

Aus der  
Universitätsklinik für Urologie Tübingen

**Veränderungen von Expressionsmerkmalen in  
Blasentumor-Organoiden während  
Langzeitkultivierungen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Lipke, Nizar Ramin Louis Timo

2023

Dekan: Professor Dr. B. Pichler  
1. Berichterstatter: Professor Dr. W. K. Aicher  
2. Berichterstatter: Professor Dr. A. D. Hartkopf

Tag der Disputation: 12.12.2023

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	12
1.1	Blasenkarzinom	12
1.1.1	Anatomie der Blase	12
1.1.2	Epidemiologie des Blasenkarzinoms	12
1.1.3	Staging, Grading, TNM	14
1.1.4	Symptome, Diagnose	16
1.1.5	Therapie und Nachsorge	17
1.2	Tumormodelle für Diagnostik und Therapie	18
1.2.1	Zellkulturlinien	18
1.2.2	Spheroide und Organoide	19
1.2.3	Tiermodelle	21
1.3	Zellstrukturen, Antikörper-Marker	22
1.3.1	Zytokeratine	23
1.3.2	Transkriptionsfaktoren	24
1.3.3	Oberflächenrezeptoren	25
1.4	Fragestellung	25
2	Material und Methoden	27
2.1	Chemikalien und Reagenzien	27
2.2	Verbrauchsmaterialien	28
2.3	Geräte	30
2.4	Antikörper	31
2.5	Zusammensetzung der Medien	32
2.6	Gewebe in Kultur nehmen	33
2.6.1	Zellen einfrieren	34
2.6.2	Zellen auftauen	35
2.7	Organoide splitten	35
2.8	Chamberslides	36
2.9	Paraffinschnitte	36
2.9.1	Organoide fixieren	36
2.9.2	Organoide in Histogel überführen	37

2.9.3	Organoide in Paraffin einbetten _____	37
2.9.4	Organoide in Paraffin einbetten _____	38
2.9.5	Entparaffinierung von 3 µm Schnitten _____	39
2.10	Immunfluoreszenzfärbung _____	39
2.10.1	Objektträger mit Paraffinschnitten/Kryoschnitten _____	40
2.10.2	Chamberslides _____	40
2.11	Immunhistochemische Färbung _____	41
2.11.1	Histoscore _____	41
3	Ergebnisse _____	42
3.1	BCO#140 _____	45
3.1.1	Pathologie BCO#140 _____	45
3.1.2	Zellkultur BCO#140 _____	46
3.1.3	Immunhistochemische Färbungen und Vergleich mit Originaltumor 49	
3.1.4	Vergleich der Expressionen _____	53
3.1.5	Immunfluoreszenzfärbungen _____	54
3.1.6	Zusammenfassung des Expressionsverhaltens von BCO#140 über 8 Passagen in Immunfluoreszenz und Immunhistochemie _____	60
3.2	BCO#154 _____	62
3.2.1	Pathologie BCO#154 _____	62
3.2.2	Zellkultur BCO#154 (m) _____	62
3.2.3	Immunhistochemische Färbungen und Vergleich mit Originaltumor 65	
3.2.4	Vergleich Histoscore Originaltumor BC#154 (m) zu BCO#154 (m) 5.P 66	
3.2.5	Zellkultur BCO#154 (b) _____	67
3.2.6	Immunhistochemische Färbungen und Vergleich mit Originaltumor 69	
3.2.7	Vergleich Histoscore Originaltumor BC#154 (b) zu BCO#154 (b) 5.P 71	
3.2.8	Immunfluoreszenzfärbungen _____	72
3.2.9	Zusammenfassung des Expressionsverhaltens von BCO#154 (m) und (b) über 5 Passagen in Immunfluoreszenz und Immunhistochemie _	77

3.3	Vergleich Histoscores der Originaltumore BC#140 #1, BC#140 #2, BC#154 (m), BC#154 (b)	78
3.4	BCO#147	80
3.4.1	Pathologie BCO#147	80
3.4.2	Zellkultur BCO#147	80
3.4.3	Immunhistochemische Färbungen und Vergleich mit Originaltumor	85
3.4.4	Vergleich Histoscore Originaltumor BC#147 zu BCO#147 7.P	86
3.4.5	Immunfluoreszenzfärbungen	87
3.4.6	Zusammenfassung des Expressionsverhaltens von BCO#147 über 7 Passagen in Immunfluoreszenz und Immunhistochemie	93
3.5	BCO#136	94
3.5.1	Pathologie BCO#136	94
3.5.2	Zellkultur BCO#136	94
3.5.3	Immunhistochemische Färbungen und Vergleich mit Originaltumor	98
3.5.4	Vergleich Histoscore Originaltumor BC#136 zu BCO#136 7.P	99
3.5.5	Immunfluoreszenzfärbungen	100
3.5.6	Zusammenfassung des Expressionsverhaltens von BCO#136 über 9 Passagen in Immunfluoreszenz und Immunhistochemie	107
4	Diskussion	108
4.1	Anzuchterfolge	108
4.2	Korrespondierende Organoidreihen mit zeitlich versetzter Entnahme	109
4.3	Expressionswandel und (basaler oder luminaler) Phänotypswitch	110
4.4	Fehleranalyse / Limitationen	112
5	Zusammenfassung	114
6	Literaturverzeichnis:	115
7	Erklärung zum Eigenanteil	125
8	Danksagung	126

## Abbildungs-, Tabellen- und Abkürzungsverzeichnis

### Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 BCO#140 1.P D0 20x.....	46
Abbildung 2 BCO#140 5.P D0 und D8 .....	47
Abbildung 3 BCO#140 8.P D0 und D12 .....	48
Abbildung 4 BCO#140 12.P D3 und D12 .....	48
Abbildung 5 Originaltumor BC#140 Teil 1 Immunhistochemie .....	50
Abbildung 6 Originaltumor BC#140 Teil 2 Immunhistochemie .....	51
Abbildung 7 Organoid BCO#140 8.P Immunhistochemie.....	52
Abbildung 8 Vergleich Histocores Originaltumor BC#140 Teil 1, 2 und Organoid BCO#140 8.Passage. X-Achse Antikörper, Y-Achse Histocore, blau = BC#140 #1, rot = BC#140 #2, grau = BCO#140 8.P.....	53
Abbildung 9 IFL-Färbung BCO#140, Chamberslide, CK5 .....	55
Abbildung 10 IFL-Färbung BCO#140, Paraffinschnitte 3 µm, CK5 .....	55
Abbildung 11 IFL-Färbung BCO#140, Chamberslide, CK7 .....	55
Abbildung 12 IFL-Färbung BCO#140, Paraffinschnitt 3 µm, CK5 .....	56
Abbildung 13 IFL-Färbung BCO#140, Chamberslide, CK20 .....	56
Abbildung 14 IFL-Färbung BCO#140, Paraffinschnitt 3 µm, CK20 .....	56
Abbildung 15 IFL-Färbung BCO#140, Chamberslide, GATA 3 .....	57
Abbildung 16 IFL-Färbung BCO#140, Paraffinschnitt 3 µm, CK20 .....	57
Abbildung 17 IFL-Färbung BCO#140, Chamberslide, TP53 .....	58
Abbildung 18 IFL-Färbung BCO#140, Paraffinschnitt 3 µm, TP53 .....	58
Abbildung 19 IFL-Färbung BCO#140, Chamberslide, TP63 .....	58
Abbildung 20 IFL-Färbung BCO#140, Paraffinschnitt 3 µm, TP63 .....	59
Abbildung 21 IFL-Färbung BCO#140, Chamberslide, FGFR 3 .....	59
Abbildung 22 IFL-Färbung BCO#140, Paraffinschnitt 3 µm, FGFR 3.....	60
Abbildung 23 BCO#154 m 0.P D0 und D15 .....	63
Abbildung 24 BCO#154 (m) links 6.P D0 und D10, rechts 7.P D3 und D10.....	64
Abbildung 25 Originaltumor BC#154 (m) Immunhistochemie.....	65
Abbildung 26 Organoid BCO#154 (m) Immunhistochemie.....	66

