. mit je 1ml Accutase für Zelllinien wie HBLAKs pro Well benetzt. Im Inkubator wurden die Platten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, bis sich die adhären Zellen vom Boden der Platte gelöst hatten. Anschließend wurde pro Well 1ml Vollmedium 1 (siehe „2.5 Kulturmedien“) zu pipettiert. Mit einer 1000-µl-Pipette wurde unter Auf- und Abpipettieren eine Zellsuspension hergestellt. Diese wurde in ein 15-ml-Röhrchen überführt.

Mit dem entsprechenden Kulturmedium (Mangelmedium 1 oder Vollmedium 1, siehe „2.5 Kulturmedien“) wurden die Wells danach mehrfach ausgewaschen, bis unter Mikroskopkontrolle keine Zellen mehr adhären am Boden sichtbar

waren. Das dafür verwendete Kulturmedium wurde ebenfalls in das 15-ml-Röhrchen pipettiert.

Es folgte ein Zentrifugationsschritt, welcher sich wieder abhängig von der jeweiligen Zellart unterschied: Tumorkulturen wurden bei 480 x g, 7Min und RT (Beschleunigung 9/9, Bremse 9/9) zentrifugiert, Zelllinien wie HBLAKs bei 200 x g, 5Min und RT (Beschleunigung 9/9, Bremse 2/9). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand mittels Pasteurpipette bis auf das am Boden befindliche Zellpellet abgenommen. Das Pellet wurde in Kulturmedium (Mangelmedium 1 oder Vollmedium 1, siehe „2.5 Kulturmedien“) mittels 10-ml-Pipette resuspendiert und abschließend eine Zellzählung in einer Neubauerzählkammer durchgeführt. Pro Well wurden  $1 \times 10^5$  Zellen ausgesät. Dafür wurde die entsprechende Menge der Zellsuspension nach erfolgter Zellzählung mittels 1000µl-Pipette in die neuen Wells eingebracht und das Volumen auf insgesamt 2ml mit dem entsprechenden Kulturmedium (Mangelmedium 1 oder Vollmedium 1, siehe „2.5 Kulturmedien“) aufgefüllt.

Abschließend wurde die 6-Well-Platte im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Zweimal wöchentlich erfolgte ein Nährmediumwechsel.

## **2.7 Dreidimensionale Zellkulturen**

### **2.7.1 Probengewinnung**

Die Gewebeproben für die Kultivierung von Organoiden wurden im Operationssaal der urologischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen entweder mittels TUR-B oder Zystektomie gewonnen und gekühlt in Transportmedium aus dem Operationssaal in das Labor (Zentrum für Medizinische Forschung) transportiert.

### **2.7.2 Verdau von Tumorgewebe zu Einzelzellen**

#### 2.7.2.1 Variante 1

Die Methode wurde aus den etablierten Protokollen des Labors übernommen.

Variante 1 für den Verdau von Tumorgewebe zu Einzelzellen wurde bis BCO#274 angewendet.

Zur Vorbereitung wurden Workingmedium und DPBS auf 37°C erwärmt, die Kollagenase auf RT. Das jeweilige Tumorgewebe wurde gekühlt in Transportmedium aus dem Operationssaal der urologischen Klinik in das Labor transportiert. Im Labor wurde das Transportmedium mittels 10-ml-Pipette vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Tumorgewebe wurde in eine Petrischale überführt und mittels Feinwaage gewogen. Nach dem Wiegen wurde dem Gewebe 1ml Workingmedium zugegeben. Mit zwei sterilen Skalpellens wurde es zerkleinert und homogenisiert. Das zerkleinerte Gewebe wurde anschließend mit einer 5-ml-Pipette in ein 15-ml-Röhrchen überführt. Möglicherweise in der Petrischale verbleibende Tumorreste wurden durch das Spülen der Petrischale mit mehreren ml Workingmedium gelöst und ebenfalls mit einer 5-ml-Pipette in das 15-ml-Röhrchen überführt.

Das Röhrchen wurde zentrifugiert (bei 480 x g, 10Min, RT, Beschleunigung 9/9, Bremse 9/9). Mittels Pasteurpipette wurde der Überstand bestehend aus Workingmedium komplett abgenommen bis auf das unten im Röhrchen verbleibende Zellpellet. Dieses Pellet wurde in 1000µl DPBS pro 100mg gewogenes Tumorgewebe resuspendiert. Danach wurden 15µl Kollagenase/Hyaluronidase pro 100mg Tumorgewebe zugegeben. Das Röhrchen musste daraufhin für 30Min im Inkubator (bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>) inkubieren, wobei innerhalb dieser Zeitspanne das Röhrchen 3-4mal herausgenommen und vorsichtig gevortext wurde. Nach Ablauf der 30Min wurde dieselbe Menge an Kollagenase/Hyaluronidase zugegeben und unter denselben Bedingungen erneut für 30Min bei gelegentlichem Vortexen inkubiert.

Nach diesem zweiten Inkubationsschritt wurde das verdaute Gewebe in eine 10-ml-Pipette aufgenommen und durch ein 70-µm-Zellsieb gefiltert. Das Filtrat wurde in einem 50-ml-Röhrchen gesammelt. Das Röhrchen wurde zentrifugiert (bei 150 x g, 7Min, RT, Beschleunigung 9/9, Bremse 9/9). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand mittels Pasteurpipette so weit abgenommen, bis über dem Zellpellet ein Flüssigkeitsrest von ca. 200µl verblieb.

Danach wurden 10ml Lysepuffer für die Erythrozytenlyse zu pipettiert, das Röhrchen auf Eis für 10Min inkubiert und nach der Inkubationszeit direkt zentrifugiert (bei 150 x g, 7Min, RT, Beschleunigung 9/9, Bremse 9/9).

#### 2.7.2.2 Variante 2

Die Methode wurde gemeinsam mit cand. med. Jonas Goß im Labor etabliert.

Variante 2 für den Verdau von Tumorgewebe zu Einzelzellen wurde ab BCO#275 angewendet.

Zur Vorbereitung wurden Workingmedium und DPBS auf 37°C erwärmt, die Kollagenase auf RT. Das jeweilige Tumorgewebe wurde gekühlt in Transportmedium aus dem Operationssaal der urologischen Klinik in das Labor transportiert. Das Transportmedium wurde mit einer 10-ml-Pipette abgenommen und in ein 15-ml-Röhrchen überführt. Das Tumorgewebe wurde in eine Petrischale überführt und mittels Feinwaage gewogen. Nach dem Wiegen wurde dem Gewebe 1ml Workingmedium zugegeben. Mit zwei sterilen Skalpellen wurde das Gewebe zerkleinert und homogenisiert.

Für den anschließenden Filtrationsschritt wurde ein 100-µm-Zellsieb auf ein 40-µm-Zellsieb aufgesetzt. Die Zellsiebe wurden vor ihrer Verwendung mit 1-2ml Workingmedium angefeuchtet. Das zerkleinerte Gewebe wurde dann mit einer 10-ml-Pipette aus der Petrischale aufgenommen und durch die Anordnung beider Zellsiebe filtriert. Möglicherweise in der Petrischale verbleibende Tumorreste wurden durch das Spülen der Petrischale mit dem zuvor abgenommen Transportmedium in diesem gelöst und ebenfalls mit einer 5-ml-Pipette durch die Zellsiebe filtriert. Somit sind drei Fraktionen entstanden:

Die Fraktion <40 µm, welche beide Zellsiebe passieren konnte, wurde in einem 50-ml-Röhrchen gesammelt. Für die Fraktionen 40-100 µm und >100 µm wurden das 40- und 100-µm-Zellsieb in eine frische Petrischale überführt, mit jeweils 10ml Workingmedium gespült und die Spülflüssigkeit in je ein eigenes 50-ml-Röhrchen pipettiert. Die drei 50-ml-Röhrchen für die unterschiedlichen Fraktionen wurden abschließend zentrifugiert (bei 480 x g, 10Min, RT, Beschleunigung 9/9, Bremse 9/9).

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand mittels Pasteurpipette so weit wie möglich abgenommen. Die weitere Bearbeitung der unterschiedlichen Fraktionen richtete sich nach dem makroskopischen Aussehen der nach Zentrifugation gewonnenen Zellpellets. Bei rötlicher Verfärbung der Pellets erfolgte eine Erythrozytenlyse durch Zugabe von 2ml Lysepuffer und anschließender Inkubation auf Eis für 2-6Min. Danach wurde die Lyse durch Zugabe von 3ml Workingmedium gestoppt und das entsprechende Röhrchen zentrifugiert (bei 480 x g, 10Min, RT, Beschleunigung 9/9, Bremse 9/9).

Die Fraktion >100 µm wurde meist in einem zusätzlichen Schritt enzymatisch verdaut. Hierfür wurde das Zellpellet vor der oben beschriebenen Erythrozytenlyse in 1000µl DPBS pro 100mg Tumorgewebe resuspendiert und 15µl Kollagenase/Hyaluronidase pro 100mg Tumorgewebe zugegeben. Nach einer Inkubation von 30Min bei 37°C im Wasserbad wurde dieselbe Menge an Kollagenase/Hyaluronidase erneut zugegeben und die Fraktion für weitere 30Min im Wasserbad inkubiert. Abschließend wurde diese Fraktion nochmals durch ein 100-µm-Zellsieb filtriert. Nach einer weiteren Zentrifugation (bei 480 x g, 10Min, RT, Beschleunigung 9/9, Bremse 9/9) konnte gegebenenfalls wie oben bereits erwähnt eine Erythrozytenlyse durchgeführt werden bei sichtbarer Rotfärbung des Pellets. Nach der Lyse musste das jeweilige Röhrchen abschließend zentrifugiert werden (bei 480 x g, 10Min, RT, Beschleunigung 9/9, Bremse 9/9).

### **2.7.3 Dreidimensionale Zellkultur zur Generierung von Organoiden**

Die Methode wurde aus den etablierten Protokollen des Labors übernommen.

Für die dreidimensionale Zellkultur wurden alle Überstände aus den entsprechenden Röhrchen bis auf das Zellpellet abgenommen.

Das Pellet wurde nun in Workingmedium resuspendiert, wobei pro zu setzendem Dome auf einer 24-Well-Platte 10µl Zellsuspension benötigt wurden (bei 48-Well-Platte 5µl Zellsuspension). Die Zellsuspension wurde dann kurzzeitig auf Eis kühl gestellt. Zu der gekühlten Zellsuspension wurde die entsprechende Menge Matrigel (Verhältnis 1:3) luftblasenfrei zu pipettiert. Pro 10µl Zellsuspension bzw. pro zu setzenden Dome wurden 30µl Matrigel

verwendet (bei 48-Well-Platte pro 5µl Zellsuspension bzw. pro zu setzendem Dom 15µl Matrigel). Ein Puffer aus 10µl Matrigel wurde bei jedem Ansatz mitberücksichtigt. Beim Pipettieren des Matrigels musste darauf geachtet werden, dass sich zum einen keine Luftblasen bildeten, zum anderen, dass sich die Zellsuspension homogen im Matrigel verteilte.

Pro Well einer 24-Well-Platte wurden dann Matrigeldomes mit je 40µl Volumen mittels 100-µl-Pipette im Well gesetzt (bei 48-Well-Platte Dome mit einem Volumen von 20µl). Es folgte die 180°-Drehung der entsprechenden Well-Platte („Hanging drop“) und die Inkubation für 30Min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator. Abschließend wurde die Platte nach der Inkubationszeit wieder gedreht, pro Well einer 24-Well-Platte 500µl Kulturmedium zugegeben (bei 48-Well-Platte 250µl Kulturmedium) und die Platte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator kultiviert. Zweimal wöchentlich erfolgte ein Nährmediumwechsel.

#### **2.7.4 Passage von Organoiden**

Die Methode wurde aus den etablierten Protokollen des Labors übernommen.

Eine Passage erfolgte bei Stagnation des Größenwachstums der Organoide oder bei dem subjektiv empfundenen Zerfall der Organoidstrukturen.

Das Medium wurde mittels 1000-µl-Pipette vorsichtig aus den entsprechenden Wells abgenommen und in ein 15-ml-Röhrchen überführt. Die Wells wurden mit kaltem PBS, welches auf 50ml 5µl 100mM Y-27632 enthielt, gewaschen. Das PBS wurde ebenfalls in das 15-ml-Röhrchen überführt. Anschließend wurden erneut pro Well 500µl PBS+Y zu pipettiert. Während dieses Vorgangs wurden die in Wells enthaltenen Domes aus Matrigel mechanisch mit der Pipettenspitze gelöst und im PBS resuspendiert. Die Suspension wurde in das 15-ml-Röhrchen zu pipettiert. Die nun leeren Wells wurden für das Lösen aller Zellen und der Matrigelreste zwei- bis dreimal mit je 1ml kaltem PBS+Y gewaschen. Das PBS aus diesen Waschvorgängen wurde ebenfalls in das 15-ml-Röhrchen überführt.

Danach wurde zentrifugiert (bei 480 x g, 10Min, RT, Beschleunigung 9/9, Bremse 9/9). Mit einer Pasteurpipette erfolgte das Absaugen des Überstands

bis zum Matrigel, welches sich mit den enthaltenen Zellen am Boden des Röhrchens abgesetzt hatte. Danach wurde 1ml TrypLE stoßweise zugegeben und das 15-ml-Röhrchen für 2-10Min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Inkubationszeit richtete sich jeweils nach Größe und Beschaffenheit der jeweiligen Organoide, welche durch Mikroskopieren vor jeder Passage beurteilt worden waren. Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurde mittels Doppelspitze bestehend aus einer 1000-µl-Pipettenspitze mit aufgesetzter 100-µl-Pipettenspitze resuspendiert. Mit einer 10-ml-Pipette wurde der Inhalt des 15-ml-Röhrchens mit kaltem PBS+Y auf ein Gesamtvolumen von 10ml aufgefüllt.

Es folgte eine Zentrifugation (bei 480 x g, 10Min, RT, Beschleunigung 9/9, Bremse 9/9). Abschließend wurde mittels Pasteurpipette der Überstand bis zum Zellpellet abgenommen. Das Pellet wurde erneut in eine 3D-Kultur eingebracht (siehe „2.7.3 Dreidimensionale Zellkultur zur Generierung von Organoiden“).

## **2.8 Zellen einfrieren**

Die Methode wurde aus den etablierten Protokollen des Labors übernommen.

Vorzubereiten waren die Kryoröhrchen, in welchen die Zellen eingefroren wurden. Die Kryoröhrchen wurden beschriftet und bei -20°C im Gefrierschrank für mindestens eine halbe Stunde heruntergekühlt.

Für das Einfrieren von Zellen mussten die zwei- beziehungsweise dreidimensionalen Zellkulturen nach dem Einzelzellverdau und der abschließenden Zentrifugation (siehe „2.6 Zweidimensionale Zellkulturen und Splitting“ und „2.7.4 Passage von Organoiden“) in Form eines Zellpellets vorliegen. Dieses Zellpellet wurde mit einer 1000-µl-Pipette in 1ml des FreezeMediums vorsichtig resuspendiert und in die heruntergekühlten Kryoröhrchen überführt. Diese wurden dann direkt in einem Gefrierschrank mit -80°C gelagert und nach mindestens einem beziehungsweise spätestens nach sieben Tagen in einen Stickstofftank überführt. Alternativ konnte auch eine Zwischenlagerung für einen Tag bei -20°C erfolgen, bevor die Proben weiter bei -80°C und letztendlich im Stickstofftank gelagert wurden.

## **2.9 Zellen auftauen**

Die Methode wurde aus den etablierten Protokollen des Labors übernommen.

Vorzubereiten waren 20ml warmes Working- oder Kulturmedium, welche in ein 50-ml-Röhrchen überführt wurden.

Die Kryoröhrchen mit den eingefrorenen Zellen wurden aus dem Stickstofftank entnommen und auf Eis transportiert. Anschließend wurden die Kryoröhrchen im 37°C warmem Wasserbad geschwenkt, bis der Inhalt angetaut war. Dann wurde der Inhalt des Kryoröhrchens in das vorbereitete 50-ml-Röhrchen mit dem vorgelegten Medium gestürzt. Es folgte eine Zentrifugation: Tumorlinien wurden bei 480 x g, 7Min und RT (Beschleunigung 9/9, Bremse 9/9) zentrifugiert, Zelllinien wie HBLAKs bei 200 x g, 5Min und RT (Beschleunigung 9/9, Bremse 2/9), BCOs bei 480 x g, 10Min und RT (Beschleunigung 9/9, Bremse 9/9).

Mittels Pasteurpipette wurde der Überstand über dem am Boden entstandenen Zellpellet abgenommen. Das Zellpellet konnte dann entweder in eine zwei- oder dreidimensionale Zellkultur eingebracht werden (siehe „2.6 Zweidimensionale Zellkulturen und Splitting“ und „2.7.3 Dreidimensionale Zellkultur zur Generierung von Organoiden“).

## **2.10 Zellzählung**

Die Methode wurde aus den Protokollen des Herstellers übernommen.

Zellzählungen wurden durchgeführt, um vor einem Proliferationsassay definierte Zellzahlen auszuplattieren sowie nach einem Proliferationsassay das Wachstum anhand der Zellzahl zu beurteilen. Verwendet wurde die Neubauer-improved-Zählkammer von Kisker Biotech.

Die Neubauer improved ist charakterisiert durch ein Zählnetz bestehend aus 3x3 Großquadraten. Jedes dieser Großquadrate hat eine Kantenlänge von je 1mm und somit eine Fläche von 1mm<sup>2</sup>. Die Kammertiefe ist standardmäßig auf 0,1mm festgelegt. Dadurch entsteht ein Raum definierten Volumens, welcher nach Auszählung der auf den Zählfeldern liegenden Zellen durch eine Formel Rückschlüsse über die Zellzahl je Volumeneinheit ermöglicht.

$$\frac{\text{Zellzahl}}{4} \times 2 \times 10^4 = \text{Zelldichte} \left( \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} \right)$$

Für die im Labor durchgeführten Zellzählungen wurden die vier äußeren Großquadrate, welche in 16 weitere Kleinquadrate unterteilt sind, ausgezählt. Von einer Zellsuspension wurden je 20µl entnommen und in einem Well einer 96-Well-Platte in 20µl Trypanblau resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 20µl seitlich auf die Zählkammer aufpipettiert, sodass sie durch Kapillarkräfte in den Raum definierten Volumens der Kammer gesogen wurden. Unter einem Mikroskop erfolgte bei eingestelltem Phasenkontrast die mäanderförmige Auszählung der vier Großquadrate. Wichtig war darauf zu achten, auf Grenzlinien liegende Zellen nicht doppelt zu zählen. Um dies zu verhindern, wurden nur die Zellen auf zwei Grenzlinien mitgezählt (links und unten), die auf den anderen beiden Linien liegenden Zellen nicht. Zudem wurden nur ungefärbte Zellen gezählt. Blau wurden vom Trypanblau tote Zellen angefärbt, da diese keine intakte Zellmembran mehr besitzen und der Farbstoff so durch die Membran hindurch diffundieren kann. Ungefärbte Zellen hingegen wiesen eine intakte Membran auf und wurden als vital angesehen.

## **2.11 Immunhistochemischer Nachweis des epithelialen Phänotyps humaner Urothelzellen**

Die Methode wurde aus den etablierten Protokollen des Labors übernommen und diente dem Nachweis des Pankeratinmarkers AE1/AE3, welcher in Urothelzellen mit epitheliale Phänotyp exprimiert wird.

### **2.11.1 Kultivierung der Zellen auf Chamber Slides**

In Chamber Slides wurden pro Well  $5 \times 10^4$  Zellen ausgesät und solange kultiviert, bis sich ein zu 100% konfluenter Zellrasen manifestierte. In dieser Zeit wurde zweimal wöchentlich Medienwechsel durchgeführt mit den entsprechenden Kulturmedien (siehe „2.5 Kulturmedien“), wobei pro Well 300µl Kulturmedium pipettiert wurden. Für die geplante Färbung war es notwendig mindestens je ein Well für eine Positiv- und Negativkontrolle einzuplanen.

### **2.11.2 Fixierung**

Die Fixierung der Zellen erfolgte bei einer Konfluenz der Zellen von 100%. Benötigt wurde Paraformaldehyd 4%, welches auf RT erwärmt wurde. Zudem wurde PBS verwendet. In den Kapiteln 2.11.2 bis 2.11.4. ist mit PBS nicht DPBS (Dulbecco's Phosphate-buffered saline) gemeint, sondern die Lösung aus einer PBS-Tablette gelöst in 1L Ampuwa.

Das Medium der kultivierten Zellen wurde vorsichtig mittels Pasteurpipette aus den Wells des Chamber Slides abgenommen. Es folgte ein Waschschrift, bei welchem pro Well 400µl PBS zu pipettiert wurden. Es folgte eine Inkubation für 2Min bei RT, das PBS wurde anschließend abgekippt. Dieser Vorgang wurde insgesamt zweimal wiederholt. Anschließend wurden pro Well 300µl des Paraformaldehyds zugegeben und 10Min bei RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde auch das Paraformaldehyd abgekippt. Es folgten erneut zwei Waschschriffe mit PBS, bei welchen pro Well 400µl PBS zu pipettiert wurden. Nach einer Inkubation von 2Min bei RT wurde das PBS abgekippt.

Falls eine Lagerung erforderlich war, wurden die Wells mit 400µl PBS gefüllt, mit Parafilm verschlossen und im Kühlschrank gelagert. So konnten die Chamber Slides für maximal zwei Wochen gelagert werden. Während dieser Lagerungsperiode musste einmal wöchentlich das PBS abgenommen und die Wells mit 400µl frischem PBS aufgefüllt werden.

### **2.11.3 Permeabilisierung**

#### 2.11.3.1 Sofortige Permeabilisierung

Erfolgte die Permeabilisierung direkt im Anschluss an die oben beschriebene Fixierung, wurde zuerst der Saponinpuffer steril 1:50 in PBS verdünnt. Hierfür wurden 100µl des Puffers in ein 15-ml-Röhrchen überführt und in 4.900µl PBS resuspendiert. Anschließend wurden 140µl des verdünnten Saponinpuffers auf jedes Well pipettiert und 10Min bei RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der verdünnte Saponinpuffer abgekippt. Es folgten zwei Waschschriffe mit PBS, bei welchen pro Well 400µl PBS zu pipettiert wurden. Nach einer Inkubation von 2Min bei RT wurde das PBS jeweils abgekippt.

### 2.11.3.2 Permeabilisierung nach Lagerung

Erfolgte die Permeabilisierung nach Lagerung des Chamber Slides, wurde dieser aus dem Kühlschrank entnommen und auf RT erwärmt. Währenddessen wurde der Saponinpuffer steril 1:50 in PBS verdünnt. Hierfür wurden 100µl des Puffers in ein 15-ml-Röhrchen überführt und in 4.900µl PBS resuspendiert. Anschließend wurden 140µl des verdünnten Saponinpuffers auf jedes Well pipettiert und 10Min bei RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der verdünnte Saponinpuffer abgekippt. Es folgten zwei Waschschriffe mit PBS, bei welchen pro Well 400µl PBS zu pipettiert wurden. Nach einer Inkubation von 2Min bei RT wurde das PBS jeweils abgekippt.

### **2.11.4 Immunhistochemische Färbung**

Die immunhistochemische Färbung erfolgte direkt im Anschluss an die Permeabilisierung. Vorbereitend wurde der AE1/AE3-Antikörper 1:500 verdünnt. 2µl des Antikörpers wurden in 998µl des verdünnten Saponinpuffers (siehe „2.11.3 Permeabilisierung“) resuspendiert. Zusätzlich wurde das Substratchromogen vorbereitet.

Der erste Schritt der Färbung war das Pipettieren von 100µl des Antibody-Diluents auf die Wells der Negativkontrolle bzw. 100µl des verdünnten Antikörpers auf die zu färbenden Wells sowie die Wells der Positivkontrolle. Es folgte eine Inkubation für 30Min bei RT, das Abkippen und ein Waschschriff mit 400µl PBS pro Well, welches 5Min bei RT inkubierte und dann abgekippt wurde. Danach wurden 100µl HRP-markiertes anti-mouse-Polymer pro Well pipettiert. Es folgte erneut eine Inkubation für 30Min bei RT, das Abkippen und ein Waschschriff mit 400µl PBS pro Well, welches 5Min bei RT inkubierte und dann ebenfalls abgekippt wurde. Anschließend wurden pro Well 100µl des Substratchromogens zugegeben. Nach einer Inkubation von 3Min bei RT wurde das Substratchromogen abgenommen und alle Wells mit je 500µl Ampuwa gewaschen. Das Ampuwa wirkte 5Min bei RT ein und wurde dann abgekippt. Es folgte die Färbung mit Hämatoxylin. Hierfür wurden 100µl Hämatoxylin pro Well zugegeben und 1Min bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Wells des Chamber Slides entfernt und der nun verbleibende

Objektträger für 10Min unter fließendem Leitungswasser gewässert. Abschließend musste der Objektträger trocknen und mit einem Deckglas sowie VectaMount Permanent Mounting Medium eingedeckelt werden.

Der Objektträger konnte bei Raumtemperatur gelagert werden.

Die AE1/AE3-Färbung war bei einer deutlichen Braunfärbung von >95% der Zellen als positiv zu werten.

## **2.12 WST-1-Proliferation-Assay**

Die Methode wurde aus den Protokollen des Herstellers übernommen.

Der WST-1-Proliferation-Assay (water soluble tetrazolium) diente dem Nachweis viabler Zellen innerhalb von zweidimensionalen Zellkulturen.

Viable Zellen verfügen über eine intakte Atmungskette mit einem mitochondrialen Succinat-Tetrazolium-Dehydrogenase-System. Durch Zugabe des schwach rot gefärbten Tetrazoliums Salzes WST-1 (chemische Bezeichnung: 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) zur Zellkultur kommt es innerhalb der viablen Zellen zu einer enzymatischen Umwandlung in den dunkelroten Tetrazolam-(Formazan)-Farbstoff. Dieser enzymatische Farbumschlag kann photometrisch mittels Absorptionsmessung in einem Spektralphotometer (ELISA) gemessen werden. Die Absorption ist dabei linear zur Menge des umgesetzten Tetrazolam-(Formazan)-Farbstoffs und somit auch linear zur Anzahl der viablen Zellen.

Als Spektralphotometer wurde der GloMax® Microplate Reader verwendet. Für die Durchführung wurden unterschiedliche Zellzahlen als zweidimensionale Zellkultur in 96-Well-Platten (flat bottom) ausgesät. Bei der Aussaat der Zelllinie HBLAKs war darauf zu achten, dass CellBIND 96-Well-Platten verwendet werden müssen. Die 96-Well-Platten wurden über einen definierten Zeitraum (vier oder sieben Tage) mit je 100µl Medium kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Ein- bis zweimal wöchentlich erfolgte ein Nährmediumwechsel.

Vorbereitend für die Messung wurde am jeweiligen Tag pro Well 10µl WST-1-Reagenz zu pipettiert. Anschließend erfolgte eine kurze Durchmischung mittels Rüttelplatte und eine dreistündige Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator. Danach erfolgte die Messung im GloMax® Microplate Reader. Die Platte wurde nochmals für 10sec (Cycles per Minute: 300, Type: linear, Shaking diameter: 2mm) durchmischt. Dann wurde die Absorption der einzelnen Wells der 96-Well-Platte im Spektralphotometer gemessen (Measurement  $\lambda$ =450nm, Reference  $\lambda$ =600nm) und ausgewertet.

## **2.13 Expressions-Vergleich 2D- vs. 3D-Zellkulturen**

### ***2.13.1 Matrigelauflösen zur RNA-Extraktion***

Die Methode wurde von cand. med. Philipp Vollmer im Labor etabliert und von ihm übernommen.

Zur Extraktion der RNA aus dreidimensionalen Zellkulturen in Matrigeldomes musste das Matrigel vollständig aufgelöst werden.

Zu Beginn wurde die Zentrifuge auf 4°C heruntergekühlt und außerhalb der Benutzung geschlossen gehalten. Die 24-Well-Platte mit den Matrigeldomes wurde für die nachfolgenden Schritte auf Eis gelagert.

Das Kulturmedium aus den Wells der 24-Well-Platte wurde mit einer 1000-µl-Pipette abgenommen und in ein 15-ml-Röhrchen überführt. Pro Well wurden 1000µl kaltes PBS in die Wells pipettiert. Der Dome wurde so mechanisch durch Kratzen der 1000-µl-Pipettenspitze über den Boden des Wells abgelöst und durch Resuspendieren im PBS aufgenommen. Die entstandene Suspension wurde ebenfalls in das 15-ml-Röhrchen überführt. Anschließend wurden nochmals 500µl kaltes PBS pro Well pipettiert, die Wells durch Auf- und Abpipettieren gewaschen und jenes PBS in das 15-ml-Röhrchen zugegeben.

Es folgte eine Zentrifugation (bei 480 x g, 10Min, 4°C, Beschleunigung 9/9, Bremse 7/9). Mittels Pasteurpipette wurde der Überstand aus PBS bis auf das am Boden befindliche Matrigel abgenommen. Pro Dome, welcher in das 15-ml-Röhrchen überführt worden war, wurde 1ml TrypLE zugegeben. Der Inhalt des Röhrchens wurde unter Verwendung eines Vortexmischers durchmischt und

das Röhrchen für 10Min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit erfolgte eine weitere Durchmischung mittels des Vortexmischers. Danach wurde der Inhalt des 15-ml-Röhrchens auf ein Volumen von 12ml mit kaltem PBS aufgefüllt und zentrifugiert (bei 1000 x g, 5Min, 4°C, Beschleunigung 9/9, Bremse 7/9). Mittels Pasteurpipette wurde der Überstand bis auf 200µl abgenommen, welche nachfolgend mit kaltem PBS auf ein Gesamtvolumen von 10ml aufgefüllt wurden. Nach einer weiteren Durchmischung unter Verwendung des Vortexmischers folgte eine Zentrifugation (bei 1200 x g, 5Min, 4°C, Beschleunigung 9/9, Bremse 7/9). Mittels Pasteurpipette wurde der Überstand erneut bis auf 200µl abgenommen, welche nachfolgend wieder mit kaltem PBS auf ein Gesamtvolumen von 10ml aufgefüllt wurden. Nach einer letzten Durchmischung mittels Vortexmischer wurde das 15-ml-Röhrchen abschließend zentrifugiert (bei 1200 x g, 5Min, 4°C, Beschleunigung 9/9, Bremse 7/9) und der Überstand mit einer Pasteurpipette bis auf das verbleibende Zellpellet abgenommen.

### **2.13.2 RNA-Extraktion**

Die Methode wurde aus den Protokollen des Herstellers und des Labors übernommen. Verwendet wurde das RNeasy® Mini Kit (250) von Qiagen.

Ausgangspunkt für die RNA-Extraktionen war ein in einem 15- oder 50-ml-Röhrchen befindliches Zellpellet, welches aus zwei- beziehungsweise dreidimensionalen Zellkulturen gewonnen worden war. Das Pellet wurde in 350µl RLT-Puffer mit β-Mercaptoethanol mittels 1000-µl-Filterspitze resuspendiert und anschließend für mindestens eine Stunde bei -80°C gelagert. Nach Ablauf der Stunde konnte die Probe erneut aufgetaut oder weiterhin gelagert werden.

Für die weitere Extraktion musste die Probe aufgetaut und dann auf Eis gestellt werden. Mit einer 1000-µl-Filterspitze wurden 350µl 70%igen Ethanol zur Probe zugegeben. Mit einer 1-ml-Insulinspritze wurde das Gemisch durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert und auf eine Spin Column aufgetragen. Diese Spin Column wurde in ein 2-ml-Tube überführt.

Es folgte eine Zentrifugation (bei 10000 rpm, 15Sec, RT) und der entstandene Durchfluss im 2-ml-Tube wurde verworfen. Auf die Spin Column wurden mit einer 1000- $\mu$ l-Filterspitze 350 $\mu$ l RW1-Waschpuffer gegeben und erneut zentrifugiert (bei 10000 rpm, 15Sec, RT). Der Durchfluss im 2-ml-Tube wurde verworfen. Anschließend wurde auf die Membran der Spin Column mit einer 100- $\mu$ l-Filterspitze 80 $\mu$ l DNase (bestehend aus 10 $\mu$ l Aliquot + 70 $\mu$ l RDD-Puffer) aufgetragen, woraufhin sich eine 15-minütige Inkubation bei RT anschloss. Nach der Inkubationszeit wurden mit einer 1000- $\mu$ l-Filterspitze 350 $\mu$ l RW1-Waschpuffer zur DNase zugegeben und wieder zentrifugiert (bei 10000 rpm, 15Sec, RT). Der Durchfluss wurde mitsamt dem 2-ml-Tube verworfen und die Spin Column in ein neues 2-ml-Tube überführt. Dann wurden 500 $\mu$ l RPE-Puffer auf die Spin Column pipettiert und erneut zentrifugiert (bei 10000 rpm, 15Sec, RT). Nach dem Verwerfen des Durchflusses und der Zugabe von 500 $\mu$ l RPE-Puffer folgte eine weitere Zentrifugation (bei 10000 rpm, 2Min, RT). Der entstandene Durchfluss wurde ebenfalls verworfen und die Spin Column nochmals trocken zentrifugiert (bei 10000 rpm, 15Sec, RT). Nachfolgend wurde die Spin Column in ein neues 1,5-ml-Tube gestellt. Auf die Membran der Spin Column wurde mittels 100- $\mu$ l-Filterspitze 20 $\mu$ l RNase freies Wasser aufgetragen (laut Hersteller 40 $\mu$ l empfohlen) und für 1Min bei RT inkubiert. Zum Schluss erfolgte ein Zentrifugationsschritt (bei 10000 rpm, 1Min, RT), nach welchem der Durchfluss im 1,5-ml-Tube die extrahierte RNA enthielt.

Die extrahierte RNA wurde im 1,5-ml-Tube bei -80°C gelagert.

### **2.13.3 Umschreiben von RNA in cDNA**

Die Methode wurde aus den Protokollen des Herstellers übernommen. Verwendet wurde das Advantage® RT-for-PCR Kit von TaKaRa.

Für die Durchführung einer quantitativen PCR musste die zuvor aus den Zellkulturproben extrahierte RNA in cDNA umgeschrieben werden. Die RNA-Probe wurde nach dem Auftauen in einem Verhältnis von 1 $\mu$ g RNA pro 12,5 $\mu$ l Volumen depc-Water und 1 $\mu$ l oligo(dT)-Primer in ein 0,5ml-Tube pipettiert. Danach erfolgte eine kurze Durchmischung mittels Vortexmischer und anschließend eine Zentrifugation.

Anschließend wurde die Probe bei einer Temperatur von 70°C für zwei Minuten inkubiert. Mit diesem Inkubationsschritt wurde die Bildung von Haarnadelstrukturen innerhalb der umzuschreibenden RNA verhindert, welche zur Synthese inkompletter cDNA führen würden. Nach der zweiminütigen Inkubation wurden 6,5µl eines zuvor angesetzten MasterMix (Zusammensetzung siehe Tabelle 8) zur Probe zu pipettiert.

*Tabelle 8: Zusammensetzung des Master Mix für Umschreiben von RNA in cDNA*

Reagenz	Volumen in µl
5x Buffer	4
RNaseInhibitor	0,5
dNTP-Mix	1
Reverse Transkriptase	1

Es folgte ein weiterer Inkubationsschritt bei einer Temperatur von 42°C für eine Stunde und sieben Minuten. Durch diesen zweiten Inkubationsschritt wurde die reverse Transkription an den oligo(dT)-Primern gestartet und somit die Synthese von cDNA. Abschließend wurden 80µl depc-Water in das 0,5ml-Tube zu pipettiert.

Das 0,5ml-Tube mit der umgeschriebenen cDNA wurde bei -20°C gelagert.

#### **2.13.4 Quantitative PCR im LC480**

Die Methode wurde aus den Protokollen des Herstellers Roche übernommen.

Die quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) wurde für den mRNA-Expressionsvergleich verschiedener Gene zwischen zwei- und dreidimensionalen Zellkulturen eingesetzt.

