

Aus der
Universitätsklinik für Urologie Tübingen

**Etablierung und zytostatische Behandlung von
patientengenerierten Organoiden von Urothelkarzinomen**

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

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

**vorgelegt von
Schwaibold, Leander David
2025**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. T. Todenhöfer

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. C. Bösmüller

Tag der Disputation: 05.05.2025

Widmung

Meinen Eltern Hartwig und Irina Schwaibold, ohne deren kompromisslose Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	8
1.1 Das Harnblasenkarzinom	9
1.1.1 Karzinomentstehung und histologische Subtypen	9
1.1.2 Klassifikation	9
1.1.2.1 WHO-Klassifikation von 2016.....	10
1.1.2.2 TNM-Klassifikation	10
1.1.3 Epidemiologie	14
1.1.4 Risikofaktoren.....	16
1.1.5 Klinische Symptomatik	17
1.1.6 Diagnostik.....	18
1.1.7 Therapie.....	19
1.1.7.1 Therapie des nicht-muskelinvasiven Urothelkarzinoms	19
1.1.7.2 Therapie des muskelinvasiven Urothelkarzinoms.....	20
1.2 Organoide	27
1.2.1 Einführung Organoide	27
1.2.2 Grundlagen und Limitationen von Zellkultur.....	27
1.2.3 Definition und Vorteile von Organoiden	28
1.2.4 Basalmembranartige Matrix.....	30
1.3 Medikamentenuntersuchungen	31
1.3.1 Cisplatin – Wirkmechanismus und Resistenzen	31
1.4 Der programmierte Zelltod (Apoptose)	33
1.4.1 Grundlagen der Apoptose und die Rolle der Caspasen	33
1.4.1.1 Die Rolle der Bcl-2 Familie im intrinsischen Pfad der Apoptose	34
1.4.2 BH3-Mimetika (Venetoclax und S63845).....	37
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	39
2 Material und Methoden.....	41
2.1 Material	41
2.1.1 Computerprogramme.....	41

2.1.2	Geräte	42
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	43
2.1.4	Zusätze und Chemikalien	44
2.1.5	Enzyme	45
2.1.6	Medikamente	45
2.1.7	Zellkulturmedien	46
2.2	Methoden	47
2.2.1	Humanes Urothelkarzinom Gewebe (Patientenkollektiv)	47
2.2.1.1	Probentransport – Transurethrale Resektion der Blase (TUR-B)	47
2.2.1.2	Probentransport – Zystektomie (Cx) und Nephroureterektomie (Nux)	47
2.2.2	Zellkultur-Methoden	48
2.2.2.1	Hergestellte Medien	48
2.2.2.1.1	Aktivkohle behandeltes Serum	48
2.2.2.1.2	Nährmedium (HCM+5% csFBS (+Y-27632))	49
2.2.2.1.3	Transport- und Arbeitsmedium (RPMI + 10 % FBS + 1% P/S)	49
2.2.2.1.4	Gefriermedium	49
2.2.2.2	Vitalitätsbestimmung und Zellzählung	50
2.2.2.3	Kryokonservierung	50
2.2.3	Probenaufarbeitung und Organoidkultur	51
2.2.3.1	Herstellung von Urothelkarzinomorganoiden	51
2.2.3.2	Passagieren	53
2.2.4	Zytotoxizitätsanalysen	54
2.2.4.1	Bestimmung der Zellviabilität	56
2.2.5	Statistische Auswertung	56
3	Ergebnisse	58
3.1	Patientenmaterial	58
3.2	Beschreibung des Patientenkollektivs	59
3.3	Erfolgsraten der unterschiedlichen Präparattypen	59
3.4	Einfluss der Patientendaten auf das Organoidwachstum	60
3.4.1	Einfluss des Geschlechts auf das Organoidwachstum	61
3.4.2	Einfluss des <i>Gradings</i> des Primärtumors auf das Organoidwachstum	61
3.4.3	Einfluss der Invasivität des Primärtumors auf das Organoidwachstum	62
3.4.4	Einfluss des Rezidivstatus auf das Organoidwachstum	63

3.5	Wachstumsverhalten der erfolgreichen Organoidkulturen.....	65
3.6	Etablierung einer Organoidlinie.....	69
3.7	Zytotoxizitätsanalyse	77
4	<i>Diskussion</i>	82
4.1	Organoidetablierung.....	82
4.1.1	Methodik der Organoidetablierung:	82
4.1.2	Erfolgsrate	84
4.2	Operationsverfahren und Präparattypen.....	87
4.3	Organoidlinie aus Urothelkarzinomen des oberen Harntrakts	89
4.4	Medikamententests	91
4.5	Limitationen der Organoidforschung.....	93
5	<i>Zusammenfassung</i>	95
6	<i>Literaturverzeichnis:</i>	97
7	<i>Erklärung zum Eigenanteil</i>	106
8	<i>Danksagung</i>	107

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1 TNM-Klassifikation des Urothelkarzinoms.	11
Abbildung 2 Graphische Darstellungen unterschiedlicher Resistenzmechanismen von Tumorzellen gegenüber Cisplatin.....	32
Abbildung 3 Bcl-2 Proteinfamilie & intrinsischer Apoptose-Signalweg.....	35
Abbildung 4 Herstellung von Urothelkarzinomorganoiden aus Operationsmaterial. ...	51
Abbildung 5 Querschnitt Matrigelkuppel mit Organoiden.	52
Abbildung 6: Vergleich der Organoidanzahl von <i>BCO#70</i> (A) und <i>BCO#80</i> (B) am 9. und 10. Kulturtag.....	65
Abbildung 7: Größenvergleich von drei verschiedenen Organoidkulturen (<i>BCO#37</i> (A;B), <i>BCO#31</i> (C;D) und <i>RTO#8</i> (E;F)	67
Abbildung 8 Tumorpräparat <i>BCO#56</i>	69
Abbildung 9 <i>BCO#56</i> Wachstum Tag 2 – 19: Tag 2 (A), Tag 14 (B, C), Tag 19 (D)..	70
Abbildung 10 <i>BCO#56</i> Wachstum Tag 33 – 48: Tag 33 (A, B), Tag 48 (C, D, E, F)..	72
Abbildung 11 <i>BCO#56SI</i> Wachstum Tag 2 - 10: Tag 2 (A, B), Tag 9 (C, D), Tag 10 (E, F).....	74
Abbildung 12 <i>BCO#56SI</i> - Nahaufnahme eines Organoids	75
Abbildung 13 <i>BCO#56</i> Passage: 2 (A), 3 (B), 4 (C), 5 (D).	76
Abbildung 14: <i>BCO#56</i> - CP Monotherapie	78
Abbildung 15: <i>BCO#56</i> - VTX und S63845 Monotherapie	79
Abbildung 16: <i>BCO#56</i> – CP und CT	80

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1 TNM-Klassifikation des Urothelkarzinoms der Harnblase	12
Tabelle 2 Stadien-Einteilung nach UICC des Urothelkarzinoms der Harnblase.....	13
Tabelle 3 Verwendete Computerprogramme.....	41
Tabelle 4 Verwendete Maschinen und Geräte	42
Tabelle 5 Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	43
Tabelle 6 Verwendete Zusätze und Chemikalien	44
Tabelle 7 Verwendete Enzyme	45
Tabelle 8 Verwendete Medikamente	45
Tabelle 9 Verwendete Zellkulturmedien	46
Tabelle 10: Monotherapie Zytotoxizitätsanalyse: Verwendete Konzentration von Cisplatin (CP), Venetoclax (VTX) und S63845	55
Tabelle 11: Kombinationstherapie CP und VTX - Konzentrationen.....	56
Tabelle 12: Präparattypen und Erfolgsraten	60
Tabelle 13: Einflussfaktor Geschlecht auf die Erfolgsrate	61
Tabelle 14: Einflussfaktor Grading auf die Erfolgsrate.....	62
Tabelle 15: Einflussfaktor Invasionstiefe auf die Erfolgsrate	63
Tabelle 16: Einflussfaktor Rezidivstatus auf die Erfolgsrate	64

Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP binding cassette
ACF	Animal Component-Free
Apaf-1	Apoptotic protease-activating factor 1
ATP	Adenosintriphosphat
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BH	Bcl-2 homology
BME	Basalmembranartige Matrix
C/H	Kollagenase/Hyaluronidase
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
csFBS	Charcoal-stripped fetal bovine serum
CT	Computertomographie
Cx	Zystektomie
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
EORTC	European Organization for Research and Treatment of Cancer
EZR	Extrazellularraum
FBS	Fetal bovine serum
FDA	Food and Drug administration
HCM	Hepatocyte Complete Media
HNPCC	Hereditäres Nicht-Polypöses Colorektales Carcinom
IC50	Mittlere inhibitorische Konzentration
iPSC	Induzierte pluripotente Stammzelle
JÜL	Jahresüberleben
MDR	Multidrug-Resistance
Mio.	Millionen
mM	Millimolar
MMC	Mitomycin-C
MOM	mitochondrial outer membrane
MOMP	mitochondrial outer membrane permeabilisation
mRNA	messenger RNA
MRP	Multidrug resistance-associated protein
MRT	Magnetresonanztomographie
NCI	National Cancer Institut
Nux	Nephroureterektomie
P/S	Penicillin/Streptomycin
PD-1	Programmed cell death protein 1
PD-L1	Programmed cell death 1 ligand 1
RKI	Robert Koch-Institut
ROCK	Rho-kinase

TUR-B *Transurethrale Blasentumorresektion*
UICC..... *Union internationale contre le cancer*
UTUC *Upper Tract Urothelial Carcinoma*
VTX..... *Venetoclax*
WHO..... *Weltgesundheitsorganisation*

1 Einleitung

Die Therapie des Urothelkarzinoms stagnierte bis vor wenigen Jahren. Die medikamentösen Behandlungsstrategien der muskelinvasiven und metastasierten Entitäten beruhten seit Jahrzehnten auf der Verabreichung von Cisplatin-basierten Chemotherapien. Individualisierte Therapiestrategien haben nur spärlich Einzug in die Behandlungsstrategie gefunden. Die seit einigen Jahren etablierte Immun-Checkpoint Inhibition nimmt sich dieses Problems zwar an, resultiert jedoch lediglich in der Einteilung des Patientenkollektivs in zwei Subgruppen: Geeignet und nicht-geeignet ([Melzer et al., 2022](#)). Auf dem letztjährigen Kongress der europäischen Krebsgesellschaft wurden die Ergebnisse der randomisierten EV-302 Studie vorgestellt, die das Potential haben, die Therapie des Urothelkarzinoms zu revolutionieren. Durch den Einsatz eines sogenannten *antibody drug conjugates* – eines humanisierten monoklonalen Antikörpers gegen Nectin -4 der mittels eines *linkers* an Monomethylauristatin E (einem Mikrotubuli Hemmstoff) gebunden ist – in Kombination mit dem PD-L1 Inhibitor Pembrolizumab, gelang es, das Gesamtüberleben von Patienten mit metastasiertem/nicht operablem muskelinvasivem Urothelkarzinom in der Erstlinie nahezu zu verdoppeln ([Powles et al., 2024](#)). Allerdings ist die Toxizität dieser Therapie erheblich, so dass weiterhin spezifische Angriffspunkte für die Therapie und präklinische Plattformen zur Therapieevaluation auf individueller Basis dringend benötigt werden ([Meijer, 2021](#)). Insbesondere Urothelkarzinome des oberen Harntrakts, welche mit einer schlechteren Prognose bezüglich Gesamtüberleben assoziiert sind, bedürfen einer gesonderten Forschung ([Azizi et al., 2019](#)).

Unsere Arbeit widmet sich dieser Problematik indem versucht wurde, solch eine Plattform an der Urologischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen zu etablieren. Unser Ziel war es, Organoidkulturen aus Urothelkarzinomgewebe herzustellen, diese über einen längeren Zeitraum zu passagieren und für in-vitro-Medikamentenuntersuchungen zu verwenden. Die im Rahmen dieses Projektes untersuchten und etablierten Methoden dienen als Grundlage für zahlreiche weitere laufende interdisziplinäre Forschungsprojekte am Universitätsklinikum Tübingen.

1.1 Das Harnblasenkarzinom

1.1.1 Karzinomentstehung und histologische Subtypen

In Deutschland geht das Harnblasenkarzinom in über 94 % der Fälle aus den spezialisierten Zellen des Urotheliums hervor, weshalb in der Klinik die Bezeichnung „Urothelkarzinom“ häufig synonym verwendet wird. Weitaus seltener als Neoplasien des Urotheliums sind Plattenepithel- und Adenokarzinome, welche jeweils nur 1 % der gesamten Blasenkarzinome ausmachen, jedoch bei Frauen häufiger vorkommen als bei Männern (Kraywinkel et al., 2018). In dieser Arbeit wird, wenn nicht anders angegeben, der Begriff „Harnblasenkarzinom“ mit „Urothelkarzinom“ gleichgesetzt.

Das Urothel, auch „Übergangsepithel“ genannt, besteht aus drei Schichten von spezialisierten Epithelzellen. Die superfiziale Schicht, welche zum Lumen der Harnblase zeigt, besteht aus sogenannten Schirmzellen. Diese sind über *Tight junctions* verbunden und verhindern unter anderem die Rückresorption von Urin in tiefere Schichten der Blasenwand. Die tieferliegenden Schichten werden in Intermediärschicht und Basalzellschicht unterteilt. Durch Umstrukturierung der intermediären Schicht und Größenveränderung der Schirmzellen kann sich das Urothel an den sich ständig verändernden Füllungszustand der Harnblase anpassen (Birder et al., 2010).

Jedoch ist nicht nur die Harnblase, sondern auch das Nierenbecken, die Harnleiter und das proximale Segment der Harnröhre mit Urothel ausgekleidet, weshalb auch hier Urothelkarzinome entstehen können (Dalghi et al., 2020).

1.1.2 Klassifikation

Nach der aktuellen S3-Leitlinie zur Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms erfolgt die Klassifikation des Harnblasenkarzinoms mittels der gängigen TNM-Klassifikation der Union internationale contre le cancer (UICC), sowie anhand der neuen Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) von 2016.

1.1.2.1 WHO-Klassifikation von 2016

Das histologische *Grading* des Tumors wird in der WHO-Klassifikation einbezogen. Die neue Klassifikation baut auf der ehemaligen Einteilung von 2004 auf, berücksichtigt jedoch neue Erkenntnisse bezüglich morphologischer Unterschiede einzelner Tumorentitäten, sowie genetischer Abweichungen, und Veränderungen der molekularen Signalwege, im Hinblick auf individualisierte therapeutische Ansätze.

Während Urothelkarzinome in fortgeschrittenen Stadien zu > 95 % schlecht differenziert sind, variiert das histologische *Grading* vor allem in den nicht-muskelinvasiven Stadien stark. Aus diesem Grund ist laut Humphrey et al. eine genaue Differenzierung in diesen niedrigeren Stadien besonders wichtig ([Humphrey et al., 2016](#)).

1.1.2.2 TNM-Klassifikation

Die TNM-Klassifikation befasst sich mit dem lokalen Ausbreitungs- und Metastasierungsverhalten des Tumors.

Eine Übersicht der TNM-Klassifikation und der Stadieneinteilung nach UICC, ist in der Tabelle 1 und Tabelle 2 am Ende des Absatzes angegeben.

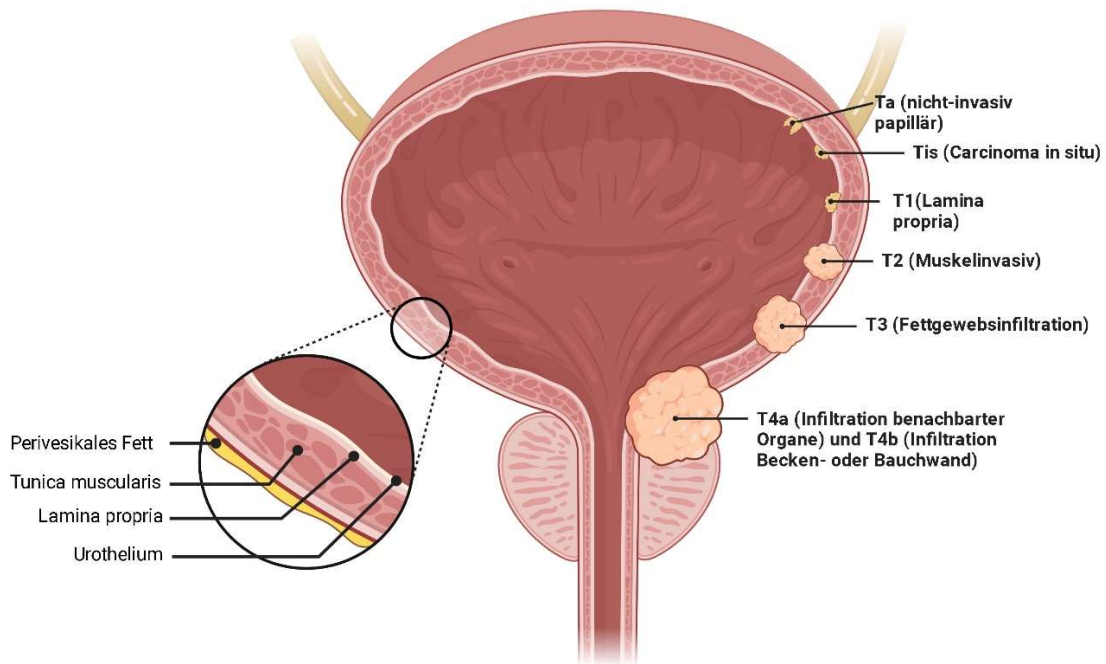


Abbildung 1 TNM-Klassifikation des Urothelkarzinoms.

Schematische Darstellung der lokalen Stadien des Urothelkarzinoms. Die Invasionstiefe wird in der TNM-Klassifikation durch „T“ repräsentiert. Die Stadien reichen von Ta (Basalmembran des Urotheliums wird nicht überschritten) bis T4 (Tumor überschreitet die Tunica adventitia und infiltriert benachbarte Organe) (Created in <https://BioRender.com>).

Die vertikale Eindringtiefe des Tumors in die Harnblasenwand, welche vor allem in lokal begrenzten Stadien therapieentscheidend ist, wird durch die Stadien Ta bis T4 beschrieben. **Abbildung 1** zeigt eine graphische Darstellung der verschiedenen T-Stadien. Eine besondere Bedeutung gilt der Unterscheidung zwischen muskelinvasiv ($> T1$) und nicht-muskelinvasiv (Ta - T1). Während im Stadium T1 zwar die *Lamina propria* infiltriert ist und dieses Stadium somit zu den invasiven Stadien gezählt wird, ist im Gegensatz zum T2 Stadium die *Muscularis propria* tumorfrei. Ab T2 spricht man von einem muskelinvasiven Harnblasenkarzinom und der Therapieansatz sowie die Prognose verändern sich drastisch. Überschreitet der Tumor die Harnblasenwand ist das Stadium T4 eingetreten. 50 % aller Urothelkarzinome werden im Stadium Ta diagnostiziert (Richters et al., 2020).

Tabelle 1 TNM-Klassifikation des Urothelkarzinoms der Harnblase

(Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft and AWMF), 2020)

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

N1 Metastase(n) in solitärem Lymphknoten des kleinen Beckens (hypogastrische, Obturator-, externe iliaca oder präsakrale Lymphknoten)

N2 Metastase(n) in multiplen Lymphknoten des kleinen Beckens, (hypogastrische, Obturator-, externe iliaca oder präsakrale Lymphknoten)

N3 Metastase(n) der Lymphknoten an der Arteria iliaca communis

M-Stadium	Fernmetastasen
M0	Keine Fernmetastasen
M1a	Metastasen in nichtregionären Lymphknoten
M1b	Andere Fernmetastasen

Tabelle 2 Stadien-Einteilung nach UICC des Urothelkarzinoms der Harnblase

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft and AWMF), 2020)

Stadium	Primärtumor	Lymphknoten	Fernmetastasen
Stadium 0a	Ta	N0	M0
Stadium 0is	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2a, T2b	N0	M0
Stadium IIIA	T3a, T3b, T4a	N0	M0
	T1, T2, T3, T4a	N1	M1
Stadium IIIB	T1, T2, T3, T4a	N1	M0
Stadium IVA	T4b	Jedes N	M0
	Jedes T	Jedes N	M1a
Stadium IVB	Jedes T	Jedes N	M1b

1.1.3 Epidemiologie

Im Jahr 2020 wurden weltweit insgesamt 19.3 Millionen (Mio.) Krebserkrankungen neu diagnostiziert und 10 Mio. krebsbedingte Todesfälle gemeldet. Das Harnblasenkarzinom war in diesem Jahr mit einer Inzidenz von 573.278 zuständig für 3 % der Krebsneuerkrankungen und 2,1 % der krebsbedingten Todesfälle weltweit. Somit war es das zwölft häufigste Karzinom, während es bei Männern, welche häufiger als Frauen erkranken, Platz sieben einnahm ([Sung et al., 2021](#)).

Etwa 70 % der neu diagnostizierten Urothelkarzinome weisen ein nicht-muskelinvasives Stadium auf. Obwohl die Prognose, bei einem 5-Jahresüberleben (JÜL) von ca. 90 %, vielversprechend ist, neigen vor allem *high-grade* und *in-situ* Karzinome zu Rezidiven und Progression in ein muskelinvasives Stadium. Die daraus resultierende Notwendigkeit wiederholter endoskopischer Nachsorgen und -Resektionen machen das Urothelkarzinom zu einer der kostenintensivsten Krebserkrankungen ([Patel et al., 2020](#)).

Die aktuellen Daten für Deutschland stammen aus dem Jahre 2018. Demnach verzeichnete das Zentrum für Krebsregisterdaten des Robert Koch-Instituts (RKI) ungefähr 31.000 Neuerkrankungen. Hiervon waren ca. 18.270 auf invasive Karzinomstufen (T1 - T4) und ca. 12.770 auf nicht-invasive papilläre Karzinome (Ta) und *in situ*-Tumoren zurückzuführen ([RKI, 2021](#)).

Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei ca. 75 Jahren, wobei Männer etwa dreimal häufiger erkranken als Frauen. Das Männer häufiger vom Urothelkarzinom betroffen sind, liegt vermutlich nach wie vor an der höheren Exposition gegenüber karzinogenen Substanzen (bspw. Tabakrauch). Frauen hingegen weisen eine schlechtere Prognose bezüglich Gesamtüberleben auf. Die Gründe hierfür sind in der Fachliteratur umstritten. Fakt ist, dass Frauen häufiger ein muskelinvasives Stadium aufweisen als Männer (32 % bei Frauen vs. 24 % bei Männern) ([Kraywinkel et al., 2018](#)). Eine verspätete Diagnosestellung beim weiblichen Geschlecht mit daraus resultierenden höheren Tumorstadien könnte ein Erklärungsansatz für die ungleiche Stadienverteilung sein. Kliniker missinterpretieren unspezifische Reizbeschwerden bei Frauen häufiger als Harnwegsinfektionen. Statt weiterführender Diagnostik erfolgt eine Antibiotikatherapie. Erst bei ausbleibender Besserung wird genauer nachgeschaut, wodurch sich der

Diagnosezeitpunkt verschiebt (Lenis et al., 2020). Richters *et al.* zufolge reicht dieser Erklärungsansatz nicht aus. Vergleicht man die Sterblichkeit zwischen den Geschlechtern innerhalb desselben Tumorstadiums, weisen Frauen ebenfalls eine höhere Mortalität auf. Anatomische Gegebenheiten wie etwa eine dünnere Harnblasenwand als auch hormonelle Unterschiede könnten laut Richters ursächlich für dieses Phänomen sein (Richters et al., 2020). Dies spiegelt sich auch in den Daten des RKI wider. Die relativen Zehnjahresüberlebensraten im muskelinvasiven Stadium betragen bei Frauen 29,1 % im Vergleich zu 33,0 % bei Männern (Kraywinkel et al., 2018).

Die altersstandardisierte Inzidenzrate zeigt bei beiden Geschlechtern einen rückläufigen Trend seit den 1990er Jahren. Der Abfall der Neuerkrankungsrate ist beim männlichen Geschlecht deutlicher ausgeprägt als bei Frauen. Dies kann nach Angaben des RKI auf einen Rückgang des Tabakkonsums und weniger beruflichen Kontakt mit krebserregenden Stoffen zurückgeführt werden. Für die nicht-invasiven Formen des Karzinoms stehen brauchbare Daten erst ab 2008 zur Verfügung. Zuvor war die Erfassung dieser Karzinome nicht zufriedenstellend. Ein Trend bezüglich altersstandardisierter Inzidenzraten lässt sich laut Kraywinkel *et al.* Stand 2018 noch nicht beobachten.

Spiegelbildlich zur sinkenden Inzidenzrate lässt sich in Deutschland ebenfalls ein Rückgang der Sterberaten beobachten. Zwischen 1999 und 2015 fällt die altersstandardisierte Sterberate um 30 % bei Männern und 25 % bei Frauen ab. Eine Vermeidung von Risikofaktoren wie auch Fortschritte in der Diagnostik und Therapie tragen zweifellos zu dieser Entwicklung bei (Kraywinkel et al., 2018). Ob sich der Rückgang an Inzidenz und Sterberaten auch in Zukunft fortsetzen wird bleibt offen. Weltweit betrachtet sollte zumindest die Inzidenz laut Richters *et al.* im Zuge der demographischen Entwicklung und steigenden Lebenserwartung in den nächsten Jahrzehnten zunehmen (Richters et al., 2020).

Wie bei anderen Karzinomtypen bestehen beim Blasenkarzinom geographische Verteilungsunterschiede. In Westeuropa und den USA ist die Inzidenz am größten, während in asiatischen Ländern und Osteuropa weniger Fälle verzeichnet werden (Pelucchi et al., 2006). Auch die histologischen Subtypen zeigen unterschiedliche Verteilungsmuster. In den westlichen Ländern dominiert der urotheliale Subtyp während z.B. im mittleren Osten häufiger auch nicht-urotheliale Subtypen diagnostiziert werden.

Dies hängt unter anderem mit der unterschiedlichen Verteilung verschiedener Risikofaktoren zusammen (Mostafa et al., 1999).

1.1.4 Risikofaktoren

Die Entstehung des Urothelkarzinoms ist multifaktoriell. Eine entscheidende Rolle scheint die Dauer der Exposition gegenüber karzinogenen Substanzen zu spielen. Folgerichtig ist das Alter der wichtigste Risikofaktor. Die meisten Karzinome werden im Alter von 70 bis 84 Jahren diagnostiziert. Neben dem Alter stellt Zugehörigkeit zum männlichen Geschlecht einen weiteren entscheidenden Risikofaktor da. Rauchen ist der größte habituelle Risikofaktor. Ca. 50 % aller Urothelkarzinome können auf die Exposition gegenüber Tabakrauch zurückgeführt werden (Lenis et al., 2020). Hinzu kommt, dass Rauchen mit einem häufigeren Auftreten von muskelinvasiven und schlecht differenzierten Karzinomen zu korrelieren scheint (Cumberbatch et al., 2016). Aromatische Amine und weitere Chemikalien tragen ebenfalls zu der Entstehung des Urothelkarzinoms bei. Der berufliche Kontakt mit direkt krebserregenden Chemikalien spielt heutzutage in Deutschland nur noch eine untergeordnete Rolle (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft and AWMF), 2020).

Zu den *iatrogenen* Risikofaktoren gehören sowohl eine Bestrahlung des Beckens, als auch die Einnahme bestimmter alkylierender Chemotherapeutika (DeGeorge et al., 2017). Besonders die karzinogene Wirkung des Arzneistoffes Cyclophosphamid konnte in zahlreichen Studien belegt werden. In einer vor kurzem veröffentlichten systematischen Übersichtsarbeit von Chou et al. wurde der Zusammenhang zwischen Cyclophosphamidtherapie und dem späteren Auftreten eines Urothelkarzinoms erneut bestätigt. Es bestand außerdem eine Assoziation zu früherem Erkrankungsalter, höherem Tumorstadium bei Diagnosestellung und variierender Tumorhistologie (Chou et al., 2021).

Chronische Blasenentzündungen durch bakterielle Infektionen und langliegende Dauerkatheter scheinen ebenfalls eine Rolle zu spielen. In Deutschland nicht relevant, jedoch in einigen Ländern im Norden Afrikas weit verbreitet, ist die Infektion mit dem

Erreger der chronischen Bilharziose, *Schistosoma hematobium*, der vor allem für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen verantwortlich ist (Mostafa et al., 1999).

Ob eine genetische Prädisposition zur Entstehung des Urothelkarzinoms beiträgt, ist aktuell in der Fachliteratur umstritten (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft and AWMF), 2020). Nennenswert ist jedoch das hereditäre nicht-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC / Lynch-Syndrom). Hier führen Keimbahnmutationen in DNA-Reparaturgenen (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) zu einer Anhäufung fehlerhafter Basenpaarungen, was in einem erhöhten Lebenszeitrisko für das Auftreten diverser Krebserkrankungen resultiert. Studien zeigen, dass Mutationen des MSH2-Reparaturgens mit der Entstehung urothelialer Karzinome, sowohl der Harnblase als auch des oberen Harntrakts, assoziiert sind (Lindner et al., 2021).

Ein generelles Screening von Urothelkarzinompatienten auf das Vorhandensein erblicher Tumorsyndrome wird nach aktueller S3-Leitlinie jedoch nicht empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft and AWMF), 2020).

1.1.5 Klinische Symptomatik

Häufig präsentiert sich das Urothelkarzinom erstmalig durch eine schmerzlose Hämaturie. Die Makrohämaturie, welche mit dem bloßen Auge sichtbar ist, stellt das Leitsymptom der Erkrankung dar und bedarf stets einer gründlichen Abklärung, da in etwa 20 % der Fälle ein malignes Geschehen der Harnblase ursächlich für die Symptomatik ist. Im Gegensatz hierzu kann die Mikrohämaturie nur bei 1,3 % der Patienten auf das Vorliegen eines Urothelkarzinoms zurückgeführt werden (DeGeorge et al., 2017). Des Weiteren fand eine US-amerikanische Studie der Mayo Klinik bei fast 40 % von 2,5 Mio. Probanden eine Mikrohämaturie (Loo et al., 2013). Demnach ist die Mikrohämaturie ein häufiges und eher unspezifisches Symptom. Vor allem beim Vorliegen von Risikofaktoren wie etwa höheres Alter, vorhergehender Bestrahlung des Beckens, oder Einnahme alkylierender Zytostatika sollte eine Abklärung der mikroskopischen Hämaturie erfolgen (DEGAM, 2020).

