

Aus dem  
Universitätsklinikum Tübingen  
Klinik für Urologie

**In vitro Transkriptomuntersuchungen in  
Patienten-abgeleiteten Blasentumororganoiden  
im zeitlichen Verlauf der Kultivierungsperiode**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Vollmer, Philipp Markus Kurt

2026

Dekan: Professor Dr. ing. B. Pichler

1. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Amend
2. Berichterstatter: Prof. Dr. S. Nahsen
3. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Sauter

Tag der Disputation: 11.12.2025

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung	12
1.1 Harnblase	13
1.2 Harnblasenkarzinom	14
1.2.1 Epidemiologie und Risikofaktoren	14
1.2.2 Früherkennung und Diagnostik	15
1.2.3 Therapie	16
1.3 Organoide und 3D-Kulturen	18
1.3.1 Grundlagen	18
1.3.2 Blasentumororganoide	21
1.3.3 Transcriptomics in Organoiden	23
1.4 Molekulare Marker des BC	24
1.4.1 HER2/neu	24
1.4.2 CD24	24
1.4.3 CD44	25
1.4.4 CD47	25
1.4.5 PD-L1	25
1.4.6 FGFR3	25
1.4.7 CD276	26
1.4.8 STAG2	26
1.4.9 ERCC2	26
1.4.10 HRAS	26
1.4.11 BRCA1	27
1.4.12 TSC1	27
1.4.13 TP53	27
1.4.14 PIK3CA	27
1.4.15 PTEN	28
1.4.16 ANGPTL4	28
1.5 Zielsetzung der Arbeit	28

2	Material und Methoden	29
2.1	Chemikalien und Reagenzien	29
2.2	Medien	31
2.3	Geräte und Verbrauchsmittel	34
2.4	Primer (qRT-PCR)	35
2.5	Zelllinien	37
2.6	Blasentumororganoide (BCOs)	37
2.7	Allgemeine Methodik	38
2.8	Probengewinnung und -transport	38
2.8.1	Probengewinnung und -transport zum ZMF	38
2.8.2	Probengewinnung und -transport zum Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik Tübingen	38
2.9	Zellkulturversuche	39
2.9.1	Zellen auftauen	39
2.9.2	Umsetzen von Zellen in 2D-Kulturen	39
2.9.3	Gewebe in eine BME-3D-Zellkultur nehmen	40
2.9.4	In 3D-Kultur nehmen mit GrowDex®	42
2.9.5	Passagieren von 3D-Zellkulturen in BME	43
2.9.6	Splitten von 3D-Zellkulturen mit Dispase II	44
2.9.7	Auflösen von BME in 3D-Zellkulturen	45
2.9.8	3D-Matrixauflösen mit GrowDase®	47
2.9.9	Zellzählung	47
2.10	Differential gene expression	48
2.11	RNA und qRT-PCR	48
2.11.1	RNA-Extraktion mit dem RNeasy® Mini Kit (250)	49
2.11.2	Umschreiben von RNA in cDNA	49
2.11.3	Primer-Mix herstellen	50
2.11.4	qRT-PCR mit dem LightCycler 480 II	51
2.11.5	Bestimmung von Primer-Efficiencies	52
2.11.6	Gelgießen der PCR-Produkte	53
2.12	Software	54
3	Ergebnisse	54

3.1	Vorversuche zur Etablierung und Verbesserung von Methoden	54
3.1.1	Optimierung der RNA-Extraktion aus 3D-Zellkulturen in BME	54
3.1.2	Vergleich verschiedener ECM-Analoga	65
3.2	Hauptversuche zum zeitlichen Transkriptionsvergleich in BCOs	72
3.2.1	Differential gene expression der bulkRNA	76
3.2.2	Quantitative Expression ausgewählter Transkripte	81
4	Diskussion	93
4.1	Verbesserung der RNA-Extraktion aus BMEs	93
4.2	Vergleich der RNA-Extraktionskonzentration zwischen verschiedenen Hydrogelen	95
4.3	Transkriptomvergleich der BCO-Linien im zeitlichen Verlauf der Kultivierung	97
5	Zusammenfassung	103
6	Literaturverzeichnis	105
7	Erklärung zum Eigenanteil	114
8	Veröffentlichungen	115
9	Danksagung	116

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten nach Geschlecht je 100.000 Einwohner, ICD-10 C67, Deutschland 1999-2020/2021 (Entnommen aus Krebs in Deutschland für 2019/2020 (2023): URL: <a href="https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_2023.pdf?__blob=publicationFile">https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_2023.pdf?__blob=publicationFile</a> , [14.12.2023]). ...	14
Abbildung 2: Komplikationsraten der radikalen Zystektomie und Harnableitung nach operativer Methode entsprechend der Clavien-Graduierung (Entnommen aus AWMF Online (2020): URL: <a href="https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-038OLI_S3_Harnblasenkarzinom_2020-04-ve">https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-038OLI_S3_Harnblasenkarzinom_2020-04-ve</a> [23.06.2022]).	17
Abbildung 3: Anwendungsgebiete von Organoiden. „OMICS“ = Oberbegriff für molekularbiologische Methoden. (Entnommen aus Corrà (2020): A brief history of organoids [24.06.2022]) CC-BY 4.0: © the American Physiological Society.	19
Abbildung 4: Vergleich verschiedener in vivo und in vitro Krankheitsmodelle. PDO = patient-derived organoid. PDX = patient-derived xenograft. GEMM = genetically engineered mouse models. (Entnommen aus Corrà (2020): A brief history of organoids [27.06.2022]) CC-BY 4.0: © the American Physiological Society. ...	20
Abbildung 5: Der durchgezogene Graph zeigt die RNA-Extraktionskonzentrationen von RT112 in 2D-Zellkulturen in Funktion zu der extrahierten Zellzahl. Der gepunktete Graph zeigt eine Ausgleichsgerade mit der Funktion $f(x) = 0,0005x + 0,1264$ . Abszisse: Zellzahl von RT112 in 2D. Ordinate: RNA (ng/ $\mu$ L).	58
Abbildung 6: Target-to-Reference-Ratios der qRT-PCR verschiedener Primer ausgehend von cDNAs der gepoolten Dome an RT112 in 3D.	60
Abbildung 7: Mittlere Cp-Werte der Target-Primer der qRT-PCR verschiedener Primer ausgehend von cDNAs der gepoolten Dome an RT112 in 3D.	61
Abbildung 8: Target-to-Reference-Ratios der qRT-PCR verschiedener Primer ausgehend von cDNAs der gepoolten Dome an BCO#140, 18. Passage, in BTM, in 3D.	63

Abbildung 9: Mittlere Cp-Werte der Target-Primer der qRT-PCR verschiedener Primer ausgehend von cDNAs der gepoolten Dome an BCO#140, 18. Passage, in BTM, in 3D.....	63
Abbildung 10: RNA-Extraktionskonzentrationen (ng/ $\mu$ L) der verschiedenen Ansätze mit BCO#270, 7. Passage, in BTM, in 3D. Ansatz 1: 15 min Trypsinierung und 40 $\mu$ L RNase-freies Wasser. Ansatz 2: 10 min Trypsinierung und 40 $\mu$ L RNase-freies Wasser. Ansatz 3: 15 min Trypsinierung und 20 $\mu$ L RNase-freies Wasser. ....	65
Abbildung 11: 3D-Kultur von UMUC-15 in MEM+, Tag 7. Hier zeigt sich ein ähnliches Wachstumsverhalten der UMUC-15-3D-Kultur im Vergleich zu BCOs. Zu sehen sind Sphäroide, bestehend aus runden Zellkonglomeraten mit einer peripheren Basalmembran-ähnlichen Begrenzung. ....	66
Abbildung 12: Boden einer 96-Well-Platte (F-Bottom) in 100-facher Vergrößerung nach dem Entfernen der im Hydrogel kultivierten Zellen und des mit GrowDase® aufgelösten GrowDex®. Zu sehen sind adhärent und sehr dicht gewachsene UMUC-15, welche sich sowohl als Einzelzellen als auch als Konglomerate präsentierten. ....	69
Abbildung 13: RNA-Konzentrationen in ng/ $\mu$ L der verschiedenen Ansätze. GD = GrowDex®; 10 min = 10 min Trypsinierung, ohne Vortex; 15 min = 15 min Trypsinierung mit Vortex.....	70
Abbildung 14: RNA-Konzentrationen in den verschiedenen Ansätzen in ng/ $\mu$ L pro Zelle (Z), die an $t_0$ ausgesät wurde. GD = GrowDex®; 10 min = 10 min Trypsinierung, ohne Vortex; 15 min = 15 min Trypsinierung mit Vortex. ....	71
Abbildung 15: Repräsentativer Ausschnitt der folgenden BCO-Kulturen in 100-facher Vergrößerung. Von links nach rechts: BCO#140, P3, in BTM, Tag 13. BCO#140, P7, in BTM, Tag 13. BCO#140, P11, in BTM, Tag 13. ....	75
Abbildung 16: Repräsentativer Ausschnitt der folgenden BCO-Kulturen in 100-facher Vergrößerung. Von links nach rechts: BCO#154, P2, in BTM, Tag 15. BCO#154, P7, in BTM, Tag 13. BCO#154, P22+24, in BTM, Tag 9. ....	75
Abbildung 17: Repräsentativer Ausschnitt der folgenden BCO-Kulturen in 100-facher Vergrößerung. Von links nach rechts: BCO#267, P8, in BTM, Tag 13. BCO#267, P12+15, in BTM, Tag 13.....	75

Abbildung 18: Repräsentativer Ausschnitt der folgenden BCO-Kulturen in 100-facher Vergrößerung. Von links nach rechts: BCO#270, P4, in BTM, Tag 12. BCO#270, P5-7, in BTM, Tag 12. BCO#270, P10, in BTM, Tag 13. .... 75

Abbildung 19: Sample distance heatmap der differential gene expression. Präsentiert sind die Expressionsprofile des Gesamttranskriptom der Zeitperioden  $t_{1-3}$  der BCO-Linien #140, #154, #270. Die Färbung jedes Vergleichsfeldes gibt die Ähnlichkeit der Expressionsprofile der verglichenen Zeitperioden an.  $t_1$ : frühe Passagen (P1-4),  $t_2$ : späte Passagen (P5-9),  $t_3$ : Langzeitpassagen (P>9). Eine dunkelblaue Färbung zeigt keine Unterschiede bzw. absolute Gleichheit der Transkriptome, eine hellblaue Färbung zeigt starke Unterschiede zwischen den Transkriptomen (siehe Skala rechts). (Entnommen aus Vollmer et al. (2024): Patient-derived bladder cancer organoids show stable transcript expression along cultivation [18.08.2024])..... 77

Abbildung 20: Sample distance heatmaps der differential gene expression. Zu sehen ist eine repräsentative Auswahl aus 100 Genen (inkl. accession number), welche in den verschiedenen Zeitperioden der BCO-Linien #140 (a), #154 (b) und #270 (c) exprimiert sind. Jedes Vergleichsfeld eines Gens zeigt die Expressionsähnlichkeit zwischen zwei Zeitperioden innerhalb einer BCO-Linie (siehe unterer Grafikbereich). Ein weißes Feld zeigt keine Unterschiede in der Expression, wohingegen ein schwarzes Feld einen Unterschied in der Expression anzeigt. DE = differentially expressed. (Entnommen aus Vollmer et al. (2024): Patient-derived bladder cancer organoids show stable transcript expression along cultivation [18.08.2024]). ..... 81

Abbildung 21: qRT-PCR Analysen der verschiedenen Zeitperiode der BCO-Linien. Die hier analysierten Transkripte sind eine Auswahl pathologisch-relevanter Blasentumor-Stammzellmarker. Die Abszisse zeigt die BCO-Linien mit ihren jeweiligen Zeitperioden. Die Ordinate zeigt die Target-to-Reference Cp Ratios. Die Targets wurden auf die Housekeeping-Primer GAPDH und beta-Actin normalisiert. CD = cluster of differentiation. (Entnommen aus Vollmer et al. (2024): Patient-derived bladder cancer organoids show stable transcript expression along cultivation [18.08.2024]). ..... 84

Abbildung 22: qRT-PCR Analysen der verschiedenen Zeitperiode der BCO-Linien. Die hier analysierten Transkripte sind eine Auswahl klinisch und pathologisch relevanter Marker. Die Abszisse zeigt die BCO-Linien mit ihren jeweiligen Zeitperioden. Die Ordinate zeigt die Target-to-Reference Cp Ratios. Die Targets wurden auf die Housekeeping-Primer GAPDH und beta-Aktin normalisiert. HER2 = human epidermal growth factor receptor 2. FGFR3 = fibroblast growth factor receptor 3. (Entnommen aus Vollmer et al. (2024): Patient-derived bladder cancer organoids show stable transcript expression along cultivation [18.08.2024])..... 85

Abbildung 23: qRT-PCR Analysen der verschiedenen Zeitperiode der BCO-Linien. Die hier analysierten Transkripte sind eine Auswahl pathologisch-relevanter Immunmodulatoren. Die Abszisse zeigt die BCO-Linien mit ihren jeweiligen Zeitperioden. Die Ordinate zeigt die Target-to-Reference Cp Ratios. Die Targets wurden auf die Housekeeping-Primer GAPDH und beta-Aktin normalisiert. PDL1 = programmed death ligand 1. CD = cluster of differentiation. (Entnommen aus Vollmer et al. (2024): Patient-derived bladder cancer organoids show stable transcript expression along cultivation [18.08.2024])..... 87

Abbildung 24: qRT-PCR Analysen der verschiedenen Zeitperiode der BCO-Linien. Die hier analysierten Transkripte sind eine Auswahl weiterer pathologisch-relevanter Blasentumormarker. Die Abszisse zeigt die BCO-Linien mit ihren jeweiligen Zeitperioden. Die Ordinate zeigt die Target-to-Reference Cp Ratios. Die Targets wurden auf die Housekeeping-Primer GAPDH und beta-Aktin normalisiert. TP53 = tumor suppressor protein 53. STAG2 = stromal antigen 2. ERCC2 = excision repair cross-contemplation group 2. HRAS = transforming protein 21. BRCA1 = breast cancer antigen 1. TSC1 = tuberous sclerosis complex subunit 1. PIK3CA = phosphatidylinositole-3-kinase. PTEN = phosphatase and tensin homolog. ANGPTL4 = angiopoietin-like 4 protein. (Entnommen aus Vollmer et al. (2024): Patient-derived bladder cancer organoids show stable transcript expression along cultivation [18.08.2024])..... 91

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien und deren Hersteller..... 29

Tabelle 2: Zusammensetzung verwendeter Medien..... 31

Tabelle 3: Geräte und Verbrauchsmittel und deren Hersteller.....	34
Tabelle 4: Verwendete qRT-PCR-Primer. ....	35
Tabelle 5: Annealing-Temperaturen der verwendeten Primer. ....	37
Tabelle 6: Zelllinien und deren Hersteller. ....	37
Tabelle 7: Verwendete BCO-Linien. ....	37
Tabelle 8: Verhältnis von $\mu\text{g}$ RNA zu depc-Water und oligo(dT)-Primern zur Umschreibung der RNA in cDNA. ....	49
Tabelle 9: Zusammensetzung des MasterMixes zur Umschreibung von RNA in cDNA. ....	50
Tabelle 10: Zusammensetzung des Inhaltes eines Wells bei einer qRT-PCR. ....	51
Tabelle 11: Zusammensetzung des Inhaltes eines Wells zur Bestimmung einer Primer-Efficiency. ....	52
Tabelle 12: RNA-Extraktionskonzentrationen ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) verschiedener BCO-Linien, welche mit alten Methoden extrahiert wurden. ....	55
Tabelle 13: Target-to-Reference-Ratios der qRT-PCRs verschiedener Primer ausgehend von cDNAs von BCO-Linien, die nach alten Protokollen synthetisiert wurden (Teil 1). Leer gelassene Felder stellen fehlende Messwerte dar. Fettkursiv markierte Werte zeigen Werte mit starken Abweichungen.....	55
Tabelle 14: Target-to-Reference-Ratios der qRT-PCRs verschiedener Primer ausgehend von cDNAs von BCO-Linien, die nach alten Protokollen synthetisiert wurden (Teil 2). Leer gelassene Felder stellen fehlende Messwerte dar. Fettkursiv markierte Werte zeigen Werte mit starken Abweichungen.....	55
Tabelle 15: RNA-Extraktionskonzentration ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) von verschiedenen Zellzahlen von RT112 aus 2D-Zellkulturen.....	57
Tabelle 16: RNA-Extraktionskonzentrationen ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) in Abhängigkeit von der Zahl der für die Extraktion gepoolten Dome und extrahierten Zellzahlen zum Zeitpunkt der Inkulturnahme ( $t_0$ ). Die verwendete Zellreihe ist RT112 in 3D....	59
Tabelle 17: Abschätzung der Zellzahlen vor der RNA-Extraktion ausgehend von der RNA-Extraktionskonzentration ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) von einer bestimmten Anzahl gepoolter Dome. Die Zellzahlen wurden mittels der angenäherten Funktion $f(x) = 0,0005x$ für die Ausgleichsgerade der RNA-Konzentrationen von RT112 in 2D in Abb. 5 berechnet. ....	59

Tabelle 18: Target-to-Reference-Ratios der qRT-PCR verschiedener Primer ausgehend von cDNAs der gepoolten Dome an RT112 in 3D. ....	60
Tabelle 19: Mittlere Cp-Werte der Target-Primer der qRT-PCR verschiedener Primer ausgehend von cDNAs der gepoolten Dome an RT112 in 3D.....	61
Tabelle 20: RNA-Extraktionskonzentrationen (ng/μL) in Abhängigkeit von der Zahl der gepoolten Dome an BCO#140, 18. Passage, in BTM, in 3D.....	62
Tabelle 21: Target-to-Reference-Ratios der qRT-PCR verschiedener Primer ausgehend von cDNAs der gepoolten Dome an BCO#140, 18. Passage, in BTM, in 3D.....	62
Tabelle 22: Mittlere Cp-Werte der Target-Primer der qRT-PCR verschiedener Primer ausgehend von cDNAs der gepoolten Dome an BCO#140, 18. Passage, in BTM, in 3D.....	63
Tabelle 23: RNA-Extraktionskonzentrationen (ng/μL) der verschiedenen Ansätze mit BCO#270, 7. Passage, in BTM, in 3D. Ansatz 1: 15 min Trypsinierung und 40 μL RNase-freies Wasser. Ansatz 2: 10 min Trypsinierung und 40 μL RNase-freies Wasser. Ansatz 3: 15 min Trypsinierung und 20 μL RNase-freies Wasser. ....	65
Tabelle 24: RNA-Isolationsansätze mit der Anzahl an befüllten Wells und der sich insgesamt pro Ansatz darin befindenden Zellzahl an Tag 0 (t <sub>0</sub> ).....	67
Tabelle 25: RNA-Extraktionsmengen in ng/μL, die mit den jeweiligen Anzahlen an extrahierten Domen im entsprechenden Ansatz erzielt wurden. ....	70
Tabelle 26: Vergleich der RNA-Extraktionskonzentrationen pro an t <sub>0</sub> ausgesäter Zelle (ng/μL x Z). Angegeben werden die Differenzen zwischen den verschiedenen Ansätzen innerhalb eines Hydrogels und die beiden Hydrogele innerhalb desselben Ansatzes. 10 min = 10 min Trypsinierung ohne Vortex. 15 min = 15 min Trypsinierung mit Vortex.....	71
Tabelle 27: Pathologische und patientenassoziierte Charakteristika von den Primärtumoren der verwendeten BCO-Linien. m = männlich. w = weiblich. Die Zeile „Alter“ bezieht sich auf das Alter des Patienten bzw. der Patientin am Entnahmetaq des Primärtumors, aus welchem die BCO-Linie entstand. pT, pN, cM = pathologisch bzw. klinisch erhobene TNM-Stadien. pL = pathologisch bestätigte Lymphangi invasion. pV = pathologisch bestätigte Gefäßinvasion. Pn	

= Perineuralscheideninvasion. „?“ = fehlender Wert. x = Charakteristikum nicht beurteilbar. .... 73

Tabelle 28: Übersicht über Zeitperioden von BCO-Linien, die vor ihrer Lagerung im Stickstofftank in einem anderen Kulturmedium kultiviert wurden als in den Kultivierungsschritten der Hauptversuche. CM = Kulturmedium. .... 74

Tabelle 29: RNA-Extraktionskonzentrationen (ng/μL) etablierter BCO-Linien in den Zeitperioden t<sub>1-3</sub> und deren Synonyme für weitere Ergebnisteile. P = Passage. D = Anzahl der extrahierten Dome. .... 82

Tabelle 30: Target-to-Reference-Ratios der qRT-PCRs verschiedener Primer ausgehend von cDNAs etablierter BCO-Linien in den Zeitperioden t<sub>1-3</sub> (Teil 1). (Entnommen aus Vollmer et al. (2024): Patient-derived bladder cancer organoids show stable transcript expression along cultivation [18.08.2024]). .... 82

Tabelle 31: Target-to-Reference-Ratios der qRT-PCRs verschiedener Primer ausgehend von cDNAs etablierter BCO-Linien in den Zeitperioden t<sub>1-3</sub> (Teil 2). (Entnommen aus Vollmer et al. (2024): Patient-derived bladder cancer organoids show stable transcript expression along cultivation [18.08.2024]). .... 83

Tabelle 32: Target-to-Reference-Ratios der qRT-PCRs verschiedener Primer ausgehend von cDNAs etablierter BCO-Linien in den Zeitperioden t<sub>1-3</sub> (Teil 3). (Entnommen aus Vollmer et al. (2024): Patient-derived bladder cancer organoids show stable transcript expression along cultivation [18.08.2024]). .... 83

## Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
ANGPTL4	Angiopoetin-like 4 Protein
ASC	adulte Stammzellen
AWMF	Arbeitsgemeinschaft Wissenschaftlichen Fachgesellschaften der Medizinischen

B7-H3	B7 Homolog 3
BC	Blasenkarzinom
BCO	bladder cancer organoid (Blasentumororganoid)
BME	Basement Membrane Extract
BRCA1	breast cancer antigen 1
BTM	Blasentumororganoidmedium
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CM	Kulturmedium
Cp	crossing point
(D)PBS	Dulbecco's Phosphate-buffered saline
ECM	Extrazellulärmatrix
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
ERBB2	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
ERCC2	excision repair cross-contemplation group 2
FGFR3	fibroblast growth factor receptor 3
GEMM	genetically engineered mouse models
HCM	Hepatocyte Culture Media
HER2	human epidermal growth factor receptor 2

HRAS	GTPase Hras aus dem Harvey Rat Sarcoma Virus
MIBC	muscle invasive bladder cancer
NMIBC	non-muscle invasive bladder cancer
NTW	non template water
P	Passage
PD-L1	programmed death ligand 1
PDO	patient-derived organoids
PDX	patient-derived xenograft
PIK3CA	Phosphatidylinositol-3-kinase
PSC	pluripotente Stammzellen
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
QBiC	Zentrum für Quantitative Biologie Tübingen
qRT-PCR	quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion
scRNA	small cytoplasmatic RNA
STAG2	stromal antigen 2
TP53	Tumorsuppressorprotein 53
TSC1	tuberous sclerosis 1
TUR-B	transurethrale Resektion der Blase
UMUC	University of Michigan-Urothelial Carcinoma Cells
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung g

## 1 Einleitung

Personalisierte Medizin mit dem Ziel jedem Patienten und jeder Patientin eine individuelle Therapie zu ermöglichen, ist aktueller Diskussions- und Forschungsgegenstand der Medizin. Ein Forschungsansatz der Personalisierten Medizin ist die Etablierung von Organoiden als Abbild eines physiologischen oder pathologischen Körpergewebes, so auch von Tumorzellen. Diese Organoiden werden *in vitro* aus ihren abzubildenden Geweben kultiviert und können dabei wichtige morphologische und genetische Faktoren ihres Primärgewebes behalten oder im Kultivierungsverlauf verändern<sup>1-3</sup>. Bisher wurden Organoiden aus unterschiedlichen Gewebetypen etabliert<sup>3</sup>. So auch von Blasen-tumororganoiden (BCO), die im Vergleich zu ihrem Ursprungsgewebe, dem Primärtumor, Ähnlichkeiten aufweisen<sup>1,2,4,5</sup>. An diesen BCOs wurden zudem erste Experimente im Hinblick auf einen klinischen Einsatz durchgeführt, z.B. Medikamentenscreenings<sup>6</sup>. Weitere Forschung bzgl. Blasen-tumororganoiden wird immer wichtiger. Harnblasenkrebs (BC) ist in Deutschland bei Männern die viert häufigste und bei Frauen die dreizehnt häufigste Tumorerkrankung<sup>7</sup>. Die Möglichkeiten aktueller Diagnostik und Therapien sind limitiert. Ein genereller Früherkennungsmarker für BCs kann derzeit nicht empfohlen werden, operative Ansätze können neo- oder adjuvant durch z.B. Chemotherapien ergänzt werden, jedoch weisen aktuelle Chemotherapien moderate Ansprechraten, Medikamentenresistenzen und relevante Rezidivraten auf. Gründe dafür könnten fehlende, geeignete Screeningmethoden sein<sup>8-14</sup>. Patientinnen und Patienten würden mit einer klinischen Anwendung von Blasen-tumororganoiden von neuen Erkenntnissen zur Erweiterung des Diagnostik- und Therapiespektrums im Sinne eines personalisierten Ansatzes profitieren. Eine Definition von Patienten-abgeleiteten Blasen-tumororganoiden ist aktuell nicht einheitlich geklärt. Verschiedene Passagenuntergrenzen werden als mögliche Etablierungsgrenzen diskutiert<sup>1,4</sup>. Das Ziel dieser Arbeit ist es, das Transkriptom von mehreren Blasen-tumororganoiden in ihrem zeitlichen Kultivierungsverlauf zu untersuchen. Die Transkriptomanalysen werden dann sowohl im Hinblick auf die Diskussion der Etablierungsgrenze als auch auf die klinisch-personalisierte Anwendung an

der Patientin bzw. am Patienten diskutiert. So könnten u.a. bestehende Diagnostik- und Therapieansätze in Zukunft ergänzt und neue Forschungsthemen angegangen werden.

Im Folgenden möchte ich in diese Themenfelder zunächst mit einem Einstieg in die Anatomie der Harnblase beginnen und über die Diagnostik und Therapie des Harnblasenkarzinoms zu Organoiden und insbesondere Blasentumororganoiden überleiten. Dabei werden wichtige molekulare Marker beschrieben, welche in dieser Arbeit in der Analyse des Transkriptom von Blasentumororganiden Anwendung finden.

## **1.1 Harnblase**

Die Harnblase dient als muskuläres Speicher- und Sekretionsorgan für den Urin, welchen sie über die Ureteren aus den beiden Nieren erhält. Dabei können physiologisch bis zu 500 mL Urin gespeichert werden. Der wesentliche Wandbestandteil der Blase ist der dreigeschichtete Detrusormuskel, welcher über sympathische und parasympathische Innervation Harnretention mit Blasenfüllung und Miktion mit Blasenentleerung steuert <sup>15</sup>.

Auf mikroskopischer Ebene sind die Harnblase, sowie die anderen Organe der ableitenden Harnwege von urothelialelem Epithel ausgekleidet. Das Urothel, ein mehrschichtiges Übergangsepithel, hat einen charakteristischen Aufbau, welcher sich entsprechend dem Füllungszustand der Harnblase ändert. Ist diese gefüllt, so weichen die Zellen durch die Dehnung der Wand auseinander, wodurch sich weniger Wandschichten ergeben. Bei Miktion und folglich Relaxation der Harnblasenwand richten sich die ehemals gedehnten Urothelzellen zu 6-7 Schichten wieder auf. Weitere Besonderheit im urothelialen Zellverband sind die sogenannten apikal liegenden Deckzellen. Diese bilden mit Uroplakinen (Transmembranproteine) und dichten Tight Junctions eine Art Schutzwall für die basal liegenden Zellen gegenüber dem Harnmilieu. Damit dieser Schutzwall bei Wanddehnung nicht Lücken aufweist, können sich die Deckzellen an ihrer apikalen Oberfläche mittels Exozytose von Uroplakin-haltigen Vesikeln vergrößern <sup>16</sup>.

## 1.2 Harnblasenkarzinom

### 1.2.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Im Jahr 2020 trat das Harnblasenkarzinom in Deutschland mit einer Inzidenz von 4.630 Fällen bei Frauen und 12.500 Fällen bei Männern auf und ist somit der 13. häufigste Tumor bei Frauen unter allen Tumorneuerkrankungen und der 4. häufigste bei Männern. Hier wurden die in-situ Tumoren noch nicht mitgerechnet. Dabei wiesen Männer auch eine signifikant höhere Sterberate als Frauen auf (Abb. 1). Mit zunehmendem Alter stiegen die Inzidenzen bei beiden Geschlechtern an, bei Männern war dieser Anstieg jedoch stärker als bei Frauen<sup>7</sup>.

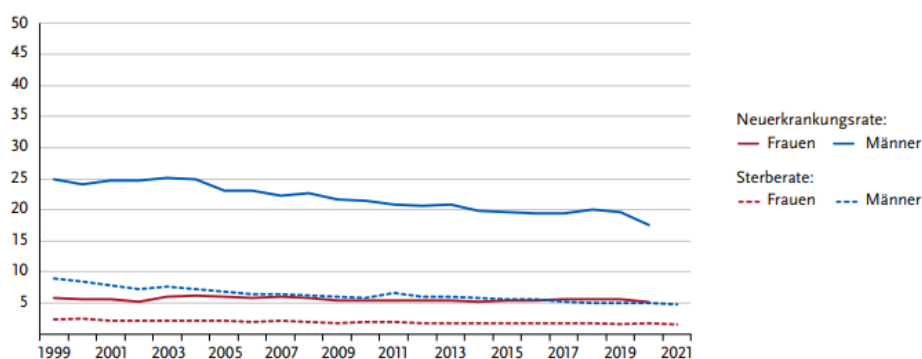


Abbildung 1: Altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten nach Geschlecht je 100.000 Einwohner, ICD-10 C67, Deutschland 1999-2020/2021 (Entnommen aus Krebs in Deutschland für 2019/2020 (2023): URL: [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/krebs\\_in\\_deutschland\\_2023.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_2023.pdf?__blob=publicationFile), [14.12.2023]).

Zu den Risikofaktoren des BC gehört, wie oben beschrieben, zum einen das Geschlecht. Des Weiteren weist das BC auch unterschiedliche Inzidenzen in verschiedenen Ländern auf. So führt Spanien die Inzidenzspitze bei den Männern an und Slowenien landet auf dem letzten Platz. Deutschland belegt dabei Platz 4<sup>17</sup>. Auch genetische Syndrome wie z.B. das Lynch-Syndrom (Hereditäres Nicht-Polypöses Colonicarcinom), bestimmte chemische Stoffe (aromatische Amine, Cyclophosphamid), Nikotinkonsum und chronische Entzündungen der Harnblase erhöhen das Risiko für die Entstehung eines BC<sup>8,18-23</sup>. Strahlentherapien anderer Organe des kleinen Beckens und auch verschiedene berufliche Expositionen (z.B. Verbrennungsprodukte) reihen sich zusätzlich in die Liste der Risikofaktoren ein<sup>8,24-26</sup>. Aktuell stehen die Faktoren

der Trinkmenge und des Kaffeekonsums in der Diskussion, ob diese ein BC begünstigen. Während ein erhöhter Kaffeekonsum als begünstigend beschrieben wird, ist der Effekt der Trinkmenge kontrovers diskutiert. Eine höhere Flüssigkeitsaufnahme bei den Männern zeigte sich als begünstigend für ein BC, während Frauen bei einer erhöhten Trinkmenge ein geringeres Risiko aufwiesen<sup>8,27,28</sup>.

### **1.2.2 Früherkennung und Diagnostik**

In der Früherkennung des BC kann zum jetzigen Stand kein genereller diagnostischer Marker empfohlen werden. In Fällen von Patienten und Patientinnen mit einem hohen Risiko kann eine Mikrohämaturie auf ein BC hinweisen noch bevor dieses an sich symptomatisch wird. Ein Test auf Mikrohämaturie ist dennoch noch nicht im standardisierten Vorgehen der Früherkennung implementiert. Wird jedoch eine asymptomatische Mikrohämaturie wiederholt festgestellt, sollte dies weitere urologische Diagnostik nach sich ziehen<sup>8,29,30</sup>. Zum Beispiel die Urinzytologie, welche insgesamt eine hohe Spezifität, aber eine geringe Sensitivität für das BC aufweist. Die Sensitivität kann bei schlecht differenzierten BCs etwas besser sein als bei mäßig differenzierten BCs<sup>31</sup>. Ein Nachweis von signifikant erhöhten Zytokeratinspiegeln (z.B. CK20) ist zwar theoretisch möglich, aber in der Sensitivität und Spezifität der Urinzytologie und anderen Markern unterlegen<sup>32-36</sup>. Weitere Möglichkeiten zur Früherkennung sind u.a. das Nukleäre Matrix Protein 22 (NMP22), die Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung (FISH) und das Blasentumor Assoziierte Antigen (BTA), welche von der amerikanischen Food and Drug Administration zwar für die Früherkennung, respektive Nachsorge des BC eingesetzt werden, in Deutschland aber aufgrund Kosten, geringer Sensitivität und/oder Spezifität nicht empfohlen werden<sup>8,37-48</sup>. Generell gibt die Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) in ihrer S3-Leitlinie folgende Befunde bzw. Klinik an, welche einen Verdacht auf ein BC begründen: Mikrohämaturie, schmerzlose Makrohämaturie, positive Urinzytologie und unspezifische Reizsymptome wie Pollakisurie, Drangsymptomatik oder Dysurie<sup>8</sup>.

Liegt ein Verdacht nun vor, sollte man via Sonographie und Weißlicht-Zystoskopie die Situation weiter beurteilen und je nach Befund eine histologische Sicherung durchführen. Ergibt die Zystoskopie einen pathologischen Befund oder keinen pathologischen Befund bei gleichzeitiger Mikro- oder Makrohämaturie, sollte der obere Harnwegstrakt als weitere mögliche Ursache für die oben beschriebene Symptomatik untersucht werden <sup>8,49,50</sup>.

### **1.2.3 Therapie**

Die wesentliche Therapie des BC richtet sich nach dessen Staging. Neben der TNM-Klassifikation werden BCs nach deren Muskelinvasivität eingeteilt. So unterscheidet man prognostisch günstigere nicht-muskelinvasive Harnblasenkarzinome (NMIBC; < pT2) von prognostisch ungünstigen muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen (MIBC; ≥ pT2) <sup>8,51</sup>. Neben der klinisch angewendeten pathologischen Klassifikation in T-Stadium und Grading orientiert sich die Wissenschaft aktuell an der Einteilung in luminale, basale, stromareiche und neuroendokrine Subtypen <sup>52</sup>.

Generell wird beim NMIBC zunächst die transurethrale Resektion der Blase (TUR-B) als Methode der Sicherung und pathologischen Beurteilung des Tumorgewebes empfohlen <sup>8,53</sup>. Durch die Urethra der Patientin bzw. des Patienten wird eine kameraassistierte mono- oder bipolare Schlinge eingeführt, welche den Tumor reseziert soll. Dabei wird ein Biopsat entnommen, welches zum Staging und Grading der Pathologie geschickt wird. Risiken bei dieser OP sind u.a. Harnröhrenverletzungen mit konsekutiver Harnröhrenverengung, Infektionen oder Harnblasenperforationen <sup>8,54</sup>. Bei Patienten und Patientinnen mit einer mittleren oder hohen Risikokonstellation wird eine TUR-Nachresektion empfohlen. Nach S3-Leitlinie fallen hierunter Patientinnen bzw. Patienten mit inkompletter Resektion bei primärer TUR-B, mit pT1-Tumoren, mit fehlendem Muskelnachweis im histologischen Präparat der primären TUR (außer pTa low-grade) oder mit pathologischem Nachweis eines high-grade Tumors mit Ausnahme von primären Carcinoma in situ (pTis). Dies dient der besseren Diagnostik bzgl. Tumorausdehnung und -charakterisierung, womit eine möglichst

komplette Tumorsektion erreicht und ein Understaging vermieden werden sollen, wenn sich in der Nachresektion doch Muskelinvasion zeigen sollte <sup>8,55-60</sup>.

Bei MIBC sowie bei very high-risk NMIBC, u.a. wird häufig zur Zystektomie geraten <sup>61</sup>. Das Ziel dieser OP ist die vollständige Entfernung der Blase und eventuell befallener Nachbarorgane mit anschließender Anlage eines Ersatzes zur Harnableitung via Urostoma oder Neoblase <sup>8,62,63</sup>. Die Risiken der Zystektomie, wie z.B. Blutungen, Infektionen, Wundheilungsstörungen etc., sind bzgl. Häufigkeit und Schweregrad von den folgenden Operationstechniken abhängig (Abb. 2). Die OP kann offen, laparoskopisch oder Roboter-assistiert erfolgen <sup>8,64-66</sup>.

<b>Komplikationen</b>	<b>Offen</b>	<b>Robotisch</b>	<b>Laparoskopisch</b>
<b>Grade 2-5</b>	20-65%	30-63%	10,5-40%
<b>Grade 3-5</b>	10-21%	20-21%	5,3-18%

Abbildung 2: Komplikationsraten der radikalen Zystektomie und Harnableitung nach operativer Methode entsprechend der Clavien-Graduierung (Entnommen aus AWMF Online (2020): URL: [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/032-038OLI\\_S3\\_Harnblasenkarzinom\\_2020-04-ve](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-038OLI_S3_Harnblasenkarzinom_2020-04-ve) [23.06.2022]).