Abbildung 27 Vergleich Histocores Originaltumor BC#154 (m) und Organoid BCO#154 (m) 5.Passage. X-Achse Antikörper, Y-Achse Histocore, blau = BC#154 (m), rot = BCO#154 (m).....	67
Abbildung 28 Organoid BCO#154 (b) 0.Passage D 0 und D 20.....	68
Abbildung 29 Organoid BCO#154 (b) 1.Passage D 0 und D 17.....	68
Abbildung 30 Organoid BCO#154 (b) 5.Passage D 0 und D 11.....	69
Abbildung 31 Originaltumor BC#154 (b) Immunhistochemie.....	69
Abbildung 32 Organoid BCO#154 (b) 5.P Immunhistochemie .....	70
Abbildung 33 Vergleich Histocores Originaltumor BC#154 (b) und Organoid BCO#154 (b) 5.Passage. X-Achse Antikörper, Y-Achse Histocore, blau = BC#154 (b), rot = BCO#154 (b).....	71
Abbildung 34 IFL-Färbung BCO#154 (m), Chamberslide, CK5.....	72
Abbildung 35 IFL-Färbung BCO#154 (m) + (b), Paraffinschnitt 3 µm, CK5.....	72
Abbildung 36 IFL-Färbung BCO#154 (m), Chamberslide, CK7.....	73
Abbildung 37 IFL-Färbung BCO#154 (m) + (b), Paraffinschnitt 3 µm, CK7.....	73
Abbildung 38 IFL-Färbung BCO#154 (m) + (b), Paraffinschnitt 3 µm, CK20....	74
Abbildung 39 IFL-Färbung BCO#154 (m), Chamberslide, GATA 3.....	74
Abbildung 40 IFL-Färbung BCO#154 (m) + (b), Paraffinschnitt 3 µm, GATA 3	74
Abbildung 41 IFL-Färbung BCO#154 (m), Chamberslide, TP53.....	75
Abbildung 42 IFL-Färbung BCO#154 (m) + (b), Paraffinschnitt 3 µm, TP53 ....	75
Abbildung 43 IFL-Färbung BCO#154 (m), Chamberslide, TP63.....	75
Abbildung 44 IFL-Färbung BCO#154 (m) + (b), Paraffinschnitt 3 µm, TP63 ....	76
Abbildung 45 FL-Färbung BCO#154 (m), Chamberslide, FGFR 3.....	76
Abbildung 46 IFL-Färbung BCO#154 (m) + (b), Paraffinschnitt 3 µm, FGFR 3	77
Abbildung 47 Vergleich Histocores Originaltumor BC#140 #1, BC#140 #2, BC#154 (b) und BC#154 (m). X-Achse Antikörper, Y-Achse Histocore, blau = BC#140 #1, rot = BC#140 #2, grau = BC#154 (m), gelb = BC#154 (b).....	78
Abbildung 48 BCO#147 0.P D0 und D10 .....	81
Abbildung 49 BCO#147 1.P D0 20x.....	81
Abbildung 50 BCO#147 1.P D6 und 2.P D7.....	82
Abbildung 51 BCO#147 3.P D0 und D8 .....	83
Abbildung 52 BCO#147 9.P D0 und D11 und 10.P D0 und D16.....	84

Abbildung 53 Originaltumor BC#147 Immunhistochemie .....	85
Abbildung 54 Organoid BCO#147 Immunhistochemie .....	86
Abbildung 55 Vergleich Histocores Originaltumor BC#147 und Organoid BCO#147 7.Passage. X-Achse Antikörper, Y-Achse Histocore, blau = BC#147, rot = BCO#147 7.P .....	87
Abbildung 56 IFL-Färbung BCO#147, Chamberslide, CK5 .....	88
Abbildung 57 IFL-Färbung BCO#147, Paraffinschnitt 3 µm, CK5 .....	88
Abbildung 58 IFL-Färbung BCO#147, Chamberslide, CK7 .....	88
Abbildung 59 IFL-Färbung BCO#147, Paraffinschnitt 3 µm, CK7 .....	89
Abbildung 60 IFL-Färbung BCO#147, Chamberslide, CK20 .....	89
Abbildung 61 IFL-Färbung BCO#147, Paraffinschnitt 3 µm, CK20 .....	89
Abbildung 62 IFL-Färbung BCO#147, Chamberslide, GATA 3 .....	90
Abbildung 63 IFL-Färbung BCO#147, Paraffinschnitt 3 µm, GATA 3.....	90
Abbildung 64 IFL-Färbung BCO#147, Chamberslide, TP53 .....	90
Abbildung 65 IFL-Färbung BCO#147, Paraffinschnitt 3 µm, TP53 .....	91
Abbildung 66 IFL-Färbung BCO#147, Chamberslide, TP63 .....	91
Abbildung 67 IFL-Färbung BCO#147, Paraffinschnitt 3 µm, TP63 .....	92
Abbildung 68 IFL-Färbung BCO#147, Chamberslide, FGFR 3 .....	92
Abbildung 69 FL-Färbung BCO#147, Paraffinschnitt 3 µm, FGFR 3.....	93
Abbildung 70 BCO#136 0.P D0 und D22 .....	95
Abbildung 71 BCO#136 1.P D0 und D11, 4.P D0 und D10.....	96
Abbildung 72 BCO#136 9.P D0 und D5, 11.P D0 und D8.....	97
Abbildung 73 BCO#136 13.P D0 und D4 .....	97
Abbildung 74 Originaltumor BC#136 Immunhistochemie .....	98
Abbildung 75 Organoid BCO#136 7.P Immunhistochemie.....	99
Abbildung 76 Vergleich Histocores Originaltumor BC#136 und Organoid BCO#136 7.Passage. X-Achse Antikörper, Y-Achse Histocore, blau = BC#136, rot = BCO#136 7.P .....	100
Abbildung 77 IFL-Färbung BCO#136, Chamberslide, CK5 .....	101
Abbildung 78 IFL-Färbung BCO#136, Paraffinschnitt 3 µm, CK5 .....	101
Abbildung 79 IFL-Färbung BCO#136, Chamberslide, CK7 .....	102
Abbildung 80 IFL-Färbung BCO#136, Paraffinschnitt 3 µm, CK7 .....	102