Darüber hinaus können unspezifische Reizbeschwerden wie eine Pollakisurie und Drangsymptomatik ebenfalls Vorboten eines Karzinoms sein.

Je nach Lokalisation und Ausbreitung des Tumors treten obstruktive Beschwerden in Form eines subjektiven Gefühls der unvollständigen Blasenentleerung nach Miktion oder eines abgeschwächten Harnstrahls auf, während in lokal fortgeschrittenen und metastasierten Stadien Schmerzen, Zeichen der Endorganschädigung (bspw. Nierenversagen) und Kachexie hinzukommen können (DeGeorge et al., 2017).

1.1.6 Diagnostik

Bei begründetem Verdacht, jedoch immer bei schmerzloser Makrohämaturie gleich welchen Alters, erfolgt eine Basisdiagnostik. Bestätigt sich im Rahmen der Untersuchungen ein muskelinvasives Stadium erfolgt ein *Staging*.

Eine orientierende sonographische Untersuchung der Harnblase und des oberen Harntrakts dient dem Ausschluss eines Harnstaus sowie der Abklärung alternativer Ursachen für die Beschwerden. Größere Tumoren lassen sich gegebenenfalls bereits sonographisch darstellen.

Bei begründetem Verdacht auf ein malignes Geschehen soll die Primärdiagnostik durch eine Blasenspiegelung erfolgen. Wichtig ist die Beurteilung der gesamten Harnblase, da Urothelkarzinome multifokal auftreten können. Bei unauffälliger Harnblasenschleimhaut und weiterhin bestehender Hämaturie muss die Diagnostik auf den oberen Harntrakt ausgeweitet werden. Besteht nach erfolgter Zystoskopie weiterhin der Verdacht auf ein Urothelkarzinom ist eine histologische Gewebssicherung erforderlich und es erfolgt als nächster Schritt die transurethrale-Resektion (TUR-B) des Tumors. Hierbei wird der Tumor unter konstanter Spülung mittels Elektroschlinge abgetragen. Das ausgespülte Tumorgewebe wird aufgefangen und anschließend histologisch untersucht, um die Diagnosestellung und eine genaue Klassifikation zu ermöglichen (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft and AWMF), 2020).

Sofern der Tumor sich nicht im Bereich des Trigonums befindet und auch keine Multifokalität vorliegt, soll nach erfolgter TUR-B keine weitere bildgebende Diagnostik des oberen Harntrakts erfolgen (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft and AWMF), 2020).

Das *Staging* beim muskelinvasiven Karzinom beinhaltet eine computertomographische (CT) Untersuchung von Abdomen, Thorax und Becken mit begleitender CT-Urographie. Eine spezifische Bildgebung des Kopfes und Skeletts wird nur bei entsprechender Symptomatik durchgeführt. Als Alternative zum CT steht die Kontrastmittel-Magnetresonanztomographie (MRT) zur Verfügung. Ca. 50 % der Patienten mit muskelinvasivem Karzinom haben zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits Lymphknoten – oder Organmetastasen (vom Dorp et al., 2009).

1.1.7 Therapie

1.1.7.1 Therapie des nicht-muskelinvasiven Urothelkarzinoms

Im Falle des nicht-muskelinvasiven Urothelkarzinoms vereint die TUR-B Diagnostik und Therapie und stellt das Mittel der Wahl da.

Im Anschluss an die Operation kann eine Intravesikale-Instillationstherapie mit Mitomycin-C oder Bacillus Calmette-Guérin (BCG) erfolgen. Indikation und Dauer dieser Instillationstherapie richten sich nach dem individuellen Progressions- und Rezidivrisiko. Sylvester *et al.* zufolge variiert das Rezidivrisiko innerhalb des ersten Jahres nach TUR-B zwischen 15 % - 70 %. Das Progressionsrisiko beträgt in den ersten 5 Jahren 7 % - 40 %. Die „*European Organization for Research and Treatment of Cancer*“ (EORTC) entwickelte im Rahmen mehrerer randomisierter Phase III Studien ein Risikostratifizierungssystem, welches Patienten hinsichtlich Rezidiv- und Progressionsrisiko in drei Gruppen (niedriges, intermediäres und hohes Risiko) unterteilt. Berücksichtigt werden Tumoranzahl- und Größe, vorheriger Befall, T-Stadium und *Grading* (Sylvester et al., 2006). Patienten mit niedrigem Risiko sollen eine einmalige Mitomycin - Frühinstillation (innerhalb von 6 – 24 Stunden postoperativ) erhalten,

Patienten mit intermediärem Risiko erhalten eine adjuvante Mitomycin – Instillation über mindestens 1 Jahr. Patienten mit hohem Risiko scheinen von einer BCG-Instillationstherapie über mindestens 1 Jahr und maximal 3 Jahren Dauer zu profitieren (Maïke, 2021).

1.1.7.2 Therapie des muskelinvasiven Urothelkarzinoms

Die (radikale) Zystektomie (Cx) mit beidseitiger *pelviner* Lymphadenektomie bildet den Goldstandard in der Therapie des muskelinvasiven Urothelkarzinoms. Ziel ist die vollständige Entfernung der Harnblase unter bestmöglichem Erhalt der Kontinenz und Potenz. Unter Umständen werden weitere Organe in unmittelbarer Nachbarschaft zur Harnblase entfernt. War die offene radikale Zystektomie vor einigen Jahren noch Standard, so haben heutzutage laparoskopische und roboterassistierte Verfahren Einzug in die Therapie erfahren und sollten dem Patienten angeboten werden. Es bestehen, nach erfolgter Cx verschiedenste Methoden der Harnableitung. Grob können diese in Kontinente, wie bspw. die Neoblase und Inkontinente, *Ileum-Conduit* unterteilt werden. Eine ausführliche Aufklärung des Patienten über die verschiedenen Verfahren unter Berücksichtigung der individuellen Bedürfnisse, Möglichkeiten und Fragilität ist essenziell (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft and AWMF), 2020).

Trotz optimaler chirurgischer Versorgung besteht beim muskelinvasiven Urothelkarzinom, abhängig vom Stadium und *Grading*, eine hohe Rezidivrate von bis zu 50 % (Patel et al., 2020). Die Prognose dieser Patienten ist denkbar schlecht, lediglich rein lymphatisch metastasierte Tumoren haben eine Chance auf Heilung (Sternberg et al., 1989). Patienten profitieren daher von einer perioperativen, also im zeitlichen Zusammenhang mit der Cx erfolgten, Chemotherapie. In Studien konnte ein Überlebensvorteil von 5 – 10 % nach 10 Jahren gezeigt werden (Collaboration, 2005). Zur Verfügung stehen aktuell cisplatinhaltige Polychemotherapien welche entweder als neoadjuvante (vor Operation) oder adjuvante (nach Operation) Therapien durchgeführt

werden können. Es bleibt umstritten, welches der beiden Verfahren effektiver ist und bislang fehlen Studien, welche die beiden Therapieansätze direkt miteinander vergleichen.

Während die neoadjuvante Chemotherapie in den vereinigten Staaten bereits ein fester Bestandteil der Therapie ist, gehen die Meinungen in Deutschland auseinander (Patel et al., 2020). In einer Metaanalyse des Jahres 2005 konnte durch den Einsatz einer cisplatinhaltigen neoadjuvanten Chemotherapie eine Steigerung der Fünfjahresüberlebensrate von 5 % gezeigt werden (Collaboration, 2005). Ziel ist sowohl ein *Downsizing* des Tumors als auch die Zerstörung potenzieller, im Körper bereits zirkulierender Mikrometastasen. Es sollen 3 – 4 Zyklen einer cisplatinhaltigen Chemotherapie appliziert werden. Eine Kontrolle auf Tumorprogression nach 2 Zyklen ist obligat (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft and AWMF), 2020). Problematisch ist, dass nicht alle Patienten von der Therapie zu profitieren scheinen. Pathologische Komplettremissionsraten liegen bei ca. 25 % (Yin et al., 2016). Bedenkt man die hohe Toxizität dieser Therapie, vor dem Hintergrund der hohen Komorbidität dieser häufig älteren Patienten, erklärt dies die kritische Haltung vieler Kliniker gegenüber der Therapie.

Die aktualisierten S3 Leitlinien zum Harnblasenkarzinom (S3 Leitlinie Harnblasenkarzinom) empfehlen beim lokalisierten, muskelinvasiven Harnblasenkarzinom eine neoadjuvante Chemotherapie mit 3 – 4 Zyklen einer Cisplatin – haltigen Kombinationstherapie. Rationale ist der in einer sogenannten De Novo Literaturrecherche festgestellte statistisch signifikante Überlebensvorteil (hazard ratio 0,86) im Vergleich zur alleinigen Zystektomie.

Eine adjuvante Chemotherapie ist postoperativ indiziert bei Patienten ab dem Stadium pT3 und / oder N+, wenn zuvor keine neoadjuvante Therapie stattgefunden hat. Konkordant zum neoadjuvanten Setting, sollen 3 – 4 Zyklen einer cisplatinhaltigen Polychemotherapie zum Einsatz kommen (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft and AWMF), 2020).

Ein häufiges Problem der Patientengruppe mit muskelinvasiven Urothelkarzinomen ist die mangelnde sogenannte Cisplatin – Fähigkeit, sei es aufgrund des Alters, der eingeschränkten Nierenfunktion oder entsprechender Komorbiditäten. Da Carboplatin keine Alternative darstellt und auch von den Leitlinien nicht empfohlen wird, stellen nicht chemotherapiehaltige Schemata eine interessante Alternative in diesem *setting* dar, wobei vor allem die Checkpoint – Inhibitoren hier im Vordergrund stehen: Dabei handelt es sich um humanisierte monoklonale Antikörper gegen das *Programmed cell death protein 1* (PD-1) und seinen Liganden *Programmed cell death 1 ligand 1* (PD-L1). Diese befinden sich in der Regel auf der Oberfläche von T-Zellen und schützen vor einer überschießenden Immunreaktion. Aber auch Tumorzellen können diese Rezeptoren exprimieren und sich so dem Immunsystem entziehen. Durch eine Blockade der Rezeptoren wird die PD-1 vermittelte Immunbremse gelöst und die antitumorale Immunantwort wieder reaktiviert ([Bagchi et al., 2021](#)).

Im perioperativen *setting* wurden mehrere Phase II Studien durchgeführt mit den folgenden Ergebnissen: In der PURE-01-Studie konnte durch die neoadjuvante Gabe von 3 Zyklen Pembrolizumab eine komplette Remissionsrate in 37 % der Patienten erreicht werden. Eine etwas geringere Komplet – Remissionsrate erreichte die 2 -malige Gabe von Atezolizumab in der ABACUS-Studie, mit 31 %.

Ein etwas kompliziertes Studiendesign hatte die NABUCCO-Studie, bei welcher der PD-1 Inhibitor Nivolumab mit dem CTLA-4 Antikörper Ipilimumab kombiniert wurde – ein beim Nierenzellkarzinom erfolgreiches Konzept: In der Kohorte I (keine Randomisierung) wurde Ipilimumab in einer Dosis von 3 mg / kg Körpergewicht (KG) (Tag 1 und 22) und Nivolumab 1 mg / kg KG (Tag 22 und 43) verabreicht. Die Kompletremissionsrate (histologisch kein Nachweis mehr von Tumor im Zystektomiepräparat) betrug 46 %.

In der Kohorte II wurden 30 Patienten in 2 Arme mit unterschiedlichen Dosierung 1:1 randomisiert: Arm A: Ipilimumab 3 und Nivolumab 1 mg vs. Arm B: Ipilimumab 1 und

Nivolumab 3 mg. Die Komplettremissionsrate im Arm A war mit 43 % deutlich höher als im Arm B, in dem nur eine einzige Komplettremission erzielt werden konnte.

Derzeit laufen mehrere große Phase III-Studien, in denen eine Cisplatin-haltige Kombinationstherapie mit Kombinationen aus Chemotherapie und Checkpointinhibitoren verglichen werden. Die Ergebnisse sind in den nächsten Jahren zu erwarten. Im metastasierten Stadium konnte allerdings kein Vorteil erzielt werden.

Die Keynote-B15/EV-304 Studie testet bei Cisplatin – fähigen Patienten Enfortumab-Vedotin in Kombination mit Pembrolizumab versus Gemcitabin – Cisplatin. Enfortumab-Vedotin ist ein neuartiges Antikörper-Wirkstoff-Konjugat aus einem humanen monoklonalen Antikörper gegen Nectin-4 und dem Zytostatikum Monomethylauristatin E, welches im April 2022 aufgrund der positiven Ergebnisse der EV-301 Studie die Zulassung für Patienten mit metastasiertem Urothelkarzinom in der Drittlinie nach Cisplatin und einer Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren erhielt ([Hoimes et al., 2021](#), [Powles et al., 2021](#)).

Die Leitlinienempfehlungen für die adjuvante Chemotherapie beim > pT3 und / oder lymphknotenpositiven Karzinom (pN+) sind weniger eindeutig. Die S3 Leitlinie empfiehlt hier eine Abstimmung im Tumorboard (multidisziplinär).

Auch in dieser Patientengruppe stellt die Cisplatinfähigkeit ein großes Problem dar, so dass chemotherapiefreie Konzepte in mehreren Studien untersucht werden. Während die Ergebnisse für den PD-L1 Antikörper Atezolizumab in der IMvigor 01 Studie nicht überzeugten, wurde der PD-1 Antikörper Nivolumab aufgrund der Verdoppelung des krankheitsfreien Überlebens (21 vs. 11 Monate) in der CheckMate 274-Studie von der FDA und inzwischen auch in Europa zugelassen. Zurzeit laufen mehrere adjuvante Phase III Studien mit den Substanzen Pembrolizumab, Infigratinib (einem oralen FGFR-Inhibitor) und Atezolizumab bei Patienten mit zirkulierender Tumor-DNA nach erfolgter Zystektomie ([Tauber et al., 2022](#)).

Die Erstlinientherapie des metastasierten Urothelkarzinoms bestand seit Jahren in einer cisplatinhaltigen Chemotherapie. Die Ansprechraten und die Gesamtüberlebenszeiten nach Chemotherapie von Patienten mit metastasiertem Urothelkarzinom lagen in der

landmark – Studie von van der Maase (von der Maase et al., 2005) mit Gemcitabin-Cisplatin bei 50 % und 13,8 Monaten. Die Ergebnisse für Carboplatin-basierte Therapien sind mit 41 % und 9,3 Monaten noch geringer (De Santis et al., 2012). In Europa wird in der Regel die Kombination von Gemcitabin und Cisplatin, in den USA häufig auch die Kombination Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin und Cisplatin eingesetzt. Die Ansprechraten liegen um die 50 %, die Gesamtüberlebenszeiten zwischen 14 und 15 Monaten (Retz et al., 2009). Patienten, die nicht für Cisplatin geeignet sind, werden in der Regel mit Carboplatin Kombinationstherapie behandelt, mit allerdings entsprechend schlechteren Ergebnissen (Gesamtansprechraten um die 35 %, mittleres Überleben 9 Monate) (De Santis et al., 2012).

Ca. 30 – 50 % der Patienten gelten als Cisplatin *unfit*, definiert als eine Kreatinin Clearance < 60 ml / min, Hörverlust, periphere Neuropathie, Herzinsuffizienz oder schlechter *Performance* Status (Galsky et al., 2011).

In Europa sind der PD-1-Inhibitor Pembrolizumab und der PD-L1-Inhibitor Atezolizumab in der Erstlinientherapie für nicht Cisplatin geeignete Patienten mit fortgeschrittenem oder metastasiertem Urothelkarzinom deren Tumoren eine Überexpression von PD-L1 aufweisen, zugelassen. Die Ansprechraten liegen maximal bei 30 %, die Überlebenszeiten sind mit denen der Chemotherapie vergleichbar (Martini et al., 2022).

Vor dem Hintergrund der unbefriedigenden Ergebnisse der Platinhaltigen Chemotherapien und dem hohen Anteil von vor allem Cisplatin unfitten Patienten macht das Konzept einer Erhaltungstherapie – möglichst ohne weiteren Einsatz der Chemotherapie – Sinn. Tom Powles aus London stellte erstmalig auf dem amerikanischen Krebskongress 2020 die Ergebnisse der Javelin-Bladder -100 Studie vor, in der nach einer Platin-haltigen Erstlinienchemotherapie Avelumab 2-wöchentlich bis zum Krankheitsprogress verabreicht wurde. Eingeschlossen wurden alle Patienten, die keinen Tumorprogress nach der Chemotherapie aufwiesen (Komplettremission, *stable disease*). 700 Patienten wurden 1:1 in einen *best supportive care* versus einen Avelumab-Therapiearm randomisiert. Das mediane Gesamtüberleben war im Avelumab – Arm mit 21,4 Monaten dem *best supportive care* Arm (14,3 Monate) deutlich überlegen. Bei den PD-L1-positiven Patienten war der Unterschied noch größer. Daher ist die Avelumab –

Therapie in Europa bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Urothelkarzinom nach erfolgreicher Platin-haltiger Chemotherapie zugelassen.

Ein neuartiges Konzept stellen die sogenannten *antibody – drug* Konjugate (deutsch Antikörper- Wirkstoff Konjugate) dar. Hierbei werden humanisierte monoklonale Antikörper gegen z.B. Nectin – 4, ein nahezu ubiquitär auf Urothelkarzinomzellen exprimiertes Antigen, mit Hilfe eines biodegradablen Linker mit einem Zytostatikum gekoppelt. Der Antikörper – Zytostatikum Komplex wird nach Bindung an die Zelloberfläche internalisiert, der Linker durch Proteolyse degradiert und das Zytostatikum freigesetzt. Die Phase III – Studie EV-301 mit dem Antikörper Wirkstoff Konjugat Enfortumab Vedotin (Antikörper gegen Nectin 4 /Monomethyl Auristatin E) bei Patienten mit metastasiertem Urothelkarzinom nach Gabe einer Platin-haltigen Chemotherapie und mindestens einem Immuncheckpointinhibitor zeigte eine signifikante Verlängerung sowohl des Gesamtüberlebens als auch des progressionsfreien Überlebens der mit EV behandelten Patienten im Vergleich zur Chemotherapie in der Drittlinie. Die Substanz ist inzwischen in Europa in dieser Indikation zugelassen.

In der EV- 302 Studie wurde die Substanz jetzt in der Erstlinie in Kombination mit Pembrolizumab gegen eine platinbasierte Chemotherapie getestet und zeigte vielversprechende Ergebnisse: Sowohl das progressionsfreie Überleben (median 12,5 vs. 6,3 Monate; HR 0.45) als auch das wesentliche Gesamtüberleben (median 31,5 vs. 16,1 Monate, HR 0.47) konnten nahezu verdoppelt werden. Allerdings waren die Nebenwirkungen nicht unerheblich mit 56 % Grad 3 und höher (im Vergleich zu 69 % in der Chemotherapiegruppe ([Powles et al., 2024](#))).

Derzeit läuft eine weitere Phase III Studien mit dem Antikörper – Wirkstoffkonjugat Sacituzumab-Govitecan (Antikörper gegen Trophoblasten-Zelloberflächen Antigen-2 (Trop-2) und SN-38, ein Topoisomerase-Inhibitor), die TROPiCS-04 Studie. Die Substanz ist seit April 2021 in den USA in der Drittlinie zugelassen.

Die Phase-II-Studie BLC2001 testet bei 101 Patienten mit einer FGFR-Alteration nach vorheriger Cisplatin basierter Chemo- oder Immuncheckpointinhibition den Tyrosinkinaseinhibitor Erdafitinib. Ein Mechanismus der Tumorprogression und -aktivierung besteht in Mutationen des Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (FGFR-Rezeptor) der zu einer Autoaktivierung des Rezeptors führt. Erdafitinib hemmt den

FGFR-Rezeptor und führte zu einem medianen Gesamtüberleben dieser schwer vorbehandelten Patientengruppe von 11,3 Monaten. Die Ansprechrate lag bei 40 %. Erdafitinib ist in den USA inzwischen zugelassen und wird derzeit in der Phase III Studie THOR gegen eine Chemotherapie bzw. gegen eine Immuncheckpointinhibition mit Pembrolizumab in der Zweitlinie getestet ([Tauber et al., 2022](#)).

Die verbesserungswürdigen Ergebnisse der Chemo- und Immuntherapie, aggraviert durch das Fehlen prognostischer Parameter für das Ansprechen beim einzelnen Patienten haben die Suche nach *ex vivo* Modellen, welche die Suszeptibilität individueller Tumoren vorhersagen könnten, beflügelt.

Organoidmodelle könnten helfen Patienten zu identifizieren, welche von einer Chemotherapie profitieren und zugleich Patienten, bei denen kein Ansprechen zu erwarten ist, davor zu bewahren. Dies könnte vor allem im neoadjuvanten, jedoch auch im adjuvanten *Setting* hilfreich sein.

1.2 Organoide

1.2.1 Einführung Organoide

Dreidimensionale Organoide sind ein neuer Forschungszweig mit einer Vielzahl an potenziellen Anwendungsmöglichkeiten sowohl in der Grundlagen- als auch der translationalen (Krebs-)Forschung. Tumormodelle basieren heute noch in der Regel auf zweidimensionalen Zellkultur- und Tiermodellen, welche enorme Beiträge zur Krebsforschung geleistet haben. Jedoch bergen sie auch Nachteile, besonders wenn es um die Übertragung von im Labor geschaffenen Wissen auf den klinischen Alltag und Behandlung von Patienten geht (Xu et al., 2018). Organoide sind eine Zwischenform dieser beiden Modelle, welche die Vorteile vereinen und Nachteile minimieren. Besonders vielversprechend ist ihre Anwendung als Plattform für präklinische Medikamentenuntersuchungen. In dieser Hinsicht können sie ein wichtiges Werkzeug in der Identifizierung von personalisierten Therapieoptionen des Urothelkarzinoms darstellen (Melzer et al., 2022).

1.2.2 Grundlagen und Limitationen von Zellkultur

In den Anfängen des zwanzigsten Jahrhunderts gelang es dem amerikanischen Embryologen Ross Granville Harrison (1870 – 1959) erstmalig Gewebe aus Frosch Embryonen außerhalb des Körpers erfolgreich zu kultivieren. Obwohl Wilhelm Roux (1850 – 1924) wenige Jahre zuvor demonstriert hatte, dass es möglich war vitale Hühnerembryozellen für wenige Tage in einer Kochsalzlösung am Leben zu halten, werden die Errungenschaften Harrisons heutzutage als die Ursprünge der modernen Zellkultur anerkannt (Rodríguez-Hernández et al., 2014).

In der translationalen Forschung haben sich seither vor allem zwei unterschiedliche Modelle herauskristallisiert, welche jeweils individuelle Vor- und Nachteile aufweisen: zweidimensionale Zellkultur und Tiermodelle.

Bei zweidimensionalen Zellkulturen wachsen die Zellen auf dem Boden einer Platte und bilden keine komplexeren Strukturen „in die Höhe“ (*Monolayer*). Zweidimensionale *in vitro* Zellkulturmodelle sind kostengünstig und können relativ leicht etabliert werden. Daher sind sie mittlerweile ein essenzieller Bestandteil zahlreicher Forschungszweige, unter anderem der modernen Krebsforschung. Ein wichtiger Nachteil zweidimensionaler Zellkulturen ist die unzureichende Repräsentation komplexer Interaktionen einzelner Zellen innerhalb eines Zellverbandes. Daraus resultieren unter anderem Konformitätsänderungen und ein Polaritätsverlust der einzelnen Zellen. Hinzu kommt, dass alle Zellen gleichermaßen Zugriff auf die im Kulturmedium vorhandenen Nährstoffen haben. Dies spiegelt die komplexe Situation innerhalb eines Tumors nicht wider, bei der z.B. hypoxische Zustände im Zentrum zu einer Selektion von Tumorzellen und Ausschüttung Angiogenese-induzierender Signale führen (Kapałczyńska et al., 2018).

Tiermodelle weisen als Alternative zur traditionellen Zellkultur viele Vorteile auf. Beispielsweise ermöglichen sie es Wissenschaftlern Signalwege zu identifizieren, welche komplexen biologischen Mechanismen zugrunde liegen. Möchte man bspw. die Auswirkung eines neuen monoklonalen Antikörpers auf das Immunsystem untersuchen, reicht ein Zellmodell nicht aus, da dieses die vielen ineinandergreifenden Bestandteile und Abläufe nicht in seinem Ganzen repräsentieren kann. Hohe Kosten, ethische Konflikte als auch eingeschränkte Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den menschlichen Organismus sind wichtige Limitationen dieses Forschungszweiges (Drost and Clevers, 2018).

1.2.3 Definition und Vorteile von Organoiden

Adulte Stammzellen finden sich in fast jedem Gewebe des menschlichen Organismus. Durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Ausdifferenzierung in unterschiedliche Zellen des Ursprungsorgans spielen sie eine entscheidende Rolle in der Regenerationsfähigkeit von Gewebe, beispielsweise nach Verletzung. Werden solche Stammzellen aus einem Primärgewebe freigesetzt und in einer dreidimensionalen Matrix kultiviert, können sie sich zu sogenannten Organoiden ausdifferenzieren (Drost and

Clevers, 2017). Hierbei handelt es sich um komplexe, dreidimensionale Mikrostrukturen, die aus unterschiedlichsten, zu Gruppen formierten Einzelzellen bestehen und über einen längeren Zeitraum passagiert werden können (Meijer, 2021). Nach enzymatischer Verdauung von Primärgewebe kann die Gesamtheit aller Zellen in Kultur genommen werden. Eine vorherige Isolation von Stammzellen ist Drost et al. zufolge nicht notwendig (Drost and Clevers, 2017). Morphologisch nehmen sie meist eine kugelförmige Gestalt an. Organoide können sowohl aus gesundem, als auch Tumorgewebe hergestellt werden. Dies ermöglicht den direkten Vergleich zwischen „gesunden“- und „Tumororganoiden“ im Hinblick auf geno- und phänotypische Unterschiede.

Organoidmodelle besitzen zahlreiche Vorteile gegenüber der konventionellen zweidimensionalen Zellkultur. So werden z.B. Zell-Zell Interaktionen genauer modelliert als bei der monolayer – Kultur. Da die Zellen in einem Verband vorkommen, besteht ein ungleicher Zugriff auf die im Zellmedium vorhandenen Nährstoffe. Dies führt zu hypoxischen Zuständen im Zentrum des dreidimensionalen Konstruktes. Wie bereits im vorherigen Absatz beschrieben, lässt sich dieses Phänomen auch bei *in-vivo* Tumoren beobachten. Darüber hinaus scheint sogar auf Ebene der Genexpression und des Zellmetabolismus eine hohe Ähnlichkeit zu *in-vivo* Zellverbänden zu bestehen (Kapalczyńska et al., 2018, Yoshida et al., 2018).

In der Fachliteratur sind zahlreiche Organoidmodelle aus verschiedensten Karzinomtypen wie beispielsweise: Kolorektalem-, Pankreas-, Brust- Hepatischem- und Prostatakarzinom beschrieben, welche wichtige Eigenschaften mit ihren Ursprungstumoren teilen (van de Wetering et al., 2015, Boj et al., 2015, Broutier et al., 2017, Gao et al., 2014, Sachs et al., 2018). Auch Urothelkarzinomorganoiden, welche aus Präparaten sowohl des oberen- als auch unteren Harntrakts mit unterschiedlichen Erfolgsquoten etabliert wurden, sind in der Literatur beschrieben (Lee et al., 2018, Mullenders et al., 2019, Li et al., 2022, Yoshida et al., 2018, Meijer, 2021).

In einer Veröffentlichung von Lee et al. wird die Kultivierung von 27 Organoidzelllinien mit einer Erfolgsquote von ca. 70 % beschrieben. Als Linie definieren die Autoren ein Organoidmodell, welches mindestens 6-mal passagiert wurde. Darunter versteht man den enzymatischen Verdau der Organoidkultur in Einzelzellen und erneuten Aussaat in

Matrigel. Histopathologische und genomische Mutationsanalysen der Organoide ergaben eine hohe Übereinstimmung mit ihren Ursprungstumoren (Lee et al., 2018).

1.2.4 Basalmembranartige Matrix

Damit Organoide dreidimensionale Strukturen ausbilden können, benötigen die Zellen eine spezielle Umgebung, die als Grundgerüst dienen kann. Dazu werden in der Literatur diverse Methoden beschrieben. Natürliche Hydrogel-basierte Verfahren, wie die Basalmembranartige Matrix (BME) repräsentieren eine dieser Methoden (Jensen and Teng, 2020). BME, ein lösliches Basalmembranextrakt, welches aus dem Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Tumor, einem schlecht differenzierten Chondrosarkom einer Maus extrahiert wird, ähnelt in seiner Zusammensetzung der natürlichen Basalmembran. Der Begriff „Matrigel“ wird häufig Synonym zu BME verwendet. Hauptbestandteile des Matrigels sind Laminin-111, Kollagen IV, Entactin und Heparansulfat-Protoglykan. Hinzu kommen zahlreiche Wachstumsfaktoren (bspw. FGF, EGF, TGF etc.), welche je nach Hersteller bereits im Matrigel enthalten sind oder später separat zugesetzt werden.

Matrigel wird bei ca. -80 °C in gefrorenem Zustand gelagert. Bei Kühlschranktemperaturen von ca. 4 °C tritt es in einen „flüssigen“ Aggregatzustand über und bei Temperaturen um die 37 °C nimmt es innerhalb von ca. 30 Min. eine gelartige Substanz an. Diese Eigenschaften macht man sich zu nutzen, indem das „flüssige“ Matrigel mit aus enzymatisch verdauten Tumorproben gewonnenen Einzelzellen vermischt und anschließend bei 37 °C inkubiert wird. Nachdem das BME eine gelartige Konsistenz angenommen hat, dient es den (Tumor-)Zellen als „Gerüst“ zur Ausdifferenzierung und Formierung komplexer dreidimensionaler Strukturen welche der *in-vivo* Situation ähneln (Benton et al., 2014, Kleinman and Martin, 2005).