Sowohl TUR-B als auch Zystektomie können je nach pathologischer Risikostratifizierung durch neo- oder adjuvante intravesikale Instillationen, Immuntherapie, Chemotherapie oder Radiotherapien ergänzt werden <sup>9</sup>. Bzgl. neoadjuvanter Chemotherapien in MIBC wurden Ansprechraten von bis zu 38% beschrieben <sup>10</sup>. Ansprechraten bei Chemotherapien mit Gemcitabin/Cisplatin als First-line Therapie betragen in metastasierenden Fällen ca. 43% <sup>12</sup>. Hierbei stellt eine Medikamentenresistenz immer noch eine große Herausforderung in der BC-Therapie dar. Gründe dafür könnten fehlende, geeignete Screeningmethoden vor der Therapie sein <sup>11</sup>. Trotz leitliniengerechter Therapie, besteht weiterhin ein relevantes Risiko des Rezidives oder Progresses. 1-Jahres-Rezidivraten von NMIBC ohne zusätzliche Therapie variieren nach EORTC-Risikotabellen (EORTC = European Organisation for Research and Treatment of Cancer) zwischen 15-61% <sup>13</sup>. In Fällen mit einem MIBC wurden lokale Rezidivraten um 5-15% und systemische um 20-35% beobachtet. 80-90% dieser Rezidive traten 3 Jahre nach operativer Therapie auf <sup>14</sup>.

Diese Daten zeigen auf, dass für einen personalisierten Therapieansatz zur Verbesserung des Outcomes in der BC-Therapie, neue, effektive und ökonomische Screeningmethoden vonnöten sind.

### **1.3 Organoide und 3D-Kulturen**

#### **1.3.1 Grundlagen**

Organoide werden in ihrer modernen Definition als multizelluläres, dreidimensionales Gewebekonstrukt *in vitro* beschrieben. Diese Gewebekonstrukte sollen ihr korrespondierendes Organ *in vivo* hinsichtlich zellulärer Heterogenität, Struktur und Funktion abbilden, um dieses unter Laborbedingungen studieren zu können. Das korrespondierende Organ kann hierbei ein physiologisches Organ oder ein Tumor sein (z.B. Retina, Gehirn, Darm, Kolonkarzinom, ...). Organoiden werden auch als Zellverbände beschrieben, welche aus pluripotenten oder adulten Stammzellen hervorgehen, sich selbst organisieren und in verschiedene funktionale Zelltypen differenzieren können<sup>3,67,68</sup>. Der Organoidbegriff wird generell für viele sphärische Organmodelle benutzt, welche verschiedene Methoden zur Modellgenerierung aufweisen<sup>69</sup>. Als mögliche Ausgangsmaterialien für z.B. Tumorganoide kommen u.a. der Tumor bzw. eine Tumorbiopsie, Tumorzelllinien (z.B. UMUC-15) oder Patient-derived xenografts (PDX) in Frage<sup>70</sup>. Tumorganoide können aber auch aus Organoiden mit gesundem Gewebe als Ursprung gewonnen werden. Mittels CRISPR/Cas9 oder RNA-Interferenz kann ein „gesundes“ Organoid durch gezielten Eingriff in onkologisch relevante Gene ein Tumorganoid gezüchtet werden<sup>71</sup>.

Wird eine Organoidreihe aus pluripotenten Stammzellen (PSC) kultiviert, so gibt man den PSC eine minimale „Information“ zur gewünschten Differenzierung. Das weitere wird von den PSCs und der Stochastik bewerkstelligt. Die Kultivierung von PSC-abgeleiteten Organoiden benötigt mehrere Schritte, in welchen Gastrulation und Organogenese simuliert werden. Organoiden aus adulten Stammzellen (ASC) benötigen definierte Wachstumsbedingungen, welche dem Milieu des abzubildenden Organs *in vivo* so ähnlich wie möglich sein sollen. In den meisten Fällen bildet dieses Milieu ein Modell zur Untersuchung

verschiedener Prozesse wie Zellerhalt, Reparaturvorgänge nach Gewebeschaden oder Mutationen, u.a. ab. Da die Organoiden in den meisten Fällen keine Angiogenese oder Immunzellen aufweisen sind diese in ihrem Größenwachstum und in der Abbildbarkeit von immunologischen Prozessen eingeschränkt <sup>3,67,72,73</sup>.

Das Potential von Organoiden in der Medizin ist groß und die Anwendungsgebiete sind vielfältig (Abb. 3) <sup>3</sup>. Vor allem Tumororganoiden finden in der Forschung zu Personalisierter Medizin, disease modeling und zu Medikamententests Anwendung durch eine breite Studienlage.

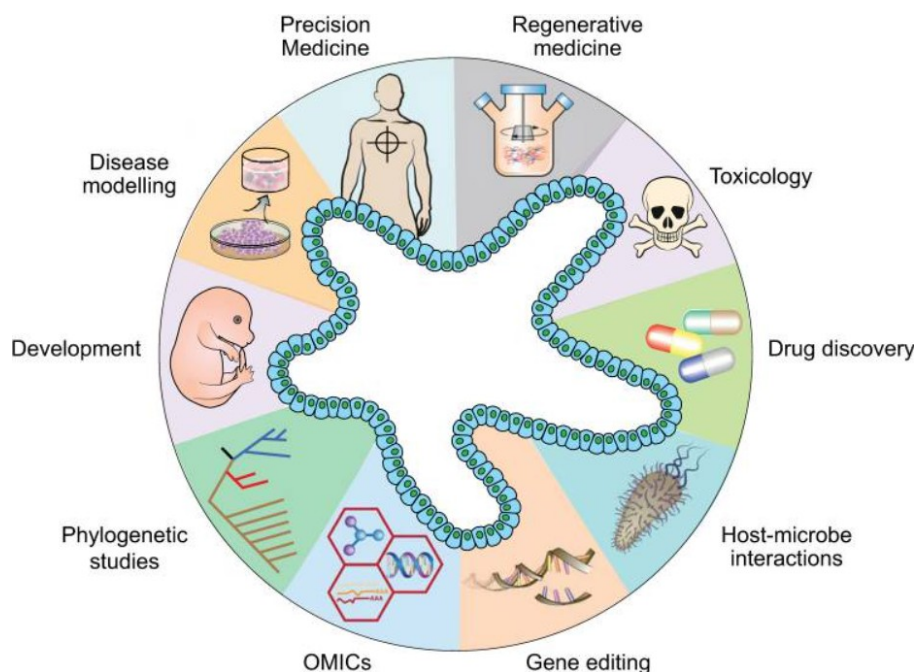


Abbildung 3: Anwendungsgebiete von Organoiden. „OMICs“ = Oberbegriff für molekularbiologische Methoden. (Entnommen aus Corró (2020): A brief history of organoids [24.06.2022]) CC-BY 4.0: © the American Physiological Society.

Neben Chancen haben Organoiden auch ihre Grenzen. In einem Review verglich Corró Organoiden (patient-derived organoids; PDO) mit zweidimensionalen (2D) Zellkulturen, Xenografts (patient-derived xenografts; PDX) und genetisch modifizierte Mausmodelle (genetically engineered mouse models; GEMM) hinsichtlich mehrerer Kriterien (Abb. 4) <sup>3</sup>.

Characteristic	2D Cell Lines	3D PDOs	PDXs	GEMMs
Establishment efficiency	Inefficient	Easy	Inefficient	NA
Maintenance time	Low	Moderate	Moderate to high	High
Reproducibility	High	Medium	Medium	High
Cost	Low	Moderate to high	High	High
Tissue organization	2D constrains morphogenests	Self-organized in 3D resembling in vivo architecture	Conserved; recapitulate patient's tissue	Conserved but murine specific
Heterogeneity	Homogenous	Heterogeneous	Heterogeneous	Heterogeneous
Cell function	Limited	Moderate	Conserved and relevant to human biology	Not always relevant to human biology
Stromal microenvironment	Absent	Mostly absent	Preserved, except for immune cell populations	Preserved
Functional analysis	Easy	Easy, but could be complicated by the presence of matrix	Easy after tissue sampling, complex in vivo analysis	Easy after tissue sampling, complex in vivo analysis
Disease modeling	Poor	Good	Good	Mediocre; possible, but challenging for some human diseases
Scalability	Easy	Limited to diffusion of nutrients	Limited to engraftment efficiency	NA
High-throughput assay	Easy	More difficult but possible	Difficult	Difficult
Drug screening	Not very physiological	More relevant to the patient	More relevant to the patient	Not always relevant to human diseases

2D, 2-dimensional; 3D, 3-dimensional; NA, not applicable.

Abbildung 4: Vergleich verschiedener *in vivo* und *in vitro* Krankheitsmodelle. PDO = patient-derived organoid. PDX = patient-derived xenograft. GEMM = genetically engineered mouse models. (Entnommen aus Corró (2020): A brief history of organoids [27.06.2022]) CC-BY 4.0: © the American Physiological Society.

Des Weiteren stellt die dreidimensionale Kultivierung von Organoiden ein großes Charakteristikum dieser dar. Diese ist vor allem für Organoiden als Tumormodelle von Bedeutung, da die dreidimensionale (3D) Kultivierung Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte in einer Form erlaubt, welche den Gegebenheiten im abzubildenden Primärtumor ähnlicher sind. Dadurch entsteht ein adäquateres Tumormodell<sup>74-76</sup>. Die dreidimensionale Kultivierung wird durch Hydrogele bzw. ECM-Analoga ermöglicht. Dazu gehören die Basement Membrane Extracts (BME), z.B. Matrigel® oder Cultrex™. Diese haben die Eigenschaft, dass sie bei 4° flüssig vorliegen und bei einer Kultivierungstemperatur von 37°C den Aggregatzustand zu fest wechseln. Durch ihre proteinogene Zusammensetzung ähneln sie dem Aufbau der humanen Extrazellulärmatrix (ECM), was die gewünschten Anhaftungsmöglichkeiten für Zellen liefert. Die organoiden Zellen werden mit den BMEs in eine Suspension gegeben. Durch die anschließende Hanging-Drop Methode durchsetzen die Zellen dann das Hydrogel in einer 3D-Struktur. Die aushärtende Hydrogel-Zellsuspension wird folgend als „Dom“ beschrieben<sup>77,78</sup>.

### **1.3.2 Blasentumororganoiden**

Eine genaue Definition für die aus ASC entstehenden BCOs lässt sich zu diesem Zeitpunkt nicht exakt definieren. Manche Studien geben allein das Überleben der Zellen von über einer Woche als das Definitionskriterium für BCOs an. Andere Autoren und Autorinnen definieren BCOs als Sphäroid-ähnliche Strukturen ab einer bestimmten Passage und darüber hinaus<sup>70,74,79</sup>. So auch in frühen Organoidstudien von Lee et al. und Pauli et al., welche eine Organoidlinie erst nach mindestens sechs erfolgreichen Passagen als etabliert ansehen<sup>1,74</sup>. Weitere Veröffentlichungen sehen schon nach der ersten Passage oder beim alleinigen Anwachsen von Zellen einen Erfolg zur Etablierung einer BCO-Linie<sup>2,4</sup>. In dieser Arbeit wird die Definition von Lee et al. verwendet. Zellreihen, die nicht in die erforderliche Passage gelangten, werden als Sphäroide bezeichnet. Diese Definition bedeutet jedoch auch Herausforderungen, da mit einer solch hohen Passagengrenze zeitbedingte und ökonomische Bürden aufkommen, die den Einsatz in einem klinischen Setting erschweren.

Bisher beschrieben Lee et al. und Mullenders et al. eine recht hohe Etablierungseffizienz von BCOs bei einer Kultivierung mit definierten Kulturmedien (Lee et al.: HCM; Mullenders et al.: BTM). Während Lee et al. in 12 von 17 Fällen (ca. 70%) Organoidreihen etablieren konnten, gelang es Mullenders et al. mit einer Effizienz von 60-70%, wobei die Arbeitsgruppe um Mullenders eine breitere Definition von etablierten BCO-Linien auffasste (Mullenders et al.:  $\geq 1$ . Passage, Lee et al.:  $\geq 6$ . Passage). Im Falle der BCO-Linien, die von Mullenders et al. etabliert wurden, konnten die Linien im wöchentlichen Takt passagiert und sogar über zwei Jahre propagiert werden <sup>1,4</sup>. Ein aktuell diskutierter Einfluss auf eine möglichst lange Kulturperiode von BCOs ist das Vorhandensein von Tumorstammzellen (cancer stem cells; CSC) in der Organoidkultur, welche verschiedene Oberflächenmarker exprimieren, so auch CD24 <sup>5,80</sup>.

Generell lassen sich BCOs erfolgreicher aus NMIBC als aus MIBC etablieren, wie Yoshida et al. und Kita et al. beschrieben <sup>81,82</sup>. Eine noch höhere Etablierungseffizienz von BCOs (100%) wurde erreicht, wenn aus einem urothelialen oder neuroendokrinen Blasenkarzinom PDX etabliert wurden, welche in BCOs konvertiert wurden <sup>2,83</sup>. Diese Konvertibilität zwischen BCO und PDX wurde in weiteren Veröffentlichungen diskutiert. Lee et al. beschrieben die erfolgreiche Interkonvertibilität zwischen BCO und PDX und wiesen auf die Möglichkeit hin, zwischen zwei Tumormodellen je nach gewünschtem Anwendungsgebiet wählen zu können <sup>1</sup>.

Neben mehreren Medikamententests an BCO-Linien und dem Vergleich des Einflusses der Medikamente auf BCO-Kulturen in 2D gegenüber 3D, wurde in der Literatur auch die Morphologie und Histologie mehrerer BCO-Linien untersucht <sup>1,4,6</sup>. Insgesamt konnten in Blasentumororganoiden drei grundlegende Phänotypen ausgemacht werden, welche auch gemischt auftreten konnten. Ein basaler Phänotyp, welcher CK5 und ein luminaler Phänotyp, welcher CK20 exprimiert. In einem Fall wurde zudem ein seltener, squamöser Phänotyp beschrieben <sup>1,4</sup>. Im Falle der luminalen BCOs konnte beobachtet werden, dass manche von diesen ihren Phänotyp zu einem basalen änderten. Diese Änderung des Phänotyps konnte durch ein Konvertieren der BCOs zu Xenografts revidiert

werden. Ein Auftreten des sogenannten „phenotype-switching“ korrelierte mit einem gemischten Phänotyp im korrespondierenden Primärtumor <sup>1</sup>.

Hinsichtlich des Mutationsprofils der BCO-Linien und des jeweiligen Primärtumors erwiesen sich bei 11 von 16 Linien > 80% Ähnlichkeit. Dies inkludierte auch BC-typische Mutationen. Des Weiteren konnte während der Kultivierungsperiode und dem Umwandeln in Xenografts, klonale Evolution in den Organoiden beobachtet werden <sup>1</sup>.

Aktuell bestehen verschiedene Methoden und Ansätze, BCOs zu kultivieren. So sind Studien veröffentlicht worden, in denen es gelang, BCOs aus einzelnen Zellen zu kultivieren <sup>84</sup>. Auch Assembloide, sogenannte Organoidmischkulturen wurden beschrieben. BCOs wurden hier mit Tumor-assoziierten Fibroblasten und humanen Endothelien oder auch T-Zellen in eine Kokultur gesetzt <sup>85,86</sup>.

### **1.3.3 Transcriptomics in Organoiden**

Bezüglich Harnblasenkarzinomen und Blasentumororganoiden gab es bereits Mutationsanalysen von BCOs hinsichtlich der häufigsten Mutationen in Blasenkarzinomen <sup>1</sup>. Auch Transkriptomanalysen wurden durchgeführt. Mittels der Analyse von Daten aus small cytoplasmatic RNA (scRNA) wurde die zelluläre Heterogenität von Patientinnen bzw. Patienten entstammenden BCOs gegenüber den entsprechenden Primärtumoren untersucht. Die BCOs wiesen in den frühen Passagen bereits einen geringen Grad an Heterogenität im Vergleich zu ihrem Ursprungsgewebe auf, behielten aber wichtige zytologische Charakteristiken des Primärtumors. Auf eine 3D-Kultur in einem BME wie Matrigel® wurde hier aber verzichtet <sup>87</sup>.

Des Weiteren wurde um Cai et al. eine Arbeit publiziert, welche sich mit dem Transkriptomvergleich von PDX-abgeleiteten BCOs und PDX in deren frühen gegenüber deren späten Passagen beschäftigt. Die BCOs der Gruppe wiesen dabei in allen Passagen dieselbe Histologie wie die PDX auf, aus denen sie entstammten. Auch das Wachstumsverhalten war ähnlich. Ein Vergleich der PDX in frühen versus späten Passagen zeigte eine erhöhte Expression von Transkripten für Proliferation, Mitose und Migration, während die BCOs über die Passagen hinweg mehr Transkripte für Selbsterneuerung und

Stammzellproliferation exprimierten. Sowohl PDX als auch BCOs wiesen eine reduzierte Expression für Differenzierungs-, Gewebeentwicklungs- und Apoptosetranskripte auf. Während der Kultivierungsperiode behielten PDX und BCOs stets wichtige Marker des Primärtumors <sup>2</sup>.

#### **1.4 Molekulare Marker des BC**

Mehrere Studien, die BCOs im Kultivierungsverlauf untersuchten bedienten sich molekularer Marker als Anhaltspunkte für etwaige Veränderungen im Genom, Transkriptom oder Proteom <sup>1,2,4,87</sup>. Die nachfolgend vorgestellten molekularen Marker werden in der Literatur oder vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Tübingen als pathologisch relevant für Harnblasenkarzinome eingestuft, etwa da sie u.a. häufig in BCs mutiert sind. Die Marker dienen der in dieser Arbeit durchgeführten quantitativen Real-Time Polymerasekettenreaktionen (qRT-PCRs) als Zieltranskripte, um BCOs in ihrem Kultivierungsverlauf abzubilden.

##### **1.4.1 HER2/neu**

Im Folgenden wird HER2/neu als HER2 abgekürzt. Human epidermal growth factor receptor 2, oder auch ERBB2 (v-erb-b2, erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2) genannt, ist in mehreren Tumorentitäten überexprimiert, vor allem im Mammakarzinom und auch im luminalen BC <sup>88-90</sup>. Diese Überexpression bedingte bei Menschen mit Brustkrebs ein schlechteres Gesamtüberleben, erhöhte Malignität des Tumors und eine Induktion von metastatischen Phänotypen. Manche Studien zeigten durch die Überexpression von HER-2 eine induzierte Chemotherapieresistenz. Eine medikamentöse Unterdrückung dieser Überexpression könnte sich positiv auf die Malignität des Tumors auswirken <sup>88</sup>.

##### **1.4.2 CD24**

Auch als hitzestabiles Antigen (heat stable antigen; HSA) bekannt, ist das Adhäsionsmolekül CD24 in der Literatur als pro-metastatisch in malignen Zellen beschrieben, da dieses eine Anhaftung an P-Selektine des Endothels mediiert. So auch in BC, wo die Funktion von CD24 durch Androgene vermittelt wird. Des Weiteren wird CD24 als diagnostischer und Stammzellmarker für verschiedene

Malignome angesehen <sup>89,91-93</sup>. Zudem kann die Expressierung von CD24 auch als Indiz für die Expandierbarkeit von BCOs angesehen werden, da dieses in frühen wie späten Passagen von lang passierbaren BCO viel exprimiert wurde <sup>5</sup>.

#### **1.4.3 CD44**

Der Hyaluronan-Rezeptor CD44 ist wie CD24 ein Stammzellmarker für BC und trägt im Fall von BC zur malignen Transformation der urothelialen Zellen bei <sup>89,93,94</sup>. Auch wie im Fall von CD24 konnte bei CD44 eine erhöhte Expressierung in frühen wie späten Passagen von BCO-Linien nachgewiesen werden, welche eine hohe Anzahl an möglichen Passagen erzielten <sup>5</sup>.

#### **1.4.4 CD47**

CD47 (auch: IAP; Integrin-assoziiertes Protein) ist ein Rezeptor für Thrombospondine und SIRP $\alpha$  (signal regulatory protein alpha) <sup>95</sup>. Das Protein ist ein Stammzellmarker für das basale BC und wurde in verschiedenen Passagen von BCOs exprimiert <sup>5,93,96</sup>. Die physiologische Funktion von CD47 ist die Inhibition einer Phagozytose durch Makrophagen. Eine Blockade von CD47 als Ziel einer Immuntherapie im Rahmen eines BC könnte daher eine potentielle Behandlungsoption darstellen <sup>96</sup>.

#### **1.4.5 PD-L1**

Der programmed death ligand 1 (PD-L1) ist als Ligand des PD1 ein Immunmodulator. Durch die Expressierung von PD-L1 an ihrer Zelloberfläche können Zellen, auch Krebszellen, der zytotoxischen Immunantwort durch PD1 positive Zellen entgehen <sup>89,97</sup>. Eine Therapie mit dem Ziel der Inhibition der PD1/PD-L1-Interaktion brachte auch beim MIBC bereits Erfolge <sup>89,98</sup>. Geng et al. untersuchten in einer Studie die Expressierung des Liganden auf BCOs und beobachteten dessen Expressierung auf manchen, aber nicht allen untersuchten BCO-Linien <sup>5</sup>.

#### **1.4.6 FGFR3**

Ein weiterer wichtiger molekularer Marker stellt FGFR3 (fibroblast growth factor receptor 3) dar. Eine Punktmutation in diesem Gen findet sich in 80% der BC mit Ta-Staging, 10-30% mit T1-Staging und in 10-20% in MIBC <sup>99</sup>. Eine

Überexpression in FGFR3 korreliert mit einem verringerten krankheitsfreien Überleben <sup>89</sup>.

#### **1.4.7 CD276**

CD276 (auch: B7-H3) spielt eine essenzielle Rolle in Malignomen, da dieses Zellproliferation, Invasion und Migration unterstützt. Als Checkpoint-Molekül im EMT-Signalweg dient es als T-Zell-Inhibitor. Da CD276 eine erhöhte Expression in vielen Tumoren und eine geringe Expression in normalem Gewebe aufweist, eignet sich das Molekül als geeignetes Ziel einer Immuntherapie mit Antikörpern <sup>100</sup>. Zudem wurde CD276 auch auf mehreren Passagen von BCO-Linien entdeckt <sup>5</sup>.

#### **1.4.8 STAG2**

Die Auswirkungen der Exprimierung von STAG2 (stromal antigen 2) auf Tumorzellen bezüglich des Outcomes sind noch kontrovers. STAG2 ist in BC allgemein durch eine Mutation inaktiviert. Manche Studien weisen darauf hin, dass STAG2, eine Untergruppe des Kohäsion-Moleküls, mit fehlender Expression vor allem in low-grade BC vorkommt und so ein besseres Outcome bedingt. Andere Studien betonten ein schlechteres Outcome mit einem Verlust der STAG2 Exprimierung. Als Wildtyp ist STAG2 an der Kohäsion zweier Schwesterchromatiden beteiligt und spielt so eine Rolle bei der Ausbildung Chromosomenzahl <sup>99,101,102</sup>.

#### **1.4.9 ERCC2**

Das DNA-Reparatur-Gen ERCC2 (excision repair cross-complementation group 2) codiert eine DNA-Helikase, welche Verknüpfungen innerhalb desselben DNA-Einzelstrangs repariert. ERCC2 ist sehr frequent in high-grade NMIBC und MIBC mutiert. Vor allem Patienten und Patientinnen mit positivem Raucherstatus scheinen mehr klassische ERCC2 Mutationen aufzuweisen als Nichtraucher <sup>99,103,104</sup>.

#### **1.4.10 HRAS**

HRAS, welches zur Superfamilie der Ras-Proteine gehört, ist zusammen mit anderen Ras-Proteinen in 10-15% der NMIBC mutiert. Eine Mutation in einem

Gen der Ras-Familie und eine FGFR3-Mutation schließen sich jedoch wechselseitig aus <sup>99,105</sup>.

#### **1.4.11 BRCA1**

Auch dieses DNA-Reparatur-Gen ist wie ERCC2 in NMIBC und MIBC häufiger mutiert <sup>99,103</sup>. Eine niedrige Expression von breast cancer antigen 1 (BRCA1) ist mit einer höheren Sensitivität für eine Cisplatin-Therapie und einem längeren Überleben bei Lungen-, Eierstock- und auch Blasenkrebs assoziiert <sup>106</sup>.

#### **1.4.12 TSC1**

TSC1 oder tuberous sclerosis 1 ist ein Genlocus (9q34), welcher in 10-15% aller BC mutiert ist, unabhängig von deren Staging oder Grading. Missense Mutationen von TSC1 führen u.a. zur Hypoacetylierung von Hsp90 (Hitzeschockprotein 90). Hsp90 ist wichtig für die Faltung, Stabilität und Aktivität von Treiberproteinen der Onkogenese. Durch die Hypoacetylierung bindet der Inhibitor von Hsp90 weniger, was sich vorteilhaft für das BC auswirkt. Mittlerweile erscheinen kombinierte Hsp90/mTOR-Inhibitoren als geeignete Therapieansätze für TSC1-mutierte BC <sup>99,107,108</sup>.

#### **1.4.13 TP53**

TP53 ist das Gen für das bekannteste Tumorsupressorprotein: p53. Die Mutationsfrequenz von TP53 ist in low-grade Ta BCs niedrig, wohingegen TP53 öfter in T1 und MIBC mutiert vorliegt <sup>99</sup>. Des Weiteren erlangten Choi et al. eine interessante Erkenntnis. MIBCs mit einem Wildtyp-Allel von TP53 schienen eine höhere Chemotherapieresistenz zu besitzen <sup>90</sup>.

#### **1.4.14 PIK3CA**

PIK3CA codiert für die Phosphatidylinositol-3-kinase. Das Gen dieser Kinase ist in BC häufig aberrant aktiviert, in NMIBC öfter als in MIBC. Oft kommt die aktivierende Mutation von PIK3CA zusammen mit FGFR3- oder RAS-Mutationen vor <sup>99,109</sup>.

#### **1.4.15 PTEN**

Das Phosphatase und Tensin Homolog PTEN kann in BCs bei Allelverlust des Gens eine Differenzierung des BC hinzu einem squamösen Phänotyp bewirken und induziert weiterhin Tumorheterogenität<sup>99,110</sup>.

#### **1.4.16 ANGPTL4**

Angiopoetin-like 4 Protein (ANGPTL4) aus der Familie der Angiopoetine hat eine bis dato kontroverse im Metabolismus von Tumoren. Je nach Literatur kann ANGPTL4 sich pro- wie antiangiogen verhalten<sup>111</sup>. In verschiedenen Tumoren vorkommend, kann ANGPTL4 viel oder gering exprimiert sein. In Urothelkarzinomen ist das Protein aufgrund von DNA-Methylierung auf einem geringen Level exprimiert. Diese Downregulation zusammen mit einer Sekretion von ANGPTL4 durch stromale Zellen im Tumorumfeld bewirken einen lokalen Tumorprogress durch die Reduktion von mRNAs von ECM-Proteinen<sup>112,113</sup>. Außerdem verhindert ANGPTL4 eine Metastasierung des Tumors durch die Inhibition der Intra- und Extravasation der Tumorzellen<sup>114</sup>.

### **1.5 Zielsetzung der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit war es, einen longitudinalen Transkriptionsvergleich von verschiedenen BCO-Linien über deren Kultivierungsperiode hinweg anzustellen. Dabei definierten wir verschiedene Zeitperioden in der Kultivierungsperiode über die BCO-Linien hinweg und innerhalb einer BCO-Linie. Die Basis des Transkriptomvergleichs stellte die jeweilig extrahierte bulkRNA dar. Diese wurden via differential gene expression (transcriptomics technologies) untersucht und verglichen. Ausgewählte pathologisch relevante molekulare Marker in BC wurden quantitativ per qRT-PCR aus der bulkRNA analysiert.

Davor war es essenziell, ein Protokoll zur RNA-Extraktion aus in BME kultivierten BCOs zu entwickeln und zu etablieren. Dabei wurden verschiedene Hydrogele und experimentelle Ansätze hinsichtlich der maximal erzielbaren RNA-Extraktionskonzentration aus einer definierten Ausgangszellzahl miteinander verglichen.

Etwaige Erkenntnisse könnten zur Verbesserung bereits verwendeter Kulturmedien und Kultivierungsbedingungen oder zur Präzisierung der Definition

von Blasen-tumororganoiden verwendet werden. Des Weiteren könnten die Ergebnisse Grundlage für weitere Forschung an Blasen-tumororganoiden im Hinblick auf klinische Anwendbarkeit dienen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Reagenzien

*Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien und deren Hersteller.*

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
A83-01	STEMCELL Tech., Köln, 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
Ampuwa	Fresenius, Bad Homburg, DE
Aprotinin	Merck, Darmstadt, DE
B27-Supplement	Gibco, Dreieich, DE
Beta-Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt, DE
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific, Oldendorf, DE
Boric Acid	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, DE
Bp-Ladder	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Bromophenol blue	AppliChem, Darmstadt, DE
CnT-Prime	CELLnTEC, Bern, CHE
Collagenase/Hyaluronidase 10X	STEMCELL Tech., Köln, DE
Dispase II	STEMCELL Tech., Köln, DE
DMSO (Dimethyl-sufoxid)	AppliChem, Darmstadt, DE
DNA-Exitus Plus IF	AppliChem, Darmstadt, DE

DPBS (Dulbecco's Phosphate-buffered saline) (im Folgenden als PBS abgekürzt)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, DE
EDTA-Na <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, DE
Ethanol (70%)	AppliChem, Darmstadt, DE
FCS (Fetal calf serum)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, DE
FGF-2, -7 und -10	PeptoTech, Hamburg, DE
Gel Red Nucleic Acid, Gel stain	Biotium, Fremont, USA
Gibco™ HEPES (1M)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Glutamax 100X	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, DE
GrowDase®	UPM Biomedicals, Helsinki, FIN
GrowDex®	UPM Biomedicals, Helsinki, FIN
HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, DE
Hepatocyte Culture Media Kit (HCM)	Corning, Wiesbaden, DE
HEPES	Invitrogen, Karlsruhe, DE
LightCycler 480 SYBR Green I Master-Kit (enthält SybrGreen, und Non Template Water)	Roche, Mannheim, DE
L-RN conditioned Medium	wird im Labor durch MTA selbst hergestellt
Lysebuffer	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Matrigel® Growth Factor Reduced (RGF) 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
Natriumacetat	SERVA Electrophoresis, Heidelberg, DE
Nicotinamid	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, DE
Non Template Water	Roche, Mannheim, DE
Pen/Strep	Gibco, Dreieich, DE
Primorcin	InvivoGen, Toulouse, FRA
Recombinant Human EGF	PeproTech, Hamburg, DE
RNase away Reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
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
Tris base	AppliChem, Darmstadt, DE
Trypanblau	Lonza, Basel, CHE
TrypLE Select (1X)	Gibco, Dreieich, DE
Trypsin-EDTA Solution	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, DE
Y-27632 (ROCK-Inhibitor)	Hycultec, Beutelsbach, DE

## 2.2 Medien

*Tabelle 2: Zusammensetzung verwendeter Medien.*

Medium	Zusammensetzung
100 bp-Ladder Mix	30 µL bp-Ladder + 50 µL ddH <sub>2</sub> O

	+ 80 µL Ladepuffer
Blasentumororganoidmedium nach AG Aicher (im Weiteren als BTM abgekürzt)	22,5 ml L-RN conditioned Medium + 22 ml Advanced DMEM/F12 + 2,5 ml 5 % csFCS + 1 ml B27-Supplement + 500 µl Glutamax 100X + 500 µl HEPES – 1 M + 500 µl Nicotinamid – 1 M + 125 µl N-Acetylcystein – 500 mM in PBS + 50 µl A83-01 – 5 mM in DMSO + 50 µl Primocin – 50 mg/ml + 50 µl FGF-10 – 100 µg/ml + 25 µl FGF-7 – 50 µg/ml + 12,5 µl FGF-2 – 50 µg/ml + 5 µl Y-27632 – 100 mM in PBS + 0,5 µl EGF – 500 µM
Blasentumororganoidmedium nach Lee et al. (im Weiteren als HCM (Hepatocyte Culture Media Kit) abgekürzt)	500 ml Hepatocyte Defined Medium aus Hepatocyte Culture Media Kit + 5 ml Glutamax 100X + 1 ml Primorcin – 50mg/ml + 5 µg EGF (wird vom Hersteller mitgeliefert)  →für Grundmedium 47,5 ml abnehmen + 2,5 ml 5% csFCS  →für fertiges Kulturmedium 50 ml Grundmedium abnehmen + 50 µl Y-27632 – 100 mM in PBS
Ladepuffer	5 mL Glycerol

	<ul style="list-style-type: none"> <li>+ 250 µL 40x TAE buffer</li> <li>+ Spatelspitze Bromophenol blue</li> <li>+ 3,75 mL H<sub>2</sub>O</li> </ul>
PBS + Y-27632	<ul style="list-style-type: none"> <li>50 mL DPBS</li> <li>+ 5 µl Y-27632 – 100 mM in PBS</li> </ul>
Standardkulturmedium für Tumorlinien (im Folgenden als: MEM+)	<ul style="list-style-type: none"> <li>450ml MEM mit Earle´s Salzen</li> <li>+ 50 ml FCS</li> <li>+ 5 ml Pen/Strep</li> <li>+ 5 ml Glutamax 100X</li> <li>+ 5 ml MEM Non-Essential Amino Acids Solution</li> </ul>
TAE Buffer 40x	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tris base (1,6 M) 193,6 g</li> <li>+ Natriumacetat x 3 H<sub>2</sub>O (0,8 M) 108,9 g</li> <li>+ EDTA-Na<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O (20mM) 7,44 g</li> <li>pH auf 7,2 einstellen mit Essigsäure</li> <li>Mit H<sub>2</sub>O auf 1 L auffüllen</li> </ul>
TBE-Puffer 20x	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tris base (1M) 121 g</li> <li>+ Boric Acid (1M) 61,7 g</li> <li>+ EDTA-Na<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O (20mM) 7,44 g</li> <li>Mit H<sub>2</sub>O auf 1 L auffüllen</li> </ul>
Transportmedium	<ul style="list-style-type: none"> <li>HBSS 500 mL</li> <li>+ 5 mL Gibco™ HEPES (1M)</li> <li>+ 1667 µL Aprotinin</li> <li>+ 5 mL Pen/Strep (1%)</li> </ul>
Working Medium	<ul style="list-style-type: none"> <li>45ml Advanced DMEM/F12</li> <li>+ 5 ml FCS</li> <li>+ 0,5 ml Pen/Strep</li> <li>+ 0,5 ml Glutamax 100X</li> <li>+ 5 µl Y-27632 – 100 mM in PBS</li> </ul>

## 2.3 Geräte und Verbrauchsmittel

Tabelle 3: Geräte und Verbrauchsmittel und deren Hersteller.

Produkt	Hersteller
0,5 ml Reactions Tubes	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
1,5 ml Reactions Tubes	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
24-Well-Platte	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE NEST Biotechnology, Wuxi, CHN
96-Well-Platte F-Bottom	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
96-Well-Platten U-Bottom	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
BioTron BioMetra UNO II Thermocycler Thermoblock	Biometra, Jena, USA
Cellstar 15ml-Tubes	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Cellstar 50ml-Tubes	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Combi-Spin FVL-2400N	SIA Biosan, Riga, LVA
CyroTubes Vials	Thermo Fisher Scientific, Ulm, DE
Deckgläser	R. Langenbrinck, Emmendingen, DE
Disposable Hemocytometer (Neubauerzählkammer)	KISKER Biotech, Steinfurt, DE
Horizontales Mini-Elektrophorese-System	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, DE
Injekt®-F Einwegspritze 1 ml mit luer-ansatz	B. Braun, Melsungen, DE
Inkubator (im Folgenden auch: „Brutschrank“)	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 „AxioVert A.1“	Carl Zeiss Microscopy, Jena, DE
Mikroskop „Primovert“	Carl Zeiss Microscopy, Jena, DE
NanoPhotometer® NP80	IMPLEN, München, DE

Petrischale	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Skalpell	pfm-medical, Köln, DE
SuperFrost® Plus Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen, DE
Thermomixer comfort	eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Vortex Gene 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage „Kern 770“	Kern & Sohn, Balingen, DE
Zellkulturflasche 250ml	Corning incorporated, Wiesbaden, DE
Zellsiebe (40µm, 70µm, 100 µm)	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, Hamburg, DE

## 2.4 Primer (qRT-PCR)

Sämtliche Primer mit Ausnahme TSC1 (Qiagen, Hilden, DE) wurden bei Eurofins Genomics, Ebersberg, DE bestellt. Für die Positivkontrolle der qRT-PCR wurde der QuantiTect® Primer Assay Hs\_ACTA2\_1-SG von Qiagen, Hilden, DE verwendet. Die Efficiencies der nachfolgenden Primer wurden alle bei 39 Zyklen durchgeführt, die Annealing-Temperaturen sind in Tabelle 5 angegeben.

Tabelle 4: Verwendete qRT-PCR-Primer.

Name	Sequenzen (5' -> 3')	Access number
Beta-Actin	F: AACTGGGACGACATGGAGAA	NM_001101.5
	R: ATACCCCTCGTAGATGGGCA	
CD24	F: TGAAGAACATGTGAGAGGTTTGAC	NM_013230.3 (transcript variant 1)
	R: GAAAACTGAATCTCCATTCCACAA	
CD44	F: CACAATCCAGGCAACTCCTA	NM_000610.4 (transcript variant 1)
	R: TACTCTGCTGCGTTGTCATT	
CD276	F: TTTCCTTTCCCCTCCTTCCTCC	

	R: TGTGACCAGCACATGCTTCC	NM_001024736.2 (transcript variant 1)
CD47_2	F: GGAGCCATTCTTTTCGTCCCA	NM_001777.4 (transcript variant 1)
	R: ACACGCCGCAATACAGAGAC	
FGFR3	F: AGCATCCGGCAGACGTAC	NM_000142.5 (transcript variant 1)
	R: TGAGGACAGAATTGCGATG	
GAPDH	F: GCTCTCCAGAACATCATCCCTGCC	NM_002046.7 (transcript variant 1)
	R: CGTTGTCATACCAGGAAATGAGCT T	
PD-L1	F: GTACCTTGGCTTTGCCACAT	NM_014143.4 (transcript variant 1)
	R: CCAACACCACAAGGAGGAGT	
TP53_2	F: CCAGGGCAGCTACGGTTTC	NM_000546.6 (transcript variant 1)
	R: CTCCGTCATGTGCTGTGACTG	
ERCC2	F: CGGAACTATGGGAACCTCCT	NM_000400.4 (transcript variant 1)
	R: TACTTCTCCAGGGCGACT	
PIK3CA_2	F: CCACGACCATCATCAGGTGAA	NM_006218.4
	R: CCTCACGGAGGCATTCTAAAGT	
PTEN_3	F: GCTAGCCTCTGGATTTGACG	NM_000314.8 (transcript variant 1)
	R: ACCAGGACCAGAGGAAACCT	
STAG2 (M)	F: GCCCATGACCTTTCAAAGTGG	NM_001042749.2 (transcript variant 1)
	R: TGAGTACACTGCAGTGC GTG	
BRCA1	F: TAAGCCAGAATCCAGAAGGC	NM_007294.4 (transcript variant 1)
	R: GGGATGACCTTTCCACTCCT	
HRAS	F: ATGACGGAATATAAGCTGGTGGT	NM_005343.4 (transcript variant 1)
	R: GGCACGTCTCCCATCAATG	
HER2	F: GCCCTCATCCACCATAACACC	NM_004448.4 (transcript variant 1)
	R: CATTCTCCACGCACTCCTG	
TSC1	Nicht offengelegt	NM_000368
	Nicht offengelegt	

ANGPTL4	F: CCACTTGGGACCAGGATCAC	NM_139314.3 (transcript variant 1)
	R: CGGAAGTACTGGCCGTTGAG	

Tabelle 5: Annealing-Temperaturen der verwendeten Primer.