Abbildung 81 IFL-Färbung BCO#136, Chamberslide, CK20 .....	102
Abbildung 82 IFL-Färbung BCO#136, Paraffinschnitt 3 µm, CK20 .....	103
Abbildung 83 IFL-Färbung BCO#136, Chamberslide, GATA 3 .....	103
Abbildung 84 IFL-Färbung BCO#136, Paraffinschnitt 3 µm, GATA 3.....	104
Abbildung 85 IFL-Färbung BCO#136, Chamberslide, TP53 .....	104
Abbildung 86 IFL-Färbung BCO#136, Paraffinschnitt 3 µm, TP53 .....	105
Abbildung 87 IFL-Färbung BCO#136, Chamberslide, TP63 .....	105
Abbildung 88 IFL-Färbung BCO#136, Paraffinschnitt 3 µm, TP63 .....	106
Abbildung 89 IFL-Färbung BCO#136, Chamberslide, FGFR 3 .....	106
Abbildung 90 IFL-Färbung BCO#136, Paraffinschnitt 3 µm, FGFR 3.....	106

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1 TNM - Klassifikation des Urothelkarzinoms .....	15
Tabelle 2 Grading des Urothelkarzinoms .....	16
Tabelle 3 verwendete Chemikalien und Reagenzien .....	28
Tabelle 4 verwendete Verbrauchsmaterialien .....	30
Tabelle 5 verwendete Geräte .....	31
Tabelle 6 verwendete Antikörper.....	32
Tabelle 7 Programm des Gewebeeinfiltrationsautomaten.....	38
Tabelle 8 Ablauf der Entparaffinierung .....	39
Tabelle 9 Übersicht relevanter Proben .....	44
Tabelle 10 Histoscore Originaltumor BC#140 Teil 1.....	50
Tabelle 11 Histoscore Originaltumor BC#140 Teil 2.....	51
Tabelle 12 Histoscore Organoid BCO#140 8.P .....	52
Tabelle 13 Histoscore Originaltumor BC#154 (m).....	65
Tabelle 14 Histoscore Organoid BCO#154 (m) 5.P.....	66
Tabelle 15 Histoscore Originaltumor BC#154 (b).....	70
Tabelle 16 Histoscore Organoid BCO#154 (b) 5.P.....	71
Tabelle 17 Histoscore Originaltumor BC#147 .....	85
Tabelle 18 Histoscore Organoid BCO#147 .....	86
Tabelle 19 Histoscore Originaltumor BC#136 .....	98
Tabelle 20 Histoscore Organoid BCO#136 .....	99

## Abkürzungsverzeichnis

D	Tag
P	Passage
Tab.	Tabelle
Abb.	Abbildung
BC	Blasenkarzinom
BCO	Blasenkarzinom-Organoid
NMIBC	non muscle invasive bladder cancer
MIBC	muscle invasive bladder cancer
BME	Basement membrane extract
TNM	tumorn, nodes, metastasis
TME	tumor microenvironment
TUR-B	Transurethrale Resektion der Harnblase
CT	Computertomografie
FSC	Fötales Kälberserum
HBSS	Hank´s Balanced Salt Solution
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäur
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
BTM	Blasentumormedium
PFA	Paraformaldehyd
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor
BSA	Rinderserumalbumin

FBS	fötale Rinderserumalbumin
PBS	Phosphate Buffered Saline
ms.	mouse
rb.	rabbit
Verd.	Verdünnung
Bel.-Zeit	Belichtungszeit
neg.	Negativprobe
PA	Paraffin
CH	Chamberslides
AK	Antikörper
IFL	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemie
ms	Millisekunde
min	Minute
h	Stunde
ml	Milliliter
mg	Milligramm
g	Gramm
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter

# 1 Einleitung

## 1.1 Blasenkarzinom

### 1.1.1 Anatomie der Blase

Die Harnblase des Menschen befindet sich im kleinen Becken und ist als Teil der ableitenden Harnwege an der Harnausscheidung und Speicherung beteiligt. Der in den Nieren gebildete Urin wird in den Nierenbecken gesammelt und über die Harnleiter in die Harnblase abgeleitet. Von dort wird er durch die Harnröhre ausgeschieden. Diese als Urogenitaltrakt bezeichnete Gruppe an in Reihe geschalteten Hohlorganen wird größtenteils von Urothel ausgekleidet. Urothel ist eine spezielle Art von Epithel, welches von der Basalmembran aufwärts in eine basale, intermediäre und superfiziale Schicht unterteilt werden kann. In der Literatur umstritten ist die Frage, ob es sich um mehrschichtiges Epithel, in dem nur die basalen Zellen Kontakt zur Basalmembran haben, oder mehrreihiges Epithel, in welchem auch die Superfizialzellen eine Verbindung zur Basalmembran haben, handelt. Die Höhe des Urothels ist variabel, die obersten Zellen passen sich dem Dehnungszustand der Blase durch im Zytoplasma eingelagerten Vesikeln mit Membranproteinen an. In Ihnen befinden sich auch Plaques, welche aus Uroplakin bestehen und zusammen mit den tight junctions für die Barrierefunktion gegenüber den aggressiven Bestandteilen des Urins zuständig sind.

Die Harnblase besteht aus 3 Schichten. Die Mucosa wird aus Urothel gebildet. Die Muscularis besteht aus dem Musculus Detrusor Vesicae, einer vegetativ innervierten, komplexen Schicht aus 3 Lagen glatter Muskelzellschichten. Diese sind für das Austreiben des Harns zuständig. Nach außen ist die Harnblase über die Adventitia mit dem umliegenden Bindegewebe verbunden.

### 1.1.2 Epidemiologie des Blasenkarzinoms

Das Urothelkarzinom war 2020 weltweit die sechst häufigste Krebsdiagnose bei Männern, bei Frauen an 17ter Stelle. Auf beide Geschlechter gerechnet wird von der WHO eine Anzahl von rund 570.000 Fällen in allen Altersgruppen geschätzt. Weltweit liegt die altersstandartisierte Mortalität bei Männern bei 3,3

und Frauen bei 0,86 pro 100000. Das ergibt rund 210.000 Todesfälle durch das Blasenkarzinom pro Jahr (IARC, 2020). Obwohl Frauen seltener erkranken, handelt es sich bei ihnen häufiger um ein fortgeschrittenes Diagnosestadium mit daraus resultierender schlechterer Überlebensrate (Liu et al., 2015). Die Inzidenz und Mortalitätsraten unterscheiden sich jedoch von Region zu Region vermutlich durch unterschiedliche methodische Erfassung, Exposition zu Risikofaktoren und medizinischen Kapazitäten. Weiterhin wird diskutiert, dass das Blasenkarzinom in seiner Behandlung das teuerste Karzinom darstellt. Dies liegt unter anderem an der hohen Inzidenz von low grade BCs und der damit einhergehenden Überlebens- aber auch Rezidivrate, welche eine lange und hochfrequente Nachsorge mit sich zieht (Grasso, 2008).