Eine Polymerasekettenreaktion dient grundsätzlich der Vervielfältigung (Amplifikation) spezifischer DNA-Abschnitte. Für die Durchführung einer PCR werden folgende Materialien benötigt: hitzestabile DNA-Polymerase, pro Gen zwei sequenzspezifische Primer (bestehend aus einem Vorwärts- und einem Rückwärtsprimer), ein DNA-Template und Desoxyribonukleotide dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP).

Die Primer bestehen aus einzelsträngiger DNA mit einer Länge von 15-20 Desoxyribonukleotiden und sind somit Oligonukleotide. Durch die Primer wird ein freies 3'OH-Ende als Startpunkt für die DNA-Polymerase geschaffen.

Das DNA-Template wurde durch reverse Transkription von RNA in cDNA gewonnen (siehe „2.13.3 Umschreiben von RNA in cDNA“).

Eine PCR läuft in 3 Reaktionsschritten ab, welche in 20 bis 50 Zyklen mehrfach durchlaufen werden (bei durchgeführten PCRs 39 Zyklen). Der erste Schritt ist die Denaturierung. Durch eine Temperaturerhöhung auf 95°C wird die cDNA von dem RNA-Template getrennt. Im anschließenden Annealing binden die Primer an die jeweils zu ihrer Sequenz komplementären DNA-Abschnitte. Für diesen Schritt muss die Temperatur entsprechend der Annealingtemperatur der Primer wieder gesenkt werden (bei verwendeten Primer bei 58°C bzw. 60°C). Danach schließt sich der Schritt der Elongation an. Bei einer Temperatur von 72°C verlängert die hitzestabile DNA-Polymerase den aufgetrennten DNA-Einzelstrang beginnend am 3'OH-Ende der Primer durch Einbau der Desoxyribonukleotide. Somit entsteht ein neuer Komplementärstrang zum Template.

Um eine Aussage über die Menge der entstandenen DNA treffen zu können, wurde während der qRT-PCR ein Fluoreszenzmarker eingesetzt. Es handelte sich um SybrGreen. Es handelt sich dabei um einen Cyaninfarbstoff, welcher an doppelsträngige DNA binden kann. Dadurch entsteht ein DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex, welcher bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{\max}=521\text{nm}$  grünes Licht emittiert. Dieses Fluoreszenzsignal kann mittels LightCycler detektiert und in einer Sigmoidfunktion aufgetragen werden. Zur quantitativen Bestimmung der Zielgene wurden die Werte gegenüber sogenannten Housekeeping-Genen (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und beta-Actin) normalisiert.

Die qRT-PCRs für den mRNA-Expressionsvergleich wurden im LightCycler 480 durchgeführt. Verwendet wurde das LightCycler 480 SYBR Green Master-Kit von Roche Diagnostics. In eine 96-Well-Platte wurden pro Well die in Tabelle 12 aufgeführten Reagenzien pipettiert.

**Tabelle 9:** verwendete Primer für quantitative PCR im LC480

Primer	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
Beta-Actin	AACTGGGACGACATGGAGAA	ATACCCCTCGTAGATGGGCA
CD24	TGAAGAACATGTGAGAGGTTT GAC	GAAAACCTGAATCTCCATTCCACA A
CD44	CACAATCCAGGCAACTCCTA	TACTCTGCTGCGTTGTCATT
CD47_2	GGAGCCATTCTTTTCGTCCCA	ACACGCCGCAATACAGAGAC
CD276	TTTCCTTTCCCCTCCTTCCTCC	TGTGACCAGCACATGCTTCC
FGFR-3	GGCAGCATCCGGCAGACGTAC	CTGAGGACAGCCTTGCGATG
GAPDH	GCTCTCCAGAACATCATCCCT GCC	CGTTGTCATACCAGGAAATGAG CTT
PD-L1	GTACCTTGGCTTTGCCACAT	CCAACACCACAAGGAGGAGT

**Tabelle 10:** Einstellungen der qRT-PCR für CD47\_2, FGFR-3 und CD276

<b>Anzahl der Zyklen</b>	39
<b>Annealingtemperatur</b>	60°C
<b>Housekeeping-Gene</b>	GAPDH, beta-Actin
<b>Zielgene</b>	CD47_2, FGFR-3, CD276

**Tabelle 11:** Einstellungen der qRT-PCR für CD24, CD44 und PD-L1

<b>Anzahl der Zyklen</b>	39
<b>Annealingtemperatur</b>	58°C
<b>Housekeeping-Gene</b>	GAPDH, beta-Actin
<b>Zielgene</b>	CD24, CD44, PD-L1

**Tabelle 12:** Reagenzien für qRT-PCR

Reagenz	Volumen
cDNA	2µl
Master Mix	10µl SybrGreen 6µl PrimerMix 2µl Non Template Water NTW

## **2.14 3D-Cell-Viability-Assay**

Die Methode wurde aus den Protokollen des Herstellers übernommen.

Für den 3D-Cell-Viability-Assay wurde ein ATP-abhängiger Assay verwendet. Er diente dem Nachweis der metabolischen Aktivität von dreidimensionalen Zellkulturen.

Dieser Assay basiert auf der Messung des ATP-Gehalts in einer ATP-abhängigen Luciferase-Reaktion. Durch die Zugabe der Assay-Reagenz zu den zuvor kultivierten dreidimensionalen Zellkulturen wird eine Lyse der Zellen induziert. Diese Lyse bewirkt die Freisetzung des in den Zellen gespeicherten ATPs (Adenosintriphosphat). Über eine Luciferase wird dieses ATP in einer Reaktion mit Luciferin zu Oxyluciferin und Licht umgesetzt. Das entstandene Lichtsignal (Lumineszenz) kann in einem Luminometer gemessen werden.

Als Luminometer zur Messung der Lumineszenz wurde ein GloMax® Microplate Reader verwendet. Für die Durchführung wurde eine definierte Zellzahl als dreidimensionale Zellkultur in 96-Well-Platten (flat bottom, Weißwand) ausgesät und über einen definierten Zeitraum von sieben Tagen mit je 100µl Medium kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Zweimal wöchentlich erfolgte ein Nährmediumwechsel.

Vorbereitend für die Messung wurde am jeweiligen Tag pro Well 100µl der CellTiter-Glo® 3D-Reagenz zu pipettiert.

Anschließend erfolgte eine fünfminütige Durchmischung mittels Rüttelplatte und eine 25-minütige Inkubation bei Raumtemperatur.

Danach erfolgte die Messung im GloMax® Microplate Reader. Die Platte wurde nochmals für 5 Minuten (Cycles per Minute: 300, Type: orbital, Shaking diameter: 1mm) durchmischt. Dann wurde die Lumineszenz der einzelnen Wells der 96-Well-Platte im GloMax® Microplate Reader gemessen (Filter: none, Integration: 0,3 sec) und ausgewertet.

## **2.15 Versuchsdurchführungen**

### **2.15.1 Vergleich verschiedener Medienansätze**

Als erste Orientierung, um einen aktuellen Stand der Medienpräferenz im Labor zu erheben, wurde das im Labor bisher etablierte Kulturmedium BTM mit einem Kulturmedium aus der Literatur (HCM nach Lee et al.) verglichen (siehe „2.5 Kulturmedien“).

Der Vergleich erfolgte anhand ausgewählter Organoide in unterschiedlichen Passagen: BCO#147 P7, BCO#154 P5 und BCO#270 P2. Diese Organoide wurden als 40µl-Domes auf 24-Well-Platten jeweils in BTM und HCM nach Lee et al. kultiviert, bis sie einen ausreichenden Organoiddurchmesser erreichten und gesplittet werden konnten. Das Organoid BCO#154 P5 war vor Ansetzen des Medienvergleichs nur in BTM kultiviert worden.

Zum Start des Medienvergleichs wurden die Organoide nach der Methode „2.7.4 Passage von Organoiden“ in Einzelzellen verdaut und nach der Methode „2.7.3 dreidimensionale Zellkultur zur Generierung von Organoiden“ als 20µl-Domes auf einer 48-Well-Platte ausgesät. Verwendet wurde hierfür Matrigel von Corning. Es erfolgte keine Zellzählung vor der Aussaat der Zellen bedingt durch den zu hohen Zellverlust bei einer solchen Zählung. Die Platten wurden anschließend bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator über einen Zeitraum von fünf beziehungsweise zehn Tagen kultiviert. Zweimal wöchentlich erfolgte ein Nährmediumwechsel.

Das Wachstumsverhalten der verschiedenen Organoidlinien wurde während des Beobachtungszeitraums mittels Mikroskopbildern dokumentiert. Diese Bilder dienten zudem der Auswertung. Die Durchmesser der fotografierten Organoide in den verschiedenen Medienansätzen wurden vermessen und aus diesen der Mittelwert berechnet. Der Mittelwert als Endgröße diente dem Vergleich zwischen den Medienansätzen.

## **2.15.2 Proliferationsassays an Zell- und Tumorkulturen in zweidimensionalen Zellkulturen**

### 2.15.2.1 Bestimmung der Duplikationsraten

Die Bestimmung der Duplikationsraten erfolgte nach Bieback et al. anhand der ausgewählten Tumorkulturen UM-UC-15 und HT1197, sowie als Kontrolle an der Zelllinie HBLAKs. Im Rahmen dieses Versuchs wurde ebenfalls das allgemeine Wachstumsverhalten der Zellen beobachtet, da diese Zell- und Tumorkulturen für spätere Proliferationsassays in zwei- und dreidimensionalen Zellkulturen verwendet wurden.

Die Zell- und Tumorkulturen wurden als zweidimensionale Kulturen in Zellkulturflaschen in ihrem Standardnährmedium (siehe „2.5 Kulturmedien“) kultiviert. Bei einer Konfluenz von 80-90% erfolgte nach „2.6.1 Variante 1 in Zellkulturflaschen“ ein Splitting der Zellen. Sie wurden nach einer Zellzählung (siehe „2.10 Zellzählung“) jeweils mit  $1 \times 10^5$  Zellen pro Well auf einer 6-Well-Platte erneut als zweidimensionale Zellkulturen ausgesät. Insgesamt wurden pro Zell- beziehungsweise Tumorkultur sechs Wells einer 6-Well-Platte angesetzt, wobei drei Wells mit Mangelmedium 1 und drei mit Vollmedium 1 (siehe „2.5 Kulturmedien“) im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert wurden. Bei einer 80-90%igen Konfluenz wurden die Wells eines jeden Medienansatzes nach „2.6.2 Variante 2 in 6-Well-Platten“ gesplittet und erneut eine Zellzählung durchgeführt. Nach der Zählung erfolgte eine weitere Aussaat von  $1 \times 10^5$  Zellen pro Well für die entsprechende Zell- beziehungsweise Tumorkultur und den entsprechenden Medienansatz. Dieses Prozedere wurde über drei konsekutive Passagen hinweg durchgeführt. Aus den Werten zu Passagezeit sowie Zellzahl vor und nach Passage wurde letztlich die Duplikationsrate (Bieback et al., 2004) bestimmt und zwischen den zwei Medienansätzen einer jeden Zell- und Tumorkultur verglichen.

#### 2.15.2.2 AE1/AE3-Färbung zum Nachweis des epithelialen Phänotyps an HBLAKs

Anhand der Zelllinie HBLAKs wurde eine AE1/AE3-Färbung der Zellen durchgeführt. Diese Färbung sollte dem Nachweis des epithelialen Phänotyps der HBLAKs in unterschiedlichen Kulturmedienansätzen dienen.

Die HBLAKs wurden als zweidimensionale Zellkultur, welche in einer Zellkulturflasche in CnT-Prime (siehe „2.5 Kulturmedien“) kultiviert worden war, nach „2.6.1 Variante 1 in Zellkulturflaschen“ gesplittet und nach einer Zellzählung (siehe „2.10 Zellzählung“) auf einem Chamber Slide mit je  $5 \times 10^4$  Zellen pro Well ausgesät. Die Kultivierung der Zellen erfolgte anschließend im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in CnT-Prime (Standardkulturmedium) für eine Negativ- und Positivkontrolle sowie in Mangelmedium 1 und Vollmedium 1 (siehe „2.5 Kulturmedien“). Die AE1/AE3-Färbung wurde erst bei einer Konfluenz der Zellen von 80-90% nach „2.11 Immunhistochemischer Nachweis des epithelialen Phänotyps humaner Urothelzellen“ durchgeführt.

### 2.15.2.3 WST-1-Proliferation-Assay - Bestimmung der Zellzahlen

In den Screen zur Bestimmung der Zellzahlen wurden die Tumorkulturen UM-UC-15 und HT1197 sowie die Zelllinie HBLAKs miteinbezogen.

Die Zell- und Tumorkulturen wurden als zweidimensionale Kulturen in Zellkulturflaschen in ihrem Standardkulturmedium kultiviert (siehe „2.5 Kulturmedien“). Bei einer Konfluenz von 80-90% erfolgte nach „2.6.1 Variante 1 in Zellkulturflaschen“ ein Splitting der Zellen. Sie wurden nach einer Zellzählung (siehe „2.10 Zellzählung“) auf je zwei 96-Well-Platten (flat bottom) pro Zell- bzw. Tumorkultur erneut als zweidimensionale Zellkultur ausgesät. Die Aussaat erfolgte mit unterschiedlichen Zellzahlen pro Well (250, 500, 1000, 2500, 5000) mit jeweils n=5 für zwei verschiedene Medienansätze (Mangelmedium 1 und Vollmedium 1, siehe „2.5 Kulturmedien“) (siehe Abbildung 2). Für die spätere Auswertung mittels Absorptionsmessung wurde für jeden Medienansatz ein Blank (Medium ohne Zellen) auf der 96-Well-Platte mitaufgetragen (siehe Abbildung 2 „zweite Zeile der 96-Well-Platte: ØZellen“).

Die 96-Well-Platten wurden anschließend bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator inkubiert. Es erfolgte ein- beziehungsweise zweimal wöchentlich ein Nährmediumwechsel. Nach vier bzw. sieben Tagen wurden die Platten nach „2.12 WST-1-Proliferation-Assay“ ausgewertet.

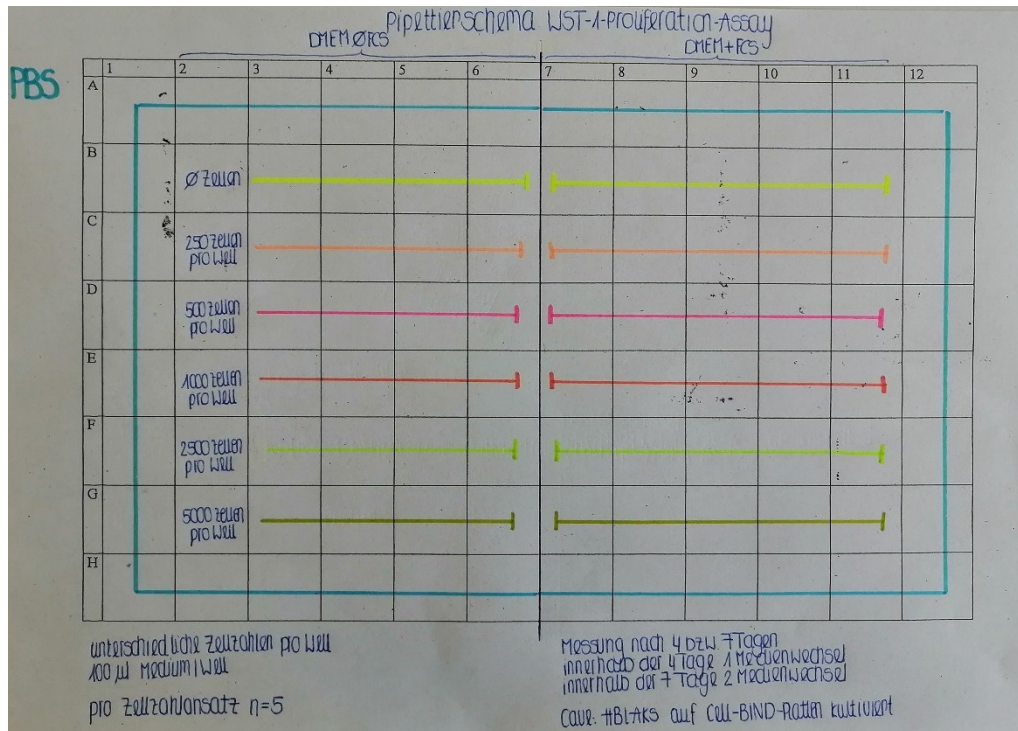


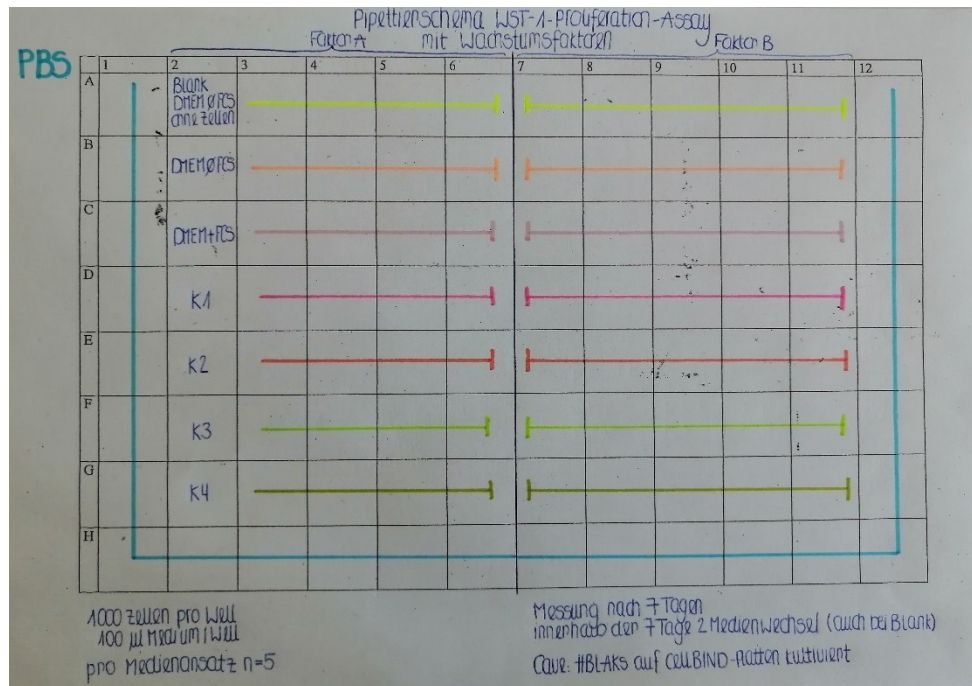
Abbildung 2: Pipettierschema zur Bestimmung der Zellzahl mittels WST-1-Assay

#### 2.15.2.4 WST-1-Proliferation-Assay – Proliferationsassay mit Wachstumsfaktoren

Der Proliferationsassay, in welchem Wachstumsfaktoren in unterschiedlichen Konzentrationen getestet wurden, erfolgte an der Tumorzelllinie UM-UC-15 und der Zelllinie HBLAKs.

Die Zell- und Tumorzelllinie wurden als zweidimensionale Kulturen in Zellkulturflaschen in ihrem Standardnährmedium kultiviert (siehe „2.5 Kulturmedien“). Bei einer Konfluenz von 80-90% erfolgte nach „2.6.1 Variante 1 in Zellkulturflaschen“ ein Splitting der Zellen. Sie wurden nach einer Zellzählung (siehe „2.10 Zellzählung“) mit je 1000 Zellen pro Well auf 96-Well-Platten (flat bottom) erneut als zweidimensionale Zellkultur ausgesät. Pro Zell- bzw. Tumorzelllinie wurden die Zellen mit unterschiedlichen Nährmedienansätzen verschiedener Wachstumsfaktoren mit jeweils n=5 kultiviert (siehe Abbildung 3). Jeder Wachstumsfaktor wurde dabei in vier Konzentrationen getestet. Die einzige Ausnahme davon stellte der Faktor A83-01 dar, welcher lediglich in der Konzentration 5µM gescreent wurde (siehe Abbildung 3 und Tabelle 13). Für die spätere Auswertung mittels Absorptionssmessung wurde ein Blank (Mangelmedium 1 und ohne Zellen) auf der 96-Well-Platte mitaufgetragen (siehe Abbildung 3 „erste Zeile der 96-Well-Platte: Blank DMEM Ø FCS ohne Zellen“). Als Negativkontrolle wurde Mangelmedium 1 und als Positivkontrolle Vollmedium 1 (siehe „2.5 Kulturmedien“) vorausgesetzt. Mangelmedium 1 diente zudem als Grundmedium für die Herstellung der verschiedenen Nährmedienansätze.

Die 96-Well-Platten wurden anschließend bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator inkubiert. Zweimal wöchentlich wurde ein Nährmediumwechsel durchgeführt. Nach sieben Tagen erfolgte nach „2.12 WST-1-Proliferation-Assay“ die Auswertung der Platten.



**Abbildung 3:** Pipettierschema der Proliferationsassays an Zell- und Tumorklinien mit Wachstumsfaktoren mittels WST-1-Assay

**Tabelle 13:** Auflistung der verwendeten Wachstumsfaktoren und ihrer Konzentrationen

Wachstumsfaktor	Konz. 4	Konz. 3	Konz. 2	Konz. 1
<b>EGF</b> (in ng/ml)	6,25	12,5	25	50
<b>FGF2</b> (in ng/ml)	3	6	12	24
<b>HGF</b> (in ng/ml)	5	10	20	50
<b>IGF 1</b> (in ng/ml)	12,5	25	50	100
<b>Neuregulin</b> (in nM)	2	5	10	20
<b>Noggin</b> (in ng/ml)	25	50	100	200
<b>R-Spondin 1</b> (in ng/ml)	62,5	125	250	500
<b>A83-01</b> (in µM)	/	/	/	5
<b>TGF-β1</b> (in ng/ml)	1	3	10	30

### **2.15.3 Proliferationsassays an Zell- und Tumorzelllinien in dreidimensionalen Zellkulturen**

#### 2.15.3.1 Expressionsvergleich zwischen zwei- und dreidimensionalen Zellkulturen

Der Expressionsvergleich der RNA erfolgte an der Zelllinie HBLAKs sowie der Tumorzelllinie UM-UC-15, sowohl in zwei- als auch dreidimensionalen Zellkulturen.

Die Zell- und Tumorzelllinien wurden zum einen nach „2.6.1 Variante 1 in Zellkulturflaschen“ als zweidimensionale Kulturen in ihren jeweiligen Standardmedien kultiviert (siehe „2.5 Kulturmedien“), zum anderen auch als dreidimensionale Zellkulturen. Für die dreidimensionalen Kulturen wurden die Zellen zuerst als zweidimensionale Zellkulturen nach „2.6.1 Variante 1 in Zellkulturflaschen“ in ihren Standardmedien kultiviert und bei einer Konfluenz von 80-90% gesplittet. Nach „2.7.3 Dreidimensionale Zellkultur zur Generierung von Organoiden“ wurden die gewonnenen Einzelzellen als 40µl-Domes mit je 20.000 Zellen pro Dome als dreidimensionale Kulturen auf 24-Well-Platten angesetzt. Verwendet wurde hierfür Matrigel von Corning. Die Kultivierung erfolgte im jeweiligen Standardmedium, welchem auf je 50ml 5µl des Y-27632 (ROCK-Inhibitor) zugegeben worden war.

Bei einer 80-90%igen Konfluenz der zweidimensionalen Zellkulturen erfolgte nach „2.13.2 RNA-Extraktion“ die RNA-Extraktion aus den kultivierten Zellen. Die dreidimensionalen Kulturen wurden bei ausreichender Größe der sphäroidalen Zellstrukturen nach „2.13.1 Matrigelauflösen zur RNA-Extraktion“ aufbereitet. Anschließend erfolgte ebenfalls nach „2.13.2 RNA-Extraktion“ die Extraktion der RNA aus den kultivierten Zellen. Nach „2.13.3 Umschreiben von RNA in cDNA“ wurde für beide Kulturbedingungen schließlich die quantitative PCR durchgeführt (siehe „2.13.4 Quantitative PCR im LC480“). Verwendet wurden Primer für folgende Gene: GAPDH, beta-Actin, CD24, CD44, CD47\_2, PD-L1, FGFR3 und CD276.

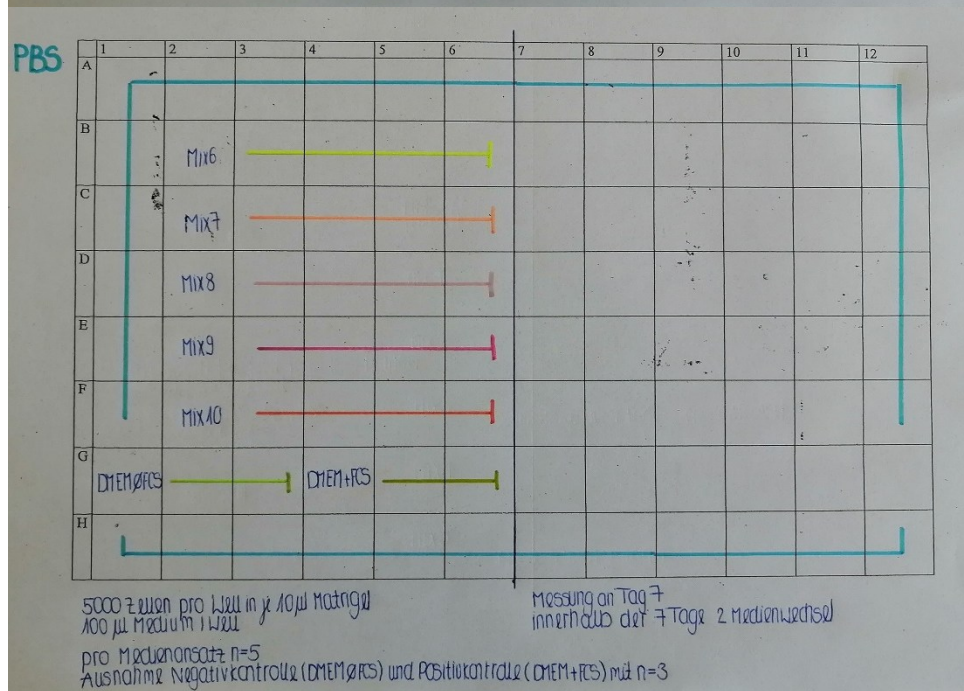
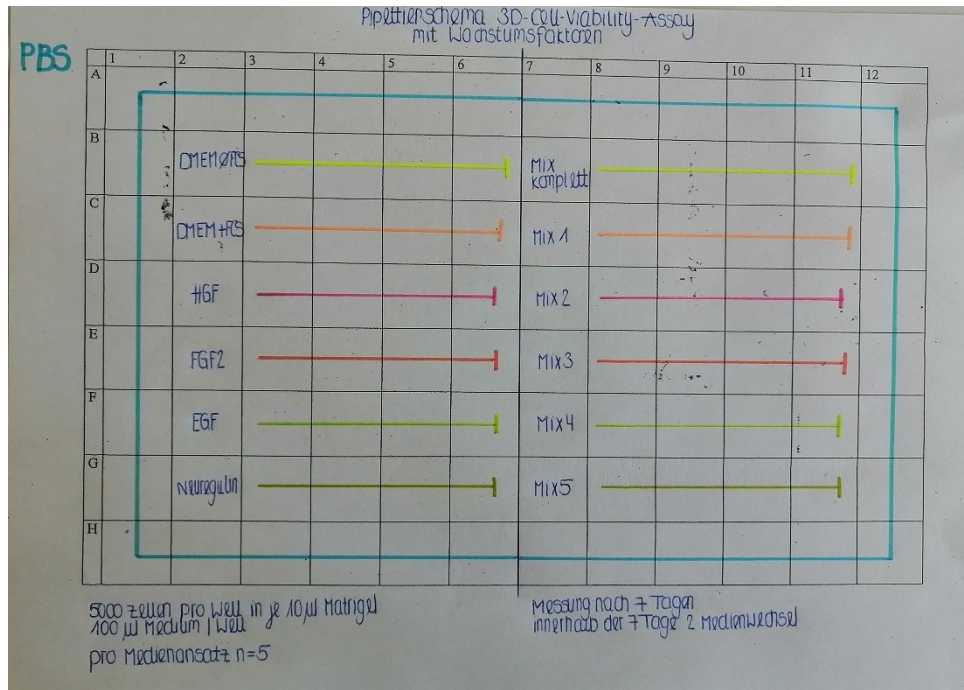
### 2.15.3.2 3D-Cell-Viability-Assay an Zell- und Tumorkulturen

Der Vitalitätsassay, in welchem Wachstumsfaktoren in unterschiedlichen Konzentrationen getestet wurden, erfolgte an der Tumorkultur UM-UC-15 und der Zellkultur HBLAKs.

Die Zell- und Tumorkulturen wurden als zweidimensionale Kulturen in Zellkulturflaschen in ihrem Standardnährmedium kultiviert (siehe „2.5 Kulturmedien“). Bei einer Konfluenz von 80-90% erfolgte nach „2.6.1 Variante 1 in Zellkulturflaschen“ ein Splitting der Zellen. Sie wurden nach einer Zellzählung (siehe „2.10 Zellzählung“) mit je 5.000 Zellen pro Dome als 10µl-Domes auf 96-Well-Platten (flat bottom, Weißwand) als dreidimensionale Zellkulturen angesetzt. Verwendet wurde hierfür Matrigel von Corning. Pro Zell- bzw. Tumorkultur wurden die Zellen mit unterschiedlichen Nährmedienansätzen mit jeweils n=5 kultiviert (siehe Abbildung 4 und Tabelle 14).

Als Negativkontrolle wurde Mangelmedium 2 und als Positivkontrolle Vollmedium 2 (siehe „2.5 Kulturmedien“) vorausgesetzt. Mangelmedium 2 diente zudem als Grundmedium für die Herstellung der verschiedenen Nährmedienansätze.

Die 96-Well-Platten wurden anschließend bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator inkubiert. Zweimal wöchentlich wurde ein Nährmediumwechsel durchgeführt. Nach sieben Tagen erfolgte nach „2.14 3D-Cell-Viability-Assay“ der Vitalitätsassay.



**Abbildung 4:** Pipettierschemata der Proliferationsassays an Zell- und Tumorklinen mit Wachstumsfaktoren mittels 3D-Cell-Viability-Assay

**Tabelle 14:** Auflistung der verwendeten Nährmedienansätze

Für die verschiedenen Kombinationen (siehe Mix komplett bis Mix 10) wurden die in den oberen Zeilen aufgeführten Wachstumsfaktoren jeweils in ihren Einzelkonzentrationen zum Grundmedium zu pipettiert.

<b>Nährmedienansätze</b>	<b>Konzentrationen</b>
Einzelfaktor HGF	50ng/ml
Einzelfaktor FGF2	6ng/ml
Einzelfaktor EGF	25ng/ml
Einzelfaktor Neuregulin	5nM
Mix komplett	HGF+FGF2+EGF+Neuregulin
Mix 1	HGF+Neuregulin
Mix 2	HGF+EGF
Mix 3	Neuregulin+FGF2
Mix 4	HGF+FGF2+Neuregulin
Mix 5	HGF+EGF+FGF2
Mix 6	EGF+FGF2+Neuregulin
Mix 7	HGF+EGF+Neuregulin
Mix 8	FGF2+HGF
Mix 9	FGF2+Neuregulin
Mix 10	EGF+FGF2

#### **2.15.4 3D-Cell-Viability-Assay an humanen Blasentumororganoiden**

Der 3D-Cell-Viability-Assay wurde anhand des humanen Blasentumororganoids BCO#270 in der elften Passage durchgeführt.

Die Zellen des BCOs wurden nach „2.9 Zellen auftauen“ aus Rückstellproben aufgetaut und nach „2.7.3 Dreidimensionale Zellkultur zur Generierung von Organoiden“ als 40µl-Domes auf 24-Well-Platten ausgesät und mit BTM als Nährmedium versorgt. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator. Um genügend Zellen für den angedachten Screen zu generieren, wurden die Organoiden über zwei Passagen nach „2.7.4 Passage von Organoiden“ und „2.7.3 Dreidimensionale Zellkultur zur Generierung von Organoiden“ expandiert.

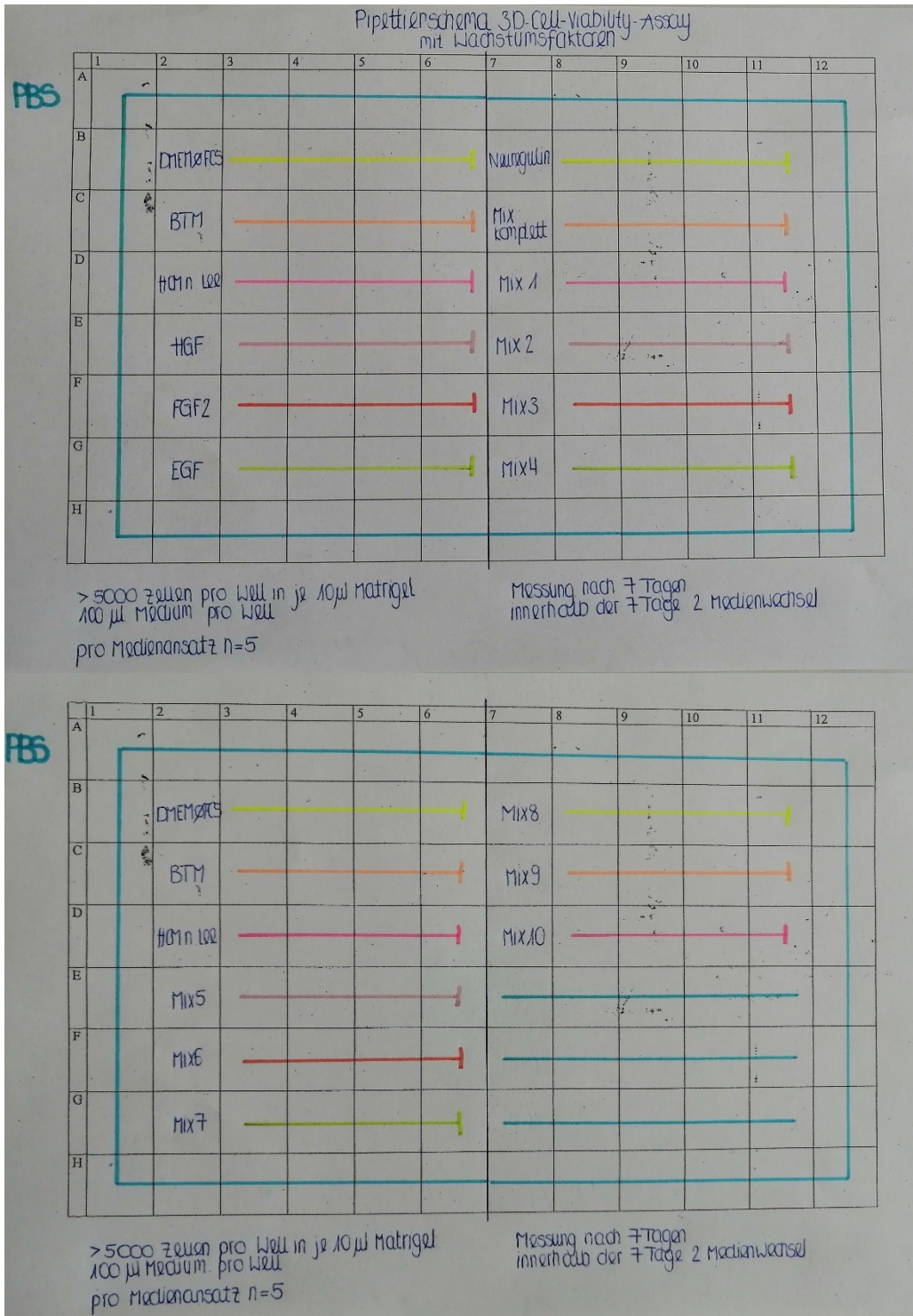
Der Versuch wurde mit Material aus 16 40µl-Domes durchgeführt. Die Domes wurden nach „2.7.4 Passage von Organoiden“ in einem 50ml-Röhrchen bis zur ersten Zentrifugation (bei 480 x g, 10Min, RT, Beschleunigung 9/9, Bremse 9/9) abgelöst. Bedingt durch die Menge an Matrigel wurde ab diesem Punkt vom ursprünglichen Protokoll (siehe „2.7.4 Passage von Organoiden“) abgewichen.