1.3 Medikamentenuntersuchungen

Die etablierte systemische Therapie des Urothelkarzinoms beruht auf der Gabe von Cisplatin beinhaltenden Therapieschemata (von der Maase et al., 2000). Bei einigen Patienten ist diese Strategie nicht erfolgreich, da die Tumoren cisplatinresistent sind (Li et al., 2023). Aus diesem Grunde werden alternative Therapieansätze untersucht, die auch bei Cisplatinresistenz Erfolg versprechen. Diese Medikamente könnten beispielsweise in einem Organoidmodell getestet werden, ohne Patienten unnötigen Nebenwirkungen auszusetzen.

1.3.1 Cisplatin – Wirkmechanismus und Resistenzen

Cisplatin, eine anorganische platinhaltige Schwermetallverbindung, welche 1970 erstmalig zur Therapie von Keimzelltumoren eingesetzt wurde, ist ein mittlerweile weit verbreitetes Zytostatikum und kommt in der Therapie zahlreicher Karzinome, unter anderem auch des Urothelkarzinoms zur Anwendung. Die Applikation erfolgt sowohl in der Mono- als auch in Kombinationstherapie mit anderen Zytostatika. Nach dem Eintritt in die Zelle interagiert Cisplatin mit der N7-Sequenz von Purinbasen der Desoxyribonukleinsäure (DNA) und verursacht zahlreiche Inter- und Intrastrang Quervernetzungen. Dies resultiert in einer Hemmung der DNA-Replikation, einem Wachstumsarrest der Zelle, und letztendlich der Aktivierung apoptotischer Signale (Dasari and Tchounwou, 2014). Obwohl die Ansprechraten i.d.R. hoch sind, entwickeln viele Patienten im Verlauf Resistenzen (Galluzzi et al., 2014).

Diese stellen zusammen mit den zahlreichen und häufig therapielimitierenden Nebenwirkungen eine Hürde dar, die es zu überwinden gilt. Die Resistenzmechanismen sind vielfältig und können den Wirkmechanismus auf jeder Ebene betreffen (siehe **Abbildung 2**). Um seine zytostatische Wirkung zu entfalten, muss das Medikament in der Tumorzelle akkumulieren. Dieser Vorgang kann auf zwei Wegen gestört werden. Zum einen können bislang noch nicht eindeutig geklärte Prozesse zu einer verminderten Aufnahme des Medikaments in die Zellen führen. Zum anderen können Medikamente aus

der Zelle ausgeschleust werden. Dies wird auch als *Multidrug-Resistance* (MDR) bezeichnet. Zahlreiche Faktoren tragen zu diesem Prozess bei, unter anderem die MDR-assoziierten Proteine, wie bspw. das p-Glykoprotein und *Multidrug resistance-associated protein* (MRP). Dies sind zur Gruppe der *ATP binding cassette* (ABC) - Transporter zugehörige Transmembranproteine, welche den Wirkstoff entgegen einem Konzentrationsgradienten in den Extrazellularraum (EZR) befördern. Im Falle von Cisplatin-Resistenzen scheint das MRP2 Gen, welches der MRP-Familie angehört, eine Schlüsselposition einzunehmen (Borst et al., 2000).

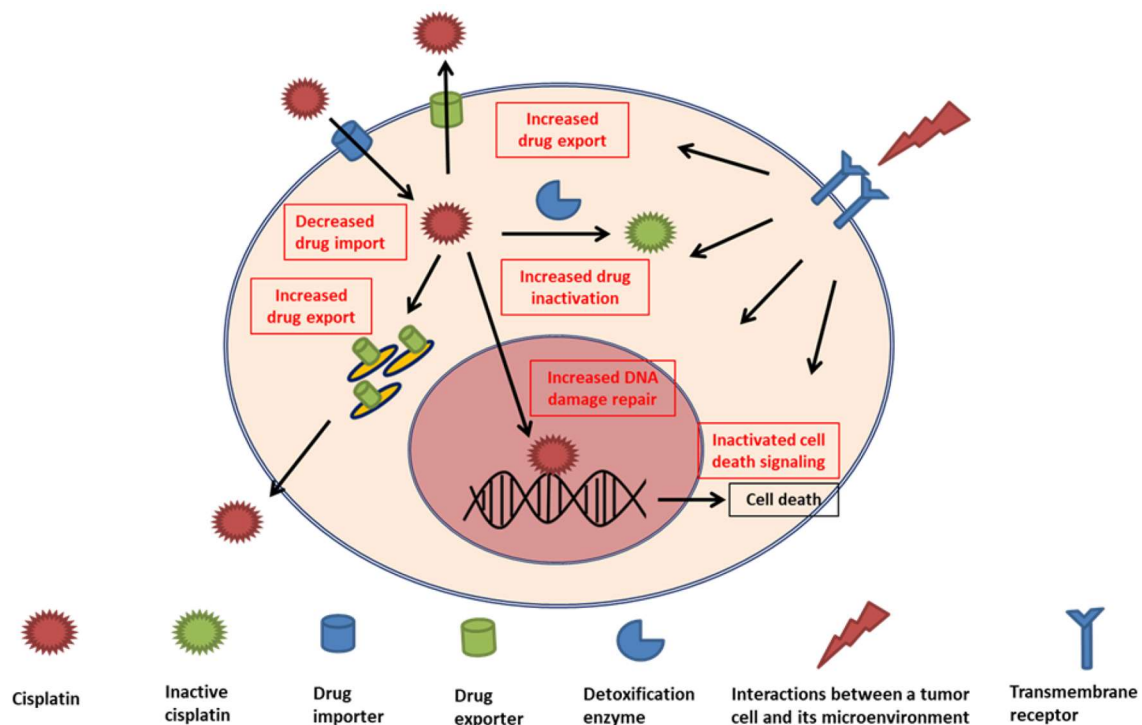


Abbildung 2 Graphische Darstellungen unterschiedlicher Resistenzmechanismen von Tumorzellen gegenüber Cisplatin

(Chen and Chang, 2019).

Weitere Mechanismen sind unter anderem die vermehrte Inaktivierung von Cisplatin im Zytoplasma und eine gesteigerte Reparatur von DNA-Schäden. Da die durch Cisplatin verursachte DNA-Schädigung letztendlich zur Aktivierung der Apoptose führt, ist ein weiterer wichtiger Resistenzmechanismus die Überexpression von anti-apoptotischen Genen der *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) Familie mit einem daraus resultierenden Ungleichgewicht auf Kosten der Apoptose induzierenden Mitglieder (Siddik, 2003).

1.4 Der programmierte Zelltod (Apoptose)

1.4.1 Grundlagen der Apoptose und die Rolle der Caspasen

Der programmierte Zelltod (Apoptose) dient in vielzelligen Organismen der Beseitigung überflüssiger oder geschädigter Zellen. Es handelt sich um einen ATP-abhängigen, strukturierten Mechanismus der Ausdruck von sowohl physiologischen- (Embryogenese, Gewebshomöostase) als auch pathologischen Prozessen (Infektionskrankheiten, Zellschaden durch Noxen) sein kann. Bei der Embryogenese werden Zellen, die nur eine vorübergehende Stützfunktion haben (bspw. die Interdigitalhäute zwischen Fingern und Zehen) durch Apoptose eliminiert. In den Keimzentren von Lymphknoten werden Immunzellen, die körpereigene Strukturen als Fremd erkennen, entfernt, um Autoimmunerkrankungen vorzubeugen. Die Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase hängt von einem ständigen Gleichgewicht zwischen Apoptose (Zelltod) und Mitose (Zellteilung) ab. Diese Wechselwirkung ist besonders in Geweben mit hohem Zellumsatz (bspw. Epidermis, Dünndarmepithel, Hämatopoetisches System) von Bedeutung. Geschädigte, entartete oder infizierte Zellen durchlaufen Apoptose um anschließend von Zellen des Immunsystems phagozytiert zu werden (Hug, 2000).

Apoptotische Zellen lassen sich (Licht-)mikroskopisch von anderen Formen des Zelltods (bspw. Nekrose) anhand charakteristischer phänotypischer Merkmale abgrenzen. Zunächst schrumpft die apoptotische Zelle bei gleichzeitiger Chromatinkondensation (Karyopyknose). Es kommt zur Ausbildung blasenartiger Membranausstülpungen, gefolgt von einer Fragmentierung des Zellkerns (Karyorrhexis). Schließlich „zerfällt“ die Zelle in apoptotische Vesikel (dicht gepackte Zellorganellen umgeben von einer intakten Plasmamembran). Benachbarte Parenchymzellen oder Makrophagen nehmen die Vesikel auf und degradieren deren Inhalt in ihrem Phagolysosom. Die Plasmamembran der apoptotischen Zelle bleibt stets intakt, sodass kein Zellinhalt in den EZR übertritt. Aus diesem Grund werden die Nachbarzellen, im Gegensatz zur Nekrose, nicht in Mitleidenschaft gezogen und keine Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebes ausgelöst (Elmore, 2007).

Apoptotische Stimuli aktivieren komplizierte Signalkaskaden auf molekularer Ebene. Abhängig davon, ob das apoptotische Signal extra- oder intrazellulären Ursprungs ist, werden zwei Pfade unterschieden: Der extrinsische / Todesrezeptor-vermittelte und der intrinsische / mitochondriale Weg. Beide Pfade aktivieren eine Gruppe Aspartat-spezifischer Cystein-Proteasen (Caspasen), welche verschiedene und für das Zellüberleben essenzielle Substratproteine spalten. (Alberts et al., 2017, Van Opendenbosch and Lamkanfi, 2019).

1.4.1.1 Die Rolle der Bcl-2 Familie im intrinsischen Pfad der Apoptose

Die Entscheidung darüber, ob eine Zelle den programmierten Zelltod einleitet oder nicht hängt von äußeren oder inneren Stimuli ab. Interne Stimuli (bspw. DNA-Schädigung oder Wachstumsfaktorentzug) aktivieren den intrinsischen Signalweg der Apoptose. Hauptschauplatz dieses Pfades ist die äußere Mitochondrienmembran (MOM). Die MOM umschließt (zusammen mit der inneren Mitochondrienmembran) den Intermembranraum, welcher Cytochrom c und weitere apoptosefördernde Proteine enthält. Nach der Initiierung der Apoptose führen eine Reihe von Proteininteraktionen auf molekularer Ebene zur Porenbildung in der äußeren Mitochondrienmembran. Dies führt zur Freisetzung von u.a. Cytochrom c in das Zytosol und konsekutiv zur Aktivierung der Caspase-Kaskade. Diese Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP) wird durch die Wechselwirkung der Bcl-2 Familienmitglieder strengstens reguliert (Goldar et al., 2015). **Abbildung 3** zeigt die Mitglieder der Bcl-2 Familie und den intrinsischen und extrinsischen Signalweg.

Die Mitglieder dieser Familie, welche durch gegenseitige Inhibition arbeiten, werden in anti- und pro-apoptotische Gruppen unterteilt. Die anti-apoptotische Gruppe beinhaltet die Proteine Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1 und Bcl-B. Diese binden an und inhibieren somit die pro-apoptotischen Multidomänen-Proteine (Bax und Bak). Darüber hinaus existieren die sogenannten BH3-*only* Proteine. Hierbei handelt es sich ebenfalls um pro-apoptotische Proteine, welche wiederum die anti-apoptotischen Familienmitglieder (Bcl-2, Bcl-xL usw.) inhibieren. Die wichtigsten Mitglieder der BH3-*only* Proteine sind Bik, Bad, Bid, Bim, Bmf, Hrk, Noxa und Puma (Adams and Cory, 2007).

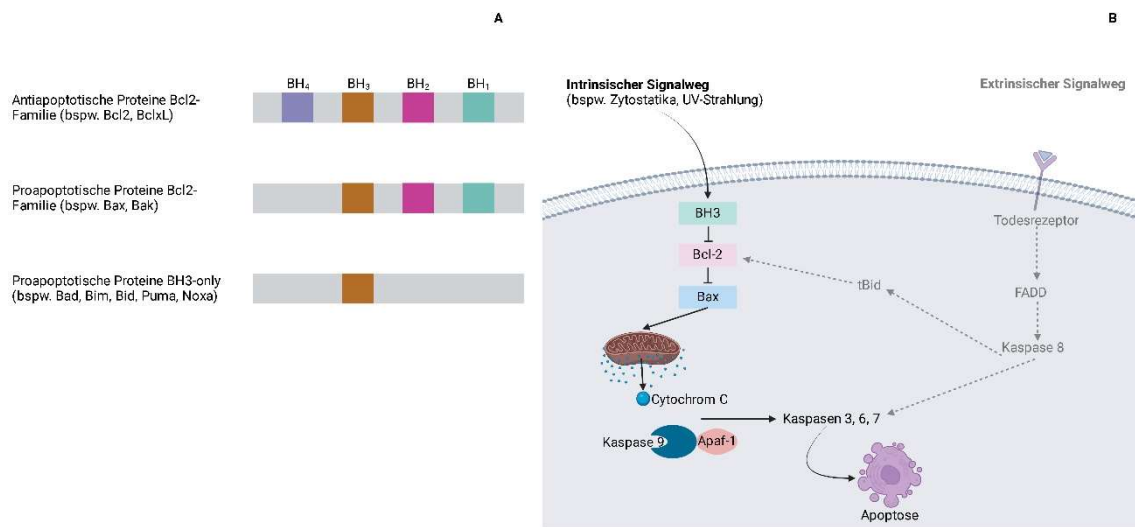


Abbildung 3 Bcl-2 Proteinfamilie & intrinsischer Apoptose-Signalweg

(A) Abgebildet sind die Mitglieder der Bcl-2 Proteine mit graphischer Darstellung der unterschiedlichen BH-Domänen. Die drei Subgruppen weisen jeweils unterschiedliche Anzahlen dieser Domänen auf. Die antiapoptotischen Proteine besitzen insgesamt vier BH-Domänen. Die proapoptotischen Bcl2-Proteine besitzen insgesamt drei, während die sogenannten BH3-only Proteine, welche ebenfalls eine proapoptotische Wirkung entfalten, lediglich eine BH3-Domäne aufweisen. (B) Der Intrinsische Signalweg der Apoptose wird über vielerlei Trigger, bspw. durch UV-Strahlung und Zellschäden durch Zytostatika induziert. Durch eine Aktivierung der proapoptischen BH3-only Proteine wird Bcl-2 inhibiert, welches in Normalzustand Bax inhibiert. Durch die wegfallende Inhibition von Bax kommt es zu einem Ausschütten proapoptischer Substanzen, wie Cytochrom C aus dem Mitochondrium. Dieses wiederum bildet zusammen mit Kaspase 9 und Apaf-1 das Apoptosom. Durch konsekutive Aktivierung weiterer Caspasen wird die Apoptose induziert und die Zelle zerfällt in apoptotische Vesikel. Der extrinsische Signalweg wird über eine Aktivierung des Todesrezeptors eingeleitet. Auch hier führen Signalkaskaden zu einer Aktivierung von Downstream-Caspasen und im Endeffekt zur Induktion des programmierten Zelltodes (Created in <https://BioRender.com>, in Anlehnung an (Alberts et al., 2017, Adams and Cory, 2007)).

Alle Bcl-2 Proteine besitzen mindestens eine Bcl-2 *homology* (BH-) Domäne. Diese ermöglichen die Interaktion mit anderen Familienmitgliedern durch homotypische Bindung. Die drei Subgruppen (anti-apoptotische Bcl-2 ähnliche Proteine, proapoptotische Multidomänenproteine & BH3-only Proteine) weisen eine unterschiedliche Anzahl an BH-Domänen auf. Anti-apoptotische Bcl-2 Proteine verfügen über BH-Domänen 1-4. Die pro-apoptotischen Multidomänenproteine besitzen BH-Domänen 1-3, während die BH3-only Proteine lediglich eine BH3-Domäne aufweisen. Zusätzlich

besitzen manche Proteine eine C-terminale Transmembrandomäne. Diese ermöglicht unter anderem die Verankerung mit der MOM (Adams and Cory, 2007). Die Proteine arbeiten in einer streng festgelegten Hierarchie. Ihr Zusammenspiel entscheidet über die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran:

In gesunden Zellen hindern die anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine, Bax und Bak an der Permeabilisierung der MOM. Bei zellulärem Stress wird die Produktion von BH3-*only* Proteinen hochreguliert. Die BH3-*only* Proteine binden an die anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine, wodurch diese inaktiviert werden (Adams and Cory, 2007). Anders als zunächst angenommen, können nicht alle BH3-*only* Proteine sämtliche Bcl-2 ähnlichen Proteine binden. Chen *et al.* zufolge besitzen lediglich Bim, Puma und tBid diese Fähigkeit, während bspw. Noxa nur an Mcl-1 binden kann (Chen et al., 2005). Inaktivierte Bcl-2 ähnliche Proteine können Bax und Bak nicht mehr binden, sodass diese an die MOM rekrutiert werden und dort homo-oligomerisieren. Dies wiederum führt zur Permeabilisierung der MOM und konsekutiv zur Freisetzung von Cytochrom c und weiteren Apoptose-fördernden Substanzen aus dem Intermembranraum (Adams and Cory, 2007).

Im Zytosol bildet Cytochrom c mit *Apoptotic protease-activating factor 1* (Apaf-1), Desoxyadenosintriphosphat (dATP) und Procaspase 9 das Apoptosom, welches die Caspase-Kaskade auslöst und über Spaltung zahlreicher Substratproteine den kontrollierten Zelltod einleitet (Van Opdenbosch and Lamkanfi, 2019).

Zur Aufrechterhaltung der Homöostase ist ein ständiges Gleichgewicht der anti-apoptotischen und BH3-*only* Familienmitglieder essenziell. Durch die Aktivität, aber auch die Expression der verschiedenen Proteinsubgruppen kann die intrinsische Apoptose eingeleitet bzw. aufgehalten werden. Folgerichtig ist sowohl die Überexpression anti-apoptotischer Bcl-2 Proteine, als auch ein Funktionsverlust pro-apoptotischer Familienmitglieder eine nicht zu unterschätzende Ursache sowohl für die Entstehung von Neoplasien als auch der Entwicklung von Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika (Adams and Cory, 2007, Merino et al., 2016). Beispielsweise ergaben *Messenger RNA* (mRNA) Expressionsanalysen von 60 Zelllinien des *National Cancer Institutes* (NCI)

eine hohe Korrelation zwischen BCL-X_L Expression und der Resistenz von Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika (Amundson et al., 2000).

Diese Erkenntnisse haben die Entwicklung einer neuen Medikamentenklasse namens BH3-Mimetika beflügelt.

1.4.2 BH3-Mimetika (Venetoclax und S63845)

Um den intrinsischen Apoptosepfad einzuleiten, müssen BH3-only Proteine ihre anti-apoptotischen BCL-2 Familienmitglieder binden und inaktivieren. Zahlreiche Mechanismen, wie bspw. eine fehlende Aktivierung der BH3-only Proteine durch das Tumorsuppressorprotein p53 (welches in zahlreichen Krebsarten mutiert ist) oder eine gesteigerte Genexpression der pro-apoptotischen Bcl2-Proteine können diesen Prozess stören. Die Folge ist eine defekte Ausführung der Apoptose. Konventionelle Chemotherapeutika, wie bspw. Cisplatin, welche auf die reibungslose Ausführung des programmierten Zelltodes angewiesen sind, werden hierdurch in ihrer Wirksamkeit eingeschränkt (Delbridge and Strasser, 2015, Adams and Cory, 2018). Dies gilt auch für Patienten mit MIBC: Steele et al. zufolge weisen 50 % dieser Patienten eine Resistenz gegenüber Cisplatin auf. Die fehlerhafte Ausführung der intrinsischen Apoptose ist eine Ursache hierfür (Steele et al., 2019).

Diese Erkenntnisse führten zur Entwicklung einer neuen Medikamentenklasse namens BH3-Mimetika. Die Mitglieder dieser Wirkstoffgruppe ähneln in Ihrem molekularen Aufbau der BH3-Domäne der pro-apoptotischen BH3-only Proteine. Dies ermöglicht es ihnen an die BH-Domänen der anti-apoptotischen Bcl2-Proteine zu binden, diese zu inhibieren und somit die defekte intrinsische Apoptose zu reaktivieren (Merino et al., 2018).

Wie ihre biologischen Vorbilder (BH3-only Proteine) weisen unterschiedliche BH3-Mimetika unterschiedliche Affinitäten zu den verschiedenen Bcl2-Proteinen auf. Das erste entwickelte BH3-Mimetikum trägt den Namen ABT-737 und bindet, wie sein orales Derivat (Navitoclax), mit einer hohen Affinität an die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL. Da die Inaktivierung von Bcl-xL eine therapielimitierende

Thrombozytopenie hervorrufen kann, wurde der selektive Bcl-2 Inhibitor Venetoclax (VTX) entwickelt, welcher diese Nebenwirkung nicht aufweist ([Souers et al., 2013](#)). VTX wurde von der amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) als erstes BH3-Mimetikum für die Behandlung der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) im Refraktär- und Rezidivfall zugelassen. Die Zulassungsstudien zeigten eine 79 % Ansprechrate, sowie eine Komplettremission bei 20 % der behandelten Patienten. Darüber hinaus existieren weitere BH3-Mimetika mit unterschiedlichen anti-apoptotischen Zielproteinen ([Adams and Cory, 2018](#)).

Im selben Jahr, in der die FDA-Zulassung von Venetoclax erfolgte, beschrieb die Arbeitsgruppe Kotschy et al. ein neuartiges BH3-Mimetikum namens S63845, welches spezifisch das anti-apoptotische MCL1 bindet und inhibiert. In dieser Studie konnte eine hohe Wirksamkeit des Medikaments gegen unterschiedliche hämatologische Neoplasien und Karzinomtypen sowohl in Zellkultur- als auch Murinen-modellen nachgewiesen werden. Eine Zulassung der FDA ist bislang noch nicht erfolgt ([Kotschy et al., 2016](#)).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Das lokal fortgeschrittene bzw. metastasierte Urothelkarzinom stellt auch heute noch eine therapeutische Herausforderung dar. Zusätzlich zur lokalen Therapie - im lokalisierten und lokal fortgeschrittenen Stadium - spielen systemische Therapieansätze, sowohl perioperativ als auch vor allem im metastasierten Stadium, eine wesentliche Rolle. Die Verbesserungswürdigen Ergebnisse der platinhaltigen Chemotherapieprotokolle und der modernen Checkpoint Inhibition unterstreichen jedoch die Notwendigkeit individualisierter Therapiestrategien. Dreidimensionale Organoidmodelle könnten, als vielversprechende neuartige Form der Zellkultur, in Zukunft als präklinische Modelle zur Testung unterschiedlicher Medikamentenkombinationen im individuellen Setting eingesetzt werden. Die erfolgreiche Etablierung solcher Organoidmodelle aus unterschiedlichsten Karzinomtypen wurde bereits in zahlreichen wissenschaftlichen Publikationen bewiesen, wie in Kapitel 1.2.3 beschrieben wurde. Jedoch ist die Datenlage beim Urothelkarzinom, bei welchem solche individualisierten Plattformen dringend benötigt werden, gering (Melzer et al., 2022). Zum Zeitpunkt dieser Arbeit stammte das vielversprechendste Paper von der Arbeitsgruppe um Lee et al. Ihnen gelang es, mit einer Erfolgsquote von 70 %, 20 Urothelkarzinomorganoidlinien herzustellen (Lee et al., 2018).

Vor diesen Hintergründen wurden die Ziele der vorliegenden Arbeit wie folgt definiert: Zunächst sollte eine zuverlässige und reproduzierbare Methode zur Herstellung von Organoiden aus Urothelkarzinomgewebe etabliert werden. Hierfür wurden Patienten der Universitätsklinik für Urologie Tübingen und der Urologischen Klinik des Kreisklinikums Reutlingen rekrutiert. Das Tumormaterial stammte aus TUR-B, Zystektomie und Nephroureterektomie-Präparaten. Um die Methodik der Organoidherstellung zu verbessern wurde untersucht, inwiefern Patienten- und Tumorspezifische Parameter einen Einfluss auf die Methodik ausübten. Um weiterführende Experimente mit selbst generierten Organoiden durchzuführen, bedarf es einer stabilen Linie, welche über mehrere Passagen kultiviert werden kann. Dies war das nächste Ziel unserer Arbeit.

Der zweite Teil dieser Arbeit umfasste Zytotoxizitätsanalysen an einer von uns hergestellten Organoidlinie. Hierfür wurde zunächst die Suszeptibilität der Linie auf das standardmäßig verwendete Alkylans Cisplatin untersucht. Darüber hinaus untersuchten wir den zytotoxischen Effekt einer Kombinationstherapie aus Cisplatin und den BH3-Mimetika Venetoclax und S63845.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Computerprogramme

Tabelle 3 Verwendete Computerprogramme

Programm	Version	Software-Anbieter
Microsoft Word	16.78	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Microsoft Excel	16.78	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
ProgRes® CapturePro	2.8.8	Jenoptik
GraphPad Prism	10.0.3	GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA

2.1.2 Geräte

Tabelle 4 Verwendete Maschinen und Geräte

Gerät	Hersteller
Axiovert 135 Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy, Jena, DE
Biofuge fresco Zentrifuge	Heraeus Holding, Hanau, DE
Centrifuge 5810R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
HERAcell 240i CO ₂ Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Ulm, DE
HERAsafe Zellkulturbank	Heraeus Holding, Hanau, DE
Kühlschrank 4°C	Liebherr, DE
LaminAir Serien-Nr.: HBB 2448	Heraeus Holding, Hanau, DE
Pipetus Pipettierhelfer	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, DE
Premium NoFrost -20°C Gefrierschrank	Liebherr, DE
Mr. Frosty Einfrierbehälter	Thermo Fisher Scientific, Ulm, DE
Mechanische Pipette	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
0,5 – 10 µl	
10 – 100 µl	
20 – 200 µl	
100 – 1000µl	
Vacunsafe Sicherheits-Absaugsystem	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, CHE
Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
ECLIPSE TS 100 Mikroskop	Nikon, Minato, Japan
BBD 6220 CO ₂ -Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Ulm, DE
ProgRes® CT3 USB Mikroskopkamera	Jenoptik, Jena, DE

Pipetus Pipettierhelfer	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, DE
Wasserbad 37°C	Köttermann, Uetze, DE
LA 120 S Präzisionswaage	Sartorius, Göttingen, DE
Esprimo E5730 PC	Fujitsu, Minato, Japan
Mechanische Pipette	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
0,5 – 10 µl	
10 – 100 µl	
20 – 200 µl	
100 – 1000 µl	

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
CELLSTAR® Tubes 15ml, 50ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
EASYstrainer™ Zellsieb 70µm, 100µm	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Stripette® serologische Einwegpipette 5ml, 10ml, 25ml, 50ml	Corning Inc., Corning, USA
Chirurgische Einmal-Skalpelle	B Braun SE, Melsungen, DE
CELLSTAR® 24 Well, 48 Well, 96 Well Zellkultur Platte	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
CELLSTAR® Petrischale 60x15mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Safe-Lock Tubes 1.5mL	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Zellkulturschale 9.2cm ²	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Zellsieb 40µm Nylon	Corning Inc., Corning, USA

Medizinische Handschuhe	Abena, Aabenraa, DNK
Pipettenspitzen	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Tissue-Tek® Cryomold®	Sakura Finetek Germany GmbH, Umkirch, DE
Cryovial 2ml Einfrierröhrchen	Greiner-Bio-One, Frickenhausen, DE
Spritzenvorsatzfilter 0,45µm	Merck, Darmstadt, DE

2.1.4 Zusätze und Chemikalien

Tabelle 6 Verwendete Zusätze und Chemikalien

Name	Hersteller
Cultrex Basement Membrane Extract Typ II (Reduced Growth Factor)	Bio-Techne, Minneapolis, USA
Charcoal dextran-coated, C6241	Sigma-Aldrich Chemie, St. Louis, USA
Fetal bovine serum (FBS)	Sigma-Aldrich Chemie, St. Louis, USA
Epidermal growth factor (EGF)	Corning Inc., Corning, USA
Gibco Glutamax 100X	Thermo Fisher Scientific, Ulm, DE
Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Ulm, DE
Primocin	InvivoGen, Toulouse, FR
Gibco Trypanblaue Lösung 0,4%	Thermo Fisher Scientific, Ulm, DE
Y-27632	Hözel Diagnostika Handels GmbH, Köln, DE
CellTiter® Blue Zellviabilitäts-Assay	Promega, Wisconsin, USA
Gibco GlutaMAX™ - (100X)	Thermo Fisher Scientific, Ulm, DE

Gibco Advanced DMEM / F12 (1X)	Thermo Fisher Scientific, Ulm, DE
Gibco RPMI Medium 1640 (1X)	Thermo Fisher Scientific, Ulm, DE
Gibco DPBS (1X)	Thermo Fisher Scientific, Ulm, DE
<i>Hepatocyte Defined Medium</i>	<i>CORNING BioCoat™</i>
<i>HHMM (ready to use)</i>	<i>PRIMACYT</i>
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt, DE

2.1.5 Enzyme

Tabelle 7 Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
Gibco Kollagenase Typ II	Thermo Fisher Scientific, Ulm, DE
Kollagenase / Hyaluronidase 10X (C/H)	STEMCELL Tech., Vancouver, CA
Dispase, Animal Component-Free (ACF)	STEMCELL Tech., Vancouver, CA
TrypLE Express	Thermo Fisher Scientific, Ulm, DE

2.1.6 Medikamente

Tabelle 8 Verwendete Medikamente

Medikament	Hersteller
Cisplatin	Sigma-Aldrich, Deutschland
Venetoclax (VTX)	Selleck Chemicals, Houston, Texas
S63845	Selleck Chemicals, Houston, Texas

2.1.7 Zellkulturmedien

Tabelle 9 Verwendete Zellkulturmedien

Medium	Inhalt
HCM Medium	500 ml Hepatocyte Culture Media (HCM) 5 µg Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) 5 ml (100X) Glutamax 1ml (50mg/ml) Primocin
Transportmedium	500 ml Advanced DMEM/F12(1X) 1ml (50mg/ml) Primocin
Nährmedium 1 (Tag 0-7)	95% HCM 5% Charcoal-stripped fetal bovine serum (csFBS) 0.1% Y-27632
Nährmedium 2 (Ab Tag 8)	95% HCM 5% csFBS
Gefriermedium	50% RPMI Medium 1640 30% csFBS 20% DMSO

2.2 Methoden

2.2.1 Humanes Urothelkarzinom Gewebe (Patientenkollektiv)

Humanes Urothelkarzinom Gewebe wurde in Kooperation mit der Urologischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen und der Urologischen Klinik des Klinikums am Steinberg, Reutlingen (Akademisches Lehrkrankenhaus Tübingen) gewonnen. In die Studie eingeschlossen wurden Patienten, welche aufgrund einer malignen Veränderung bzw. des Verdachts auf eine maligne Veränderung des Urothels eine der folgenden Operationen erhielten: 1) Transurethrale Resektion der Blase (TUR-B); 2) Zystektomie (Cx); 3) Nephroureterektomie. Es wurden sowohl Primär- als auch Rezidivtumoren eingeschlossen. Eine vorherige Selektion der Patienten fand nicht statt. Die Auswertung der Patientendaten und Pathologischen Klassifikation des Primärtumors wurde retrospektiv durchgeführt. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Eberhard-Karls-Universität Tübingen (Nr. 869/2018 B02) und der Landesärztekammer Baden-Württemberg (Nr. B-F-2019-049) genehmigt. Die Einverständniserklärung der Patienten lag vor.