Blasenkarzinome werden im klinischen Alltag neben der klassischen TNM (tumor, nodes, metastasis) Klassifikation in die Gruppe der nicht muskelinvasiven (NMIBC) und muskelinvasiven (MIBC) Blasenkarzinome unterteilt. Zu den NMIBC wird auch das Carcinoma in situ (Cis) gezählt, eine oberflächlich wachsende Variante des Urothelcarcinoms. Die Einteilung beruht auf den unterschiedlichen Prognosen und Therapieoptionen der Varianten. In über 75% der Blasenkrebsfälle handelt es sich um ein NMIBC (Compérat et al., 2015). Den histologischen Kriterien nach handelt es sich bei über 90 % der Fälle um ein klassisches Urothelkarzinom. Weiterhin werden Urothelkarzinome unter anderem mit plattenepithelialer, drüsenartiger oder trophoblastischer Teildifferenzierung, mikropapilläre und mikrozystische Urothelkarzinome unterschieden (Compérat et al., 2019, Veskimäe et al., 2019, Moch H, 2016). Das Blasenkarzinome ist eine Erkrankung des Alters, das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei ca. 75 Jahren (Kaatsch et al., 2012). Eine Reihe von Risikofaktoren sind identifiziert worden, der prominenteste davon der Tabakkonsum, welcher für bis zu 50% der Fälle verantwortlich gemacht wird. Weiterhin haben Berufsgruppen, welche Chemikalien wie z.B. aromatischen Amiden ausgesetzt sind, ein bis zu 10 % höheres Risiko an BC zu erkranken. Dies trifft hauptsächlich auf Regionen mit schlechten Arbeitsbedingungen z.B. in der Textil-, Gummi- oder Metallindustrie zu (van Osch et al., 2016, Freedman et al., 2011, Laaksonen et al., 2020, Burger et al., 2013, Chavan et al., 2014,

Colt et al., 2014, Pesch et al., 2014). Weitere Risikofaktoren wie Ernährungsgewohnheiten, chronische Harnwegsinfekte sowie individuelle genetische und metabolische Eigenschaften werden untersucht

### 1.1.3 Staging, Grading, TNM

Das Blasenkarzinom wird für die klinische Diagnose und Therapieplanung nach der TNM Klassifikation eingeteilt. Diese wurde von Pierre Denoix in den Jahren 1943 bis 1952 erarbeitet und seitdem in diversen Auflagen von der Union for International Cancer Control (UICC) aktualisiert (Brierley et al., 2017). Das T beschreibt die Größe und das Wachstumsverhalten des Primärtumors in Bezug auf die umliegenden Strukturen. N steht für die Lokalisation und Menge an befallenen lokalen Lymphknoten, und M für das Vorhandensein von Fernmetastasen. Die verschiedenen Möglichkeiten werden als Staging bezeichnet und stellen sich wie folgt dar.

TX	Beurteilung des Primärtumors nicht möglich
T0	Kein Primärtumor festgestellt
Ta	Nichtinvasives papilläres Karzinom
Tis/Cis	Nichtinvasives Karzinom mit flächiger Ausbreitungsform
T1	Infiltration des subepithelialen Bindegewebes
T2	Infiltration der Tunica muscularis (musculus detrusor vesicae)
T2a	Infiltration der inneren Hälfte der Muskelschicht
T2b	Infiltration der äußeren Hälfte der Muskelschicht
T3	Infiltration der Tunica adventitia (perivesicales Bindegewebe)
T3a	Mikroskopisch nachweisbar
T3b	Makroskopisch nachweisbar
T4	Infiltration benachbarter Organe:
T4a	Prostata, Samenbläschen, Uterus, Vagina
T4b	Beckenwand, Peritoneum

<b>NX</b>	<b>Beurteilung der regionalen Lymphknoten nicht möglich</b>
<b>N0</b>	Kein Befall regionaler Lymphknoten feststellbar
<b>N1</b>	1 Lymphknoten befallen im kleinen Becken
<b>N2</b>	Mehrere Lymphknoten befallen im kleinen Becken
<b>N3</b>	Befallene Lymphknoten auf Höhe der Gefäße Arteria et Vena Iliaca communis / Befall der Nodi lymphoidei iliaci communes

<b>M0</b>	<b>Keine Fernmetastasen feststellbar</b>
<b>M1a</b>	Befall nicht-regionaler Lymphknoten
<b>M1b</b>	Andersartige Fernmetastasen

*Tabelle 1 TNM - Klassifikation des Urothelkarzinoms*

Neben dem TNM Staging existiert ein weiteres System zu prognostischen Einteilung für neoplastische Erkrankungen, welche auch auf das Blasenkarzinom angewandt wird. Das sog. Grading bezieht sich auf histologische Eigenschaften der malignen Zellen und wird mikroskopisch ermittelt. Es spiegelt wider, wie weit sich das Tumorgewebe von dem ursprünglichen, differenzierten Gewebe entfernt, also entdifferenziert hat. Es ist ein wichtiger prognostischer Faktor in Hinsicht auf Therapie und Verlauf der Erkrankung. Die Ursprüngliche Einteilung des BC durch die WHO von 1973 war die klassische Gliederung G1-G3. Je höher das G-Stadium, also je geringer differenziert der Tumor, desto schlechter die Prognose. Die neue WHO-Klassifikation 2004/2016 weicht von der ursprünglichen Nomenklatur ab und ersetzt die G-Stadien durch neue Beschreibungen. Beide Systeme werden angewandt (MacLennan et al., 2007, Kaatsch et al., 2012).

<b>WHO 2004/2016</b>	
<b>PUNLMP</b>	Papilläre urotheliale Neoplasie mit geringem malignem Potential
<b>LG</b>	Low grade papilläres Urothelkarzinom
<b>HG</b>	High grade papilläres Urothelkarzinom

	WHO1973	Überschneidungspunkte
G1	Gut differenziert	PUNLMP, LG
G2	Mäßig differenziert	LG, HG
G3	Schlecht differenziert	HG

*Tabelle 2 Grading des Urothelkarzinoms*

#### **1.1.4 Symptome, Diagnose**

Das häufigste Symptom eines Blasenkarzinoms stellt die Hämaturie dar. Diese kann initial sowohl mikroskopisch als auch bereits makroskopisch sichtbar sein. Seltener kann es je nach Stadium von Dysurie und Harnverhalt bis zu Druckgefühl im Unterleib und Schmerzen kommen (Mommssen et al., 1983). Eine Urinuntersuchung mit Zytologie sollte durchgeführt werden, um etwaige Differentialdiagnosen wie z.B. Harnwegsinfekte auszuschließen oder die Verdachtsdiagnose in Richtung Karzinom zu lenken (Têtu, 2009, Yafi et al., 2015, DeGeorge et al., 2017). Steht der Verdacht auf ein BC im Raum, hat man die Möglichkeit der gängigen bildgebenden Methoden durch Sonografie, Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT). Der Verdacht kann allerdings nur im Rahmen einer Zystoskopie bestätigt werden, weshalb die Bildgebung im Anschluss im Rahmen des Stagings durchgeführt wird. Durch die Zystoskopie kann das Blasenepithel direkt eingesehen und somit verdächtige Neoplasien gefunden werden. Unterstützend ist dabei das Prinzip der photodynamischen Diagnostik PDD, womit eine Reduktion der Rezidiv-Rate nachgewiesen werden konnte (Stenzl et al., 2010). Dabei wird zuvor das Blasenlumen mit einer 5-Aminolävulinsäure- oder Methyl-5-amino-4-oxopentanoathaltigen Lösung gespült. In malignem Gewebe akkumuliert somit durch die erhöhte Stoffwechsellage das Abbauprodukt Porphyrin IX, welches bei anschließender Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 375 bis 440 nm farblich rot hervorgehoben wird (Mowatt et al., 2011, Kausch et al., 2010). Im klinischen Setting ist es sinnvoll, bei diesem Verfahren bereits die Möglichkeit einer Resektion bereitzuhalten. Das erforderliche Equipment ist meist mit dem Zystoskop kompatibel und der bestehende Zugang sollte genutzt werden, um unnötige wiederholte Eingriffe zu vermeiden und Zeit zu sparen. Dieses