Nach der ersten Zentrifugation (siehe „2.7.4 Passage von Organoiden“) wurde der Überstand bis auf das Matrigel abgenommen. Es folgte die Zugabe von 4ml TrypLE und eine zweiminütige Inkubation des Röhrchens bei 37°C im Wasserbad. Nach einer Durchmischung mittels Vortexmischer wurden erneut 4ml TrypLE zugegeben und das Röhrchen bei 37°C für 2Min im Wasserbad inkubiert. Dieser Arbeitsschritt wiederholte sich ein weiteres Mal. Nach dem letzten Inkubationsschritt wurden zur entstandenen Suspension 25ml kaltes PBS+Y zugegeben. Es folgte eine Zentrifugation (bei 480 x g, 10Min, RT, Beschleunigung 9/9, Bremse 9/9). Bedingt durch weiterhin bestehende Matrigelreste wurde der Überstand bis zum Matrigel nach der Zentrifugation abgenommen und 2ml TrypLE zugegeben. Nach zweiminütiger Inkubation im Wasserbad bei 37°C wurde mit 10ml kaltem PBS+Y aufgefüllt und es erfolgte eine Zentrifugation (bei 480 x g, 10Min, RT, Beschleunigung 9/9, Bremse 9/9). Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal mit 10ml TrypLE und 25ml kaltem PBS+Y durchgeführt und wieder zentrifugiert (bei 480 x g, 10Min, RT, Beschleunigung

9/9, Bremse 9/9). Anschließend wurde der Überstand bis auf das gewonnene Zellpellet abgenommen. Dieses wurde in 300µl Workingmedium und 900µl Matrigel resuspendiert. Es wurde eine dreidimensionale Zellkultur mit jeweils 10µl-Domes auf 96-Well-Platten (flat bottom, Weißwand) angesetzt. Verwendet wurde hierfür Matrigel Cultrex RGF BME, Type 2 von R&D Systems. Eine orientierende Zellzählung konnte nach „2.10 Zellzählung“ nicht erfolgen, da die Organoide nicht ausreichend zu Einzelzellen vereinzelt werden konnten.

Als dreidimensionale Kultur wurden die Zellen mit unterschiedlichen Nährmedienansätzen mit jeweils n=5 kultiviert (siehe Abbildung 5 und Tabelle 15). Als Negativkontrolle wurde Mangelmedium 2 und als Positivkontrolle BTM und HCM nach Lee et al. (siehe „2.5 Kulturmedien“) eingesetzt. Das Mangelmedium 2 diente zudem als Grundmedium für die Herstellung der verschiedenen Nährmedienansätze.

Die 96-Well-Platten wurden anschließend bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator inkubiert. Zweimal wöchentlich wurde ein Nährmediumwechsel durchgeführt. Nach sieben Tagen erfolgte nach „2.14 3D-Cell-Viability-Assay“ die Auswertung der Platten.



**Abbildung 5:** Pipettierschemata der Proliferationsassays an humanen Blasen-tumororganoiden mit Wachstumsfaktoren mittels 3D-Cell-Viability-Assay

**Tabelle 15:** Auflistung der verwendeten Nährmedienansätze

Für die verschiedenen Kombinationen (siehe Mix komplett bis Mix 10) wurden die in den oberen Zeilen aufgeführten Wachstumsfaktoren jeweils in ihren Einzelkonzentrationen zum Grundmedium zu pipettiert.

<b>Nährmedienansätze</b>	<b>Konzentrationen</b>
Einzelfaktor HGF	50ng/ml
Einzelfaktor FGF2	6ng/ml
Einzelfaktor EGF	25ng/ml
Einzelfaktor Neuregulin	5nM
Mix komplett	HGF+FGF2+EGF+Neuregulin
Mix 1	HGF+Neuregulin
Mix 2	HGF+EGF
Mix 3	Neuregulin+FGF2
Mix 4	HGF+FGF2+Neuregulin
Mix 5	HGF+EGF+FGF2
Mix 6	EGF+FGF2+Neuregulin
Mix 7	HGF+EGF+Neuregulin
Mix 8	FGF2+HGF
Mix 9	FGF2+Neuregulin
Mix 10	EGF+FGF2

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Vergleich verschiedener Medienansätze

Als erste Orientierung, um einen aktuellen Stand der Medienpräferenz im Labor zu erheben, wurde das im Labor bisher etablierte Kulturmedium BTM mit einem Kulturmedium aus der Literatur (HCM nach Lee et al.) verglichen (siehe „2.5 Kulturmedien“).

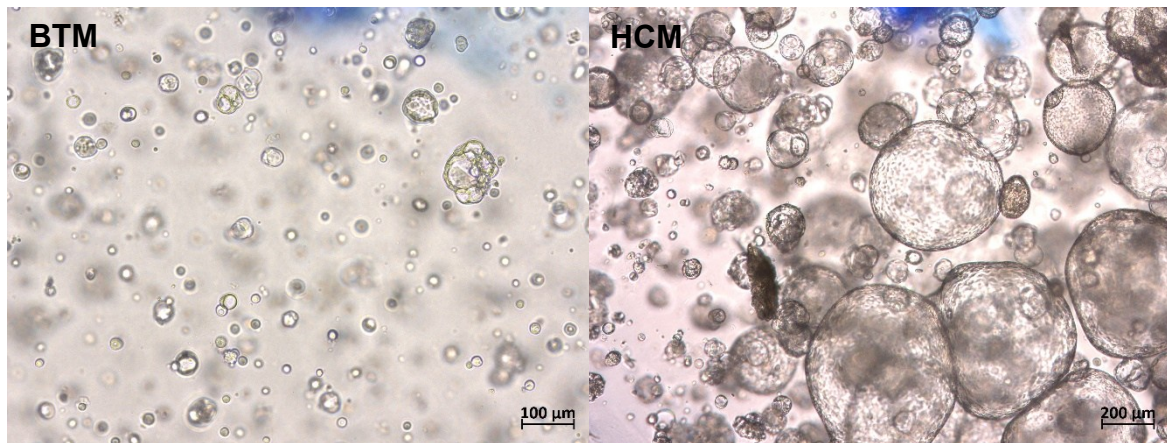
Der Vergleich erfolgte anhand ausgewählter Organoide in unterschiedlichen Passagen: BCO#147 P7, BCO#154 P5 und BCO#270 P2.

Für BCO#147 in der siebten Passage wurden insgesamt fünf Domes auf eine 48-Well-Platte gesetzt. Zwei dieser Domes wurden in BTM und drei in HCM nach Lee et al. kultiviert. Der dritte Dome, welcher in HCM nach Lee et al. kultiviert worden war, wurde nicht in die Auswertung miteinbezogen.

Bei diesem Organoid zeigten sich mikroskopisch bereits am dritten Tag des Beobachtungszeitraums gravierende Unterschiede zwischen den Medienansätzen. Im Medienansatz BTM war nur ein minimales Organoidwachstum zu verzeichnen, während im Medienansatz HCM nach Lee et al. Organoide mit einem Durchmesser  $>200\mu\text{m}$  dokumentiert wurden (siehe Abbildung 6). Auch die Morphologie der Organoide war unterschiedlich. Während im HCM nach Lee et al. die Organoide symmetrisch und zystisch wuchsen, waren sie im BTM eher asymmetrisch und nur anteilig von zystischem Wachstum geprägt (siehe Abbildung 6).

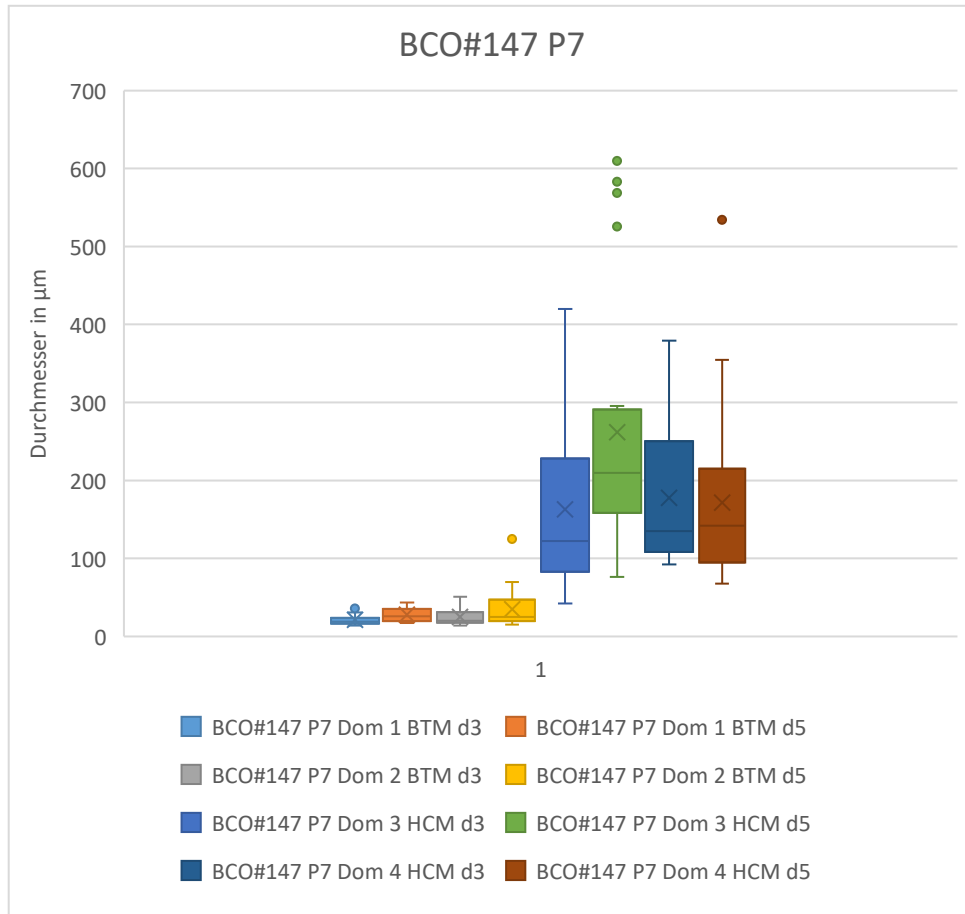
Nach dem fünften Tag musste der Medienvergleich für BCO#147 P7 abgebrochen werden. Grund hierfür war das weiterhin massive Wachstum der Organoide im Medium HCM nach Lee et al., welches eine Passage der Organoide erforderlich machte. Die Organoide, die in BTM kultiviert worden waren, wurden noch über den fünften Tag hinweg beobachtet, zeigten aber weiterhin ein asymmetrisches und ungleichmäßiges Wachstum. Trotz des längeren Beobachtungszeitraums konnten die Organoide im BTM die Organoiddurchmesser aus dem Medienansatz mit HCM nach Lee et al. nicht erreichen.

In der Auswertung der vermessenen Organoiddurchmesser zeigten die Organoide im Medium HCM nach Lee et al. ebenfalls ein deutlicheres Größenwachstum mit Durchmessern teilweise  $>200\mu\text{m}$ . Die Durchmesser der Organoide im BTM erreichten bis auf ein vermessenes Organoid (siehe Abbildung 7 „BCO#147 P7 Dome 2 BTM d5“) nur Werte  $<100\mu\text{m}$ . Zwischen Tag 3 und Tag 5 war in den Domes 1, 2 und 3 jeweils eine Zunahme der Organoiddurchmesser zu verzeichnen. Für Dome 4 nahmen die Werte der Durchmesser von Tag 3 zu Tag 5 hin ab. Dies lässt sich darin begründen, dass durch das massive Wachstum die Organoide bis Tag 5 bereits zerfallen waren beziehungsweise nicht mehr ausreichend Platz für eine Größenexpansion hatten.



**Abbildung 6:** BCO#147 P7 in BTM (links) und HCM nach Lee et al. (rechts) an Tag 5

Die beiden Bilder zeigen die Organoide BCO#147 P7 aus den Ansätzen in BTM und HCM an Tag 5 der Auswertung. Zu beachten sind die verschiedenen Maßstäbe (Maßstab links:  $100\mu\text{m}$ , Maßstab rechts:  $200\mu\text{m}$ ). Deutlich zu erkennen ist der Unterschied zwischen den zwei Medienansätzen (links BTM, rechts HCM). Die Organoide im HCM haben Durchmesser  $>200\mu\text{m}$  erreicht und zeigten ein zystisches, aber symmetrisches Wachstum. Die Durchmesser der Organoide im BTM hingegen blieben  $<100\mu\text{m}$ . Die Organoide im BTM zeigten zudem ein asymmetrisches, nur anteilig zystisches Wachstum.



**Abbildung 7:** Auswertung Medienvergleich BCO#147 P7

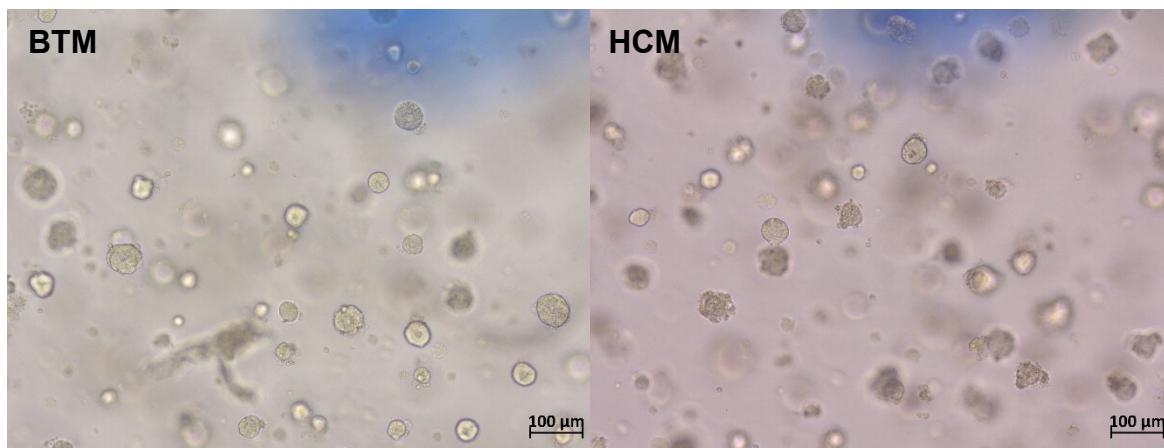
Abgebildet sind die aus der Vermessung der Organoiddurchmesser von BCO#147 P7 erhobenen Daten. Die Zellen von BCO#147 P7 wurden als 20µl-Domes auf 48-Well-Platten ausgesät. Zwei Domes wurden in BTM und zwei Domes in HCM nach Lee et al. kultiviert und über einen Zeitraum von insgesamt fünf Tagen beobachtet. Dokumentiert wurde das Wachstum der Organoide mittels Mikroskopbildern, anhand derer die Organoiddurchmesser vermessen wurden. Für jeden in die Auswertung einbezogenen Dome wurden die Daten der Durchmesser von Tag 3 (d3) und Tag 5 (d5) gegeneinander aufgetragen. Anhand dieser Daten wurde das Wachstum der Organoide in den verschiedenen Medienansätzen (BTM bzw. HCM nach Lee et al.) miteinander verglichen.

Wie bereits mikroskopisch ersichtlich, zeigten die Organoide im Medium HCM nach Lee et al. ein deutlicheres Größenwachstum mit Durchmessern teilweise >200µm. Die Durchmesser der Organoide im BTM erreichten bis auf ein vermessenes Organoid (siehe Abbildung 7 „BCO#147 P7 Dom 2 BTM d5“) nur Werte <100µm.

Als weiteres Organoid wurde BCO#154 in der fünften Passage verwendet. Insgesamt wurden drei Domes auf einer 48-Well-Platte gesetzt. Davon wurden zwei Domes in BTM und ein Dome in HCM nach Lee et al. kultiviert. Der zweite Dome, welcher in BTM kultiviert worden war, wurde nicht in die Auswertung miteinbezogen.

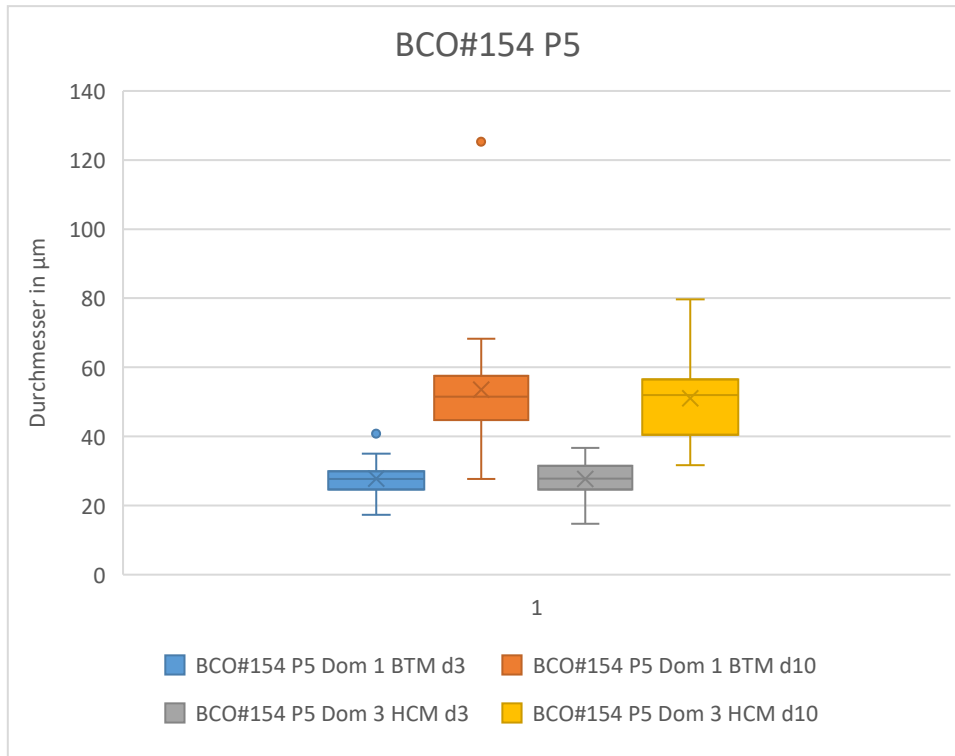
Über den gesamten Beobachtungszeitraum zeigten sich mikroskopisch keine Unterschiede im Wachstum der Organoide. In beiden Medienansätzen wuchsen die Organoide gleichmäßig und glatt berandet mit einigen wenigen Ausnahmen (siehe Abbildung 8). BCO#154 P5 konnte sowohl in BTM als auch in HCM nach Lee et al. über einen Zeitraum von zehn Tagen in Kultur gehalten werden, bis sich erste Anzeichen für eine notwendige Passage der Organoide zeigten.

Das gleichmäßige Wachstum der Organoide spiegelte sich ebenfalls in der Auswertung der Organoiddurchmesser wider. An allen Tagen, an welchen Daten für die Auswertung erhoben wurden, zeigten die Durchmesser in den zwei Medienansätzen kaum Abweichungen voneinander (siehe Abbildung 9). In beiden Medienansätzen erreichten die Organoide an Tag 10 im Mittel Durchmesser zwischen 40 und 60µm.



**Abbildung 8:** BCO#154 P5 in BTM (links) und HCM nach Lee et al. (rechts) an Tag 10

*Die beiden Bilder zeigen die Organoide BCO#154 P5 aus den Ansätzen in BTM und HCM nach Lee et al. an Tag 10 der Auswertung. Sowohl in BTM als auch in HCM nach Lee et al. wuchsen die Organoide gleichmäßig und symmetrisch ohne erkennbaren Unterschied zwischen beiden Medienansätzen.*



**Abbildung 9:** Auswertung Medienvergleich BCO#154 P5

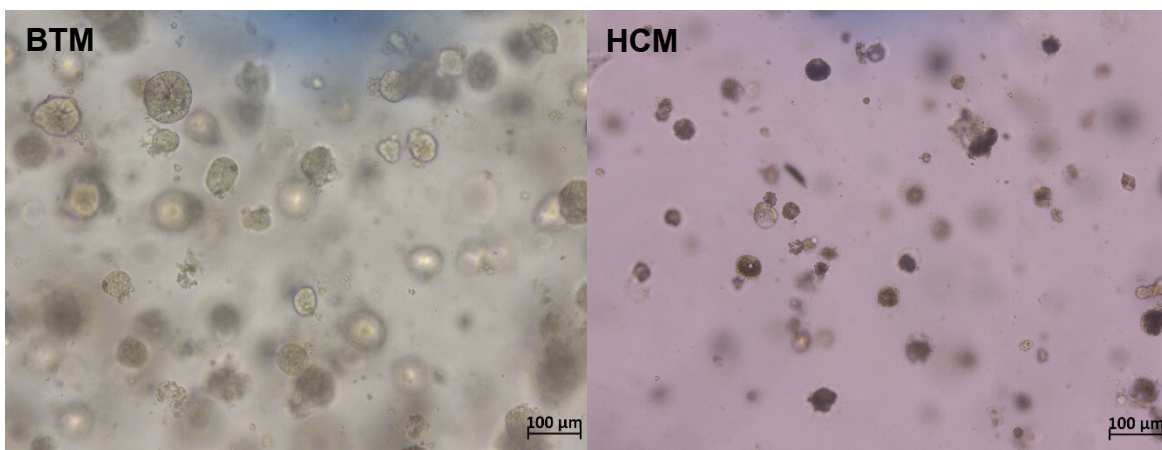
Abgebildet sind die aus der Vermessung der Organoiddurchmesser von BCO#154 P5 erhobenen Daten. Die Zellen von BCO#154 P5 wurden als 20µl-Domes auf 48-Well-Platten ausgesät. Ein Dome wurde in BTM und ein Dome in HCM nach Lee et al. kultiviert und über einen Zeitraum von insgesamt zehn Tagen beobachtet. Dokumentiert wurde das Wachstum der Organoide mittels Mikroskopbildern, anhand derer die Organoiddurchmesser vermessen wurden. Für jeden in die Auswertung einbezogenen Dome wurden die Daten von Tag 3 (d3) und Tag 10 (d10) gegeneinander aufgetragen. Anhand dieser Daten wurde das Wachstum der Organoide in den verschiedenen Medienansätzen (BTM bzw. HCM nach Lee et al.) miteinander verglichen.

Die Daten der Organoiddurchmesser aus BTM und HCM nach Lee et al. unterschieden sich an Tag 3 und Tag 10 kaum voneinander. In beiden Medienansätzen erreichten die Organoide an Tag 10 im Mittel Durchmesser zwischen 40 und 60µm.

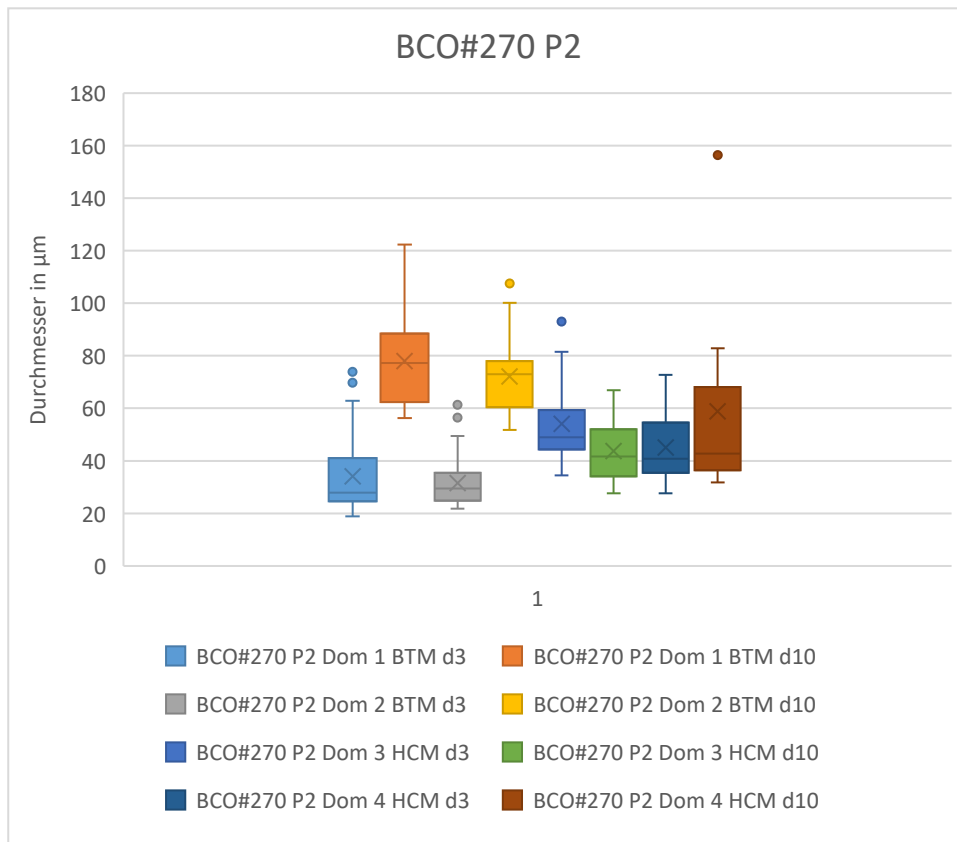
Für BCO#270 in der zweiten Passage wurden insgesamt 4 Domes auf einer 48-Well-Platte gesetzt. Zwei dieser Domes wurden in BTM, zwei in HCM nach Lee et al. kultiviert. Alle Domes wurden in die Auswertung miteingeschlossen.

Es zeigte sich mikroskopisch in beiden Medienansätzen ab dem dritten Tag ein Organoidwachstum, jedoch mit deutlichen morphologischen Unterschieden. Während die Organoide im BTM symmetrisch und glatt berandet wuchsen, waren die Organoide im HCM nach Lee et al. asymmetrisch und hatten teilweise zystische Anteile (siehe Abbildung 10). Diese Unterschiede blieben über den gesamten Beobachtungszeitraum von zehn Tagen bestehen.

Nicht nur morphologisch, sondern auch anhand der vermessenen Organoiddurchmesser zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den verwendeten Medienansätzen. Im Medienansatz BTM zeigte sich zwischen Tag 3 und Tag 10 eine eindeutige Zunahme der Durchmesser von  $<40\mu\text{m}$  auf  $>60\mu\text{m}$ . Im Medienansatz HCM nach Lee et al. waren an Tag 3 Durchmesser erfasst worden, welche über den Werten für Tag 3 in BTM lagen, jedoch kam es bis Tag 10 kaum zu einer Größenzunahme (vgl. Abbildung 11 „BCO#270 P2 Dom 4 HCM d3“ und „BCO#270 P2 Dom 4 HCM d10“) bzw. sogar zu abnehmenden Werten (vgl. Abbildung 11 „BCO#270 P2 Dom 3 HCM d3“ und „BCO#270 P2 Dom 3 HCM d3“).



**Abbildung 10:** BCO#270 P2 in BTM (links) und HCM nach Lee et al. (rechts) an Tag 10  
Die beiden Bilder zeigen die Organoide BCO#270 P2 aus den Ansätzen in BTM und HCM nach Lee et al. an Tag 10 der Auswertung. Im Medienansatz BTM zeigte sich ein symmetrisches Wachstum von glatt berandeten Organoiden. Die Organoide in HCM nach Lee et al. hingegen waren durch eine asymmetrische Morphologie charakterisiert mit teilweise zystischen Anteilen.



**Abbildung 11:** Auswertung Medienvergleich BCO#270 P2

Abgebildet sind die aus der Vermessung der Organoiddurchmesser von BCO#270 P2 erhobenen Daten. Die Zellen von BCO#270 P2 wurden als 20µl-Domes auf 48-Well-Platten ausgesät. Zwei Domes wurden in BTM und zwei Domes in HCM nach Lee et al. kultiviert und über einen Zeitraum von insgesamt zehn Tagen beobachtet. Dokumentiert wurde das Wachstum der Organoide mittels Mikroskopbildern, anhand derer die Organoiddurchmesser vermessen wurden. Für jeden in die Auswertung einbezogenen Dome wurden die Daten von Tag 3 (d3) und Tag 10 (d10) gegeneinander aufgetragen. Anhand dieser Daten wurde das Wachstum der Organoide in den verschiedenen Medienansätzen (BTM bzw. HCM nach Lee et al.) miteinander verglichen.

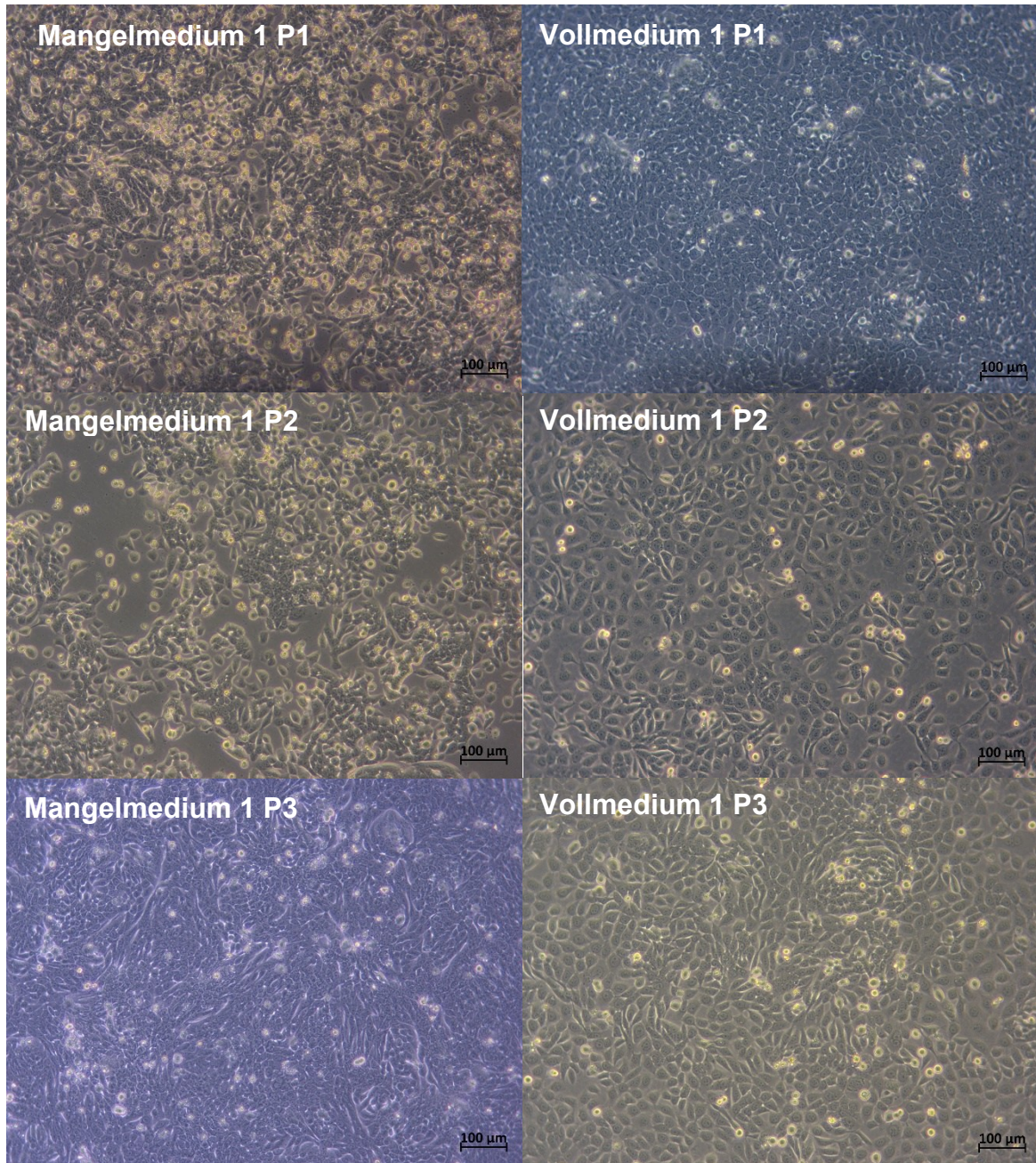
Nicht nur morphologisch, sondern auch anhand der vermessenen Organoiddurchmesser zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den verwendeten Medienansätzen, wobei eine Präferenz für BCO#270 P2 für das Medium BTM auszumachen war.

## **3.2 Proliferationsassays an Zell- und Tumorkulturen in zweidimensionalen Zellkulturen**

### **3.2.1 Bestimmung der Duplikationsraten**

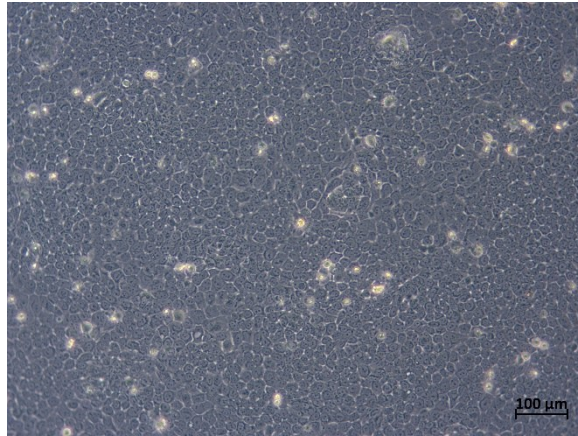
Die Bestimmung der Duplikationsraten erfolgte nach Bieback et al. anhand der ausgewählten Tumorkulturen UM-UC-15 und HT1197, sowie als Kontrolle an der Zelllinie HBLAKs. Im Rahmen dieses Versuchs wurde ebenfalls das allgemeine Wachstumsverhalten der Zellen beobachtet, da diese Zell- und Tumorkulturen für spätere Proliferationsassays in zwei- und dreidimensionalen Zellkulturen verwendet wurden.

Die Tumorkultur UM-UC-15 zeigte während der ersten Passage kaum zellmorphologischen Unterschiede zwischen den beiden Medienansätzen bzw. gegenüber einer Kultur im Standardmedium (siehe Abbildung 12 und 13), die Passagezeit jedoch schwankte zwischen fünf (Vollmedium 1) und sechs Tagen (Mangelmedium 1). Ab der zweiten Passage hingegen zeigten die Tumorzellen im Mangelmedium 1 einen kleineren Zelldurchmesser sowie einen deutlich granulierten Zellkern (siehe Abbildung 12). Die Zellen im Vollmedium 1 blieben weiterhin morphologisch unauffällig. Dieser Unterschied blieb sowohl über die zweite als auch dritte Passage bestehen, ebenso die deutlich langsamere Wachstumsgeschwindigkeit zwischen beiden Medienansätzen. Während die Tumorzellen im Vollmedium 1 über beide Passagen konstant nach vier Tagen gesplittet werden konnten, schwankte die Passagezeit der Zellen im Mangelmedium 1 zwischen sieben und acht Tagen. Bedingt durch den kleineren Zelldurchmesser im Ansatz mit dem Mangelmedium 1 konnten nach einer jeden Passage mehr Zellen als im Ansatz mit dem Vollmedium 1 gezählt werden.