2.2.1.1 Probentransport – Transurethrale Resektion der Blase (TUR-B)

Das Tumormaterial wurde direkt nach der Entnahme im OP in ein mit 2 ml Transportmedium (2.1.7) gefülltes Reaktionsgefäß überführt und an das Labor versandt. Die Transportzeit variierte zwischen 10 und 30 min.

2.2.1.2 Probentransport – Zystektomie (Cx) und Nephroureterektomie (Nux)

Das Blasen- bzw. Nierenteilresektat wurde sofort nach der Entnahme im OP in die Pathologie gebracht und dort im Zuschnitt makroskopisch von einem Pathologen/-in beurteilt. Von dem als Tumor identifizierten Areal wurde ein Teil für die Studie

entnommen und in einem mit 2 ml Transportmedium (2.1.7) gefüllten Reaktionsgefäß an das Labor versandt. Wenn möglich wurde ebenfalls ein Teil des makroskopisch gesunden Gewebes entfernt und für die Studie verwendet.

2.2.2 Zellkultur-Methoden

Die Kultivierung der Organoide fand stets unter sterilen Bedingungen statt. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle zellbiologischen Methoden in einer Sterilbank (2.1.2) durchgeführt. Alle Medien und Lösungen wurden vor Gebrauch entweder unter Verwendung eines 37 °C Wasserbades (2.1.2) oder bei Raumtemperatur erwärmt. Lediglich BME Typ II wurde über Nacht bei Kühlschranktemperaturen aufgetaut. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ und Luftfeuchtigkeitsgesättigt in einem Brutschrank. Ein kompletter Mediumwechsel erfolgte i.d.R. alle 7 Tage. Alle 2-3 Tage wurde frisches Medium hinzugegeben.

2.2.2.1 Hergestellte Medien

2.2.2.1.1 Aktivkohle behandeltes Serum

Für die Herstellung des hormoneprivierten fetalen Kälberserums (*Charcoal-stripped fetal bovine serum*, csFBS) wurde 50 ml fetales Kälberserum (FBS) (2.1.4) zunächst für 30 min bei 56 °C im Wasserbad hitzeinaktiviert. Das inaktivierte Serum wurde anschließend mit 1 g *Dextran coated charcoal* (2.1.4) vermischt und für 12 Stunden bei 4 °C auf einem Schütteltisch bei 45 Umdrehungen/min inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch für 15 min bei 2000 g zentrifugiert, um die Aktivkohle zu pelletieren. Der Überstand wurde abgenommen und je nach Bedarf ein weiteres Mal zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mithilfe eines 0,45 µm Filters (2.1.3) steril filtriert, in 25 ml Aliquots aufgeteilt und bei – 20 °C aufbewahrt.

2.2.2.1.2 Nährmedium (HCM+5% csFBS (+Y-27632))

Das Organoid-Nährmedium wurde, aufbauend auf die Vorarbeit von Dominik Daub, analog zur Publikation der Arbeitsgruppe um Lee *et al.* modifiziert (Lee *et al.*, 2018).

Im ersten Schritt wurden 1 ml EGF, 5 ml (100X) Glutamax und 1 ml Primocin (50 mg / ml) zu 500 ml *Hepatocyte Defined Medium* (2.1.4) pipettiert um *Hepatocyte Complete Media* (HCM) herzustellen. Das Gemisch konnte anschließend für 1 Monat im Kühlschrank bzw. bei -80 °C für mehrere Monate aufbewahrt werden.

Zu 47,5 ml HCM wurde 2,5 ml csFBS (2.2.2.1.1) gegeben um das fertige Nährmedium 2 HCM + 5 % csFBS herzustellen. In den ersten 7 Tagen nach der Probenverarbeitung bzw. Passagieren der Organoide wurde Nährmedium 1 verwendet, welches zusätzlich durch den Rho-kinase (ROCK) Inhibitor Y-27632 angereichert wurde. Hierfür wurde 1 µl/ml Y-27632 zu HCM + 5 % csFBS gegeben. Nach der Herstellung war das Gemisch für 7 Tage bei 4 °C haltbar.

2.2.2.1.3 Transport- und Arbeitsmedium (RPMI + 10 % FBS + 1% P/S)

Der Transport der Tumorproben in das Labor und die Verarbeitung der Probe in Einzelzellen erfolgte in Transportmedium: Es wurden zu 500 ml RPMI 1640 (1X) 50 ml FBS und 5 ml Penicillin / Streptomycin (P/S) pipettiert und das Gefäß mehrmals invertiert. Anschließend wurde das Transportmedium (RPMI + 10 % FCS + 1 % P/S) in 50 ml Gefäße aliquotiert und bei 4 °C im Kühlschrank (für kürzere Zeit) bzw. bei -20 °C (für längere Zeit) aufbewahrt.

2.2.2.1.4 Gefriermedium

Zur Herstellung des Gefriermediums wurde DMSO zu fertigem Nährmedium 2 (2.2.2.1.2) in einer Endkonzentration von 20 % (10 ml DMSO / 40 ml Nährmedium 2) gegeben.

2.2.2.2 Vitalitätsbestimmung und Zellzählung

Zur Etablierung einer Organoidkultur wurde eine Vitalitätsbestimmung durchgeführt und die passende Konzentration an Einzelzellen / Organoiden ermittelt. Hierfür wurde der Farbstoff Trypanblau (2.1.4) verwendet. Gesunde Zellen, welche eine intakte Zellmembran besitzen, nehmen den Farbstoff nicht auf. Geschädigte bzw. verletzte Zellen hingegen sind aufgrund einer Barrierestörung nicht in der Lage den Farbstoff abzuweisen. Dies ermöglicht eine lichtmikroskopische Vitalitätsbestimmung.

In einer 96 Well Zellkulturplatte wurden zu 10 µl Zellsuspension, 10 µl des Farbstoffes pipettiert und mittels einer Pipette durchmischt. Anschließend wurden 10 µl des Gemischs in eine Kammer eines Neubauer Hämozytometers pipettiert. Die nicht angefärbten vitalen Zellen wurden lichtmikroskopisch bei 10-facher Vergrößerung gezählt und die gewünschte Konzentration von 2×10^6 Zellen / ml mittels Verdünnung unter Verwendung der folgenden Formel eingestellt:

$$\text{Konzentration} = \frac{1 + 2 + 3 + 4}{4} \times 2 \times 10^6 \text{ Zellen/ml}$$

2.2.2.3 Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung wurden 2×10^6 Zellen in 1 ml Nährmedium für 1 min auf Eis inkubiert und anschließend wurde 1 ml kaltes Gefriermedium zu den Zellen pipettiert. Darauffolgend wurden die Zellen in ein Kryoröhrchen überführt und in einem vorgekühltem Polykarbonat Kühlbehälter für 48 Stunden (Mr. Frosty; 2.1.2) bei -80°C gelagert. Der Kühlbehälter ermöglichte eine Kühlrate von $-1^\circ\text{C} / \text{min}$. Danach konnten die Kryoröhrchen entnommen und für Langzeit bei -80°C gelagert werden.

2.2.3 Probenaufarbeitung und Organoidkultur

2.2.3.1 Herstellung von Urothelkarzinomorganoiden

Für die Herstellung von Tumororganoiden wurde das Tumorgewebe mechanisch zerkleinert, enzymatisch, mittels Kollagenase / Hyaluronidase (C/H) zu einer Einzelzellsuspension verdaut, mittels eines 70 µm Filters filtriert und die so gewonnenen Einzelzellen gezählt. Anschließend wurden die Zellen mit Matrigel (BME Typ II) vermischt und mit Organoid Nährmedium 1 (2.2.2.1.2) kultiviert.



Abbildung 4 Herstellung von Urothelkarzinomorganoiden aus Operationsmaterial.

Vereinfachte Darstellung des Prozessablaufes der Organoidetablierung: Das Tumormaterial wurde aus einer der folgenden Operationen gewonnen: Zystektomie (Cx), Transurethrale Resektion der Blase (TUR-B), Nephroureterektomie (Nux) und Lymphonodektomie (LK). Für die Kultivierung wurde das Tumorgewebe zunächst mechanisch zerkleinert und anschließend enzymatisch mittels Kollagenase / Hyaluronidase (C/H) verdaut. Die so gewonnene Einzelzellsuspension wurde filtriert, mittels der „hangig drop“ Methode in Matrigel eingebettet und anschließend bei 37 °C inkubiert. Das Zellkulturmedium wurde regelmäßig gewechselt.

Zur Gewebedissoziation wurde der Tumor in 500 – 1000 µl DPBS mittels Skalpell mechanisch zerkleinert. Das zerkleinerte Gewebe wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß gegeben und für 10 min bei 480 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Reaktionsgefäß wurde mit 1000 µl Arbeitsmedium (2.2.2.1.3) pro 100 mg Gewebe aufgefüllt. Zur enzymatischen Dissoziation der Kollagenfibrillen wurde 15 µl Kollagenase / Hyaluronidase (2.1.5) pro 100 µl Arbeitsmedium hinzugefügt und das Gemisch in einem Brutschrank bei 37 °C für 30 min inkubiert. Anschließend wurde nochmals dieselbe Menge an C / H hinzugegeben und die Probe für weitere 30 min

inkubiert. Nach der Inkubationsperiode von 60 min wurde das Reaktionsgefäß mit DPBS aufgefüllt und die Tumorzellen anschließend mittels eines 70 µm Zellsiebes (2.1.3) filtriert. Wenn das Material nach der Verdauung noch sehr dickflüssig war, wurde zuvor ein 100 µm Zellsieb (2.1.3) verwendet. Die Tumorzellen wurden mittels Zentrifugation (5 min bei 150 g) pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in ca. 1000 µl Nährmedium (HCM + 5 % csFBS) resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt (2.2.2.2), und die gewünschte Konzentration von 2×10^6 Zellen / ml eingestellt.

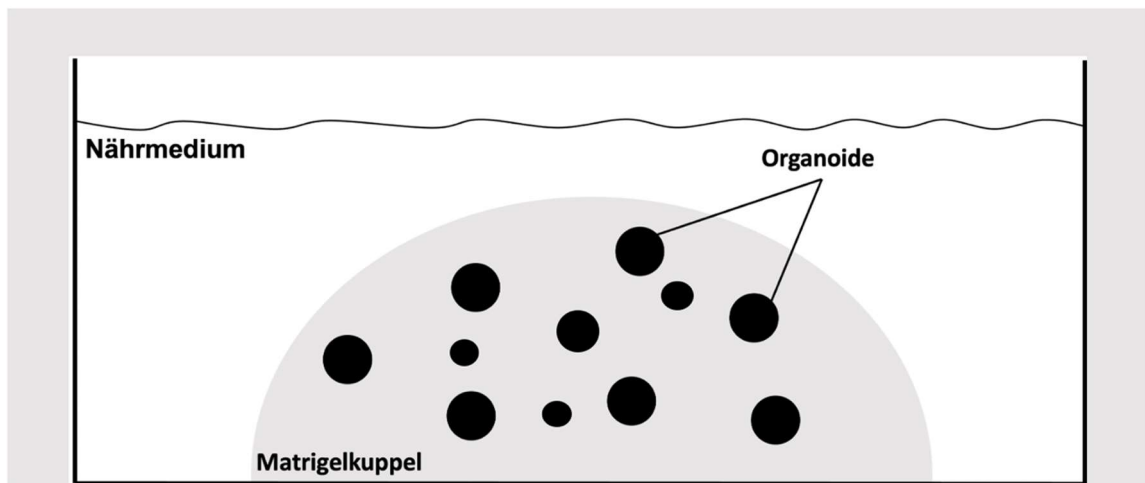


Abbildung 5 Querschnitt Matrigelkuppel mit Organoiden.

Graphische Darstellung einer Organoidkultur. Abgebildet ist ein Well einer Zellschale im Querschnitt. Der graue Halbkreis stellt die Matrigelkuppel dar, welche von Nährmedium bedeckt ist. Innerhalb des Matrigels befinden sich Organoiden unterschiedlicher Größe, dargestellt durch die dunklen Kreise.

Matrigel (BME Typ II) wurde verwendet, um die dreidimensionale Struktur der Organoiden zu ermöglichen. Die Handhabung von BME erfordert besondere Vorsicht, um eine vorzeitige Polymerisierung (Verfestigung) des Gels zu vermeiden. Vorbereitete Eppendorfgefäße, welche jeweils 200 µl Matrigel enthielten wurden bei -80 °C gelagert. Am Vortag wurden diese in einen Kühlschrank mit einer Temperatur von 4 °C gestellt, um das langsame Auftauen über Nacht, ohne Polymerisierung zu ermöglichen. Sämtliche Zellkultur Schritte, welche das Verwenden von Matrigel benötigten, wurden auf Eis durchgeführt. Die Tumorzellen wurden für kurze Zeit auf Eis gestellt und anschließend

mit 30 µl Matrigel pro 10 µl Zellsuspension vermischt. Anschließend wurden jeweils 40 µl des Gemischs in einen Well einer – im Brutschrank auf 37 °C aufgewärmten - 24 Well Platte pipettiert. Dies ergab eine „Kuppelartige“ Struktur aus Matrigel und Zellsuspension. Nachdem alle Wells ausplattiert waren, wurde die Platte rasch um 180 ° gedreht und „kopfüber“ für 15 min in den Brutschrank (37 °C bei 5 % CO₂) gestellt. Das Matrigel haftete nun an der Platte, während die Zellen im Inneren der Kuppel mittels Schwerkraft nach unten sanken. Das Matrigel verfestigte sich langsam und ermöglichte so eine Verteilung der Zellen innerhalb der Kuppel. Anschließend wurde die Platte umgedreht und 500 µl Nährmedium 1 zu jedem Well gegeben. Die anschließende Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂.

2.2.3.2 Passagieren

Unter der Passagierung einer Organoidkultur versteht man den enzymatischen Verdau von Organoiden zu Einzelzellen, um diese erneut auszuplattieren. Mithilfe verschiedener Enzyme wurde zunächst die Matrigelkuppel und anschließend der Zellverband aufgelöst. Die so gewonnen Einzelzellen wurden anschließend erneut mit Matrigel vermischt und kultiviert. Organoidkulturen wurden dann passagiert, wenn ein Well dicht mit Organoiden besiedelt war oder sich die dreidimensionale Struktur eines Organoids auflöste.

Zur Auflösung der Matrigelkuppel wurde das Nährmedium abgesaugt und durch 400 µl Dispase (2.1.5) und 200 µl HCM (ohne csFBS) ersetzt. Anschließend wurde die Platte für 1 Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension mittels Pipette in ein 15 ml Reaktionsgefäß pipettiert und für 5 min bei 150 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 1 ml TrypLE (2.1.5) pro Well resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurde die Zellsuspension mittels 1000 µl Pipette mehrmals auf- und abgesaugt, um eine weitere Zerkleinerung zu bewirken. Daraufhin wurde das Reaktionsgefäß mit Arbeitsmedium (2.2.2.1.3) aufgefüllt, um die Enzymkonzentration zu verdünnen und den Verdauvorgang zu beenden. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 5 min bei 150 g. Das Ausplattieren der Zellen in Matrigel wurde mittels der in Kapitel

2.2.3.1 beschriebenen Methode, zur Herstellung von Urothelkarzinomorganoiden, durchgeführt.

2.2.4 Zytotoxizitätsanalysen

Die Zytotoxizitätsanalysen wurden an der von uns etablierten Organoidlinie *BCO#56* (3.6) in Duplikaten durchgeführt. Untersucht wurde der zytostatische Effekt von CP, VTX und S63845.

Die Stammlösungen (2.1.6) der unterschiedlichen Medikamente hatten jeweils die folgenden Konzentrationen: CP: 3,3 Millimolar (mM); VTX: 10 mM; S63845: 10 mM. Diese wurden nach Ankunft im Labor bei -20 °C gelagert. Am Tag der Behandlung wurde die benötigte Menge an Stammlösung bei Raumtemperatur und lichtgeschützt aufgetaut.

Mittels der in Kapitel 2.2.3.2 beschriebenen Methode wurden anschließend 6 Wells der *BCO#56* Kultur mit Dispase behandelt, um die jeweilige Matrigelkuppel aufzulösen und die Organoide freizusetzen. Während der 60 - minütigen Inkubationsperiode wurden die gewünschten Konzentrationen der Zytostatika durch Mischung von absteigenden Volumina der Stammlösungen mit der entsprechenden Verdünnungslösungen hergestellt. Für CP wurde hierfür DPBS und für VTX bzw. S63845 entsprechend DMSO verwendet. Die Volumina der zugegebenen Verdünnungslösungen wurden entsprechend angepasst, so dass jeweils ein Endvolumen von 20 µl pro gewünschter Konzentration erzielt wurde. Mittels dieses Verfahrens wurden die in **Tabelle 10** aufgelisteten Zytostatikakonzentration hergestellt.

Tabelle 10: Monotherapie Zytotoxizitätsanalyse: Verwendete Konzentration von Cisplatin (CP), Venetoclax (VTX) und S63845

Cisplatin (CP)	Venetoclax (VTX)	S63845	Einheit
66	25	25	µM
33	10	10	µM
25	4	4	µM
12,5	1,6	1,6	µM
6,25	0,64	0,64	µM
3,125	0,256	0,256	µM
1,5625	0,1024	0,1024	µM

Die freigesetzten Organoide wurden anschließend in 4800 µl HCM + 5 % csFBS + 360 µl BME suspendiert und gleichmäßig (100 µl Organoidsuspension / Well) in einer 96-Well Platte ausgesät. Während der Aussaat wurde die Organoidsuspension regelmäßig vermischt, um eine gleichmäßige Verteilung der Organoide auf die entsprechenden Wells zu erzielen. Daraufhin wurde zu jedem Well 1 µl der Arbeitslösung pipettiert um die in **Tabelle 10** aufgelisteten Konzentrationen zu erreichen. Die Organoide wurden für 72 h im Brutschrank (37 °C und 5 % CO₂) inkubiert.

Zusätzlich zu dieser Monotherapie wurde die Auswirkung einer Kombinationstherapie aus CP und VTX auf die Zellviabilität getestet. Die verwendeten Konzentrationen der beiden Medikamente sind in **Tabelle 11** aufgelistet.

Tabelle 11: Kombinationstherapie CP und VTX - Konzentrationen

Kombination	CP	VTX	Einheit
CP + VTX high	25	10	μM
CP + VTX med	25	1,6	μM
CP + VTX low	25	0,1	μM

Als Kontrollen wurden DPBS für CP und DMSO für VTX und S63845 verwendet.

2.2.4.1 Bestimmung der Zellviabilität

Nach der 72 - stündigen Inkubationsperiode der Organoide mit den entsprechenden Medikamenten (Kapitel 2.2.4) erfolgte die Viabilitätsmessung unter Verwendung des CellTiter® -Blue Viabilitätsassays (Promega). Analog zu Herstellerangaben wurden zu jedem Well 20 μl der CellTiter®-Blue Reagenz pipettiert und das Gemisch für mindestens 1 h inkubiert (RICH MORAVEC and RISS, 2003). Anschließend erfolgte die Absorptionsmessung bei 530(25) / 590(35) nm Wellenlänge (Hertie-Institut für klinische Hirnforschung).

2.2.5 Statistische Auswertung

Die Analyse und statistische Auswertung der Rohdaten der Zytotoxizitätsanalysen (2.2.4) erfolgte mittels Microsoft Excel (Version 16.78) und GraphPad Prism (Version 10.0.3). Aus den ermittelten Absorptionswerten der einzelnen Wells wurden die Mittelwerte berechnet. Anschließend wurde von jeder Einzelmessung der Mittelwert des jeweiligen Verdünnungslösung (Zellkulturmedium für CP bzw. DMSO für VTX und S63845) subtrahiert, um die Eigenfluoreszenz der jeweiligen Verdünnungslösungen nicht in die Statistik mit einzubeziehen. Ferner dienten mittels Verdünnungslösung (Zellkulturmedium bzw. DMSO) behandelte Organoide als Kontrolle zur Berechnung des

Änderungsfaktors. Die so ermittelten Werte wurden verwendet, um den x-fold-Wert zu berechnen. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz der Kombinationstherapien wurden die Variationen des errechneten x-fold-Change durch Interferenzstatistik, mittels T-Test und ANOVA analysiert.

Die statistische Auswertung der Einflussparameter auf das Organoidwachstum (3.4) erfolgte unter Verwendung des Chi-Quadrat-Tests.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenmaterial

Im Rahmen der Studie wurden 65 Patientenproben zur Weiterverarbeitung an das Labor gesandt. Hiervon wurden insgesamt 10 Proben aus der Auswertung entfernt: In vier Cx-Fällen wurde neben Tumorgewebe, auch ein Präparat aus makroskopisch gesunden Arealen von Harnblasenresektaten eingesandt. Da das Ziel der Arbeit die Etablierung von Organoiden aus Urothelkarzinomgewebe war, wurden diese nicht in die endgültige Auswertung inkludiert. Darüber hinaus wurden weitere 6 Proben nicht für die Auswertung verwendet: Eine davon wurde beim Transport ins Labor beschädigt, so dass eine Weiterverarbeitung nicht möglich war. Bei vier Proben wurde im Rahmen der pathologischen Analyse kein Urothelkarzinom nachgewiesen. Bei diesen Patienten wurde ein harnblaseninfiltrierendes Prostatakarzinom, Urozystitis, Nierenzellkarzinom und ein Onkozytom nachgewiesen. Das letzte aus der Auswertung genommene Präparat war aufgrund von Kauterisierungsartefakten nicht beurteilbar.

In die Auswertung inkludiert wurden somit 55 Proben, welche von 52 Patienten stammten. Bei drei dieser Patienten wurde zusätzlich zum Zystektomiepräparat auch ein Lymphknotenresektat eingesandt. 45 Präparate stammten von Patienten der Urologischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen und 10 Proben von Patienten der Urologischen Klinik des Klinikums am Steinenberg, Reutlingen.

3.2 Beschreibung des Patientenkollektivs

Von den insgesamt 52 in die Studie inkludierten Patienten wurden 38 (73 %) mittels TUR-B operiert. 12 Patienten (23 %) erhielten eine Zystektomie, während 2 Patienten (4 %) einer Nephroureterektomie unterzogen wurden.

19 Patienten (37 %) wiesen bereits Voroperationen an der Blase in Form einer oder mehrerer TUR-B auf. Eine intravesikale Therapie wurde zuvor bei lediglich vier Patienten (8 %) durchgeführt. Hiervon hatten drei Patienten eine lokale Therapie mit BCG und ein Patient eine MMC-Instillation erhalten. Zwei Patienten (4 %) hatten zuvor eine neoadjuvante Chemotherapie erhalten. Ein Rezidiv eines bereits bekannten Urothelkarzinoms lag in 13 % (n = 7) der Fälle vor. Bezüglich der pathologischen Eigenschaft des Primärtumors wurde besonderer Wert auf das *Grading* und die Eindringtiefe gelegt. 60 % (n = 31) der Tumoren wiesen das Stadium *High-Grade* auf, während 38 % (n = 20) ein *Low-Grade* Stadium hatten. Darüber hinaus hatten 31 % (n = 16) der Tumoren bereits ein muskelinvasives Stadium erreicht, während 67 % (n = 35) die *Muscularis* noch nicht erreicht hatten. 52 % (n = 16) der *High-Grade* Karzinome wiesen ein muskelinvasives Stadium auf. Ein Patient, welcher bereits drei Zyklen einer neoadjuvanten Chemotherapie erhalten hatte, wies in der histologischen Untersuchung des Zystektomiepräparates keine Tumorzellen mehr auf.

3.3 Erfolgsraten der unterschiedlichen Präparattypen

Die 55 Tumorpräparate verteilten sich wie folgt: 38 TUR-B Präparate (69 %), 12 Zystektomie-Tumorpräparate (22 %), 3 Lymphknotenpräparate (5 %) und 2 Nephroureterektomiepräparate (4 %). Als Erfolg definierten wir das Wachstum von mindestens einem Organoid. Dies konnte in insgesamt 28 Proben (51 %) erzielt werden. Unter den verschiedenen Proben typen zeigte sich eine stark variable Erfolgsquote.

In **Tabelle 12** sind die Erfolgsquoten der jeweiligen Proben typen zusammengefasst.

Tabelle 12: Präparattypen und Erfolgsraten

	TUR-B	Cx	Lk	Nux	Insgesamt
Gesamtzahl	38	12	3	2	55
Wachstum	19	5	2	2	28
Ø Wachstum	19	7	1	0	27
Erfolgsrate	50 %	42 %	67 %	100 %	51 %

Erfolgsraten der Organoidetablierung aufgeschlüsselt nach Operationsverfahren bzw. Präparattyp (Transurethrale Resektion der Blase (TUR-B), Zystektomie (Cx), Lymphknotenmetastase (Lk), Nephroureterektomie (Nux)). **Zeile 1:** Gesamtzahl der jeweils kultivierten Proben. **Zeile 2:** Zahl der Proben, bei denen ein erfolgreiches Organoidwachstum erzielt wurde. **Zeile 3:** Zahl der Proben ohne Organoidwachstum. **Zeile 4:** Jeweilige Erfolgsrate (%).

Die durchschnittliche Erfolgsrate der Organoidetablierung bei allen untersuchten Präparattypen betrug 51 %. Die höchste Erfolgsrate wurde mittels Urothelkarzinompräparaten des oberen Harntrakts (Nux) erzielt. Beide verwendeten Proben konnten als Organoide angezüchtet werden. Ferner konnte eines dieser Präparate erfolgreich als Linie etabliert und für die in Kapitel 3.7 beschriebenen Zytotoxizitätsanalysen verwendet werden. Die Lymphknotenpräparate wiesen mit 67 % Wachstum die zweithöchste Erfolgsquote auf. TUR-B Präparate eigneten sich besser zur Organoidetablierung als Zystektomie (Cx) Präparate, mit einer Erfolgsrate von 50 % vs. 42 %.

3.4 Einfluss der Patientendaten auf das Organoidwachstum

In diesem Abschnitt werden verschiedene Patienten- und Tumordaten zusammengefasst und bezüglich des erfolgreichen Organoidwachstums analysiert. Analysiert wurden das Patientengeschlecht, das *Grading* und Invasionsstadium des Primärtumors, sowie der Rezidivstatus.

3.4.1 Einfluss des Geschlechts auf das Organoidwachstum

Das Geschlecht der Patienten hatte keinen wesentlichen Einfluss auf das Organoidwachstum ($p = 0.8085$). Die von weiblichen Patientinnen gewonnenen Tumorproben hatten insgesamt eine etwas höhere Erfolgsrate, wie in **Tabelle 13** zu sehen ist.

Tabelle 13: Einflussfaktor Geschlecht auf die Erfolgsrate

	Männlich	Weiblich
Gesamtzahl	42	13
Wachstum	21	7
Ø Wachstum	21	6
Erfolgsrate	50 %	54 %

Erfolgsraten der Organoidetablierung aufgeschlüsselt nach Geschlecht. **Zeile 1:** Gesamtzahl der jeweils kultivierten Proben. **Zeile 2:** Zahl der Proben, bei denen ein erfolgreiches Organoidwachstum erzielt wurde. **Zeile 3:** Zahl der Proben ohne Organoidwachstum. **Zeile 4:** Jeweilige Erfolgsrate (%).

Von den 42 Proben, die von männlichen Patienten stammten, konnte in genau der Hälfte ein Organoidwachstum erzielt werden. Bei den weiblichen Proben lag die Erfolgsrate bei vergleichbaren 54 %.

3.4.2 Einfluss des *Grading* des Primärtumors auf das Organoidwachstum

Das histopathologisch festgelegte *Grading* des Primärtumors wurde anhand der neuen WHO-Klassifikation in Low- und High-Grade Tumoren unterteilt. Die Verteilung des Organoidwachstums zwischen diesen beiden Graden ist in **Tabelle 14** abgebildet.

Tabelle 14: Einflussfaktor Grading auf die Erfolgsrate

	HG	LG
Gesamtzahl	31	20
Wachstum	17	9
Ø Wachstum	14	11
Erfolgsrate	55 %	45 %

Erfolgsraten der Organoidetablierung aufgeschlüsselt nach dem *Grading* des Primärtumors (*High-Grade (HG)*, *Low-Grade (LG)*). **Zeile 1:** Gesamtzahl der jeweils kultivierten Proben. **Zeile 2:** Zahl der Proben, bei denen ein erfolgreiches Organoidwachstum erzielt wurde. **Zeile 3:** Zahl der Proben ohne Organoidwachstum. **Zeile 4:** Jeweilige Erfolgsrate (%).

55 % (n = 17) der *High-Grade* Tumoren zeigten Organoidwachstum in Kultur. Im Gegensatz hierzu konnten 45 % (n = 9) der *Low-Grade* Tumoren erfolgreich kultiviert werden. Während die Erfolgsrate bei den HG-Tumoren somit höher war, erwies sich der Unterschied als nicht signifikant (p = 0,4926).

3.4.3 Einfluss der Invasivität des Primärtumors auf das Organoidwachstum

Das Invasionsstadium der Primärtumoren wird in der TNM-Klassifikation durch die T-Stadien angegeben (Kapitel 1.1.2.2). Für die Auswertung wurden die Tumoren in muskelinvasiv (MIBC) und Nicht-muskelinvasiv (NMIBC) unterteilt. Somit wurden alle Tumoren ab dem Stadium T2, der muskelinvasiven Subgruppe zugeteilt. Das Verteilungsmuster in Bezug auf das Organoidwachstum ist in **Tabelle 15** abgebildet.