Verfahren ist die transurethrale Resektion in der Blase (TUR-B). Die dadurch gewonnene Gewebeprobe wird von der Pathologie histologisch untersucht und nur so kann die definitive Diagnose eines BCs gestellt werden (DeGeorge et al., 2017). Besteht der Verdacht auf ein lokal fortgeschrittenes MIBC oder Fernmetastasen, so sind CT und MRT Mittel der Wahl zum bildgebenden Staging (Woo et al., 2020, Gandhi et al., 2018, Kundra et al., 2007, Yang et al., 2000, Kim et al., 2004).

### **1.1.5 Therapie und Nachsorge**

Die TUR-B ist bereits Therapie der Wahl bei einem low grade BC mit einem Stadium Ta oder T1 mit N0 M0, also ohne muskelinvasives Wachstum. Bei der Biopsiegewinnung sollte somit bereits versucht werden, die verdächtige Neoplasie in Ihrer Gesamtheit mit genügend Sicherheitsabstand zu entfernen (Moschini et al., 2019, Babjuk et al., 2019). Dabei wird eine Resektionsschlinge durch den Arbeitskanal des Zystoskops in die Blase eingeführt. Diese kann durch bi- oder monopolaren Strom präzise erhitzt werden und somit das verdächtige Gewebe unter Sicht und mit gleichzeitiger Koagulation des angrenzenden Gewebes durchtrennen. Das Resektat wird geborgen und zur weiteren Untersuchung verwendet.

Für MIBC der Stadien T2 – T4 N0 M0 ist bei operablen Patienten die radikale Zystektomie (Cx) die Therapie der Wahl (Stein et al., 2001). Dabei werden bei Bedarf und nach Möglichkeit benachbarte oder betroffene Organe mitentfernt. So kann zusätzlich zur Blase, dem distalen Ureter und angrenzenden Lymphknoten bei Männern die Prostata und Samenbläschen, bei Frauen die Urethra, der Uterus und angrenzende Teile der Vagina entfernt werden (Stenzl et al., 2005). Danach bedarf es einer alternativen Harnableitung, entweder über ein Ileum- Conduit, einer sog. Neoblase, mittels einer Ureterokutaneostomie oder über das Rectum mittels einer Ureterosigmoidostomie (Lee et al., 2014, Stenzl, 1999). Dies benötigt eine hohe Compliance des Patienten und resultiert in einer ernsthaften Anpassung der Lebensgewohnheiten/ des Lebensstils.

Eine alleinige Chemotherapie findet im kurativen Ansatz kaum Gebrauch. Eine neoadjuvante Chemotherapie auf Cis-Platin Basis zeigt einen Benefit auf die 5-

Jahre Überlebensrate (5 – 8 %) beim MIBC und wird daher für Fälle mit N0 M0 in den EAU Guidelines für das MIBC 2023 empfohlen.

Radiotherapie wird präoperativ nicht routinemäßig empfohlen, postoperativ kann sie bei speziellen Konstellationen Gebrauch finden. Generell ist die Datenlage dahingehend nicht eindeutig (Iwata et al., 2019, Zaghloul et al., 2018, El-Monim et al., 2013).

Adjuvante Therapieoption bei einem low grade NMIBC ist eine intravesicale Instillation verschiedener Wirkstoffe. Einerseits findet die Chemotherapie Anwendung, gängige Mittel sind die Zytostatika Mitomycin C oder Gemcitabin. Je nach Risikoprofil verbessert die einmalige oder wiederholte Gabe die Rezidivrate (Sylvester et al., 2016, Pan et al., 1989).

Des Weiteren kommt das Bacillus Calmette-Guérin (BCG) als Instillation zur Anwendung. Auch hier kann ein zusätzlicher Benefit gegenüber einer alleinigen TUR-B bezüglich der Verhinderung eines Rezidivs erzielt werden (Malmström et al., 2009, Shelley et al., 2001).

Im Falle eines Cis bietet eine TUR-B keinen kurativen Ansatz. Hier stellt die BCG-Instillation eine mögliche Therapieoption dar, bevor die radikale Zystektomie als invasive, jedoch sehr erfolgversprechende Alternative genutzt wird (Lamm, 1992, Sylvester et al., 2002, Sylvester et al., 2005).

## **1.2 Tumormodelle für Diagnostik und Therapie**

### **1.2.1 Zellkulturlinien**

Die Nutzung von Zellkulturen zum besseren Verständnis der biologischen Abläufe auf zellulärer Ebene wurde erstmals von Harrison 1910 an Nervenzellen beschrieben (Harrison, 1910). Seitdem sind Zellkulturen aus den naturwissenschaftlichen Forschungsgebieten nicht mehr wegzudenken. Traditionell wurden 2D - Zellkulturen verwendet. Hierbei sind die Zellen als Einzelschicht an ein Plastikgefäß wie z.B. einer Petrischale angeheftet und werden von Nährmedium umspült. Vorteile hierbei sind die direkte Beobachtung der Zellen am Mikroskop, sowie geringe Kosten verbunden mit einer verlässlichen, schnellen und routinemäßig gut verstandenen Methode der

Kultur. Durch diese simple Art der Zellkultivierung entstehen aber Nachteile hinsichtlich ihrer Übertragbarkeit auf die im Körper vorherrschenden physiologischen Verhältnisse. So fehlt diesen Zellen die Interaktion mit anderen, nicht gleichartigen Zellen und Bestandteilen der extrazellulären Matrix sowohl luminal als auch basal. Diese im Körper so heterogene Umgebung, auch als tumor micro environment (TME) bezeichnet, beeinflusst die Entwicklung des Tumors durch Austausch diverser Mediatoren und Zell-Zell-Kontakte (Quail and Joyce, 2013, Whiteside, 2008, Pampaloni et al., 2007). Weiterhin ist die durch die Einschichtigkeit der 2D – Zellkultur der Kontakt mit Nährmedium allgegenwärtig und optimal, wenn auch einseitig. In physiologischen Verhältnissen spielt die Diffusionsstrecke für Nährstoffe und Sauerstoff jedoch eine wichtige Rolle und übt einen Selektionsdruck auf die Zellen in weniger gut vaskularisierten Bereichen des Gewebes aus (Pampaloni et al., 2007). Durch diese Faktoren können sich die Zellen in 2D - Kulturen in unterschiedlichem Ausmaß hinsichtlich Morphologie und Genexpression, und je nach Länge der Kultivierung von den ursprünglichen Zellen im physiologischen Umfeld unterscheiden (Petersen et al., 1992, Kapalczyńska et al., 2018, von der Mark et al., 1977, Aggarwal et al., 2009). Dies beeinträchtigt die Übertragbarkeit von *in vitro* Ergebnissen auf *in vivo*.