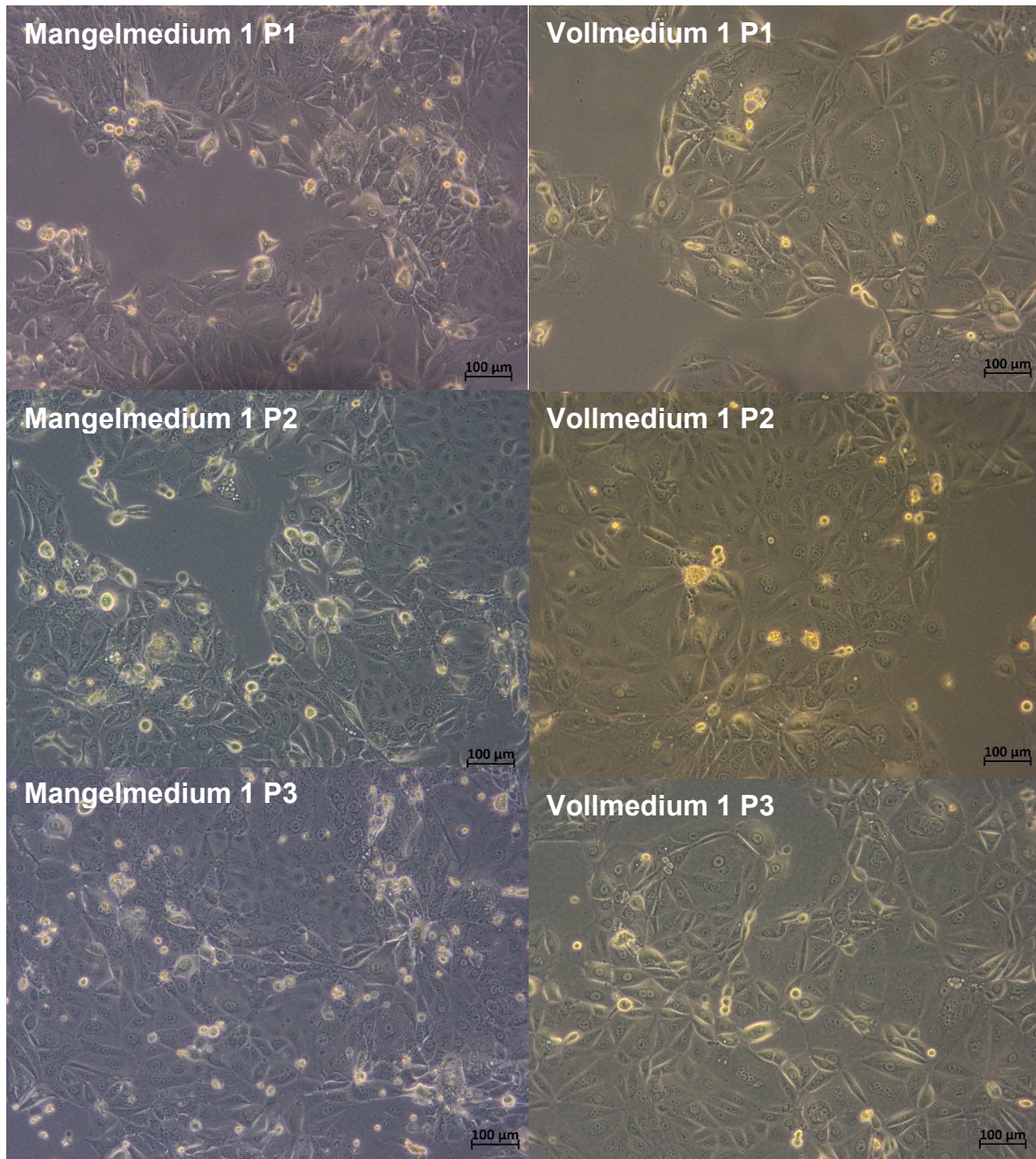
**Abbildung 12:** Bestimmung der Duplikationsrate der Tumorzelle UM-UC-15

Die Tumorzellen wurden im Mangelmedium 1 (links) und im Vollmedium 1 (rechts) über 3 konsekutive Passagen kultiviert. Die Passagen wurden von oben (Passage 1) nach unten (Passage 3) aufgetragen. Im Medienansatz „Vollmedium 1“ zeigten sich kaum zellmorphologische Unterschiede über die 3 Passagezeiträume gegenüber der Kultur in MEM (vergleiche Abbildung 13). Im Medienansatz „Mangelmedium 1“ hingegen wurde ab der zweiten Passage der kleinere Zelldurchmesser und der deutlich granulierte Zellkern gegenüber der Kultur in MEM auffällig.



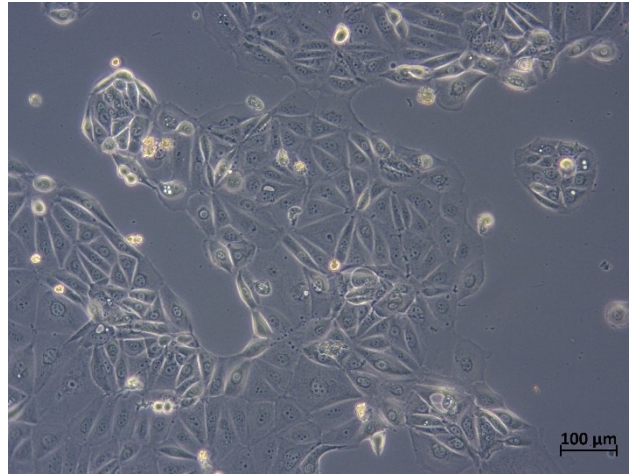
**Abbildung 13:** Kultivierung der Tumorklinie UM-UC-15 in MEM (Standardkulturmedium)

Ebenso wie bei der Tumorklinie UM-UC-15 zeigte die Tumorklinie HT1197 während der ersten Passage kaum zellmorphologische Unterschiede zwischen den beiden Medienansätzen beziehungsweise gegenüber einer Kultur im Standardkulturmedium (siehe Abbildung 14 und 15). Auch bei dieser Tumorklinie war die von Anfang an unterschiedliche Passagezeit auffällig. Zellen, die im Vollmedium 1 kultiviert wurden, wurden nach sieben Tagen gesplittet, wohingegen die Zellen im Mangelmedium 1 erst nach acht Tagen gesplittet werden konnten. Über die zweite und dritte Passage wurde der Unterschied in der Wachstumsgeschwindigkeit deutlicher. Die Tumorzellen im Vollmedium 1 waren jeweils nach fünf Tagen konfluent, die im Mangelmedium 1 erst nach acht bzw. zehn Tagen. Erst ab der dritten Passage fielen auch morphologische Unterschiede auf, auch wenn diese nicht so gravierend waren wie bei der Tumorklinie UM-UC-15. Die Zellen, welche im Mangelmedium 1 kultiviert wurden, erschienen kleiner und mit granuliertem Zellkern im Vergleich zu den Zellen im anderen Medienansatz (siehe Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Bestimmung der Duplikationsrate der Tumorzelle HT1197

Die Tumorzellen wurden im Mangelmedium 1 (links) und im Vollmedium 1 (rechts) über 3 konsekutive Passagen kultiviert. Die Passagen wurden von oben (Passage 1) nach unten (Passage 3) aufgetragen. Im Medienansatz „Vollmedium 1“ zeigten sich kaum zellmorphologische Unterschiede über die 3 Passagezeiträume gegenüber der Kultur in MEM (vergleiche Abbildung 15). Im Medienansatz „Mangelmedium 1“ hingegen wurde ab der dritten Passage der kleinere Zelldurchmesser und der leicht granulierte Zellkern gegenüber der Kultur in MEM auffällig.



**Abbildung 15:** Kultivierung der Tumorzelle HT1197 in MEM (Standardkulturmedium)

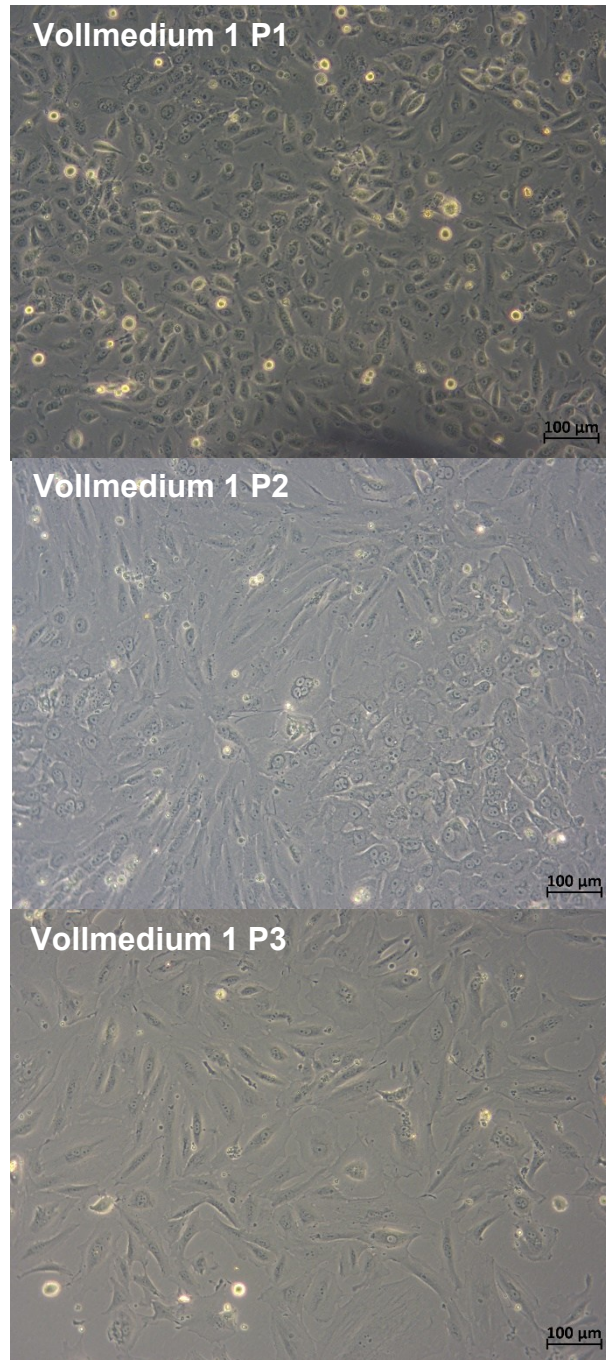
Die Zelllinie HBLAKs zeigte bereits ab der ersten Passage deutliche Unterschiede in der Zellmorphologie zwischen beiden Medienansätzen sowie gegenüber einer Kultur im Standardmedium (siehe Abbildung 16, 17 und 18). Während die Zellen, welche im Vollmedium 1 kultiviert wurden, einen größeren Zelldurchmesser sowie einen granulierten Zellkern aufwiesen, waren die Zellen im Mangelmedium 1 eher länglich mit Ausbildung Pseudopodien ähnlicher Zellausläufer. Ebenso wie bei den Tumorklinien UM-UC-15 und HT1197 zeigten auch bei der Zelllinie HBLAKs die im Vollmedium 1 kultivierten Zellen eine kürzere Passagezeit als die im Mangelmedium 1 kultivierten Zellen (Vollmedium 1 drei Tage, Mangelmedium 1 fünf Tage).

Die Zellen in Vollmedium 1 konnten über die zweite und dritte Passage weiterhin in Kultur gehalten werden. Die Passagezeit zeigte mit jeweils vier Tagen nur geringe Unterschiede gegenüber der ersten Passage, wohingegen die Morphologie sich weiter veränderte. Die Zellen wiesen größere Durchmesser auf und schienen ebenfalls Pseudopodien ähnliche Ausläufer auszubilden.

Die Zellen, welche im Mangelmedium 1 kultiviert wurden, wuchsen hingegen in der zweiten Passage nicht mehr adhärent an und starben ab. Ein möglicher Grund, weshalb die Zellen aus dem Medienansatz „Mangelmedium 1“ in der zweiten Passage nicht adhärent anwachsen, lag möglicherweise im Proteinmangel des verwendeten Mediums begründet. Proteine werden von verschiedenen Zellen benötigt, um zwischen Zelle und Wellboden stabile adhäsive Kontakte herzustellen.

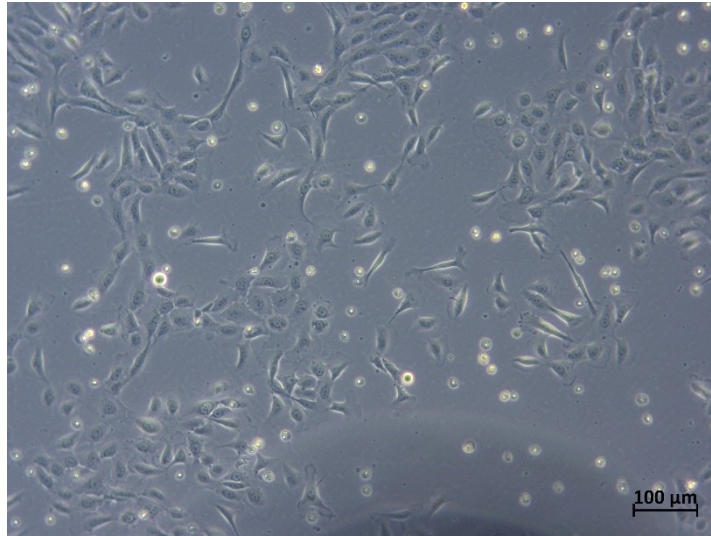
Um dies auszuschließen, wurde der obige Versuch für die Zellen im Mangelmedium 1 erneut in abgewandelter Form angesetzt. Bevor die Zellaussaat in die Wells der 6-Well-Platte erfolgte, wurden die Wells mit je 2ml Vollmedium 1 für eine Stunde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium abgesaugt und die Wells vorsichtig mit je 2ml PBS gewaschen. Erst nach diesen Schritten wurden die HBLAKs mit 1x10<sup>5</sup> Zellen pro Well ausgesät. Der Ansatz lag darin begründet, dass Proteine aus dem Vollmedium 1 auf den Wellboden innerhalb der Inkubationszeit absinken

würden und anschließend die Adhäsion der Zellen verbessern. Eine Kultivierung bei gleicher Morphologie und ähnlicher Passagezeit von sechs Tagen wie beim ersten Versuch war mit diesem Vorgehen ebenfalls über die erste Passage möglich. In der zweiten Passage wuchsen zwar vereinzelt Zellen adhärent an, jedoch waren sie morphologisch weiter auffällig. Da nach einem Beobachtungszeitraum von mehr als zehn Tagen die Zellen immer noch nicht gesplittet werden konnten und viele adhärente Zellen wieder abstarben, wurde der Versuch abgebrochen. Aus diesem Grund konnte lediglich für die Zellen im Vollmedium 1 eine mittlere Duplikationsrate bestimmt werden (siehe Abbildung 19).



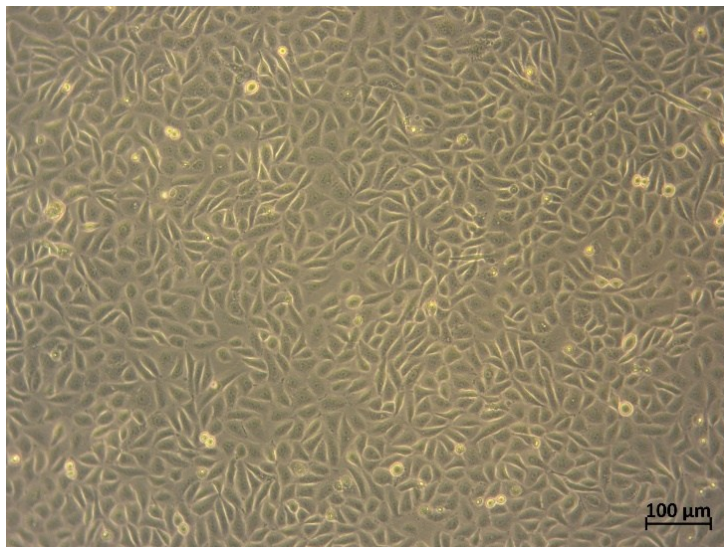
**Abbildung 16:** Bestimmung der Duplikationsrate der Zelllinie HBLAKs

*Die Zellen wurden im Vollmedium 1 über 3 konsekutive Passagen kultiviert. Die Passagen wurden von oben (Passage 1) nach unten (Passage 3) aufgetragen. Auffällig ist die sich stark ändernde Zellmorphologie: großvolumige Zellen mit Pseudopodien ähnlichen Ausläufern und granulierten Zellkernen (vergleiche Abbildung 18).*



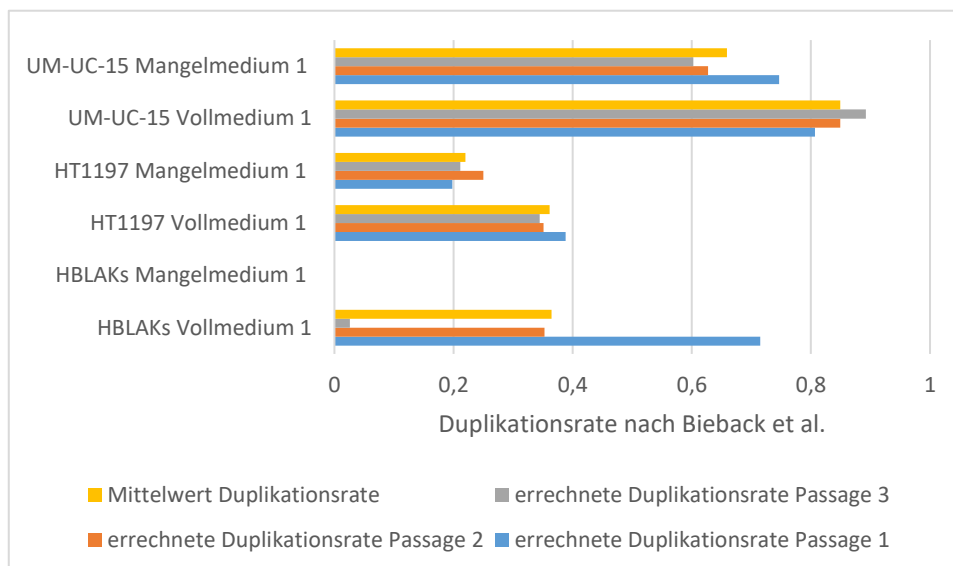
**Abbildung 17:** Bestimmung der Duplikationsrate der Zelllinie HBLAKs (Tag 2 der ersten Passage)

Die Zellen wurden im Mangelmedium 1 kultiviert, was nur über eine Passage hinweg möglich war. Auffällig war vor allem die bereits zu Beginn bestehende Zellmorphologie mit Pseudopodien ähnlichen Zellausläufern (vergleiche Abbildung 18).



**Abbildung 18:** Kultivierung der Zelllinie HBLAKs in Cnt-P (Standardkulturmedium)

Die Auswertung der erhobenen Daten zeigte, dass die mittleren Duplikationsraten der Tumorklinien UM-UC-15 und HT1197 im Vollmedium 1 jeweils über den Duplikationsraten im Mangelmedium 1 lagen. Die errechneten Duplikationsraten der 1.-3.Passage schwankten innerhalb der Tumorklinien bedingt durch die beschriebenen morphologischen Veränderungen. Für die Zelllinie HBLAKs konnte nur im Vollmedium 1 eine mittlere Duplikationsrate ermittelt werden. Die Ansätze im Mangelmedium 1 konnten wie bereits beschrieben nur über die 1.Passage in Kultur gehalten werden, was eine Bestimmung der mittleren Duplikationsrate nicht möglich machte.



**Abbildung 19:** Auswertung Bestimmung der Duplikationsraten

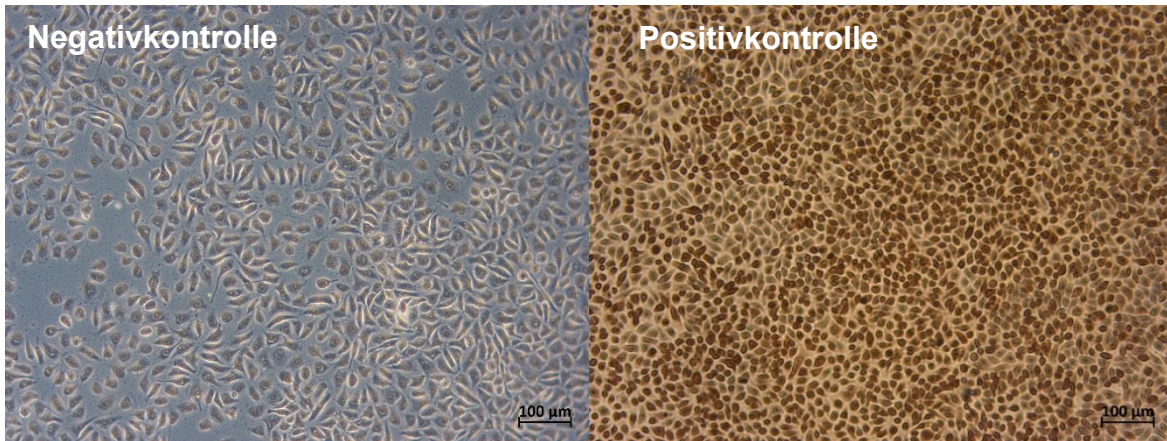
Abgebildet sind die nach Bieback et al. errechneten Duplikationsraten sowie die mittlere Duplikationsrate für die Tumorklinien UM-UC-15 und HT1197 und die Zelllinie HBLAKs. Die Zell- beziehungsweise Tumorklinien wurden mit je  $1 \times 10^5$  Zellen pro Well in 6-Well-Platten ausgesät und in zwei verschiedenen Medienansätzen (Mangelmedium 1 und Vollmedium 1) kultiviert. Bei einer Konfluenz von 80-90% innerhalb der 6-Well-Platten wurde die Zellen abgelöst, gezählt und erneut mit einer Zellzahl von  $1 \times 10^5$  angesetzt. Dieses Vorgehen erfolgte für jede Zell- beziehungsweise Tumorklinie und jeden Medienansatz über drei konsekutive Passagen.

Wie zu erwarten war, lagen die mittleren Duplikationsraten der Tumorklinien UM-UC-15 und HT1197 im Vollmedium 1 jeweils über den Duplikationsraten im Mangelmedium 1. Für die Zelllinie HBLAKs konnte nur im Vollmedium 1 eine mittlere Duplikationsrate ermittelt werden.

### **3.2.2 AE1/AE3-Färbung zum Nachweis des epithelialen Phänotyps an HBLAKs**

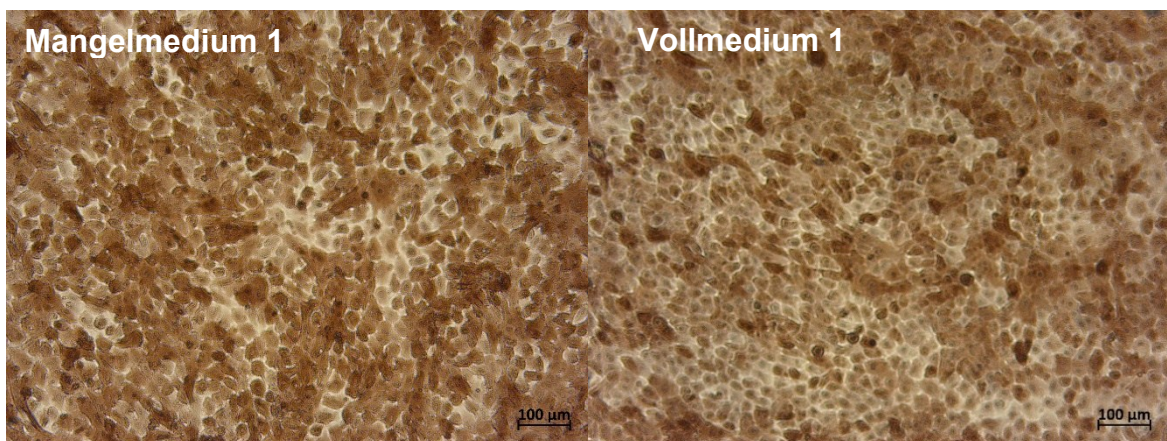
Aufgrund der auffälligen Zellmorphologie der Zelllinie HBLAKs im Rahmen der Bestimmung der Duplikationsrate (siehe „3.2.1 Bestimmung der Duplikationsraten“) wurde eine AE1/AE3-Färbung der Zellen durchgeführt. Diese Färbung sollte dem Nachweis des epithelialen Phänotyps der HBLAKs in den unterschiedlichen Kulturmedienansätzen dienen.

Aus Abbildung 20 kann entnommen werden, dass sowohl die Negativ- als auch die Positivkontrolle als Referenz zur Bewertung verwendet werden können. Die Negativkontrolle zeigt eine violette Färbung der Zellkerne. Die Positivkontrolle zeigt eine Braunfärbung von 100% der Zellen, womit die Färbung als erfolgreich gewertet wird. Die Wells, welche vor der Färbung in Mangel- und Vollmedium 1 kultiviert wurden, zeigen ebenfalls eine Braunfärbung der Zellen (siehe Abbildung 21). Jedoch liegt in beiden Ansätzen die Braunfärbung <95%. Somit ist die Färbung als z.T. negativ zu werten. Es ist somit davon auszugehen, dass in einem falschen Medium kultivierte HBLAKs ihren epithelialen Phänotyp teilweise verlieren.



**Abbildung 20:** Negativ- und Positivkontrolle der AE1/AE3-Färbung an der Zelllinie HBLAKs

Sowohl die Zellen für die Negativ- als auch Positivkontrolle wurden vor der Färbung auf Chamber Slides in CnT-Prime (Standardkulturmedium) kultiviert. Die rechts abgebildete Positivkontrolle zeigt eine deutliche Braunfärbung von 100% der Zellen, womit die Färbung als positiv zu werten ist.



**Abbildung 21:** AE1/AE3-Färbung an der Zelllinie HBLAKs

Die Zellen wurden vor der Färbung auf Chamber Slides in Mangelmedium 1 (links) und Vollmedium 1 (rechts) kultiviert. In beiden Ansätzen ist deutlich zu erkennen, dass eine Braunfärbung der Zellen >95% nicht erreicht wurde und die Färbung daher als z.T. negativ zu werten ist. Daraus kann geschlossen werden, dass die Zelllinie HBLAKs durch Kultivierung in verschiedenen Kulturmedien ihren epithelialen Phänotyp teilweise verliert.

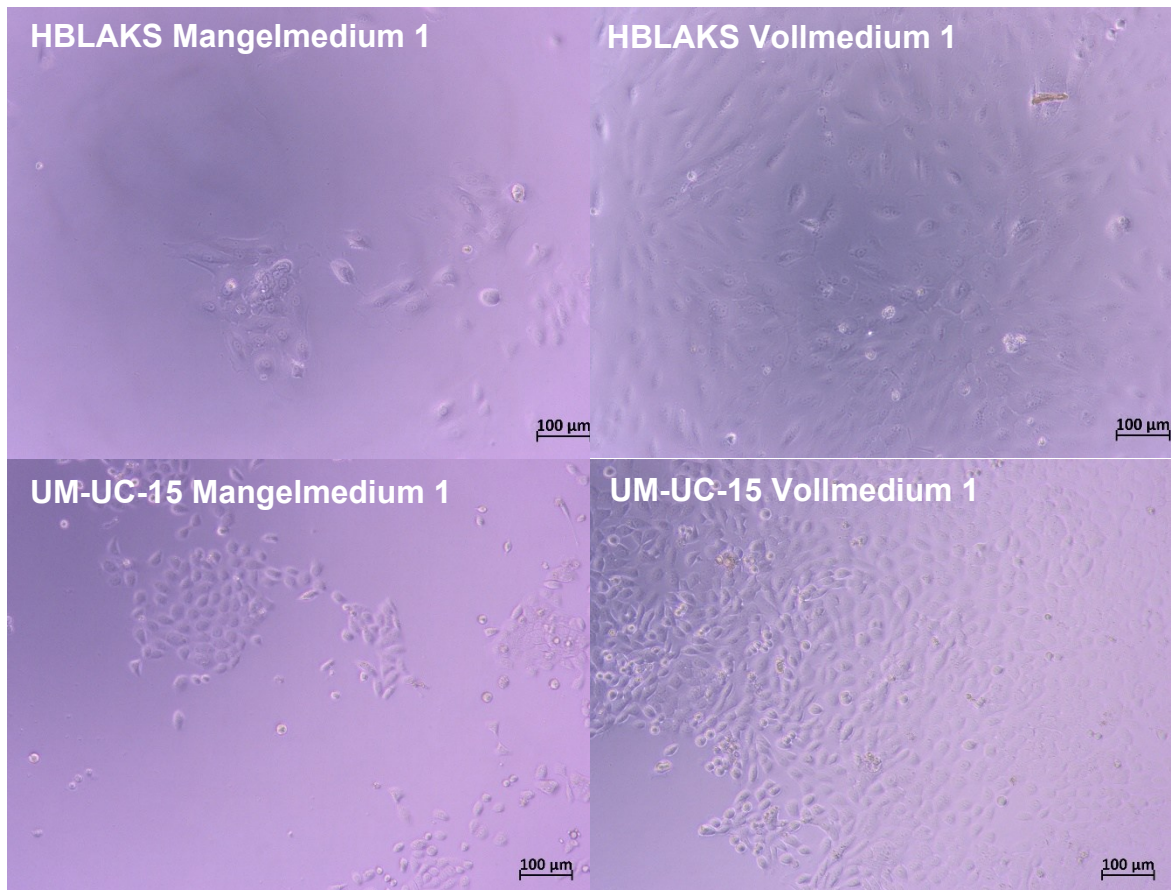
### **3.2.3 WST-1-Proliferation-Assay**

#### 3.2.3.1 Bestimmung der Zellzahlen

Die Bestimmung der Zellzahl bei Aussaat der Zellen diente als Vorversuch für nachfolgende Medienassays. In den Screen wurden die Tumorklinien UM-UC-15 und HT1197 sowie die Zelllinie HBLAKs miteinbezogen.

Für die nachfolgenden Proliferationsassays wurde bei der Auswertung der Daten berücksichtigt, dass zum jeweiligen Zeitpunkt des Screenings die OD-Mittelwerte der Absorptionsmessung und damit die Zellzahl zwischen beiden Medienansätzen einen deutlichen Unterschied im Proliferationsverhalten aufweisen sollte. Das Medium „Mangelmedium 1“ sollte für nachfolgende Versuche als Negativkontrolle fungieren, während das Medium „Vollmedium 1“ als Positivkontrolle verwendet werden sollte (siehe „2.5 Kulturmedien“).

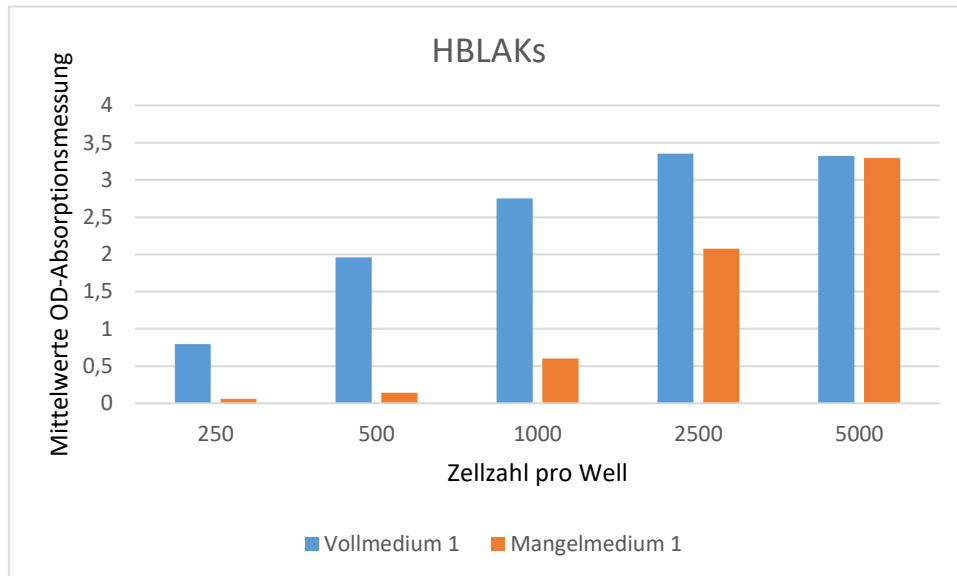
Sowohl für die Zelllinie HBLAKs als auch die Tumorklinie UM-UC-15 wurden aufgrund der Daten und der mikroskopischen Bilder als Screeningzeitpunkt sieben Tage und eine Zellzahl bei Aussaat von 1.000 Zellen festgelegt (siehe Abbildung 22, 23 und 24). Die Tumorklinie HT1197 wurde von weiteren Screens ausgeschlossen, da sie bei den Messungen am vierten Tag widersprüchliche Ergebnisse lieferte, nach welchen das Mangelmedium 1 einen größeren Benefit auf das Zellwachstum hätte als das Vollmedium 1 (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 22:** Bestimmung der Zellzahl mittels WST-1-Assay

Für die Bestimmung der Zellzahl bei Aussaat für nachfolgende Proliferationsassays wurden die Zelllinie HBLAKs und die Tumorzelllinie UM-UC-15 in unterschiedlichen Zellzahlen pro Well (250, 500, 1000, 2500, 5000) auf 96-Well-Platten ausgesät und in zwei verschiedenen Medienansätzen (Mangelmedium 1 und Vollmedium 1) über vier bzw. sieben Tage kultiviert. Die verwendeten Medienansätze dienen für nachfolgende Versuche als Negativ- (Mangelmedium 1) und als Positivkontrolle (Vollmedium 1). Abgebildet sind die Zelllinie HBLAKs (erste Zeile) und die Tumorzelllinie UM-UC-15 (zweite Zeile) jeweils an Tag 7. Links sind die Zellen abgebildet, welche im Mangelmedium 1 kultiviert wurden. Rechts sind die Zellen abgebildet, welche im Vollmedium 1 kultiviert wurden.

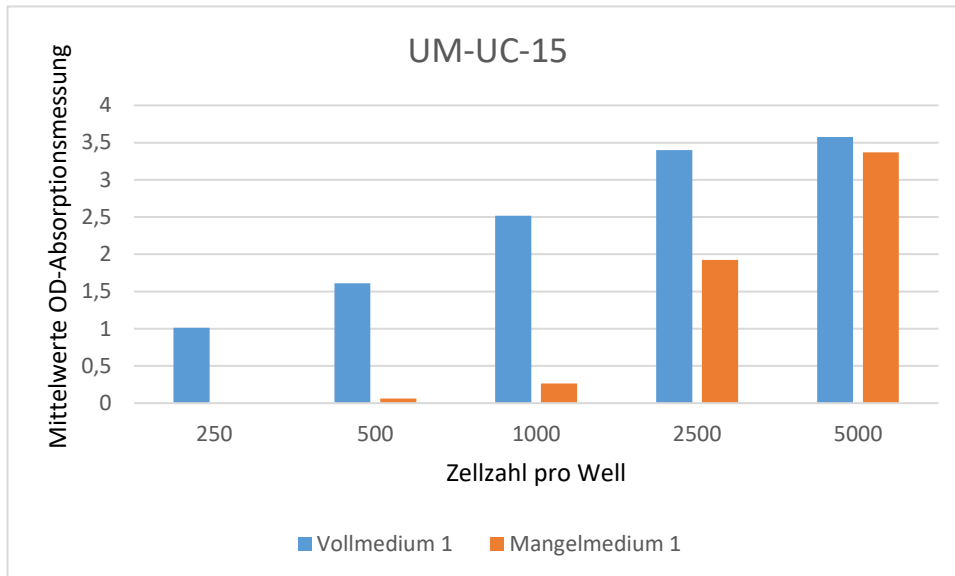
An Tag 7 zeigte sich bei einer Aussaat von 1.000 Zellen pro Well sowohl mikroskopisch als auch anhand der Daten aus dem WST-1-Assay (siehe Abbildung 23 und 24) der größte Unterschied im Zellwachstum zwischen beiden Medienansätzen.



**Abbildung 23:** Auswertung Bestimmung der Zellzahl mittels WST-1-Assay an der Zelllinie HBLAKs an Tag 7

Für die Bestimmung der Zellzahl bei Aussaat für nachfolgende Proliferationsassays wurde die Zelllinie HBLAKs in unterschiedlichen Zellzahlen pro Well (250, 500, 1000, 2500, 5000) auf 96-Well-Platten ausgesät und in zwei verschiedenen Medienansätzen (Mangelmedium 1 und Vollmedium 1) über vier bzw. sieben Tage kultiviert. Die verwendeten Medienansätze dienten für nachfolgende Versuche als Negativ- (Mangelmedium 1) und als Positivkontrolle (Vollmedium 1).