Tabelle 15: Einflussfaktor Invasionstiefe auf die Erfolgsrate

	MIBC	NMIBC
Gesamtzahl	16	35
Wachstum	8	18
Ø Wachstum	8	17
Erfolgsrate	50 %	51 %

Erfolgsraten der Organoidetablierung aufgeschlüsselt nach der Invasionstiefe des Primärtumors (Muskelinvasives Urothelkarzinom (MIBC), Nicht-muskelinvasives Urothelkarzinom (NMIBC)). **Zeile 1:** Gesamtzahl der jeweils kultivierten Proben. **Zeile 2:** Zahl der Proben, bei denen ein erfolgreiches Organoidwachstum erzielt wurde. **Zeile 3:** Zahl der Proben ohne Organoidwachstum. **Zeile 4:** Jeweilige Erfolgsrate (%).

Die NMIBC zeigten in 51 % (n = 35) der Fälle ein Organoidwachstum. Somit unterschied sich ihre Erfolgsrate kaum von den MIBC, bei denen 50 % (n = 8) der Präparate erfolgreich waren (p = 0,9246).

3.4.4 Einfluss des Rezidivstatus auf das Organoidwachstum

7 Patienten wiesen einen Rezidivtumor eines bereits bekannten und mittels TUR-B, BCG-Instillation und / oder Neoadjuvanter Chemotherapie vortherapierten Urothelkarzinoms auf. Im Gegensatz hierzu hatten 45 Patienten einen Primärtumor, welcher bei 12 Patienten ebenfalls mittels TUR-B voroperiert war.

Tabelle 16: Einflussfaktor Rezidivstatus auf die Erfolgsrate

	Rezidiv	Ø Rezidiv
Gesamtzahl	7	45
Wachstum	2	24
Ø Wachstum	5	21
Erfolgsrate	29 %	54 %

Erfolgsraten der Organoidetablierung aufgeschlüsselt nach dem Rezidivstatus. **Zeile 1:** Gesamtzahl der jeweils kultivierten Proben. **Zeile 2:** Zahl der Proben, bei denen ein erfolgreiches Organoidwachstum erzielt wurde. **Zeile 3:** Zahl der Proben ohne Organoidwachstum. **Zeile 4:** Jeweilige Erfolgsrate (%).

29 % (n = 2) der Rezidivtumoren konnten als Organoide angezüchtet werden. Einen statistisch signifikanten Unterschied zur Erfolgsrate der Primärtumoren gab es nicht (p = 0,2229). Hier wuchsen 54 % (n = 24) der Präparate.

3.5 Wachstumsverhalten der erfolgreichen Organoidkulturen

Als Erfolg wurde eine Kultur definiert, in der das Wachstum von mindestens einem Organoid erzielt werden konnte. Insgesamt gelang uns dies in 51 % (n = 28) der Proben.

Die durchschnittliche Anzahl an Organoiden variierte deutlich zwischen den verschiedenen Kulturansätzen. In 16 / 28 Kulturen wuchsen weniger als 10 Organoide. In 12 / 28 Kulturen wuchsen mehr als 10 Organoide, von denen zwei mehr als 50 Organoide aufwiesen. Auf **Abbildung 6** lässt sich repräsentativ die unterschiedliche Organoidmenge zwischen zwei Kulturen (*BCO#70* und *BCO#80*) erkennen.

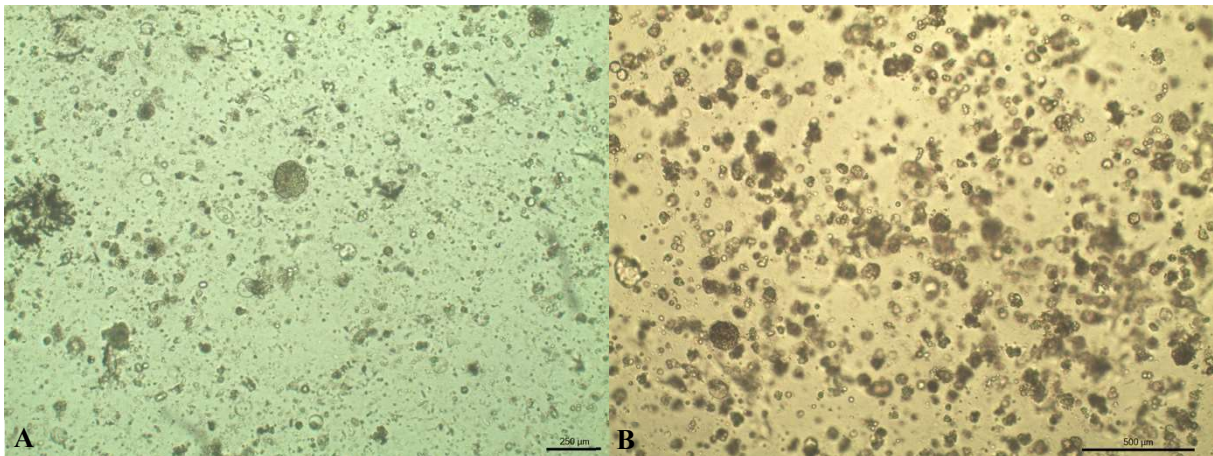


Abbildung 6: Vergleich der Organoidanzahl von *BCO#70* (A) und *BCO#80* (B) am 9. und 10. Kulturtag.

Die Aufnahmen wurden in der kleinsten Vergrößerungsstufe angefertigt. **A** zeigt die Organoidkultur *BCO#70* am 9. Kulturtag. In der Mitte der oberen Hälfte erkennt man ein ca. 150 µm durchmessendes Organoid. Im umliegenden Matrigel befinden sich weitere, deutlich kleinere Organoide und Zellaggregate. Jedoch waren in der gesamten Kuppel nicht mehr als 10 Organoide zu sehen. Ganz anders sieht es in **Abbildung B** aus, welche am 10. Kulturtag von *BCO#80* aufgenommen wurde. Hier ist die Matrigelkuppel durchsetzt von zahlreichen, ebenfalls bis 150 µm messenden Organoiden. Beide Tumorpräparate stammten aus TUR-B Material. Der Ursprungstumor von *BCO#70* wurde als differenziertes, nicht invasives (pTa) Urothelkarzinom der Harnblase, G1 (*low*

Grade) klassifiziert. *BCO#80* stammte von einem papillären, nicht invasivem (pTa) Urothelkarzinom der Harnblase, G2 (*low Grade*).

Auch hinsichtlich der Organoiddurchmesser gab es deutliche Varianzen, wobei durchschnittlich eine Größe von ca. 200 µm erreicht wurde. In 9 / 28 Fällen wurde eine Größe von 100 µm nicht überschritten. Die Mehrheit der Organoide 39 % (n = 11) erreichte einen Durchmesser zwischen 100 – 300 µm. In 8 / 28 Kulturen wuchsen die Organoide bis zu einer Größe von 300 µm oder mehr heran. Zwei dieser Kulturen (*BCO#44* und *BCO#56*) erreichten einen Durchmesser von beinahe 1 mm und waren somit auch ohne Mikroskop deutlich erkennbar.

Auf **Abbildung 7** lassen sich die unterschiedlichen Größen von drei Organoiden aus drei verschiedenen Kulturen gut erkennen:

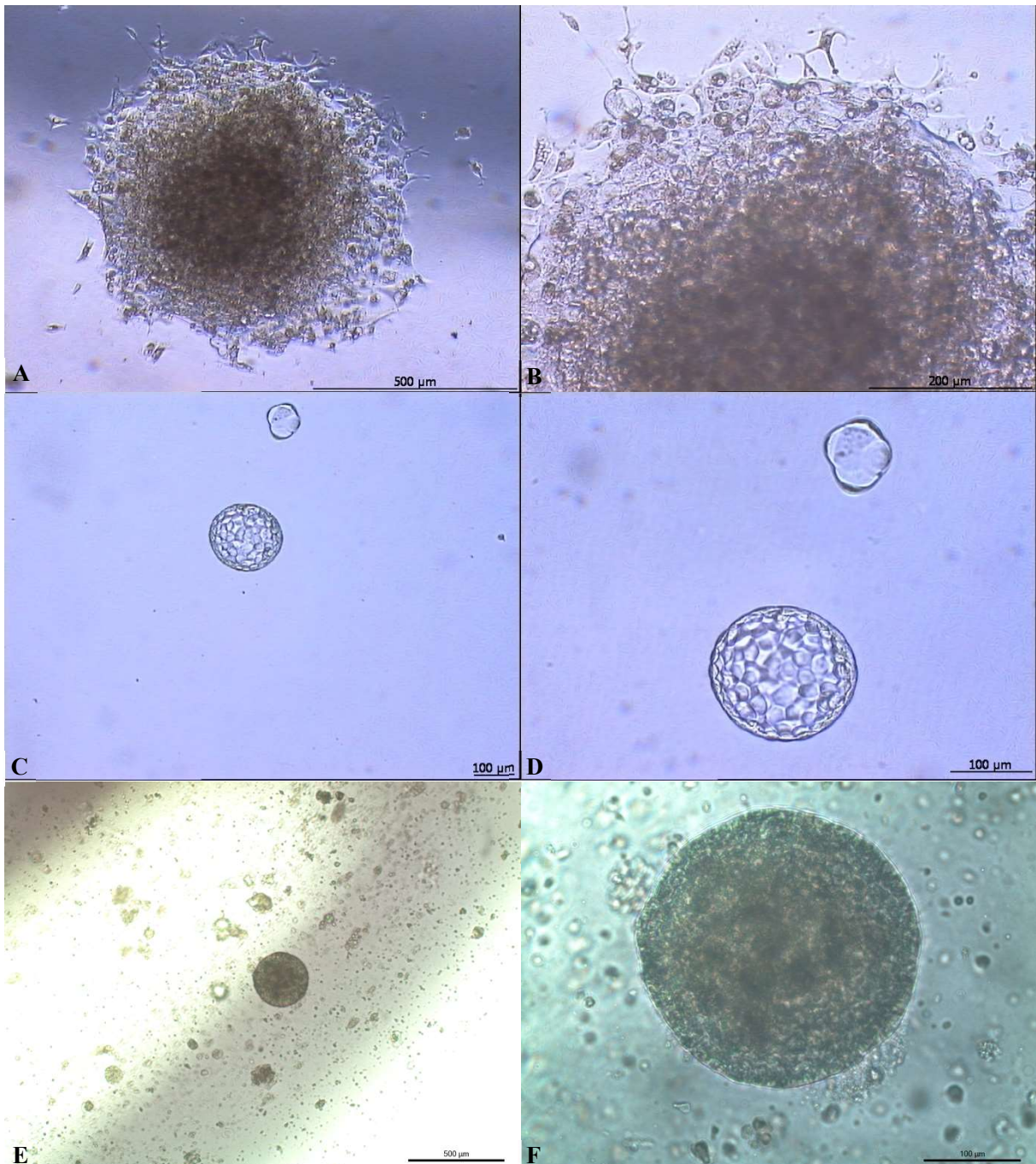


Abbildung 7: Größenvergleich von drei verschiedenen Organoidkulturen (*BCO#37* (A;B), *BCO#31* (C;D) und *RTO#8* (E;F))

Die Aufnahmen in **Abbildung 7** wurden an unterschiedlichen Kulturtagen erstellt. Sie zeigen (Nah-)Aufnahmen von drei unterschiedlichen Organoiden, die sich in Größe und Form deutlich unterscheiden. Auf den Bildern **A** und **B** ist ein großes Organoid, mit einem Durchmesser von ca. 770 µm, abgebildet. Die Aufnahme erfolgte am 8. Kulturtag der Probe *BCO#37*. Ursprungsmaterial war ein mittels TUR-B reseziertes, nicht-invasives

(pTa) papilläres Urothelkarzinom der Harnblase mit einem Grading von G2 (*low Grade*). Das Organoid entwickelte sich rasch und löste sich am 6. Tag aus der Matrigelkuppel, so dass es frei im Kulturmedium schwamm. *BCO#31* stammte von einem TUR-B Präparat eines nicht-invasiven (pTa), papillären Urothelkarzinoms. Das *Grading* wurde als *low-Grade* eingestuft. Am 3. Kulturtag wurde das in den Abbildungen **C** und **D** erkennbare Organoid fotografiert. Mit einem Durchmesser von ca. 180 µm gehörte es dem Durchschnitt an. Dieses Organoid ist im Gegensatz zu *BCO#37* und *RTO#8* eher locker konfiguriert. Die Einzelzellen im Inneren sind gut erkennbar. **E** und **F** wiederum zeigen ein 23 Tage altes Organoid der Probe *RTO#8*. Auch hier handelte es sich um ein TUR-B Präparat mit einer ungewöhnlichen Pathologie bestehend aus einem neuroendokrin differenzierten, hoch proliferierendem Karzinom mit Anteilen eines papillären Urothelkarzinoms, high grade (G3) und CIS des Urothels. Vereinzelt mit gerade beginnender Infiltration in das suburotheliale Bindegewebe (T1). Die Größe des Organoids betrug ca. 300 µm.

Die meisten Primärkulturen konnten für mind. zwei Wochen am Leben gehalten werden. 5 / 29 Kulturen zeigten Anzeichen eines Zerfalls bereits nach einer Woche.

3.6 Etablierung einer Organoidlinie

Die Etablierung einer Organoidlinie erwies sich als außerordentlich anspruchsvoll. Lediglich eine Probe (*BCO#56*) konnte erfolgreich als Linie etabliert und über ein Jahr in Kultur fortgesetzt werden. Anhand dieser Linie wurden die in Kapitel 3.7 beschriebenen Zytotoxizitätsanalysen durchgeführt. Zahlreiche weitere Forschungsprojekte des Zentrums für Medizinische Forschung (ZMF) verwendeten die hier beschriebene Organoidlinie. In diesem Abschnitt wird zunächst auf die pathologische Klassifikation des ursprünglichen Tumormaterials eingegangen und anschließend Mikroskopaufnahmen von unterschiedlichen Abschnitten der Etablierung präsentiert.



Abbildung 8 Tumorpräparat *BCO#56*

Ausgangsmaterial war ein ca. 100 mg schweres Tumorpräparat eines Nierenbeckenkarzinoms (**Abbildung 8**). Die histopathologische Evaluation des Tumors ergab ein gering differenziertes, invasives (pT3) Urothelkarzinom des linken Nierenbeckens. *Grading*: G3.

Der Transport- und Verarbeitungsprozess entsprach der in Kapiteln 2.2.1.2 und 2.2.3.1 beschriebenen Methoden.

Eine erste Betrachtung der in Matrigel ausgesäten Zellen mit dem Mikroskop ergab keine Besonderheiten. Zu beobachten waren zahlreiche Einzelzellen und einige wenige Zellkonglomerate. Zunächst blieb ein Organoidwachstum aus. In den nächsten Wochen nahm die Anzahl an Zellgruppen stetig zu. Die Form und Menge dieser Zellgruppen war zu gering, um eine frühzeitige Passagierung durchzuführen.

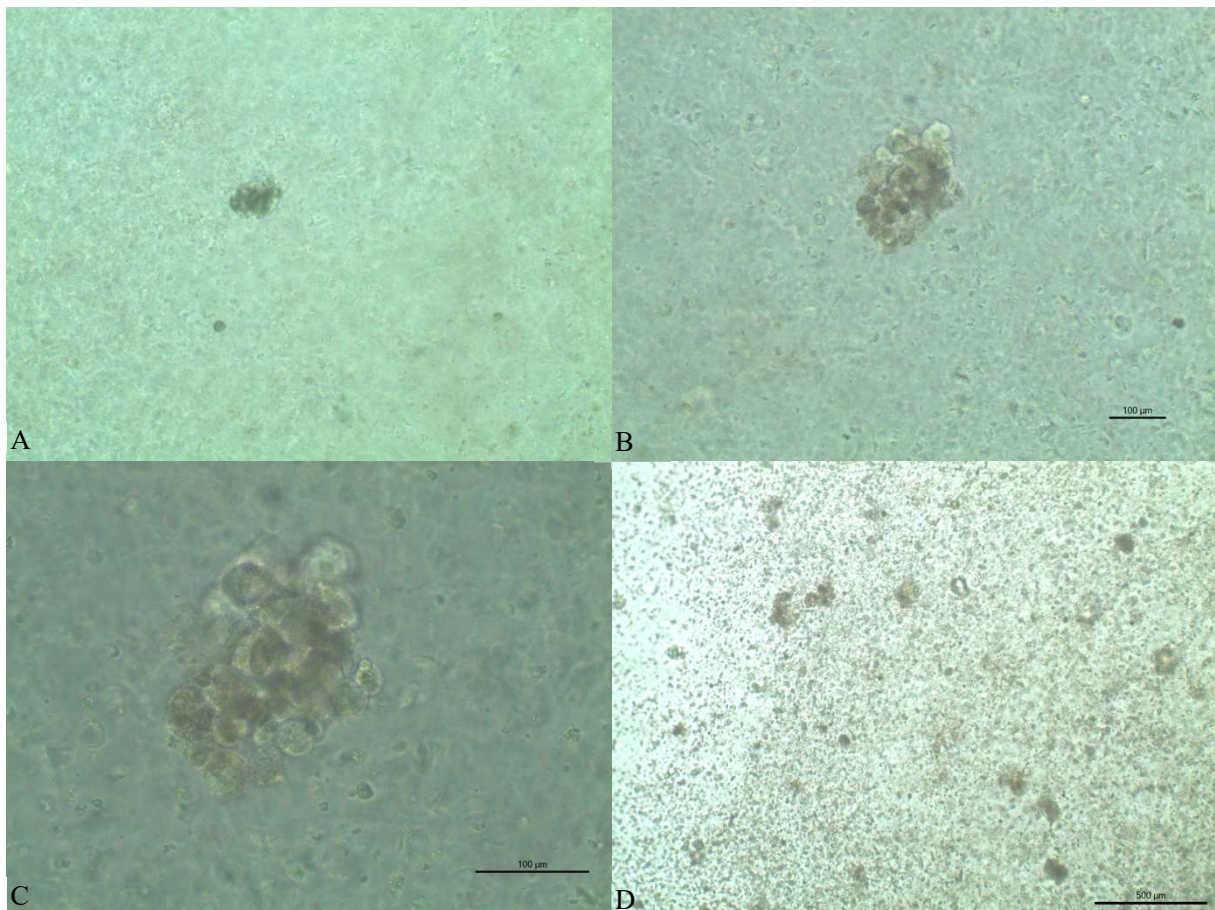


Abbildung 9 BCO#56 Wachstum Tag 2 – 19: Tag 2 (A), Tag 14 (B, C), Tag 19 (D)

Auf **Abbildung 9** ist das Wachstum von BCO#56 innerhalb der ersten 19 Tage abgebildet. **A** wurde am zweiten Tag nach der Probenverarbeitung aufgenommen. Zu

sehen ist hier ein Zellkonglomerat umgeben von Einzelzellen. **B** und **C** zeigen eine weitere Zellgruppierung in jeweils 10- und 20-facher Vergrößerung. Dieses wurde am 14. Tag gesichtet. **D** ist eine Übersichtsaufnahme, welche am 19. Tag erstellt wurde. Hier sind mehrere Zellkonglomerate innerhalb der Matrigelkuppel umgeben von Einzelzellen abgebildet. Diese Zellgruppierung wurde zu diesem Zeitpunkt noch nicht als Organoide angesehen. Aufgrund der geringen Menge und Größe wurde in den ersten Wochen der Kultivierung die Organoidkultur nicht passagiert.

Bis Tag 33 hatte sich ein ca. 350 µm großes Organoid in der linken unteren Ecke des *Domes* gebildet. Dieses wurde von weiteren kleineren Organoiden und Zellkonglomeraten, sowie Einzelzellen umgeben. Das Wachstum dieses Organoids zwischen Tag 33 und 48 ist in **Abbildung 10** abgebildet:

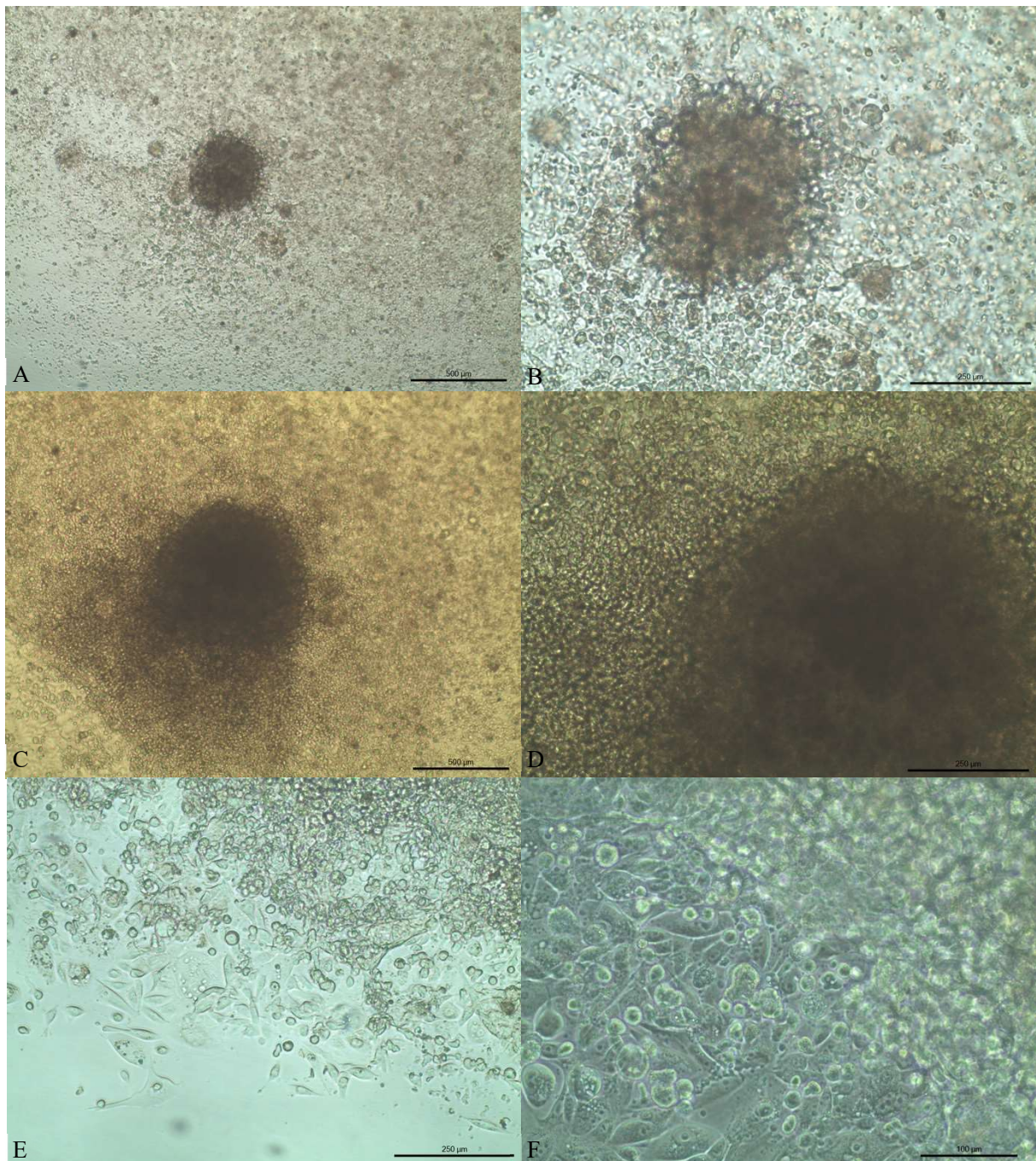


Abbildung 10 BCO#56 Wachstum Tag 33 – 48: Tag 33 (A, B), Tag 48 (C, D, E, F).

Bild **A** und **B** wurden an Tag 33 aufgenommen. Zu sehen ist das oben erwähnte Organoid in 10- und 20-facher Vergrößerung. Die Zellen im Zentrum des Organoids scheinen sehr dicht gepackt zu sein, erkennbar an der dunkleren Farbe. Einzelne Zellen sind in diesem Bereich mit dem Mikroskop kaum darzustellen. Der Rand des Organoids wird von locker platzierten, großen Zellen mit hellem Zytoplasma umsiedelt. In der unmittelbaren

Umgebung dieser kugelförmigen Struktur lassen sich weitere, kleinere Organoide auffinden. Das Organoid nahm in den darauffolgenden Tagen stetig an Größe zu, ohne dass es zu Zeichen eines Wachstumsarrest oder Zerfall kam. Bild **C – F** wurden 15 Tage später aufgenommen. Das Organoid hatte nun eine Größe von ca. 850 μm erreicht. Das Zentrum war noch dichter besiedelt als in den Abbildungen zuvor. Der Randsaum, welcher hauptsächlich aus Einzelzellen bestand, hatte ebenfalls deutlich an Größe zugenommen. Abbildung **E** und **F** zeigen die Ausläufer dieses Randsaums, welcher bis zum Rand des *Matrigel-Domes* reichte, in 10- und 20-facher Vergrößerung.

Am 48. Tag wurde das Organoid mittels der in Kapitel 2.2.3.2 beschriebenen Methode passagiert. Nach der Aussaat in Matrigel waren zahlreiche Einzelzellen und kleinere Zellgruppierungen vorhanden. Diese vermehrten sich rasch, so dass bereits am zweiten Kulturtag zahlreiche Organoide das Matrigel besiedelten. Insgesamt wurde die erste Passage 10 Tage kultiviert, bevor eine zweite Passagierung stattfand. Das Wachstum der Probe innerhalb dieser 10 Tage ist in **Abbildung 11** zu sehen. Bilder **A** und **B** wurden am zweiten Kulturtag aufgenommen. Zu sehen sind hier zahlreiche kleine Organoide deren Durchmesser zwischen ca. 125 – 200 μm variierte. Manche Areale des *Domes* waren bereits etwas dichter mit Organoiden besiedelt, während andere Bereiche eher kleine Einzelzellen und Zellgruppierungen enthielten. Auf Abbildung **B** lässt sich außerdem die Dreidimensionalität der Kultur gut beobachten. In der Mitte der Abbildung ist ein ca. 200 μm großes Organoid scharf gestellt. Bereiche die sich ober- bzw. unterhalb dieses Organoids befinden stellen sich unscharf da. Abbildung **C** und **D** zeigen einen Bereich aus der Mitte des *Domes* am 9. Kulturtag. Vergleicht man **A** und **C**, so kann man deutlich erkennen das sowohl die Anzahl als auch Größe der Organoide deutlich zugenommen hatte. Die Bilder **E** und **F** wurden am 10. Tag aufgenommen.

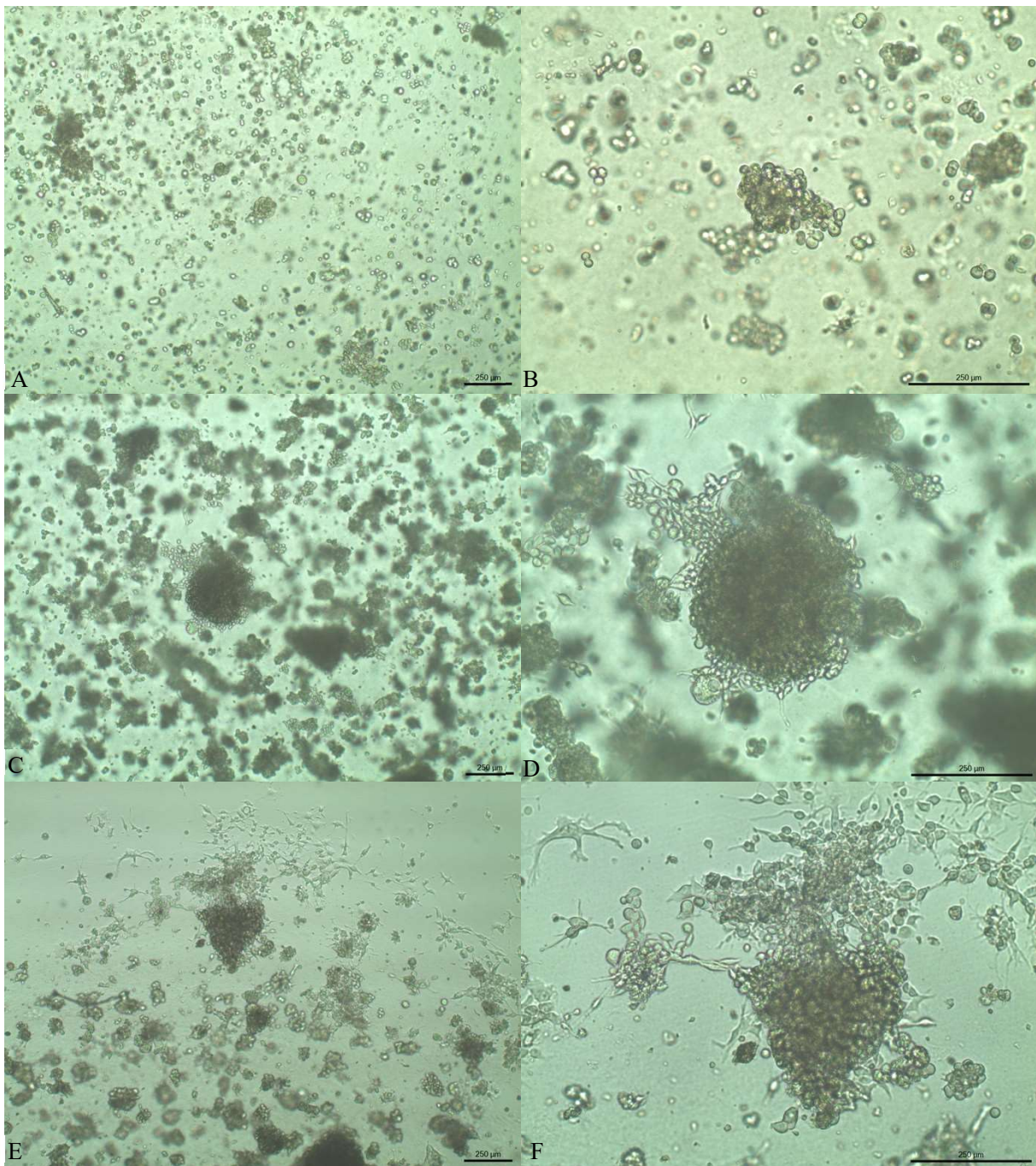


Abbildung 11 *BCO#56SI* Wachstum Tag 2 - 10: Tag 2 (A, B), Tag 9 (C, D), Tag 10 (E, F).