Annealing-Temperatur (in °C)	Primer
58	CD24, CD44, PD-L1
60	GAPDH, beta-Actin, STAG2 (M), ERCC2, HRAS, BRCA1, TSC1, TP53_2, PIK3CA_2, PTEN_3, CD47_2, FGFR3, CD276
62	ANGPTL4, HER2

## 2.5 Zelllinien

Tabelle 6: Zelllinien und deren Hersteller.

Zelllinie	Hersteller
RT112 (Order Number: 300324)	Cell Lines Service, Eppelheim, DE
UMUC-15	ECACC General Cell Collection (Accession CVCL_R742) Zur Verfügung gestellt durch Dr. Peter Black, Vancouver, Kanada

## 2.6 Blasentumororganoide (BCOs)

Der Ethikantrag wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter der Projektnummer 804/2020/B02 bewilligt.

Folgende BCOs wurden im Zentrum für Medizinische Forschung Tübingen (ZMF) von der AG Aicher aus den Primärtumoren von Urothelkarzinomen verschiedener Patientinnen und Patienten aufgearbeitet und gezüchtet. Rückstellproben für Versuche wurden in flüssigem Stickstoff konserviert.

Tabelle 7: Verwendete BCO-Linien.

BCO-Nummer	#140	#154	#267	#270
------------	------	------	------	------

## **2.7 Allgemeine Methodik**

Unter dem Absaugen von nach Zentrifugation entstandenen Überständen wird im Folgenden immer, wenn nicht anders angegeben, die maschinelle Aspiration via Pasteurpipette verstanden.

Die angegebenen Zentrifugationsschritte verliefen immer bei voller Beschleunigung und einem Abbremsungsfaktor von 5/9. Der Inkubator lief bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Diese Einstellung wurden bei allen Methoden angewandt, sofern dies nicht anders angegeben wird.

## **2.8 Probengewinnung und -transport**

### ***2.8.1 Probengewinnung und -transport zum ZMF***

Die Proben, aus welchen später Organoide kultiviert werden, wurden über die bereits beschriebenen Operationsverfahren der Zystektomie oder der TUR-B der spendenden Person entnommen. Dieser Schritt geschah durch die Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen. Der Transport der Gewebeproben erfolgte auf Trockeneis in einem 15 mL Reaktionsgefäß suspendiert in einem Transportmedium (Zusammensetzung siehe oben) zum Zentrum für Medizinische Forschung, wo die Proben im Kühlschrank bei 8 °C gelagert und spätestens am Folgetag in Kultur genommen wurden.

### ***2.8.2 Probengewinnung und -transport zum Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik Tübingen***

Gewisse Anteile an Domen der kultivierten BCOs wurden mit der Methode „Matrigelauflösen von 3D-Zellkulturen“ zu Zellpellets in den jeweiligen 15 mL Reaktionsgefäßen abzentrifugiert. Anschließend wurden die Pellets in PBS resuspendiert und auf zwei 1,5 mL Reaktionsgefäße verteilt. Diese wurden anschließend abzentrifugiert (8000 xg, 20°C, 5 min, volle Beschleunigung, volle Bremse). Ein PBS-Überstand wurde versucht, so gut wie technisch möglich, per maschineller Aspiration mit einer Pasteurpipette abzunehmen. Die 1,5 mL Reaktionsgefäße wurden anschließend auf -80°C schockgefroren und dort bis zu deren Transport gelagert.

Der Transport der Zellpellets zum Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik Tübingen erfolgte auf Trockeneis.

## **2.9 Zellkulturversuche**

### **2.9.1 Zellen auftauen**

Dieses Protokoll war bereits im Labor etabliert.

Zu Beginn wurden 20 mL Working Medium im Wasserbad (37°C; Temperatureinstellung gilt im Folgenden für jede Verwendung des Wasserbads) vorgewärmt und anschließend in 50 mL-Röhrchen pipettiert. Danach wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank genommen und auf Eis zum Arbeitsplatz transportiert. Diese wurden dann im Wasserbad geschwenkt bis der Inhalt sich verflüssigt hatte. Nun wurde der Inhalt der Kryoröhrchen möglichst schnell in das Medium im 50 mL-Röhrchen überführt und in der Folge bei 20°C, 480 xg, 10 min. zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und es wurden Dome entsprechend den Methoden „Organoide splitten“ bzw. „Gewebe in eine BME-3D-Zellkultur nehmen“ auf einer 24-Well-Platte ausplattiert.

Am darauffolgenden Tag wurde immer ein kompletter Medienwechsel durchgeführt, um Reste an DMSO (Dimethylsulfoxid) aus dem Schritt der Kryokonservierung aus den Wells zu entfernen, welches im Einfriermedium enthalten war.

### **2.9.2 Umsetzen von Zellen in 2D-Kulturen**

Das Protokoll war bereits im Labor etabliert.

Das Umsetzen bzw. Passagieren von 2D-Zellkulturen wurde dann angewendet, wenn der Zellkulturflaschenboden unter dem Lichtmikroskop zu 90-100% von den jeweiligen Zellen adhärent bedeckt war.

Zu Beginn des Umsetzens wurde die jeweilige 2D-Zellkulturflasche, in die später umgesetzt wurde, im Inkubator vorgewärmt. Das Medium der bereits besiedelten Platte wurde abgenommen. Anschließend wurde 7-10 mL auf Raumtemperatur gebrachtes PBS zugegeben, welches nach kurzer Einwirkzeit wieder abgenommen wurde. Nach Zugabe von 3-5 mL Trypsin-EDTA wurde nun die 2D-

Zellkulturflasche für mindestens 5 min. im Inkubator inkubiert. Danach wurde unter dem Mikroskop überprüft, ob die Zellen sich vereinzelt und vom Flaschenboden abgelöst hatten. War dies noch nicht der Fall wurde die Kulturflasche leicht von der Seite beklopft, um ebendies zu gewährleisten. Anschließend wurde noch einmal unter dem Mikroskop das Ablösen und die Vereinzelnung überprüft. Nun wurde 7 mL MEM+ in die 2D-Zellkulturflasche gegeben und mit leichtem Schwenken in der Flasche verteilt. Die Zellsuspension wurde dann in ein 50 mL-Röhrchen überführt und anschließend zentrifugiert (20°C, 1500 rpm, 7 min., volle Beschleunigung, volle Bremse). Jetzt wurde die neue, bereits vorgewärmte 2D-Zellkulturflasche aus dem Inkubator genommen und bereit gelegt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand bis zum Zellpellet abgenommen und dann mit Medium entsprechend dem gewünschten Splittingverhältnis aufgefüllt und resuspendiert. Die Zellsuspension aus dem 50 mL-Röhrchen wurde anschließend mit dem Splittingverhältnis entsprechendem MEM+ in die neue 2D-Zellkulturflasche überführt. Bei einem Verhältnis von 1:2 wurden 5 mL MEM+ und 5 mL Zellsuspension in die neue Kulturflasche gegeben. Insgesamt waren nun 10 mL Flüssigkeit in der neuen Kulturflasche vorhanden. Zum Schluss wurde die Zellkulturflasche im Inkubator kultiviert.

### **2.9.3 Gewebe in eine BME-3D-Zellkultur nehmen**

Diese Protokolle wurden verwendet, um die ankommenden Tumorsektate aus dem OP zu Einzelzellen zu verdauen und dann auf Well-Platten zu kultivieren.

#### 2.9.3.1 Inkulturnahme

Das Protokoll war bereits im Labor etabliert.

Zu Beginn wurden das Kulturmedium, Working Medium und PBS + Y-27632 im Wasserbad auf Raumtemperatur gebracht. In diesem und folgenden Protokollen wurde der ROCK-Inhibitor Y-27632 dazu verwendet, um einer Apoptose der Zellen während den Bearbeitungsschritten entgegenzuwirken. Die Collagenase/Hyaluronidase wurde außerhalb des Wasserbads auf Raumtemperatur erwärmt. Das im Transportmedium gelieferte Gewebestück wurde via Aspiration mittels einer Pipette in eine Petrischale gelegt und der Rest des Transportmediums, sowohl aus Transportröhrchen als auch aus Petrischale,

wurde in ein 15 mL-Röhrchen überführt. Das nun von Medium weitestgehend befreite Gewebestück wurde auf einer Waage gewogen und das Gewicht notiert. Anschließend wurde 1 mL Working Medium der Petrischale hinzugefügt. In der Petrischale wurde dann das Gewebe mit Hilfe von 2 sterilen Skalpellens in ca. 1 mm große Stücke zerteilt. Nun wurde die sich in der Petrischale befindende Gewebe-Medium-Suspension mit einer Pipette aufgenommen und in das 15 mL-Röhrchen überführt. Zellreste, die in der Petrischale verblieben, wurden erneut mit Working Medium gespült und in das Röhrchen gegeben. Dieses wurde dann abzentrifugiert (20°C, 480 xg, 10 min) und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde nun in 1 mL PBS + Y-27632 pro 100 mg Gewebe und 15 µL Collagenase/Hyaluronidase pro 100 mg Gewebe aufgenommen, resuspendiert und anschließend für 30 min in das Wasserbad gestellt. In dieser Zeit wurde das Röhrchen immer wieder herausgenommen und geschwenkt. Danach wurde erneut dieselbe Menge an Collagenase/Hyaluronidase hinzugefügt, dann geschwenkt und wieder für 30 min. mit gelegentlichem Schwenken in das Wasserbad gestellt. Der nun durch die Collagenase/Hyaluronidase verdaute Inhalt des Röhrchens wurde durch ein Zellsieb (70 µm) in ein 50 mL-Röhrchen überführt. Es folgte eine weitere Zentrifugation (20°C, 150 xg, 7 min), nach welcher wieder der Überstand abgenommen wurde. Nun wurden 2 mL kalter RBC Lysis Buffer hinzugegeben und für 2-6 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde mit 3 mL Working Medium abgestoppt und mit denselben Einstellungen wie im Schritt zuvor erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet wurde in 10 µL Working Medium pro geplantem Dom resuspendiert. Dazu wurden danach 30 µL Matrigel® pro geplantem Dom möglichst luftblasenfrei hinzugefügt und resuspendiert. Insgesamt sollte man aus Sicherheitsgründen immer 10 µL Matrigel® pro Ansatz mehr dazu pipettieren als berechnet. Aus dem 50 mL-Röhrchen wurden im Anschluss 40 µL pro Dom und Well entnommen und auf eine bereits im Brutschrank vorgewärmte 24-Well-Platte pipettiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Matrigel®-Zell-Suspension luftblasenfrei und ins Well-Zentrum bis zum ersten Pipettendruckpunkt pipettiert wurde. Die Platte wurde auf den Kopf gedreht und so für 30 min in den Brutschrank gestellt. Nach dem Aushärten des Matrigel®

wurde die Platte wieder zurückgedreht und 500 µL Kulturmedium pro Well mit Dom wurden durch Pipettieren an den Wellrand dazugegeben. Die umliegenden leeren Wells wurden mit ca. 1 mL PBS als Verdampfungsschutz befüllt. Die Platte wurde schlussendlich in den Brutschrank zum Kultivieren gestellt.

#### 2.9.3.2 Zellerhalt

Medienwechsel erfolgten am 7. Folgetag nach Inkulturnahme bzw. letztem Medienwechsel mit 500 µL des entsprechenden Mediums. Am 3. oder 4. Folgetag nach der Inkulturnahme oder dem letzten Medienwechsel wurden zusätzlich 100 µL Medium pro Well dazu pipettiert.

Etwaige Abweichungen von diesem Schema wurden unternommen, wenn entweder ein Farbumschlag im Medium durch den pH-Indikator Phenolrot eine starke Metabolisierung des Kulturmediums anzeigte oder wenn sich lichtmikroskopisch Anzeichen ergaben, dass die Zellen begannen sich in ihrer Struktur aufzulösen.

#### 2.9.3.3 3D-Kultivierung von Zelllinien

Die jeweiligen Zelllinien wurden ausgehend von einem Zellpellet nach denselben Schritten wie oben erwähnt in Dome gesetzt und mit ihrem Medium in Kultur genommen. Auch der Zellerhalt lief wie zuvor beschrieben ab.

#### **2.9.4 In 3D-Kultur nehmen mit GrowDex®**

Das Protokoll entspricht den Angaben des Herstellers. Etwaige Optimierung zur besseren Handhabung der einzelnen Schritte wurden von Herrn cand. med. Paul Pollehne übernommen.

Um GrowDex® besser handhaben zu können, wurde das GrowDex® in der vom Hersteller gelieferten Spritze in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und anschließend für 15 sec bei 10.000 xg zentrifugiert. Aufgrund der hohen Viskosität von GrowDex® wurde zum einfacheren Pipettieren das distale Drittel einer 1000 µL Pipettenspitze mit einem sterilen Skalpell abgetrennt. Zudem wurde GrowDex® in einer Ausgangskonzentration von 1,5% geliefert. Je nach auszusähernder Zellart musste die Arbeitskonzentration angepasst werden.

Vor dem Herstellen einer GrowDex®-Arbeitskonzentration wurde eine 96-Well-Platte (F-Bottom) beschriftet und im Brutschrank warm gestellt. Anschließend wurden die auszusäenden Zellen nach deren Ablösung aus ihrer 2D-Zellkulturflasche in ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt, bei 480 xg, 20°C, 10 min zentrifugiert und nach dem Abnehmen des Überstandes gezählt. Die gewünschte Zellzahl wurde dann in der nachfolgend berechneten Menge an Kulturmedium resuspendiert. Folgende Volumina an Reagenzien wurden für das Ausplattieren von 12 Domen in 0,2% bzw. 0,5% GrowDex®-Konzentration pipettiert:

Für eine 0,2% GrowDex®-Arbeitskonzentration wurden 172,9 µL GrowDex® (1,5%), 1067,1 µL Kulturmedium und 60 µL Zellsuspension vermennt.

Für eine 0,5% GrowDex®-Arbeitskonzentration wurden 432,9 µL GrowDex® (1,5%), 807,1 µL Kulturmedium und 60 µL Zellsuspension vermennt.

Nun wurde zuerst das berechnete Kulturmedium in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß vorgelegt. Dann wurde die entsprechende Menge an GrowDex® vorsichtig hinzugefügt und anschließend mit einer 100 µL Pipettenspitze mit dem Kulturmedium verrührt bis der Inhalt des Reaktionsgefäß trüb, aber homogen wurde. Danach wurde vorsichtig resuspendiert. Jetzt kam das berechnete Volumen an Zellsuspension hinzu, gefolgt von erneutem Resuspendieren. Es wurden nun 100 µL der GrowDex®-Arbeitssuspension pro Well auf die vorgewärmte 96-Well-Platte ausplattiert. Pro Well wurden 100 µL Kulturmedium durch das Pipettieren am Wellrand dem GrowDex® zugefügt. Ähnlich zu der Inkulturnahme mit Matrigel® wurde auch hier in die umliegenden Wells 100 µL PBS pipettiert, um einem Verdampfen des Kulturmediums entgegenzuwirken. Zuletzt wurde die Platte im Brutschrank inkubiert.

Der Erhalt der Zellen wurde durch eine Medienzugabe von 50 µL nach ca. 4 d und einen Medienwechsel nach 7 d sichergestellt.

### **2.9.5 Passagieren von 3D-Zellkulturen in BME**

Das Protokoll war bereits im Labor etabliert.

Das Passagieren wurde angewandt, wenn die Zellen in den Kulturen zu dicht wuchsen, in ihrem Wachstumsverhalten stagnierten oder die Sphäroid- bzw. Organoidstruktur begann, sich aufzulösen.

Initial wurde das Kulturmedium aus den Wells entnommen und in ein 15 mL-Reaktionsgefäß überführt. Die Wells, die Dome enthielten, wurden 2-3x mit 1 mL kaltem PBS + Y-27632 unter leichtem Abkratzen der Dome gewaschen. Die PBS-Zellsuspension wurde ebenfalls in das Reaktionsgefäß pipettiert. Nach dem Waschgang wurden die Wells mikroskopiert, ob noch Zellreste hinterblieben waren. War das der Fall, wurde erneut mit PBS + Y-27632 gewaschen und in das Reaktionsgefäß überführt. Das Reaktionsgefäß wurde nun zentrifugiert (480 xg, 10 min., 20°C) und der anschließend entstandene Überstand wurde bis zur „Überstand-BME-Grenze“ abgesaugt. Jetzt wurden 1 mL TrypLE pro 2 entnommenen Domen auf einen Schlag dazugegeben. Das Röhrchen wurde zum Inkubieren für 2-10 min je nach Zelldichte und Sphäroid- bzw. Organoidgröße (meistens 3 min.) in das Wasserbad gestellt. Nach dem Inkubationsschritt wurde mit einer Pipettendoppelspitze (100 µL-Spitze über einer 1000 µL-Spitze) resuspendiert. Das TrypLE im Röhrchen wurde durch Hinzugeben von 8-9 mL Working Medium abgestoppt. Nun wurde erneut zentrifugiert (480 xg, 10 min., 20°C) und der Überstand abgesaugt. Das entstandene Zellpellet wurde in einer suffizienten Menge an Working Medium resuspendiert (10 µL Working Medium pro neuem Dom). Dazu wurden 30 µL Matrigel® (+ 10 µL als Sicherheitsfaktor) pipettiert. Die Suspension wurde vorsichtig resuspendiert, um möglichst keine Luftblasen zu verursachen. Anschließend wurden 40 µL pro Dom der Suspension entnommen und auf einer bereits im Brutschrank vorgewärmten 24-Well-Platte ausplattiert, um 180° gedreht und für 30 min zum Aushärten des BME in den Brutschrank gestellt. Danach wurden 500 µL Kulturmedium in die besetzten Wells und jeweils 1 mL PBS in die umliegenden Wells pipettiert. Abschließend wurde die Platte wieder zur Kultivierung in den Brutschrank gestellt.

### **2.9.6 Splitten von 3D-Zellkulturen mit Dispase II**

Das Protokoll war bereits im Labor etabliert.

Dieses Protokoll wurde unter den gleichen Kriterien eingesetzt, wie die Methode „Passagieren von 3D-Zellkulturen in BME“. Diese Art des Splittens von 3D-Kulturen wurde verwendet, wenn man die Zellen nicht vereinzeln wollte, was mit dem Enzym Dispase II statt TrypLE funktionierte.

Auch hier wurde zunächst das Kulturmedium aus den besetzten Wells entnommen und in ein 15 mL-Röhrchen überführt. Die Wells wurden dann gleich wie in der Methode („Passagieren von 3D-Zellkulturen in BME“) mit PBS + Y-27632 gewaschen, mikroskopiert und im selben Programm zentrifugiert. Der Überstand wurde nun bis zum Matrigel® abgenommen. Es wurden 1 mL PBS + Y-27632 und 100 µL Dispase II hinzugegeben, gevortext und für 30 min im Wasserbad inkubiert. Danach wurde erneut 100 µL Dispase II dazugegeben, gevortext und für 30 min im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurde mit Working Medium auf 10 mL aufgefüllt. Es folgte eine weitere Zentrifugation (480 xg, 20°C, 10 min,), nach welcher der Überstand abgenommen wurde. Um neue Dome zu setzen, wurden die gleichen Schritte unternommen wie in der Methode „Gewebe in eine BME-3D-Zellkultur nehmen“.

### **2.9.7 Auflösen von BME in 3D-Zellkulturen**

Das Protokoll wurde von mir entworfen und etabliert.

Das Protokoll fand dann seine Anwendung, wenn die Zellen in den BME-Domen dicht wuchsen, in ihrem Wachstum stagnierten und oder begannen ihre Struktur aufzulösen. Wichtig war hierbei, dass eine suffiziente Zellzahl durch die Kultivierung erreicht wurde, da sich im nachfolgenden Schritt eine RNA-Extraktion anschloss. Das Protokoll wurde von mir unter dem Gesichtspunkt etabliert, dass etwaige BME-Reste einerseits die Extraktionssäulen des RNeasy Kits verstopfen können, da BME bei Raumtemperatur fest wird. Andererseits können Bestandteile von BME bei der Messung von RNA im NanoPhotometer® NP80 die RNA-Konzentration falsch-positiv verfälschen. Somit hat das Protokoll u.a. den Anspruch BME restlos von den zu vereinzeln Zellen zu trennen und zu entfernen.

Zuerst wurde die Zentrifuge im Leerlauf bei 4°C (480 xg, 10 min, Beschleunigung 9/9, Bremse 7/9) heruntergekühlt, bis alle Reagenzien vorbereitet wurden.

Außerhalb der Zentrifugationsschritte war die Zentrifuge geschlossen, um ein Erwärmen des Inneren zu Verhindern. Die zu behandelnde 24-Wellplatte wurde auf Eis gestellt und während des gesamten Vorgangs dort belassen. Das Medium wurde aus allen zu bearbeitenden Wells abgenommen und in die jeweiligen 15 mL-Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurde mit 1 mL kaltem PBS pro Well versucht, die Dome unter ständigem Kratzen und Resuspendieren vom Wellboden zu lösen. Die Suspension wurde dann in das oben beschriebene 15 mL-Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt des Abkratzens, Resuspendierens und Überführens wurde mit 500 µL kaltem PBS pro Well wiederholt. Nun wurde unter dem Mikroskop überprüft, ob alle Zell- und Domreste vollständig abgelöst und dem Well entnommen wurden. Bei Resten im Well wurde der „Waschschritt“ mit 500 µL kaltem PBS wiederholt. Das 15 mL-Reaktionsgefäß wurde nun zentrifugiert (4°C, 480 xg, 10 min, Beschleunigung 9/9, Bremse 7/9). Anschließend wurde der Überstand bis zum sich unten abgelagerten Matrigel® abgesaugt. Danach wurde 1 mL raumtemperiertes TrypLE pro abgelöstem Well in das 15 mL-Reaktionsgefäß pipettiert. Der Inhalt des Reaktionsgefäß wurde sogleich im Vortexmischer vermischt und danach im Wasserbad inkubiert.

Für die Vorversuche zur Etablierung der Methoden wurde hier 15 min inkubiert mit einem Vortexen nach 10 min und 15 min. In den Hauptversuchen wurde nur 10 min ohne Vortexen inkubiert.

Nach der Inkubation wurde anschließend mit kaltem PBS auf 12 mL aufgefüllt. Nun wurde wieder zentrifugiert (4°C, 1000 xg, 5 min., Beschleunigung 9/9, Bremse 7/9). Der Überstand wurde auf ca. 200 µL abgenommen. Im nächsten Schritt wurde wieder auf 10 mL mit kaltem PBS aufgefüllt, gefolgt von einem Mischen im Vortexmischer. Es folgte wieder eine Zentrifugation (4°C, 1200 xg, 5 min, Beschleunigung 9/9, Bremse 7/9). Auch hier wurde anschließend wieder der Überstand auf 200 µL reduziert. Dann wurde erneut auf 10 mL mit kaltem PBS aufgefüllt und im Vortexmischer gemischt. Es folgte nun wieder eine Zentrifugation (4°C, 1200 xg, 5 min., Beschleunigung 9/9, Bremse 7/9). Jetzt wurde der Überstand im Röhrchen so genau wie möglich bis auf das Zellpellet abgenommen.

### **2.9.8 3D-Matrixauflösen mit GrowDase®**

Das Protokoll entspricht den Angaben des Herstellers und wurde unter denselben Kriterien wie die Methode „Auflösen von BME in 3D-Zellkulturen“.

Als Erstes wurde hier die benötigte GrowDase®-Arbeitskonzentration berechnet. Die entsprechenden Formeln bzw. eine Tabelle finden sich auf der Packungsbeilage. Zur Herstellung der Arbeitskonzentration wurden die berechneten Volumina von GrowDase® und Kulturmedium miteinander vermischt. Nun wurde das dem GrowDex® in den Wells überstehende Kulturmedium vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Danach wurde die GrowDase®-Suspension auf das GrowDex® pipettiert. Die 96-Well-Platten wurden dann für mind. 8h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Inhalt der Wells abgenommen und in ein 50 mL-Reaktionsgefäß überführt. Zusätzlich wurden die Wells mit jeweils 100 µL PBS + Y-27632 vorsichtig gewaschen und der Inhalt ebenfalls in das 50 mL-Röhrchen überführt. Etwaige adhärent am Wellboden gewachsenen Zellen wurden nicht abgelöst. Zur weiteren Bearbeitung der Zellen wurden diese bei 480 xg, 20°C, 10 min zentrifugiert und der entstandene Überstand wurde abgenommen.

### **2.9.9 Zellzählung**

Die Zellzählung ging stets von einem abzentrifugierten Zellpellet aus, welches in einer bestimmten Menge an Kultur- oder Workingmedium resuspendiert wurde. Es wurden anschließend 20 µL Trypanblau und 20 µL Tumorzellsuspension in einem Well einer 96-Rundwell-Platte gemischt. Aus diesem Gemisch wurden ca. 20 µL entnommen und in die Kammern A und B einer Neubauerzählkammer pipettiert. Unter dem Lichtmikroskop wurden pro Kammer die Zellen in den 4 großen Eckquadraten ausgezählt. Mit folgenden Rechnungen wurde anschließend die Zellzahl im gesamten Volumen der Tumorzellsuspension bestimmt.

$$\text{Mittelwert} = \frac{(\text{Zellzahl (Kammer A)} + \text{Zellzahl (Kammer B)})}{4}$$

$$\text{Zellzahl pro mL} = \text{Mittelwert} \times 10^4 \frac{1}{\text{mL}}$$

*Zellzahl der gesamten Suspension = Zellzahl pro mL x Suspensionsvolumen*

## **2.10 Differential gene expression**

Für die Auswertung der differential gene expression wurden folgende Protokolle des Zentrums für Quantitative Biologie Tübingen (QBiC) verwendet und durch dieses durchgeführt.

Das „Nextflow-based nf-core pipeline rnaseq v1.4.2“ wurde für RNAseq Bioinformatik Analyse benutzt. FASTQC v0.11.8 (Andrews et al. 2010) wurde benutzt, um die Qualität der FASTQ Dateien zu bestimmen. Anschließend wurde ein Trimmen der Adapter mit Trim Galore v0.6.4 (Krueger 2012) durchgeführt. Der „STAR v2.6.1d (Dobin et al. 2013) aligner“ wurde benutzt, um die „Reads“, die die Qualitätskontrolle des Referenzgenoms passierten, zu kartieren. Die RNA-seq Qualitätskontrolle wurde mit RSeqQC v3.0.1 (Wang, Wang and Li 2012) und die „Read-Quantifizierung“ der Merkmale (z.B. Gene) mit featureCounts v1.6.4 (Liao, Smyth, and Shi 2014) durchgeführt. Eine Aggregation der Qualitätskontrolle für die Analyse der RNA-Sequenzierung wurde mit MultiQC v1.7 (P. Ewels et al. 2016) durchgeführt.

Die Analyse der differential gene expression wurde mit der „rnadeseq 2.1 pipeline“ durchgeführt, welche mittels dem „nf-core template (P. A. Ewels et al. 2020)“ geschrieben wurde. Für die Analyse der differential gene expression wurden die Daten der Quantifizierung der „Reads“ aus „featureCounts“ mit dem R Paket DESeq2 v1.34.0 (Love, Anders, and Huber 2014) prozessiert. Für die Pathway-Analyse wurden die R Pakete gprofiler2 v0.2.1, AnnotationDbi v1.56.2 und org.Hs.eg.db v1.56.2 eingesetzt. Zudem wurden folgende Datenbanken abgefragt: KEGG: KEGG FTP Release 27.03.2023, REAC: annotations: BioMart, classes 29.03.2023. Resultierende Grafiken wurden in RStudio v4.1.2 (11.01.2021) hauptsächlich mit dem R Paket ggplot2 v3.3.5 erstellt. Die Abschlussberichte wurde mit dem R Paket rmarkdown v2.11, knitr v1.37 und DT v0.20 erstellt.

## **2.11 RNA und qRT-PCR**

Bei den folgenden Protokollen wurden zu jeder Zeit Filterpipettenspitzen verwendet.

### **2.11.1 RNA-Extraktion mit dem RNeasy® Mini Kit (250)**

Die RNA-Extraktion schloss sich konsekutiv an die Methoden „Auflösen von BME in 3D-Zellkulturen“ und „3D-Matrixauflösen mit GrowDase®“ an. Ziel war es aus den abzentrifugierten Zellen möglichst viel RNA für eine qRT-PCR zu isolieren.

Das Protokoll entspricht in seinen Grundzügen der Anleitung des Herstellers (Qiagen, Hilden, DE) des RNeasy® Kits, wurde aber in manchen Punkten von mir abgeändert:

In den Vorversuchen blieb das Herstellerprotokoll unverändert.

In den Hauptversuchen wurde im Schritt des Zufügens von RNase-freiem Wasser eine Änderung der Menge vorgenommen. Statt 40 µL wurden nur 20 µL der Säule hinzugegeben (siehe 3.1.1.3).

Die fertig isolierte RNA wurde auf -80°C gelagert.

### **2.11.2 Umschreiben von RNA in cDNA**

Das Protokoll entspricht den Angaben des Herstellers. Zum Umschreiben der RNA in cDNA (komplementäre DNA) wurde das Advantage® RT-for-PCR Kit von TaKaRa Bio Inc., Kusatsu, JPN verwendet. Sinn des Umschreibens war im Anschluss eine qRT-PCR durchzuführen, welche als Ausgangsmaterial cDNA statt RNA benutzt.

Ausgangspunkt für diese Methode war die mit dem RNeasy® Kit isolierte RNA, deren Konzentration (in ng/µL) im Anschluss im NanoPhotometer® NP80 von IMPLEN, München, DE gemessen wurde. Die RNA wurde anschließend mit depc-Water und oligo(dT)-Primern im folgenden Verhältnis in einem 0,5 mL Reaktionsgefäß gemischt:

*Tabelle 8: Verhältnis von µg RNA zu depc-Water und oligo(dT)-Primern zur Umschreibung der RNA in cDNA.*

<b>Reagenz</b>	
RNA	1 µg
depc-Water	12,5 µL
Oligo(dT)-Primer	1 µL

Anschließend wurde das Gemisch für 2 min bei 70°C inkubiert. Dies diente dem Verhindern einer Ausbildung von sogenannten Haarnadelstrukturen innerhalb der RNA, da diese die Umschreibung von RNA in cDNA behindern und somit zu einer Umschreibung in eine inkomplette cDNA führen können. Nach diesem Inkubationsschritt wurden 6,5 µL eines MasterMixes mit folgender Zusammensetzung in das 0,5 mL Reaktionsgefäß pipettiert.

*Tabelle 9: Zusammensetzung des MasterMixes zur Umschreibung von RNA in cDNA.*

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen in µL</b>
5x Buffer	4
dNTP-Mix	1
Reverse Transkriptase	1
RNAse Inhibitor	0,5

Nun folgte eine weitere Inkubation im NanoPhotometer® NP80 bei einer Temperatur von 42°C für 1h und 7 min. Hier fand der Bindungsschritt der reversen Transkriptase an die oligo(dT)-Primer mit konsekutiver cDNA-Synthese statt. Nach diesem Inkubationsschritt befanden sich 20 µL im 0,5 mL Reaktionsgefäß, in welches zusätzlich 80 µL depc-Water pipettiert wurden.

Die fertig synthetisierte cDNA wurde auf -20°C gelagert.

### **2.11.3 Primer-Mix herstellen**

Die Primer-Mixe wurden bei der qRT-PCR benötigt und mussten erst aus den gelieferten Lyophilisaten hergestellt werden.

#### 2.11.3.1 Qiagen Primer

Das gelieferte Lyophilisat wurde in 1,1 mL TE-Puffer gelöst und in 50 µL-Aliquots bei -20°C gelagert.

#### 2.11.3.2 MWG Primer

Die Lyophilisate wurden mit NTW (Non Template Water) entsprechend dem auf dem Beipackzettel angegebenen Mischverhältnis vermengt und anschließend im Vortexmischer gemischt. Danach wurde kurz abzentrifugiert. Für den finalen Primer-Mix wurden insgesamt 400 µL NTW, 50 µl sense-Primer und 50 µL

antisense-Primer miteinander in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

#### **2.11.4 qRT-PCR mit dem LightCycler 480 II**

Das Protokoll entspricht den Angaben des Herstellers. Die qRT-PCR wurde zur quantitativen Expressionsanalyse von mRNAs verschiedene Gene benutzt in verschiedenen 3D-Zellkulturen. Die Expressionsanalyse wurde mit dem LightCycler 480 II und dem LightCycler 480 SYBR Green I Master-Kit von Roche, Mannheim, DE durchgeführt. In ein Well der mitgelieferten 96-Well-Platte wurden folgende Reagenzien pipettiert:

*Tabelle 10: Zusammensetzung des Inhaltes eines Wells bei einer qRT-PCR.*

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen in <math>\mu\text{L}</math></b>
cDNA	2
MasterMix	18
Bestehend aus:	
SybrGreen	10
NTW	6
Primer Mix	2

Der Vorgang einer qRT-PCR lief wie folgendermaßen ab:

Initial startete die Denaturierung auf 95°C. Anschließend folgte die Amplifikation, welche standardmäßig 39 Zyklen beinhaltete. 1 Zyklus der Amplifikation bestand aus einer Denaturierung (95°C, 10 sec), Annealing (58-62°C, 20 sec) und Elongation (72°C, 30 sec). Die 39 Amplifikationszyklen wurden von einer Melting Curve von 60°C auf 95°C und einem anschließenden Kühlschritt beendet.

Zur quantitativen Analyse der Zielprimer wurden diese anhand zweier sog. Housekeeping Genes (hier: GAPDH und beta-Actin) normalisiert.

Die in den Analysen erwähnten mittleren Cp-Werte (crossing point) beschreiben den rechnerisch ermittelten Mittelwert aus den beiden PCR-Analysen eines

analysierten Transkripts. Der einzelne Cp-Wert gibt die Zykluszahl an, ab welcher die Amplifikation des Transkripts eine messbare Konzentration erreicht.

### **2.11.5 Bestimmung von Primer-Efficiencies**

Da einige der angegebenen Primer noch nicht im Labor etabliert waren und bestellt wurden, musste zunächst für diese eine Efficiency bestimmt werden. Diese Primer-Efficiency gibt an, wie viele cDNA-Stränge sich bei dem Elongationsschritt der qRT-PCR aus einem Ausgangsstrang amplifizieren. Eine Efficiency von „2“ bedeutet also, dass, idealerweise, 2 neue cDNA-Stränge aus einem Ausgangsstrang entstehen. In der Realität besitzen Primer aber Efficiencies, die unter diesem Wert liegen. Diese gilt es mittels einer Verdünnungsreihe und einem vorher definierten Genpool zu bestimmen. Der Genpool besteht aus einer klar definierten Zusammensetzung an cDNAs verschiedener Zellarten, welche das dem Primer zugehörige Transkript exprimieren.

Die Bestimmung der Efficiency unter einer definierten Annealing-Temperatur wurde von derselben Person, mit demselben Genpool unter möglichst gleichen Bedingungen an 3 verschiedenen Tagen durchgeführt. Abschließend wurde aus den Ergebnissen der 3 Tage ein Mittelwert gebildet, welcher als etablierte Efficiency für weitere Experimente mit dem Primer anzusehen war. Zudem wurden die Melting Curves der qRT-PCR-Produkte angeschaut, welche einen schmalbasigen Peak zeigten, wenn der Primer nur ein Produkt amplifizierte.

Die Bestimmung wurde mit dem LightCycler 480 II und dem LightCycler 480 SYBR Green I Master-Kit von Roche, Mannheim, DE durchgeführt. In jeweils ein Well der 96-Well-Platte wurden folgende Reagenzien pipettiert:

*Tabelle 11: Zusammensetzung des Inhalts eines Wells zur Bestimmung einer Primer-Efficiency.*

Reagenz	Volumen in $\mu\text{L}$
cDNA (Genpool)	2
MasterMix bestehend aus:	18

SybrGreen	10
NTW	6
PrimerMix	2

Die Liste der verwendeten Primer und ihrer Annealing-Temperaturen findet sich im Materialteil.

### **2.11.6 Gelgießen der PCR-Produkte**

Das Protokoll war bereits im Labor etabliert.

Das Protokoll dient der gelelektrophoretischen Bestimmung des PCR-Produktes eines zu etablierenden qRT-PCR-Primers.

Am Anfang wurde in einer 96-Rundwellplatte aus 10 µL des PCR-Produkts aus einem Well der 96-Well-Platte der PCR und 4 µL Ladepuffer ein PCR-Gemisch unter Resuspendieren hergestellt und für später beiseite gestellt. Danach wurde ein 2% Agarosegel hergestellt. Es wurden insgesamt pro Gel 1g Agarose und 50 mL 1x TBE zusammen mit einem Rührfisch in einen Erlenmeyerkolben gegeben und anschließend mit Frischhaltefolie locker abgedeckt. Das Ganze wurde dann in einer Mikrowelle bei höchster Stufe erhitzt, bis keine Schlieren in der Suspension zu sehen waren. Danach wurde pro Gel 5 µL Gel Red Nucleic Acid unter Resuspendieren hinzugefügt. Der Inhalt des Kolbens wurde nun auf ca. 60°C durch die Raumtemperatur abgekühlt, während dieser auf einem Magnetrührer stand, der mittels dem Rührfisch den Inhalt rührte. Dann wurde der Inhalt in die dafür vorgesehene Vertiefung im Elektrophoresegerät gegossen. Nach 20-30 min. wurde überprüft, ob der Inhalt zu einem festen Gel wurde. War dies der Fall, wurde das Gel in der Vertiefung der Elektrophorese mit 1x TBE überflutet. Der Kamm für die Taschen im Gel wurde herausgenommen und 10 µL des PCR-Gemisches bzw. 7 µL der 100 bp Ladder wurden in die jeweiligen Taschen gefüllt. Die Elektrophorese wurde nun mit 100V für 40 min eingestellt und bei Bedarf auch länger laufen gelassen. Das Elektrophoreseprodukt wurde abschließend aus der Elektrophorese genommen und unter einem UV-Licht bewertet.