### **1.2.2 Spheroide und Organoide**

Das Konzept die konventionelle 2D Zellkultur in die 3. Ebene zu erweitern, wurde bereits 1977 vorgestellt (Hamburger and Salmon, 1977). Es gibt verschiedene Ansätze zu einer 3D Kultur. Die zwei geläufigsten sind Spheroide und Organoide. Spheroide sind Aggregate mehrerer, potentiell auch verschiedener in der Zellkultur vorhandener Zellen, welche sich spontan aufgrund der Kultivierungsmethode zusammenschließen und sich mittels Zell-Matrix und Zell-Zell-Kontakten in Form halten. In Organoiden geht die 3D – Organisation auf die Teilung und anschließenden Differenzierung einer Stammzelle (embryonisch, adult oder induziert pluripotent) oder einer homogenen Population dieser zurück (Gunti et al., 2021, Ryu et al., 2019). Sie erreichen somit potenziell eine komplexere und dem Ursprungsgewebe ähnlichere Struktur (McCauley and Wells, 2017). In unserem Fall wurde eine

Patientenprobe malignen Urothels entnommen, in der Hoffnung, beim Aufarbeiten eine ausreichende Anzahl dieser Tumorstammzellen zu erhalten. Weiterhin ist bei dieser Art der Kultur die Zugabe von Bestandteilen der extrazellulären Matrix von Nöten. Diese bestehen aus verschiedenen Proteinen (z.B. Laminin, Collagen IV, Wachstumsfaktoren) welche die physikalischen Eigenschaften und die Bestandteile der Basallamina nachahmen, und somit den Zellen durch Zell-Matrix-Kontakte ihre Position im Gewebe simulieren und die weiteren Differenzierungsschritte stimulieren kann. Für die ECM kann dabei beispielsweise sogenanntes basement membrane extract (BME) verwendet werden (Kleinman and Martin, 2005) (Spence et al., 2011, Gunti et al., 2021, McCauley and Wells, 2017). Dieses besitzt die Fähigkeit, bei 4°C flüssig zu sein, bei Körpertemperatur jedoch fest zu polymerisieren, wodurch die darin gelösten Zellen mit ihrer gesamten Oberfläche Kontakt zu der ECM haben. Dabei bleibt es aber weiterhin permeabel für im Nährmedium gelöste Nährstoffe, um somit die Versorgung der Organoide sicherstellen zu können. Wie bereits erwähnt spiegelt diese Umgebung die tatsächlichen physiologischen Bedingungen im menschlichen Gewebe besser wider als in einer 2D-Kultur. Die gelösten Zellen treten in Zell-Matrix-Kontakt mit der ECM über Integrine, welche die äußeren Zellen in einem Organoid über diverse Signalwege hinsichtlich Morphologie, Proliferation, Migration und letztendlich Genexpression beeinflusst (Levental et al., 2009, Giancotti and Ruoslahti, 1999). Des Weiteren imitieren mögliche im BME gelöste Mediatoren wie Wachstumsfaktoren die Interaktion des Tumors mit seiner Umwelt hinsichtlich des TMEs in gewisser Weise (Quail and Joyce, 2013). Auch die physikalische Rigidität des BMEs in Wechselwirkung mit einem wachsenden Organoid beeinflusst diesen hinsichtlich der oben genannten Kriterien (Kalli and Stylianopoulos, 2018). Zellen, die sich im Zentrum des Organoids befinden, sind einem steigenden O<sub>2</sub> - und Nährstoffmangel wegen längerer Diffusionsstrecke bis zum Nährmedium ausgesetzt. Dieses Problem, welches in einer 2D-Zellkultur nicht vorhanden ist, spiegelt sich auch in der Genexpression, sowie Zelldichte und Metabolismus wider (Zhao et al., 2005, Griffith and Swartz, 2006, Hermitte et al., 2006). Dies hat auch einen Effekt auf die Ergebnisse

möglicher *in vitro* Medikamententestungen, für welche Organoiden als eine besonders repräsentative Methode antizipiert werden (Kapałczyńska et al., 2018, Hsieh et al., 2015).

Neben all diesen Vorteilen im Vergleich zu 2D-Kulturen gibt es auch praktische Nachteile. So ist diese Methode zeitaufwendiger und kostspieliger, die Erfolgsraten geringer und die Reproduzierbarkeit weniger verlässlich als in 2D – Kulturen. Die Interpretation der Ergebnisse sowie die Arbeitsabläufe sind je nach Labor weniger routiniert und standardisiert (Kapałczyńska et al., 2018).

Somit ist zusammenzufassen, dass der Schritt von einer 2D zu einer 3D-Zellkultur in der Theorie vielversprechende Vorteile bereithält. So wird postuliert, dass Organoiden die tatsächliche Physiologie des zu untersuchenden Originaltumors besser widerspiegeln und sein Verhalten verlässlicher imitieren. Davon würden Anwendungsbereiche wie die aufstrebende personalisierte Medizin und die Forschung hinsichtlich Tumorentstehung profitieren. Aussagekräftige Vorab-Medikamententestungen könnten dem Patienten eine von vornerein effektive Therapie ermöglichen und unnötige, nebenwirkungsreiche Behandlungen ersparen (Gunti et al., 2021).

### **1.2.3 Tiermodelle**

Tiermodelle zur Untersuchung von Tumorentwicklung, vor allem aber für Medikamentenentwicklung und Toxizitätsstudien, sind seit der Mitte des 20. Jahrhunderts intensiv erforscht worden. Häufig wird dabei auf die Vertreter der kleinen Nagetiere wie Maus und Ratte, aber auch auf Hunde und Affen gesetzt. Dabei ist die Methode der Xenografts oder Orthografts weit verbreitet. Hierbei werden die zu untersuchenden Tumorzellen, traditionell aus 2D-Kulturen, entweder subkutan oder in das Ursprungsgewebe (ortho) eingebracht und eine Einnistung abgewartet. Nach erfolgreicher Manifestation des Tumors wird mittels systemischer Medikamentengabe hinsichtlich einer möglichen therapeutischen Wirkung oder potenziell schädigendem Effekt eben dieser untersucht (Aggarwal et al., 2009, Kelland, 2004). Letztendlich scheitern jedoch bis zu 90% der untersuchten Therapeutika mit horrendem finanziellem Aufwand im Verlauf der klinischen Studien, obwohl sie sich in Tierversuchen als

vielversprechend herausgestellt haben (Von Hoff, 1998). Dies unterstreicht den Bedarf an effizienteren, aussagekräftigeren Modellen mit humanen Zellen. Auch die Ergebnisse der Toxizitätsstudien an verschiedenen Tieren zeigen eine inkonsistente Übereinstimmung mit derer an Menschen, wodurch auch hier ein Verbesserungspotential besteht (Aggarwal et al., 2009, Burchill, 2006, Greaves et al., 2004). Zuletzt muss der ethische Aspekt bei extensiven genutzten Tiermodellen genannt werden. So wäre es zweifelsohne von Vorteil, wenn mittels fortschrittlichen Forschungsmodellen neben validen Ergebnissen auch die Leben vieler Versuchstiere verschont werden könnten.