Die Organoide unterscheiden sich in ihrem Wuchsmuster. Dies lässt sich im Vergleich der Teilabbildungen von **Abbildung 11** erkennen. Ein ovales, ca. 360 µm durchmessendes Organoid ist auf Abbildung C und D in 10- und 20-facher Vergrößerung

zu sehen. Ähnlich zu dem in **Abbildung 10** dargestellten ursprünglichen Organoid besitzt es ein Zentrum aus stark gebündelten Zellen, umgeben von einem Randsaum aus helleren und weniger dicht sitzenden Zellen. Im Hintergrund (Bild **D**) lassen sich weitere Organoide erkennen, die sich in einer anderen Ebene des *Domes* befinden.

Interessanterweise wiesen nicht alle Organoide diese ovale Form auf. So lässt sich in **E** und **F** ein ca. 400 μm hohes Organoid erkennen, dessen Form an eine umgedrehte Pyramide erinnert. Betrachtet man die Zellen oberhalb des Organoids, lässt sich deutlich erkennen, dass diese untereinander mittels Zellausläufer in Kontakt stehen.

Betrachtet man die Probe in 40-facher Vergrößerung, lässt sich die Feinstruktur der Organoide gut erkennen. **Abbildung 12** zeigt deutlich, die zahlreichen Einzelzellen, aus welchen das Organoid aufgebaut ist. In dieser Vergrößerung kann man die Abgrenzungen der Zellen zueinander betrachten.

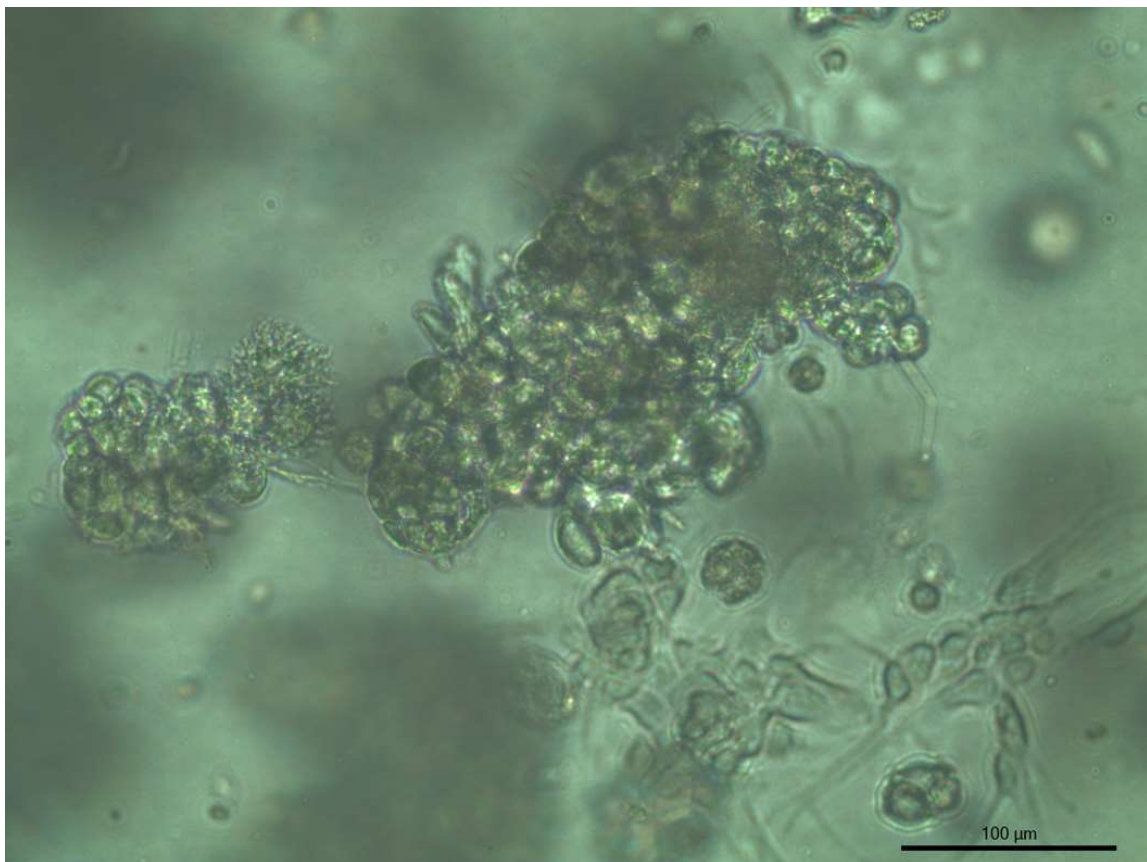


Abbildung 12 BCO#56S1 - Nahaufnahme eines Organoids

Nach 10 Tagen wurde BCO#56S1 passagiert. Sowohl die zweite als auch die darauffolgenden Passagen wuchsen zuverlässig. Nach wenigen Tagen formierten sich Organoide, welche anschließend an Menge und Größe zunahmten. Die äußerliche Erscheinung setzte sich über die darauffolgenden Passagen fort. Repräsentative Fotos von Passage 2 – 5 sind in **Abbildung 13** abgebildet.

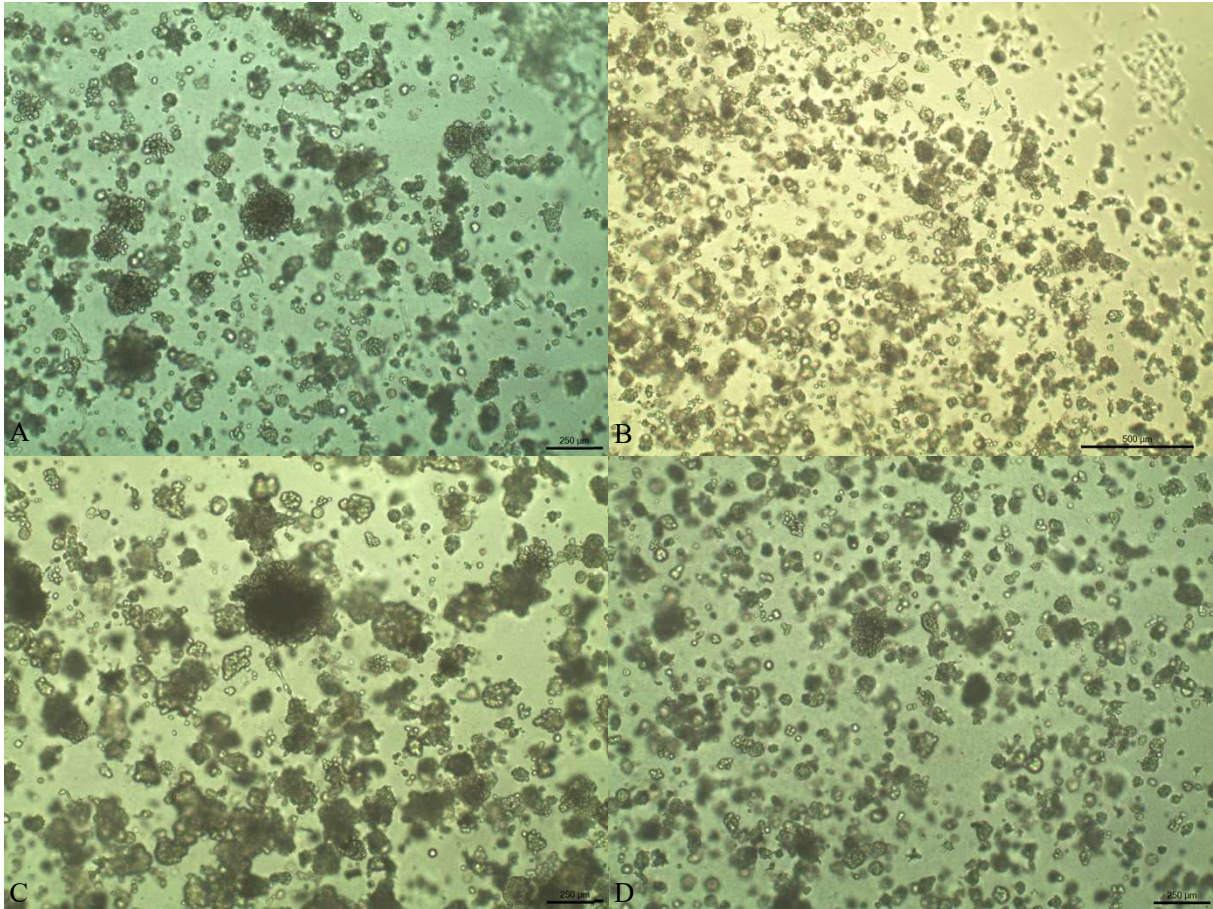


Abbildung 13 BCO#56 Passage: 2 (A), 3 (B), 4 (C), 5 (D).

3.7 Zytotoxizitätsanalyse

Die erfolgreich etablierte Organoidlinie BCO#56 wurde für Zytotoxizitätsanalysen mit dem Standardchemotherapeutikum Cisplatin und zwei BH3-Mimetika (Venetoclax (VTX) und S63845) verwendet. Neben der Monotherapie wurde zusätzlich eine Kombinationstherapie aus CP und VTX angewandt. Die Organoide wurden für 72 h bei 37 °C mit den Medikamenten inkubiert. Anschließend wurde die Zellviabilität mittels des Cell-Titer Blue Assays analysiert. Die Ergebnisse dieser Experimente werden im Folgenden dargestellt:

Die Auswirkung einer CP-Monotherapie in steigenden Konzentrationen auf die Zellviabilität von *BCO#56* ist in **Abbildung 14** dargestellt. Untersucht wurden die Konzentration 66 µM, 33 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,3 µM, 3,1 µM und 1,56 µM. Die Auswirkung von CP auf die Viabilität der Zellen wurde in Verhältnis zur Kontrollbehandlung mit DPBS als x-fache Änderung berechnet. Die Zellviabilität fällt auch in höheren Konzentrationen des Zytostatikums nur gering ab. Das kaum wahrnehmbare Ansprechen wurde als Resistenz der Organoidlinie gegenüber Cisplatin interpretiert. Es konnte keine mittlere inhibitorische Konzentration (IC50) ermittelt werden.

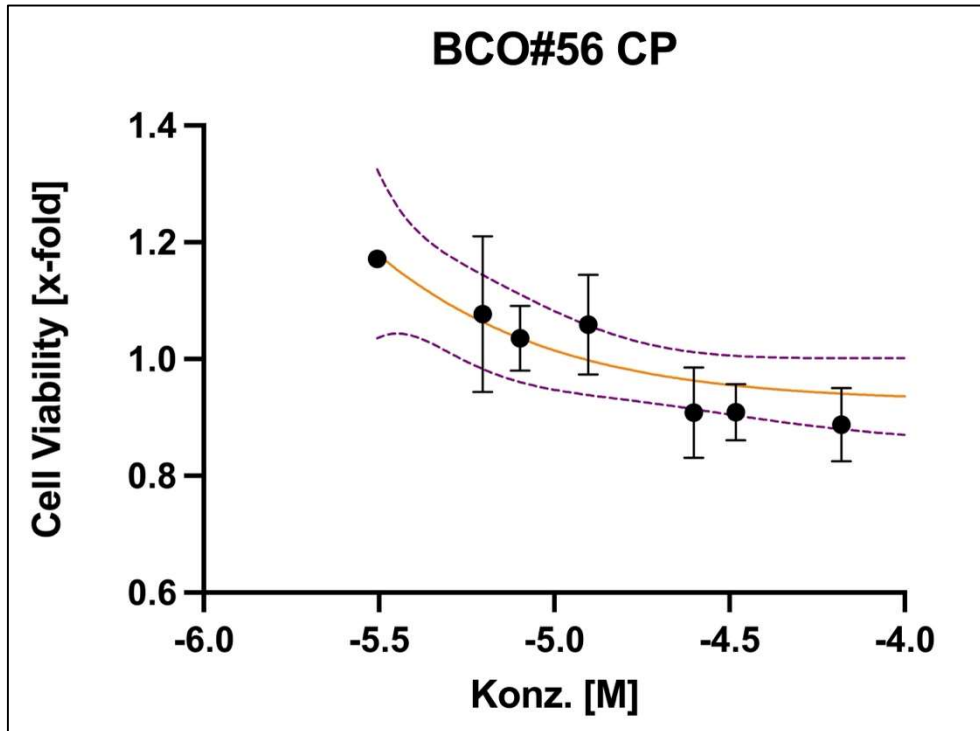


Abbildung 14: BCO#56 - CP Monotherapie

Dargestellt ist das Ergebnis einer non-linearen Regressionsanalyse der transformierten Werte des X-Fold change der Zellviabilität bei der Behandlung der Organoidlinie BCO#56 mit Cisplatin (CP). Auf der Y-Achse ist die Zellviabilität (ausgedrückt durch die Änderung des X-Fold), und auf der X-Achse der neg. Logarithmus der verwendeten Konzentration von CP abgebildet. Die gelbe durchgezogene Linie repräsentiert die Mittelwerte der Datenpunkte und die gestrichelten (lila) Linien jeweils die Standardabweichungen. Auch in höheren Konzentrationen entfaltet CP kaum eine zytotoxische Wirkung.

Weiterhin wurde die Auswirkung der BH3-Mimetika VTX und S63845 auf die Zellviabilität der Organoidkultur getestet. Wie bei der Behandlung mit CP wurde auch hier jeweils die x-fache Änderung der Zellviabilität mit Hilfe der Kontrollbehandlung berechnet. Die BH3-Mimetika VTX und S63845 zeigten im Gegensatz zu der Behandlung mit CP eine ausgeprägte zytotoxische Wirkung, wie sich **Abbildung 15** entnehmen lässt:

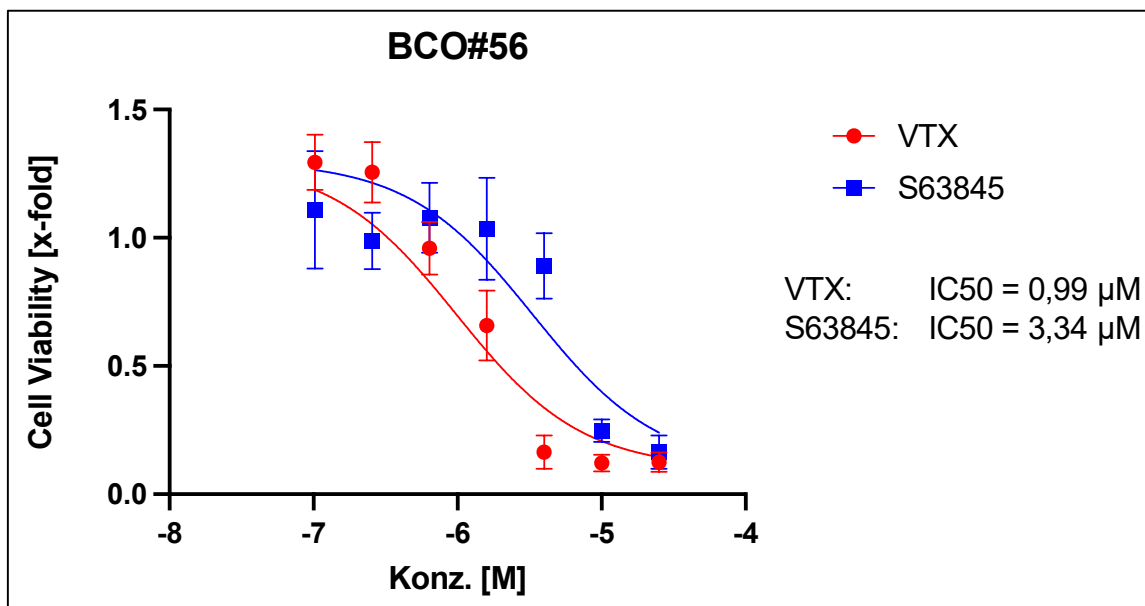


Abbildung 15: BCO#56 - VTX und S63845 Monotherapie

Die BH3-Mimetika Venetoclax und S63845 übten einen zytotoxischen Effekt gegen die Urothelkarzinomorganoidlinie *BCO#56* aus. Die ermittelte Mittlere inhibitorische Konzentration betrug $0,99 \mu\text{M}$ für VTX und $3,34 \mu\text{M}$ für S63845. Abgebildet ist der X-Fold-Change Wert auf der Y-Achse und der negative Logarithmus der Konzentration auf der X-Achse. Die blaue Linie und Datenpunkte repräsentieren S63845, während die rote Linie und Datenpunkte VTX abbilden.

Im Gegensatz zu CP erzielten VTX und S63845 mit steigender Konzentration einen zunehmenden Abfall der Viabilität von *BCO#56*. VTX erzielte eine IC_{50} von $0,99 \mu\text{M}$, während die IC_{50} von S63845 $3,34 \mu\text{M}$ betrug. Somit wies VTX die geringste IC_{50} -Konzentration auf.

Abbildung 16 zeigt das Ergebnis der Kombinationstherapie aus CP und VTX:

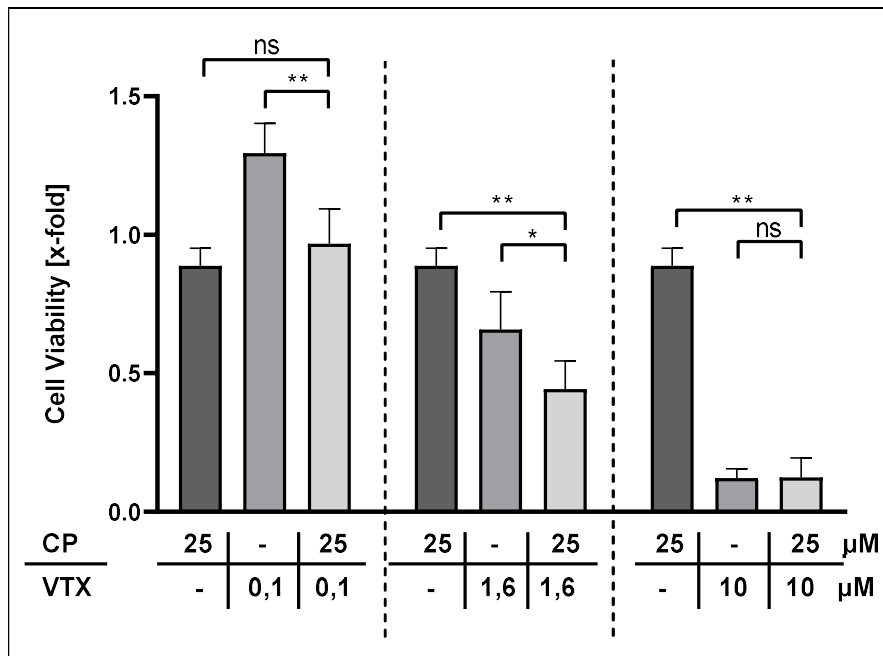


Abbildung 16: BCO#56 – CP und CT

Kombinationstherapie aus Cisplatin (CP) und Venetoclax (VTX). VTX bewirkte in einer Konzentration von 1,6 μM eine Sensitivierung der Tumorzellen für Cisplatin (25 μM). Dies bewirkte einen statistisch signifikanten Abfall der Zellviabilität im Gegensatz zur Cisplatin Monotherapie.

Weiterhin wurde untersucht, ob die Kombination von CP mit den BH3-Mimetikum VTX die Zellen für den zytotoxischen Effekt von CP sensibilisieren kann. Dazu wurden insgesamt drei verschiedene Kombinationen untersucht, wobei die Konzentration von Cisplatin immer gleich blieb (25 μM). VTX hingegen wurde in einer niedrigen (0,1 μM), einer mittleren (1,6 μM) und einer hohen (10 μM) Konzentration angewandt. CP bewirkt in der angewandten Konzentration (25 μM) kaum einen zytotoxischen Effekt in der Monotherapie. VTX zeigt in sehr niedriger (0,1 μM) ebenfalls keine Auswirkung auf die Zellviabilität in der Monotherapie. In der Kombination der beiden Substanzen – in denselben niedrigen Konzentrationen - ergibt sich ein hoch signifikanter Effekt im Vergleich zur VTX Monotherapie, jedoch nicht im Vergleich zur CP Monotherapie. In mittlerer Dosierung entfaltet VTX in der Monotherapie einen höheren Abfall der

Zellviabilität als CP. In der Kombinationstherapie zeigt sich ein signifikanter Abfall gegenüber VTX in der Monotherapie und ein hoch-signifikanter Unterschied im Vergleich zur CP Monotherapie. In sehr hoher (10 μM) Konzentration entfaltet VTX eine sehr starke zytotoxische Wirkung. Die Differenz zur Kombinationstherapie ist hier nicht signifikant.

Zusammenfassend bewirkt CP in der Monotherapie keinen wesentlichen Abfall der Zellviabilität. VTX und S63845 entfalten bereits in der Monotherapie eine dosisabhängige zytotoxische Wirkung. In der Kombination von CP (25 μM) mit VTX (1,6 μM) zeigt sich ein signifikanter bis hochsignifikanter Abfall der Zellviabilität im Vergleich zu den jeweiligen Monotherapien. Somit sensitiviert VTX die CP-resistenten Zellen und wirkt additiv zytotoxisch zu CP.

4 Diskussion

Das muskelinvasive und metastasierte Urothelkarzinom ist gekennzeichnet durch eine schlechte Prognose. Systemische Therapien, basierend auf platin-haltigen Kombinationsschemata oder dem Einsatz von Immuncheckpoint Inhibitoren, zeigten in den letzten Jahren vielversprechende Ergebnisse. Dennoch sind die Ansprechraten, aber auch das tumorspezifische und Gesamtüberleben nicht befriedigend. Individualisierte Therapieansätze fehlen größtenteils und dementsprechende Modelle sind klinisch noch nicht verfügbar. Organoide stellen als dreidimensionale Zellkulturform einen Mittelweg zwischen konventioneller zweidimensionaler Zellkultur und Xenograft-Modellen dar und wurden bereits aus vielen unterschiedlichen Tumoren erfolgreich etabliert. Ihre Verwendung als präklinische, individualisierte Modelle zur Untersuchung der Suszeptibilität eines Tumors auf unterschiedliche Therapieschemata könnte die Therapie des Urothelkarzinoms unterstützen. Die Datenlage zur Herstellung von Organoidzelllinien aus Urothelkarzinomgewebe, insbesondere des oberen Harntrakts, ist gering. Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer zuverlässigen Tumororganoidlinie aus Urothelkarzinompräparaten, um das Ansprechverhalten der Tumorzellen auf Cisplatin und weitere Kombinationstherapien zu untersuchen.

4.1 Organoidetablierung

4.1.1 Methodik der Organoidetablierung:

In der Literatur existieren unterschiedliche Methoden zur Herstellung von Organoidkulturen, welche sich in ihren Grundzügen ähneln. Von Patienten gewonnenes Gewebe bzw. Stammzellen werden in einer dreidimensionalen Matrix suspendiert und mittels Nährmedium, welches durch unterschiedliche Wachstumsfaktoren angereicht wird, kultiviert. Die Unterschiede der Methoden liegen insbesondere in der Art des Ausgangsmaterials (Gewebe vs. Stammzellen) und der dreidimensionalen Matrix, sowie der Zusammensetzung des Kulturmediums.

Ausgangsmaterial für die Bildung dieser komplexen, dreidimensionalen *in-vitro* Strukturen sind (Tumor-)Gewebsfragmente, sowie Stammzellen (Adulte Stammzellen, induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC) und embryonale Stammzellen). Rauth et al. zufolge rekapitulieren Organoide, welche aus Gewebsfragmenten und adulten Stammzellen hergestellt wurden besser die Regenerationsfähigkeit und Homöostase des Ausgangsgewebes als solche, die aus iPSCs entstehen. Organoide aus iPSCs hingegen eignen sich besser zur Untersuchung der Organogenese und der während der fetalen Periode herrschenden Bedingungen. Darüber hinaus scheint die Herstellung von Organoiden aus Tumorgewebe schwieriger zu sein, als wenn gesundes Gewebe als Ausgangsmaterial verwendet wird (Rauth et al., 2021).

In der vorliegenden Arbeit wurde Urothelkarzinomgewebe als Ausgangsmaterial verwendet. In solchen Fällen muss das Gewebe zunächst mechanisch und anschließend enzymatisch verdaut werden, um die (Tumorstamm-)Zellen aus ihren Verbänden zu lösen. Auch die Arbeitsgruppen von Lee et al., und Mullenders et al., verwendeten als Ausgangsmaterial Tumorproben von Patienten mit Urothelkarzinomen. Um das Gewebe zu verdauen, verwendete die Gruppe von Lee ein Kollagenase/Hyaluronidase-Gemisch, während Mullenders et al., nur Kollagenase verwendeten. Die Inkubationsperioden unterschieden sich ebenfalls. Während Lee et al. das Gemisch für 15 Minuten bei 37 °C inkubierten gefolgt von einer Inkubation mit Trypsin für 3 min bei Raumtemperatur, entschied sich die Gruppe von Mullenders dafür, zwei Inkubationsperioden von je 30 Minuten (ebenfalls bei 37 °C) zu verwenden. Unser eigenes Protokoll verwendete eine Inkubationsperiode von 2 x 30 Minuten, wobei als Enzym ein Kollagenase/Hyaluronidase-Gemisch verwendet wurde.

Neben dem Ausgangsmaterial stellt der verwendete Extrazellulärmatrix-Ersatz einen weiteren wichtigen Schlüsselpunkt der Organoidherstellung dar. Dieser bietet den Zellen ein dreidimensionales Grundgerüst zum Wachsen. Sowohl unsere Arbeitsgruppe, als auch die Arbeitsgruppe von Lee und Mullenders et al., verwendeten hierfür Matrigel (1.2.4), welches auch in der Literatur am häufigsten beschrieben wird (Rauth et al., 2021, Mullenders et al., 2019, Lee et al., 2018). Wie in Kapitel 1.2.4 beschrieben, wird das BME aus dem murinen Engelbreth-Holm-Swarm Tumor extrahiert. Manche Autoren sind der Meinung, dass residuale murine Wachstumsfaktoren als auch eine variierende Zusammensetzung das Organoidwachstum unerwünscht beeinflussen können. Aus

diesem Grund werden synthetisch hergestellte Hydrogel-Polymere als Alternative zu BME erforscht. Prince et al., beschreiben in einer Veröffentlichung die Verwendung eines solchen Hydrogels zur Erstellung von Patientenabgeleiteten Brustkrebs-Organoiden, welche u.a. in Proliferationsverhalten, histopathologischer Typisierung und Genexpression sowohl ihrem Primarius, als auch in BME ausgesäten Organoiden ähneln (Prince et al., 2022, Rauth et al., 2021).

Auch hinsichtlich des verwendeten Kulturmediums gibt es Unterschiede: Lee et al., verwenden in Ihrer Arbeit Hepatozyten-Medium welches durch EGF, CS-FBS, Y-27632, Glutamax und Primocin angereichert wurde (Lee et al., 2018). Die Arbeitsgruppe von Mullenders entschied sich hingegen dafür *Advanced* DMEM/F-12 als Kulturmedium zu verwenden. Dieses wurde durch FGF10, FGF7, FGF2, B27, A83-01, N-acetylcystein und Nicotinamid ergänzt (Mullenders et al., 2019). Unsere Arbeitsgruppe verwendete analog zu Lee et al. ein Hepatozyten-Kulturmedium, welches durch EGF, Glutamax, Primocin und csFBS ergänzt wurde. In den ersten 7 Kulturtagen wurde zusätzlich der ROCK-Inhibitor Y-27632 verwendet (2.2.2.1.2).

4.1.2 Erfolgsrate

Als erfolgreiche Organoidkultur haben wir die Entstehung von mindestens einem Organoid nach der Ausplattierung und Kultivierung der Tumorzellsuspension gewertet. Es wurden insgesamt 28 Organoidkulturen aus 55 Tumorpräparaten hergestellt, welche von 52 Patienten stammten. Damit lag unsere Erfolgsquote über alle Entitäten und Operationsverfahren verteilt bei 51 %.

Die Datenlage zu Urothelkarzinomorganoiden ist spärlich. In einer systematischen Literaturrecherche vom Juni 2022 fanden Melzer et al. insgesamt 7 peer-reviewed Publikationen zur Etablierung von dreidimensionalen Zellkulturen aus Urothelkarzinomgewebe bis Februar 2022. Zwei dieser Publikationen beschreiben Melzer et al. zufolge Methoden zur Entwicklung von Sphäroiden und werden für die Diskussion der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt (Melzer et al., 2022, Yoshida et al., 2015, Burgués et al., 2007). Die übrigen fünf Paper wurden von den Arbeitsgruppen

um Lee *et al.*, Mullenders *et al.*, Li *et al.*, Luo *et al.*, und Kim *et al.*, im Zeitraum von 2018 bis 2022 veröffentlicht. Interessanterweise beschäftigten sich lediglich zwei Arbeitsgruppen mit der Etablierung von Organoiden aus Urothelkarzinomgewebe des oberen Harntrakts (Luo *et al.*, 2021, Li *et al.*, 2022). Zum Zeitpunkt unserer Experimente (2019) gab es diesbezüglich noch keine *peer-reviewed* Veröffentlichungen. Die übrigen drei Arbeitsgruppen verwendeten als Ausgangsmaterial Tumorgewebe aus der Harnblase (Lee *et al.*, 2018, Mullenders *et al.*, 2019, Kim *et al.*, 2020).

Eine eigene Pubmed-Recherche mit den Suchbegriffen *Urothelial carcinoma* und *Organoids* am 07. April 2024 ergab vier weitere Publikationen, die sich mit der Herstellung von Organoiden aus Patientenmaterial befassen. Hiervon stammen drei von der eigenen Arbeitsgruppe. Die andere Studie beschreibt die Generierung einer Organoidkultur aus einem sarkomatoiden Urothelkarzinom. Die Methode war, nach Angaben der Autoren, analog zu der von Lee *et al.*, publizierten Methode (Garioni *et al.*, 2023, Wei *et al.*, 2022, Geng *et al.*, 2022, Walz *et al.*, 2023).

Die Erfolgsrate der fünf Arbeitsgruppen variierte zwischen 50 und 77 %. Interessanterweise variierte die Definition einer erfolgreichen Kultur zwischen den verschiedenen Autoren.