## **2.12 Software**

Zur Erstellung der Grafiken wurden folgende Softwares verwendet: GraphPad Prism 10.1.1, GIMP 2.10 und RStudio 4.1.2 (siehe 2.10).

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Vorversuche zur Etablierung und Verbesserung von Methoden**

#### **3.1.1 Optimierung der RNA-Extraktion aus 3D-Zellkulturen in BME**

##### 3.1.1.1 Reinheitskontrolle der mit alten Methoden extrahierten RNA

Vor dieser Arbeit wurde im Labor bereits versucht, RNA aus BCOs zu isolieren. Jedoch kamen dabei Probleme auf, wie etwa eine zu geringe Extraktionskonzentration oder ein Verstopfen der RNA-Extraktionssäulen mit bei Raumtemperatur aushärtendem BME. Gerade Obstruktionen der Säulen mit BME stellten zwei Probleme dar. Einerseits konnte nicht mit Sicherheit festgestellt werden, dass ein Großteil der zu isolierenden RNA auch am Ende isoliert wurde. Andererseits wurde vermutet, dass bei der Extraktion manche Bestandteile des BMEs mit extrahiert wurden und sich am Ende neben der extrahierten RNA im 1,5 mL Reaktionsgefäß befanden. Die RNA-Messung aus der Extraktionssuspension könnte somit verfälscht werden und falsch-hohe Werte ergeben.

Um einen Hinweis auf die Reinheit der RNA aus BCOs zu bekommen, die bereits extrahiert wurde, wurde diese in cDNA umgeschrieben, falls sie nicht bereits als solche vorlag. Anschließend wurde mit den Primern, die später auch in Hauptversuchen benutzt wurden, eine qRT-PCR durchgeführt. Unvollständige Daten (in Tbl. 13 als leer dargestellt) rühren daher, dass nicht mehr genug cDNA, respektive RNA, von den jeweiligen BCO-Linien vorhanden war. Alle in Tbl. 12 aufgeführten BCOs wurden vor ihrem Auftauen alten Protokollen nach in 48-Well- statt 24-Well-Platten kultiviert.

Tabelle 12: RNA-Extraktionskonzentrationen (ng/μL) verschiedener BCO-Linien, welche mit alten Methoden extrahiert wurden.

BCO-Linie, Passagen (P), Domanzahl	RNA-Konzentration (ng/μL)
#140, P0, 24 Dome	211,88
#140, P2, 13 Dome	211,72
#140, P11, 10 Dome	334,92
#154, P1, 12 Dome	474,88
#154, P6, 10 Dome	560,48
#154, P11, 12 Dome	813,88

Tabelle 13: Target-to-Reference-Ratios der qRT-PCRs verschiedener Primer ausgehend von cDNAs von BCO-Linien, die nach alten Protokollen synthetisiert wurden (Teil 1). Leer gelassene Felder stellen fehlende Messwerte dar. Fett-kursiv markierte Werte zeigen Werte mit starken Abweichungen.

	CD24	PDL-1	CD44	HER-2	PTEN_3	TP53_2	PIK3CA_2
#140, P0	0,4873	0,0006	0,0733	0,0227	0,0252	0,0018	0,0019
#140, P2		<b>1,9680</b>	0,0000			<b>0,4394</b>	<b>1,0580</b>
#140, P11	0,4674	0,0008	0,0788	0,0239	0,0192	0,0019	0,0014
#154, P1	0,8298	0,0005	0,0651	0,0120	0,0162	0,0013	0,0006
#154, P6	0,4527	0,0007	0,0760	0,0173	0,0194	0,0022	0,0014
#154, P11	<b>1,3760</b>	0,0011	<b>0,5098</b>	0,0410	0,0684	0,0051	0,0069

Tabelle 14: Target-to-Reference-Ratios der qRT-PCRs verschiedener Primer ausgehend von cDNAs von BCO-Linien, die nach alten Protokollen synthetisiert wurden (Teil 2). Leer gelassene Felder stellen fehlende Messwerte dar. Fett-kursiv markierte Werte zeigen Werte mit starken Abweichungen.

	CD276	STAG-2 (M)	CD47_2	FGFR-3	BRCA-1	TSC-1	ERCC-2	HRAS
#140, P0	0,0005	0,0082	0,0195	0,0003	0,0019	0,0008	0,0009	0,0013
#140, P2	0,0000	0,0275	<b>0,0750</b>	0,0000	0,0018	0,0005	0,0010	0,0016
#140, P11	0,0011	0,0056	0,0135	0,0000	0,0021	0,0005	0,0015	0,0017
#154, P1	0,0013	0,0066	0,0135	0,0000	0,0015	0,0007	0,0018	0,0009
#154, P6	0,0010	0,0081	0,0144	0,0001	0,0021	0,0006	0,0017	0,0014
#154, P11	0,0005	0,0212	0,0325	0,0000	0,0029	0,0046	0,0029	0,0005

Aus Beobachtungen vergangener Experimente ergab sich, dass mit den damaligen Methoden, BME nicht verlässlich und rückstandslos von den Zellen isoliert werden konnte. Somit blieb immer eine ungewisse Menge an den Zellen haften, was konsekutiv die RNA-Extraktion und auch die Ausbeute beeinflusste. Die Tabellen 13 und 14 zeigen den Einfluss des BMEs. Die in den Tabellen dickkursiv markierten Ausreißer finden sich ausschließlich in den Proben #140 P2 und #154, P11. Daher ist zu vermuten, dass sich im Ausgangsmaterial für diese qRT-PCR-Proben Verunreinigungen in den RNA-Extraktionssäulen befanden. Zum Vergleich sind die qRT-PCR-Ergebnisse aus 3.2.2 heranzuziehen, welche Ausreißer in diesen Dimensionen nicht aufwiesen.

#### 3.1.1.2 Ermitteln einer suffizienten Zell- und Domzahl für RNA-Extraktionen

In den ersten Vorversuchen bestanden mehrere Fragestellungen. Zum einen war herauszufinden, wie viele Zellen bzw. Dome zu kultivieren waren, um in einer anschließenden RNA-Extraktion, eine suffiziente RNA-Extraktionskonzentration zu gewinnen. Eine minimale RNA-Konzentration von 80 ng/μL war deshalb zu erzielen, da für konsekutive qRT-PCRs mindestens 1 ng cDNA benötigt wurden und im Schritt des Umschreibens von RNA in 1 ng cDNA vom Hersteller 80 ng/μL RNA als minimale Substratkonzentration für das Umschreiben mit dem Advantage® RT-for-PCR Kit angegeben war. Zum anderen dienten qRT-PCRs der extrahierten RNA bzw. umgeschriebenen cDNA der 3D-Zellkulturen als Nachweis, dass die im NanoPhotometer® NP80 (IMPLEN) gemessene RNA-Konzentration nicht falsch-positiv war.

Zur Etablierung der Methoden wurde zunächst eine 2D-Zellkultur an RT112 kultiviert, bis diese zu 90-100% dicht gewachsen waren. Diese wurde dann entsprechend der Methode „Umsetzen von Zellen in 2D-Kulturen“ bis zum Erreichen von einem Zellpellet bearbeitet. Das Pellet wurde in 20 mL MEM+ resuspendiert und die Zellen wurden gezählt. Nun wurden 5 mL MEM+ in jeweils eines von insgesamt neun 15 mL Reaktionsgefäßen vorgelegt. Jedes Reaktionsgefäß wurde einer bestimmten Zellzahl an RT112 zugewiesen, die sogleich in das Gefäß überführt wurde. Die Zellzahlen waren: 5.000; 10.000; 15.000; 20.000; 40.000; 60.000; 80.000; 100.000; 300.000. In das

Reaktionsgefäß für die 300.000 Zellen wurden nur 4,5 mL BTM gegeben, da das Volumen der hinzugefügten Zellsuspension ca. 500 µL betrug und man so beim sich nun anschließenden Zentrifugieren (20°C, 1500 rpm, 7 min., volle Beschleunigung, volle Bremse) besser austarieren konnte.

Die RNA der Zellen in den Reaktionsgefäßen für die Zellzahlen 5.000 bis 100.000 wurde nun extrahiert und anschließend gemessen.

*Tabelle 15: RNA-Extraktionskonzentration (ng/µL) von verschiedenen Zellzahlen von RT112 aus 2D-Zellkulturen.*

<b>Zellzahl</b>	<b>RNA in ng/µL</b>
100.000	53,56
80.000	38,36
60.000	28,68
40.000	18,60
20.000	8,64
15.000	6,52
10.000	7,04
5.000	5,20

Die RNA-Konzentrationen wurden in Abb. 5 auf einen Graphen aufgetragen. Der Graph nimmt einen annähernd linearen Verlauf an. Die dem Graphen abgeleitete Funktion der Ausgleichsgeraden kann als Referenz benutzt werden, um eine unbekannte RNA-Extraktionskonzentration von einer Zellzahl an in 2D kultivierten RT112 abzuleiten.

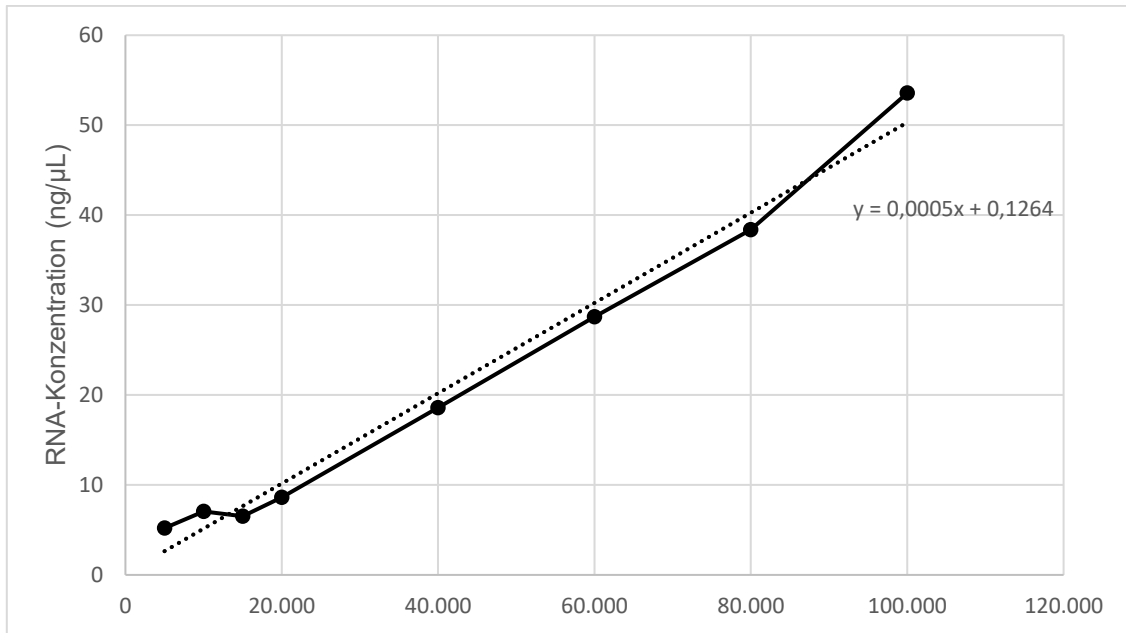


Abbildung 5: Der durchgezogene Graph zeigt die RNA-Extraktionskonzentrationen von RT112 in 2D-Zellkulturen in Funktion zu der extrahierten Zellzahl. Der gepunktete Graph zeigt eine Ausgleichsgerade mit der Funktion  $f(x) = 0,0005x + 0,1264$ . Abszisse: Zellzahl von RT112 in 2D. Ordinate: RNA (ng/µL).

Dem Reaktionsgefäß, welches 300.000 Zellen enthielt, wurde nach der Zentrifugation der Überstand abgesaugt. Entsprechend den letzten Schritten der Methode „Gewebe in eine BME-3D-Zellkultur nehmen“ wurden 150 µL Kulturmedium, hier BTM, (10 µL pro Dom) und 470 µL Matrigel® (30 µl pro Dom + 20 µL Sicherheitsfaktor) hinzugefügt und die Dome ausplattiert. Geplant war das Setzen von 15 Domen mit 20.000 Zellen pro Dom als Ausgang. Gesetzt wurden jedoch 16 Dome mit 18.750 Zellen pro Dom als Ausgangszellzahl. Zusätzlich wurden 6 Dome mit einer Ausgangszellzahl von 20.000 Zellen kultiviert. Die nun entstandenen RT112 3D-Zellkulturen wurden wie in „Gewebe in eine BME-3D-Zellkultur nehmen“ beschrieben, kultiviert. Über die Kultivierungsperiode hinweg nahmen die Zellen in ihren Domen an Zahl und Größe stetig zu. Am fünften Tag nach Inkulturnahme wurden diese vom Matrigel® getrennt. Dabei wurden von den 16 Domen mit 18.750 Ausgangszellen folgende Domanzahlen für die sich anschließende RNA-Extraktion gepoolt: 1; 3; 5; 7. Von den 6 Domen mit 20.000 Ausgangszellen wurden 2 und 4 Dome gepoolt. Die RNA der Zellen der gepoolten Dome wurde nun extrahiert und es schloss sich eine qRT-PCR an.

Tabelle 16: RNA-Extraktionskonzentrationen (ng/ $\mu$ L) in Abhängigkeit von der Zahl der für die Extraktion gepoolten Dome und extrahierten Zellzahlen zum Zeitpunkt der Inkulturnahme ( $t_0$ ). Die verwendete Zellreihe ist RT112 in 3D.

Zahl an gepoolten Domen	RNA (ng/ $\mu$ L)
1	47,08
2	121,84
3	257,44
4	281,28
5	523,56
7	1090,80

Diese RNA-Extraktionskonzentrationen können nun mit den Konzentrationen der RT112 in 2D verglichen werden. Die RNA-Konzentrationen der 2D-Kulturen stellen das Maximum dar, welches man aus der jeweiligen Zellzahl extrahieren kann. Mittels der in Abb. 5 angegebenen Funktion der Ausgleichsgeraden kann man von einer RNA-Extraktionskonzentration die Zellzahl vor der Extraktion in etwa abschätzen.

Tabelle 17: Abschätzung der Zellzahlen vor der RNA-Extraktion ausgehend von der RNA-Extraktionskonzentration (ng/ $\mu$ L) von einer bestimmten Anzahl gepoolter Dome. Die Zellzahlen wurden mittels der angenäherten Funktion  $f(x) = 0,0005x$  für die Ausgleichsgerade der RNA-Konzentrationen von RT112 in 2D in Abb. 5 berechnet.

Zahl an gepoolten Domen	RNA (ng/ $\mu$ L)	Zellzahl vor RNA-Extraktion
1	47,08	94.160
2	121,84	243.680
3	257,44	514.880
4	281,28	562.560
5	523,56	1.047.120
7	1090,80	2.181.600

Aus Tabelle 17 ergibt sich, dass man mindestens zwei Dome oder umgerechnet 160.000 Zellen an RT112 braucht, um den unteren cut-off Wert von 80 ng/ $\mu$ L für eine RNA-Extraktion zu erzielen.

Die anschließend durchgeführten qRT-PCRs dienen einer Überprüfung, ob die RNA-Proben durch zurückgebliebenes BME oder andere Substanzen verunreinigt wurden, was sich auf die RNA-Konzentration auswirken könnte.

Bis auf FGFR3 zeigen sich bei den untersuchten Markern recht vergleichbare Target-to-Reference Ratios (Tbl. 18, Abb. 6).

Tabelle 18: Target-to-Reference-Ratios der qRT-PCR verschiedener Primer ausgehend von cDNAs der gepoolten Dome an RT112 in 3D.

	CD276	CD47_2	FGFR-3	CD44	CD24	PDL-1
1 Dome	0,0195	0,0331	0,1329	0,1096	0,0573	0,0031
2 Dome	0,0223	0,0311	0,0697	0,1528	0,0732	0,0056
3 Dome	0,0221	0,0401	0,1706	0,1077	0,0599	0,0029
4 Dome	0,0158	0,0294	0,0586	0,1200	0,0629	0,0035
5 Dome	0,0242	0,0355	0,1609	0,0904	0,0630	0,0028
7 Dome	0,0194	0,0424	0,1836	0,0957	0,0561	0,0027

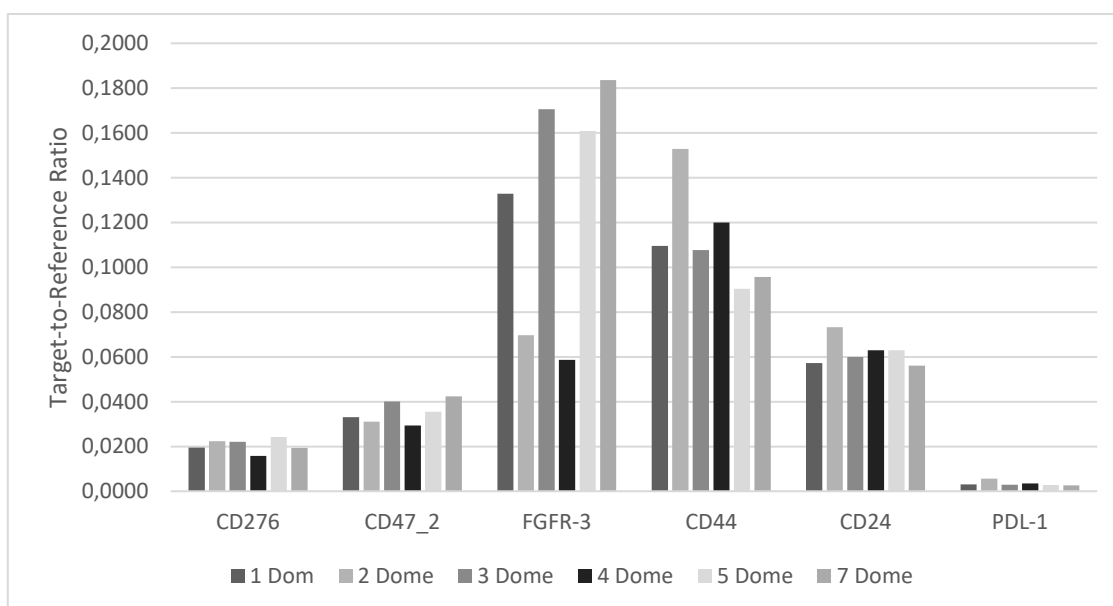


Abbildung 6: Target-to-Reference-Ratios der qRT-PCR verschiedener Primer ausgehend von cDNAs der gepoolten Dome an RT112 in 3D.

Tabelle 19: Mittlere Cp-Werte der Target-Primer der qRT-PCR verschiedener Primer ausgehend von cDNAs der gepoolten Dome an RT112 in 3D.

	CD276	CD47_2	FGFR-3	CD44	CD24	PDL-1
1 Dom	24,6480	21,9377	20,5622	20,9337	21,5868	26,8346
2 Dome	25,1056	22,6792	22,3166	22,0574	22,8318	27,5334
3 Dome	23,6520	20,9104	19,3951	20,0721	20,6409	26,0554
4 Dome	23,7649	20,9698	20,7291	20,6399	21,2925	26,5197
5 Dome	23,8776	21,4620	19,8645	20,7117	20,8958	26,4800
7 Dome	25,0491	21,9014	20,3999	21,4434	21,8972	27,3771

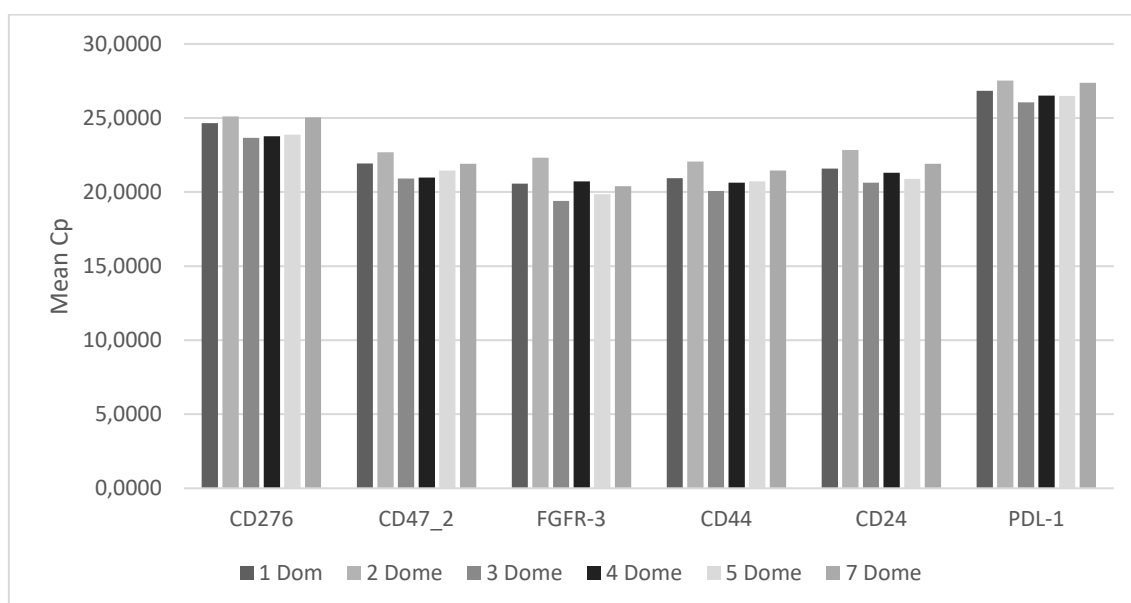


Abbildung 7: Mittlere Cp-Werte der Target-Primer der qRT-PCR verschiedener Primer ausgehend von cDNAs der gepoolten Dome an RT112 in 3D.

In Abb. 7 ist zu sehen, dass sich ähnliche mittlere Cp-Werte bei allen untersuchten Primern ergeben, egal ob die RNA aus einem oder sieben Domen entstand. Das spricht gegen Verunreinigungen mit BME.

Die bisherig beschriebenen Vorversuchsreihen wurden zunächst an RT112 getestet, da etablierte BCO-Zelllinien zu diesem Zeitpunkt im Labor sehr rar waren. Die entwickelten Methoden wurden anschließend an einer BCO-Linie getestet. Zu Beginn wurde Material von 12 Domen an BCO#140 P18 aufgetaut. Sechs Dome davon wurden vor ihrem Einfrieren in BTM und die anderen sechs in HCM kultiviert. Zwölf Dome wurden dann auf 24-Well-Platten in Matrigel® ausgesät und in BTM kultiviert. In der Kultivierungsperiode konnte unter dem Lichtmikroskop beobachtet werden, dass die Zellen sich in Organoidstrukturen

organisierten und an Zahl und Größe zunahmen. An Tag 15 nach Inkulturnahme wurden die BCOs vom Matrigel® getrennt. Dabei wurden ähnlich zu den Versuchsreihen der RT112 3D-Zellkulturen Dome gepoolt. Von den zwölf initial ausgesäten Domen wurde das BME in zehn aufgelöst. Folgendes Poolen ergab sich daraus: 1; 2; 3; 4 Dome. Die RNA in den gepoolten Ansätzen wurde mit denselben Methoden wie bereits zuvor mit den RT112 3D-Zellkulturen extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Auch hier fügte sich anschließend eine qRT-PCR an.

*Tabelle 20: RNA-Extraktionskonzentrationen (ng/μL) in Abhängigkeit von der Zahl der gepoolten Dome an BCO#140, 18. Passage, in BTM, in 3D.*

Anzahl der gepoolten Dome	RNA-Konzentration (ng/μL)
1	55,60
2	176,24
3	234,52
4	340,44

Aus Tabelle 20 ergibt sich, dass für BCO#140 in der 18. Passage bei einer Extraktion von 2 Domen nach 15 Tagen eine suffiziente Extraktionskonzentration erreicht werden kann. Auch hier wurden qRT-PCRs durchgeführt, um ausschließen zu können, dass BME in den RNA-Proben rückständig war und die Extraktionskonzentrationen verfälschte.

*Tabelle 21: Target-to-Reference-Ratios der qRT-PCR verschiedener Primer ausgehend von cDNAs der gepoolten Dome an BCO#140, 18. Passage, in BTM, in 3D.*

	CD276	CD47_2	FGFR-3	CD44	CD24	PDL-1
1 Dom	5,36E-03	4,67E-02	6,68E-04	5,92E-02	0,2948	5,36E-04
2 Dome	8,61E-03	5,67E-02	4,20E-04	7,36E-02	0,3469	6,44E-04
3 Dome	8,52E-03	6,80E-02	7,43E-04	6,53E-02	0,3355	5,66E-04
4 Dome	4,21E-03	5,07E-02	6,52E-04	5,97E-02	0,3479	6,07E-04

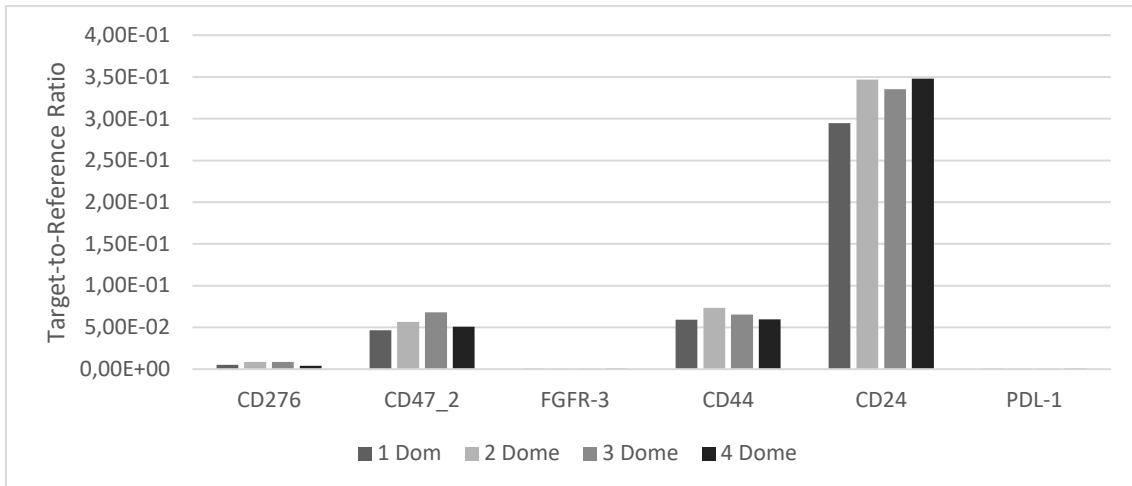


Abbildung 8: Target-to-Reference-Ratios der qRT-PCR verschiedener Primer ausgehend von cDNAs der gepoolten Dome an BCO#140, 18. Passage, in BTM, in 3D.

Tabelle 22: Mittlere Cp-Werte der Target-Primer der qRT-PCR verschiedener Primer ausgehend von cDNAs der gepoolten Dome an BCO#140, 18. Passage, in BTM, in 3D.

	CD276	CD47_2	FGFR-3	CD44	CD24	PDL-1
1 Dom	28,2373	22,6180	30,7605	20,5259	17,4760	28,3473
2 Dome	27,3694	22,2676	31,4999	20,1154	17,1637	27,9937
3 Dome	26,8291	21,4591	30,0020	20,0523	16,9598	27,9456
4 Dome	28,3117	22,1691	30,4682	20,2905	16,9875	27,9193

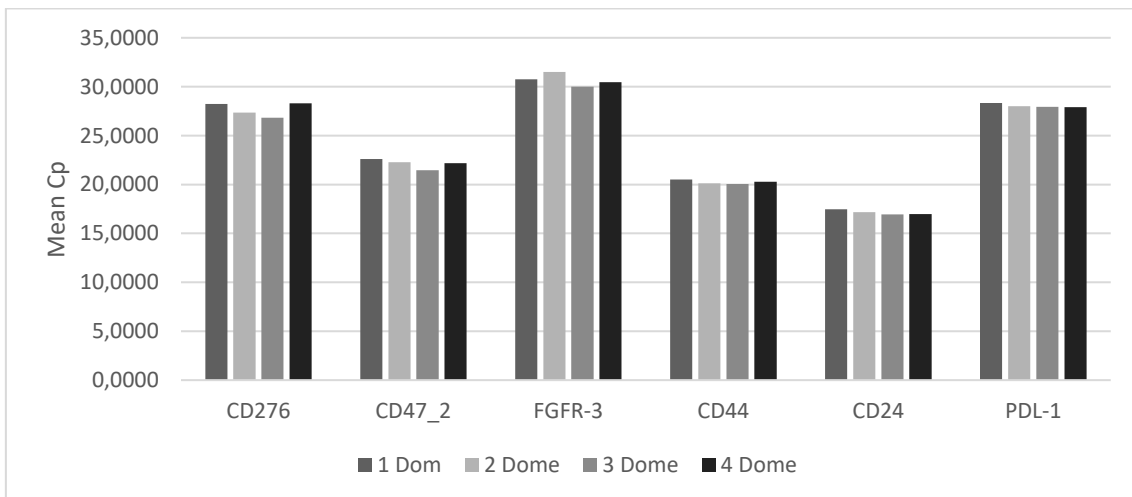


Abbildung 9: Mittlere Cp-Werte der Target-Primer der qRT-PCR verschiedener Primer ausgehend von cDNAs der gepoolten Dome an BCO#140, 18. Passage, in BTM, in 3D.

Abb. 9 zeigt wie Abb. 7 für RT112 in 3D, ähnliche mittlere Cp-Werte bei allen untersuchten Primern, egal wie viele Dome als Ausgangsmaterial dienten.

### 3.1.1.3 Verbesserung bestehender Protokolle

Um in den Hauptversuchen eine möglichst hohe RNA-Extraktionskonzentration bei gleichbleibender Domzahl zu erlangen, wurde in diesem Vorversuch versucht, die Extraktionskonzentration durch Veränderungen an den Protokollen zu erhöhen. Folgende Ansätze wurden dabei miteinander verglichen:

Ansatz 1: In der Methode „Auflösen von BME in 3D-Zellkulturen“ wurde 15 min lang trypsinisiert und ab der Hälfte der Trypsin-Inkubationszeit gevortext. In der RNA-Extraktion wurden 40 µL RNase-freies Wasser benutzt. Dieser Ansatz stellte den bis dato geltenden Standard da.

Ansatz 2: Dieser Ansatz gestaltete sich gleich wie der erste Ansatz. Hier wurde jedoch statt 15 min nur 10 min trypsinisiert und nach der Trypsinierung einmal gevortext. Grund für diesen Ansatz war die Befürchtung, dass durch ein zu langes Trypsinieren, die Zellintegrität geschädigt wird und somit RNA für die RNA-Extraktion verloren geht.

Ansatz 3: Auch hier verlief alles wie in Ansatz 1, nur dass hier 20 µL RNase-freies Wasser benutzt wurden. Die Überlegung war die, die bereits geringe RNA-Ausbeute in weniger RNase-freiem Wasser zu eluieren, um so die RNA-Konzentration zu steigern. Das diente dazu, um über die erforderliche RNA-Extraktionskonzentration zukommen.

Bei allen Ansätzen entfiel das Mischen auf dem Vortexmischer vor dem jeweiligen Trypsinierungsschritt. Durchgeführt wurden die neuen Ansätze mit den Domen einer BCO#270-Kultur (7. Passage, in BTM, abgelöst an Tag 11 nach Aussaat), welche die gleichen Wachstumsbedingungen erfuhren. Es wurde jeweils 1 Dom pro Ansatz verwendet.

Tabelle 23: RNA-Extraktionskonzentrationen (ng/μL) der verschiedenen Ansätze mit BCO#270, 7. Passage, in BTM, in 3D. Ansatz 1: 15 min Trypsinierung und 40 μL RNase-freies Wasser. Ansatz 2: 10 min Trypsinierung und 40 μL RNase-freies Wasser. Ansatz 3: 15 min Trypsinierung und 20 μL RNase-freies Wasser.

Ansatz	RNA-Konzentration (ng/μL)
1	33,80
2	53,32
3	81,24

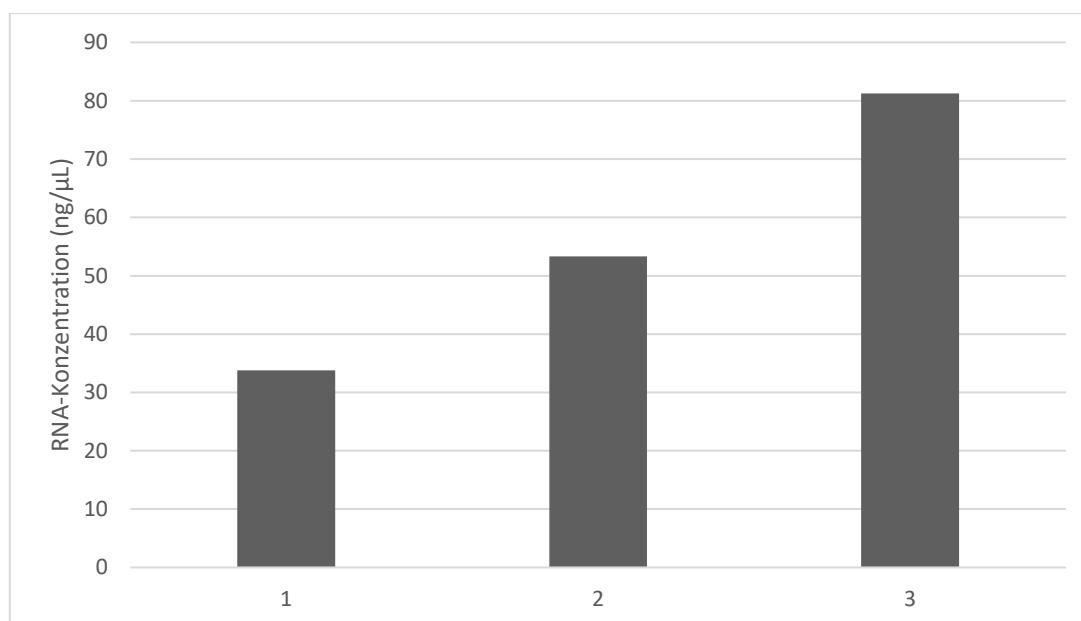


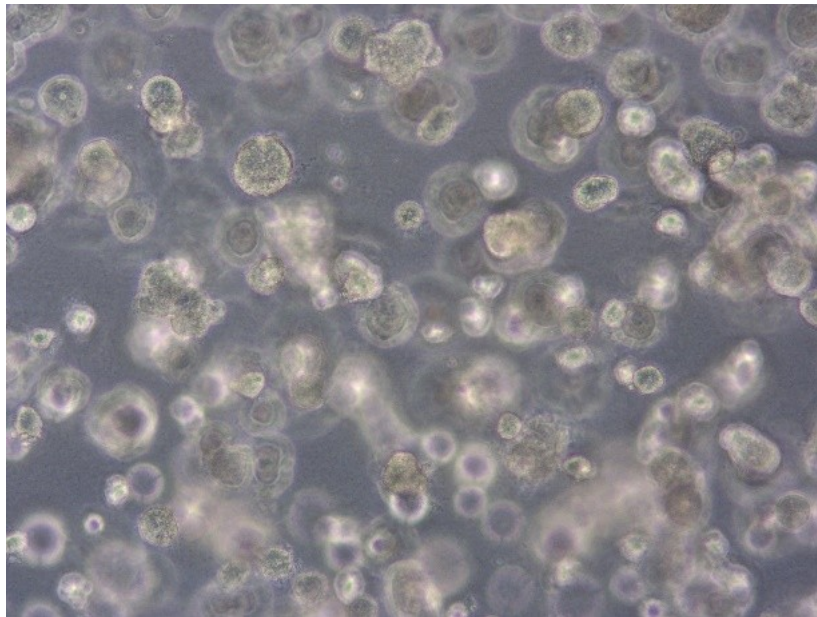
Abbildung 10: RNA-Extraktionskonzentrationen (ng/μL) der verschiedenen Ansätze mit BCO#270, 7. Passage, in BTM, in 3D. Ansatz 1: 15 min Trypsinierung und 40 μL RNase-freies Wasser. Ansatz 2: 10 min Trypsinierung und 40 μL RNase-freies Wasser. Ansatz 3: 15 min Trypsinierung und 20 μL RNase-freies Wasser.

Ansatz 1 entspricht dem bisherig verwendeten Protokoll und erzielte 33,80 ng/μL als Extraktionskonzentration mit einem Dom. Der zweite Ansatz ergab 53,32 ng/μL und somit ca. 58% mehr als Ansatz 1. Ansatz 3 resultierte in 81,24 ng/μL (140% mehr als Ansatz 1) und lag mit schon einem Dom über der unteren RNA-Extraktionsgrenze (Abb. 10).

### 3.1.2 Vergleich verschiedener ECM-Analoga

Hintergrund verschiedene ECM-Analoga zu vergleichen, war es herauszufinden mit welcher Methode man aus welchem Analogon am meisten RNA isolieren konnte. Verglichen wurden GrowDex®, Matrigel® Basement Membrane Matrix

und Cultrex™ RGF BME, Type 2. Zusätzlich wurden an Matrigel® und Cultrex™ zwei verschiedene Ansätze zur RNA-Isolation erprobt, während GrowDex® nur einen Ansatz aufwies. Ausgangspunkt waren UMUC-15, da diese in 3D-Kulturen lichtmikroskopisch ein ähnliches Wachstumsverhalten und Strukturen in der Kultur aufwiesen wie BCOs (Abb. 11).