Abgebildet sind die errechneten Mittelwerte der OD-Absorptionsmessung von Tag 7. Die errechneten Mittelwerte wurden zwischen den zwei Medienansätzen Mangelmedium 1 und Vollmedium 1 mittels Zweistichproben t-Test (unterschiedlicher Varianzen) unter Annahme einer hypothetischen Differenz der Mittelwerte von 0 und Alpha  $\alpha < 0,05$  auf Signifikanz überprüft. Die Werte des Vollmediums 1 zeigten dabei ein signifikant besseres Wachstum als die Werte des Mangelmediums 1 (Cave: Ausnahme Zellzahl 5000). Aus der Gesamtschau der Daten, den mikroskopischen Bildern und dem Vergleich mit der Tumorzelllinie UM-UC-15 (siehe Abbildung 24) wurde für nachfolgende Proliferationsassays eine Zellzahl von 1000 bei Aussaat und ein Beobachtungszeitraum von 7 Tagen festgelegt.



**Abbildung 24:** Auswertung Bestimmung der Zellzahl mittels WST-1-Assay an der Tumorklinie UM-UC-15

Für die Bestimmung der Zellzahl bei Aussaat für nachfolgende Proliferationsassays wurde die Tumorklinie UM-UC-15 in unterschiedlichen Zellzahlen pro Well (250, 500, 1000, 2500, 5000) auf 96-Well-Platten ausgesät und in zwei verschiedenen Medienansätzen (Mangelmedium 1 und Vollmedium 1) über vier bzw. sieben Tage kultiviert. Die verwendeten Medienansätze dienen für nachfolgende Versuche als Negativ- (Mangelmedium 1) und als Positivkontrolle (Vollmedium 1).

Abgebildet sind die errechneten Mittelwerte der OD-Absorptionsmessung von Tag 7. Die errechneten Mittelwerte wurden zwischen den zwei Medienansätzen Mangelmedium 1 und Vollmedium 1 mittels Zweistichproben t-Test (unterschiedlicher Varianzen) unter Annahme einer hypothetischen Differenz der Mittelwerte von 0 und Alpha  $\alpha < 0,05$  auf Signifikanz überprüft. Die Werte des Vollmediums 1 zeigten dabei ein signifikant besseres Wachstum als die Werte des Mangelmediums 1. Aus der Gesamtschau der Daten, den mikroskopischen Bildern und dem Vergleich mit der Zelllinie HBLAKs (siehe Abbildung 23) wurde für nachfolgende Proliferationsassays eine Zellzahl von 1000 bei Aussaat und ein Beobachtungszeitraum von 7 Tagen festgelegt.

### 3.2.3.2 Proliferationsassay mit Wachstumsfaktoren

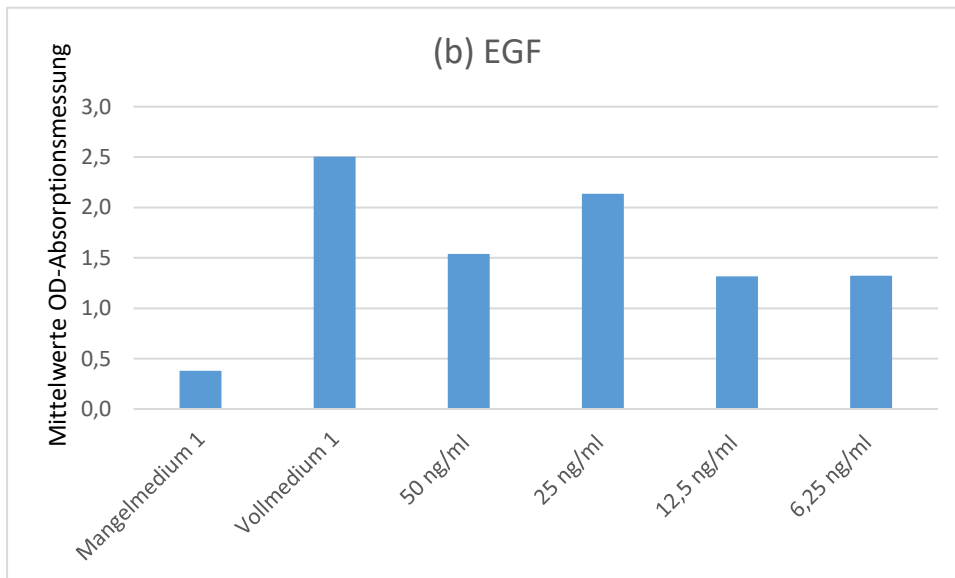
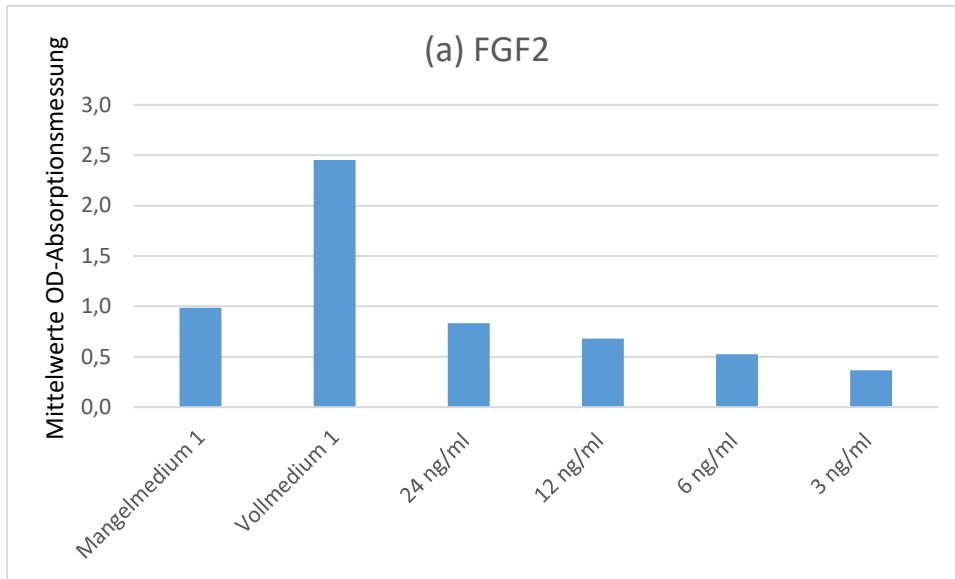
Nach der Bestimmung der optimalen Zellzahl für die Zellaussaat und Festlegung der Wachstumsdauer (siehe „3.2.3.1 Bestimmung der Zellzahlen“) erfolgte die Durchführung der Proliferationsassays, in welchen Wachstumsfaktoren in unterschiedlichen Konzentrationen getestet wurden (siehe Tabelle 16). In den Screen wurden die Tumortalie UM-UC-15 und die Zelllinie HBLAKs miteinbezogen.

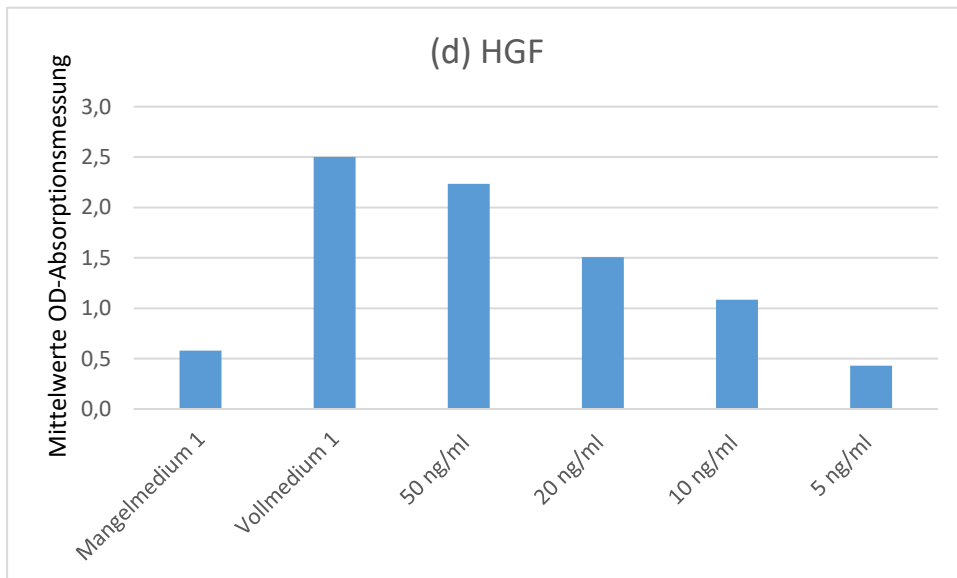
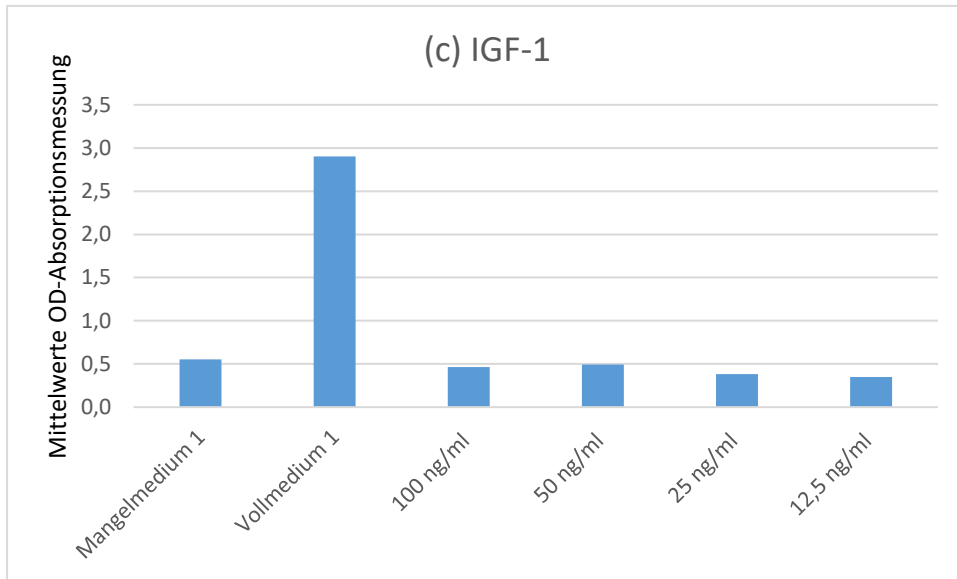
*Tabelle 16: Auflistung der verwendeten Wachstumsfaktoren und ihrer Konzentrationen*

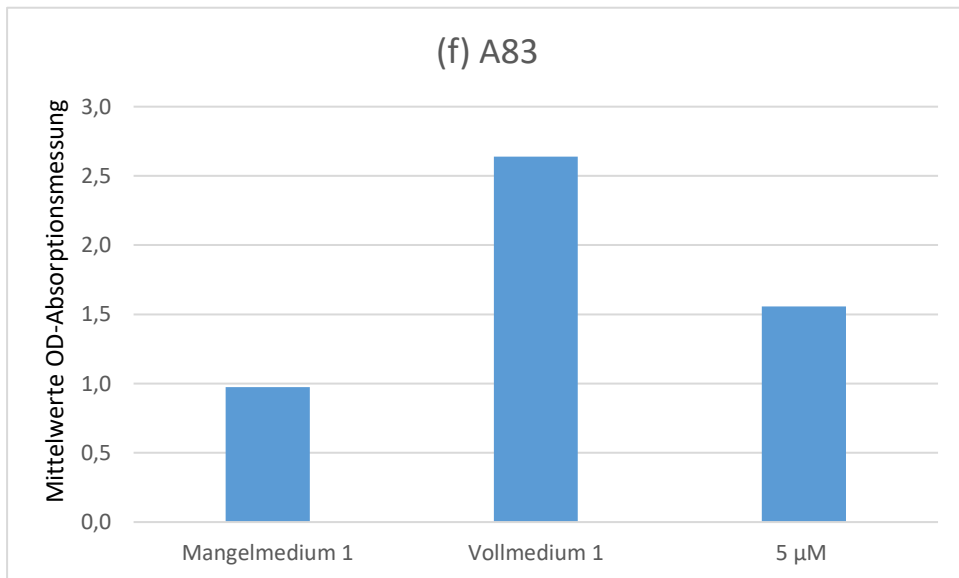
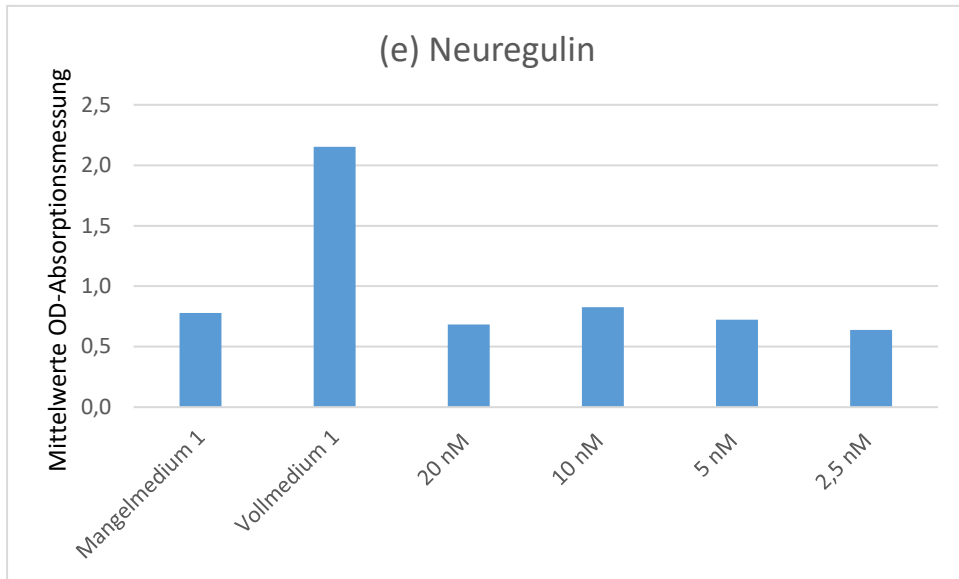
<b>Wachstumsfaktor</b>	<b>Konz. 4</b>	<b>Konz. 3</b>	<b>Konz. 2</b>	<b>Konz. 1</b>
<b>EGF</b> (in ng/ml)	6,25	12,5	25	50
<b>FGF2</b> (in ng/ml)	3	6	12	24
<b>HGF</b> (in ng/ml)	5	10	20	50
<b>IGF 1</b> (in ng/ml)	12,5	25	50	100
<b>Neuregulin</b> (in nM)	2	5	10	20
<b>Noggin</b> (in ng/ml)	25	50	100	200
<b>R-Spondin 1</b> (in ng/ml)	62,5	125	250	500
<b>A83-01</b> (in $\mu$ M)	/	/	/	5
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b> (in ng/ml)	1	3	10	30

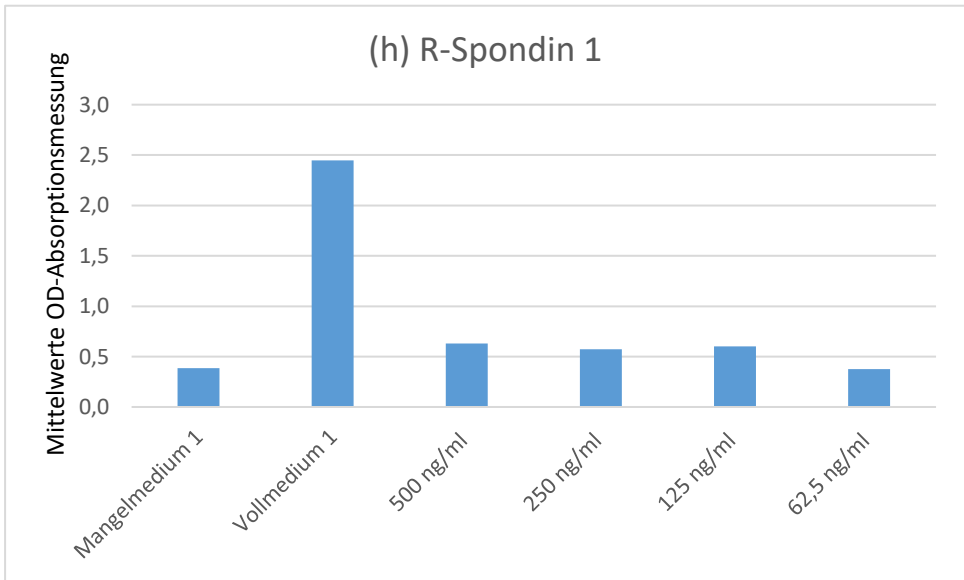
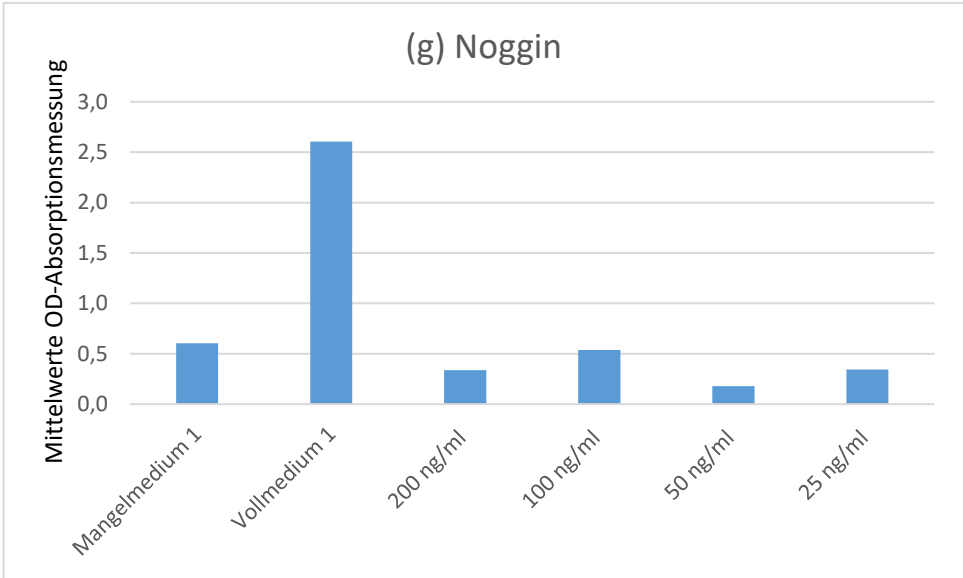
Bei der Zelllinie HBLAKs (siehe Abbildung 25) zeigten die Wachstumsfaktoren EGF in der Konzentration 25ng/ml und HGF in der Konzentration 50ng/ml eine deutliche Steigerung des Zellwachstums verglichen mit dem Wachstum im Mangelmedium 1. Beide Wachstumsfaktoren zeigten in den getesteten Konzentrationen ein signifikant besseres Wachstum als das Mangelmedium 1 (Ausnahme HGF in der Konzentration von 5ng/ml), jedoch kein (signifikant) besseres Wachstum als das Vollmedium 1.

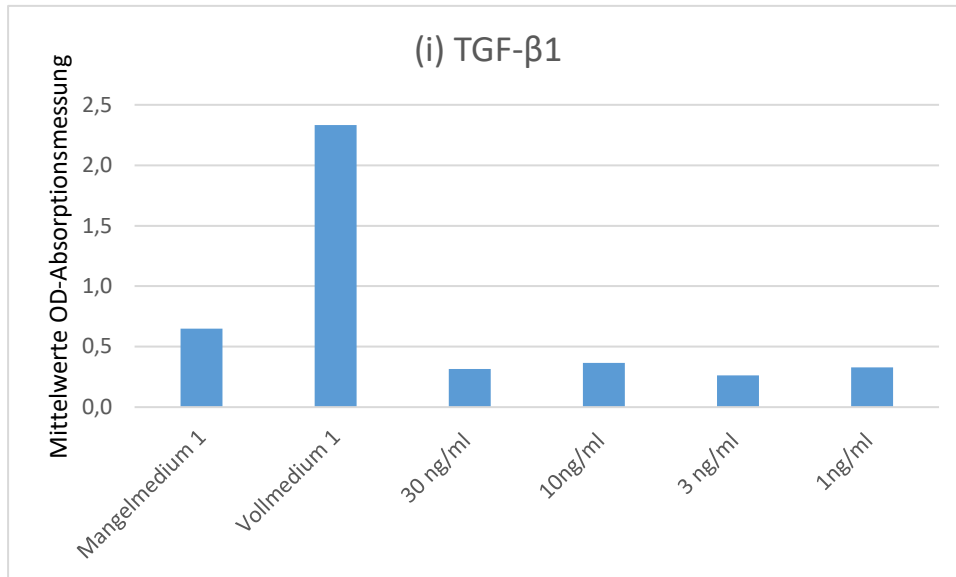
Der Faktor R-Spondin 1 zeigte bis auf in der Konzentration 62,5ng/ml ein signifikant besseres Wachstum als das Mangelmedium 1, aber ebenfalls kein (signifikant) besseres Wachstum als das Vollmedium 1. Der Faktor Neuregulin zeigte nur in der Konzentration 10nM ein nicht signifikant besseres Wachstum gegenüber dem Mangelmedium 1. Für die Faktoren FGF2, Noggin und TGF- $\beta$ 1 zeigte jeweils das Mangelmedium 1 ein signifikant besseres Wachstum gegenüber den getesteten Konzentrationen (Ausnahme Noggin in der Konzentration 100ng/ml und FGF2 in der Konzentration 24ng/ml). Für den Faktor IGF-1 zeigte das Mangelmedium 1 ebenfalls ein besseres Wachstum gegenüber den getesteten Konzentrationen, wobei ein signifikant besseres Wachstum nur gegenüber der Konzentration 12,5ng/ml nachgewiesen werden konnte. Der Faktor A83-01, welcher nur in der Konzentration 5 $\mu$ M getestet wurde, zeigte zwar ein signifikant besseres Wachstum als das Mangelmedium 1, jedoch kein (signifikant) besseres Wachstum als das Vollmedium 1.









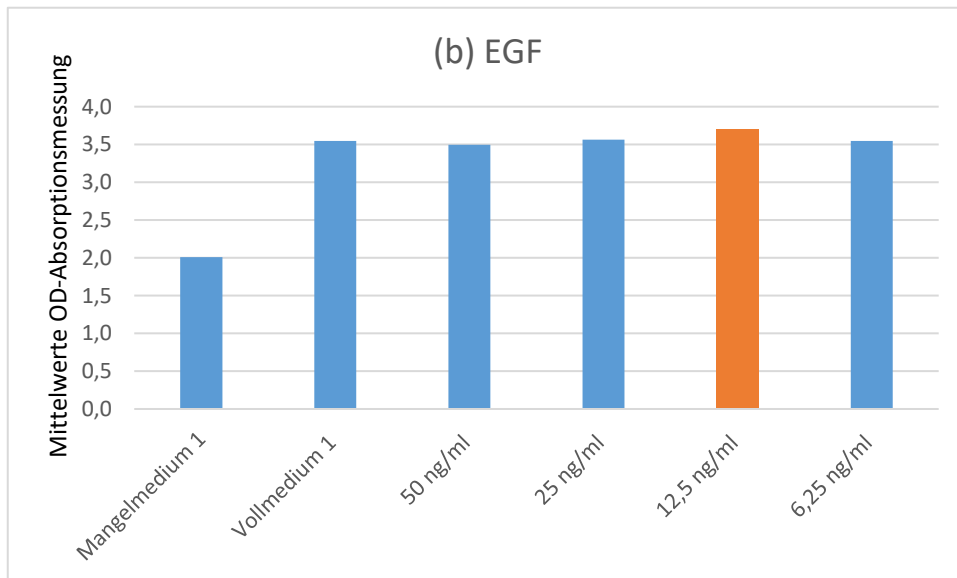
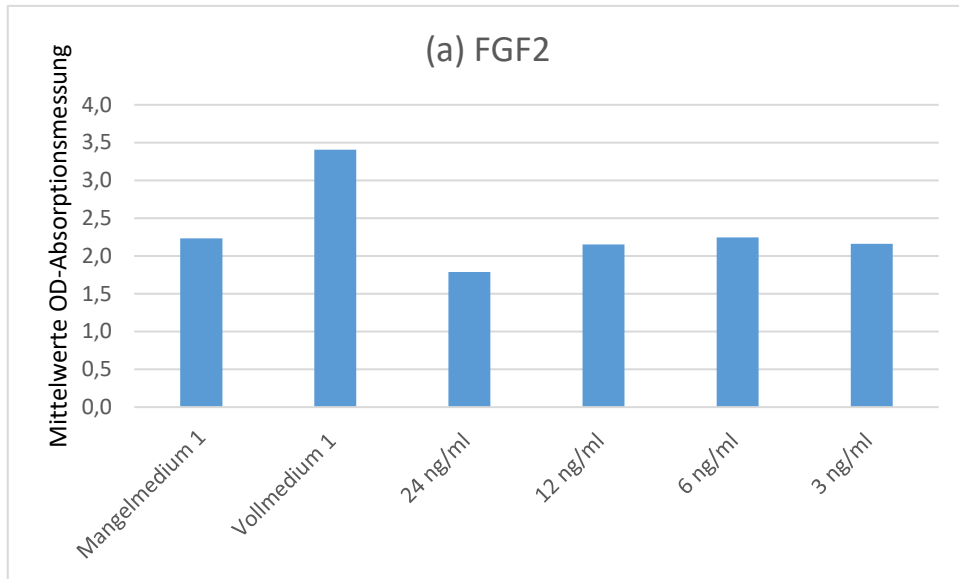


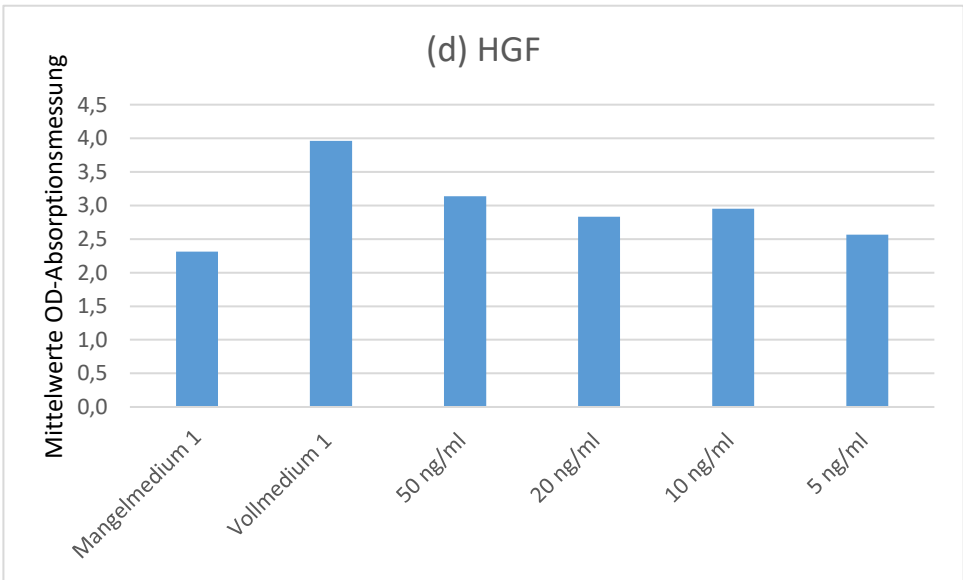
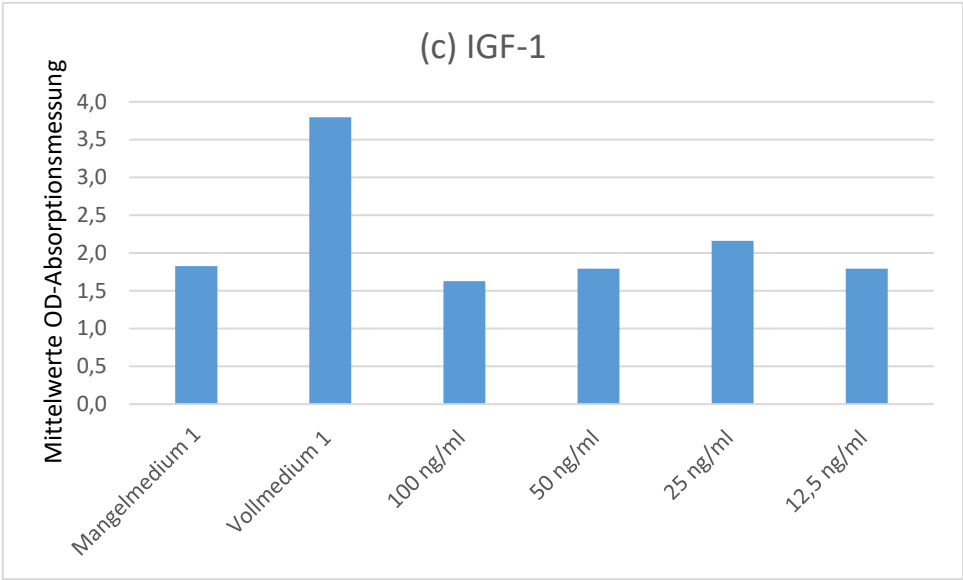
**Abbildung 25 (a)-(i):** Auswertung Proliferationsassay mit Wachstumsfaktoren mittels WST-1-Assay für die Zelllinie HBLAKs

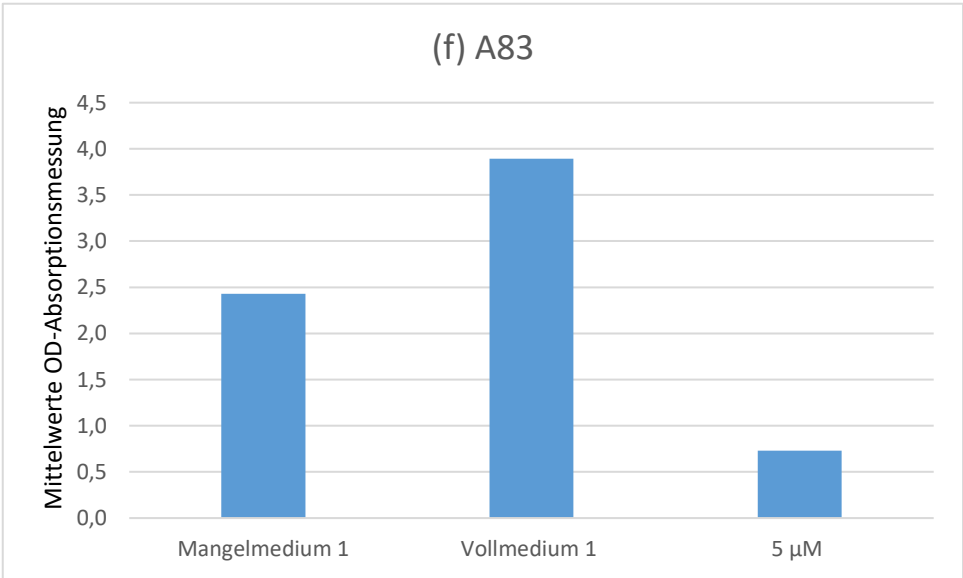
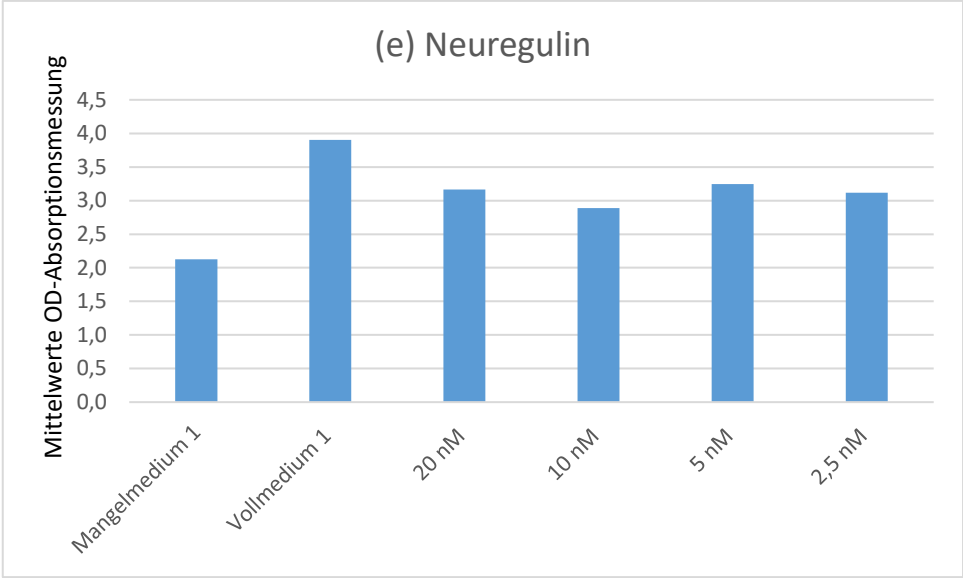
Die Zelllinie HBLAKs wurde mit je 1000 Zellen pro Well auf 96-Well-Platten (flat bottom) als zweidimensionale Zellkultur ausgesät und mit unterschiedlichen Nährmedienansätzen verschiedener Wachstumsfaktoren mit jeweils  $n=5$  kultiviert. Jeder Wachstumsfaktor wurde dabei in vier Konzentrationen getestet. Die einzige Ausnahme stellte der Faktor A83-01 dar, welcher lediglich in der Konzentration  $5\mu\text{M}$  gescreent wurde. Als Negativkontrolle wurde Mangelmedium 1 und als Positivkontrolle Vollmedium 1 vorausgesetzt. Nach 7 Tagen erfolgte mittels Absorptionsmessung im WST-1-Assay die Auswertung der Platten.

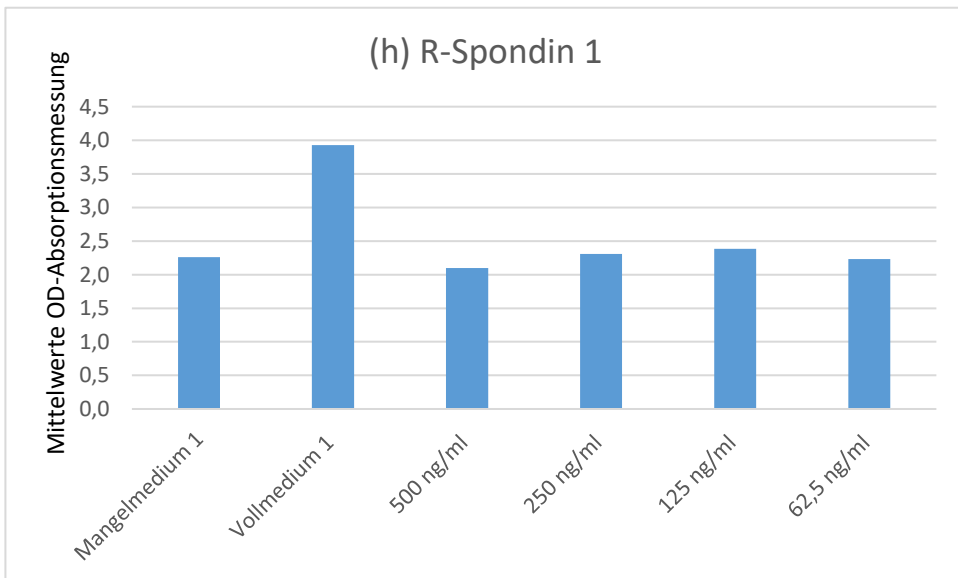
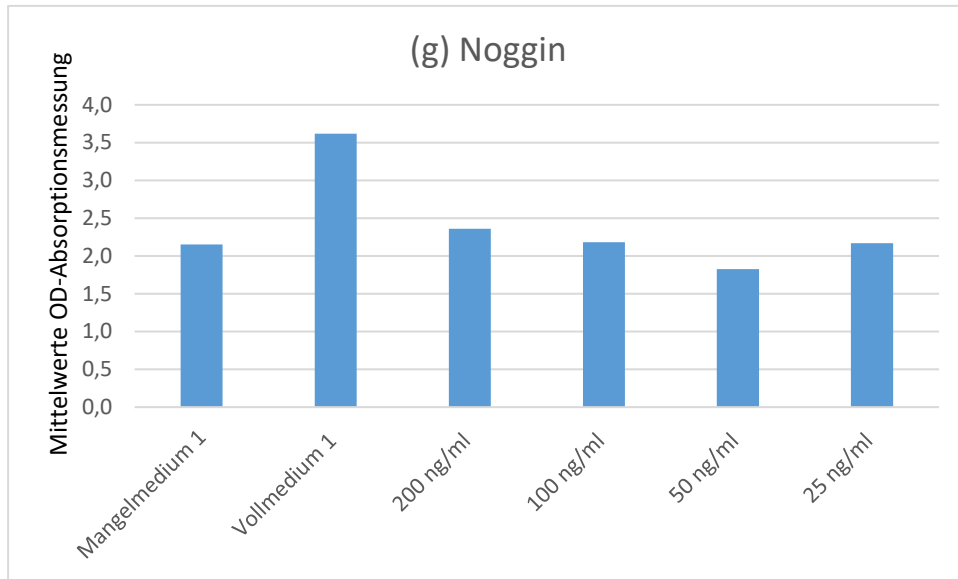
Die Diagramme (a)-(i) zeigen die errechneten OD-Mittelwerte der Absorptionsmessung der unterschiedlichen Wachstumsfaktoren in den verschiedenen Konzentrationen gegeneinander aufgetragen. Die Ordinate zeigt dabei die Zahlenwerte der errechneten OD-Mittelwerte. Die errechneten Mittelwerte wurden für jeden Wachstumsfaktor in seinen verschiedenen Konzentrationen gegen die zwei Medienansätzen Mangelmedium 1 und Vollmedium 1 mittels Zweistichproben  $t$ -Test (unterschiedlicher Varianzen) unter Annahme einer hypothetischen Differenz der Mittelwerte von 0 und Alpha  $\alpha < 0,05$  auf Signifikanz überprüft. Jedoch konnte bei keiner der getesteten Konzentrationen ein (signifikant) besseres Wachstum als im Vollmedium 1 nachgewiesen werden.