Lee *et al.* definierten 2018 sechs erfolgreiche Passagen einer primären Organoidkultur als „Linie“ und somit als Erfolg. Sie gaben eine Erfolgsquote von 70 % an. Somit wurden insgesamt 20 Organoidlinien etabliert, deren Primärgewebe von insg. 16 Patienten stammte. Interessanterweise bezieht sich die Erfolgsquote auf die letzten 9 Monate des Zeitraums der in der Veröffentlichung dargestellten Experimente. Als Ausgangsmaterial wurden ausschließlich TUR-B Präparate verwendet. Lediglich vier Organoidlinien wurden aus muskelinvasiven Karzinomen ($\geq T2$) hergestellt (Lee *et al.*, 2018).

Im Jahre 2019 wurde die erfolgreiche Etablierung von 77 Organoidlinien aus insgesamt 53 Patientenproben von Mullender *et al.* vorgestellt. Die Erfolgsrate wurde mit 50 % angegeben. Eine genaue Definition, ab wie vielen Passagen eine Kultur als „Linie“

angesehen wurde, fehlt in dieser Arbeit. Die Mehrzahl der Proben stammte von Patienten, die sich einer Zystektomie unterzogen hatten (42 Cx vs. 11 TUR-B Präparate) (Mullenders et al., 2019).

Die Forschungsgruppe um Kim et al. stellte 2020 acht Organoidlinien aus Operationsmaterial von acht Patienten her (7 Proben aus TUR-chips, 1 Probe aus Zystektomiematerial). Eine eindeutige Definition der Erfolgsraten fehlt (Kim et al., 2020).

Luo et al. berichteten 2021 von der erfolgreichen Herstellung von 6 Organoidkulturen aus 6 Patienten, welche an einem UTUC erkrankt waren. Ziel der Arbeit war es den Effekt der Extrakorporalen Stoßwellenlithotripsie auf Cisplatin Applikation zu untersuchen. Auch in dieser Arbeit finden sich keine Angaben bezüglich der Erfolgsraten (Luo et al., 2021).

Die Studien von Kim et al. und Lou et al. zeigen, dass nach erfolgreicher Methodenetablierung und zuverlässiger Organoidherstellung, diese als Plattform für zahlreiche weitere Projekte zur Verfügung stehen. Während sich die Gruppe von Kim et al. auf eine Verbesserung der dreidimensionalen Kultur spezialisierte, verwendeten Lou et al. die Organoide zur Untersuchung potenzieller neuer Therapiestrategien. Dies spiegelt die vielfältigen Möglichkeiten und Anwendungsgebiete der Organoidforschung wider.

2022 publizierte die Arbeitsgruppe um Li et al. ebenfalls Daten zur Etablierung von Urothelkarzinomorganoiden aus Tumorproben des oberen Harntrakts. Insgesamt wurden 25 Organoidlinien und 6 „normale“ Organoid Linien aus dem (Tumor-)Gewebe von 32 Patienten gezüchtet (Li et al., 2022).

Ein direkter Vergleich unserer Erfolgsquote von 51 % mit der aktuellen Literatur ist schwer. Zum einen legen lediglich zwei Veröffentlichung (Lee et al., 2018, Mullenders et al., 2019) ihre Erfolgsquote dar, zum anderen gibt nur die Arbeitsgruppe von Lee et al. eine klare Definition einer erfolgreichen Kultur vor. Ihnen zur Folge benötigt es 6 erfolgreiche Passagen um eine Kultur als „Organoidlinie“ zu bezeichnen. Wenn wir uns dieser Definition annehmen, ist es uns in lediglich 1/53 Fällen gelungen eine erfolgreiche Kultur zu etablieren. Nichtsdestotrotz gelang es uns zahlreiche Tumorproben als

Organoide anzuzüchten und diese zum Teil über einen Zeitraum von mindestens zwei Wochen am Leben zu halten.

4.2 Operationsverfahren und Präparattypen

Zur Probengewinnung wurden drei verschiedene Operationsverfahren verwendet: Zystektomie, Transurethrale Resektion der Blase und Nephroureterektomie. Da im Rahmen der radikalen Zystektomie auch Lymphknoten(-metastasen) entfernt werden, wurden drei weitere Kulturen mit makroskopisch befallenem Lymphknotengewebe angelegt. Die Erfolgsquote unterschied sich zum Teil deutlich zwischen den einzelnen Operationsverfahren.

Die Erfolgsrate der TUR-B Präparate war mit 50 % höher als der Cx Proben (42 %). Das ist insofern überraschend, als bei den Zystektomiepräparaten das Tumormaterial mit dem „kalten“ Skalpell entnommen wurde, bei der transurethralen Resektion jedoch – wie in Kapitel 1.1.6 beschrieben – mittels Elektroschlinge. Eine thermische Schädigung des Tumorgewebes ist somit nicht zu vermeiden. Dies mag für die Therapie von Vorteil sein, für die Zellkultur jedoch stellt dies ein Problem dar. Vorgeschädigte Zellen wachsen schlechter *in vitro* als vollständig vitale. Dieses Problem erkannten auch Lee et al., weshalb sie propagierten, den Tumor mittels „cold cut biopsy“ bzw. „cold loop resection“, also ohne Strom zu resezierem (Lee et al., 2018). Nach Rücksprache mit den Chirurgen der Abteilung für Urologie des Kreisklinikums Reutlingen wurde bei insgesamt 7 / 7 transurethralen Resektionen vor der Elektroresektion mittels einer kalten Biopsiezange großzügig vitales Tumorgewebe entfernt und uns zugesandt. Tatsächlich wuchsen in allen 7 Proben Organoiden, was die Vermutung von Lee et al., untermauert. Es könnte somit sinnvoll sein, wenn klinisch möglich, Tumormaterial für Forschungszwecke ohne Strom zu gewinnen, solange dabei die Radikalität der Operation nicht kompromittiert wird.

Eine mögliche Erklärung für die schlechtere Erfolgsrate der Zystektomiepräparate liegt darin begründet, dass die Diagnose eines muskelinvasiven Karzinoms und damit die Indikation zur Cx in der Regel durch eine TUR-B gestellt wird und damit das bei der Cx

gewonnene Tumormaterial intensiv vorbehandelt und somit potenziell ebenfalls vorgeschädigt sein könnte. Hinzu kommt, dass etwaige neoadjuvante Chemotherapien die Tumorzellen ebenfalls in ihrer Vitalität beeinträchtigen. Allerdings hatten in der vorliegenden Arbeit lediglich 2 Patienten eine neoadjuvante Chemotherapie erhalten. Zuletzt sollte bedacht werden, dass die Zeit, in der das Gewebe nicht mit Blut und Sauerstoff versorgt wird, durch den Operationsablauf (Cx) und die Tatsache, dass das Gewebe zunächst in die Pathologie transportiert wird, deutlich länger ist.

Die Lymphknotenpräparate lieferten zunächst zufriedenstellende Ergebnisse. Ein Organoidwachstum konnte in 2/3 Proben erreicht werden. Jedoch wurde eine Überwucherung der beiden Proben durch fibroblastenartige Zellen mit langen Fortsätzen beobachtet. Diese konnten auch nach mehrmaligen Passagieren nicht entfernt werden. Dieses Phänomen wurde jedoch nicht nur in den Lymphknotenpräparaten, sondern gelegentlich auch in anderen Kulturen beobachtet. Eine Möglichkeit diesem Problem zu entgehen wäre das gezielte Abpipettieren von Organoiden aus der Kultur um diese dann erneut in Matrigel auszuplattieren. Es ist denkbar, dass nach mehrmaligem Wiederholen dieses Vorganges die „Fibroblastenpopulation“ begrenzt werden könnte. Dies ist allerdings rein hypothetisch und bedarf weiterer Experimente.

Der höchste Erfolg wurde mittels UTUC-Präparate erzielt, wobei nur zwei Proben aus dem oberen Harntrakt stammten. Hierfür müssten weitere Kulturversuche aus UTUC erfolgen. Beide an das Labor gesandten Präparate konnten erfolgreich als Organoid kultiviert werden. Eine UTUC-Probe wuchs für zwei Wochen, während die andere erfolgreich als Linie etabliert werden konnte.

4.3 Organoidlinie aus Urothelkarzinomen des oberen Harntrakts

Wie bereits von Lee et al beschrieben, bedarf es einer stabilen Organoidlinie, welche zuverlässig über einen längeren Zeitraum passagiert werden kann, um weiterführende Experimente durchzuführen (Lee et al., 2018). Das Ziel unserer Studie war die Etablierung einer solchen Linie. Mit *BCO#56* ist uns dies gelungen. Die Organoidlinie war stabil genug, konnte über ein Jahr passagiert zu werden und wurde für die in Kapitel 3.7 und 4.4 beschriebenen Zytotoxizitätsanalysen verwendet. Obwohl es unserer Arbeitsgruppe zuvor zwar gelungen war, Organoide aus Urothelkarzinompräparaten zu züchten, blieb der Versuch eine stabile Linie zu etablieren erfolglos. Somit gelang es uns im Rahmen dieser Arbeit als erste Forschungsgruppe eine Organoidlinie aus Urothelkarzinomgewebe am Universitätsklinikum Tübingen zu etablieren. Darüber hinaus gab es, nach unserem besten Wissen, zu diesem Zeitpunkt (Mai. 2019) keine Publikationen bezüglich Organoidkulturen aus Urothelkarzinomen des oberen Harntrakts. Die immunhistochemische Färbung der Linie gelang der Arbeitsgruppe zu einem späteren Zeitpunkt. Yi Wei zeigte in seiner Arbeit, dass *BCO#56* sowohl „epitheliale als auch Urotheliale Marker“ exprimierte. Mittels Kryoschnitten konnte er die Expression von AE1 / AE3; CK5; CK8 und; CK20 beweisen (Wei et al., 2022).

Das Präparat stammte von einer 74 Jährigen Patientin welche sich, aufgrund eines UTUC, an der urologischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen einer Nephroureterektomie unterzog. Postoperativ wurde das Tumormaterial am Institut für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Tübingens untersucht. Es handelte sich um ein *High Grade* (G3) Urothelkarzinom des linken Nierenbeckens. Die Invasionstiefe wurde mit pT3 angegeben. Somit hatte der Tumor die *muscularis* überschritten und das Nierenparenchym infiltriert.

Interessanterweise war *BCO#56* zunächst kein vielversprechendes Präparat. Wie in Kapitel 3.6 detailliert beschrieben wurde, konnte in den ersten Kultivierungswochen kein Organoidwachstum beobachtet werden. Innerhalb der ersten zwei Wochen nach der Aussaat hatten sich fokal wenige Zellkonglomerate in der Matrigelkuppel gebildet. Diese nahmen an Größe und Menge zu, sodass sie ca. ab dem 19. Tag auch mit der kleinsten Vergrößerung deutlich erkennbar waren (**Abbildung 9**). Entgegen unseren Erwartungen

entwickelten sich diese Zellgruppierungen nicht zu vielen kleineren Organoiden, wie es in anderen Kulturen der Fall gewesen war. Stattdessen formierte sich im Laufe der nächsten zwei Wochen allmählich ein einzelnes, großes Organoid mit einem Durchmesser von ca. 350 μm . Dieses wuchs stetig weiter und erreichte schließlich eine Größe von ca. 850 μm , so dass es auch ohne Mikroskop sichtbar war (**Abbildung 10**). Nach der ersten Passagierung (welche erst am 48. Kulturtag erfolgte) änderte sich das Wachstumsverhalten der gesamten Kultur drastisch. Bereits am zweiten Tag nach der Aussaat hatten sich zahlreiche kleine Organoiden formiert, welche zuverlässig und rasch an Größe und Menge zunahmten. Auch in den weiteren Passagen folgten die Organoiden diesem Wachstumsmuster, so dass die Passagierung in kurzen Abständen von 7 – 10 Tagen erfolgen konnten.

Das Wachstumsverhalten von *BCO#56* ist aus mehreren Gründen interessant. Zum einen verdeutlicht diese Probe, dass eine (zunächst) ausbleibende Organoidformierung nicht zwingend ein Scheitern nach sich ziehen muss. Im Gegenteil könnte ein zu rasches Wachstum eventuell zu einem vorzeitigen Sterben der Organoiden führen. Dominik Daub diskutiert in seiner Dissertation, dass eine rasche Größenzunahme eines Organoids zu einer Sauerstoffminderversorgung der zentral gelegenen Zellen führen könnte. Ursächlich hierfür sei eine Zunahme der Diffusionsstrecke ([Daub, 2022](#)). Jedoch sollte berücksichtigt werden, dass das oben erwähnte, große, solitäre Organoid über zwei Wochen in Kultur gehalten wurde, ohne dass es zu einem Absterben kam. Möglicherweise hatten die Zellen, aufgrund des langsamen Wachstums Zeit, sich an die sich verändernde Sauerstoff- und Nährstoffkonzentration zu adaptieren. Somit könnte ein langsames Organoidwachstum sogar vorteilhaft für eine erfolgreiche Kultivierung und Linienetablierung sein. Allerdings birgt das langsame Wachstum einen entscheidenden Nachteil: In Zukunft könnten Organoidkulturen im individualisierten Setting verwendet werden, um das Ansprechen des Tumors auf verschiedene Medikamente und Kombinationstherapien zu evaluieren. In solch einem Szenario spielt die Zeit selbstverständlich eine entscheidende Rolle. Hier ist eine Zeitperiode von 7 Wochen „Wartezeit“ eventuell nicht mit dem Voranschreiten der Tumorerkrankung vereinbar. Allerdings könnte hier die Verwendung von Tumoroïden, kleine Gewebestücke des Tumors, die direkt in Kultur genommen werden können ohne das Ziel einer Linien-

Etablierung hilfreich sein. In den Veröffentlichungen von Mullenders und Lee et al., finden sich bezüglich der Dauer von der Aussaat bis zur ersten Formierung von Organoiden keine Information. Ein direkter Vergleich der Wachstumsdauer von *BCO#56* mit der Literatur ist daher nicht möglich.

Allerdings war neben *BCO#56* eine weitere Kultur mit einem UTUC-Präparat erfolgreich, welche ein schnelleres Wachstum aufwies, jedoch nicht als Linie etabliert werden konnte. *BCO#69* stammte von einem hochdifferenzierten, papillären Urothelkarzinom der linken oberen Kelchgruppe. Es handelte sich um eine nicht-invasive (Ta) Stufe welche als Low Grade (G1) klassifiziert wurde. Eine Organoidformierung konnte bereits wenige Tage nach der Aussaat beobachtet werden. Um den 11. Kulturtag erreichten die Organoide ihre Maximalgröße von ca. 100 µm. Zu diesem Zeitpunkt wies die *BCO#56* Kultur nur einige wenige Zellkonglomerate auf. Insgesamt wuchsen in *BCO#69* weniger als 5 Organoide, die eine beinahe Kreisrunde Kontur aufwiesen. Die Kultur konnte für 2 Wochen fortgesetzt werden, bevor ein allmählicher Zerfall beobachtet wurde. Der Wachstumsarrest und die konsekutive Degradierung dieser Organoide könnte evtl. mit dem raschen Wachstum zusammenhängen, wobei dies nur spekulativ ist. Ein weiterer Erklärungsansatz für das Scheitern der einen und der Erfolg der anderen UTUC-Kultur könnte das fortgeschrittene Tumorstadium von *BCO#56* und damit einhergehende zellbiologische Faktoren und genetische Veränderungen, z.B. hinsichtlich Immortalisierung der Zellen, sein. Zukünftige Kulturversuche mit Primärtumoren, die ebenfalls von oberen Harntrakt stammen und ähnliche histologische Eigenschaften wie der Primärtumor von *BCO#56* aufweisen könnten mehr Klarheit bringen.

4.4 Medikamententests

Neben der Etablierung einer Linie war ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit zu untersuchen, ob Zytotoxizitätsanalysen an dieser durchgeführt werden können. Dies ist uns gelungen. Somit konnten wir als erste Arbeitsgruppe des Universitätsklinikums Tübingen die Chemosensitivität von Urothelkarzinomen an einer dreidimensionalen Organoidkultur untersuchen. Dies stellt einen bedeutenden Fortschritt dar, da 3D-

Kulturen als vielversprechende Alternative zu etablierten Zelllinien gelten, wie bereits in Kapitel 1.2.3 dargelegt.

Untersucht wurde der zytotoxische Effekt des standardmäßig in der Therapie des Urothelkarzinoms angewendeten Zytostatikums Cisplatin (CP). Ferner wurden die Wirkung der BH3-Mimetika VTX und S63845, sowohl in der Mono- als auch in der Kombinationstherapie mit CP analysiert. Die Organoiden zeigten kaum ein Ansprechen auf CP. Auch in höheren Konzentrationen konnte keine wesentliche Verringerung der Zellviabilität registriert werden. Dies wurde als Resistenz der Organoiden gegenüber CP gewertet. Die BH3-Mimetika hingegen entfalteten eine antitumorale Wirkung. VTX stellte sich mit einem IC₅₀ von 0,99 µM als effektiver als S63845 heraus (IC₅₀ = 3,34 µM), so dass die Organoidlinie als sensitiv gegenüber beiden Medikamenten eingestuft wurde.

Weiterhin wurde untersucht, ob durch die Kombination von CP mit VTX die Resistenz der Zellen gegenüber dem Zytostatikum umgangen werden konnte. CP wurde jeweils in einer Konzentration von 25 µM angewandt, während VTX in drei unterschiedlichen Konzentrationen: 0,1 µM, 1,6 µM und 10 µM untersucht wurde. Hier zeigte sich, dass die Zellviabilität in Gegenwart von VTX und CP stärker abnahm als in den jeweiligen Monotherapien.

Hier war VTX in der mittleren Dosis (1,6 µM) am effektivsten (hoch signifikanter Unterschied). Somit konnte die Kombination von VTX und Cisplatin die Sensibilität der Organoiden gegenüber Cisplatin erhöhen und gezeigt werden, dass die zytotoxische Wirkung beider Medikamente additiv ist. Dies stimmt mit früheren Studien überein, die die synergistische Wirkung von Cisplatin und Medikamenten, welche die anti-apoptotische Wirkung der Bcl-2-Familienmitglieder hemmen, auf Tumorzelllinien aus Urothelkarzinomgewebe untersucht haben. In diesen Studien wurde beispielsweise die synergistische Wirkung von Cisplatin und sogenannten Antisense-Oligonukleotiden, welche die Expression von Bcl-2 und Bcl-xL (anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie) reduzieren, untersucht. Dies wird durch eine komplementäre Bindung dieser Medikamente an die RNA erreicht, wodurch die Bildung der entsprechenden Proteine verhindert wird (Schaaf et al., 2004, Bolenz et al., 2007). Obwohl in der vorliegenden Arbeit BH3-Mimetika eingesetzt wurden, ist der Effekt vergleichbar: Eine Verringerung

der anti-apoptotischen Wirkung der Bcl-2-Familienmitglieder, um die zytotoxische Wirkung von Cisplatin zu potenzieren. Insgesamt zeigen unsere Ergebnisse, dass die von unserer Arbeitsgruppe etablierten Urothelkarzinom Organoide für die Durchführung von Medikamententests geeignet sind. Sie dienen als Grundstein für die Etablierung vielversprechender weiterer Forschungsprojekte. Es ist durchaus denkbar, dass Organoidmodelle nach Optimierung der Kulturmethode verwendet werden können, um maßgeschneiderte Therapiestrategien auf individueller Basis zu identifizieren.

4.5 Limitationen der Organoidforschung.

Organoide stellen zweifellos eine vielversprechende und hoffnungsvolle neue Form der in-vitro Analyse dar, welche das Potential besitzt, viele verschiedene Forschungszweige zu revolutionieren. Allerdings existieren derzeit noch viele Limitationen, die es zu überwinden gilt. Um Organoide als standardisierte präklinische Modelle für bspw. Medikamententests anzuwenden, bedarf es einigen Autoren zur Folge einer Steigerung der Reproduzierbarkeit. Huch et al., zur Folge bedeutet dies, dass unterschiedliche Organoide unter gleichen Kulturbedingungen möglichst ähnliche Eigenschaften aufweisen sollten. Ihnen zufolge haben Forschende aktuell noch wenig Einfluss darüber, wie sich die Zellen in Kultur verhalten und zu einem Organoid zusammenfügen. Die Reproduzierbarkeit ähnlicher Eigenschaften und eine Kontrolle über das Wachstumsverhalten der Zellen sei eine wesentliche Voraussetzung dafür, Abweichungen vom Normalzustand systematisch zu erforschen ([Huch et al., 2017](#)). Auch in der vorliegenden Arbeit wurden sowohl eine Vielzahl an unterschiedlichen Wachstumsformen der einzelnen Organoide, als auch der Organoidanzahl / Kultur beobachtet. Um den Differenzierungs- und Formierungsprozess der Organoide anzuregen, bedarf es der kontrollierten Zugabe unterschiedlichster Wachstumsfaktoren. Yang et al., zufolge existiert eine Variabilität der Zusammensetzung und Dosierung der Wachstumsfaktoren und Nährstoffe der Organoidkulturmedien zwischen unterschiedlichen Laboren. Ferner könne die Zugabe unterschiedlichster Wachstumsfaktoren Genmutationen induzieren, welche sowohl die Reproduzierbarkeit als auch die Validität der Medikamententests beeinträchtigen können. Darüber hinaus sei

der Bedarf an unterschiedlichen Wachstumsfaktoren mit hohen Kosten verbunden, welches sich viele Labore nicht leisten können. Ihrer Meinung nach bedarf es der Einführung standardisierter Qualitätskontrollen, um die Reproduzierbarkeit und Popularität von Organoidforschung zu steigern. Die Autoren vertreten ferner die Meinung, dass Organoide aktuell nicht in der Lage seien, die Komplexität der in vivo Situation in ihrer Ganzheit zu rekapitulieren. Dies hat zwei Gründe: einerseits ist die Organoidkultur in ihrer physischen Anzahl und Größe der einzelnen Organoide durch den steigenden Bedarf an Nährstoffen limitiert. Im Gegensatz zu Tumoren im menschlichen Körper gibt es keine Kompensationsmechanismen wie bspw. die Induktion der Angiogenese. Andererseits besteht bspw. ein Karzinom, nicht nur aus maligne entarteten Epithelien, sondern aus zahlreichen weiteren mesenchymalen Zellen, welche bspw. das Stroma bilden. Es sei den Autoren zur Folge schwierig, in vitro Kulturbedingungen zu schaffen, welche gleichzeitig Wachstum und Differenzierung aller unterschiedlichen, in einem Tumor vorhanden, Zelltypen fördern. Dies begrenzt den Hauptvorteil von Organoiden gegenüber konventioneller zweidimensionaler Zellkultur und Xenograft-Modellen, hinsichtlich ihrer besseren Rekapitulation der in vivo Situation. (Yang et al., 2023).

Unsere Erfolgsrate der Organoidetablierung liegt bei 51 % über alle Präparattypen verteilt.

Obwohl man dies bereits als Erfolg sehen kann, benötigt die Anwendung von Organoidkulturen im klinischen Setting, einer höhere Erfolgsrate. Dies könnte einerseits durch selektive Präparatgewinnung, verbesserte Verdauprozesse, unterschiedlichen Medien als auch eine Standardisierung der Passagierschritte erreicht werden. Die Zeit bis zur erfolgreichen Kulturetablierung und sukzessiver Medikamententestung spielt im klinischen Setting ebenfalls eine kritische Rolle. Durch Umstellung der o.g. Faktoren könnte eine schnellere und zuverlässigere Kulturmethode entwickelt werden. Dies bedarf weiterer Untersuchungen mit größeren Kohorten.

5 Zusammenfassung

Das Urothelkarzinom ist ein multifaktoriell verursachter Tumor, dessen Inzidenz stetig zunimmt. Seit Jahrzehnten basiert die Therapie der fortgeschrittenen und muskelinvasiven Stadien auf der Verabreichung cisplatinbasierter chemotherapeutischer Protokolle. Die hohe Fragilität des häufig älteren Patientenkollektivs und die Entwicklung von Resistenzen im Rahmen der Therapie schränken die Effektivität dieser Therapie stark ein. Individuelle Therapiestrategien haben zwar bereits Einzug in die Therapie gefunden (Immun-Checkpoint Inhibition), jedoch liefern sie aktuell kaum bessere Ergebnisse als die konventionelle Cisplatin-basierte Therapie. Es mangelt an Plattformen, um neue Medikamente und -Kombinationen zu untersuchen. Organoide könnten in Zukunft diese Rolle einnehmen. Dabei handelt es sich um komplexe dreidimensionale Zellkonstrukte, welche u.a. durch die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten und Polarität der Einzelzellen die *in-vivo* Situation besser rekapitulieren als konventionelle zweidimensionale Zellkulturen. Gelingt es Organoide aus Patientenabgeleitetem Material mit hoher Zuverlässigkeit und Effizienz zu generieren, könnten diese in Zukunft verwendet werden, um optimale Therapiestrategien auf individueller Basis zu untersuchen.

Vor diesen Hintergründen war das Ziel dieser Arbeit die Generierung von Patientenabgeleiteten Urothelkarzinomorganoiden um diese als Plattform für Zytotoxizitätsanalysen, sowohl in der Mono- als auch in Kombinationstherapie zu verwenden.

Uns gelang es sowohl zahlreiche Organoide aus Urothelkarzinomen des unteren- und oberen Harntrakts an der Universitätsklinik für Urologie Tübingen zu generieren als auch eine Linie zu etablieren, welche über mehrere Monate zuverlässig passagiert werden konnte. Der Primärtumor war ein gering differenziertes (G3) Urothelkarzinom des linken Nierenbeckens. Die mit dem hohen Grading verbundene Aggressivität des Tumors könnte eine Ursache für den Erfolg dieser Probe sein. Unsere Untersuchungen zeigen, dass HG Tumoren eine etwas höhere Erfolgsrate als LG Tumoren aufwiesen, wobei der Unterschied sich als statistisch nicht signifikant erwies. Dies könnte allerdings auch mit der geringen Probenzahl zusammenhängen und müsste durch weiterführende

Untersuchungen untermauert werden. An dieser Linie wurde das zytotoxische Potenzial von Cisplatin in der Monotherapie als auch in der Kombination mit verschiedenen BCL-2 Inhibitoren untersucht. Hierbei handelt es sich um eine neue Medikamentenklasse, welche bereits in der Therapie bestimmter Leukämiearten zugelassen ist. Wir konnten zeigen, dass der zytotoxische Effekt von Cisplatin auf eine „resistente“ Zellpopulation durch die Kombination mit diesen Medikamenten wiederhergestellt werden kann.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sehen wir als ein „*Proof of Concept*“. Sie legt den Grundstein für zukünftige weitere Projekte auf diesem Gebiet. Die Methode der Organoidgenerierung muss in Zukunft weiter optimiert werden. Denkbar ist hier die Zusammensetzung des Kulturmediums zu ändern und kontrolliert zu testen. Auch könnte man Tumorstammzellen isolieren und diese gezielt in Kultur nehmen, um eine „reiner“ Organoidkultur zu erhalten. Zuletzt könnte man als Extrazellulärmatrix synthetische Hydrogel basierte Verfahren anwenden anstatt des üblicherweise verwendeten Matrigels. Die Zytotoxizitätsassays können in Zukunft ebenfalls weiter fortgesetzt werden. Die Kombination aus Cisplatin und BCL-2 Inhibitoren sollte weiter untersucht werden, um die von uns beobachtete Potenzierung des antitumoralen Effekts gegebenenfalls zu bestätigen. Ferner könnten weitere Medikamentenkombinationen an Organoidlinien getestet werden.