*Abbildung 11: 3D-Kultur von UMUC-15 in MEM+, Tag 7. Hier zeigt sich ein ähnliches Wachstumsverhalten der UMUC-15-3D-Kultur im Vergleich zu BCOs. Zu sehen sind Sphäroide, bestehend aus runden Zellkonglomeraten mit einer peripheren Basalmembran-ähnlichen Begrenzung.*

Die an den UMUC-15 erprobten Methoden sollten mit diesem Gedanken auf BCOs übertragen werden. So wurden UMUC-15 in einer festgelegten Zelldichte im jeweiligen Hydrogel ausgesät. Nach 7 Tagen möglichst gleicher Wachstumsbedingungen wurde anschließend mit dem Prozess der RNA-Isolation begonnen und die Ansätze wurden letztendlich basierend auf der erzielten RNA-Extraktionsmenge in ng/μL miteinander verglichen.

Initial wurden UMUC-15 in einer 2D-Kulturflasche kultiviert, bis diese zu 90-100% dicht gewachsen waren. Diese wurden dann aus der Flasche abgelöst, gezählt und in den Hydrogelen auf Well-Platten ausplattiert. Es wurden UMUC-15 mit einer Zelldichte von 100 Zellen pro μL Hydrogel-Zell-Suspension ausgesät. Ergo wurden 10.000 Zellen in 100 μL GrowDex®-Hydrogel pro Well und 4.000 Zellen in jeweils einem 40 μL Dom der BMEs ausgesät. Eine gleiche Zelldichte wurde

u.a. unter dem Kriterium gewählt, ein ähnliches Wachstumsumfeld zu erzielen. Das schloss den Faktor der parakrinen Sekretion mit ein.

GrowDex® wurde mit 2 verschiedenen Arbeitskonzentrationen von 0,2 % und 0,5 % in 96-Well-Platten (F-Bottom) getestet. Diese beiden Arbeitskonzentrationen wurden basierend auf den Ergebnissen einer Arbeit aus unserem Labor ausgewählt <sup>115</sup>. Die RNA der BMEs wurde ausgehend von einer Kultivierung in 24-Well-Platten mit jeweils 2 Ansätzen isoliert. Die beiden Ansätze wurden in ähnlicher Form bereits in 3.1.1.3 durchgeführt, wurden hier jedoch wiederholt, um die Auswirkung der einzelnen BMEs auf die verschiedenen Ansätze zu untersuchen.

Im Schritt des Auflöserns des BMEs wurde im 1. Ansatz 10 min mit Trypsin inkubiert ohne dabei zu vortexen. Im 2. Ansatz wurde für 15 min mit Trypsin inkubiert und in der Inkubationszeit nach fünf und 10 min jeweils einmal gevortext. Der Hintergrund für diese beiden Ansätze wurde in 3.1.1.3 Ansatz 2 bereits erläutert.

Folgende Anzahl an Wells respektive Gesamtanzahl an Zellen wurden pro Ansatz an Tag 0 ausgesät:

*Tabelle 24: RNA-Isolationsansätze mit der Anzahl an befüllten Wells und der sich insgesamt pro Ansatz darin befindenden Zellzahl an Tag 0 (t0).*

<b>Ansatz</b>	<b>Befüllte Wells</b>	<b>Zellgesamtzahl bei t<sub>0</sub></b>
GrowDex® (0,2 %)	12	120.000
GrowDex® (0,5 %)	10	100.000
Matrigel® (10 min Trypsin, ohne Vortex)	4	16.000
Matrigel® (15 min Trypsin, mit Vortex)	4	16.000
Cultrex™ (10 min Trypsin, ohne Vortex)	4	16.000
Cultrex™ (15 min Trypsin, mit Vortex)	4	16.000

Die GrowDex®-Wells erhielten am 5. Folgetag eine Medienzugabe von 50 µL MEM+ pro Well. Den BME-Wells wurde am 4. Folgetag 100 µL MEM+ pro Well hinzugegeben. Am 7. Folgetag wurde bei jedem Ansatz mit der entsprechenden Methode für die RNA-Isolation begonnen. Die GrowDex®-Wells wurden nach der Methode „3D-Matrixauflösen mit GrowDase®“ behandelt. Die Inkubationszeit der GrowDase® betrug dabei ca. 19 h. Anschließend wurden die Wells mikroskopiert. Die Zellen hatten sich über die Kultivierungszeit vermehrt und zu Sphäroid-ähnlichen Konglomeraten zusammengeschlossen. Ein unverzerrtes Mikroskopbild konnte aufgrund der kleinen Welloberfläche der 96-Well-Platten und der konkav gekrümmten Kulturmediumoberfläche nur in einem kleinen, zentralen Wellbereich beobachtet werden. Nun wurden alle Zellen eines GrowDex®-Ansatzes samt Medium mit einer Pipette abgenommen und in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt. So ergaben sich jeweils 1 Reaktionsgefäß für die 2 Ansätze mit den verschiedenen GrowDex® Arbeitskonzentrationen. Ein sich anschließender Blick unter das Mikroskop zeigte bei beiden Arbeitskonzentrationen (0,2% und 0,5%), dass der gesamte Zellboden adhärent und fast zu 100% von Zellen bedeckt war (Abb. 12). Da die adhärent gewachsenen Zellen kein Bestandteil des Versuches waren, wurden die Wells in der Folge vorsichtig mit PBS + Y-27632 gewaschen und die Suspension wurde in das gleiche Reaktionsgefäß überführt. Die adhärent gewachsenen Zellen wurden am Wellboden belassen. Die Reaktionsgefäße wurden bei 480 xg, 20°C, 10 min zentrifugiert, woraus sich ein sehr kleines Zellpellet am Gefäßboden absetzte. Es schloss sich der Versuch einer Zellzählung an, welcher zwar vitale,

aber wenige Zellen zeigte. Nun wurde mit den gleichen Einstellungen erneut zentrifugiert und RNA extrahiert.

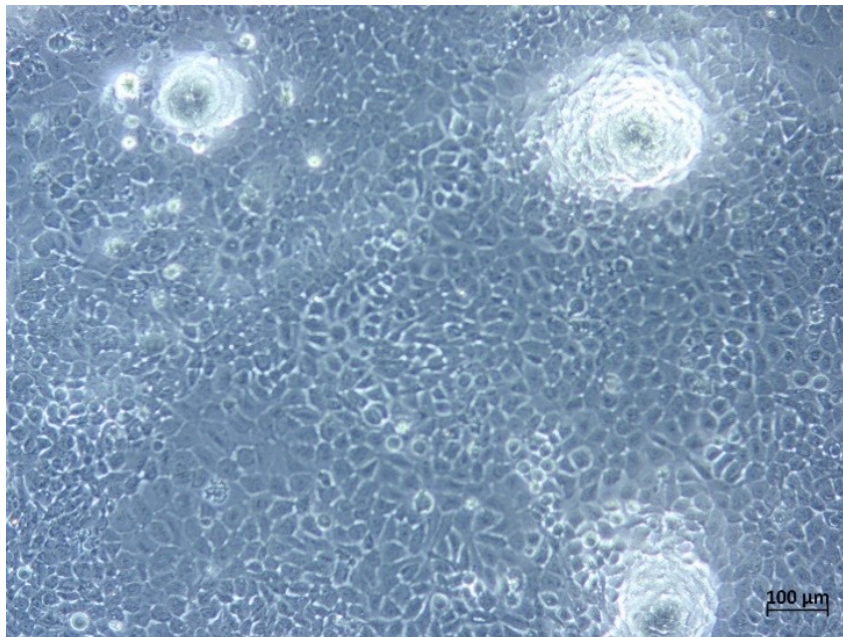


Abbildung 12: Boden einer 96-Well-Platte (F-Bottom) in 100-facher Vergrößerung nach dem Entfernen der im Hydrogel kultivierten Zellen und des mit GrowDase® aufgelösten GrowDex®. Zu sehen sind adhärent und sehr dicht gewachsene UMUC-15, welche sich sowohl als Einzelzellen als auch als Konglomerate präsentierten.

Die BME-Wells wurden nach der Methode „Auflösen von BME in 3D-Zellkulturen“ mit den bereits beschriebenen, Ansatz-typischen Abänderungen am Protokoll bearbeitet. Davor wurden die Wells mikroskopiert, was Zellen zeigte, welche sich in Sphäroiden zusammenschlossen und im Verlauf an Zahl und Größe zunahmen. Die jeweils 4 Dome pro Ansatz wurden entsprechend „Auflösen von BME in 3D-Zellkulturen“ in jeweils ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt. Im Verlauf fiel auf, dass im Reaktionsgefäß für den Ansatz von Cultrex™ (10 min Trypsin, ohne Vortex) nach der ersten Zentrifugation bis hin zum letzten Schritt ein flockiger, visköser Überstand zu sehen war, welcher auch nach Trypsinierung bestehen blieb. Dies konnte nur dieses eine Mal beobachtet werden. Bei anderen Versuchen, die diese Methode bzw. diesem Ansatz folgten, blieb diese Art von Überstand aus. Im letzten Schritt wurde dieser Überstand bis auf das Zellpellet so genau wie möglich abgesaugt. Auch hier schloss sich nun eine RNA-Extraktion an.

Folgende RNA-Extraktionskonzentrationen wurden mit den Ansätzen erzielt:

Tabelle 25: RNA-Extraktionsmengen in ng/μL, die mit den jeweiligen Anzahlen an extrahierten Domen im entsprechenden Ansatz erzielt wurden.

Ansatz	Anzahl extrahierter Dome	RNA-Konzentration in ng/μl
GrowDex® (0,2 %)	12	5,64
GrowDex® (0,5 %)	10	2,64
Matrigel® (10 min Trypsin, ohne Vortex)	4	740,56
Matrigel® (15 min Trypsin, mit Vortex)	4	698,40
Cultrex™ (10 min Trypsin, ohne Vortex)	4	261,12
Cultrex™ (15 min Trypsin, mit Vortex)	4	518,04

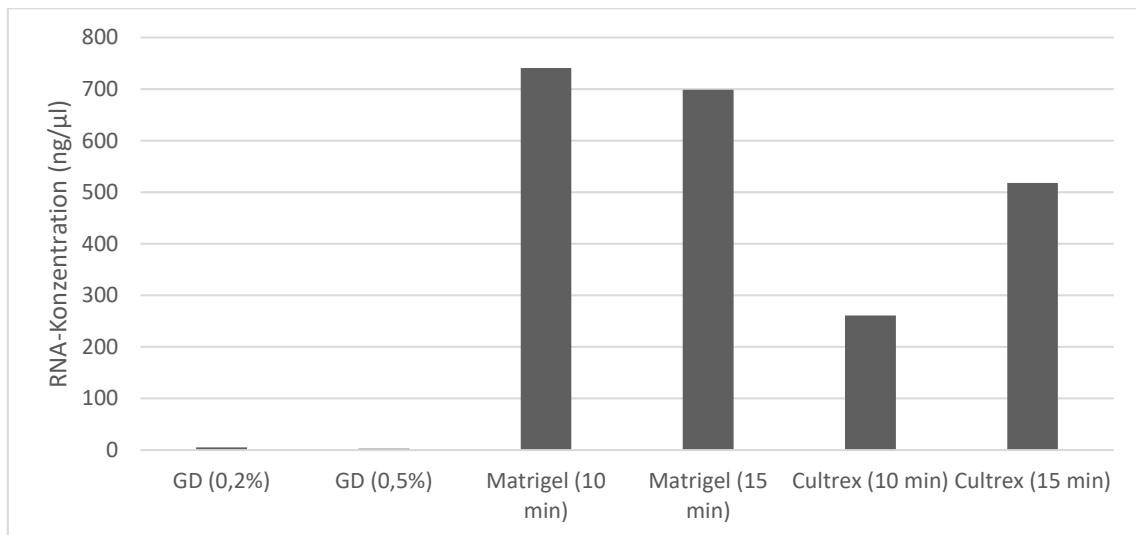


Abbildung 13: RNA-Konzentrationen in ng/μL der verschiedenen Ansätze. GD = GrowDex®; 10 min = 10 min Trypsinierung, ohne Vortex; 15 min = 15 min Trypsinierung mit Vortex.

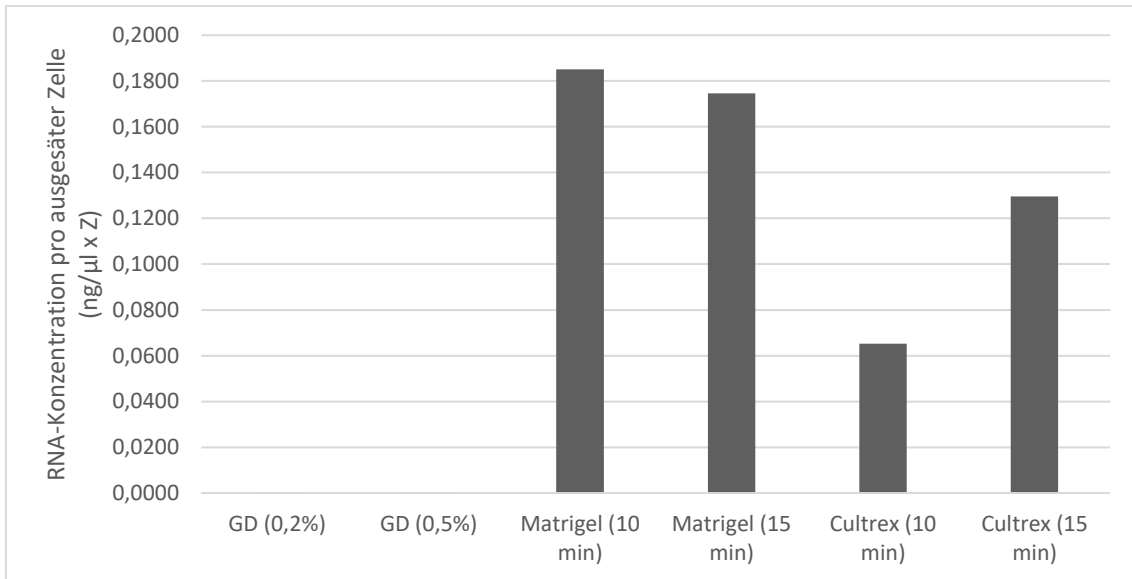


Abbildung 14: RNA-Konzentrationen in den verschiedenen Ansätzen in ng/μL pro Zelle (Z), die an  $t_0$  ausgesät wurde. GD = GrowDex®; 10 min = 10 min Trypsinierung, ohne Vortex; 15 min = 15 min Trypsinierung mit Vortex.

Auf die Zellzahl an  $t_0$  heruntergerechnet, finden sich große Unterschiede in den jeweiligen RNA-Ausbeuten. Während die Ansätze im GrowDex® nahezu keine RNA-Ausbeute aufwiesen, konnte man mit den BME-Ansätzen RNA messen (Abb. 14). Vergleicht man beiden Ansätze und Hydrogele so ergeben sich folgende Differenzen:

Tabelle 26: Vergleich der RNA-Extraktionskonzentrationen pro an  $t_0$  ausgesäter Zelle (ng/μL x Z). Angegeben werden die Differenzen zwischen den verschiedenen Ansätzen innerhalb eines Hydrogels und die beiden Hydrogele innerhalb desselben Ansatzes. 10 min = 10 min Trypsinierung ohne Vortex. 15 min = 15 min Trypsinierung mit Vortex.

Hydrogele	RNA-Konzentration (ng/μL x Z)		Differenz (Ansätze)
	10 min	15 min	
Matrigel®	0,1851	0,1746	<b>0,0105</b>
Cultrex™	0,0653	0,1295	<b>0,0642</b>
	<b>0,1198</b>	<b>0,0451</b>	
	<b>Differenz (Hydrogele)</b>		

Während Matrigel® im Ansatz „10 min“ eine ca. 183,5% höhere RNA-Konzentration erzielte als Cultrex™, so erzielte Matrigel® eine prozentuale Differenz von 34,8% im Ansatz „15 min“ ggü. Cultrex™. Im Vergleich der Ansätze innerhalb des jeweiligen Hydrogels ergab der Ansatz „10 min“ eine 6% höhere

Konzentration mit Matrigel® als der Ansatz „15 min“. Mit Cultrex™ wies der Ansatz „15 min“ eine 98,3% höhere Konzentration auf als der Ansatz „10 min“ (Tbl. 26).

### **3.2 Hauptversuche zum zeitlichen Transkriptionsvergleich in BCOs**

In den Hauptversuchen wurde das Transkriptom hinsichtlich ausgewählter Primer von vier etablierten BCO-Linien mit den in 3.1 optimierten Methoden untersucht. Dabei werden drei Zeitperioden ( $t_{1-3}$ ) in jeder Linie auf das Transkriptom hin untersucht. Die Zeitperioden werden dabei innerhalb der jeweiligen BCO-Linie untereinander und zwischen den Linien verglichen. Folgende Definitionen haben sich für die Zeitperioden  $t_{1-3}$  ergeben:

$t_1$ : Passage 1-4

$t_2$ : Passage 5-9

$t_3$ : Passage  $\geq 10$

Tabelle 27 zeigt die in den Experimenten verwendeten BCO-Linien und führt zudem pathologische Merkmale der jeweiligen Primärtumoren auf, aus welchen die BCOs entstanden sind. Zu beachten ist, dass BCO#140 und #154 von demselben Patienten, aber aus unterschiedlichen Zeitpunkten im Krankheitsverlauf entspringen.

Tabelle 27: Pathologische und patientenassoziierte Charakteristika von den Primärtumoren der verwendeten BCO-Linien. m = männlich. w = weiblich. Die Zeile „Alter“ bezieht sich auf das Alter des Patienten bzw. der Patientin am Entnahmetag des Primärtumors, aus welchem die BCO-Linie entstand. pT, pN, cM = pathologisch bzw. klinisch erhobene TNM-Stadien. pL = pathologisch bestätigte Lymphangiainvasion. pV = pathologisch bestätigte Gefäßinvasion. Pn = Perineuralscheideninvasion. „?“ = fehlender Wert. x = Charakteristikum nicht beurteilbar.

<b>BCO#</b>	<b>140</b>	<b>154</b>	<b>267</b>	<b>270</b>
Max. Passagen (Stand 11/2022)	29	23	14	25
Probengewicht (in mg)	?	?	300	300
Geschlecht	m	m	m	w
Alter (in a)	62	62	73	86
OP-Technik	TUR-B	Zystektomie	TUR-B	TUR-B
Raucherstatus	ja	ja	ja	ja
Primärtumor	ja	ja	ja	ja
Vortherapien	keine	TUR-B	keine	keine
pT	1, Tis	3b	1	2a
pN	x	0	?	x
cM	x	0	?	1
pL	1	1	?	1
pV	1	1	?	0
Pn	?	1	?	0
PD-L1-Status	?	Wenige positiv	?	?
CPS-Score	?	<1	?	?
Muskelinvasivität	nein	ja	nein	ja
Grading	High-grade	High-grade	High-grade	High-grade

Aus Tabelle 27 ergibt sich, dass alle verwendeten BCOs aus BC-Primärtumoren von Personen mit Raucherstatus entsprangen. Bis auf BCO#154 (TUR-B) erfolgte vor der Entnahme des Tumors zur Kultivierung keine Vortherapie, vor allem keine Vortherapie radiologischer oder chemotherapeutischer Art. Bei 3/4 BCO-Linien bestand ein L1-Status (positive Lymphangiainvasion), bei BCO#267

war dieser Status nicht erhoben worden. Alle BCO-Linien stammten von high-grade Tumoren ab.

Initial wurden mehrere BCO-Proben aus der Zwischenlagerung im Stickstofftank ausgewählt, welche den Zeitperioden  $t_{1-3}$  entsprachen. Dabei wurden teils auch Proben rekultiviert, die ursprünglich aus mehreren Passagen stammten. Die letztendlich ausgewählten Proben wurden allesamt aus dem Stickstofftank aufgetaut und in eine BME-3D-Zellkultur genommen. Das verwendete BME war in den Hauptversuchen das Cultrex™ RGF, BME Type 2. Die Proben wurden sowohl vor als auch nach der Lagerung im Stickstofftank in BTM als Kulturmedium kultiviert. Ein paar Proben davon wurden jedoch vor dem Einfrieren im Stickstofftank in Mediumgemischen aus 50% BTM und 50% HCM kultiviert, eine davon nur in HCM (Tbl. 28). Um einen Einfluss auf das Transkriptom durch die verschiedenen Kulturmedien in den Schritten vor einer Lagerung im Stickstofftank so gering wie möglich zu halten, wurden alle Proben nach dem Auftauen aus dem Stickstofftank in BTM kultiviert. Das Kultivieren geschah anschließend über mehrere Wochen und Passagen hinweg, so dass man versuchte, eventuelle Mediums-bedingte Unterschiede im Transkriptom zu minimieren.

*Tabelle 28: Übersicht über Zeitperioden von BCO-Linien, die vor ihrer Lagerung im Stickstofftank in einem anderen Kulturmedium kultiviert wurden als in den Kultivierungsschritten der Hauptversuche. CM = Kulturmedium.*

BCO-Linie und -Zeitperiode	CM vor der Stickstofftanklagerung
#154, $t_3$	BTM/HCM
#267, $t_2$	HCM
#267, $t_3$	BTM/HCM
#270, $t_1$	BTM/HCM
#270, $t_2$	BTM/HCM

Unter täglichem Lichtmikroskopieren wurde das Wachstum der BCOs beobachtet. Repräsentative lichtmikroskopische Bilder der jeweiligen BCO-Linien in den verschiedenen Definitionszeitperioden sind nachfolgend aufgeführt und zeigen den Stand kurz vor dem Ablösen der Zellen vom BME.

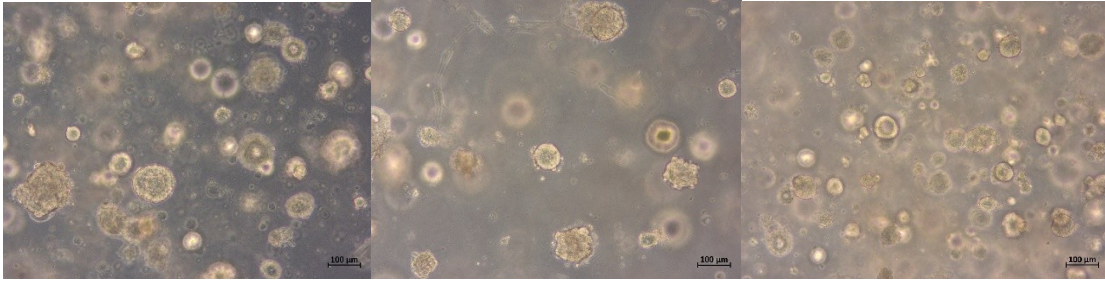


Abbildung 15: Repräsentativer Ausschnitt der folgenden BCO-Kulturen in 100-facher Vergrößerung. Von links nach rechts: BCO#140, P3, in BTM, Tag 13. BCO#140, P7, in BTM, Tag 13. BCO#140, P11, in BTM, Tag 13.

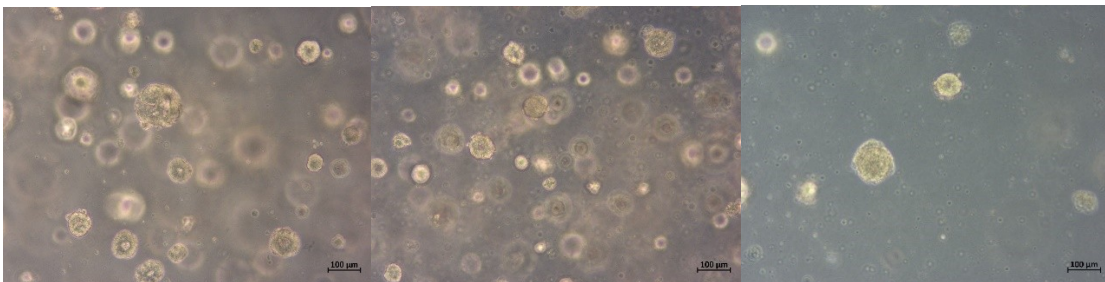


Abbildung 16: Repräsentativer Ausschnitt der folgenden BCO-Kulturen in 100-facher Vergrößerung. Von links nach rechts: BCO#154, P2, in BTM, Tag 15. BCO#154, P7, in BTM, Tag 13. BCO#154, P22+24, in BTM, Tag 9.

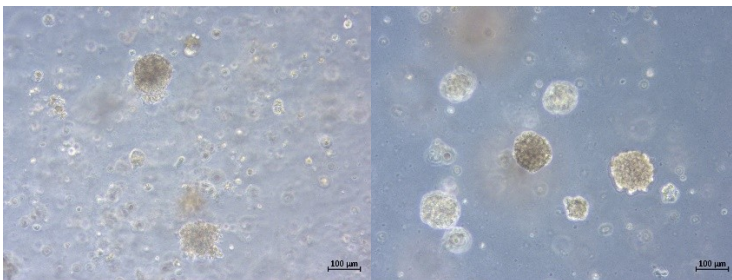


Abbildung 17: Repräsentativer Ausschnitt der folgenden BCO-Kulturen in 100-facher Vergrößerung. Von links nach rechts: BCO#267, P8, in BTM, Tag 13. BCO#267, P12+15, in BTM, Tag 13.

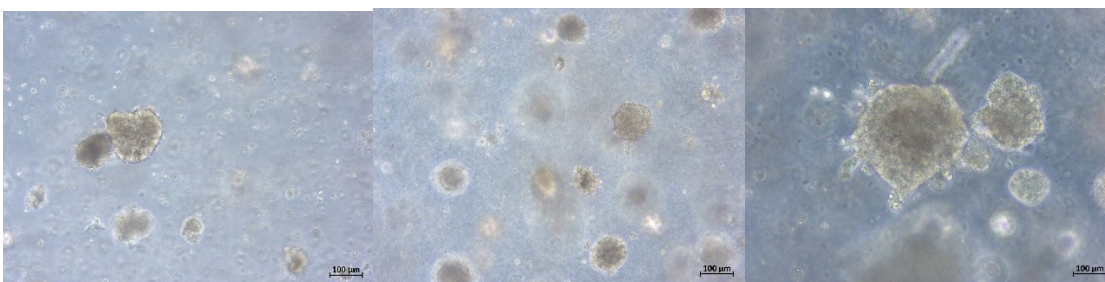


Abbildung 18: Repräsentativer Ausschnitt der folgenden BCO-Kulturen in 100-facher Vergrößerung. Von links nach rechts: BCO#270, P4, in BTM, Tag 12. BCO#270, P5-7, in BTM, Tag 12. BCO#270, P10, in BTM, Tag 13.

War überwiegend eine suffiziente Organoidgröße von mindestens 80 µm und Mindestorganoiddichte wie in Abb. 15-18 erreicht, wurden die Zellen aus dem

BME isoliert. Ungefähr die Hälfte der nun aufgelösten Dome wurde entsprechend „Probengewinnung und -transport zum Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik Tübingen“ weiter bearbeitet und bis zum Transport auf  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Aus der anderen Hälfte wurde nun RNA extrahiert (hier nur  $20\ \mu\text{L}$  RNase-freies Wasser). Die RNA wurde anschließend in cDNA umgeschrieben, um dann als Substrat für qRT-PCRs zu fungieren.

### **3.2.1 Differential gene expression der bulkRNA**

Die folgenden Analysen der differential gene expression wurden an den BCO-Linien #140, #154 und #270 durchgeführt. Linie #267 wurde aufgrund von Schwierigkeiten bei der Kultivierung der für eine Statistik erforderlichen Zeitperiode nicht in diese Analysen miteinbezogen.

Abb. 19 zeigt eine sample distance heatmap der Zeitperioden  $t_{1-3}$  der BCO-Linien #140, #154, #270 hinsichtlich der Ähnlichkeit des jeweiligen mRNA-Gesamttranskriptoms. Die Färbung des „Vergleichsfeldes“ zeigt die Ähnlichkeit der verglichenen Zeitperioden an. Die Grafik zeigt, dass sich die Transkriptionsprofile innerhalb der jeweiligen BCO-Linie nicht wesentlich über den Kultivierungsverlauf ändern. Auch weisen die Linien #140 und #154 untereinander eine starke Ähnlichkeit im Gesamttranskriptom auf <sup>116</sup>.

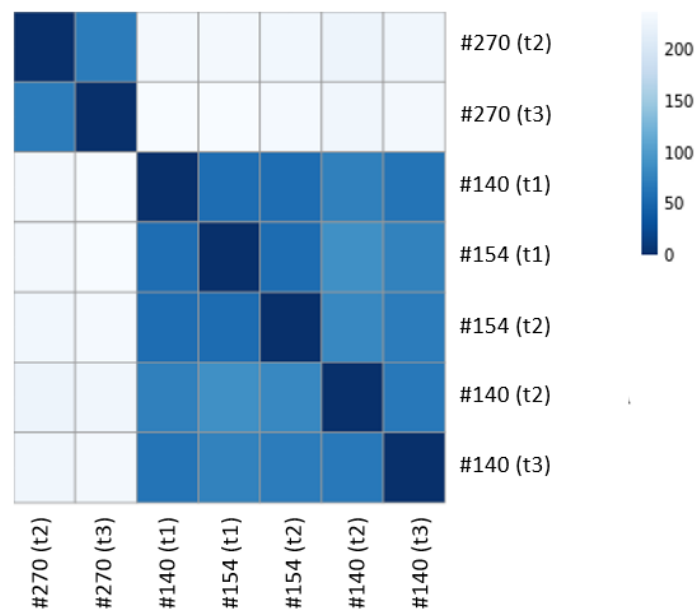
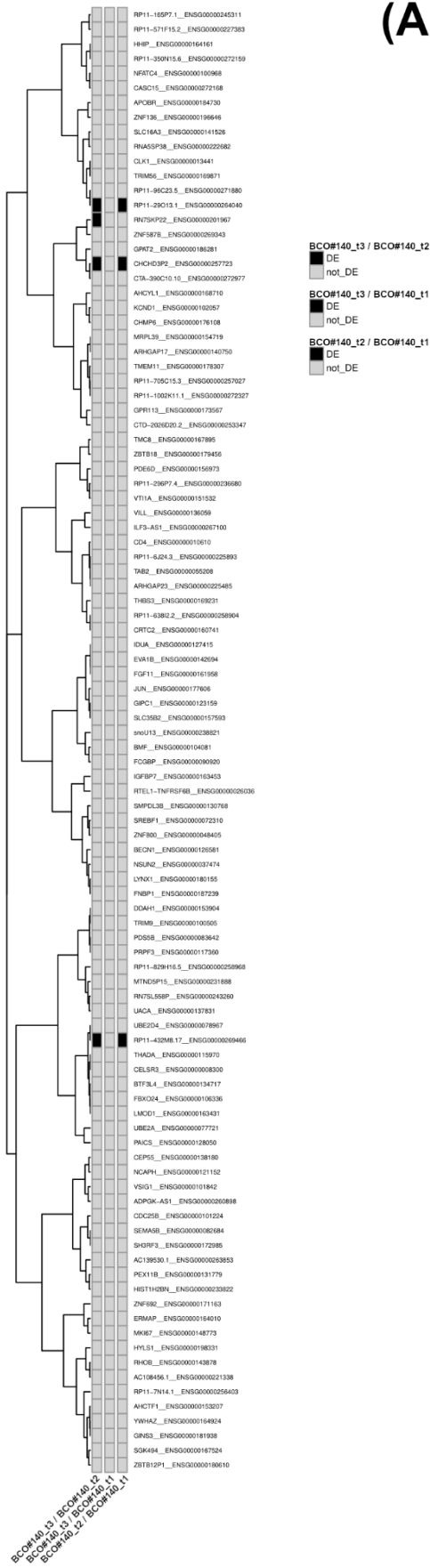


Abbildung 19: Sample distance heatmap der differential gene expression. Präsentiert sind die Expressionsprofile des Gesamttranskriptom der Zeitperioden  $t_{1-3}$  der BCO-Linien #140, #154, #270. Die Färbung jedes Vergleichsfeldes gibt die Ähnlichkeit der Expressionsprofile der verglichenen Zeitperioden an.  $t_1$ : frühe Passagen (P1-4),  $t_2$ : späte Passagen (P5-9),  $t_3$ : Langzeitpassagen (P>9). Eine dunkelblaue Färbung zeigt keine Unterschiede bzw. absolute Gleichheit der Transkriptome, eine hellblaue Färbung zeigt starke Unterschiede zwischen den Transkriptomen (siehe Skala rechts). (Entnommen aus Vollmer et al. (2024): Patient-derived bladder cancer organoids show stable transcript expression along cultivation [18.08.2024]).

Die weiteren sample distance heatmaps zeigen einen detaillierteren Einblick in das Transkriptom jeder untersuchten Linie (Abb. 20a-c). In diesen Heatmaps präsentiert jede Säule einen Expressionsvergleich eines von 100 beispielhaften Genen zwischen zwei Zeitperioden in einer einzelnen BCO-Linie. BCO-Linie #154 zeigt in 3 der 100 Gene eine unterschiedliche Expression im Kultivierungsverlauf (RP11-29O13.1, RP11-432M8.17, CHCHD3P2; Abb. 20b). Die Linien #140 und #270 zeigten hingegen in 4 der 100 Gene eine unterschiedliche Expression (RP11-29O13.1, RP11-432M8.17, CHCHD3P2, RN7SKP22; Abb. 20a, c). Interessant zu beobachten ist hier, dass dieselben Transkripte in allen untersuchten Linien eine unterschiedliche Expression im Kultivierungsverlauf aufweisen. Mit Ausnahme von RN7SKP22 weisen die anderen drei sich verändernden Transkripte bei allen untersuchten BCO-Linien über die Zeitperioden hinweg kein stabiles Transkriptexpressionsprofil auf. Das Transkript RN7SKP22 weist lediglich in #140 und #270 (Abb. 20a, c) eine zeitliche Änderung im Expressionsprofil auf, welche in #154 (Abb. 20b) nicht zu beobachten ist <sup>116</sup>.