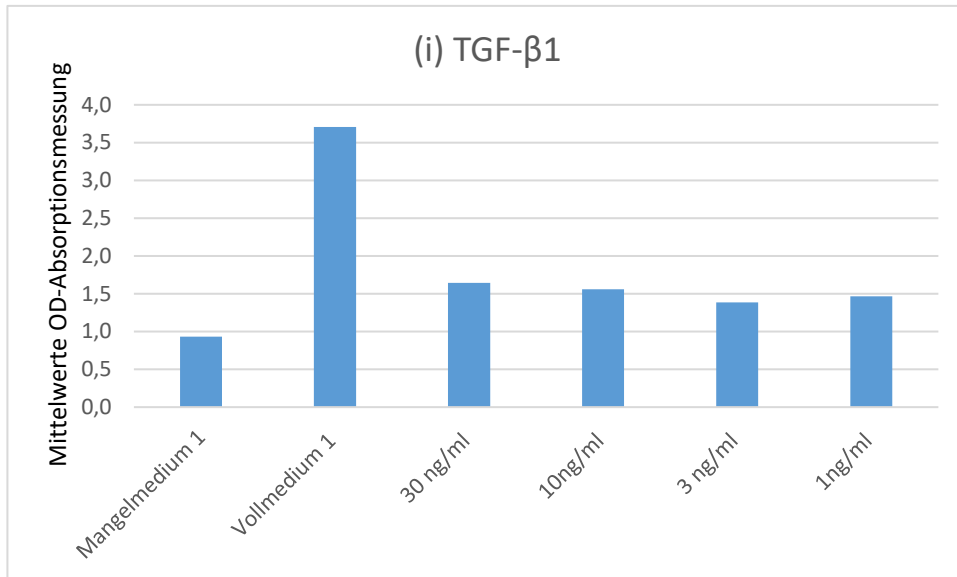
Bei der Tumorlinie UM-UC-15 (siehe Abbildung 26) zeigte der Wachstumsfaktor EGF in allen Konzentrationen ein signifikant besseres Wachstum als im Mangelmedium 1. Die Konzentration von 12,5ng/ml zeigte zudem ein signifikant besseres Wachstum gegenüber dem Vollmedium 1. Die Faktoren HGF, Neuregulin und TGF- $\beta$ 1 wiesen in allen Konzentrationen nur ein signifikant besseres Wachstum als im Mangelmedium 1 auf, jedoch kein (signifikant) besseres Wachstum als im Vollmedium 1. Unter Einfluss des Wachstumsfaktors Noggin war kein signifikant besseres Wachstum gegenüber dem Mangelmedium 1 zu verzeichnen. Die Faktoren FGF2 und R-Spondin 1 zeigten in allen getesteten Konzentrationen im Vergleich zum Mangelmedium 1 eine Verminderung der Zellproliferation. Der Faktor IGF-1 hingegen zeigte nur in den Konzentrationen 25ng/ml ein signifikant besseres und in der Konzentration 12,5ng/ml ein nicht signifikant besseres Wachstum gegenüber dem Mangelmedium 1. Auffällig war besonders der Faktor A83-01. Dieser kohibierte das Zellwachstum der Tumorlinie UM-UC-15 drastisch. Dies zeigte sich, da das Mangelmedium 1 signifikant besser war als die getestete Konzentration.











**Abbildung 26 (a)-(i):** Auswertung Proliferationsassay mit Wachstumsfaktoren mittels WST-1-Assay für die Tumorlinie UM-UC-15

Die Tumorlinie UM-UC-15 wurde mit je 1000 Zellen pro Well auf 96-Well-Platten (flat bottom) als zweidimensionale Zellkultur ausgesät und mit unterschiedlichen Nährmedienansätzen verschiedener Wachstumsfaktoren mit jeweils  $n=5$  kultiviert. Jeder Wachstumsfaktor wurde dabei in vier Konzentrationen getestet. Die einzige Ausnahme stellte der Faktor A83-01 dar, welcher lediglich in der Konzentration  $5\mu\text{M}$  gescreent wurde. Als Negativkontrolle wurde Mangelmedium 1 und als Positivkontrolle Vollmedium 1 vorausgesetzt. Nach 7 Tagen erfolgte mittels Absorptionsmessung im WST-1-Assay die Auswertung der Platten.

Die Diagramme (a)-(i) zeigen die errechneten OD-Mittelwerte der Absorptionsmessung der unterschiedlichen Wachstumsfaktoren in den verschiedenen Konzentrationen gegeneinander aufgetragen. Die Ordinate zeigt dabei die Zahlenwerte der errechneten OD-Mittelwerte. Die errechneten Mittelwerte wurden für jeden Wachstumsfaktor in seinen verschiedenen Konzentrationen gegen die zwei Medienansätze Mangelmedium 1 und Vollmedium 1 mittels Zweistichproben t-Test (unterschiedlicher Varianzen) unter Annahme einer hypothetischen Differenz der Mittelwerte von 0 und Alpha  $\alpha < 0,05$  auf Signifikanz überprüft. Jedoch konnte nur bei der getesteten Konzentrationen von  $12,5\text{ng/ml}$  des Faktors EGF ein signifikant besseres Wachstum als im Vollmedium 1 nachgewiesen werden (farblich in Diagramm (b) hervorgehoben).

Aufgrund der Gesamtschau der Daten und den Daten von cand. med. Jonas Goß in einer parallelen Arbeit wurde die Auswahl an Wachstumsfaktoren für die nachfolgenden Proliferationsassays in dreidimensionalen Zellkulturen auf folgende Faktoren in definierten Konzentrationen begrenzt:

*Tabelle 17: Auflistung der ausgewählten Wachstumsfaktoren und ihrer Konzentrationen*

<b>Wachstumsfaktor</b>	<b>Konzentration</b>
HGF	50ng/ml
FGF2	6ng/ml
EGF	25ng/ml
Neuregulin	5nM

### **3.3 Proliferationsassays an Zell- und Tumorkulturen in dreidimensionalen Zellkulturen**

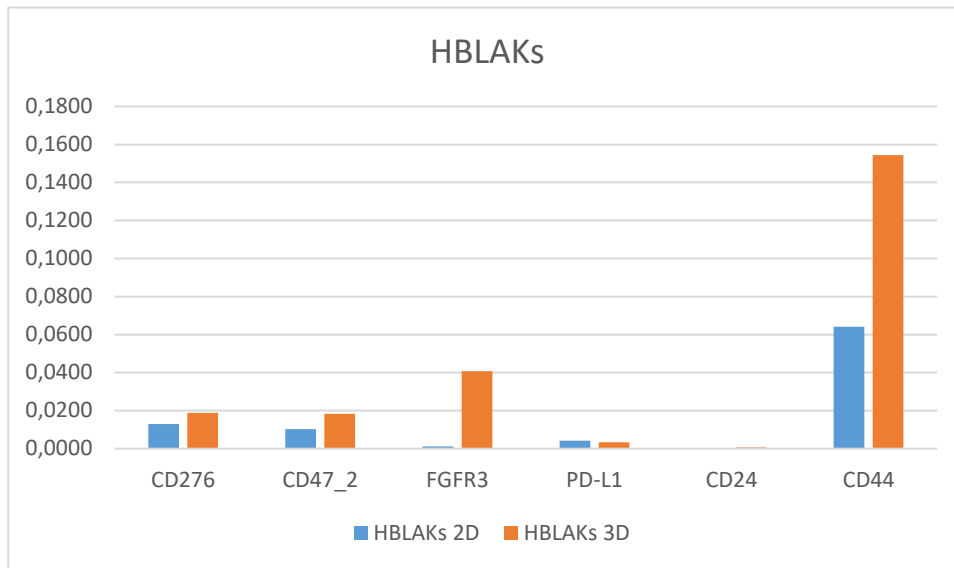
#### **3.3.1 Expressionsvergleich zwischen zwei- und dreidimensionalen Zellkulturen**

Der Expressionsvergleich der RNA erfolgte an der Zelllinie HBLAKs sowie der Tumorkultur UM-UC-15, welche auch für die späteren Screens in dreidimensionalen Kulturen verwendet wurden. Die Zell- und die Tumorkultur wurden hierfür sowohl als zwei-, als auch dreidimensionale Zellkultur in den Expressionsvergleich eingebracht.

Bedingt durch die verschiedenen Wachstumsbedingungen der zwei- und dreidimensionalen Zellkulturen und auch geringfügige Abweichungen zwischen den jeweiligen Medien (+/- Y-27632) waren Veränderungen in der RNA-Expression zu erwarten.

Bei der Tumorkultur UM-UC-15 zeigten beide Zellkulturen für die Gene CD276, PD-L1 und CD44 kaum Abweichungen untereinander. Auffällig war jedoch die vermehrte RNA-Expression von CD47\_2, FGFR3 und CD24 in der dreidimensionalen gegenüber der zweidimensionalen Kultur (siehe Abbildung 28).

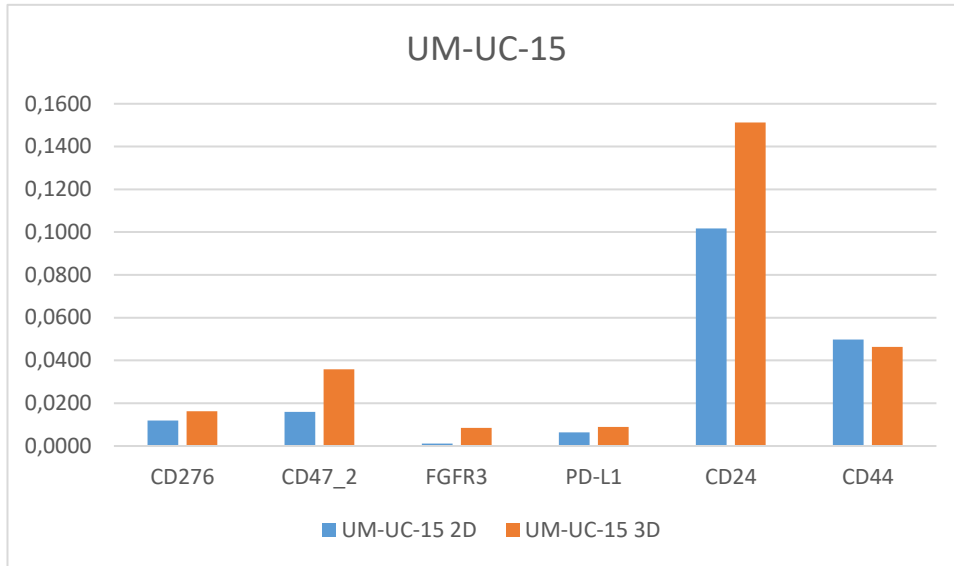
Bei der Zelllinie HBLAKs hingegen zeigten sich nur minimale Veränderungen zwischen der Expression von CD276, CD47\_2, PD-L1 und CD24. Eine deutlich vermehrte Expression war für CD44 und FGFR3 zu verzeichnen (siehe Abbildung 27). Diese veränderten Expressionsmuster lassen eine Anpassung der Zellen in unterschiedlichen Kulturbedingungen vermuten.



**Abbildung 27:** Auswertung Expressionsvergleich zwischen zwei- und dreidimensionalen Zellkulturen an der Zelllinie HBLAKs

Für den Expressionsvergleich wurden sowohl zweidimensionale Kulturen in Zellkulturflaschen als auch dreidimensionale Kulturen als 40µl-Domes auf 24-Well-Platten der Zelllinie HBLAKs angesetzt. Kultiviert wurden beide Ansätze im Standardmedium der Zelllinie, wobei dem Medium für die dreidimensionale Kultur auf 50ml Standardmedium 5µl Y-27632 zugesetzt worden war. Bei einer ausreichenden Konfluenz der zweidimensionalen Zellkultur bzw. einer ausreichenden Größe der sphäroidalen Strukturen in der dreidimensionalen Zellkultur wurde aus den Zellen RNA extrahiert. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und die gewonnene cDNA in einer quantitativen PCR auf folgende Gene untersucht: GAPDH, beta-Actin, CD24, CD44, CD47\_2, PD-L1, FGFR3 und CD276.

An der Zelllinie HBLAKs ist vor allem die deutliche vermehrte Expression der Gene CD44 und FGFR3 in der dreidimensionalen Kultur hervorzuheben.



**Abbildung 28:** Auswertung Expressionsvergleich zwischen zwei- und dreidimensionalen Zellkulturen an der Tumormlinie UM-UC-15

Für den Expressionsvergleich wurden sowohl zweidimensionale Kulturen in Zellkulturflaschen als auch dreidimensionale Kulturen als 40µl-Domes auf 24-Well-Platten der Tumormlinie UM-UC-15 angesetzt. Kultiviert wurden beide Ansätze im Standardmedium der Tumormlinie, wobei dem Medium für die dreidimensionale Kultur auf 50ml Standardmedium 5µl Y-27632 zugesetzt worden war. Bei einer ausreichenden Konfluenz der zweidimensionalen Zellkultur bzw. einer ausreichenden Größe der sphäroidalen Strukturen in der dreidimensionalen Zellkultur wurde aus den Zellen RNA extrahiert. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und die gewonnene cDNA in einer quantitativen PCR auf folgende Gene untersucht: GAPDH, beta-Actin, CD24, CD44, CD47\_2, PD-L1, FGFR3 und CD276.

An der Tumormlinie UM-UC-15 ist vor allem die deutliche vermehrte Expression der Gene CD47\_2, FGFR3 und CD24 in der dreidimensionalen Zellkultur hervorzuheben.

### 3.3.2 3D-Cell-Viability-Assay an Zell- und Tumorlinien

Trotz Veränderungen der RNA-Expression zwischen zwei- und dreidimensionalen Zellkulturen wurden verschiedene Wachstumsfaktoren aus vorangegangenen zweidimensionalen (siehe „3.2.3.2 Proliferationsassay mit Wachstumsfaktoren“) in weiteren dreidimensionalen Screens verwendet, entweder als Einzelfaktoren oder in Kombination (siehe Tabelle 18). Diese Screens erfolgten an der Zelllinie HBLAKs und der Tumorlinie UM-UC-15.

**Tabelle 18:** Auflistung der verwendeten Nährmedienansätze

*Für die verschiedenen Kombinationen (siehe Mix komplett bis Mix 10) wurden die in den oberen Zeilen aufgeführten Wachstumsfaktoren jeweils in ihren Einzelkonzentrationen zum Grundmedium zu pipettiert.*

<b>Nährmedienansätze</b>	<b>Konzentrationen</b>
Einzelfaktor HGF	50ng/ml
Einzelfaktor FGF2	6ng/ml
Einzelfaktor EGF	25ng/ml
Einzelfaktor Neuregulin	5nM
Mix komplett	HGF+FGF2+EGF+Neuregulin
Mix 1	HGF+Neuregulin
Mix 2	HGF+EGF
Mix 3	Neuregulin+FGF2
Mix 4	HGF+FGF2+Neuregulin
Mix 5	HGF+EGF+FGF2
Mix 6	EGF+FGF2+Neuregulin
Mix 7	HGF+EGF+Neuregulin
Mix 8	FGF2+HGF
Mix 9	FGF2+Neuregulin
Mix 10	EGF+FGF2

Sowohl die Zelllinie HBLAKs als auch die Tumorzelllinie UM-UC-15 zeigten als dreidimensionale Kultur in allen getesteten Medienansätzen die Ausbildung sphäroidaler Strukturen, welche morphologisch der von Organoiden ähnelten (siehe Abbildungen 29 bis 32).

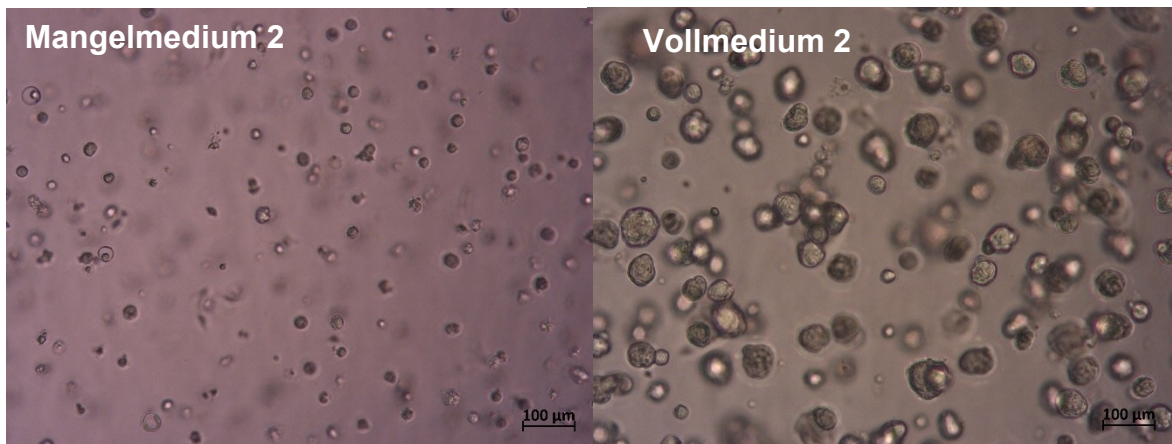
Eindeutige Ergebnisse bezüglich der optimalen Medienzusammensetzung lieferte der 3D-Cell-Viability-Assay an den Zell- und Tumorzelllinien aber nicht. Bei der Zelllinie HBLAKs zeigten zwar alle Medienansätze ein signifikant besseres Wachstum gegenüber dem Mangelmedium 2, (signifikant) bessere Werte gegenüber dem Vollmedium 2 wurden jedoch nicht detektiert (siehe Abbildung 33(a)).

Die Tumorzelllinie UM-UC-15 zeigte ebenfalls in allen Medienansätzen ein signifikant besseres Wachstum gegenüber dem Mangelmedium 2. Hervorzuheben sind des Weiteren die Ansätze „EGF“ als Einzelkomponente, „Mix komplett“, „Mix 1“, „Mix 2“, „Mix 4“ und „Mix 5“. Bei diesen Medienansätzen konnte im Assay eine signifikante Zunahme der Zellproliferation gegenüber dem Vollmedium 2 nachgewiesen werden (farblich in Abbildung 33(b) hervorgehoben).

Vergleiche zu den Proliferationsassays in zweidimensionalen Zellkulturen aus „3.2.3.2 Proliferationsassay mit Wachstumsfaktoren“ lassen sich kaum ziehen, da vor allem die Medienansätze mit den Kombinationen der ausgewählten Wachstumsfaktoren lediglich in den Versuchen der dreidimensionalen Kulturen getestet wurden. Die Ergebnisse der Einzelfaktoren HGF, FGF2, EGF und Neuregulin entsprechen in einigen Aspekten den Ergebnissen der vorangegangenen Screens. Das Wachstum der Zelllinie HBLAKs wurde in den zwei- wie auch dreidimensionalen Kulturen durch HGF und EGF stimuliert. Während FGF2 und Neuregulin in der dreidimensionalen Kultur die Proliferation verglichen mit dem Mangelmedium 2 leicht stimulierten, zeigten sie in den zweidimensionalen Kulturen keinen beziehungsweise kaum positive Effekte auf das Zellwachstum. Die Tumorzelllinie UM-UC-15 zeigte bereits in den zweidimensionalen Versuchsansätzen ein gutes Ansprechen auf die Faktoren HGF und EGF. In der dreidimensionalen Kultur konnte der leicht stimulierende

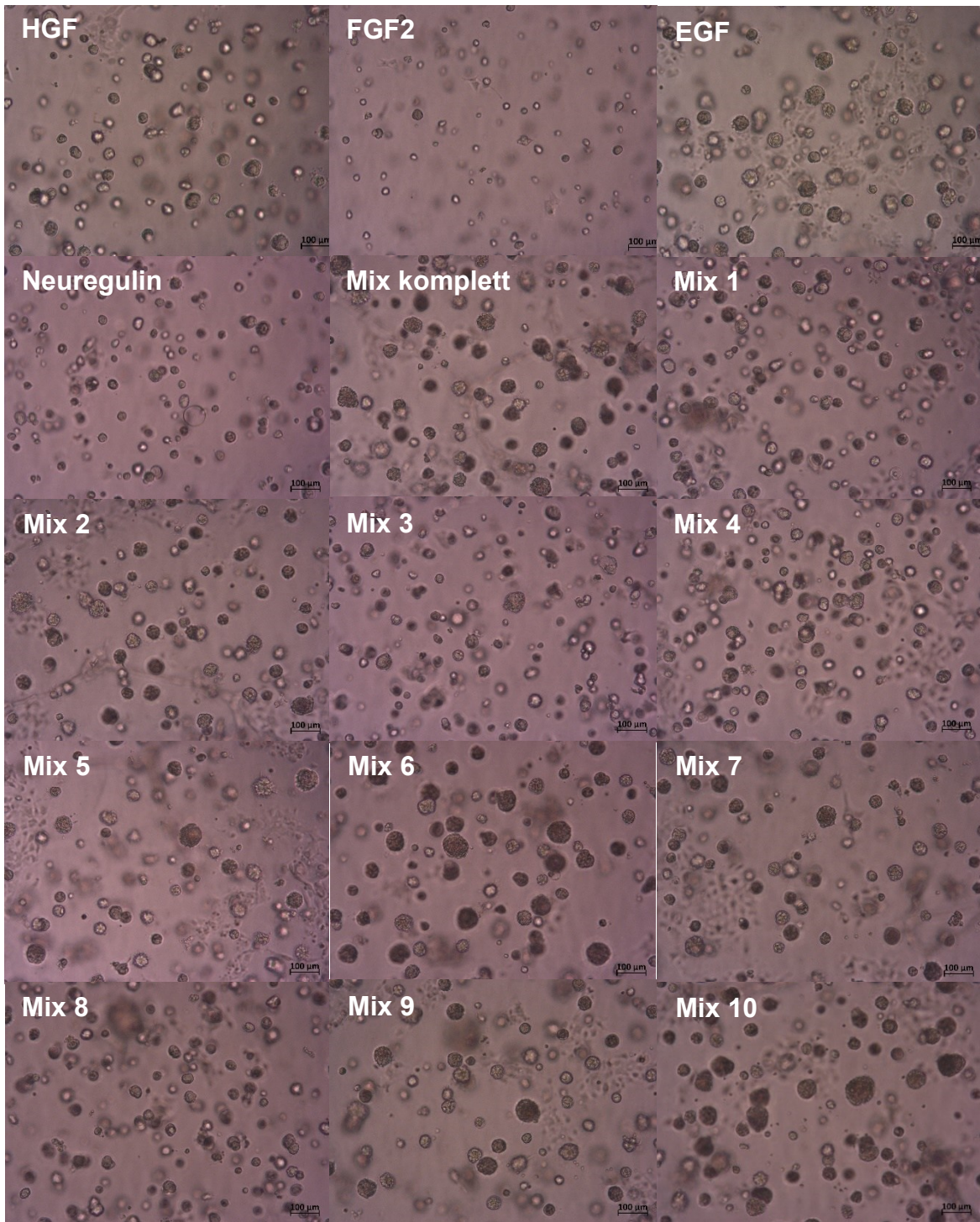
Effekt von Neuregulin aus den zweidimensionalen Kulturen jedoch nicht erneut nachgewiesen werden.

Um eine aussagekräftige und eindeutige Entscheidung bezüglich des optimalen Medienansatzes treffen zu können, waren weitere Screens an Organoiden unerlässlich.



**Abbildung 29:** 3D-Cell-Viability-Assay an der Zelllinie HBLAKs an Tag 7

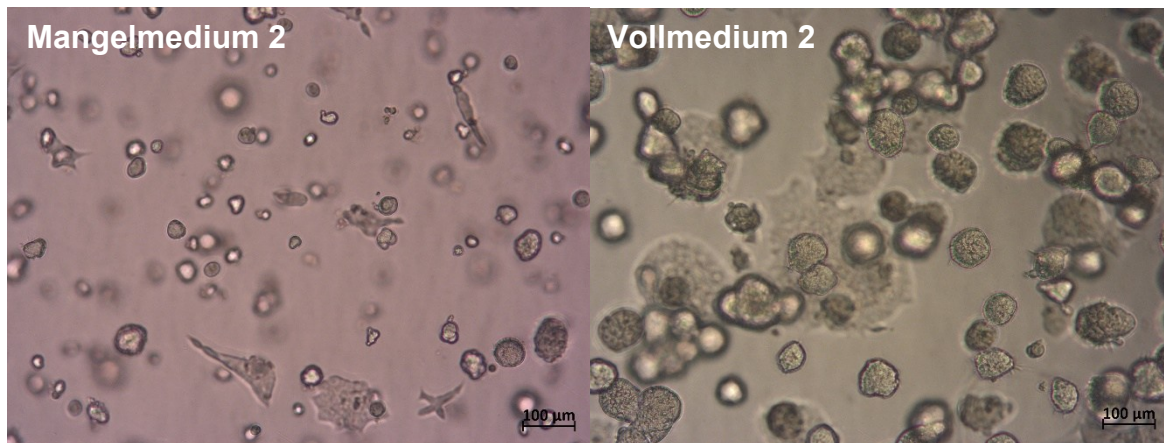
*Negativkontrolle im Mangelmedium 2 (links) und Positivkontrolle im Vollmedium 2 (rechts)*



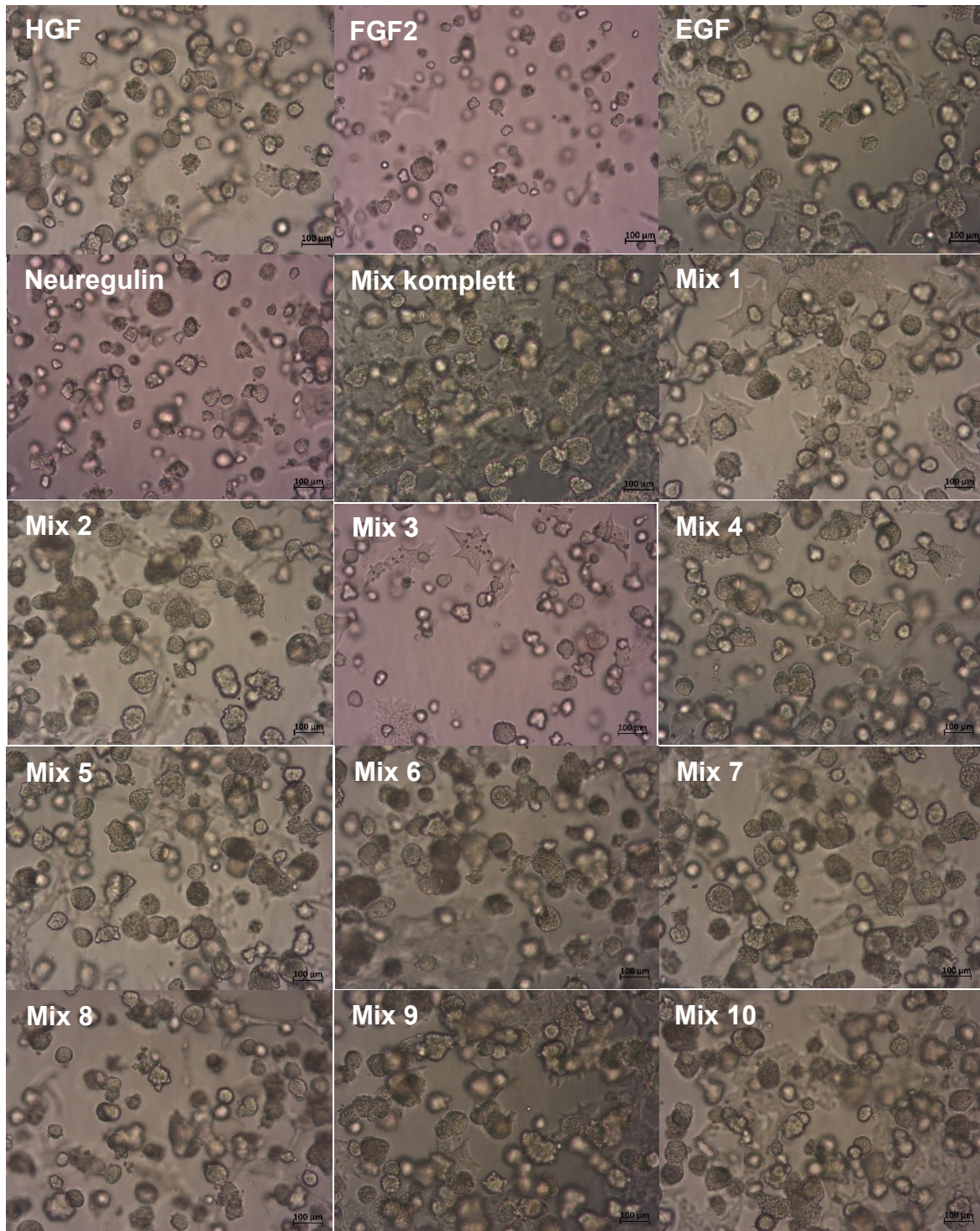
**Abbildung 30:** 3D-Cell-Viability-Assay an der Zelllinie HBLAKs an Tag 7

Für den dreidimensionalen Proliferationsassay wurden die Zellen der Zelllinie HBLAKs als 10µl-Domes a 5.000 Zellen pro Dome auf 96-Well-Platten (flat bottom, Weißwand) ausgesät und in verschiedenen Medienansätzen für sieben Tage kultiviert. Aufgetragen sind die mikroskopischen Bilder der einzelnen Medienansätze.

*In allen Medienansätzen konnte ein generell den Organoiden ähnliches dreidimensionales Wachstum nachgewiesen werden.*



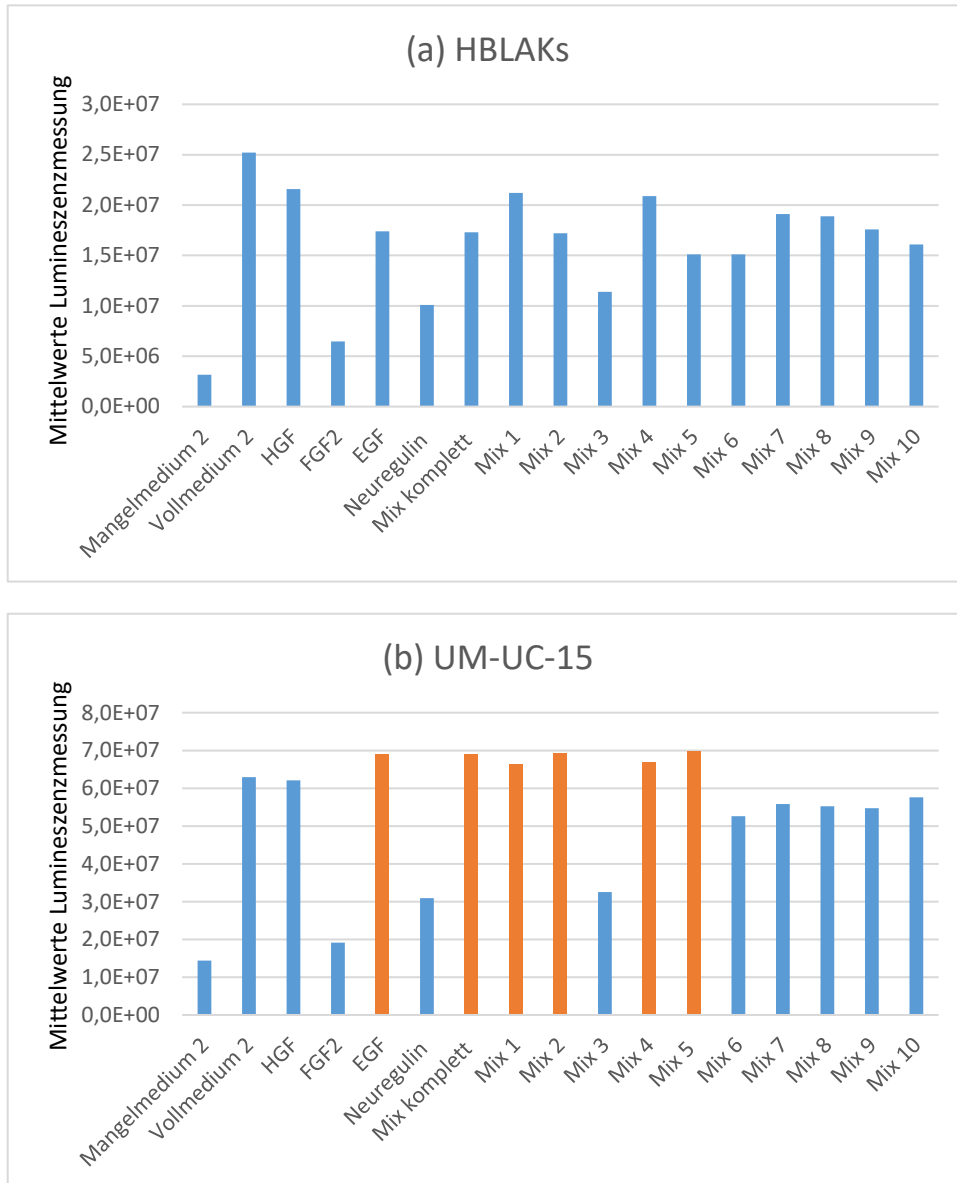
**Abbildung 31:** 3D-Cell-Viability-Assay an der Tumorklinie UM-UC-15 an Tag 7  
Negativkontrolle im Mangelmedium 2 (links) und Positivkontrolle im Vollmedium 2 (rechts)



**Abbildung 32:** 3D-Cell-Viability-Assay an der Tumorzelle UM-UC-15 an Tag 7

Für den dreidimensionalen Proliferationsassay wurden die Zellen UM-UC-15 als 10µl-Domes à 5.000 Zellen pro Dome auf 96-Well-Platten (flat bottom, Weißwand) ausgesät und in verschiedenen Medienansätzen für sieben Tage kultiviert. Aufgetragen sind die mikroskopischen Bilder der einzelnen Medienansätze.

In allen Medienansätzen konnte ein generell den Organoiden ähnliches dreidimensionales Wachstum nachgewiesen werden.



**Abbildung 33:** Viability-Assay für die Zelllinie HBLAKs (a) und die Tumorzelllinie UM-UC-15 (b)

Die Zell- und Tumorzelllinie wurden mit je 5000 Zellen pro Well auf 96-Well-Platten (flat bottom, Weißwand) als dreidimensionale Zellkultur als 10µl-Domes ausgesät und mit unterschiedlichen Nährmedienansätzen verschiedener Wachstumsfaktoren mit jeweils n=5 kultiviert. Als Negativkontrolle wurde Mangelmedium 2 und als Positivkontrolle Vollmedium 2 vorausgesetzt. Nach 7 Tagen erfolgte mittels Lumineszenzmessung im 3D-Cell-Viability-Assay die Auswertung der Platten.