### **1.3 Zellstrukturen, Antikörper-Marker**

Neben neueren Verfahren der Gensequenzierung spielt bei der Untersuchung von Gewebeproben traditionell die Mikroskopie eine entscheidende Rolle. Dafür wird das zu untersuchende Material zunächst chemisch fixiert und in Material wie Paraffin oder Kryogel eingebettet. Daraus werden Schnitte angefertigt und schlussendlich gefärbt. Mit dem letzten Schritt können auf unterschiedlichen Wegen Strukturen innerhalb und auf den Zellen sichtbar gemacht werden, und somit qualitativ und quantitativ untersucht werden.

In vielen Tumoren herrscht eine Heterogenität hinsichtlich des Expressionsverhalten verschiedener Strukturen. Im Hinblick auf das Urothelkarzinom wurden in den letzten Jahren ausgewählte Strukturen in Verbindung mit verschiedenen molekularen Subtypen des BCAs gebracht. Diese unterscheiden sich unter anderem hinsichtlich Aggressivität, Prognose, Metastasierung- und Invasionspotentials, Therapiesensibilität und Rezidivneigung, weshalb sich diese Strukturen als hilfreiche klinische Marker entwickeln könnten. Auf Grund des Behandlungsvorgehens beziehen sich diese meist auf das MIBC. Zu den vorgeschlagenen Subtypen zählen am eindrucklichsten der basale- (mit/ohne plattenepithelialer Differenzierung), der luminale-, und der TP53-artige Typ (Kamoun et al., 2020, Goutas et al., 2021, Warrick et al., 2019, Guo et al., 2016, McConkey et al., 2016, Choi et al., 2014a).

Für diese Arbeit wurden drei experimentelle Hauptaspekte festgelegt, welche sich zur Untersuchung eignen, in der Forschung routinemäßig angewandt werden und sich als potenzielle Marker für Dignitäten des BCAs erweisen könnten.

### **1.3.1 Zytokeratine**

Bei den Zytokeratinen (CK) handelt es sich um Proteine, welche Intermediärfilamente bilden. Sie sind im Zytosol und der Zellmembran verankert und bilden einen wichtigen Teil des Stützskeletts einer Epithelzelle. Verschiedene Epithelien und Zellen innerhalb eines epithelialen Verbandes exprimieren unterschiedliche Subgruppen von Zytokeratinen, anhand derer man sie teilweise kategorisieren kann. Im Folgenden wurde sich auf die Zytokeratine CK 20, CK 7, und CK 5 fokussiert. Bei dem Antikörper AE1/AE3 handelt es sich um einen Marker für Panzytokeratine. Er detektiert also verschiedene Arten, nämlich CK 1 – 8, CK 10, CK 14 – 16, und CK 19. Dadurch wird in der histologischen Untersuchung der Pathologie das Vorhandensein von Epithelzellen z.B. bei Verdacht auf ein Karzinom untersucht (Southgate et al., 1999, Moll et al., 1982, Lane and Alexander, 1990).

**CK 5** wurde in der Vergangenheit als Marker für die basale Subgruppe des MIBC identifiziert. In verschiedenen Untersuchungen wurde es mit plattenepithelialer Differenzierung und Cis, seltener jedoch mit Tumoren im Ta Stadium in Zusammenhang gebracht (Guo et al., 2020, Muilwijk et al., 2021, Van Batavia et al., 2014, Dadhania et al., 2016, Hashmi et al., 2018).

**CK 7** ist in vielen epithelialen Neoplasien vorhanden. Expressionsverhalten kombiniert mit anderen Markern wie CK20 kann zur Identifikation von Ursprungsgewebe bei cancer of unknown primary (CUP), oder als Ausschluss anderer Gewebe wie z.B. der anatomisch benachbarten Prostata dienen (Jiang et al., 2001, Hammam et al., 2014, Chu et al., 2000).

**CK 20** kann wie schon erwähnt in Kombination mit CK7 hilfreich bei der Differentialdiagnose bestimmter Karzinomursprünge sein. Des Weiteren scheint es hauptsächlich in luminalen Subtypen des Urothelkarzinoms exprimiert und mit höherem Grading und Staging abzunehmen. Das Expressionsmuster kann

Hinweis auf das Rezidivverhalten eines Urothelkarzinoms haben (Guo et al., 2020, Mi et al., 2019, Hammam et al., 2014, Southgate et al., 1999).

### **1.3.2 Transkriptionsfaktoren**

Bei Transkriptionsfaktoren handelt es sich um Proteine, welche Auswirkung auf die Expressionsrate von Genen haben. Sie beeinflussen die Häufigkeit und Effizienz, mit der bestimmte Gensequenzen abgelesen und transkribiert werden. Ihre Lokalisation wechselt je nach Aktivierungsstufe zwischen dem Zytosol und dem Zellkern. Transkriptionsfaktoren können in der Art ihrer Ausprägung charakteristisch für bestimmte Gewebe oder Tumore sein, ebenso wie das Vorhandensein spezieller Mutationsvarianten einen prognostischen Faktor darstellen kann. Im Folgenden wurde sich auf die Transkriptionsfaktoren GATA3, TP53 und TP63 konzentriert.

**GATA3** wurde vermehrt in luminalen Subtypen des MIBC nachgewiesen. Eine verminderte Expression korrelierte mit einer höheren Proliferationsrate des Tumors und einer schlechteren Prognose (Wang et al., 2019, Guo et al., 2020, Dadhania et al., 2016).

**TP53** (auch p53, Tumorprotein 53) ist einer der am besten erforschten Tumorsuppressoren. Wird im physiologischen Zustand bei DNA-Schäden der Zell-Zyklus-Arrest ausgelöst und/oder die Apoptose eingeleitet, sind diese Mechanismen bei fehlender Expression oder beeinträchtigenden Mutationen ausgehebelt, wodurch das Risiko zur Tumorentstehung steigt. Eine vermehrte Expression kann auf eine Mutation zurückgeführt werden, da diese die Halbwertszeit des Proteins verlängert. Diese ist im Urothelkarzinom mit dem basalen Subtyp und High Grade Tumoren in Verbindung gebracht worden. Auch wurde von vermehrter Neigung zu muskelinvasivem Wachstum, Knochenmetastasen und verminderter Sensibilität gegenüber Chemotherapeutika berichtet (Wang et al., 2019, Masuda et al., 2020, McConkey et al., 2016, Castillo-Martin et al., 2010, Damrauer et al., 2014).

**TP63** (auch p63, Tumorprotein 63) gehört zur selben Familie von Tumorsuppressoren wie TP53. Es wird vermutet, dass die Signalwege untereinander eine transaktivierende Funktion besitzen. Im Blasenkarzinom

wurden verschiedene Mutationen nachgewiesen und mit dem basalen Subtyp sowie plattenepithelialer Differenzierung in Verbindung gebracht (Castillo-Martin et al., 2010, Kaufmann et al., 2001, Parsa et al., 1999, Yang et al., 1998, Choi et al., 2014b).