(A)



(B)

RP11-29013.1\_ENSG0000204040  
TMC8\_ENSG00000167895  
GPC1\_ENSG00000123159  
ARHGAP17\_ENSG00000140750  
ZNF62\_ENSG00000171163  
RP11-16577.1\_ENSG00000204311  
GRNS3\_ENSG00000181538  
RP11-7N14.1\_ENSG00000205403  
RTEL1-TNFRSF8B\_ENSG00000206036  
RNA5SP8\_ENSG00000222682  
ZNF587B\_ENSG00000205543  
HNF1B\_ENSG00000229821  
ILF3-AS1\_ENSG00000207100  
RP11-432M8.17\_ENSG000002089466  
CASC15\_ENSG00000272168  
RP11-9623.5\_ENSG000002071880  
MTNDSP15\_ENSG00000231888  
RN7SKP22\_ENSG00000201967  
IDUA\_ENSG00000127415  
APCBR1\_ENSG00000184730  
RN7SL58P\_ENSG000002043260  
UBE2D4\_ENSG00000278967  
CHMP6\_ENSG00000176108  
NSUN2\_ENSG0000037474  
CTA-390210.16\_ENSG00000272977  
RP11-6J24.3\_ENSG00000225893  
LYNX1\_ENSG00000180155  
SH3BP3\_ENSG00000172985  
RP11-100K11.1\_ENSG00000272327  
SCK494\_ENSG00000187524  
CLK1\_ENSG0000013441  
RP11-705C15.3\_ENSG00000205707  
CRT2\_ENSG00000162741  
THSS3\_ENSG00000168291  
BECN1\_ENSG00000126581  
CHCHD9P2\_ENSG00000205723  
NFATC4\_ENSG00000190968  
LMCC1\_ENSG00000163431  
KCNK1\_ENSG00000162567  
FGF11\_ENSG00000161958  
RP11-29677.4\_ENSG000002036680  
BMF\_ENSG00000104081  
GPA72\_ENSG00000186281  
VSG1\_ENSG00000101842  
CELSR3\_ENSG00000200830  
JUN\_ENSG00000177606  
ZBTB12P1\_ENSG00000180610  
CTD-2028D02.7\_ENSG00000203347  
SLC16A3\_ENSG00000141526  
SMPDL3B\_ENSG00000130768  
TRMS6\_ENSG00000169871  
MRPL39\_ENSG00000154719  
AHCTF1\_ENSG00000153207  
DDA1\_ENSG00000153904  
SLC35B2\_ENSG00000157593  
SREBF1\_ENSG00000272310  
FNBP1\_ENSG00000187239  
POSSB\_ENSG00000208362  
ZNF136\_ENSG00000196946  
AHCYL1\_ENSG00000168710  
RP11-6382.2\_ENSG000002058904  
HST1H9N\_ENSG00000235822  
CDC28B\_ENSG00000101224  
AC108456.1\_ENSG000002021338  
GPH113\_ENSG00000173567  
VIL1\_ENSG00000136059  
ADPKC-AS1\_ENSG00000200886  
FBXO24\_ENSG00000106336  
ZBTB18\_ENSG00000178456  
RP11-571F15.2\_ENSG00000227283  
TMEM11\_ENSG00000178307  
RP11-829H16.5\_ENSG00000208968  
PRPF3\_ENSG00000173360  
MKI67\_ENSG00000148773  
FCGBP\_ENSG000002009920  
VTG1A\_ENSG00000151532  
ZNF800\_ENSG000002048405  
TAB2\_ENSG00000155208  
KGFBP7\_ENSG00000163453  
PDE6D\_ENSG00000156873  
THADA\_ENSG00000115970  
HYS11\_ENSG00000198331  
SEMA5B\_ENSG0000020081684  
CEP350\_ENSG00000138180  
ARHGAP23\_ENSG00000205485  
AC128530.1\_ENSG000002028833  
CD4\_ENSG00000106101  
PAC3\_ENSG00000128050  
RHO8\_ENSG00000143878  
NCAPH1\_ENSG000001011152  
BTF3L4\_ENSG00000134717  
RP11-355N15.6\_ENSG000002072159  
HHP\_ENSG00000104161  
UBE2A\_ENSG00000207721  
TRIM8\_ENSG00000105505  
UACA\_ENSG00000137931  
YWHA2\_ENSG00000164924  
EVA1B\_ENSG00000142694  
PEX11B\_ENSG00000131779  
ERMAP\_ENSG00000164010

BCO#154\_t2 / BCO#154\_t1  
DE  
not\_DE

BCO#154\_t2 / BCO#154\_t1

(C)

[REDACTED]

RNFKP22\_ENSG00000201967  
GRN3\_ENSG00000181936  
ZBTB12P1\_ENSG00000183610  
UBE2D4\_ENSG00000078967  
DDAH1\_ENSG00000153904  
CELSR1\_ENSG00000006300  
ARHGAP23\_ENSG00000225485  
THBS3\_ENSG00000168231  
KCNB1\_ENSG00000102057  
VTG1A\_ENSG00000151532  
VSG1\_ENSG00000101842  
AC10846.1\_ENSG00000221338  
CTD-202B20.2\_ENSG00000253347  
ZBTB18\_ENSG00000179456  
RP11-63812.2\_ENSG00000258904  
ZNF692\_ENSG00000171163  
APOB1\_ENSG00000184730  
RP11-96C23.5\_ENSG00000271880  
PEX1B\_ENSG00000131779  
RTEL1-TNFRSF68\_ENSG00000200336  
TRIM9\_ENSG00000100556  
RP11-29MP7.4\_ENSG00000236680  
FNASSP38\_ENSG00000222682  
LYNX1\_ENSG00000180155  
AHCTF1\_ENSG00000153207  
ADPK4-AS1\_ENSG00000309898  
HST1H2BN\_ENSG00000233822  
RP11-423M.17\_ENSG00000209468  
CDA\_ENSG0000010610  
FOXP2\_ENSG00000099020  
SREBF3\_ENSG00000172985  
SOKH4\_ENSG00000167324  
TRIM5L\_ENSG00000169871  
CRTG2\_ENSG00000160741  
GPR72\_ENSG00000186281  
THADA\_ENSG00000115970  
enolU13\_ENSG00000228821  
VLL\_ENSG00000136059  
AHCTV11\_ENSG00000168710  
RP11-29Q13.1\_ENSG00000284040  
AC139530.1\_ENSG00000263853  
CASC15\_ENSG00000272168  
NSL22\_ENSG00000037474  
SMPDL3B\_ENSG00000130768  
PPPF3\_ENSG00000117380  
ARHGAP17\_ENSG00000140750  
UBE2A\_ENSG00000077721  
FGF11\_ENSG00000161958  
JUN\_ENSG00000177606  
ERMAP\_ENSG00000164010  
SEMA5B\_ENSG00000082894  
HYS11\_ENSG00000198331  
SLC16A3\_ENSG00000141526  
RP11-4244.3\_ENSG00000225890  
MKI67\_ENSG00000148773  
SREBF1\_ENSG00000072310  
CTA-390C10.10\_ENSG00000227277  
EVA1B\_ENSG00000142654  
LMOD1\_ENSG00000163421  
GPC1\_ENSG00000123156  
TM6M11\_ENSG00000178207  
MTNDGP15\_ENSG00000221888  
BECN1\_ENSG00000126381  
FNBP1\_ENSG00000187239  
MPP139\_ENSG00000154719  
RP11-571F15.2\_ENSG00000227383  
TAB2\_ENSG00000055208  
RP11-705C15.3\_ENSG00000267027  
IGFBP7\_ENSG00000163453  
TMC8\_ENSG00000167895  
GPR113\_ENSG00000175567  
RP11-350N15.6\_ENSG00000272159  
RNFL568P\_ENSG00000243250  
ZNF136\_ENSG00000186546  
RP11-1002K11.1\_ENSG00000272327  
FBXO24\_ENSG00000106336  
CLK1\_ENSG0000013441  
RP11-165P7.1\_ENSG00000246311  
CHCHD3P2\_ENSG00000257723  
CHMPE\_ENSG00000176108  
SLC35B2\_ENSG00000157993  
PAICS\_ENSG00000128050  
RP11-429H16.5\_ENSG00000268968  
BTF3L4\_ENSG00000134717  
EFS-AS1\_ENSG00000207100  
ZNF478\_ENSG00000306343  
HHP\_ENSG00000164161  
UACA\_ENSG00000137831  
ZNF800\_ENSG00000048405  
YWHAZ\_ENSG00000164504  
POK1O\_ENSG00000156973  
NFR1CA\_ENSG00000100668  
CEP350\_ENSG00000138190  
RHKOB\_ENSG00000143878  
BMF\_ENSG00000140481  
CDC25B\_ENSG00000101224  
RP11-7N14.1\_ENSG00000255403  
PDS5B\_ENSG00000083642  
IDUA\_ENSG00000127415  
NCAPH1\_ENSG00000121152

BCO#270\_13 / BCO#270\_12  
■ DE  
■ not\_DE

BCO#270\_13 / BCO#270\_12

Abbildung 20: Sample distance heatmaps der differential gene expression. Zu sehen ist eine repräsentative Auswahl aus 100 Genen (inkl. accession number), welche in den verschiedenen Zeitperioden der BCO-Linien #140 (a), #154 (b) und #270 (c) exprimiert sind. Jedes Vergleichsfeld eines Gens zeigt die Expressionsähnlichkeit zwischen zwei Zeitperioden innerhalb einer BCO-Linie (siehe unterer Grafikbereich). Ein weißes Feld zeigt keine Unterschiede in der Expression, wohingegen ein schwarzes Feld einen Unterschied in der Expression anzeigt. DE = differentially expressed. (Entnommen aus Vollmer et al. (2024): Patient-derived bladder cancer organoids show stable transcript expression along cultivation [18.08.2024]).

Insgesamt lässt sich aus der Analyse der differential gene expression aus der bulkRNA der BCO-Linien die Erkenntnis gewinnen, dass alle untersuchten Linien ein über die untersuchten Zeitperioden hinweg stabiles Gesamttranskriptom aufweisen. Im Falle von #140 und #154 (Abb. 20a, b) lässt sich zudem eine Ähnlichkeit des Gesamttranskriptoms zwischen diesen beiden Linien feststellen

116

### **3.2.2 Quantitative Expression ausgewählter Transkripte**

Ausgehend von den ersten Erkenntnissen aus den Analysen der bulkRNA kam die Überlegung auf, das Expressionsverhalten von bestimmten Tumor- und BC-spezifischen Markern, welche teils eine Bedeutung für Diagnostik und Therapie bedeuten, quantitativ über die Zeit hinweg zu bestimmen, was mittels qRT-PCRs untersucht wurde.

Folgend sind die Ergebnisse der RNA-Extraktionen und qRT-PCRs aus den BCO-Linien aufgeführt, deren Kultivierung zuvor beschrieben wurde (Tbl. 29-30). Es sei zu erwähnen, dass für die qRT-PCRs auch Proben verwendet wurden, deren RNA-Extraktionskonzentration unter dem unteren cut-off Wert von 80 ng/ $\mu$ L lagen. Um eine Vergleichbarkeit zu bewahren, wurden die Target-to-Reference-Ratios im Vergleich mit den Housekeeping Genen GAPDH und beta-Actin analysiert.

Tabelle 29: RNA-Extraktionskonzentrationen (ng/μL) etablierter BCO-Linien in den Zeitperioden t<sub>1-3</sub> und deren Synonyme für weitere Ergebnisteile. P = Passage. D = Anzahl der extrahierten Dome.

<b>BCO-Linie, Passage (P), Domanzahl (D)</b>	<b>Synonym</b>	<b>RNA-Konzentration (ng/μL)</b>
#140, P3, 3D	#140, t <sub>1</sub>	206,36
#140, P7, 3D	#140, t <sub>2</sub>	120,64
#140, P11, 3D	#154, t <sub>3</sub>	251,28
#154, P2, 4D	#154, t <sub>1</sub>	252,36
#154, P7, 3D	#154, t <sub>2</sub>	122,88
#154, P22+24, 3D	#154, t <sub>3</sub>	17,50
#267, P8, 3D	#267, t <sub>2</sub>	7,40
#267, P12+15, 4D	#267, t <sub>3</sub>	48,76
#270, P4, 2D	#270, t <sub>1</sub>	21,68
#270, P5-7, 4D	#270, t <sub>2</sub>	84,64
#270, P10, 5D	#270, t <sub>3</sub>	111,08

Tabelle 30: Target-to-Reference-Ratios der qRT-PCRs verschiedener Primer ausgehend von cDNAs etablierter BCO-Linien in den Zeitperioden t<sub>1-3</sub> (Teil 1). (Entnommen aus Vollmer et al. (2024): Patient-derived bladder cancer organoids show stable transcript expression along cultivation [18.08.2024]).

	HER2	CD24	PD-L1	CD44	CD47
#140, t <sub>1</sub>	0,0315	0,7137	0,0004	0,1393	0,0291
#140, t <sub>2</sub>	0,0200	0,7591	0,0010	0,1157	0,0252
#140, t <sub>3</sub>	0,0209	0,5331	0,0006	0,1353	0,0249
#154, t <sub>1</sub>	0,0158	0,3862	0,0003	0,0871	0,0292
#154, t <sub>2</sub>	0,0152	0,4022	0,0003	0,0868	0,0260
#154, t <sub>3</sub>	0,0068	0,2036	0,0033	0,0507	0,0305
#267, t <sub>2</sub>	0,0091	0,1870	0,0059	0,1355	0,0972
#267, t <sub>3</sub>	0,0045	0,1004	0,0013	0,1628	0,0586
#270, t <sub>1</sub>	0,0088	0,1426	0,0002	0,0142	0,0577
#270, t <sub>2</sub>	0,0006	0,1225	0,0002	0,0130	0,0626
#270, t <sub>3</sub>	0,0045	0,0936	0,0002	0,0225	0,0501

Tabelle 31: Target-to-Reference-Ratios der qRT-PCRs verschiedener Primer ausgehend von cDNAs etablierter BCO-Linien in den Zeitperioden  $t_{1-3}$  (Teil 2). (Entnommen aus Vollmer et al. (2024): Patient-derived bladder cancer organoids show stable transcript expression along cultivation [18.08.2024]).

	FGFR3	CD276	STAG2	ERCC2	HRAS
#140, t1	0,0007	0,0128	0,0094	0,0025	0,0030
#140, t2	0,0004	0,0131	0,0054	0,0023	0,0041
#140, t3	0,0007	0,0104	0,0060	0,0022	0,0041
#154, t1	0,0006	0,0090	0,0085	0,0023	0,0031
#154, t2	0,0004	0,0098	0,0080	0,0024	0,0030
#154, t3	0,0001	0,0088	0,0052	0,0017	0,0041
#267, t2	0,0117	0,0187	0,0108	0,0050	0,0119
#267, t3	0,0010	0,0103	0,0070	0,0035	0,0120
#270, t1	0,0332	0,0266	0,0270	0,0109	0,0074
#270, t2	0,0019	0,0148	0,0273	0,0086	0,0051
#270, t3	0,0144	0,0245	0,0268	0,0109	0,0063

Tabelle 32: Target-to-Reference-Ratios der qRT-PCRs verschiedener Primer ausgehend von cDNAs etablierter BCO-Linien in den Zeitperioden  $t_{1-3}$  (Teil 3). (Entnommen aus Vollmer et al. (2024): Patient-derived bladder cancer organoids show stable transcript expression along cultivation [18.08.2024]).

	BRCA1	TSC1	TP53	PIK3CA	PTEN	ANGPTL4
#140, t1	0,0012	0,0009	0,0020	0,0014	0,0236	0,0006
#140, t2	0,0007	0,0005	0,0012	0,0011	0,0173	0,0008
#140, t3	0,0008	0,0006	0,0014	0,0013	0,0201	0,0003
#154, t1	0,0009	0,0005	0,0012	0,0012	0,0235	0,0002
#154, t2	0,0008	0,0005	0,0013	0,0011	0,0199	0,0011
#154, t3	0,0009	0,0002	0,0007	0,0003	0,0192	0,0015
#267, t2	0,0011	0,0003	0,0029	0,0009	0,0607	0,0003
#267, t3	0,0008	0,0003	0,0049	0,0007	0,0423	0,0007
#270, t1	0,0017	0,0005	0,0012	0,0016	0,0279	0,0008
#270, t2	0,0015	0,0004	0,0007	0,0027	0,0262	0,0006
#270, t3	0,0018	0,0008	0,0011	0,0031	0,0252	0,0032

Zur Veranschaulichung der qRT-PCR-Ergebnisse sind nun mehrere Diagramme aufgeführt (Abb. 21-24). Jedes Diagramm beschreibt die Expression eines Primers in den Zeitperioden  $t_{1-3}$  der verwendeten BCO-Linien. Die ausgewählten Primer codieren u.a. für BC-Stammzellmarker, Immunmodulatoren und weitere Faktoren <sup>116</sup>.

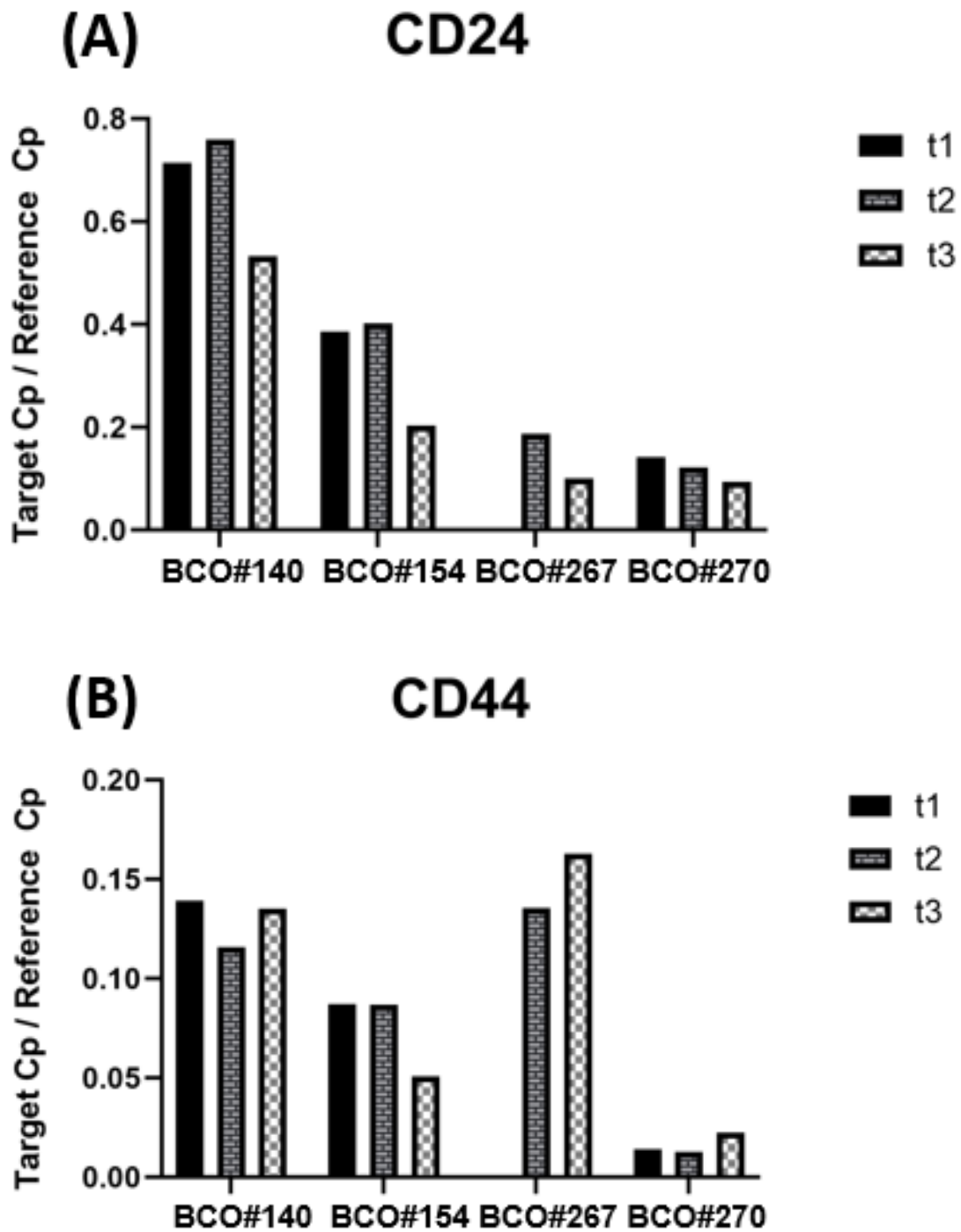


Abbildung 21: qRT-PCR Analysen der verschiedenen Zeitperiode der BCO-Linien. Die hier analysierten Transkripte sind eine Auswahl pathologisch-relevanter Blasentumor-Stammzellmarker. Die Abszisse zeigt die BCO-Linien mit ihren jeweiligen Zeitperioden. Die Ordinate zeigt die Target-to-Reference Cp Ratios. Die Targets wurden auf die Housekeeping-Primer GAPDH und beta-Actin normalisiert. CD = cluster of differentiation. (Entnommen aus Vollmer et al. (2024): Patient-derived bladder cancer organoids show stable transcript expression along cultivation [18.08.2024]).

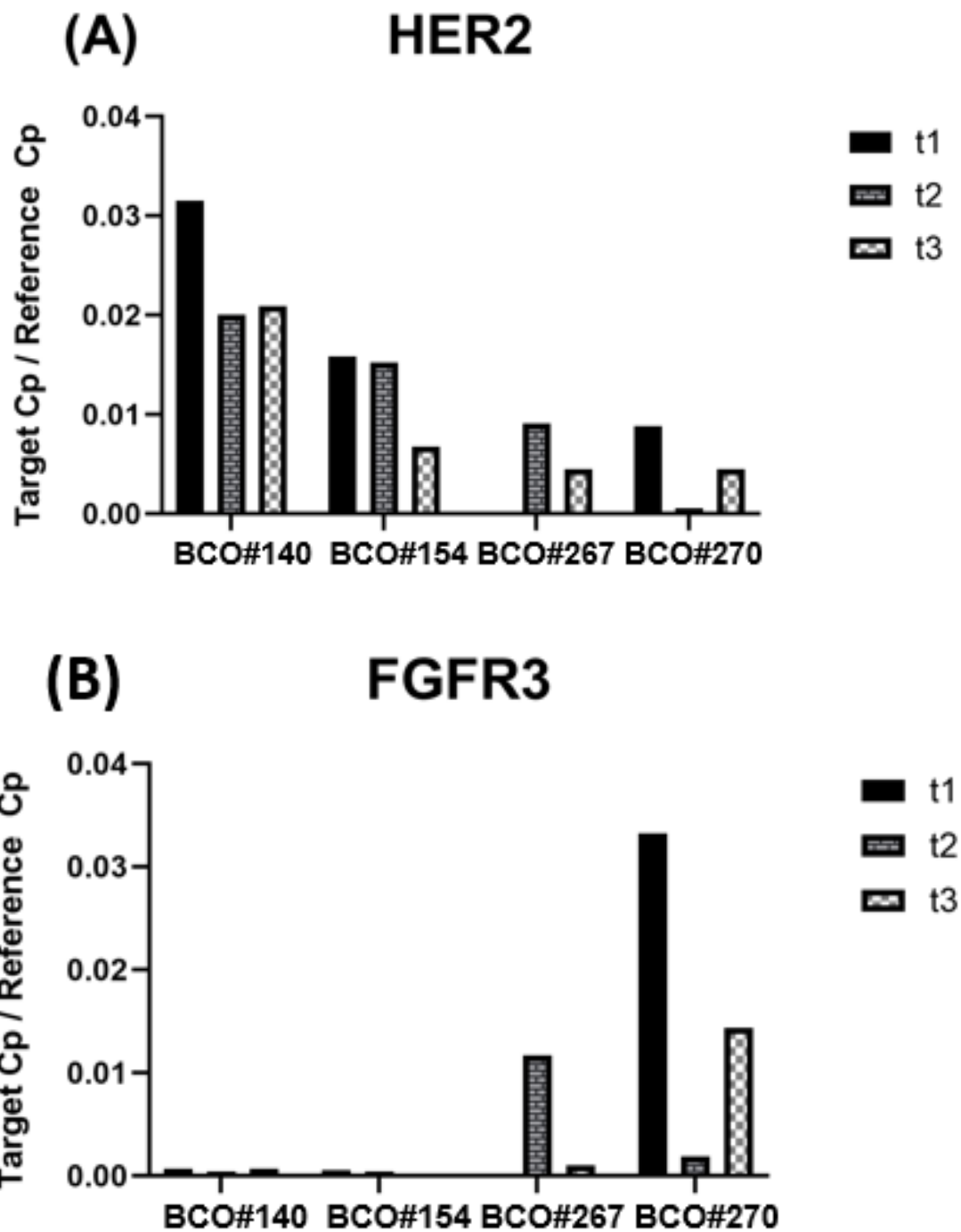
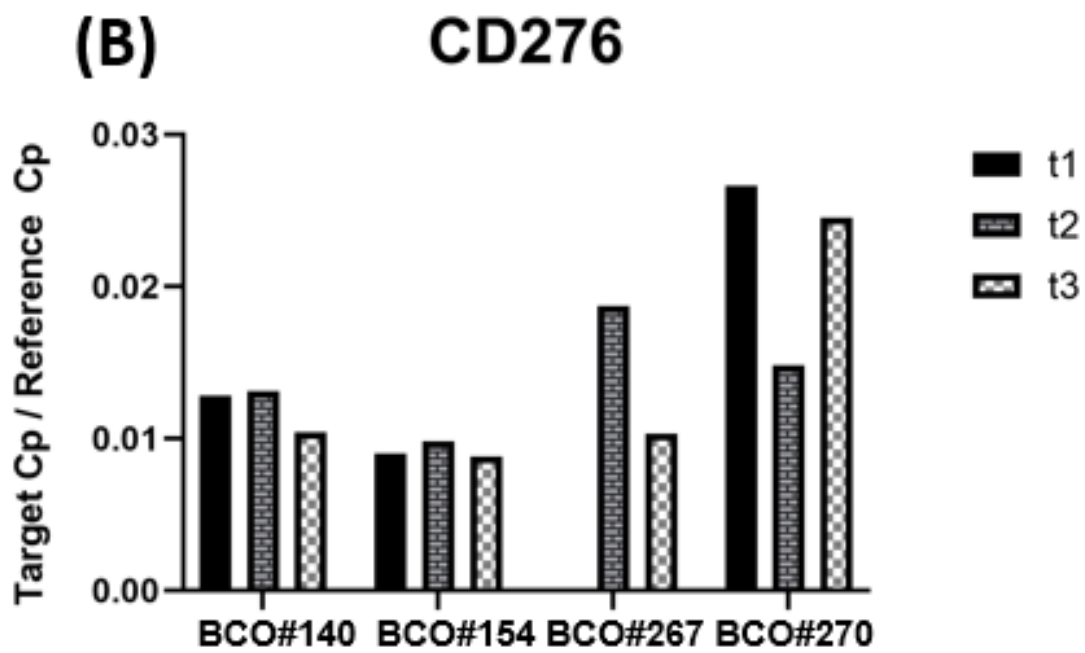
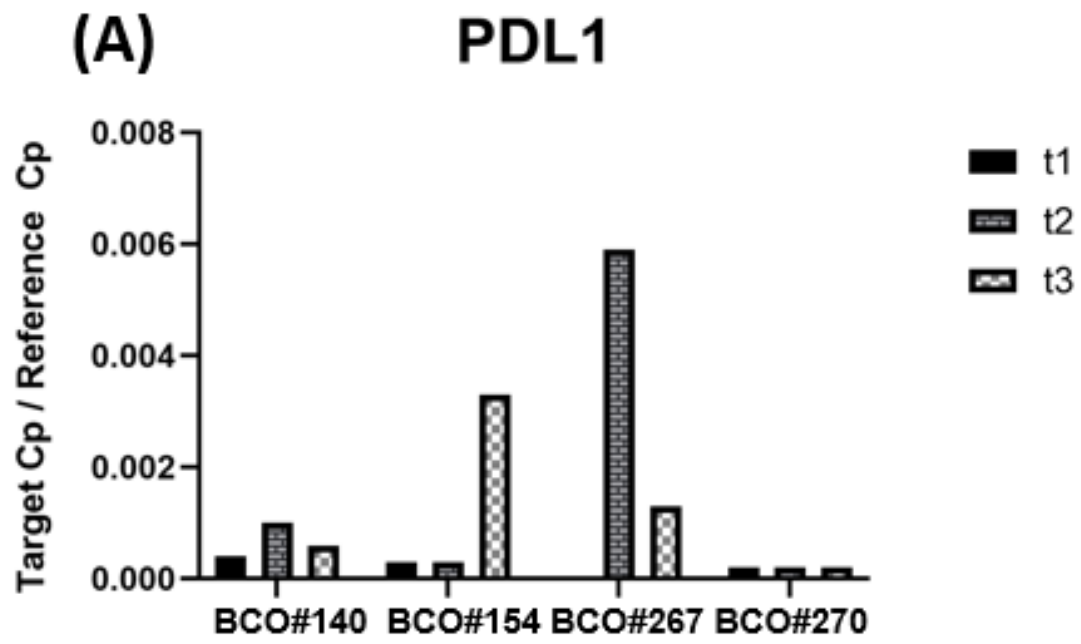


Abbildung 22: qRT-PCR Analysen der verschiedenen Zeitperiode der BCO-Linien. Die hier analysierten Transkripte sind eine Auswahl klinisch und pathologisch relevanter Marker. Die Abszisse zeigt die BCO-Linien mit ihren jeweiligen Zeitperioden. Die Ordinate zeigt die Target-to-Reference Cp Ratios. Die Targets wurden auf die Housekeeping-Primer GAPDH und beta-Aktin normalisiert. HER2 = human epidermal growth factor receptor 2. FGFR3 = fibroblast growth factor receptor 3. (Entnommen aus Vollmer et al. (2024): Patient-derived bladder cancer organoids show stable transcript expression along cultivation [18.08.2024]).



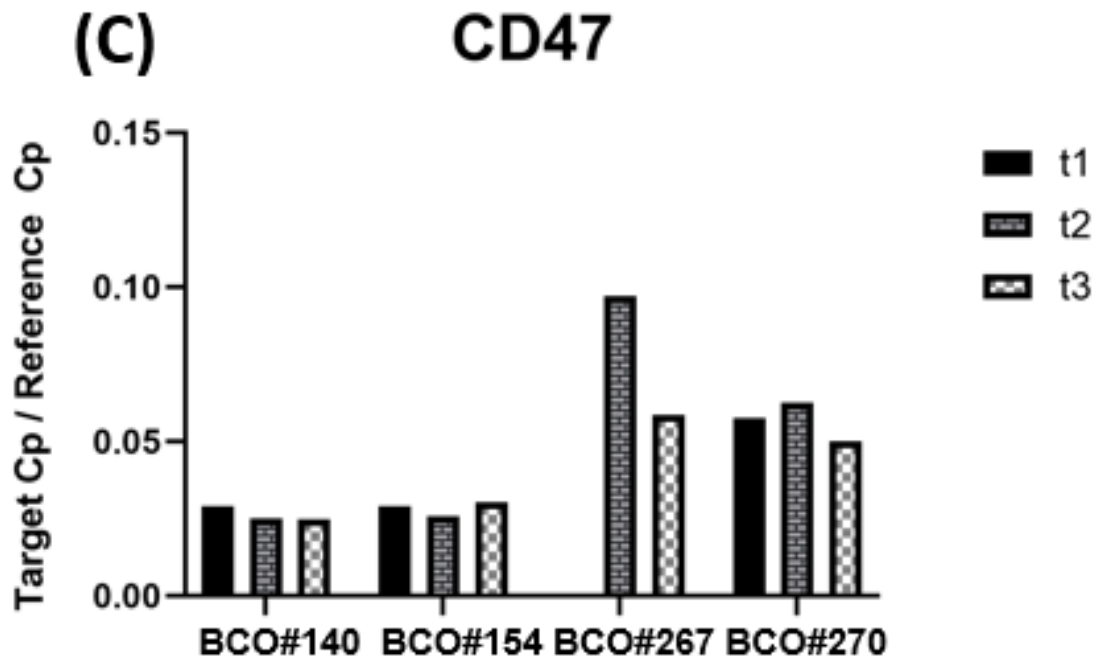
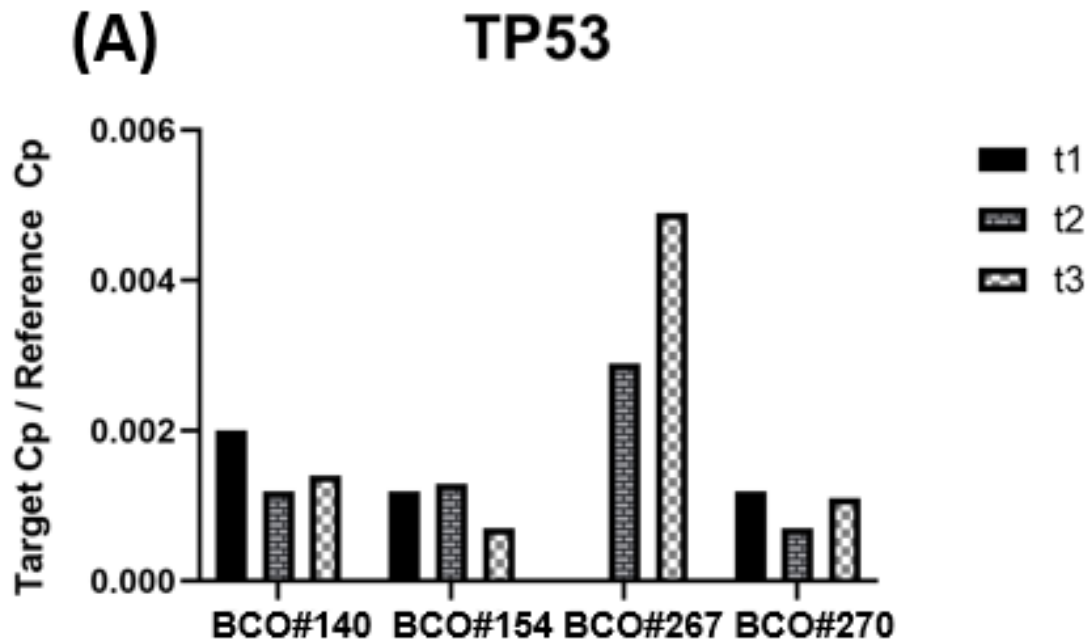
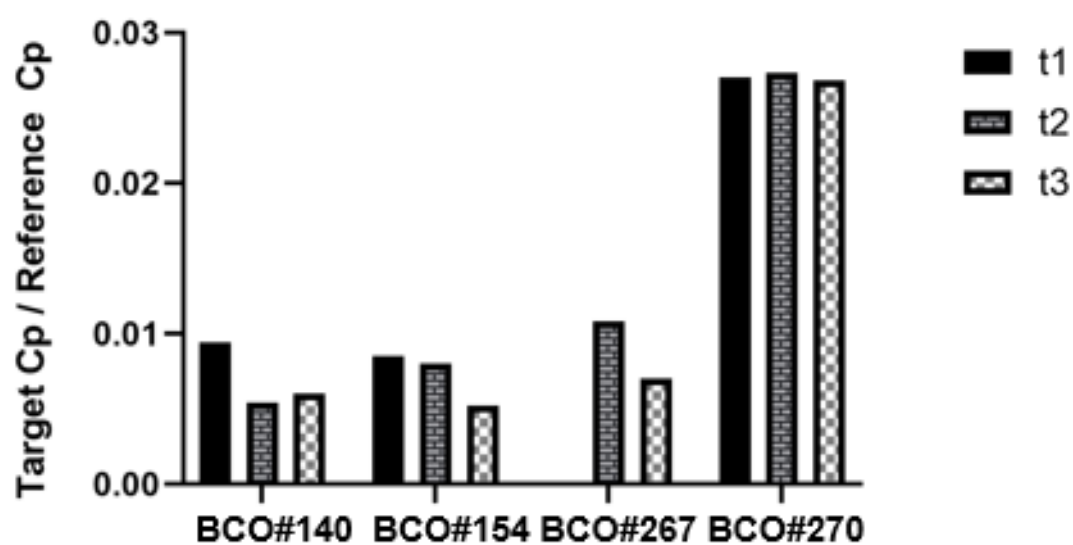


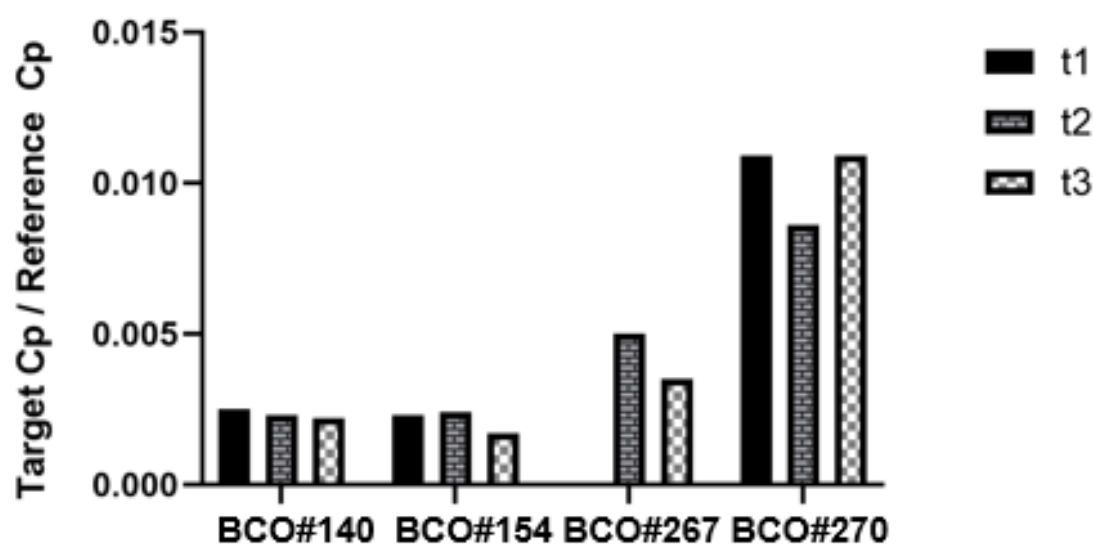
Abbildung 23: qRT-PCR Analysen der verschiedenen Zeitperiode der BCO-Linien. Die hier analysierten Transkripte sind eine Auswahl pathologisch-relevanter Immunmodulatoren. Die Abszisse zeigt die BCO-Linien mit ihren jeweiligen Zeitperioden. Die Ordinate zeigt die Target-to-Reference Cp Ratios. Die Targets wurden auf die Housekeeping-Primer GAPDH und beta-Actin normalisiert. PDL1 = programmed death ligand 1. CD = cluster of differentiation. (Entnommen aus Vollmer et al. (2024): Patient-derived bladder cancer organoids show stable transcript expression along cultivation [18.08.2024]).