Die Diagramme (a)-(b) zeigen die errechneten Mittelwerte der Lumineszenzmessung der unterschiedlichen Wachstumsfaktoren in den verschiedenen Konzentrationen und Kombinationen gegeneinander aufgetragen. Die Ordinate zeigt dabei die Zahlenwerte der errechneten Mittelwerte. Die errechneten Mittelwerte wurden für jeden Wachstumsfaktor und deren Kombinationen gegen die zwei Medienansätzen Mangelmedium 2 und Vollmedium 2 mittels Zweistichproben t-Test (unterschiedlicher Varianzen) unter Annahme einer hypothetischen Differenz der Mittelwerte von 0 und Alpha  $\alpha < 0,05$  auf Signifikanz überprüft. Lediglich für die Tumorzelllinie UM-UC-15 konnte für die Kombinationen „EGF“ als Einzelkomponente, „Mix komplett“, „Mix 1“, „Mix 2“, „Mix 4“ und „Mix 5“ ein signifikant besseres Wachstum als im Vollmedium 2 nachweisen werden (farblich in Diagramm (b) hervorgehoben).

### 3.4 3D-Cell-Viability-Assay an humanen Blasentumororganoiden

Der 3D-Cell-Viability-Assay wurde anhand des humanen Blasentumororganoids BCO#270 in der elften Passage durchgeführt und sollte der Bestätigung der Ergebnisse aus den 3D-Assays an Zell- und Tumorkulturen dienen (siehe „3.3.2 3D-Cell-Viability-Assay an Zell- und Tumorkulturen“).

Eine Auflistung der gescreenten Wachstumsfaktoren als Einzelfaktoren und in Kombination kann nochmals Tabelle 19 entnommen werden.

**Tabelle 19:** Auflistung der verwendeten Nährmedienansätze

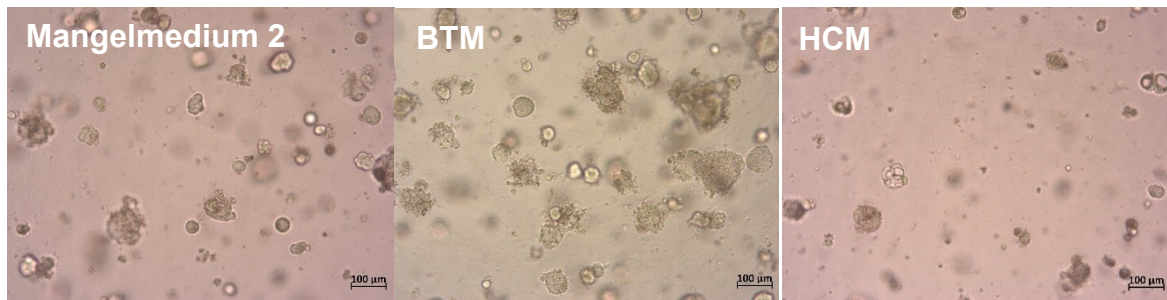
*Für die verschiedenen Kombinationen (siehe Mix komplett bis Mix 10) wurden die in den oberen Zeilen aufgeführten Wachstumsfaktoren jeweils in ihren Einzelkonzentrationen zum Grundmedium zu pipettiert.*

<b>Nährmedienansätze</b>	<b>Konzentrationen</b>
Einzelfaktor HGF	50ng/ml
Einzelfaktor FGF2	6ng/ml
Einzelfaktor EGF	25ng/ml
Einzelfaktor Neuregulin	5nM
Mix komplett	HGF+FGF2+EGF+Neuregulin
Mix 1	HGF+Neuregulin
Mix 2	HGF+EGF
Mix 3	Neuregulin+FGF2
Mix 4	HGF+FGF2+Neuregulin
Mix 5	HGF+EGF+FGF2
Mix 6	EGF+FGF2+Neuregulin
Mix 7	HGF+EGF+Neuregulin
Mix 8	FGF2+HGF
Mix 9	FGF2+Neuregulin
Mix 10	EGF+FGF2

Auffällig während des gesamten Versuchs war, dass die Organoide, welche aus BCO#270 generiert wurden, eine andere Morphologie zeigten verglichen mit vorangegangenen Versuchen im Standardmedium (BTM) dieser Blasentumororganoidlinie (vergleiche Abbildung 10 linkes Bild mit Abbildung 34 und 35). Die Organoide waren eher von einem asymmetrischen und zystischen Wachstum geprägt. Zudem konnten keine eindeutige Tendenzen bezüglich einer möglichen Proliferationssteigerung anhand der Mikroskopbilder ausgemacht werden.

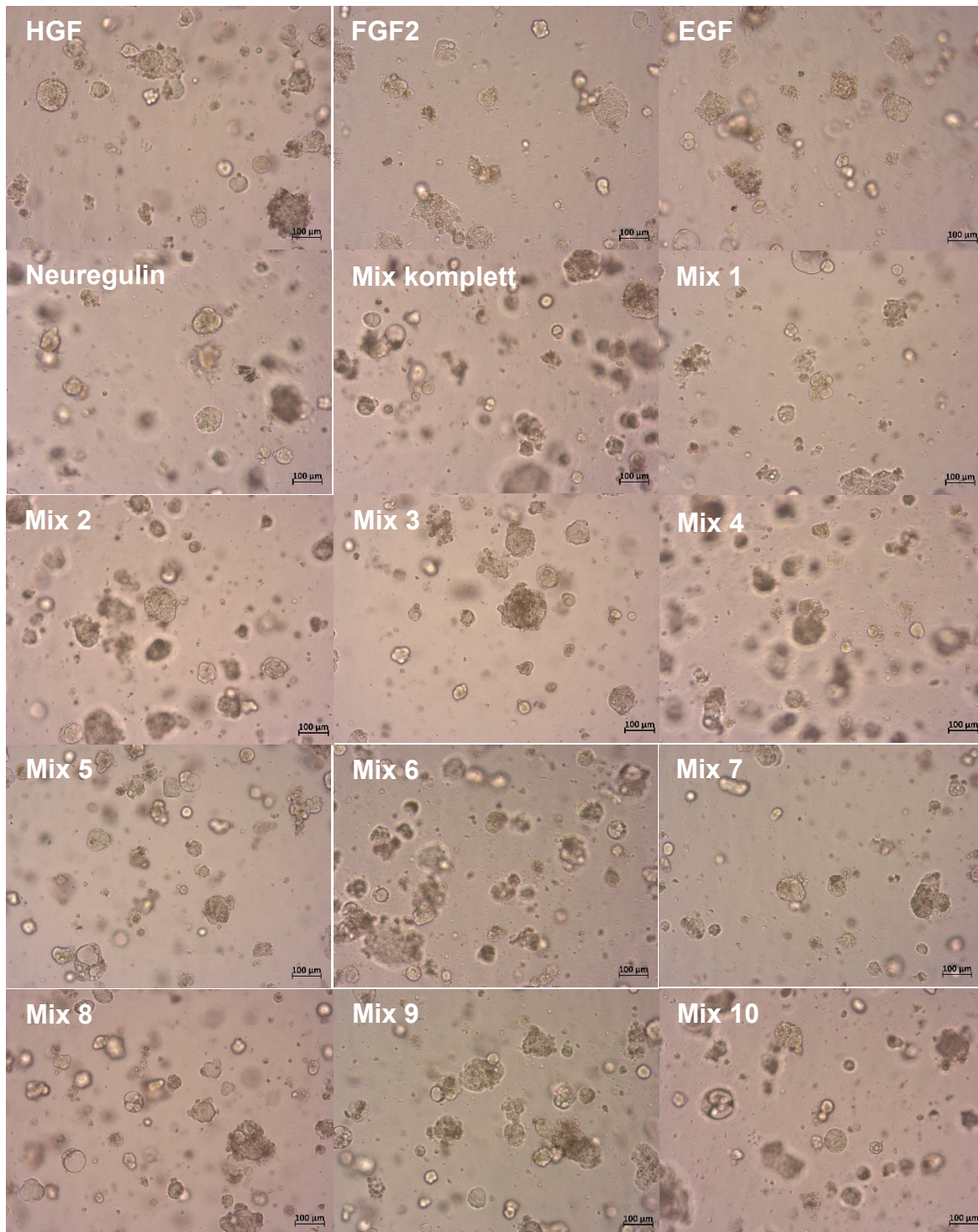
Die ausgewerteten Daten des 3D-Cell-Viability-Assays zeigten, dass alle getesteten Kombinationen ein signifikant besseres Wachstum gegenüber den als Positivkontrolle angedachten Medien BTM und HCM nach Lee et al. aufwiesen (farblich hervorgehoben in Abbildung 36). Bezüglich des Vergleichs mit dem Mangelmedium 2 gab es hingegen Unterschiede. Die Kombinationen „Neuregulin“ als Einzelkomponente, „Mix 1“, „Mix 5“ und „Mix 10“ wiesen ein Wachstum über dem des Mangelmediums auf, welches jedoch nicht signifikant war. Die Kombination „Mix komplett“ zeigte ein dem Mangelmedium 2 unterlegenes Wachstum. Alle weiteren Kombinationen zeigten ein signifikant besseres Wachstum gegenüber dem Mangelmedium 2.

Vergleiche mit den vorangegangenen Ansätzen mit Zell- und Tumorkulturen (vergleiche „3.3.2 3D-Cell-Viability-Assay an Zell- und Tumorkulturen“) können kaum gezogen werden, da bei beiden Versuchen unterschiedliche Medienansätze als Vollmedium vorausgesetzt wurden und die Blasentumororganoide BCO#270 zudem in einer anderen Extrazellulärmatrix kultiviert worden waren.



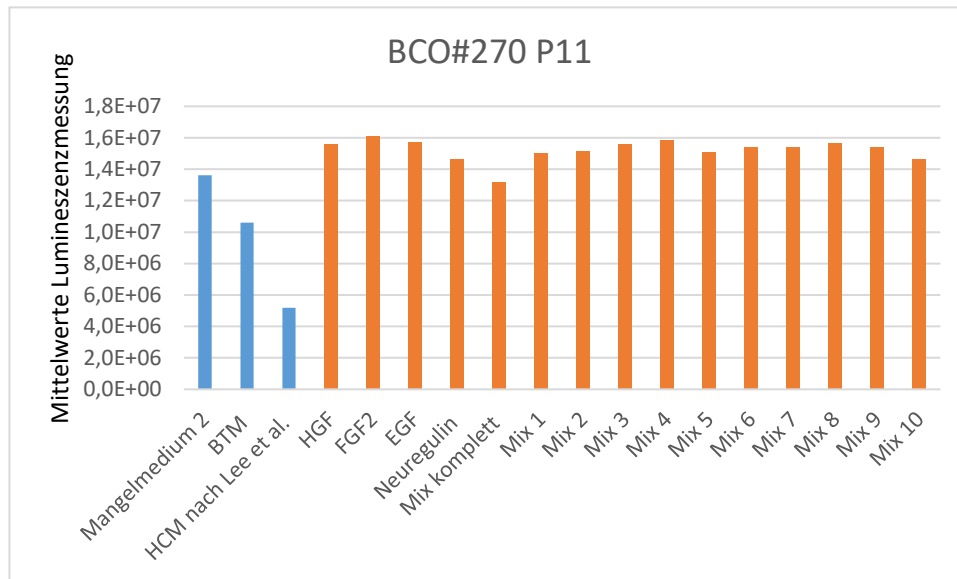
**Abbildung 34:** 3D-Cell-Viability-Assay an der humanen Blasentumororganoidlinie BCO#270 in der elften Passage an Tag 7

Negativkontrolle im Mangelmedium 2 (links) und Positivkontrolle im Vollmedium (BTM mittig, HCM rechts)



**Abbildung 35:** 3D-Cell-Viability-Assay an der humanen Blasen-tumororganoidlinie BCO#270 in der elften Passage an Tag 7

Für den dreidimensionalen Proliferationsassay wurden die Zellen des BCO#270 P11 als 10µl-Domes mit >5.000 Zellen (geschätzt) pro Dome auf 96-Well-Platten (flat bottom, Weißwand) ausgesät und in verschiedenen Medienansätzen für sieben Tage kultiviert. Aufgetragen sind die mikroskopischen Bilder der einzelnen Medienansätze, in welchen sich jeweils ein asymmetrisches und zystisches Wachstum der Organoid zeigte.



**Abbildung 36:** Auswertung Proliferationsassay mit Wachstumsfaktoren mittels 3D-Cell-Viability-Assay für die Blasen-tumororganoidlinie BCO#270 in der elften Passage

Die Zellen des Blasen-tumororganoids wurden mit je >5000 Zellen (geschätzt) pro Well auf 96-Well-Platten (flat bottom, Weißwand) als dreidimensionale Zellkultur als 10µl-Domes ausgesät und mit unterschiedlichen Nährmedienansätzen verschiedener Wachstumsfaktoren mit jeweils n=5 kultiviert. Als Negativkontrolle wurde Mangelmedium 2 und als Positivkontrolle BTM und HCM nach Lee et al. vorausgesetzt. Nach 7 Tagen erfolgte mittels Lumineszenzmessung im 3D-Cell-Viability-Assay die Auswertung der Platten.

Das Diagramm zeigt die errechneten Mittelwerte der Lumineszenzmessung der unterschiedlichen Wachstumsfaktoren in den verschiedenen Konzentrationen und Kombinationen gegeneinander aufgetragen. Die Ordinate zeigt dabei die Zahlenwerte der errechneten Mittelwerte. Die errechneten Mittelwerte wurden für jeden Wachstumsfaktor und deren Kombinationen gegen die drei Medienansätzen Mangelmedium 2, BTM und HCM nach Lee et al. mittels Zweistichproben t-Test (unterschiedlicher Varianzen) unter Annahme einer hypothetischen Differenz der Mittelwerte von 0 und Alpha  $\alpha < 0,05$  auf Signifikanz überprüft. Alle getesteten Kombinationen zeigten dabei ein signifikant besseres Wachstum gegenüber den als Positivkontrollen angedachten Medien BTM und HCM nach Lee et al. (farblich im Diagramm hervorgehoben).

## 4 Diskussion

### 4.1 Vergleich verschiedener Medienansätze

Die durchgeführten Medienvergleiche zwischen BTM und HCM nach Lee et al. anhand ausgewählter, im Labor etablierter Blasen-tumororganoide dienen als eine erste Orientierung, um einen aktuellen Stand der Medienpräferenz im Labor zu erheben.

Die vorliegenden Ergebnisse lieferten keine eindeutigen Präferenzen für eins der Kulturmedien, was an einem Kollektiv von lediglich drei Organoidlinien auch nur exploratorischen Charakter haben kann. Sie konnten jedoch bestätigen, dass Organoide unterschiedlichste Morphologien aufweisen können. Diese Beobachtung wurde von Mullenders et al. in ihrer Arbeit beschrieben: „Organoide von verschiedenen Patienten erschienen entweder solide oder lumenhaltig“ (Mullenders et al., 2019) (vergleiche Abbildung 6 und 8: lumenhaltiges Wachstum bei BCO#147, solides Wachstum bei BCO#154).

Wie bereits erwähnt, konnte innerhalb des Kollektivs von drei Organoidlinien keine eindeutige Entscheidung getroffen werden, welches Kulturmedium für die Etablierung künftiger Organoide oder als Basismedium für nachfolgende Proliferationsassays zu präferieren sei. Unter „1.3.2 In der Literatur verwendete Kulturmedien“ wurde auf vorangegangene Forschungsarbeiten eingegangen, welche zeigten, dass Harnblasenkarzinome eine „sehr heterogene Erkrankung mit dem Vorhandensein einer großen Anzahl an Mutationen [darstellen]“ ((Mullenders et al., 2019), (Cancer Genome Atlas Research, 2014), (Robertson et al., 2017)). Diese Heterogenität zwischen den einzelnen Blasenkarzinomen bleibt auch bei der Generierung der dazugehörigen Organoide bestehen. Mittels immunhistochemischer Hämatoxylin-Eosin-Färbung konnte in der Forschungsgruppe um Lee eine „starke Übereinstimmung [der] [...] histopathologischen Merkmale“ zwischen dem Ursprungstumor und dem jeweiligen Organoid nachgewiesen werden (Lee et al., 2018). Auch Analysen der Mutationsprofile zeigten eine hohe Konkordanz zwischen den Zellen in-vivo und in-vitro (Lee et al., 2018). Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass dreidimensionale Organoidkulturen teilweise die Charakteristika des

ursprünglichen Gewebes rekapitulieren. Es stellt sich aber die Frage, ob eben bedingt durch diese Heterogenität ein für alle Blasentumororganoid ein einheitliches Kulturmedium genutzt werden kann, oder ob für jedes Tumorgewebe individuell ein eigenes Medium entsprechend des Mutations- und Rezeptorprofils zusammengestellt werden sollte. Allein aus zeit- und kostentechnischen Aspekten wäre eine Individualisierung der Kulturmedien für jedes einzelne Organoid vermutlich aber nicht realisierbar.

Grundsätzlich muss auch das Vorgehen des durchgeführten Medienvergleichs überdacht werden. Im Gegensatz zu den Blasentumororganoiden BCO#147 und BCO#270 wurde BCO#154 vor Beginn des Versuchs lediglich im Medium BTM kultiviert. Die Organoiden BCO#147 und BCO#270 hingegen wurden bereits vor Ansetzen des Medienvergleichs in den zwei verwendeten Medien entsprechend der Kultivierung innerhalb des Versuchs angesetzt und hätten sich demnach phänotypisch an die Umgebungsbedingungen anpassen können. Zudem sind die Ergebnisse unter den Blasentumororganoiden schwer zu vergleichen, da vor Beginn und nach Beendigung des Medienvergleichs keine Zellzählung erfolgte, sondern das Wachstumsverhalten nur mikroskopisch dokumentiert wurde. Dies war zum einen der Tatsache geschuldet, dass eine Zellzählung in der Neubauerzählkammer einen zu hohen Zellverlust mit sich bringt, zum anderen aber auch, dass Organoiden mit den aktuellen Protokollen des Labors nicht adäquat zu Einzelzellen vereinzelt werden können. Mikroskopische Kontrollen beim Splitting der Zellen vor Beginn des Vergleichs zeigten das Verbleiben kleinerer Zellcluster, welche eine Zellzählung nur verfälschen würden. Zusätzlich wurde der Vergleich zwischen den Organoidlinien darin limitiert, dass die mikroskopischen Kontrollen lediglich Rückschlüsse auf das allgemeine Wachstumsverhalten zuließen. Eine Aussage über die Vitalität der Zellen konnte jedoch nicht getroffen werden. Zudem konnten vitale nicht proliferierende Zellen oder Zellen außerhalb der Organoidstruktur, welche zum Beispiel adhärent am Wellboden wuchsen, ebenfalls nicht beurteilt werden.

## **4.2 Proliferationsassays an Zell- und Tumorkulturen in zweidimensionalen Zellkulturen**

### **4.2.1 Bestimmung der Duplikationsraten und AE1/AE3-Färbung zum Nachweis des epithelialen Phänotyps an HBLAKs**

Der Versuch zur Bestimmung der Duplikationsraten wurde an den Tumorkulturen UM-UC-15 und HT1197, sowie an der Zelllinie HBLAKs durchgeführt. Er diente nicht nur der Bestimmung der jeweiligen Duplikationsraten, sondern auch der Beobachtung des allgemeinen Wachstumsverhaltens der Zellen.

Wie zu erwarten war, lagen die mittleren Duplikationsraten der Tumorkulturen UM-UC-15 und HT1197 im Vollmedium 1 jeweils über den Duplikationsraten im Mangelmedium 1. Für die Zelllinie HBLAKs konnte bedingt durch Kultivierungsprobleme lediglich die Duplikationsrate für das Vollmedium 1 ermittelt werden.

Die Ergebnisse für die Tumorkulturen UM-UC-15 und HT1197 zeigten eindeutig, dass die Zellen im Mangelmedium 1, welches nur die Grundversorgung einer Zelle sichern sollte, kultiviert werden können. Die Kulturen im Vollmedium 1 erhärteten aber den Verdacht, dass für eine Steigerung des Zellwachstums Zusätze in Form von im Serum enthaltenen Wachstumsfaktoren und Supplements nötig sind, welche über verschiedene Pathways proliferativ auf die Zellen einwirken. Bedingt durch die Tatsache, dass in diesem Versuch als Zusatz charcoal-stripped fetal bovine serum gewählt wurde, kann jedoch nicht gesagt werden, welcher im Serum enthaltene Faktor diese Proliferationssteigerung gegenüber dem Mangelmedium induziert hat. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass der proliferative Effekt eher durch ein Zusammenspiel verschiedener Wachstumsfaktoren in unterschiedlichsten Konzentrationen bedingt wurde.

Für die Zelllinie HBLAKs konnte eine ausreichende Versorgung der Zellen im Mangelmedium 1, anders als bei den verwendeten Tumorkulturen, innerhalb dieses Versuchs nicht nachgewiesen werden. Es muss aber angemerkt werden, dass pauschal nicht gesagt werden kann, dass das Mangelmedium 1 kein Zellwachstum dieser Zelllinie ermöglicht. In nachfolgenden Versuchen

konnte eine Kultivierung der Zelllinie im Mangelmedium 1 erfolgen. Es ist daher anzunehmen, dass bei den Vorbereitungen und der Durchführung des Versuchs zur Bestimmung der Duplikationsraten Fehler unterlaufen sind, welche die Zellen der Zelllinie geschädigt und so zum Abstreben geführt haben könnten. Auch eine fehlerhafte Beschichtung der verwendeten CellBIND 6-Well-Platten kann im Nachhinein nicht ausgeschlossen werden.

Auffällig ist jedoch, dass die Tumorlinien UM-UC-15 und HT1197 im Mangelmedium 1 und die Zelllinie HBLAKs sowohl im Mangelmedium 1 als auch im Vollmedium 1 mikroskopisch zellmorphologische Veränderungen gegenüber der Kultur im Standardmedium zeigten (vergleiche Abbildungen 12 bis 18). Es kann angenommen werden, dass Zellen sich an neue Kultivierungsbedingungen anpassen müssen und sich dies auch zellmorphologisch in einem veränderten Phänotyp zeigt. Für die Zelllinie HBLAKs konnte eine solche phänotypische Anpassung der Zellen im Rahmen der nachfolgend durchgeführten AE1/AE3-Färbung teilweise nachgewiesen werden. Immunhistochemische Färbungen als Beleg für phänotypische Veränderungen der Tumorzellen der Linien UM-UC-15 und HT1197 wurden nicht durchgeführt. Bedingt durch die Eigenschaften von Tumorzellen ist eine Veränderung des Phänotyps jedoch nicht auszuschließen. „Tumorzellen sind [in vivo] verschiedenen Stoffwechselbedingungen, Signalmolekülen, Stromaelementen und therapeutischen Wirkstoffen ausgesetzt, die zusammen eine flüchtige Mikroumgebung bilden, die Veränderungen des zellulären Phänotyps fördern können“ (Yuan et al., 2019). Diese „zelluläre Plastizität“ der Tumorzellen in vivo, wie auch vermutlich der Tumorlinien UM-UC-15 und HT1197 in vitro, sichert nicht nur das Überleben der Zellen bei schwankenden Umgebungsbedingungen, sondern ermöglicht auch in-vivo den Tumorprogress beispielsweise durch Induktion der Metastasierung.

## **4.2.2 WST-1-Proliferation-Assay**

### 4.2.2.1 Bestimmung der Zellzahlen

Dieser Versuch diente der zweidimensionalen Kultivierung der Tumorklinien HT1197 und UM-UC-15 sowie der Zelllinie HBLAKs in zwei verschiedenen Medienansätzen. Durch das Einbringen unterschiedlicher Zellzahlen bei Aussaat wurde die optimale Zellzahl für das Ansetzen nachfolgender Proliferationsassays bestimmt.

Aus den Daten zu UM-UC-15 und HBLAKs wurden 1.000 Zellen pro Well bei Aussaat und ein Beobachtungszeitraum von sieben Tagen festgelegt.

Die Tumorklinie HT1197 hingegen wurde aufgrund sehr hoher Proliferationsraten und widersprüchlicher Daten von weiteren Screens ausgeschlossen. Laut diesen Daten hätte das verwendete Mangelmedium 1, welches lediglich eine Grundversorgung der Zellen sicherstellen sollte, einen größeren Einfluss auf die Zellproliferation als das serumhaltige Vollmedium 1, zumindest für den Versuchsansatz mit einem Beobachtungszeitraum von vier Tagen (Daten nicht gezeigt). Bedingt durch diese Ergebnisse für HT1197 kann ein Fehler beim Ansetzen des Versuchs nicht ausgeschlossen werden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Tumorzellen vor Einbringen in die jeweiligen Wells nicht ausreichend resuspendiert worden waren. Dadurch hätten sich in der zweidimensionalen Kultur des Mangelmediums 1 bereits frühzeitig Zellcluster bilden können. Durch die vermehrte Zell-Zell-Interaktion und gegebenenfalls auch autokrine Sekretion von Wachstumsfaktoren innerhalb dieser Cluster hätten sich die Tumorzellen selbst in ihrer Proliferation stimulieren können. Frühere Forschungsarbeiten an verschiedenen Blasen-tumorklinien (5637, HU549, SD, TCCSuP und T24) konnten bereits nachweisen, dass Tumorklinien durch autokrine Sekretion in Serum-freien Kulturmedien „die Fähigkeit zum autonomen Wachstum [...] erwerben [können]“ (Ruck et al., 1994).

#### 4.2.2.2 Proliferationsassay mit Wachstumsfaktoren

Die Proliferationsassays an zweidimensionalen Zellkulturen wurden mittels WST-1-Proliferations-Assay an der Zelllinie HBLAKs und der Tumorzelllinie UM-UC-15 durchgeführt. Sie dienten als Screen für insgesamt neun Wachstumsfaktoren in unterschiedlichen Konzentrationen. In der Gesamtschau der Daten, ergänzt um Daten von cand. med. Jonas Goß aus einer parallelen Arbeit an den Tumorzelllinien T24, RT4 und RT112, erfolgte eine Eingrenzung der Auswahl auf folgende Wachstumsfaktoren: EGF (25ng/ml), HGF (50ng/ml), FGF2 (6ng/ml) und Neuregulin (5nM). Diese Auswahl stellt mit den Faktoren FGF2 und EGF eine Schnittfläche zwischen den in der Literatur verwendeten Kulturmedien von Lee et al. und Mullenders et al. dar ((Lee et al., 2018), (Mullenders et al., 2019)).

Hervorzuheben sind besonders die Daten, welche für den Aktivin-Like-Rezeptor-Kinase-Inhibitor A83-01 in dieser Arbeit und in der von cand. med. Jonas Goß erhoben wurden. Bei den malignen Tumorzelllinien, wobei in dieser Arbeit lediglich UM-UC-15 eingeschlossen wurde, zeigte dieses Supplement eine deutliche Minderung der Zellproliferation. Die benigne Zelllinie HBLAKs hingegen konnte in ihrem Wachstum unter Zusatz von A83-01 stimuliert werden. Aus diesem Grund wurde die Annahme gestellt, dass im Labor etablierte Tumorzelllinien und somit gegebenenfalls auch Harnblasenkarzinome den TGF- $\beta$ -Signalweg, welcher durch das Supplement A83-01 inhibiert wird, für die Zellproliferation benötigen. Im Umkehrschluss hätte dies aber bedeuten müssen, dass durch Zugabe des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$ 1 die Proliferation der Tumorzelllinien im durchgeführten Assay stark stimuliert werden müsse. Ein solch proliferativer Einfluss auf das Zellwachstum der Tumorzelllinien blieb aber aus. Eine mögliche Erklärung ist, dass der Aktivin-Like-Rezeptor-Kinase-Inhibitor A83-01 nicht nur den TGF- $\beta$ 1-Signalweg über Bindung an den Rezeptor Transforming growth factor beta receptor 1 bzw. ALK5 beeinflussen kann, sondern auch weitere beispielsweise den Rezeptoren ALK4 und ALK7 nachgeschaltete Signalwege. Der transmembrane Serin/Threonin-Kinase-Aktivin-Typ-1-Rezeptor bzw. ALK4 zum Beispiel kann über den Faktor Aktivin A aktiviert werden und induziert als Rezeptorkomplex mit dem Aktivin-Typ-2-

Rezeptor verschiedene physiologische wie auch pathologische Prozesse. Der Faktor Aktivin A könnte demnach die Proliferationssteigerung in nachfolgenden Assays induzieren, welche unter TGF- $\beta$ 1 ausgeblieben war. In verschiedenen Forschungsarbeiten konnte bereits gezeigt werden, „[that] Aktivin-A has been shown overexpressed in metastatic prostate cancer, stage 4 colorectal cancers, lung cancer, hepatocellular carcinoma, and pancreatic cancers“ ((Bashir et al., 2015), (Kang et al., 2009), (Wildi et al., 2001), (Seder et al., 2009), (Deli et al., 2008), (Lonardo et al., 2011)), „suggesting that activation of the activin signaling pathway may be widely involved in carcinogenesis“ (Bashir et al., 2015). Um den Einfluss von Aktivin A spezifisch auf Blasentumore und davon abgeleitete Tumorkulturen näher zu untersuchen und ggf. proliferative Stimuli zu bestätigen, sind weitere Screens erforderlich und wurden (Stand April 2023) bereits teilweise in nachfolgenden Arbeiten durchgeführt.

Grundsätzlich muss jedoch auch die Konzipierung des Versuchs hinterfragt werden, besonders bezüglich der gewählten Konzentrationen der einzelnen Wachstumsfaktoren. Grundlage für die Entscheidung der gewählten Konzentrationen waren Referenzen aus der Literatur, vornehmlich aber zu dreidimensionalen Zellkulturen unterschiedlichster Organoidmodelle ((Sachs et al., 2018), (Lee et al., 2018), (Mullenders et al., 2019), (Vlachogiannis et al., 2018), (Drost et al., 2016), (Yu et al., 2021), (Maenhoudt et al., 2020)). Die ersten Screens an den zweidimensionalen Zellkulturen sollten eine Vorauswahl der Wachstumsfaktoren ermöglichen, um Ressourcen für die dreidimensionalen Screens einzusparen. Jedoch könnten die Wachstumsfaktoren für eine zweidimensionale Zellkultur zu hoch konzentriert gewesen sein und so durch eine Überstimulierung der Zellen zu einer Proliferationsminderung geführt haben. Für Screens an dreidimensionalen Kulturen hätten diese Konzentrationen gegebenenfalls die Zellen optimal stimuliert, beispielsweise bedingt durch die verlängerte Diffusionsstrecke durch das Matrigel. Unter dieser Annahme wären die Daten aus den zweidimensionalen Screens nicht geeignet, um daraus Schlüsse für Screens in dreidimensionalen Kulturen zu ziehen. Diese Vermutung, dass Zellen in verschiedenen Kultivierungsbedingungen unterschiedlich durch den gleichen Wachstumsfaktor stimuliert werden, kann

teilweise durch die Ergebnisse der Forschungsarbeit von Yoshida, Sopko et al. bestätigt werden: „the data show that [the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway activator] CHIR promoted the proliferation of both bladder cancer cell lines [RT4 and 5637] within a certain range of concentrations in organoid cultures but not in conventional adherent cultures“ (Yoshida, Sopko, et al., 2018). Daher muss kritisch hinterfragt werden, ob Screens an zweidimensionalen Zellkulturen als Vorversuche für nachfolgende Screens in dreidimensionalen Kulturen überhaupt geeignet sind.

Weiterhin muss angemerkt werden, dass die verwendeten Wachstumsfaktoren lediglich einen kleinen Auszug derer Faktoren und Supplements darstellen, welche zur Optimierung von Kulturmedien eingesetzt werden können. In der Literatur finden sich Hinweise, dass beispielsweise Hormone wie Östrogene eine proliferative Wirkung sowohl auf gutartiges Urothel als auch Urothelkarzinome haben können ((Koskela et al., 2009), (Teng et al., 2002), (Teng et al., 2008)). Die Forschungsgruppe um Mullenders beschrieb zudem den Nutzen der Wachstumsfaktoren FGF7 und FGF10 für das Wachstum humaner Blasentumororganoiden: „[Both] FGF7 and FGF10 are sufficient for the growth of human bladder cancer organoids“ (Mullenders et al., 2019). Um weitere Faktoren ggf. bereits im Setting einer dreidimensionalen Kultur testen zu können, sind daher weitere Versuche nötig.

### **4.3 Proliferationsassays an Zell- und Tumorzelllinien in dreidimensionalen Zellkulturen**

#### **4.3.1 Expressionsvergleich zwischen zwei- und dreidimensionalen Zellkulturen**

Der Expressionsvergleich diente dem Vergleich der Expression der Gene CD24, CD44, CD47\_2, PD-L1, FGFR3 und CD276 zwischen zwei- und dreidimensionalen Zellkulturen der Zelllinie HBLAKs und der Tumorzelllinie UM-UC-15. In beiden Linien konnte eine vermehrte Expression innerhalb der dreidimensionalen Kultur gegenüber der zweidimensionalen Kultur nachgewiesen werden: für CD44 und FGFR3 bei der Zelllinie HBLAKs, für CD47\_2, CD24 und FGFR3 bei der Tumorzelllinie UM-UC-15.

Grundsätzlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass die unterschiedlichen Wachstumsbedingungen zwischen zwei- und dreidimensionalen Kulturen zu diesem veränderten Profil der mRNA-Expression geführt haben, wie die Verwendung von Matrigel als künstliche Extrazellulärsubstanz oder der Medienzusatz Y-27632 (ROCK-Inhibitor) innerhalb der dreidimensionalen Kulturen.

Auffällig war dabei, dass sowohl die Zell- als auch die Tumorzelllinie in der dreidimensionalen Kultur eine gesteigerte Expression der mRNA des fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) zeigten. Es muss aber auch angeführt werden, dass bei dem Expressionsvergleich mittels quantitativer PCR lediglich transkribierte RNA nachgewiesen wird. Die Transkription einer mRNA muss aber nicht mit der Translation in ein Protein einhergehen, welches beispielsweise als Rezeptor fungiert. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die veränderten Kultivierungsbedingungen neben einer veränderten Expression der mRNA auch zum Beispiel zu einem veränderten Rezeptorprofil geführt haben. Dies könnte auch eine mögliche Erklärung sein, weshalb in der Forschungsarbeit von Yoshida, Sopko et al. der Wnt/ $\beta$ -catenin pathway activator „CHIR [...] the proliferation of both bladder cancer cell lines [RT4 and 5637] [...] in organoid cultures [promoted] but not in conventional adherent cultures“ (Yoshida, Sopko, et al., 2018).

### **4.3.2 3D-Cell-Viability-Assay an Zell- und Tumorlinien**

Die Vitalitätsversuche an dreidimensionalen Zellkulturen wurden mittels 3D-Cell-Viability-Assay an der Zelllinie HBLAKs und der Tumorlinie UM-UC-15 durchgeführt. Sie sollten als weiterführende Screens der zweidimensionalen Proliferationsassays für die Wachstumsfaktoren HGF, EGF, FGF2 und Neuregulin dienen und auch der Testung verschiedener Kombinationen eben dieser ausgewählten Wachstumsfaktoren.