6 Literaturverzeichnis:

- ADAMS, J. M. & CORY, S. 2007. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26, 1324-37.
- ADAMS, J. M. & CORY, S. 2018. The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets. *Cell Death Differ*, 25, 27-36.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., MORGAN, D., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P., SCHÄFER, U., HÄCKER, B. R., HORSTMANN, C., PROWALD, A., ARNDT, O., BÖRSCH-HAUBOLD, A. & BÖRSCH-SUPAN, M. 2017. Molekularbiologie der Zelle. 6. Auflage ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- AMUNDSON, S. A., MYERS, T. G., SCUDIERO, D., KITADA, S., REED, J. C. & FORNACE, A. J., JR. 2000. An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines. *Cancer Res*, 60, 6101-10.
- AZIZI, M., CHERIYAN, S. K., PEYTON, C. C., FOERSTER, B., SHARIAT, S. F. & SPIESS, P. E. 2019. Optimal Management of Upper Tract Urothelial Carcinoma: an Unmet Need. *Curr Treat Options Oncol*, 20, 40.
- BAGCHI, S., YUAN, R. & ENGLEMAN, E. G. 2021. Immune Checkpoint Inhibitors for the Treatment of Cancer: Clinical Impact and Mechanisms of Response and Resistance. *Annu Rev Pathol*, 16, 223-249.
- BENTON, G., ARNAOUTOVA, I., GEORGE, J., KLEINMAN, H. K. & KOBLINSKI, J. 2014. Matrigel: from discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research. *Adv Drug Deliv Rev*, 79-80, 3-18.
- BIRDER, L. A., KANAI, A. J., CRUZ, F., MOORE, K. & FRY, C. H. 2010. Is the urothelium intelligent? *Neurourol Urodyn*, 29, 598-602.
- BOJ, S. F., HWANG, C. I., BAKER, L. A., CHIO, II, ENGLE, D. D., CORBO, V., JAGER, M., PONZ-SARVISE, M., TIRIAC, H., SPECTOR, M. S., GRACANIN, A., ONI, T., YU, K. H., VAN BOXTEL, R., HUCH, M., RIVERA, K. D., WILSON, J. P., FEIGIN, M. E., ÖHLUND, D., HANDLY-SANTANA, A., ARDITO-ABRAHAM, C. M., LUDWIG, M., ELYADA, E., ALAGESAN, B., BIFFI, G., YORDANOV, G. N., DELCUZE, B., CREIGHTON, B., WRIGHT, K., PARK, Y., MORSINK, F. H., MOLENAAR, I. Q., BOREL RINKES, I. H., CUPPEN, E., HAO, Y., JIN, Y., NIJMAN, I. J., IACOBUZIO-DONAHUE, C., LEACH, S. D., PAPPIN, D. J., HAMMELL, M., KLIMSTRA, D. S., BASTURK, O., HRUBAN, R. H., OFFERHAUS, G. J., VRIES, R. G., CLEVERS, H. & TUVESON, D. A. 2015. Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell*, 160, 324-38.
- BOLENZ, C., BECKER, A., TROJAN, L., SCHAAF, A., CAO, Y., WEISS, C., ALKEN, P. & MICHEL, M. S. 2007. Optimizing chemotherapy for transitional cell carcinoma by application of bcl-2 and bcl-xL antisense oligodeoxynucleotides. *Urol Oncol*, 25, 476-82.
- BORST, P., EVERS, R., KOOL, M. & WIJNHOLDS, J. 2000. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst*, 92, 1295-302.
- BROUTIER, L., MASTROGIOVANNI, G., VERSTEGEN, M. M., FRANCIES, H. E., GAVARRÓ, L. M., BRADSHAW, C. R., ALLEN, G. E., ARNES-

- BENITO, R., SIDOROVA, O., GASPERSZ, M. P., GEORGAKOPOULOS, N., KOO, B. K., DIETMANN, S., DAVIES, S. E., PRASEEDOM, R. K., LIESHOUT, R., JNM, I. J., WIGMORE, S. J., SAEB-PARSY, K., GARNETT, M. J., VAN DER LAAN, L. J. & HUCH, M. 2017. Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening. *Nat Med*, 23, 1424-1435.
- BURGUÉS, J. P., GÓMEZ, L., PONTONES, J. L., VERA, C. D., JIMÉNEZ-CRUZ, J. F. & OZONAS, M. 2007. A chemosensitivity test for superficial bladder cancer based on three-dimensional culture of tumour spheroids. *Eur Urol*, 51, 962-9; discussion 969-70.
- CHEN, L., WILLIS, S. N., WEI, A., SMITH, B. J., FLETCHER, J. I., HINDS, M. G., COLMAN, P. M., DAY, C. L., ADAMS, J. M. & HUANG, D. C. 2005. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell*, 17, 393-403.
- CHEN, S. H. & CHANG, J. Y. 2019. New Insights into Mechanisms of Cisplatin Resistance: From Tumor Cell to Microenvironment. *Int J Mol Sci*, 20.
- CHOU, W. H., MCGREGOR, B., SCHMIDT, A., CARVALHO, F. L. F., HIRSCH, M. S., CHANG, S. L., KIBEL, A. & MOSSANEN, M. 2021. Cyclophosphamide-associated bladder cancers and considerations for survivorship care: A systematic review. *Urol Oncol*, 39, 678-685.
- COLLABORATION, A. B. C. M.-A. 2005. Neoadjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer: update of a systematic review and meta-analysis of individual patient data advanced bladder cancer (ABC) meta-analysis collaboration. *Eur Urol*, 48, 202-5; discussion 205-6.
- CUMBERBATCH, M. G., ROTA, M., CATTO, J. W. & LA VECCHIA, C. 2016. The Role of Tobacco Smoke in Bladder and Kidney Carcinogenesis: A Comparison of Exposures and Meta-analysis of Incidence and Mortality Risks. *Eur Urol*, 70, 458-66.
- DALGHI, M. G., MONTALBETTI, N., CARATTINO, M. D. & APODACA, G. 2020. The Urothelium: Life in a Liquid Environment. *Physiol Rev*, 100, 1621-1705.
- DASARI, S. & TCHOUNWOU, P. B. 2014. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*, 740, 364-78.
- DAUB, D. 2022. Organoide aus malignem Harnblasengewebe: Etablierung einer Kultivierungsmethode und Vergleich verschiedener Wachstumsbedingungen. *Medizinische Fakultät Universität Tübingen Publikationssystem* (<http://dx.doi.org/10.15496/publikation-64020>).
- DE SANTIS, M., BELLMUNT, J., MEAD, G., KERST, J. M., LEAHY, M., MAROTO, P., GIL, T., MARREAUD, S., DAUGAARD, G., SKONECZNA, I., COLLETTE, S., LORENT, J., DE WIT, R. & SYLVESTER, R. 2012. Randomized phase II/III trial assessing gemcitabine/carboplatin and methotrexate/carboplatin/vinblastine in patients with advanced urothelial cancer who are unfit for cisplatin-based chemotherapy: EORTC study 30986. *J Clin Oncol*, 30, 191-9.
- DEGAM. 2020. *Nicht sichtbare Hämaturie (NSH) - Degam S1-Handlungsempfehlung* [Online]. Deutsche Gesellschaft für Allgemeinmedizin und Familienmedizin e.V. Available: <https://www.degam.de/files/Inhalte/Leitlinien->

- [Inhalte/Dokumente/DEGAM-S1-Handlungsempfehlung/053-028%20Haematurie%2C%20nicht%20sichtbare/LL%20Homepage%201_2020/053-028| Nicht%20sichtbare%20Haematurie_redakt211020.pdf](#) [Accessed 19. März 2023].
- DEGEORGE, K. C., HOLT, H. R. & HODGES, S. C. 2017. Bladder Cancer: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician*, 96, 507-514.
- DELBRIDGE, A. R. & STRASSER, A. 2015. The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. *Cell Death Differ*, 22, 1071-80.
- DROST, J. & CLEVERS, H. 2017. Translational applications of adult stem cell-derived organoids. *Development*, 144, 968-975.
- DROST, J. & CLEVERS, H. 2018. Organoids in cancer research. *Nat Rev Cancer*, 18, 407-418.
- ELMORE, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35, 495-516.
- GALLUZZI, L., VITALE, I., MICHELS, J., BRENNER, C., SZABADKAI, G., HAREL-BELLAN, A., CASTEDO, M. & KROEMER, G. 2014. Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell Death Dis*, 5, e1257.
- GALSKY, M. D., HAHN, N. M., ROSENBERG, J., SONPAVDE, G., HUTSON, T., OH, W. K., DREICER, R., VOGELZANG, N., STERNBERG, C., BAJORIN, D. F. & BELLMUNT, J. 2011. A consensus definition of patients with metastatic urothelial carcinoma who are unfit for cisplatin-based chemotherapy. *Lancet Oncol*, 12, 211-4.
- GAO, D., VELA, I., SBONER, A., IAQUINTA, P. J., KARTHAUS, W. R., GOPALAN, A., DOWLING, C., WANJALA, J. N., UNDVALL, E. A., ARORA, V. K., WONGVIPAT, J., KOSSAI, M., RAMAZANOGLU, S., BARBOZA, L. P., DI, W., CAO, Z., ZHANG, Q. F., SIROTA, I., RAN, L., MACDONALD, T. Y., BELTRAN, H., MOSQUERA, J. M., TOUIJER, K. A., SCARDINO, P. T., LAUDONE, V. P., CURTIS, K. R., RATHKOPF, D. E., MORRIS, M. J., DANILA, D. C., SLOVIN, S. F., SOLOMON, S. B., EASTHAM, J. A., CHI, P., CARVER, B., RUBIN, M. A., SCHER, H. I., CLEVERS, H., SAWYERS, C. L. & CHEN, Y. 2014. Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer. *Cell*, 159, 176-187.
- GARIONI, M., TSCHAN, V. J., BLUKACZ, L., NUCIFORO, S., PARMENTIER, R., ROMA, L., COTO-LLERENA, M., PUESCHEL, H., PISCUOGLIO, S., VLAJNIC, T., STENNER, F., SEIFERT, H. H., RENTSCH, C. A., BUBENDORF, L. & LE MAGNEN, C. 2023. Patient-derived organoids identify tailored therapeutic options and determinants of plasticity in sarcomatoid urothelial bladder cancer. *NPJ Precis Oncol*, 7, 112.
- GENG, R., HARLAND, N., MONTES-MOJARRO, I. A., FEND, F., AICHER, W. K., STENZL, A. & AMEND, B. 2022. CD24: A Marker for an Extended Expansion Potential of Urothelial Cancer Cell Organoids In Vitro? *Int J Mol Sci*, 23.
- GOLDAR, S., KHANIANI, M. S., DERAKHSHAN, S. M. & BARADARAN, B. 2015. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev*, 16, 2129-44.
- HOIMES, C. J., BEDKE, J., LORIOT, Y., NISHIYAMA, H., FANG, X., KATARIA, R. S., MORENO, B. H. & GALSKY, M. D. 2021. KEYNOTE-B15/EV-304:

- Randomized phase 3 study of perioperative enfortumab vedotin plus pembrolizumab versus chemotherapy in cisplatin-eligible patients with muscle-invasive bladder cancer (MIBC). *Journal of Clinical Oncology*, 39, TPS4587-TPS4587.
- HUCH, M., KNOBLICH, J. A., LUTOLF, M. P. & MARTINEZ-ARIAS, A. 2017. The hope and the hype of organoid research. *Development*, 144, 938-941.
- HUG, H. 2000. Apoptose: die Selbstvernichtung der Zelle als Überlebensschutz. *Biologie in unserer Zeit*, 30, 128-135.
- HUMPHREY, P. A., MOCH, H., CUBILLA, A. L., ULBRIGHT, T. M. & REUTER, V. E. 2016. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol*, 70, 106-119.
- JENSEN, C. & TENG, Y. 2020. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Front Mol Biosci*, 7, 33.
- KAPAŁCZYŃSKA, M., KOLENDA, T., PRZYBYŁA, W., ZAJĄCZKOWSKA, M., TERESIAK, A., FILAS, V., IBBS, M., BLIŹNIAK, R., ŁUCZEWSKI, Ł. & LAMPERSKA, K. 2018. 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci*, 14, 910-919.
- KIM, E., CHOI, S., KANG, B., KONG, J., KIM, Y., YOON, W. H., LEE, H. R., KIM, S., KIM, H. M., LEE, H., YANG, C., LEE, Y. J., KANG, M., ROH, T. Y., JUNG, S., KIM, S., KU, J. H. & SHIN, K. 2020. Creation of bladder assembloids mimicking tissue regeneration and cancer. *Nature*, 588, 664-669.
- KLEINMAN, H. K. & MARTIN, G. R. 2005. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol*, 15, 378-86.
- KOTSCHY, A., SZLAVIK, Z., MURRAY, J., DAVIDSON, J., MARAGNO, A. L., LE TOUMELIN-BRAIZAT, G., CHANRION, M., KELLY, G. L., GONG, J. N., MOUJALLED, D. M., BRUNO, A., CSEKEI, M., PACZAL, A., SZABO, Z. B., SIPOS, S., RADICS, G., PROSZENYAK, A., BALINT, B., ONDI, L., BLASKO, G., ROBERTSON, A., SURGENOR, A., DOKURNO, P., CHEN, I., MATASSOVA, N., SMITH, J., PEDDER, C., GRAHAM, C., STUDENY, A., LYSIAK-AUVITY, G., GIRARD, A. M., GRAVÉ, F., SEGAL, D., RIFFKIN, C. D., POMILIO, G., GALBRAITH, L. C., AUBREY, B. J., BRENNAN, M. S., HEROLD, M. J., CHANG, C., GUASCONI, G., CAUQUIL, N., MELCHIORE, F., GUIGAL-STEPHAN, N., LOCKHART, B., COLLAND, F., HICKMAN, J. A., ROBERTS, A. W., HUANG, D. C., WEI, A. H., STRASSER, A., LESSENE, G. & GENESTE, O. 2016. The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. *Nature*, 538, 477-482.
- KRAYWINKEL, K., FIEBIG, J. & SCHULZ, G. B. 2018. Epidemiologie des Harnblasenkarzinoms in Deutschland. *Der Onkologe*, 24, 6-13.
- LEE, S. H., HU, W., MATULAY, J. T., SILVA, M. V., OWCZAREK, T. B., KIM, K., CHUA, C. W., BARLOW, L. J., KANDOTH, C., WILLIAMS, A. B., BERGREN, S. K., PIETZAK, E. J., ANDERSON, C. B., BENSON, M. C., COLEMAN, J. A., TAYLOR, B. S., ABATE-SHEN, C., MCKIERNAN, J. M., AL-AHMADIE, H., SOLIT, D. B. & SHEN, M. M. 2018. Tumor

- Evolution and Drug Response in Patient-Derived Organoid Models of Bladder Cancer. *Cell*, 173, 515-528.e17.
- LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE (DEUTSCHE KREBSGESELLSCHAFT, D. K. & AWMF). 2020. *S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Langversion 2.0* [Online]. AWMF. Available: https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Blasenkarzinom/Version_2.0/LL_Harnblasenkarzinom_Langversion_2.0.pdf [Accessed 15 Juli 2022].
- LENIS, A. T., LEC, P. M., CHAMIE, K. & MSHS, M. D. 2020. Bladder Cancer: A Review. *Jama*, 324, 1980-1991.
- LI, F., ZHENG, Z., CHEN, W., LI, D., ZHANG, H., ZHU, Y., MO, Q., ZHAO, X., FAN, Q., DENG, F., HAN, C. & TAN, W. 2023. Regulation of cisplatin resistance in bladder cancer by epigenetic mechanisms. *Drug Resist Updat*, 68, 100938.
- LI, Z., XU, H., GONG, Y., CHEN, W., ZHAN, Y., YU, L., SUN, Y., LI, A., HE, S., GUAN, B., WU, Y., XIONG, G., FANG, D., HE, Y., TANG, Q., YAO, L., HU, Z., MEI, H., HE, Z., CAI, Z., GUO, Y., LI, X., ZHOU, L. & HUANG, W. 2022. Patient-Derived Upper Tract Urothelial Carcinoma Organoids as a Platform for Drug Screening. *Adv Sci (Weinh)*, 9, e2103999.
- LINDNER, A. K., SCHACHTNER, G., TULCHINER, G., THURNHER, M., UNTERGASSER, G., OBRIST, P., PIPP, I., STEINKOHL, F., HORNINGER, W., CULIG, Z. & PICHLER, R. 2021. Lynch Syndrome: Its Impact on Urothelial Carcinoma. *Int J Mol Sci*, 22.
- LOO, R. K., LIEBERMAN, S. F., SLEZAK, J. M., LANDA, H. M., MARIANI, A. J., NICOLAISEN, G., ASPERA, A. M. & JACOBSEN, S. J. 2013. Stratifying risk of urinary tract malignant tumors in patients with asymptomatic microscopic hematuria. *Mayo Clin Proc*, 88, 129-38.
- LUO, H. L., LIU, H. Y., CHANG, Y. L., SU, Y. L., HUANG, C. C., LIN, X. J. & CHUANG, Y. C. 2021. Extracorporeal Shock Wave Enhances the Cisplatin Efficacy by Improving Tissue Infiltration and Cellular Uptake in an Upper Urinary Tract Cancer Animal and Human-Derived Organoid Model. *Cancers (Basel)*, 13.
- MAIKE, D. W. E. A. 2021. Diagnostik und Therapie bei Patienten mit Harnblasenkarzinom. *Deutsches Ärzteblatt International*, 118, 169-76.
- MARTINI, A., RAGGI, D., FALLARA, G., NOCERA, L., SCHULTZ, J. G., BELLADELLI, F., MARANDINO, L., SALONIA, A., BRIGANTI, A., MONTORSI, F., POWLES, T. & NECCHI, A. 2022. Immunotherapy versus chemotherapy as first-line treatment for advanced urothelial cancer: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev*, 104, 102360.
- MEIJER, R. P. 2021. Urothelial cancer organoids: a tool for bladder cancer research. *Pathologe*, 42, 165-169.
- MELZER, M. K., ZEHE, V., ZENGERLING, F., WEZEL, F., GÜNES, C., MAISCH, P. & BOLENZ, C. 2022. Organoide als Meilenstein auf dem Weg zur personalisierten Therapie des Urothelkarzinoms: ein systematischer Review. *Die Urologie*, 61, 745-752.

- MERINO, D., KELLY, G. L., LESSENE, G., WEI, A. H., ROBERTS, A. W. & STRASSER, A. 2018. BH3-Mimetic Drugs: Blazing the Trail for New Cancer Medicines. *Cancer Cell*, 34, 879-891.
- MERINO, D., LOK, S. W., VISVADER, J. E. & LINDEMAN, G. J. 2016. Targeting BCL-2 to enhance vulnerability to therapy in estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncogene*, 35, 1877-87.
- MOSTAFA, M. H., SHEWEITA, S. A. & O'CONNOR, P. J. 1999. Relationship between schistosomiasis and bladder cancer. *Clin Microbiol Rev*, 12, 97-111.
- MULLENDERS, J., DE JONGH, E., BROUSALI, A., ROOSEN, M., BLOM, J. P. A., BEGTHEL, H., KORVING, J., JONGES, T., KRANENBURG, O., MEIJER, R. & CLEVERS, H. C. 2019. Mouse and human urothelial cancer organoids: A tool for bladder cancer research. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116, 4567-4574.
- PATEL, V. G., OH, W. K. & GALSKEY, M. D. 2020. Treatment of muscle-invasive and advanced bladder cancer in 2020. *CA Cancer J Clin*, 70, 404-423.
- PELUCCHI, C., BOSETTI, C., NEGRI, E., MALVEZZI, M. & LA VECCHIA, C. 2006. Mechanisms of disease: The epidemiology of bladder cancer. *Nat Clin Pract Urol*, 3, 327-40.
- POWLES, T., ROSENBERG, J. E., SONPAVDE, G. P., LORIOT, Y., DURÁN, I., LEE, J.-L., MATSUBARA, N., VULSTEKE, C., CASTELLANO, D., WU, C., CAMPBELL, M., MATSANGOU, M. & PETRYLAK, D. P. 2021. Enfortumab Vedotin in Previously Treated Advanced Urothelial Carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 384, 1125-1135.
- POWLES, T., VALDERRAMA, B. P., GUPTA, S., BEDKE, J., KIKUCHI, E., HOFFMAN-CENSITS, J., IYER, G., VULSTEKE, C., PARK, S. H., SHIN, S. J., CASTELLANO, D., FORNARINI, G., LI, J. R., GÜMÜŞ, M., MAR, N., LORIOT, Y., FLÉCHON, A., DURAN, I., DRAKAKI, A., NARAYANAN, S., YU, X., GORLA, S., HOMET MORENO, B. & VAN DER HEIJDEN, M. S. 2024. Enfortumab Vedotin and Pembrolizumab in Untreated Advanced Urothelial Cancer. *N Engl J Med*, 390, 875-888.
- PRINCE, E., CRUICKSHANK, J., BA-ALAWI, W., HODGSON, K., HAIGHT, J., TOBIN, C., WAKEMAN, A., AVOULOV, A., TOPOLSKAIA, V., ELLIOTT, M. J., MCGUIGAN, A. P., BERMAN, H. K., HAIBE-KAINS, B., CESCONE, D. W. & KUMACHEVA, E. 2022. Biomimetic hydrogel supports initiation and growth of patient-derived breast tumor organoids. *Nat Commun*, 13, 1466.
- RAUTH, S., KARMAKAR, S., BATRA, S. K. & PONNUSAMY, M. P. 2021. Recent advances in organoid development and applications in disease modeling. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 1875, 188527.
- RETZ, M., GSCHWEND, J. E. & LEHMANN, J. 2009. [Systemic chemotherapy for bladder cancer: news in 2009]. *Urologe A*, 48, 655-62.
- RICH MORAVEC, B. & RISS, T. 2003. THE CELLTITER-BLUE™ CELL VIABILITY ASSAY: MONITORING CELL VIABILITY USING A FLUORESCENT REDOX INDICATOR DYE. *Cell*, 12.
- RICHTERS, A., ABEN, K. K. H. & KIEMENEY, L. 2020. The global burden of urinary bladder cancer: an update. *World J Urol*, 38, 1895-1904.

- RKI. 2021. *Krebs in Deutschland für 2017/2018* [Online]. Robert Koch Institut - Zentrum für Krebsregisterdaten. Available: [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs in Deutschland/kid_2021/krebs_in_deutschland_2021.pdf? blob=publicationFile](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2021/krebs_in_deutschland_2021.pdf?blob=publicationFile) [Accessed 19. März 2023].
- RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, C. O., TORRES-GARCÍA, S. E., OLVERA-SANDOVAL, C., RAMÍREZ-CASTILLO, F. Y., MURO, A. L., AVELAR-GONZALEZ, F. J. & GUERRERO-BARRERA, A. L. 2014. International Journal of Current Research and Academic Review. *Int. J. Curr. Res. Aca. Rev*, 2, 188-200.
- SACHS, N., DE LIGT, J., KOPPER, O., GOGOLA, E., BOUNOVA, G., WEEBER, F., BALGOBIND, A. V., WIND, K., GRACANIN, A., BEGTHEL, H., KORVING, J., VAN BOXTEL, R., DUARTE, A. A., LELIEVELD, D., VAN HOECK, A., ERNST, R. F., BLOKZIJL, F., NIJMAN, I. J., HOOGSTRAAT, M., VAN DE VEN, M., EGAN, D. A., ZINZALLA, V., MOLL, J., BOJ, S. F., VOEST, E. E., WESSELS, L., VAN DIEST, P. J., ROTTENBERG, S., VRIES, R. G. J., CUPPEN, E. & CLEVERS, H. 2018. A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell*, 172, 373-386.e10.
- SCHAAF, A., SAGI, S., LANGBEIN, S., TROJAN, L., ALKEN, P. & MICHEL, M. S. 2004. Cytotoxicity of cisplatin in bladder cancer is significantly enhanced by application of bcl-2 antisense oligonucleotides. *Urol Oncol*, 22, 188-92.
- SIDDIK, Z. H. 2003. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22, 7265-79.
- SOUERS, A. J., LEVERSON, J. D., BOGHAERT, E. R., ACKLER, S. L., CATRON, N. D., CHEN, J., DAYTON, B. D., DING, H., ENSCHEDE, S. H., FAIRBROTHER, W. J., HUANG, D. C., HYMOWITZ, S. G., JIN, S., KHAW, S. L., KOVAR, P. J., LAM, L. T., LEE, J., MAECKER, H. L., MARSH, K. C., MASON, K. D., MITTEN, M. J., NIMMER, P. M., OLEKSIJEV, A., PARK, C. H., PARK, C. M., PHILLIPS, D. C., ROBERTS, A. W., SAMPATH, D., SEYMOUR, J. F., SMITH, M. L., SULLIVAN, G. M., TAHIR, S. K., TSE, C., WENDT, M. D., XIAO, Y., XUE, J. C., ZHANG, H., HUMERICKHOUSE, R. A., ROSENBERG, S. H. & ELMORE, S. W. 2013. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med*, 19, 202-8.
- STEELE, T. M., TALBOTT, G. C., SAM, A., TEPPER, C. G., GHOSH, P. M. & VINALL, R. L. 2019. Obatoclox, a BH3 Mimetic, Enhances Cisplatin-Induced Apoptosis and Decreases the Clonogenicity of Muscle Invasive Bladder Cancer Cells via Mechanisms That Involve the Inhibition of Pro-Survival Molecules as Well as Cell Cycle Regulators. *Int J Mol Sci*, 20.
- STERNBERG, C. N., YAGODA, A., SCHER, H. I., WATSON, R. C., GELLER, N., HERR, H. W., MORSE, M. J., SOGANI, P. C., VAUGHAN, E. D., BANDER, N. & ET AL. 1989. Methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin for advanced transitional cell carcinoma of the urothelium. Efficacy and patterns of response and relapse. *Cancer*, 64, 2448-58.

- SUNG, H., FERLAY, J., SIEGEL, R. L., LAVERSANNE, M., SOERJOMATARAM, I., JEMAL, A. & BRAY, F. 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71, 209-249.
- SYLVESTER, R. J., VAN DER MEIJDEN, A. P., OOSTERLINCK, W., WITJES, J. A., BOUFFIOUX, C., DENIS, L., NEWLING, D. W. & KURTH, K. 2006. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol*, 49, 466-5; discussion 475-7.
- TAUBER, R., VON AMSBERG, G. & DE SANTIS, M. 2022. [Update on systemic treatment of urothelial cancer: therapy in transition]. *Aktuelle Urol*, 53, 167-179.
- VAN DE WETERING, M., FRANCIES, H. E., FRANCIS, J. M., BOUNOVA, G., IORIO, F., PRONK, A., VAN HOUTD, W., VAN GORP, J., TAYLOR-WEINER, A., KESTER, L., MCLAREN-DOUGLAS, A., BLOKKER, J., JAKSANI, S., BARTFELD, S., VOLCKMAN, R., VAN SLUIS, P., LI, V. S., SEEPO, S., SEKHAR PEDAMALLU, C., CIBULSKIS, K., CARTER, S. L., MCKENNA, A., LAWRENCE, M. S., LICHTENSTEIN, L., STEWART, C., KOSTER, J., VERSTEEG, R., VAN OUDENAARDEN, A., SAEZ-RODRIGUEZ, J., VRIES, R. G., GETZ, G., WESSELS, L., STRATTON, M. R., MCDERMOTT, U., MEYERSON, M., GARNETT, M. J. & CLEVERS, H. 2015. Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients. *Cell*, 161, 933-45.
- VAN OPDENBOSCH, N. & LAMKANFI, M. 2019. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. *Immunity*, 50, 1352-1364.
- VOM DORP, F., EISENHARDT, A., GOEBELL, P.-J., GSCHWEND, J., JÄGER, T., JAKSE, G., JOCHAM, D., KARL, A., KREGE, S., LÜMMEN, G., OTTO, T., RETTENMEIER, A., RÖDEL, C., RÜBBEN, H., SCHENCK, M., SCHMID, K. W., STIEF, C., STÖCKLE, M. & ZAAK, D. 2009. Harnblasenkarzinom. In: RÜBBEN, H. (ed.) *Uroonkologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- VON DER MAASE, H., HANSEN, S. W., ROBERTS, J. T., DOGLIOTTI, L., OLIVER, T., MOORE, M. J., BODROGI, I., ALBERS, P., KNUTH, A., LIPPERT, C. M., KERBRAT, P., SANCHEZ ROVIRA, P., WERSALL, P., CLEALL, S. P., ROYCHOWDHURY, D. F., TOMLIN, I., VISSERENGRUL, C. M. & CONTE, P. F. 2000. Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study. *J Clin Oncol*, 18, 3068-77.
- VON DER MAASE, H., SENGELOV, L., ROBERTS, J. T., RICCI, S., DOGLIOTTI, L., OLIVER, T., MOORE, M. J., ZIMMERMANN, A. & ARNING, M. 2005. Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol*, 23, 4602-8.

-
- WALZ, S., POLLEHNE, P., VOLLMER, P., AICHER, W. K., STENZL, A., HARLAND, N. & AMEND, B. 2023. Effects of Scaffolds on Urine- and Urothelial Carcinoma Tissue-Derived Organoids from Bladder Cancer Patients. *Cells*, 12.
- WEI, Y., AMEND, B., TODENHÖFER, T., LIPKE, N., AICHER, W. K., FEND, F., STENZL, A. & HARLAND, N. 2022. Urinary Tract Tumor Organoids Reveal Eminent Differences in Drug Sensitivities When Compared to 2-Dimensional Culture Systems. *Int J Mol Sci*, 23.
- XU, H., LYU, X., YI, M., ZHAO, W., SONG, Y. & WU, K. 2018. Organoid technology and applications in cancer research. *J Hematol Oncol*, 11, 116.
- YANG, S., HU, H., KUNG, H., ZOU, R., DAI, Y., HU, Y., WANG, T., LV, T., YU, J. & LI, F. 2023. Organoids: The current status and biomedical applications. *MedComm (2020)*, 4, e274.
- YIN, M., JOSHI, M., MEIJER, R. P., GLANTZ, M., HOLDER, S., HARVEY, H. A., KAAG, M., FRANSEN VAN DE PUTTE, E. E., HORENBLAS, S. & DRABICK, J. J. 2016. Neoadjuvant Chemotherapy for Muscle-Invasive Bladder Cancer: A Systematic Review and Two-Step Meta-Analysis. *Oncologist*, 21, 708-15.
- YOSHIDA, T., OKUYAMA, H., NAKAYAMA, M., ENDO, H., NONOMURA, N., NISHIMURA, K. & INOUE, M. 2015. High-dose chemotherapeutics of intravesical chemotherapy rapidly induce mitochondrial dysfunction in bladder cancer-derived spheroids. *Cancer Sci*, 106, 69-77.
- YOSHIDA, T., SINGH, A. K., BISHAI, W. R., MCCONKEY, D. J. & BIVALACQUA, T. J. 2018. Organoid culture of bladder cancer cells. *Investig Clin Urol*, 59, 149-151.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik / Institut für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. Tilman Todenhöfer durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Arnulf Stenzl, Supervisor, Prof. Dr. Tilman Todenhöfer, Doktorvater und Dr. rer. nat. Janina Johanning, Betreuerin.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Prof. Dr. rer. nat. Gerd Klein und Dominik Daub von mir (mit Unterstützung durch Yi Wei) durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Dr. rer. nat. Janina Johanning durch mich.

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

Tübingen, den 18.05.2025

Leander Schwaibold

8 Danksagung

Mein Dank gilt zunächst meinen Eltern Hartwig und Irina Schwaibold. Nicht nur haben sie mir mein Studium ermöglicht, sondern mich auf jedem Schritt des Studiums und der Dissertation unterstützt. Auch meinem Bruder Marvin Schwaibold möchte ich danken. Seine beinahe spartanische Arbeitsmoral und Unfähigkeit, Mittelmäßigkeit bei sich selbst und anderen zu akzeptieren haben mich stets auf meinem Weg motiviert.

Ferner möchte ich mich bei allen Mitarbeitenden der Klinik für Urologie, Tübingen und des Zentrums für medizinische Forschung bedanken, welche an dieser Arbeit durch kleine oder größere Beiträge mitgeholfen haben. Ohne Ihre Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen: Gerd Klein, Dominik Daub, Wilhelm Aicher, Sieglinde Baisch, Niklas Harland, Eva Erne, Jörg Hennenlotter, Yi Wei und allen weiteren.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Tilman Todenhöfer. Er hat mir viel beigebracht und mich dazu ermutigt die vorliegende Arbeit an zwei Kongressen zu präsentieren. Seine Lehren werde ich in meiner weiteren Karriere stets berücksichtigen. Ferner möchte ich mich bei meiner Betreuerin Janina Johänning bedanken. Sie hat mich nie mit Samthandschuhen angefasst und stets motiviert besser und härter zu arbeiten. Insbesondere bei der Verfassung der Dissertationsschrift war sie mir stets eine große Unterstützung.

Zuletzt möchte ich mich bei Prof. Dr. Arnulf Stenzl bedanken. Er bot mir die Möglichkeit in seinem Institut an einem spannenden und wichtigen Thema zu forschen. Bei Rückfragen oder Problemen war seine Tür immer offen, was nicht selbstverständlich ist.

Euch allen vielen Dank!

Leander Schwaibold