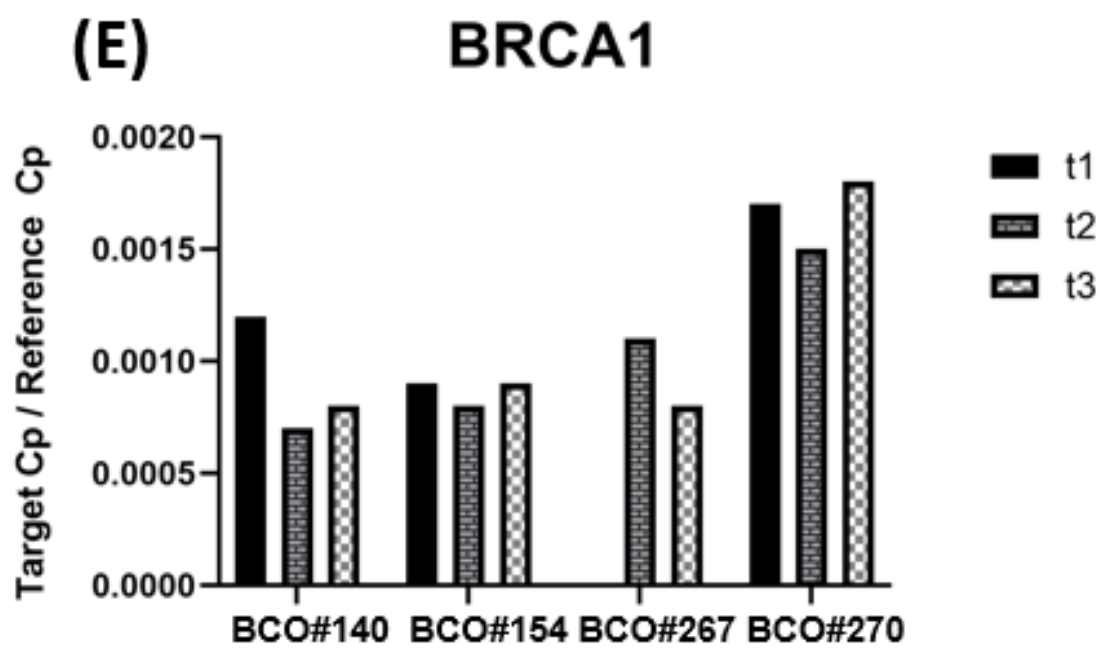
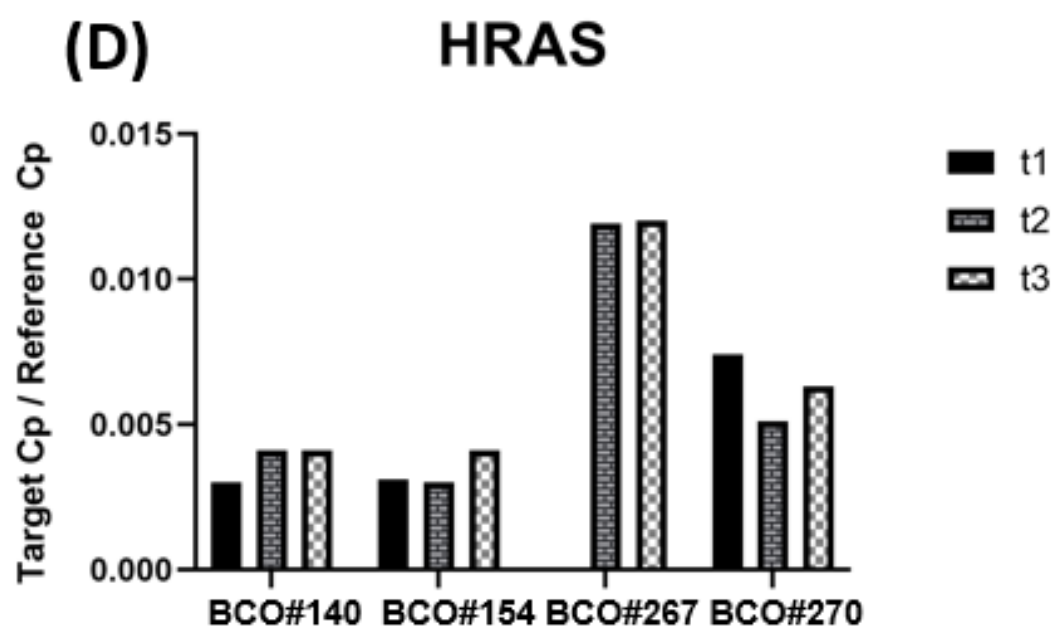


## (B) STAG2

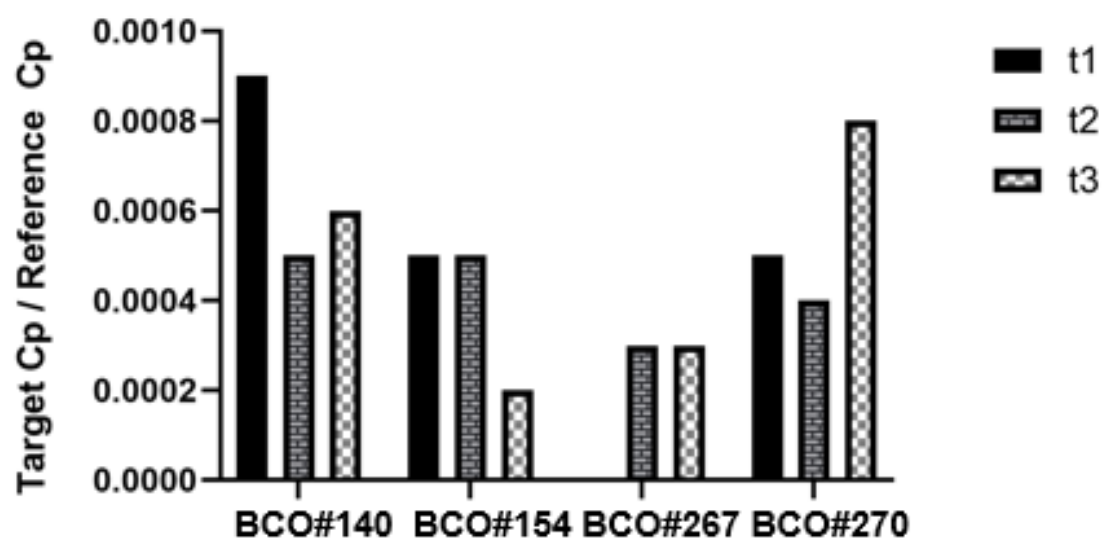


## (C) ERCC2

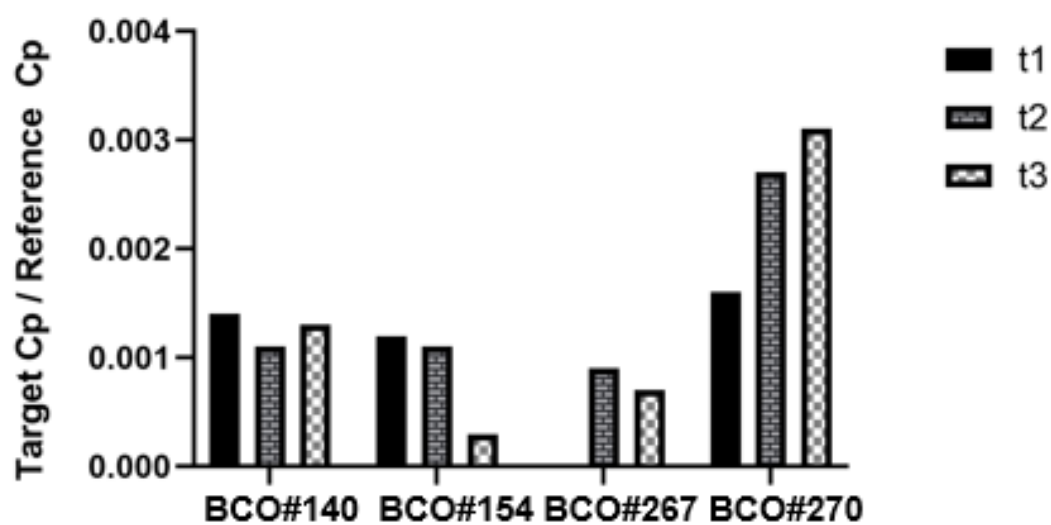




### (F) TSC1



### (G) PIK3CA



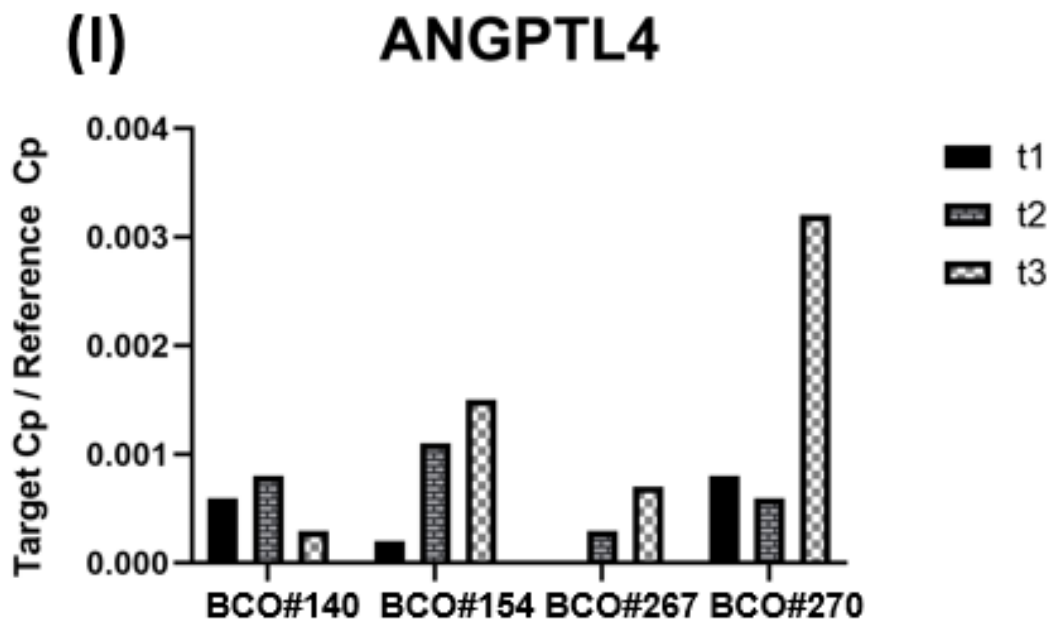
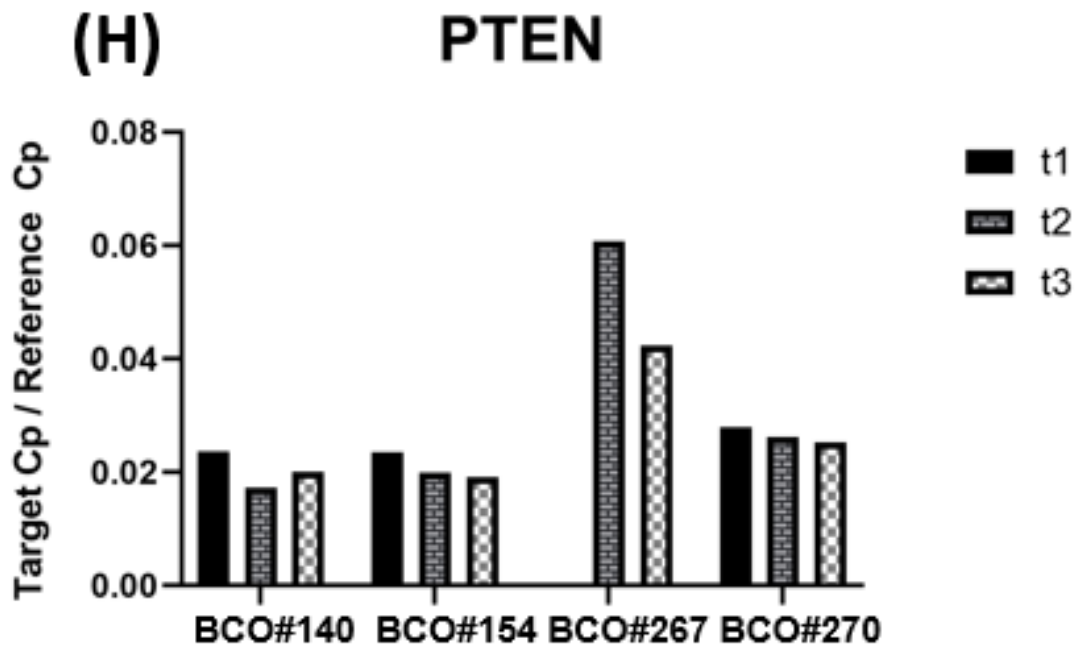


Abbildung 24: qRT-PCR Analysen der verschiedenen Zeitperiode der BCO-Linien. Die hier analysierten Transkripte sind eine Auswahl weiterer pathologisch-relevanter Blasen-tumormarker. Die Abszisse zeigt die BCO-Linien mit ihren jeweiligen Zeitperioden. Die Ordinate zeigt die Target-to-Reference Cp Ratios. Die Targets wurden auf die Housekeeping-Primer GAPDH und beta-Actin normalisiert. TP53 = tumor suppressor protein 53. STAG2 = stromal antigen 2. ERCC2 = excision repair cross-contemplation group 2. HRAS = transforming protein 21. BRCA1 = breast cancer antigen 1. TSC1 = tuberous sclerosis complex subunit 1. PIK3CA = phosphatidylinositole-3-kinase. PTEN = phosphatase and tensin homolog. ANGPTL4 = angiopoietin-like 4 protein. (Entnommen aus Vollmer et al. (2024): Patient-derived bladder cancer organoids show stable transcript expression along cultivation [18.08.2024]).

Bezüglich der beiden BC-Stammzellmarker CD24 (Abb. 21a) und CD44 (Abb. 21b) waren variable Expressionslevel über die untersuchten BCO-Linien hinweg zu erkennen. CD24 zeigte einen Trend hin zu einer niedrigeren Expression bei höheren Passagen (Abb. 21a), während CD44 über die Zeitperioden einen insgesamt stabilen Expressionstrend aufwies (Abb. 21b). Die Erb-B2 Tyrosinkinase HER2 aus der EGF-Rezeptorfamilie wies wie CD24 einen Expressionstrend hin zu niedrigeren Leveln bei gleichzeitig höherer Passagenzahl auf (Abb. 22a). Bezüglich fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3; Abb. 22b) und programmed death ligand 1 (PD-L1; Abb. 23a) konnte kein klarer Expressionstrend über die Kultivierungsperiode beobachtet werden. Im Falle von FGFR3 zeigte sich, dass FGFR3 im Kultivierungsverlauf einer BCO-Linie keine spontane Expressierung aufwies, wenn die Linie FGFR3 zuvor nicht exprimierte (Abb. 22b). Dies war in BCO#140 und BCO#154 zu beobachten. CD276 wies einen stabilen Expressionstrend in BCO#140 und BCO#154 auf, jedoch nicht in den anderen Linien (Abb. 23b). Die Mehrheit der untersuchten Gentranskripte, mitunter der Immunmodulator CD47 (Abb. 23c), die Cohesin-Untergruppe STAG2 (Abb. 24b), die DNA-Reparaturproteine ERCC2 (Abb. 24c) und BRCA1 (Abb. 24e), das Protoonkogen HRAS (Abb. 24d), die Tumorsuppressoren TSC1 (Abb. 24f), TP53 (Abb. 24a) und PTEN (Abb. 24h), und die Signaltransduktionskinase PIK3CA (Abb. 24g) zeigten in den untersuchten Zeitperioden keinen klaren Trend einer mit der Zeit steigenden oder fallenden Expression. Im Gegensatz dazu konnte in den Linien #154, #267, #270 ein steigender Expressionstrend für ANGPTL4 beobachtet werden (Abb. 24i), welcher sich insgesamt auf einem sehr niedrigen Expressionsniveau bewegte. Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die meisten der untersuchten BC-Marker stabile Expressionsmuster über die untersuchten Zeitperioden hinweg aufwiesen. Eine Anwendung von frühen Passagen (P1-4) für klinische Applikationen scheint somit vorteilhaft zu sein <sup>116</sup>.

## 4 Diskussion

### 4.1 Verbesserung der RNA-Extraktion aus BMEs

Die Ergebnisse aus 3.1.1.1 zeigen, dass mit den alten Protokollen BME nicht zuverlässig aufgelöst werden konnte. Von den 6 untersuchten Proben wiesen 2 (#140, P2 und #154, P11) enorme Ausreißer in den Target-to-Reference-Ratios auf, die so nicht in den anderen Proben im Versuchsteil oder in den Ergebnissen der Hauptversuche in 3.2.2 vorkamen (Tbl. 13-14). Das unterstützt die Vermutung, dass molekulare Bestandteile der BMEs falsch-hohe Messergebnisse in der RNA-Extraktion verursachten. Vor allem die Kohlenhydrat-haltigen Bestandteile in den BMEs weisen ein ähnliches Absorptionsspektrum wie RNA auf, welche für mögliche Verfälschungen die Ursache sein könnten<sup>117,118</sup>. Dass nicht die ganzen sechs in 3.1.1.1 untersuchten Proben solche ausreißenden Werte aufwiesen, lässt vermuten, dass zu der damaligen Zeit der RNA-Extraktion nie sicher gesagt werden konnte, wann noch BME-Rückstände vorhanden waren. Daher war es von großer Bedeutung, für diese Arbeit eine Methode zu entwickeln und zu etablieren, die gewährleisten kann, dass BME rückstandslos von den Zellen getrennt wird, um eine regelrechte RNA-Extraktion gewährleisten zu können.

So entstand die Methode „Auflösen von BME in 3D-Zellkulturen“, welche sowohl allgemeine Beobachtungen und Erfahrungen aus dem Labor mit BCOs und 3D-Zellkulturen als auch Ideen aus einer Arbeit von Da Silva et al. (2020) aufgreift<sup>119</sup>. Mit dieser Methode wurden die in 3.1.1.2 beschriebenen Versuchsreihen durchgeführt. Hier ergaben sich in den 3D-Zellkulturen der RT112 (Abb. 7) und von BCO#140 (Abb. 9) ähnlich hohe mittlere Ct-Werte in den durchgeführten qRT-PCRs, egal wie viele Dome das Ausgangsmaterial darstellten. Daraus ist zu schlussfolgern, dass auch tatsächlich 1 ng RNA aus jeder Probe zu cDNA umgeschrieben wurden. Verunreinigungen, die die RNA-Messung beeinträchtigen, würden dazu führen, dass nicht genau 1 ng RNA in cDNA umgeschrieben wird. Der daraus resultierende Ct-Wert würde eine signifikante Abweisung zu den Ct-Werten aufweisen, welche 1 ng RNA als Ausgang aufweisen. Die Messung der RNA-Konzentration im NanoPhotometer® NP80

(IMPLEN) weist folglich keine falsch-hohen Werte durch etwaige Verunreinigungen auf. Des Weiteren ergaben die Versuche die benötigte Zell- bzw. ungefähre Domzahl an RT112, respektive BCO#140 (18. Passage), die nötig war, um den unteren cut-off Wert von 80 ng/μL bei einer RNA-Extraktion zu erzielen. Man benötigt mindestens 2 Dome an RT112 oder, mit der Funktion in Abb. 5 berechnet, 160.000 Zellen, um den cut-off Wert zu erreichen (Tbl. 17). Auch bei den BCO#140 waren 2 Dome die Mindestanforderung (Tbl. 20).

Durch Veränderungen an den Protokollen wurde versucht, die RNA-Extraktion aus BCOs zu verbessern, um dadurch eine bessere Vergleichbarkeit der Genexpressionsprofile zwischen verschiedenen Ausgangszahlen an Domen bzw. Kulturen in unterschiedlichen Passagen und von verschiedenen Personen zu ermöglichen. Im Versuchsteil 3.1.1.3 schienen sowohl der Ansatz einer kürzeren Trypsininkubationszeit auf 10 min mit einem Verzicht auf ein Vortexmischen währenddessen als auch die Reduktion des RNase-freien Wassers auf 20 μL im Schritt der RNA-Extraktion in den Zellen der Versuchsreihe positive Ergebnisse hervorzubringen (Abb. 10). Gegensätzlich dazu konnte im Versuchsteil 3.1.2 zum Vergleich zweier Ansätze mit verschiedenen BMEs im Falle von Matrigel® kein wesentlicher Unterschied in der RNA-Extraktionskonzentration beider Ansätze gefunden werden. In den Versuchsreihen mit Cultrex™ erzielte der Ansatz „15 min“ eine höhere Konzentration auf als der Ansatz „10 min“, jedoch wird dem wenig Beachtung geschenkt, da im Versuchsverlauf beobachtet werden konnte, dass im Reaktionsgefäß mit Cultrex™ im Ansatz „10 min“ ein trüber Überstand zurückblieb, welcher auch durch mehrere Waschschrte und eine Trypsinierung nicht beseitigen ließ. Im Großen und Ganzen wird diese Beobachtung nicht als signifikant gewertet, da in mehreren weiteren Versuchen mit dem gleichen Protokoll nie eine solche Beobachtung gemacht wurde.

In der Retrospektive wird davon abgeraten, eine Veränderung an der Trypsininkubationszeit und am Vortexen vorzunehmen. Ein Mikroskopieren zeigte nach dem Schritt der verkürzten Trypsininkubation, dass manche Organoide nicht vollständig zu Einzelzellen verdaut wurden. Reagenzien könnten in konsekutiven Versuchen an diesen halb-vereinzelteten Organoiden somit nicht

auf jede Zelle wirken. Die Reduzierung des RNase-freien Wassers auf 20µL wurde beibehalten, da sich mit diesem Ansatz verlässlicher höhere RNA-Extraktionskonzentrationen bei geringer Zellmasse erzielen lassen. Zusätzlich sei zu erwähnen, dass BCOs ein sehr individuelles Wachstumsverhalten in verschiedenen Medien, Passagen und je nach Kulturdauer aufweisen, welches bis dato nicht gänzlich erforscht ist. Daher können die hier angegebenen „Mindestanforderungen“ an Domen für eine suffiziente RNA-Extraktion nicht als absolut angesehen werden, sondern dienen lediglich als grobe Orientierung. Limitationen bezüglich der Stichprobenmenge in den durchgeführten Versuchen sind auf die sehr stark begrenzte Verfügbarkeit der etablierten BCO-Linien zurückzuführen. Daher wurde versucht, mit möglichst wenig Proben Erkenntnisse zu gewinnen. Es bleiben künftige Studien abzuwarten, die den Einfluss dieser Moderatorvariablen besser erklären.

#### **4.2 Vergleich der RNA-Extraktionskonzentration zwischen verschiedenen Hydrogelen**

Das verwendete Matrigel® und Cultrex™ stellen ECM-Analoga dar, welche u.a. Proteinen und Glykoproteinen aus Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Maus-Sarkomen extrahiert werden. Diese bieten durch ihre proteinogene Zusammensetzung viele Anhaftungspunkte für Zell-Matrix-Kontakte, so etwa Laminin, Kollagen IV oder Glykoproteine wie Heparansulfat <sup>77,78</sup>. Da die quantitative Zusammensetzung der einzelnen Bestandteile jeder extrahierten Charge variieren kann, wird vom Hersteller die Lowry-Methode eingesetzt, um die Proteinzusammensetzung quantitativ zu bestimmen <sup>120</sup>. Somit werden starke Abweichungen in der Zusammensetzung zwischen verschiedenen Chargen minimiert. Zudem weisen die vorliegenden Varianten an Matrigel® und Cultrex™ eine reduzierte Konzentration an Wachstumsfaktoren auf, was eine adäquatere Etablierung und besseren Einsatz der von uns eingesetzten Kulturmedien ermöglicht <sup>77,78</sup>. Ein Einsatz von unbekanntem Konzentrationen an Wachstumsfaktoren würde etwaige Analysen der BCOs hinsichtlich Wachstumsverhalten und oder Transkriptomexpressierungen beeinflussen. Im Gegensatz dazu besteht GrowDex® laut Herstellerangaben aus Reinstwasser und nanofibrillärer Cellulose und bietet so statt Proteinen oder Glykoproteinen

lediglich Polysaccharidketten als Anhaftungsmöglichkeiten für Zell-Matrix-Kontakte an. GrowDex® weise zudem ein definiertes Verhältnis seiner wenigen Bestandteile auf, was Abweichungen zwischen verschiedenen Chargen minimiere <sup>120</sup>.

Es gibt mehrere Gründe, warum in dieser Arbeit drei ECM-Analoga miteinander verglichen wurden. Zum einen stellt Matrigel® ein sehr teures BME mit knapper Verfügbarkeit dar, was eine effiziente Gestaltung von Experimenten schwierig macht. Zum anderen kann bei den beiden BMEs (Matrigel® und Cultrex™) nie mit absoluter Wahrscheinlichkeit eine hundertprozentige Vergleichbarkeit zwischen den jeweiligen BME-Chargen angegeben werden, da gerade die Zusammensetzung der Glykoproteine, Proteine und Wachstumsfaktoren doch gewissen Schwankungen unterliegt <sup>78,121,122</sup>. Daher wurden mit Cultrex™ und GrowDex® nach Alternativen gesucht, die manche dieser experimentellen Herausforderungen nicht aufweisen. Cultrex™ ist mit Matrigel® in der Zusammensetzung vergleichbar, aber kosteneffizienter und schneller lieferbar. GrowDex® stellt aufgrund seiner konstanten Zusammensetzung einen neuen Ansatz dar, BCOs in 3D zu kultivieren.

Der in 3.1.2 gezeigte Vergleich der auf die Ausgangszellzahl bezogene RNA-Extraktionskonzentrationen zwischen Matrigel® und Cultrex™ zeigte im Matrigel®-Ansatz „10 min“ eine 183,5% und im Ansatz „15 min“ eine 34,8% höhere RNA-Extraktionskonzentration als in den Cultrex™-Ansätzen (Tbl. 26). Zudem erschließt sich, dass sich GrowDex™ nicht für RNA- bzw. PCR-Analysen aus 3D-Zellkulturen von BCOs eignet. Da die Zellen mehrheitlich adhärent am Wellboden wuchsen, kann daraus geschlossen werden, dass GrowDex® zu wenig adäquate Anhaftungspunkte für Zell-Matrix-Kontakte liefert, um ein dreidimensionales Zellwachstum zu ermöglichen. Dies wurde auch in einer aus dem Labor stammenden Publikation diskutiert <sup>115</sup>. Zudem sei zu bemerken, dass das Handling von 3D-Zellkulturen mit GrowDex® sehr viele Fehlerquellen zulässt. Vor allem das Arbeiten in den von Hersteller empfohlenen 96-Well-Platten und die hohe Viskosität von GrowDex® machen es schwer, sauber und genau eine Inkulturnahme oder einen Medienwechsel durchzuführen.

In der Arbeit von Walz et al. (2023) wird das Wachstumsverhalten von BCO#140 (gleiche BCO-Reihe wie in dieser Dissertation beschrieben) und RT112 in 3D in 0,2% und 0,5% GrowDex® gegenüber wachstumsfaktorgemindertem Cultrex™ untersucht. Die Arbeit kam zu dem Schluss, dass BCOs in Cultrex™ ein signifikant besseres Wachstumsverhalten hinsichtlich Organoidzahl und -größe aufwiesen als in 0,2% GrowDex®. Eine Erhöhung der Arbeitskonzentration von GrowDex® auf 0,5% zeigte im Vergleich zu 0,2% GrowDex® oder Cultrex™ keine signifikante Veränderung. Zudem beobachtete man, dass RT112 in 3D hinsichtlich derselben Kriterien kein signifikant besseres Wachstum in wachstumsfaktorgemindertem Cultrex™ als in 0,2% GrowDex® zeigten. Auch hier ergab eine Erhöhung der Arbeitskonzentration auf 0,5% GrowDex® kein signifikant besseres Ergebnis als 0,2% Arbeitskonzentration <sup>115</sup>. Herr Paul Pollehne diskutiert in der Dissertation, aus welcher die hier beschriebene Publikation entstand, dass das BME Cultrex™ vermutlich ein besseres Nährstoff-, Sauerstoff- und Wachstumsfaktorversorgung gewährleiste und auch mehr Zell-Matrix-Kontakte ermögliche, was dem Zellwachstum im Hydrogel zugutekomme <sup>123</sup>.

Insgesamt wird Matrigel® als das überlegenere ECM-Analogon für RNA-Extraktionen mit BCOs angesehen. Die Beobachtung des adhärennten Zellwachstums am Boden der Kulturplatte in den GrowDex®-Versuchsreihen lässt die Annahme zu, dass man für zukünftige Versuche nie mit Sicherheit ein 3D-Zellwachstum antizipieren kann. Die beschriebenen Erkenntnisse aus der Literatur unterstützen die Entscheidung, GrowDex® als ECM-Analogen für zukünftige Versuche auszuschließen. Auch sei hier nochmals auf das individuelle Wachstumsverhalten von BCOs und die geringe Stichprobenmenge hingewiesen, welche die Aussagekraft der Versuchsreihen einschränkt.

#### **4.3 Transkriptomvergleich der BCO-Linien im zeitlichen Verlauf der Kultivierung**

Die Untersuchung pathologisch relevanter Marker mittels qRT-PCR in BCO-Linien zeigt konstante Expressionsniveaus in 11 von 16 analysierten Transkripten während des Kultivierungsprozesses, einschließlich CD44, CD276

und BRCA1, unter anderen Markern (Abb. 21-24) <sup>1,68</sup>. Zu den 11 Markern mit konstantem Expressionsprofil wurde auch CD276 aufgrund des stabilen Expressionsprofils in BCO#140 und BCO#154 gezählt (Abb. 23b). Selbst die Kultivierungsprozesse bis zur 24. Passage, die in  $t_3$  von BCO#140 implementiert wurde, zeigten keine signifikante Veränderung in der Expression der untersuchten Transkripte <sup>116</sup>. Das modulierte Transkript HER2 zeigte abnehmende Expressionsniveaus in höheren Passagen (Abb. 22a). Dies könnte mit Veränderungen in der Zellzusammensetzung innerhalb einer BCO-Linie oder mit einem in-vitro-Artefakt zusammenhängen, da das verwendete Zellkulturmedium Wachstumsfaktoren enthält, die den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor-Pathway adressieren und somit möglicherweise negativ-regulatorische Wege für Faktoren aktivieren, die an diesem Weg beteiligt sind <sup>5,124</sup>. Wie bereits beschrieben, sinkt bzw. verliert CD24 als Indikator für vorteilhaftes Wachstum von BCO-Linien im Laufe der Zeit seine Expression (Abb. 21a) <sup>5</sup>. In späteren Passagen wurde bzgl. CD24 bei allen untersuchten BCOs ein Trend zu geringerer Transkriptexpression festgestellt. Dies bestätigt eine vergangene Arbeit aus der Arbeitsgruppe <sup>5</sup>. Während BCO#140 und BCO#154 ein erhöhtes Niveau dieses Zelloberflächenantigens aufwiesen, exprimierten BCO#267 und BCO#270 insgesamt deutlich weniger (Abb. 21a). Solche CD24<sup>high</sup>- und CD24<sup>low</sup>-BCOs wurden bereits beim Analysieren von Organoiden durch Immunfluoreszenz beschrieben <sup>5</sup>. Diese phänotypischen Unterschiede könnten einfach auf personenspezifische Pathologien zurückzuführen sein. Insbesondere, da BCO#140 und BCO#154 vom selben Patienten stammen, jedoch bei zwei verschiedenen Operationen mit einigen Monaten Abstand akquiriert wurden. Die molekularen Unterschiede zwischen verschiedenen Phänotypen von BCOs müssen jedoch in zukünftigen Studien untersucht werden. Zu beachten ist, dass eine insgesamt erhöhte Expression der untersuchten Transkripte in BCO#140 und BCO#154 nicht bei den anderen Proben beobachtet wurde. Zum Beispiel waren CD47 (Abb. 23c) und STAG2 (Abb. 24b) in BCO#267 und BCO#270 erhöht. Dies unterstützt die Annahme, dass interindividuelle Unterschiede in den Genexpressionsmustern unter den untersuchten Proben gemessen wurden. Hinsichtlich des Immuncheckpoint-

Inhibitors PD-L1 konnte beobachtet werden, dass die Expression in den untersuchten Linien im Vergleich zu anderen Transkripten niedriger war (Abb. 23a). In einzelnen Zeitperioden wurde ein plötzlicher Anstieg der Expression festgestellt. Des Weiteren schien BCO#270 in keiner Zeitperiode eine Expression von PD-L1 zu zeigen. Dies steht im Einklang mit Geng et al., die ebenfalls beschrieben, dass PD-L1 nur in einigen BCO-Linien exprimiert wird, wobei die Expression je nach untersuchten Passagen variieren kann <sup>5</sup>. Eine signifikante Expression von ANGPTL4 in den BCO-Linien war zu keiner Zeitperiode vorhanden (Abb. 24i). Diese Beobachtung wird von Hsieh et al. unterstützt, welche die ANGPTL4-Expression in Urothelkarzinomen erforschten <sup>112</sup>. Aktuell wird die Funktion von ANGPTL4 als Promotor für Tumorprogress kontrovers diskutiert <sup>112</sup>. Die Arbeitsgruppe um Hsieh et al. identifizierte ANGPTL4 in den untersuchten Urothelkarzinomlinien als durch Promotor-Hypermethylierung herunterreguliert, was einem Tumorprogress zugutekäme <sup>112</sup>. Ob eine solche Herunterregulierung von ANGPTL4 in BCOs durch etwa einen Entzug von ANGPTL4-spezifischen Stimulanzen im Kulturmedium einen Effekt auf die Expandierfähigkeit und Langlebigkeit der BCO-Linien hat, bleibt zu untersuchen <sup>116</sup>.

Um einen vergleichenden Eindruck von der Transkriptom-Plastizität zu erhalten, wurde eine differential gene expression analysis von BCO-Linien durchgeführt. In Übereinstimmung mit der oben genannten Stabilität der wichtigsten pathologischen Merkmale in der qRT-PCR zeigte die differential gene expression analysis ebenfalls eine stabile Expression (Abb. 19-20). Ohne Ausnahme codierten die wenigen verschieden exprimierten Transkripte in den untersuchten BCO-Linien für Pseudogene <sup>116</sup>.

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen in der qRT-PCR und differentiellen Genexpressionsanalyse erwähnten Lee et al. und Cai et al. eine klonale Evolution in der BCO-Linienkultur und eine Veränderung des Transkriptoms in Organoid-Linien während der Kultivierung, die als Ergebnis von Selektionsdruck während der Kultivierung diskutiert wird <sup>1,2</sup>. Diese klonale Evolution konnte auch im Falle der BCO-Linien #140 und #154, welche vom selben Patienten stammen, wenn auch von verschiedenen Lokalisationen im Situs und Stadien des

Krankheitsverlaufs (Tbl. 27) nicht gezeigt werden. Die beiden Linien repräsentieren den Tumor nämlich zu verschiedenen Zeitpunkten. Des Weiteren präsentierten Cai et al. Daten zur klonalen Evolution, teilweise hin zu einem stammzellähnlicheren Genexpressionsmuster, was auch die Kultivierung von höheren und langfristigen Passagen in Bezug auf die Modellierung des primären Tumors in Frage stellt <sup>2</sup>. Im Gegensatz dazu zeigten weitere Studien ähnliche Transkriptomprofile zwischen dem ursprünglichen Tumor und all seinen abgeleiteten Organoiden, was die Beobachtung unterstützt, dass BCO-Linien derselben Patientin bzw. desselben Patienten sich mit einer dem Primärtumor ähnlichen Transkriptomexpression und ähnlichen Mustern an Schlüsselmutationen präsentieren <sup>1,2,125</sup>. Darüber hinaus wurde berichtet, dass in einigen Organoidlinien derselben Person genetische Profile hinsichtlich z.B. FGFR3- und p53-Status Ähnlichkeiten zeigten, was auch bei BCO#140 und BCO#154 beobachtet werden konnte (Abb. 22b, 24a) <sup>4</sup>. Die Ähnlichkeit des Transkriptoms von BCO-Linien (hier: BCO#140 und BCO#154) desselben Patienten aus verschiedenen Krankheitsstadien, lässt jedoch auch hoffen, dass die Re Kultivierung und Etablierung von Patienten-abgeleiteten BCOs in höhere Passagen zu einem späteren Krankheitsstadium immer noch möglich ist. Folglich könnte ein Patient oder eine Patientin, der bzw. die in den frühen Stadien der Krankheit ein Medikamentenscreening unter Verwendung eines Organoidmodells durchlaufen hat, diesen Ansatz potenziell erneut in Betracht ziehen, wenn sein Tumor in ein fortgeschrittenes Stadium übergegangen ist <sup>116</sup>.

Im Folgenden werden einige Herausforderungen erläutert, welche sich während der Kultivierungs- und RNA-Extraktionsperiode ergeben hatten. Einerseits wuchsen manche Passagen an aufgetauten BCOs untypischerweise sehr verhalten. In den ersten Tagen konnte noch ein moderates Zellwachstum beobachtet werden, welches anschließend stagnierte. In manchen Fällen verringerte sich die Zellzahl vor der beobachteten Passagezeit für die jeweilige BCO-Linie. Dies betraf auch BCO-Linien, die vor dem Einfrieren ein gutes Zellwachstum zeigten. Zudem konnte bei manchen Passagen beobachtet werden, dass die Organoide nicht die Größe erreichten wie vor dem Einfrieren typisch für die BCO-Linie. Des Weiteren konnte lichtmikroskopisch bei manchen

Kulturen beobachtet werden, dass das bisher eigentlich nahezu klare Cultrex™ plötzlich „vernebelt und griselig“ aussah. Weitere Indizien sprachen hier für einen Kontaminationsverdacht in manchen Proben, da diese Proben nicht wuchsen. Die Passagen wurden fachgerecht entsorgt und es wurden entsprechend neue Passagen unter besonderer Vorsicht und Hygiene kultiviert. Doch auch danach konnte dieser Phänotyp des Cultrex™ in manchen Kulturen beobachtet werden; auch in solchen, die wuchsen. Diese Proben wurden vorsichtshalber dennoch von der Analyse ausgeschlossen. Eine weitere Schwierigkeit ergab sich im Schritt der RNA-Extraktion. Viele BCOs wuchsen sehr gut in Zahl und Organoidgröße und glichen stark den Kulturen vor dem Einfrierschritt. Jedoch ergab sich bei der RNA-Extraktion mancher Proben eine sehr geringe Extraktionskonzentration trotz vielversprechendem lichtmikroskopischem Bild. Diesbezüglich sind weitere Erkenntnisse nötig, um ein effizienteres und einheitliches Kulturmedium zu erschaffen, welches ein verlässliches und suffizientes Organoidwachstum ermöglicht. Die Ursachen für das herausfordernde und unvorhersehbare Kultivieren von Organoiden wurden auch nach intensiver Literaturrecherche und Diskussion in der Arbeitsgruppe nicht vollständig geklärt. Zu vermuten ist ein Zusammenspiel aus mehreren Variablen, wie etwa Kulturmedien, Wachstumsverhalten, u.a. Etwaige Einflüsse der Verwendung verschiedener Kulturmedien vor bzw. nach einer Lagerung im Stickstofftank auf das Transkriptom der BCOs im Kultivierungsverlauf sind nicht auszuschließen. Durch die Kultivierung aller Proben im gleichen Medium (BTM) nach dem Auftauen aus dem Stickstofftank wurde versucht, ein Mediumbedingter Einfluss auf das Transkriptom so gering wie möglich zu halten. Generell wird eine größere Stichprobenmenge benötigt, um die Ergebnisse und weitere Einflüsse statistisch besser erfassen zu können.

Allgemein gibt es begrenzt experimentelle Belege für die Kultivierung von Organoiden in höhere Passagen ( $P \geq 6$ ). Die Konzentration auf frühe Passagen ( $P < 6$ ) bietet Vorteile, insbesondere in klinischen Anwendungen für interindividuelle Screening-Modelle in der personalisierten Medizin. Frühe Passagen können schnell kultiviert werden, was die Wahrscheinlichkeit einer Krankheitsprogression verringert und eine kürzere Diagnosezeit bis zur präzisen

Therapie ermöglicht. Darüber hinaus kann die Verwendung früher Passagen die wirtschaftliche Belastung personalisierter Ansätze signifikant verbessern. Zudem erhöht sich dadurch die Stichprobemenge an verwendbaren BCO-Linien, was die Untersuchung von aktuell noch nicht geklärten Forschungsfragen, wie etwa Einflüsse von Kulturmedium und Wachstumsbedingungen, ermöglichen würde. Die Kultivierung in höhere Passagen ist dennoch zielführend, da sie die Expansion von Organoidkulturen hinzu einer größeren Zellmasse ermöglicht und damit neue Forschungsansätze wie Xenotransplantat-Modelle für die Entwicklung medizinischer Geräte eröffnet. Zusammenfassend bleiben Patienten-abgeleitete Organoide ein vielversprechendes Werkzeug in der zukünftigen Personalisierten Medizin. Aufgrund der stabilen Expression des Transkriptoms scheint die Verwendung früher BCO-Linien für Arzneimitteltests im Rahmen der Personalisierten Medizin und später Passagen für Forschungsbereiche, die höhere Zellzahlen erfordern, machbar zu sein. Weitere Forschung ist erforderlich, um das Potenzial vollständig zu verstehen, um die Stichprobengröße zu erhöhen, die aufgrund einer begrenzten Kultivierungseffizienz in sehr hohen Passagen beeinträchtigt wurde, und um BCO-Linien in die klinische Routine zu integrieren <sup>116</sup>.

## 5 Zusammenfassung

Blasentumororganoide (BCO) stellen für die personalisierte Medizin einen aktuellen Forschungsgegenstand dar, welcher die gegenwärtige Diagnostik und Therapie von Blasen Tumoren ergänzen kann.

Ziel dieser Arbeit war es, einen Transkriptionsvergleich von verschiedenen BCO-Linien über deren Kultivierungsperiode hinweg anzustellen. Die extrahierte bulkRNA wurde via differential gene expression und qRT-PCR analysiert und verglichen.