Aus den Versuchsergebnissen ging hervor, dass die Wachstumsfaktoren als Einzelkomponente teilweise die Zellproliferation mehr stimulierten im Vergleich zu einer Kombination mehrerer Faktoren. Dies kann darin begründet sein, dass die ausgewählten Wachstumsfaktoren HGF, EGF, FGF2 und Neuregulin über Bindung an ihre Rezeptoren teilweise in die gleichen nachgeschalteten Pathways einwirken, exemplarisch beispielsweise in den PI3K/AKT-signaling-pathway. Dieser Pathway „is [...] prominently activated by many growth factors that signal through receptor tyrosine kinases“ (Zhang et al., 2013) , zu denen die Rezeptoren der oben aufgeführten Wachstumsfaktoren zählen. Der PI3K/AKT-signaling-pathway „is one of the major signal transduction pathways that regulates numerous cellular activities [...] [for example] induction of stem cell differentiation and metastasis, promotion of cell proliferation, inhibition of apoptosis, and regulation of tissue inflammation, tumor growth, and invasion“ (Wang et al., 2022). Durch die Kombinationen der verschiedenen Wachstumsfaktoren innerhalb der Vitalitätsassays könnte es ggf. zu einer Überstimulierung dieses oder weiterer Pathways gekommen sein. Es ist nicht auszuschließen, dass eine solche Überstimulierung der Zellen nicht zur erhofften Proliferationssteigerung führt, sondern ggf. einen Zellarrest oder eine Apoptose der Zellen induziert. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch weder bestätigt noch widerlegt werden.

Grundsätzlich muss noch diskutiert werden, ob Screens von Wachstumsfaktoren zur Etablierung eines neuen Kulturmediums bei künftigen Versuchen nur an dreidimensionalen Kulturen durchgeführt werden sollten. Wie bereits beschrieben können Nährmedienzusätze, wie der in der angeführten

Forschungsarbeit verwendete Wnt/ $\beta$ -catenin pathway activator CHIR, in dreidimensionalen Kultivierungsbedingungen das Zellwachstum fördern, nicht jedoch in einem zweidimensionalen Versuchsansatz (Yoshida, Sopko, et al., 2018). Dass Wachstumsfaktoren zudem in ihrer Konzentration genau titriert werden müssen, zeigen die Ergebnisse der Forschungsarbeit von Sachs und Kollegen: sie testeten verschiedene Wachstumsfaktoren in mehreren Konzentrationen in dreidimensionalen Brustkrebsorganoiden. Die Versuche bestätigten, dass Wachstumsfaktoren in bestimmten Konzentrationen zum Kulturmedium zugegeben werden müssen, um einen proliferativen Effekt zu induzieren. Der Faktor SB202190, ein p38 MAPK Inhibitor, zeigte beispielsweise ab Konzentrationen über 1 mM eine Verringerung in der Effizienz der Organoidetablierung (Sachs et al., 2018). Aus diesen angebrachten Gründen sollte erwogen werden, die durchgeführten Screens aller Wachstumsfaktoren in den unterschiedlichen Konzentrationen nochmals im Setting dreidimensionaler Zellkulturen durchzuführen.

Der Expressionsvergleich zwischen zwei- und dreidimensionalen Zellkulturen zeigte zudem deutlich, dass sich auf mRNA-Ebene Veränderungen innerhalb von zwei- und dreidimensionalen Zellkulturen manifestieren, wie beispielsweise die vermehrte Expression von fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3). Wie bereits angedeutet, muss ein solcher Unterschied auf mRNA-Ebene nicht zwangsläufig auch mit zum Beispiel Veränderungen des Rezeptorprofils und damit einem veränderten Ansprechen auf unterschiedliche Wachstumsfaktoren einhergehen, ausgeschlossen werden kann es jedoch nicht.

Außerdem stellen in dreidimensionalen Versuchen die Verwendung von Matrigel und die Zugabe des ROCK-Inhibitors Y-27632 zum Kulturmedium wichtige Einflussfaktoren auf das Outcome der Zellvitalität dar. Bedingt durch eben diese Unterschiede in den Kultivierungsbedingungen lassen sich kaum Vergleiche zwischen diesem dreidimensionalen Vitalitätsassay und vorangegangenen Proliferationsassays in zweidimensionalen Zellkulturen ziehen. Es konnte daher keine Eingrenzung auf bestimmte Einzelfaktoren oder Kombinationen erfolgen, was nachfolgende Versuchsansätze an humanen dreidimensionalen Blasentumororganoiden erforderlich machte.

#### **4.4 3D-Cell-Viability-Assay an humanen Blasentumororganoiden**

Der Vitalitätsassay wurde an der dreidimensionalen Kultur des humanen Blasentumororganoids BCO#270 mittels 3D-Cell-Viability-Assay durchgeführt. Es erfolgte nochmals nach vorangegangenen dreidimensionalen Versuchen an Zell- und Tumorkulturen die Testung der Wachstumsfaktoren HGF, EGF, FGF2 und Neuregulin sowie verschiedener Kombinationen eben dieser ausgewählten Wachstumsfaktoren.

Die Ergebnisse dieses Versuchansatzes zeigten im gegebenen Setting, dass alle Wachstumsfaktoren als Einzelfaktor oder in Kombination ebenso wie das verwendete Mangelmedium 2 eine deutliche Steigerung der Zellproliferation gegenüber den eigentlich als Positivkontrollen angedachten Medien BTM und HCM nach Lee et al. zeigten. Der Vergleich zwischen den beiden Medien BTM und HCM nach Lee et al. zeigte zudem, dass das humane Blasentumororganoid BCO#270 auch in späteren Passagen (P11) eher eine Affinität gegenüber dem Medium BTM aufweist. Laut Mitarbeitern des ZMF, welche dieses Organoid während den Versuchsreihen weiter passagierten, zeigte sich in den mittleren Passagen aber auch eine mikroskopisch beobachtete Proliferationssteigerung unter Verwendung von HCM nach Lee et al. als Kulturmedium. Dies könnte bedingt sein durch eine Veränderung auf mRNA- und/oder Rezeptorebene innerhalb der Passagezeiträume mit einem daraus resultierenden veränderten Ansprechen auf verschiedene Wachstumsfaktoren. Die Detektion solcher Veränderungen innerhalb der Passagezeiträume von humanen Blasentumororganoiden war Gegenstand einer parallelen Arbeit von cand. med. Philipp Vollmer. Bestätigende oder widerlegende Daten zu dieser These stehen nach aktuellem Stand (April 2023) noch aus. Daten aus der Forschungsarbeit von Sachs und Kollegen geben aber Hinweise darauf, dass das Kulturmedium von Organoiden wechselnden Ansprüchen der Zellen angepasst werden muss. Die Forschungsgruppe fügte dem Kulturmedium von Brustkrebsorganoiden den Wachstumsfaktor EGF (5ng/ml) zu, reduzierte diese Konzentration jedoch oder verwendete ein EGF-freies Medium bei Auffälligkeiten im Organoidwachstum (Sachs et al., 2018).

Grundsätzlich muss noch die Konzipierung dieses Versuchsansatz kritisch hinterfragt werden. Die Zellen der Zell- und Tumorkulturen aus den vorangegangenen dreidimensionalen Assays wurden vor Ansetzen des Vitalitätsassays jeweils in ihrem Standardmedium unter Zugabe des ROCK-Inhibitors Y-27632 kultiviert. Das Blasentumororganoid BCO#270 hingegen wurde zuvor im Medium BTM in Kultur gehalten, welches jedoch im nachfolgenden Assay als eine der Positivkontrollen neben dem Medium HCM nach Lee et al. eingesetzt wurde. Demnach hätte BCO#270 gegebenenfalls Adaptationen an das Kulturmedium BTM aufweisen können. Außerdem wurde für das Ansetzen dieses Versuchs ein abweichendes Protokoll für die Passage der Organoide angewandt. Diese Abweichung bei der Passage war erforderlich, um Matrigelreste vollständig zu entfernen und die benötigten Zellen effektiv zu trennen, um eine anschließende Zellzählung zu garantieren. Eine Zellzählung war dennoch nicht möglich, da trotz intensiver enzymatischer Verdauung mikroskopisch Zellcluster zurückblieben. Diese hätten eine Zellzählung verfälscht. Aus diesem Grund musste die in die neuen Domes eingebrachte Zellzahl geschätzt werden. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Zellen des BCO#270 durch das veränderte Passageprotokoll geschädigt wurden. Der aggressive enzymatische Verdau des Matrigels könnte auch die äußersten Zellen der Organoide geschädigt haben. Wenn beim Resuspendieren der Zellen nun eine Akkumulation gegebenenfalls vorgeschädigter Zellen innerhalb eines Ansatzes erfolgt wäre, könnte dies die Ergebnisse an humanen Blasentumororganoiden teilweise verfälschen.

Außerdem wurde mehrfach die Heterogenität von Blasenkarzinomen und damit daraus generierter Organoide angebracht, was Screens an mehr als einem einzelnen humanen Blasentumororganoid erforderlich gemacht hätte, um aussagekräftige Daten zur Definierung eines verbesserten Kulturmediums zu erhalten. Bedingt durch den Mangel an Rückstellproben innerhalb des im Labor etablierten Organoidpools war eine Testung an mehr als einer Blasentumororganoidlinie jedoch nicht möglich. Zudem sind ergänzende Vergleiche, welche die Auswahl eines Medienansatzes gerechtfertigt hätte, zu vorangegangenen Vitalitätsassays an Zell- und Tumorkulturen schwer zu ziehen.

Zum einen, da für „3.4 3D-Cell-Viability-Assay an humanen Blasentumororganoiden“ nicht Matrigel von Corning, sondern Matrigel Cultrex RGF BME, Type 2 von R&D Systems verwendet wurde. Dies war Lieferengpässen der Materialien geschuldet und wurde bei Planung der Versuchsreihen nicht beabsichtigt, stellt aber eine nicht zu unterschätzende Störgröße dar. Zum anderen muss auch die zu geringe Stichprobengröße der verwendeten Zell- und Tumorlinien mit  $n=2$  angebracht werden.

Basierend auf diesen möglichen Fehler beim Ansetzen des Vitalitätsassays und der zu kleinen Stichprobengrößen konnte basierend auf den Daten dieser Arbeit letztendlich kein verbessertes Kulturmedium für humane Blasentumororganoiden definiert werden.

#### **4.5 Ausblick**

Bedingt durch die Erkenntnisse dieser Arbeit müssen im Rahmen künftiger Forschungsarbeiten weitere Screens, vornehmlich an dreidimensionalen Kulturen humaner Tumorkulturen und Blasen-Tumorganoide, durchgeführt werden zur Etablierung eines verbesserten Kulturmediums. Voraussetzung dafür ist jedoch, dass im Labor ggf. weitere Organoide aus Patientenproben generiert oder noch vorhandene Rückstellproben ausreichend expandiert werden können. Zudem muss die Konzipierung weiterer Screens, wie oben angesprochen, überdacht und angepasst werden.

Abschließend muss noch angebracht werden, dass ein verbessertes Kulturmedium als Einzelfaktor vermutlich nicht ausreicht, um die Effizienz zur Generierung von humanen Blasen-Tumorganoide im Labor ausreichend steigern zu können. Auch die Zusammensetzung verwendeter Transportmedien, der anfängliche Verdau des Patientenmaterials zur Gewinnung der Tumorzellen oder die Protokolle zur Passage der Organoide sollten, trotz bereits erfolgter Änderungen, überdacht und ggf. weiter angepasst werden. Auch eine stetige Anpassung eines später etablierten Kulturmediums erachte ich als notwendig, um auf phänotypische Veränderungen oder Auffälligkeiten in der Proliferation der Blasen-Tumorganoide adäquat reagieren zu können, wie bereits für Organoide aus Brustkrebsgewebe beschrieben (s.o.) (Sachs et al., 2018).

Grundlegend sollte aber auch überlegt werden, dass aktuell bestehende Organoidmodell weiterzuentwickeln, um die Verhältnisse im Primärtumor noch besser rekapitulieren zu können. Ein möglicher Ansatz könnten sogenannte „Assembloide“ sein, welche nach Kim et al. eine „3D reconstitution of adult stem or cancer cells with multiple components of tissue stroma“ darstellen (Kim et al., 2020). Auch müssen künftig Limitationen wie das Fehlen von Nerven, Blutgefäßen und Immunzellen (Clevers, 2016) bereinigt werden, damit Organoide ein noch effizienteres Tool der Forschung und personalisierten Medizin werden.

## 5 Zusammenfassung

Das Harnblasenkarzinom ist nach dem Prostatakarzinom die zweithäufigste Tumorentität des Urogenitaltraktes sowie das viert häufigste Karzinom des Mannes. Es bedarf teilweise aufwendiger chirurgischer Interventionen und mögliche nebenwirkungsreiche Chemotherapien oder intravesikale Instillationen für eine Kuration. Um beispielsweise Vorabprognosen bezüglich der Wirksamkeit und Effektivität angewandeter Therapeutika im Rahmen von Medikamententestungen zu ermöglichen, werden alternative in-vitro Zellkulturmodelle benötigt.

Organoide als dreidimensionale Zellkulturen scheinen eine solche Alternative zu sein und stellen einen erfolgsversprechenden Ansatz in der Tumorforschung dar, vor allem da sie im Vergleich zu häufig in Laboren verwendeten zweidimensionalen Kulturen die Charakteristika ihres Primärtumors besser rekapitulieren. Bislang konnten aus verschiedensten humanen, sowohl benignen als auch malignen, Geweben Organoide kultiviert werden, ebenfalls aus Harnblasenkarzinomen.

Vorarbeiten im Labor zeigten, dass unter Verwendung des eigenen etablierten Kulturmediums die Ausbeute zur Generierung von Organoidkulturen aus humanen Harnblasenkarzinomen deutlich geringer war als in anderen Arbeiten aus der Literatur. Um die Effizienz der Generierung und Kultivierung zu steigern, war es Ziel dieser Arbeit, ein nochmals verbessertes Kulturmedium zur Nährstoffversorgung der Organoide zu etablieren und somit die Anwendung der Organoide im Rahmen der personalisierten Medizin weiter voranzutreiben.

Nach vorangegangenen Vorversuchen wurden Proliferationsassays an zweidimensionalen Zellkulturen der Zelllinie HBLAKs und der Tumورlinie UM-UC-15 durchgeführt, um deren Ansprechen auf insgesamt neun verschiedene Wachstumsfaktoren (EGF, FGF2, HGF, IGF-1, Neuregulin, Noggin, R-Spondin 1, A83-01, TGF- $\beta$ 1) in mehreren Konzentrationen zu testen. Aus der Gesamtschau dieser Screeningdaten wurden für nachfolgende Proliferationsassays in dreidimensionalen Kulturen folgende Wachstumsfaktoren ausgewählt: HGF (50ng/ml), FGF2 (6ng/ml), EGF

(25ng/ml) und Neuregulin (5nM). In die dreidimensionalen Proliferationsassays wurden erneut die Zelllinie HBLAKs und die Tumorzelllinie UM-UC-15 eingeschlossen und die zuvor ausgewählten Wachstumsfaktoren HGF, FGF2, EGF und Neuregulin nochmals als Einzelkomponenten sowie in verschiedenen Kombinationen bezüglich ihres proliferativen Effekts auf das Zellwachstum gescreent. Ebenfalls erfolgte die Testung der Faktoren als Einzelkomponente und in Kombination an Kulturen des humanen Blasen-Tumororganoids BCO#270. Die Daten für die Tumorzelllinie UM-UC-15 lieferte vielversprechende Ergebnisse für EGF als Einzelkomponente und fünf verschiedene Kombinationen an Faktoren: Mix komplett (HGF+FGF2+EGF+Neuregulin), Mix 1(HGF+Neuregulin), Mix 2 (HGF+EGF), Mix 4 (HGF+FGF2+Neuregulin) und Mix 5 (HGF+EGF+FGF2). Für BCO#270 konnte gezeigt werden, dass alle Faktoren als Einzelkomponenten und in Kombination beinahe gleichermaßen das Zellwachstum stimulierten. Das Medium BTM aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe sowie das aus der Literatur übernommene Medium HCM konnten diesen proliferativen Effekt nicht induzieren.

Bedingt durch verschiedene Störvariablen innerhalb der Screens an dreidimensionalen Kulturen und vor allem der zu kleinen Stichprobengrößen mit lediglich n=1 für humane Blasen-Tumororganoidkulturen konnte letztendlich kein verbessertes Kulturmedium definiert werden.

Im Rahmen künftiger Forschungsarbeiten sind daher weitere Screens an dreidimensionalen Kulturen humaner Tumorzelllinien und Blasen-Tumororganoidkulturen erforderlich ebenso wie die Optimierung weiterer Aspekte der Organoidkultivierung.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abdollah, F., Sun, M., Shariat, S. F., Schmitges, J., Djahangirian, O., Tian, Z., Jeldres, C., Perrotte, P., Montorsi, F., & Karakiewicz, P. I. (2011). The importance of pelvic lymph node dissection in the elderly population: implications for interpreting the 2010 National Comprehensive Cancer Network practice guidelines for bladder cancer treatment. *J Urol*, *185*(6), 2078-2084. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2011.02.022>
- Aboulkheyr Es, H., Montazeri, L., Aref, A. R., Vosough, M., & Baharvand, H. (2018). Personalized Cancer Medicine: An Organoid Approach. *Trends Biotechnol*, *36*(4), 358-371. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.12.005>
- Bartfeld, S., & Clevers, H. (2017). Stem cell-derived organoids and their application for medical research and patient treatment. *J Mol Med (Berl)*, *95*(7), 729-738. <https://doi.org/10.1007/s00109-017-1531-7>
- Bashir, M., Damineni, S., Mukherjee, G., & Kondaiah, P. (2015). Activin-A signaling promotes epithelial-mesenchymal transition, invasion, and metastatic growth of breast cancer. *NPJ Breast Cancer*, *1*, 15007. <https://doi.org/10.1038/npjbcancer.2015.7>
- Bieback, K., Kern, S., Kluter, H., & Eichler, H. (2004). Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*, *22*(4), 625-634. <https://doi.org/10.1634/stemcells.22-4-625>
- Birder, L. A. (2005). More than just a barrier: urothelium as a drug target for urinary bladder pain. *Am J Physiol Renal Physiol*, *289*(3), F489-495. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00467.2004>
- Cancer Genome Atlas Research, N. (2014). Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*, *507*(7492), 315-322. <https://doi.org/10.1038/nature12965>
- Clevers, H. (2016). Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell*, *165*(7), 1586-1597. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.082>
- DeGeorge, K. C., Holt, H. R., & Hodges, S. C. (2017). Bladder Cancer: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician*, *96*(8), 507-514. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29094888>
- Deli, A., Kreidl, E., Santifaller, S., Trotter, B., Seir, K., Berger, W., Schulte-Hermann, R., Rodgarkia-Dara, C., & Grusch, M. (2008). Activins and activin antagonists in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, *14*(11), 1699-1709. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.1699>
- Drost, J., & Clevers, H. (2018). Organoids in cancer research. *Nat Rev Cancer*, *18*(7), 407-418. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0007-6>
- Drost, J., Karthaus, W. R., Gao, D., Driehuis, E., Sawyers, C. L., Chen, Y., & Clevers, H. (2016). Organoid culture systems for prostate epithelial and cancer tissue. *Nat Protoc*, *11*(2), 347-358. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.006>
- Gray, P. J., Lin, C. C., Jemal, A., Shipley, W. U., Fedewa, S. A., Kibel, A. S., Rosenberg, J. E., Kamat, A. M., Virgo, K. S., Blute, M. L., Zietman, A. L., & Efsthathiou, J. A. (2014). Clinical-pathologic stage discrepancy in bladder cancer patients treated with radical cystectomy: results from the

- national cancer data base. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 88(5), 1048-1056. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2014.01.001>
- Herr, H., Lee, C., Chang, S., Lerner, S., & Bladder Cancer Collaborative, G. (2004). Standardization of radical cystectomy and pelvic lymph node dissection for bladder cancer: a collaborative group report. *J Urol*, 171(5), 1823-1828; discussion 1827-1828. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000120289.78049.0e>
- Herr, H. W., Faulkner, J. R., Grossman, H. B., Natale, R. B., deVere White, R., Sarosdy, M. F., & Crawford, E. D. (2004). Surgical factors influence bladder cancer outcomes: a cooperative group report. *J Clin Oncol*, 22(14), 2781-2789. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.11.024>
- Huch, M., Knoblich, J. A., Lutolf, M. P., & Martinez-Arias, A. (2017). The hope and the hype of organoid research. *Development*, 144(6), 938-941. <https://doi.org/10.1242/dev.150201>
- Illert, A. L., Stenzinger, A., Bitzer, M., Horak, P., Gaidzik, V. I., Moller, Y., Beha, J., Oner, O., Schmitt, F., Lassmann, S., Ossowski, S., Schaaf, C. P., Hallek, M., Brummendorf, T. H., Albers, P., Fehm, T., Brossart, P., Glimm, H., Schadendorf, D., . . . Malek, N. P. (2023). The German Network for Personalized Medicine to enhance patient care and translational research. *Nat Med*. <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02354-z>
- Kang, H. Y., Huang, H. Y., Hsieh, C. Y., Li, C. F., Shyr, C. R., Tsai, M. Y., Chang, C., Chuang, Y. C., & Huang, K. E. (2009). Activin A enhances prostate cancer cell migration through activation of androgen receptor and is overexpressed in metastatic prostate cancer. *J Bone Miner Res*, 24(7), 1180-1193. <https://doi.org/10.1359/jbmr.090219>
- Katiyar, P., Schwenck, J., Frauenfeld, L., Divine, M. R., Agrawal, V., Kohlhofer, U., Gatidis, S., Kontermann, R., Konigsrainer, A., Quintanilla-Martinez, L., la Fougere, C., Scholkopf, B., Pichler, B. J., & Disselhorst, J. A. (2023). Quantification of intratumoural heterogeneity in mice and patients via machine-learning models trained on PET-MRI data. *Nat Biomed Eng*. <https://doi.org/10.1038/s41551-023-01047-9>
- Kim, E., Choi, S., Kang, B., Kong, J., Kim, Y., Yoon, W. H., Lee, H. R., Kim, S., Kim, H. M., Lee, H., Yang, C., Lee, Y. J., Kang, M., Roh, T. Y., Jung, S., Kim, S., Ku, J. H., & Shin, K. (2020). Creation of bladder assembloids mimicking tissue regeneration and cancer. *Nature*, 588(7839), 664-669. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-3034-x>
- Koskela, S., Lehtonen, S., Santala, M., Venhola, M., Parpala-Sparman, T., & Lehenkari, P. (2009). 17beta-estradiol induces the proliferation of the in vitro cultured human urothelium. *Scand J Urol Nephrol*, 43(3), 179-185. <https://doi.org/10.1080/00365590902799005>
- Langbein, S., Badawi, K., Haecker, A., Weiss, C., Hatzinger, M., Alken, P., & Siegsmond, M. (2006). Persistence, recurrence, and progression rates of superficial bladder tumours after resection using the differentiated technique. *Med Princ Pract*, 15(3), 215-218. <https://doi.org/10.1159/000092184>
- 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., . . . Shen, M. M. (2018). Tumor Evolution and Drug Response in Patient-Derived Organoid Models of Bladder Cancer. *Cell*, *173*(2), 515-528 e517. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.017>
- Lonardo, E., Hermann, P. C., Mueller, M. T., Huber, S., Balic, A., Miranda-Lorenzo, I., Zagorac, S., Alcalá, S., Rodríguez-Arabaolaza, I., Ramirez, J. C., Torres-Ruiz, R., Garcia, E., Hidalgo, M., Cebrian, D. A., Heuchel, R., Lohr, M., Berger, F., Bartenstein, P., Aicher, A., & Heeschen, C. (2011). Nodal/Activin signaling drives self-renewal and tumorigenicity of pancreatic cancer stem cells and provides a target for combined drug therapy. *Cell Stem Cell*, *9*(5), 433-446. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.10.001>
- Maenhoudt, N., Defraye, C., Boretto, M., Jan, Z., Heremans, R., Boeckx, B., Hermans, F., Arijis, I., Cox, B., Van Nieuwenhuysen, E., Vergote, I., Van Rompuy, A. S., Lambrechts, D., Timmerman, D., & Vankelecom, H. (2020). Developing Organoids from Ovarian Cancer as Experimental and Preclinical Models. *Stem Cell Reports*, *14*(4), 717-729. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.03.004>
- Mariappan, P., Finney, S. M., Head, E., Somani, B. K., Zachou, A., Smith, G., Mishriki, S. F., N'Dow, J., Grigor, K. M., & Edinburgh Urological Cancer, G. (2012). Good quality white-light transurethral resection of bladder tumours (GQ-WLTURBT) with experienced surgeons performing complete resections and obtaining detrusor muscle reduces early recurrence in new non-muscle-invasive bladder cancer: validation across time and place and recommendation for benchmarking. *BJU Int*, *109*(11), 1666-1673. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2011.10571.x>
- Minoli, M., Kiener, M., Thalmann, G. N., Kruithof-de Julio, M., & Seiler, R. (2020). Evolution of Urothelial Bladder Cancer in the Context of Molecular Classifications. *Int J Mol Sci*, *21*(16). <https://doi.org/10.3390/ijms21165670>
- Mullenders, J., de Jongh, E., Brousalı, 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*(10), 4567-4574. <https://doi.org/10.1073/pnas.1803595116>
- Nishiyama, H., Habuchi, T., Watanabe, J., Teramukai, S., Tada, H., Ono, Y., Ohshima, S., Fujimoto, K., Hirao, Y., Fukushima, M., & Ogawa, O. (2004). Clinical outcome of a large-scale multi-institutional retrospective study for locally advanced bladder cancer: a survey including 1131 patients treated during 1990-2000 in Japan. *Eur Urol*, *45*(2), 176-181. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2003.09.011>
- 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., . . . Rubin, M. A. (2017). Personalized In Vitro and In Vivo Cancer Models to Guide Precision Medicine. *Cancer Discov*, *7*(5), 462-477. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-1154>

- Power, N. E., Kassouf, W., Bell, D., Aprikian, A. G., Fradet, Y., Lacombe, L., Chin, J., Izawa, J., Estey, E., Fairey, A., Cagiannos, I., Lattouf, J. B., Drachenberg, D., & Rendon, R. A. (2012). Natural history of pT3-4 or node positive bladder cancer treated with radical cystectomy and no neoadjuvant chemotherapy in a contemporary North-American multi-institutional cohort. *Can Urol Assoc J*, 6(6), E217-223.  
<https://doi.org/10.5489/cuaj.11012>
- Richterstetter, M., Wullich, B., Amann, K., Haeberle, L., Engehausen, D. G., Goebell, P. J., & Krause, F. S. (2012). The value of extended transurethral resection of bladder tumour (TURBT) in the treatment of bladder cancer. *BJU Int*, 110(2 Pt 2), E76-79.  
<https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2011.10904.x>
- Rink, M., Shariat, S. F., Xylinas, E., Fitzgerald, J. P., Hansen, J., Green, D. A., Kamat, A. M., Novara, G., Daneshmand, S., Fradet, Y., Tagawa, S. T., Bastian, P. J., Kassouf, W., Trinh, Q. D., Karakiewicz, P. I., Fritsche, H. M., Tilki, D., Chun, F. K., Volkmer, B. G., . . . Svatek, R. S. (2012). Does increasing the nodal yield improve outcomes in patients without nodal metastasis at radical cystectomy? *World J Urol*, 30(6), 807-814.  
<https://doi.org/10.1007/s00345-012-0910-5>
- Robertson, A. G., Kim, J., Al-Ahmadie, H., Bellmunt, J., Guo, G., Cherniack, A. D., Hinoue, T., Laird, P. W., Hoadley, K. A., Akbani, R., Castro, M. A. A., Gibb, E. A., Kanchi, R. S., Gordenin, D. A., Shukla, S. A., Sanchez-Vega, F., Hansel, D. E., Czerniak, B. A., Reuter, V. E., . . . Lerner, S. P. (2017). Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cell*, 171(3), 540-556 e525.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.007>
- Ruck, A., Jakobson, E., Bjorkman, S., & Paulie, S. (1994). Adaptation of human bladder carcinoma cell lines to serum-free growth. Evidence for autocrine growth stimulation. *Anticancer Res*, 14(1A), 55-60.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8166456>
- Sachs, N., de Ligt, J., Kopper, O., Gogola, E., Bounova, G., Weeber, F., Balgobind, A. V., Wind, K., Gracanin, A., Begthel, H., Korving, J., van Boxtel, R., Duarte, A. A., Lelieveld, D., van Hoeck, A., Ernst, R. F., Blokzijl, F., Nijman, I. J., Hoogstraat, M., . . . Clevers, H. (2018). A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell*, 172(1-2), 373-386 e310. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.010>
- Seder, C. W., Hartojo, W., Lin, L., Silvers, A. L., Wang, Z., Thomas, D. G., Giordano, T. J., Chen, G., Chang, A. C., Orringer, M. B., & Beer, D. G. (2009). Upregulated INHBA expression may promote cell proliferation and is associated with poor survival in lung adenocarcinoma. *Neoplasia*, 11(4), 388-396. <https://doi.org/10.1593/neo.81582>
- Sivalingam, S., Probert, J. L., & Schwaibold, H. (2005). The role of repeat transurethral resection in the management of high-risk superficial transitional cell bladder cancer. *BJU Int*, 96(6), 759-762.  
<https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2005.05710.x>
- S3-Leitlinie Harnblasenkarzinom [Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Langversion 2.0, März 2020]

- Teng, J., Wang, Z. Y., & Bjorling, D. E. (2002). Estrogen-induced proliferation of urothelial cells is modulated by nerve growth factor. *Am J Physiol Renal Physiol*, 282(6), F1075-1083. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00215.2001>
- Teng, J., Wang, Z. Y., Jarrard, D. F., & Bjorling, D. E. (2008). Roles of estrogen receptor alpha and beta in modulating urothelial cell proliferation. *Endocr Relat Cancer*, 15(1), 351-364. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01255>
- Vianello, A., Costantini, E., Del Zingaro, M., Bini, V., Herr, H. W., & Porena, M. (2011). Repeated white light transurethral resection of the bladder in nonmuscle-invasive urothelial bladder cancers: systematic review and meta-analysis. *J Endourol*, 25(11), 1703-1712. <https://doi.org/10.1089/end.2011.0081>
- Vlachogiannis, G., Hedayat, S., Vatsiou, A., Jamin, Y., Fernandez-Mateos, J., Khan, K., Lampis, A., Eason, K., Huntingford, I., Burke, R., Rata, M., Koh, D. M., Tunariu, N., Collins, D., Hulkki-Wilson, S., Ragulan, C., Spiteri, I., Moorcraft, S. Y., Chau, I., . . . Valeri, N. (2018). Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers. *Science*, 359(6378), 920-926. <https://doi.org/10.1126/science.aao2774>
- Wang, M., Zhang, J., & Gong, N. (2022). Role of the PI3K/Akt signaling pathway in liver ischemia reperfusion injury: a narrative review. *Ann Palliat Med*, 11(2), 806-817. <https://doi.org/10.21037/apm-21-3286>
- Wildi, S., Kleeff, J., Maruyama, H., Maurer, C. A., Buchler, M. W., & Korc, M. (2001). Overexpression of activin A in stage IV colorectal cancer. *Gut*, 49(3), 409-417. <https://doi.org/10.1136/gut.49.3.409>
- Yafi, F. A., Aprikian, A. G., Chin, J. L., Fradet, Y., Izawa, J., Estey, E., Fairey, A., Rendon, R., Cagiannos, I., Lacombe, L., Lattouf, J. B., Bell, D., Drachenberg, D., & Kassouf, W. (2011). Contemporary outcomes of 2287 patients with bladder cancer who were treated with radical cystectomy: a Canadian multicentre experience. *BJU Int*, 108(4), 539-545. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2010.09912.x>
- Yoshida, T., Singh, A. K., Bishai, W. R., McConkey, D. J., & Bivalacqua, T. J. (2018). Organoid culture of bladder cancer cells. *Investig Clin Urol*, 59(3), 149-151. <https://doi.org/10.4111/icu.2018.59.3.149>
- Yoshida, T., Sopko, N. A., Kates, M., Liu, X., Joice, G., McConkey, D. J., & Bivalacqua, T. J. (2018). Three-dimensional organoid culture reveals involvement of Wnt/beta-catenin pathway in proliferation of bladder cancer cells. *Oncotarget*, 9(13), 11060-11070. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24308>
- Yu, L., Li, Z., Mei, H., Li, W., Chen, D., Liu, L., Zhang, Z., Sun, Y., Song, F., Chen, W., & Huang, W. (2021). Patient-derived organoids of bladder cancer recapitulate antigen expression profiles and serve as a personal evaluation model for CAR-T cells in vitro. *Clin Transl Immunology*, 10(2), e1248. <https://doi.org/10.1002/cti2.1248>
- Yuan, S., Norgard, R. J., & Stanger, B. Z. (2019). Cellular Plasticity in Cancer. *Cancer Discov*, 9(7), 837-851. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0015>

Zhang, L., Zhou, F., & ten Dijke, P. (2013). Signaling interplay between transforming growth factor-beta receptor and PI3K/AKT pathways in cancer. *Trends Biochem Sci*, 38(12), 612-620.  
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.10.001>

## **7 Erklärung zum Eigenanteil**

Die Forschungsarbeit wurde im Universitätsklinikum Tübingen in der Klinik für Urologie unter Betreuung von OA PD Dr. med. Bastian Amend, clinical scientist des GRK2543 OA Dr. med. Niklas Harland und Prof. Dr. Wilhelm K. Aicher durchgeführt.

Die Konzeption der Arbeit erfolgte durch OA PD Dr. Bastian Amend in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Wilhelm K. Aicher und clinical scientist des GRK2543 OA Dr. Niklas Harland.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitarbeiter und -Mitarbeiterinnen von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich nach Anleitung und Einarbeitung durch Moritz Greiner.

Ich versichere, das Manuskript nach Anleitung durch OA PD Dr. med. Bastian Amend, clinical scientist des GRK2543 OA Dr. med. Niklas Harland und Prof. Dr. Wilhelm K. Aicher selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 17.06.2023

Lea-Madlen Fundel

## **8 Danksagung**

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

Ein besonderer Dank geht an OA PD Dr. med. Bastian Amend und clinical scientist des GRK2543 OA Dr. med. Niklas Harland für die Überlassung des Themas, für die unermüdlichen Bemühungen im Rahmen des IZKF-Stipendiums und die Unterstützung beim Anfertigen dieser Arbeit.

Ein weiteres großes Dankeschön geht an Prof. Dr. Wilhelm K. Aicher für die Bereitstellung seiner Laborräume und die wissenschaftliche Betreuung im Laboralltag sowie ebenfalls beim Anfertigen dieser Arbeit.

Desweiteren möchte ich mich herzlich bedanken bei:

Tanja Abruzzese, Conny Bock, Jasmin Knoll und Markus Kühs für die unendlich tolle Einarbeitung im Labor und die geduldige Unterstützung in jeglicher Notlage.

Dr. med. Simon Walz für die fachliche Betreuung und cand. med. Philipp Vollmer für die anregenden Besprechungen und die Unterstützung im Labor.

Allen Mitarbeitern und Kollegen des ZMF sowie der Klinik für Urologie, die die Umsetzung dieser Arbeit mit ermöglicht haben.

Moritz Greiner für die Einarbeitung und Anleitung zur statistischen Auswertung meiner Daten.

Dr. rer. nat. André Koch für die Mithilfe bei der Vorauswahl relevanter Wachstumsfaktoren und der Möglichkeit zum Austausch.

Dem IZKF-Stipendium und besonders Dr. Tanja Rieß für die tolle fachliche Unterstützung, für die regelmäßigen motivierenden Schreibworkshops und die Möglichkeit zum Austausch mit anderen Doktoranden und Doktorandinnen.

Ich bedanke mich herzlichst bei meinen Freunden, bei meinen Großeltern und meinen Geschwistern, die immer an mich geglaubt haben. Ein weiteres Dankeschön geht nochmals vor allem an Jana und Dom, ohne euer Vertrauen in mich und eurer Zureden hätte ich diesen Schritt nicht gewagt.

Und abschließend ein riesiges Dankeschön an meine Eltern, Flo und Merlin. Ihr habt mich zu dem Menschen gemacht, der ich heute bin, und mich nie aufgegeben. Ich bin euch unendlich dankbar für alles, was ihr für mich getan habt.

*„Nicht am Ziel wird der Mensch groß, sondern auf dem Weg dorthin.“*

~Ralph Waldo Emerson