Sowohl in der Analyse des Gesamttranskriptoms via differential gene expression als auch mehrheitlich in der qRT-PCR von pathologisch relevanten Markern konnte eine stabile Transkriptexpression in den BCO-Linien im zeitlichen Verlauf gezeigt werden. Zudem konnte in zwei BCO-Linien aus verschiedenen Krankheitsstadien eines Tumors desselben Patienten ein ähnliches Expressionsmuster zwischen den beiden Linien beobachtet werden.

Im Gegensatz zur Literatur konnte eine klonale Evolution in BCO-Linien im zeitlichen Verlauf der Kultivierung in diesen Versuchsreihen nicht beschrieben werden.

Ergebnisse an den jeweiligen Expressionsmustern der quantitativ analysierten Transkripte (z.B. ANGPTL4) könnten für zukünftige Versuche zur Verbesserung von Kulturmedien genutzt werden.

Die hier gezeigte Ähnlichkeit des Transkriptoms zweier BCO-Linien aus unterschiedlichen Stadien eines Tumors desselben Patienten spricht für eine Wiederholbarkeit von Organoidmodellen im klinischen Setting bei Tumorprogress oder Rezidiven.

Insgesamt spricht das stabile Transkriptexpressionsverhalten der BCOs für eine Konzentrierung auf die Kultivierung von frühen Passagen ( $P < 6$ ).

Zudem gibt es wenig Gründe, BCOs in höhere Passagen ( $P \geq 6$ ) zu kultivieren. Die Anpassung der Etablierungsdefinition hin zu geringeren Passagen bietet Vorteile im klinischen Setting. So können Screeningmodelle präziser sein, da

wenig Zeit bis zur Etablierung des Organoidmodells verloren geht. Auch sind Medikamententests möglich und die kürzere Kultivierungsdauer bietet wirtschaftliche Vorteile. Dennoch ist die Kultivierung in höhere Passagen nicht uninteressant, da durch die Expandierfähigkeit zu größeren Zellmassen neue Forschungsthemen erschlossen werden.

Bis zum klinischen Gebrauch von Patienten-abgeleiteten Blasen-tumororganoiden ist jedoch noch weitere Forschungsarbeit nötig, zu welcher diese Promotion im Rahmen des DFG-geförderten Graduiertenkollegs 2543 einen wichtigen Teil beigetragen hat.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Lee SH, Hu W, Matulay JT, et al. Tumor Evolution and Drug Response in Patient-Derived Organoid Models of Bladder Cancer. *Cell*. Apr 5 2018;173(2):515-528.e17. doi:10.1016/j.cell.2018.03.017
2. Cai EY, Garcia J, Liu Y, et al. A bladder cancer patient-derived xenograft displays aggressive growth dynamics in vivo and in organoid culture. *Scientific Reports*. 2021/02/25 2021;11(1):4609. doi:10.1038/s41598-021-83662-7
3. Corrò C, Novellademunt L, Li VSW. A brief history of organoids. *American journal of physiology Cell physiology*. 2020;319(1):C151-C165. doi:10.1152/ajpcell.00120.2020
4. Mullenders J, de Jongh E, Brousalı A, et al. Mouse and human urothelial cancer organoids: A tool for bladder cancer research. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 5 2019;116(10):4567-4574. doi:10.1073/pnas.1803595116
5. Geng R, Harland N, Montes-Mojarro IA, et al. CD24: A Marker for an Extended Expansion Potential of Urothelial Cancer Cell Organoids In Vitro? *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(10):5453. doi:10.3390/ijms23105453
6. Wei Y, Amend B, Todenhöfer T, et al. Urinary Tract Tumor Organoids Reveal Eminent Differences in Drug Sensitivities When Compared to 2-Dimensional Culture Systems. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(11):6305. doi:10.3390/ijms23116305
7. Robert-Koch-Institut. Krebs in Deutschland für 2019/2020. Accessed 14.12, 2023. [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/krebs\\_in\\_deutschland\\_2023.pdf?blob=publicationFile](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_2023.pdf?blob=publicationFile)
8. AWMF-Online. S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms. Accessed 20.06.2022, 2022. [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/032-038OLI\\_S3\\_Harnblasenkarzinom\\_2020-04-verlaengert.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-038OLI_S3_Harnblasenkarzinom_2020-04-verlaengert.pdf)
9. DeGEORGE KC, Holt HR, Hodges SC. Bladder cancer: diagnosis and treatment. *American family physician*. 2017;96(8):507-514.
10. Zargar H, Espiritu PN, Fairey AS, et al. Multicenter Assessment of Neoadjuvant Chemotherapy for Muscle-invasive Bladder Cancer. *European Urology*. 2015/02/01/ 2015;67(2):241-249. doi:10.1016/j.eururo.2014.09.007
11. Bellmunt J, Petrylak DP. New therapeutic challenges in advanced bladder cancer. Elsevier; 2012:598-607.
12. Bellmunt J, von der Maase H, Mead GM, et al. Randomized phase III study comparing paclitaxel/cisplatin/gemcitabine and gemcitabine/cisplatin in patients with locally advanced or metastatic urothelial cancer without prior systemic therapy: EORTC Intergroup Study 30987. *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30(10):1107. doi:10.1200/JCO.2011.38.6979
13. Sylvester RJ, Van Der Meijden AP, Oosterlinck W, et al. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *European urology*. 2006;49(3):466-477. doi:10.1016/j.eururo.2005.12.031

14. Huguet J. Follow-up after radical cystectomy based on patterns of tumor recurrence and its risk factors. *Actas Urológicas Españolas (English Edition)*. 2013;37(6):376-382. doi:10.1016/j.acuroe.2013.01.004
15. Aumüller G AG, Conrad A, Engele J, Kirsch J, Maio G, Mayerhofer A, Mense S, Reißig D et al. *Duale Reihe Anatomie*. 5 ed. Georg Thieme Verlag; 2020. Accessed 08.06.2022. [https://eref.thieme.de/ebooks/cs\\_11350838#/ebook\\_cs\\_11350838\\_SL7659867\\_2](https://eref.thieme.de/ebooks/cs_11350838#/ebook_cs_11350838_SL7659867_2)
16. Lüllmann-Rauch R AE. *Taschenlehrbuch Histologie*. 6 ed. Georg Thieme Verlag; 2019. Accessed 08.06.2022. [https://eref.thieme.de/ebooks/2444813#/ebook\\_2444813\\_SL91304781](https://eref.thieme.de/ebooks/2444813#/ebook_2444813_SL91304781)
17. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. Dec 15 2010;127(12):2893-917. doi:10.1002/ijc.25516
18. Skeldon SC, Semotiuk K, Aronson M, et al. Patients with Lynch syndrome mismatch repair gene mutations are at higher risk for not only upper tract urothelial cancer but also bladder cancer. *Eur Urol*. Feb 2013;63(2):379-85. doi:10.1016/j.eururo.2012.07.047
19. Fairchild WV, Spence CR, Solomon HD, Gangai MP. The incidence of bladder cancer after cyclophosphamide therapy. *J Urol*. Aug 1979;122(2):163-4. doi:10.1016/s0022-5347(17)56306-5
20. Brennan P, Bogillot O, Cordier S, et al. Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. *Int J Cancer*. Apr 15 2000;86(2):289-94. doi:10.1002/(sici)1097-0215(20000415)86:2<289::aid-ijc21>3.0.co;2-m
21. Brennan P, Bogillot O, Greiser E, et al. The contribution of cigarette smoking to bladder cancer in women (pooled European data). *Cancer Causes Control*. Jun 2001;12(5):411-7. doi:10.1023/a:1011214222810
22. Kantor AF, Hartge P, Hoover RN, Narayana AS, Sullivan JW, Fraumeni JF, Jr. Urinary tract infection and risk of bladder cancer. *Am J Epidemiol*. Apr 1984;119(4):510-5. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a113768
23. Abol-Enein H. Infection: is it a cause of bladder cancer? *Scand J Urol Nephrol Suppl*. Sep 2008;(218):79-84. doi:10.1080/03008880802325309
24. Boice JD, Jr., Day NE, Andersen A, et al. Second cancers following radiation treatment for cervical cancer. An international collaboration among cancer registries. *J Natl Cancer Inst*. May 1985;74(5):955-75.
25. Reulen RC, Kellen E, Buntinx F, Brinkman M, Zeegers MP. A meta-analysis on the association between bladder cancer and occupation. *Scand J Urol Nephrol Suppl*. Sep 2008;(218):64-78. doi:10.1080/03008880802325192
26. Bosetti C, Boffetta P, La Vecchia C. Occupational exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons, and respiratory and urinary tract cancers: a quantitative review to 2005. *Ann Oncol*. Mar 2007;18(3):431-46. doi:10.1093/annonc/mdl172
27. Brinkman M, Zeegers MP. Nutrition, total fluid and bladder cancer. *Scand J Urol Nephrol Suppl*. Sep 2008;(218):25-36. doi:10.1080/03008880802285073
28. Zhou Y, Tian C, Jia C. A dose-response meta-analysis of coffee consumption and bladder cancer. *Prev Med*. Jul 2012;55(1):14-22. doi:10.1016/j.ypmed.2012.04.020

29. Davis R, Jones JS, Barocas DA, et al. Diagnosis, evaluation and follow-up of asymptomatic microhematuria (AMH) in adults: AUA guideline. *J Urol*. Dec 2012;188(6 Suppl):2473-81. doi:10.1016/j.juro.2012.09.078
30. Steiner H, Bergmeister M, Verdorfer I, et al. Early results of bladder-cancer screening in a high-risk population of heavy smokers. *BJU Int*. Aug 2008;102(3):291-6. doi:10.1111/j.1464-410X.2008.07596.x
31. Turco P, Houssami N, Bulgaresi P, et al. Is conventional urinary cytology still reliable for diagnosis of primary bladder carcinoma? Accuracy based on data linkage of a consecutive clinical series and cancer registry. *Acta Cytol*. 2011;55(2):193-6. doi:10.1159/000320861
32. Pu XY, Wang ZP, Chen YR, Wang XH, Wu YL, Wang HP. The value of combined use of survivin, cytokeratin 20 and mucin 7 mRNA for bladder cancer detection in voided urine. *J Cancer Res Clin Oncol*. Jun 2008;134(6):659-65. doi:10.1007/s00432-007-0331-9
33. Guo B, Luo C, Xun C, Xie J, Wu X, Pu J. Quantitative detection of cytokeratin 20 mRNA in urine samples as diagnostic tools for bladder cancer by real-time PCR. *Exp Oncol*. Mar 2009;31(1):43-7.
34. Gkialas I, Papadopoulos G, Iordanidou L, et al. Evaluation of urine tumor-associated trypsin inhibitor, CYFRA 21-1, and urinary bladder cancer antigen for detection of high-grade bladder carcinoma. *Urology*. Nov 2008;72(5):1159-63. doi:10.1016/j.urology.2008.04.009
35. Srivastava R, Arora VK, Aggarwal S, Bhatia A, Singh N, Agrawal V. Cytokeratin-20 immunocytochemistry in voided urine cytology and its comparison with nuclear matrix protein-22 and urine cytology in the detection of urothelial carcinoma. *Diagn Cytopathol*. Sep 2012;40(9):755-9. doi:10.1002/dc.21617
36. Eissa S, Swellam M, Amin A, Balbaa ME, Yacout GA, El-Zayat TM. The clinical relevance of urine-based markers for diagnosis of bladder cancer. *Med Oncol*. Jun 2011;28(2):513-8. doi:10.1007/s12032-010-9422-6
37. Grossman HB, Messing E, Soloway M, et al. Detection of bladder cancer using a point-of-care proteomic assay. *Jama*. Feb 16 2005;293(7):810-6. doi:10.1001/jama.293.7.810
38. Huber S, Schwentner C, Taeger D, et al. Nuclear matrix protein-22: a prospective evaluation in a population at risk for bladder cancer. Results from the UroScreen study. *BJU Int*. Sep 2012;110(5):699-708. doi:10.1111/j.1464-410X.2011.10883.x
39. Pesch B, Taeger D, Johnen G, et al. Screening for bladder cancer with urinary tumor markers in chemical workers with exposure to aromatic amines. *Int Arch Occup Environ Health*. 2014;87(7):715-24. doi:10.1007/s00420-013-0916-3
40. Lotan Y, Capitanio U, Shariat SF, Hutterer GC, Karakiewicz PI. Impact of clinical factors, including a point-of-care nuclear matrix protein-22 assay and cytology, on bladder cancer detection. *BJU Int*. May 2009;103(10):1368-74. doi:10.1111/j.1464-410X.2009.08360.x
41. Lotan Y, Elias K, Svatek RS, et al. Bladder cancer screening in a high risk asymptomatic population using a point of care urine based protein tumor marker. *J Urol*. Jul 2009;182(1):52-7; discussion 58. doi:10.1016/j.juro.2009.02.142

42. Bangma CH, Loeb S, Busstra M, et al. Outcomes of a bladder cancer screening program using home hematuria testing and molecular markers. *Eur Urol.* Jul 2013;64(1):41-7. doi:10.1016/j.eururo.2013.02.036
43. Bonberg N, Taeger D, Gawrych K, et al. Chromosomal instability and bladder cancer: the UroVysion(TM) test in the UroScreen study. *BJU Int.* Aug 2013;112(4):E372-82. doi:10.1111/j.1464-410X.2012.11666.x
44. Dimashkieh H, Wolff DJ, Smith TM, Houser PM, Nietert PJ, Yang J. Evaluation of urovysion and cytology for bladder cancer detection: a study of 1835 paired urine samples with clinical and histologic correlation. *Cancer Cytopathol.* Oct 2013;121(10):591-7. doi:10.1002/cncy.21327
45. Goodison S, Rosser CJ, Urquidi V. Bladder cancer detection and monitoring: assessment of urine- and blood-based marker tests. *Mol Diagn Ther.* Apr 2013;17(2):71-84. doi:10.1007/s40291-013-0023-x
46. Miyake M, Goodison S, Rizwani W, Ross S, Bart Grossman H, Rosser CJ. Urinary BTA: indicator of bladder cancer or of hematuria. *World J Urol.* Dec 2012;30(6):869-73. doi:10.1007/s00345-012-0935-9
47. Wadhwa N, Jatava SK, Tiwari A. Non-invasive urine based tests for the detection of bladder cancer. *J Clin Pathol.* Nov 2012;65(11):970-5. doi:10.1136/jclinpath-2012-200812
48. Vrooman OP, Witjes JA. Urinary markers in bladder cancer. *Eur Urol.* May 2008;53(5):909-16. doi:10.1016/j.eururo.2007.12.006
49. Filbeck T, Pichlmeier U, Knuechel R, Wieland WF, Roessler W. Do patients profit from 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence diagnosis in transurethral resection of bladder carcinoma? *Urology.* Dec 2002;60(6):1025-8. doi:10.1016/s0090-4295(02)01961-1
50. Jocham D, Stepp H, Waidelich R. Photodynamic diagnosis in urology: state-of-the-art. *Eur Urol.* Jun 2008;53(6):1138-48. doi:10.1016/j.eururo.2007.11.048
51. Lee R, Droller MJ. The natural history of bladder cancer. Implications for therapy. *Urol Clin North Am.* Feb 2000;27(1):1-13, vii. doi:10.1016/s0094-0143(05)70229-9
52. Kamoun A, de Reyniès A, Allory Y, et al. A Consensus Molecular Classification of Muscle-invasive Bladder Cancer. *European Urology.* 2020/04/01/ 2020;77(4):420-433. doi:<https://doi.org/10.1016/j.eururo.2019.09.006>
53. Mannheim U. Operation: TUR-Blase bei Harnblasenkrebs. Accessed 30.05, 2024. [https://www.umm.de/uro-onkologisches-zentrum/leistungsspektrum/harnblasenkrebs/harnblasenkrebs-tur-blase/#:~:text=Die%20TUR%20DB%20\(TUR%2D,Tiefe%20der%20Harnblasen%2D%20oder%20Harnr%C3%B6hrenwand.](https://www.umm.de/uro-onkologisches-zentrum/leistungsspektrum/harnblasenkrebs/harnblasenkrebs-tur-blase/#:~:text=Die%20TUR%20DB%20(TUR%2D,Tiefe%20der%20Harnblasen%2D%20oder%20Harnr%C3%B6hrenwand.)
54. Klinikum-Uni-München. Die Transurethrale Resektion der Harnblase (TUR-B). Accessed 23.06, 2022. [http://www.klinikum.uni-muenchen.de/Blasentumorzentrum/de/Therapie/Therapie\\_nicht\\_invasiv/TURB/index.html](http://www.klinikum.uni-muenchen.de/Blasentumorzentrum/de/Therapie/Therapie_nicht_invasiv/TURB/index.html)
55. Schips L, Augustin H, Zigeuner RE, et al. Is repeated transurethral resection justified in patients with newly diagnosed superficial bladder cancer? *Urology.* Feb 2002;59(2):220-3. doi:10.1016/s0090-4295(01)01522-9

56. Vianello A, Costantini E, Del Zingaro M, Bini V, Herr HW, Porena M. Repeated white light transurethral resection of the bladder in nonmuscle-invasive urothelial bladder cancers: systematic review and meta-analysis. *J Endourol*. Nov 2011;25(11):1703-12. doi:10.1089/end.2011.0081
57. Sivalingam S, Probert JL, Schwaibold H. The role of repeat transurethral resection in the management of high-risk superficial transitional cell bladder cancer. *BJU Int*. Oct 2005;96(6):759-62. doi:10.1111/j.1464-410X.2005.05710.x
58. Oswald D, Pallauf M, Herrmann TRW, et al. [Transurethral resection of bladder tumors (TURBT)]. *Urologe A*. Jan 2022;61(1):71-82. Transurethrale Resektion von Blasentumoren (TUR-B). doi:10.1007/s00120-021-01741-z
59. Cumberbatch MGK, Foerster B, Catto JWF, et al. Repeat Transurethral Resection in Non-muscle-invasive Bladder Cancer: A Systematic Review. *European Urology*. 2018/06/01/ 2018;73(6):925-933. doi:<https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.02.014>
60. Babjuk M, Burger M, Compérat EM, et al. European Association of Urology Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (TaT1 and Carcinoma In Situ) - 2019 Update. *European Urology*. 2019/11/01/ 2019;76(5):639-657. doi:<https://doi.org/10.1016/j.eururo.2019.08.016>
61. Guidelines E. Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer. European Association of Urology. Accessed 20.06., 2024. <https://uroweb.org/guidelines/muscle-invasive-and-metastatic-bladder-cancer/chapter/introduction>
62. Stein JP, Skinner DG. Surgical atlas. Radical cystectomy. *BJU Int*. Jul 2004;94(1):197-221. doi:10.1111/j.1464-410X.2004.04981.x
63. Uro-Tuebingen. Die da Vinci Zystektomie. Accessed 23.06.2022, <https://uro-tuebingen.de/leistungsspektrum/harnblase/tumore-der-harnblase/therapie/da-vinci-zystektomie.html>
64. Bochner BH, Dalbagni G, Sjoberg DD, et al. Comparing Open Radical Cystectomy and Robot-assisted Laparoscopic Radical Cystectomy: A Randomized Clinical Trial. *Eur Urol*. Jun 2015;67(6):1042-1050. doi:10.1016/j.eururo.2014.11.043
65. Khan MS, Gan C, Ahmed K, et al. A Single-centre Early Phase Randomised Controlled Three-arm Trial of Open, Robotic, and Laparoscopic Radical Cystectomy (CORAL). *Eur Urol*. Apr 2016;69(4):613-621. doi:10.1016/j.eururo.2015.07.038
66. Albisinni S, Oderda M, Fossion L, et al. The morbidity of laparoscopic radical cystectomy: analysis of postoperative complications in a multicenter cohort by the European Association of Urology (EAU)-Section of Uro-Technology. *World J Urol*. Feb 2016;34(2):149-56. doi:10.1007/s00345-015-1633-1
67. de Souza N. Organoids. *Nature Methods*. 2018/01/01 2018;15(1):23-23. doi:10.1038/nmeth.4576
68. Drost J, Clevers H. Organoids in cancer research. *Nature Reviews Cancer*. 2018/07/01 2018;18(7):407-418. doi:10.1038/s41568-018-0007-6
69. Weiswald L-B, Bellet D, Dangles-Marie V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia*. 2015;17(1):1-15.

70. Medle B, Sjö Dahl G, Eriksson P, Liedberg F, Höglund M, Bernardo C. Patient-Derived Bladder Cancer Organoid Models in Tumor Biology and Drug Testing: A Systematic Review. *Cancers*. 2022;14(9):2062.
71. Matano M, Date S, Shimokawa M, et al. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nat Med*. Mar 2015;21(3):256-62. doi:10.1038/nm.3802
72. Huch M, Koo B-K. Modeling mouse and human development using organoid cultures. *Development*. 2015;142(18):3113-3125.
73. Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science*. 2014;345(6194):1247125.
74. Pauli C, Hopkins BD, Prandi D, et al. Personalized In Vitro and In Vivo Cancer Models to Guide Precision Medicine. *Cancer Discovery*. 2017;7(5):462-477. doi:10.1158/2159-8290.Cd-16-1154
75. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(10):839-845.
76. Baker BM, Chen CS. Deconstructing the third dimension—how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *Journal of cell science*. 2012;125(13):3015-3024.
77. Systems R. Cultrex Basement Membrane Extract (BME) and Extracellular Matrices (ECM). Accessed 28.01., 2023. <https://www.rndsystems.com/products/cultrex-basement-membrane-extract-bme-and-extracellular-matrices-ecm>
78. Corning. Corning® Matrigel® Matrix. Accessed 28.01., 2023. <https://www.corning.com/emea/de/products/life-sciences/products/surfaces/matrigel-matrix.html>
79. Bentivegna A, Conconi D, Panzeri E, et al. Biological heterogeneity of putative bladder cancer stem-like cell populations from human bladder transitional cell carcinoma samples. *Cancer Science*. 2010;101(2):416-424. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01414.x>
80. Ooki A, VandenBussche CJ, Kates M, et al. CD24 regulates cancer stem cell (CSC)-like traits and a panel of CSC-related molecules serves as a non-invasive urinary biomarker for the detection of bladder cancer. *British journal of cancer*. 2018;119(8):961-970.
81. Yoshida T, Okuyama H, Nakayama M, et al. High-dose chemotherapeutics of intravesical chemotherapy rapidly induce mitochondrial dysfunction in bladder cancer-derived spheroids. *Cancer science*. 2015;106(1):69-77.
82. Kita Y, Hamada A, Saito R, et al. Systematic chemical screening identifies disulfiram as a repurposed drug that enhances sensitivity to cisplatin in bladder cancer: a summary of preclinical studies. *British Journal of Cancer*. 2019;121(12):1027-1038.
83. Hofner T, Macher-Goepfing S, Klein C, et al. Development and characteristics of preclinical experimental models for the research of rare neuroendocrine bladder cancer. *The Journal of urology*. 2013;190(6):2263-2270.
84. Yoon WH, Lee H-R, Kim S, et al. Use of inkjet-printed single cells to quantify intratumoral heterogeneity. *Biofabrication*. 2020;12(3):035030.

85. Kim E, Choi S, Kang B, et al. Creation of bladder assembloids mimicking tissue regeneration and cancer. *Nature*. 2020;588(7839):664-669. doi:10.1038/s41586-020-3034-x
86. Yu L, Li Z, Mei H, et al. Patient-derived organoids of bladder cancer recapitulate antigen expression profiles and serve as a personal evaluation model for CAR-T cells in vitro. *Clinical & translational immunology*. 2021;10(2):e1248.
87. Minoli M, Cantore T, Kiener M, et al. Bladder cancer organoids as a functional system to model different disease stages and therapy response. *bioRxiv*. 2022:2022.03.31.486514. doi:10.1101/2022.03.31.486514
88. Hung MC, Lau YK. Basic science of HER-2/neu: a review. *Semin Oncol*. 1999/08// 1999;26(4 Suppl 12):51-59.
89. Kiselyov A, Bunimovich-Mendrazitsky S, Startsev V. Key signaling pathways in the muscle-invasive bladder carcinoma: Clinical markers for disease modeling and optimized treatment. *International Journal of Cancer*. 2016;138(11):2562-2569. doi:<https://doi.org/10.1002/ijc.29918>
90. Choi W, Porten S, Kim S, et al. Identification of Distinct Basal and Luminal Subtypes of Muscle-Invasive Bladder Cancer with Different Sensitivities to Frontline Chemotherapy. *Cancer Cell*. 2014/02/10/ 2014;25(2):152-165. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.01.009>
91. Lim SC. CD24 and human carcinoma: tumor biological aspects. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2005/10/01/ 2005;59:S351-S354. doi:[https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(05\)80076-9](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(05)80076-9)
92. Overdevest JB, Knubel KH, Duex JE, et al. CD24 expression is important in male urothelial tumorigenesis and metastasis in mice and is androgen regulated. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(51):E3588-E3596.
93. Hofner T, Macher-Goeppinger S, Klein C, et al. Expression and prognostic significance of cancer stem cell markers CD24 and CD44 in urothelial bladder cancer xenografts and patients undergoing radical cystectomy. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2014/07/01/ 2014;32(5):678-686. doi:<https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2014.01.001>
94. Marcinkiewicz K, Scotland KB, Boorjian SA, et al. The androgen receptor and stem cell pathways in prostate and bladder cancers (Review). *Int J Oncol*. 2012/01/01 2012;40(1):5-12. doi:10.3892/ijo.2011.1212
95. Brown EJ, Frazier WA. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends in Cell Biology*. 2001/03/01/ 2001;11(3):130-135. doi:[https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(00\)01906-1](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(00)01906-1)
96. Abugomaa A, Elbadawy M, Yamawaki H, Usui T, Sasaki K. Emerging Roles of Cancer Stem Cells in Bladder Cancer Progression, Tumorigenesis, and Resistance to Chemotherapy: A Potential Therapeutic Target for Bladder Cancer. *Cells*. 2020;9(1):235.
97. Kythreotou A, Siddique A, Mauri FA, Bower M, Pinato DJ. PD-L1. *Journal of Clinical Pathology*. 2018;71(3):189. doi:10.1136/jclinpath-2017-204853
98. Powles T, Eder JP, Fine GD, et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature*. 2014/11/01 2014;515(7528):558-562. doi:10.1038/nature13904

99. Hayashi T, Fujita K, Hayashi Y, et al. Mutational Landscape and Environmental Effects in Bladder Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(17):6072.
100. Liu S, Liang J, Liu Z, et al. The Role of CD276 in Cancers. Review. *Frontiers in Oncology*. 2021-March-26 2021;11doi:10.3389/fonc.2021.654684
101. Aquila L, Ohm J, Woloszynska-Read A. The role of STAG2 in bladder cancer. *Pharmacological Research*. 2018/05/01/ 2018;131:143-149. doi:<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.02.025>
102. Solomon DA, Kim J-S, Bondaruk J, et al. Frequent truncating mutations of STAG2 in bladder cancer. *Nature Genetics*. 2013/12/01 2013;45(12):1428-1430. doi:10.1038/ng.2800
103. Hurst CD, Knowles MA. Mutational landscape of non-muscle-invasive bladder cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2022/07/01/ 2022;40(7):295-303. doi:<https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2018.10.015>
104. Hayashi Y, Fujita K, Matsuzaki K, et al. Clinical Significance of Hotspot Mutation Analysis of Urinary Cell-Free DNA in Urothelial Bladder Cancer. Original Research. *Frontiers in Oncology*. 2020;10
105. Oxford G, Theodorescu DAN. Review Article: The Role of Ras Superfamily Proteins in Bladder Cancer Progression. *The Journal of Urology*. 2003/11/01/ 2003;170(5):1987-1993. doi:<https://doi.org/10.1097/01.ju.0000088670.02905.78>
106. Font A, Taron M, Gago JL, et al. BRCA1 mRNA expression and outcome to neoadjuvant cisplatin-based chemotherapy in bladder cancer. *Annals of Oncology*. 2011/01/01/ 2011;22(1):139-144. doi:<https://doi.org/10.1093/annonc/mdq333>
107. Guo Y, Chekaluk Y, Zhang J, et al. TSC1 involvement in bladder cancer: diverse effects and therapeutic implications. *The Journal of Pathology*. 2013;230(1):17-27. doi:<https://doi.org/10.1002/path.4176>
108. Woodford MR, Hughes M, Sager RA, et al. Mutation of the co-chaperone Tsc1 in bladder cancer diminishes Hsp90 acetylation and reduces drug sensitivity and selectivity. *Oncotarget*. Oct 8 2019;10(56):5824-5834. doi:10.18632/oncotarget.27217
109. Knowles MA, Platt FM, Ross RL, Hurst CD. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway activation in bladder cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2009/12/01 2009;28(3):305-316. doi:10.1007/s10555-009-9198-3
110. Osei-Amponsa V, Buckwalter JM, Shuman L, et al. Hypermethylation of FOXA1 and allelic loss of PTEN drive squamous differentiation and promote heterogeneity in bladder cancer. *Oncogene*. 2020/02/01 2020;39(6):1302-1317. doi:10.1038/s41388-019-1063-4
111. La Paglia L, Listì A, Caruso S, et al. Potential Role of ANGPTL4 in the Cross Talk between Metabolism and Cancer through PPAR Signaling Pathway. *PPAR Research*. 2017/01/15 2017;2017:8187235. doi:10.1155/2017/8187235
112. Hsieh HY, Jou YC, Tung CL, et al. Epigenetic silencing of the dual-role signal mediator, ANGPTL4 in tumor tissues and its overexpression in the urothelial carcinoma microenvironment. *Oncogene*. 2018/02/01 2018;37(5):673-686. doi:10.1038/onc.2017.375
113. Cai Y-C, Yang H, Wang K-F, Chen T-H, Jiang W-Q, Shi Y-X. ANGPTL4 overexpression inhibits tumor cell adhesion and migration and predicts favorable

- prognosis of triple-negative breast cancer. *BMC Cancer*. 2020/09/14 2020;20(1):878. doi:10.1186/s12885-020-07343-w
114. Galaup A, Cazes A, Le Jan S, et al. Angiopoietin-like 4 prevents metastasis through inhibition of vascular permeability and tumor cell motility and invasiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(49):18721-18726. doi:doi:10.1073/pnas.0609025103
115. Walz S, Pollehne P, Vollmer P, et al. Effects of Scaffolds on Urine- and Urothelial Carcinoma Tissue-Derived Organoids from Bladder Cancer Patients. *Cells*. 2023;12(16):2108.
116. Vollmer P, Amend B, Harland N, et al. Patient-derived bladder cancer organoids show stable transcript expression along cultivation. *World Journal of Urology*. 2024/08/07 2024;42(1):468. doi:10.1007/s00345-024-05182-z
117. Okamoto T, Okabe S. Ultraviolet absorbance at 260 and 280 nm in RNA measurement is dependent on measurement solution. *Int J Mol Med*. 2000/06/01 2000;5(6):657-666. doi:10.3892/ijmm.5.6.657
118. Kaijanen L, Paakkunainen M, Pietarinen S, Jernström E, Reinikainen S-P. Ultraviolet Detection of Monosaccharides: Multiple Wavelength Strategy to Evaluate Results after Capillary Zone Electrophoretic Separation. *International Journal of Electrochemical Science*. 2015/04/01/ 2015;10(4):2950-2961. doi:[https://doi.org/10.1016/S1452-3981\(23\)06510-0](https://doi.org/10.1016/S1452-3981(23)06510-0)
119. Da Silva L, Bray JK, Bulut G, Jiang J, Schmittgen TD. Method for improved integrity of RNA isolated from Matrigel cultures. *MethodsX*. 2020/01/01/ 2020;7:100966. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.100966>
120. BIOMEDICALS U. GrowDex®- the natural hydrogel for 3D cell culture. Accessed 28.01., 2023. <https://www.upmbiomedicals.com/products/life-science/growdex/>
121. Mimler T. Smooth muscle cells and endothelial cells: Comparative study of 3D culture in GrowDex® & Matrigel™. Accessed 23.01., 2023. <https://www.upmbiomedicals.com/resource-center/application-notes/smooth-muscle-cells-and-endothelial-cells-comparative-study-of-3d-culture-in-growdex--matrigel/>
122. Aisenbrey EA, Murphy WL. Synthetic alternatives to Matrigel. *Nature Reviews Materials*. 2020/07/01 2020;5(7):539-551. doi:10.1038/s41578-020-0199-8
123. Pollehne P. *Etablierung von Organoiden aus Zellen des Spülurins von Patientinnen und Patienten mit Blasen Tumoren*. Eberhard Karls Universität Tübingen; 2023. <http://dx.doi.org/10.15496/publikation-90218>
124. Uribe ML, Marrocco I, Yarden Y. EGFR in Cancer: Signaling Mechanisms, Drugs, and Acquired Resistance. *Cancers*. 2021;13(11):2748. doi:10.3390/cancers13112748
125. Minoli M, Cantore T, Hanhart D, et al. Bladder cancer organoids as a functional system to model different disease stages and therapy response. *Nature Communications*. 2023/04/18 2023;14(1):2214. doi:10.1038/s41467-023-37696-2

## **7 Erklärung zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde in der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung von PD Dr. med. Bastian Amend gemeinsam mit Prof. Dr. rer. nat. Wilhelm K. Aicher durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte im Rahmen des Graduiertenkollegs 2543 – Intraoperative multisensorische Gewebedifferenzierung in der Onkologie – Projektteil C1b durch Prof. Dr. med. Dr. h.c. Arnulf Stenzl, ehem. stellvertretender Sprecher des Graduiertenkollegs, in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. rer. nat. Wilhelm K. Aicher, Laborleiter, PD Dr. med. Bastian Amend, habilitierter Betreuer, und Dr. med. Simon Walz, Clinical Scientist.

Sämtliche Versuche wurden, wenn nicht nachfolgend anders angegeben, nach Einarbeitung durch Tanja Abruzzese, MTA und Markus Kühs, MTA von mir eigenständig durchgeführt. Für die RNA-Isolierung der Proben für die differential gene expression wurde das Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik Tübingen beauftragt. Die anschließende Durchführung der differential gene expression erfolgte in Absprache mit mir, Prof. Dr. Wilhelm K. Aicher und Dr. Simon Walz durch das Zentrum für Quantitative Biologie (QBiC) Tübingen. Die Interpretation der Daten aus der differential gene expression erfolgte durch mich.

Die Verantwortlichen zur Etablierung der jeweiligen Methoden wurden am Anfang der Methodenbeschreibung erwähnt.

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

Tübingen, den 19.08.2024

Philipp Vollmer

## 8 Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden in zwei Originalarbeiten publiziert.

- **Vollmer P**, Amend B, Harland N, Stenzl A, Tsauro I, Maas M, Aicher WK, Walz S. Patient-derived bladder cancer organoids show stable transcript expression along cultivation. *World J Urol* 42, 468 (2024).  
<https://doi.org/10.1007/s00345-024-05182-z>.
- Walz S, Pollehne P, **Vollmer P**, Aicher WK, Stenzl A, Harland N, Amend B. Effects of Scaffolds on Urine- and Urothelial Carcinoma Tissue-Derived Organoids from Bladder Cancer Patients. *Cells*. 2023; 12(16):2108. <https://doi.org/10.3390/cells12162108>.

Zusätzlich wurden Auszüge dieser Arbeit auf dem 75. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie (2023) in Form von 3 Beiträgen präsentiert.

- **P. Vollmer**, B. Amend, W.K. Aicher, A. Stenzl, N. Harland, S. Walz  
V06-01 Primäre Blasentumororganoide zeigen stabile Transkriptexpression relevanter Gene im zeitlichen Verlauf der Kultivierung.
- S. Walz, **P. Vollmer**, B. Amend, A. Stenzl, I.A. Montes Mojarro, M. Granai, F. Fend, W.K. Aicher, N. Harland  
V09-01 Neoadjuvante Chemotherapie korreliert mit einer verminderter Kultivierungseffizienz von Blasentumororganoiden.
- N. Rödiger, **P. Vollmer**, B. Amend, M. Granai, F. Fend, A. Stenzl, W.K. Aicher, N. Harland, S. Walz  
V35-01 Expression von Nectin-4 und Trop-2 in Blasentumororganoiden – Vergleichbarkeit zum Originaltumor und Veränderungen des Expressionsmusters in der Langzeitkultur

## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst bei allen von Blasenkrebs betroffenen Patienten bedanken, ohne deren Einverständnis zur Nutzung der bereitgestellten Gewebeproben meine und weitere Organoidforschung nicht möglich gewesen wäre.

Des Weiteren geht mein Dank an die Deutsche Forschungsgemeinschaft, die mit ihrer Förderung des Graduiertenkollegs 2543 die Grundlage für diese Arbeit geschaffen hat. Auch möchte ich mich bei allen Beteiligten des Graduiertenkollegs für den interdisziplinären Austausch bedanken.

Ich danke PD Dr. Bastian Amend als habilitierter Betreuer und erster Gutachter für seine Betreuung und Begleitung meiner Arbeit. Außerdem danke ich Prof. Dr. Dr. Stenzl für die Möglichkeit der Promotion in seiner Abteilung.

Mein besonderer Dank geht an Dr. Simon Walz, welcher mich mehrere Jahre als Clinical Scientist im und auch nach dem Projekt begleitet hat und mir für meine zahlreichen Fragen jederzeit mit Rat und Geduld zur Seite stand.

Auch möchte ich mich bei Prof. Dr. Wilhelm K. Aicher ausdrücklich bedanken, der als Laborleiter tagtäglich die Fortschritte meiner Forschung begleitete und meinen Fragen mit Zeit und einem guten Rat entgegnete und welcher auch nach der Laborzeit mich bei der Anfertigung von Publikationen und dieser Arbeit unterstützte.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei meinen Labormitarbeitern Tanja Abruzzese und Markus Kühs, welche mich in sämtliche Laborpraktiken eingearbeitet haben und mich auch fachlich jederzeit unterstützten, sowie bei Viktoria Kramer, Cornelia Bock und Jasmin Knoll.

Danken möchte ich auch meinen Mitdoktoranden Lea Fundel, Nina Rödiger und Jonas Goß, die mir eine unvergesslich schöne Zeit im Labor bereitet haben.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern, Großeltern, meinem Bruder und meiner Freundin für die allgegenwärtige Unterstützung bedanken, ohne welche ich nicht da stehen würde, wo ich heute bin.