### **1.3.3 Oberflächenrezeptoren**

Oberflächenrezeptoren sind typischerweise in der Zellmembran einer Zelle verankert, wobei es Mechanismen gibt, mit denen sie internalisiert und somit nicht an der direkten Zell Oberfläche lokalisiert sein können. Sie bestehen meist aus einem extrazellulären-, transmembranären- und intrazellulären Teil. Bei Kontakt mit dem rezeptorspezifischen Protein wird auf diesem Wege eine Signalkaskade in die Zelle weitergeleitet. Auch hier ist die Art der Ausstattung der Zelle mit Rezeptorproteinen in manchen Fällen charakteristisch für eine bestimmte Zellpopulation oder kann von prognostischem Wert im Falle einer Erkrankung sein.

**FGFR3** (fibroblast growth factor receptor 3) reguliert über eine Tyrosinkinase unter anderem die Zellproliferation und Differenzierung. Überexpression oder aktivierungssteigernde Mutationen führen zu einer aberranten Signalkaskade und potenziellen Tumorentstehung. Der Rezeptor wird in Verbindung mit luminalen, papillären und low grade Urothelkarzinomen gebracht. Er stellt außerdem einen möglichen vielversprechenden Angriffspunkt für Tyrosinkinaseinhibitoren wie Erdafitinib da (Dadhania et al., 2016, Robertson et al., 2017, Choi et al., 2017, Choi et al., 2014b, Damrauer et al., 2014, Cheng et al., 2013).

## **1.4 Fragestellung**

Blasenkrebs hat einen hohen Stellenwert in der Onkologie und betrifft jährlich hunderttausende Menschen weltweit. Durch aktuelle Forschung ist es möglich geworden, verschiedene molekulare Subtypen zu identifizieren, welche große Auswirkungen auf die klinische Behandlung haben. So kann im Falle eines Stagings > T1, bei dem routinemäßig eine Zystektomie die sicherste, wenn auch radikalste Option darstellt, möglicherweise sichere und valide auf den Patienten zugeschnittene Behandlungsoptionen identifiziert werden. Die

Grundlage dafür bildet ein aussagekräftiges Forschungsmodell, welches eben jene molekularen Eigenschaften zuverlässig und langfristig abbildet, und sich für die nötigen Untersuchungen wie z.B. Medikamententestungen auch praktisch eignet. In der Forschung ist dahingehen der Fokus zunehmend auf die 3D-Zellkultur in Form von Organoiden gerückt. Diese versprechen die Eigenschaften des letztendlich zu therapierenden Tumors bei vertretbarem labortechnischem Aufwand genauer und langfristiger widerzuspiegeln. In dieser Arbeit möchten wir untersuchen, inwiefern eine Organoidkultur, welche über einen längeren Zeitraum nach Entnahme aus dem Tumor kultiviert und passagiert wurde, weiterhin die Physiologie des Originaltumors wiedergibt, und sich somit als Forschungsmodell qualifizieren würde.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Reagenzien

BSA 5%	Sigma Aldrich, Taufkirchen, DE
RPMI 1640	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
FBS	Sigma Aldrich, Taufkirchen, DE
DMSO	AppliChem, Darmstadt, DE
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
HEPES - 1 M	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
HBSS NaHCO <sub>3</sub>	Biochrom, Berlin, DE
L-Glutamin 20 MM	Biochrom, Berlin, DE
Aprotinin	Calbiochem, Burlington USA
Primocin	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Penicillin-Streptomycin 10000 U/ ml	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Triton-X-100	Merck, Darmstadt, DE
Tris	AppliChem, Darmstadt, DE
Urea	Sigma Aldrich, Taufkirchen, DE
0,1 % Tween 20	Sigma Aldrich, Taufkirchen, DE
B27-Supplement	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
Nicotinamid – 1 M	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
A83-01 – 5 mM in DMSO	Tocris Bioscience, Bristol, UK
EGF – 500 µ	Peptotech Gmbh, Cranbury, USA
FGF-10 – 100 µg/ ml	Peptotech Gmbh, Cranbury, USA
FGF-7 – 50 µg/ ml	Peptotech Gmbh, Cranbury, USA

FGF-2 – 50 µg/ ml (basic)	Peprotech Gmbh, Cranbury, USA
Y-27632 – 100 mM in PBS	Hyclutec, Beutelsbach, DE
Collagenase/Hyaluronidase	STEMCELL Technologies, Vancouver, CAN
TrypLE Express	Gibco, Life Technologies, UK
TissueTek	Leica Biosystems Richmond Inc., USA
Flourescence Mounting Medium	DAKO, Sante Clara, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, DE
Dispase	STEMCELL Technologies, Vancouver, CAN
Dispase 2	Merck, Darmstadt, DE
BME	Trevigen, catalog# 3532-005-02
Methanol	VWR International
4% PFA	MORPHISTO, Offenbach, DE
Ethanol	SV Liquid Production
Xylol	AppliChem, Darmstadt, DE
Advanced DMEM	Thermo Fischer, Waltham, USA
N-Acetylcystein – 500mM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE

*Tabelle 3 verwendete Chemikalien und Reagenzien*

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

Tissue-Tek® Cryomold®	Sakura Finetek USA, Torrance, USA
HistoGel	Thermo Fischer, Waltham, USA
Dako Fluorescence Mounting Medium	Agilent Technologies Inc., USA
Paraffin	McCormick, St. Louis, USA
Hämatoxylin	Vector Laboratories, California, USA
Einbettkassette Universal	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, DE
Objektträger 26 x 76 x 1 mm	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, DE

SuperFrost® Objektträger 26 x 76 x 1 mm	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, DE
Deckgläser 24x50 mm	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, DE
Chirurgisches Einmalskalpell	Braun/Aesculap AG, Tuttlingen, DE
Multipipette® M4 - Mehrfachdispenser	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Combitips® Multidispenser 2,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Combitips® Multidispenser 12,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Pipettenspitze serologisch 5 ml	Falcon, Durham, USA
Pipettenspitze serologisch 10 ml	Falcon, Durham, USA
Pipettenspitze serologisch 25 ml	Corning Inc., New York, USA
Pipette Research plus 10 µl	Eppendorf, München, DE
Pipette Research plus 20 µl	Eppendorf, München, DE
Pipette Research plus 100 µl	Eppendorf, München, DE
Pipette Research plus 200 µl	Eppendorf, München, DE
Pipette Research plus 1000 µl	Eppendorf, München, DE
Reaktionsgefäß Safe-Lock Tubes 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Reaktionsgefäß Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Reaktionsgefäß Safe-Lock Tubes 2,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Zentrifugationsröhrchen 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Zentrifugationsröhrchen 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Gefriergefäß CryoTube™ Vials 1,8 ml	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, DK
Zellkulturschale 60x15 mm Cellstar®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Zellkulturplatten 6 Well Cellstar®	Greiner Bio-One GmbH,

	Frickenhausen, DE
Zellkulturplatte Multiwellplatte 24 Well Cellstar®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Zellkulturplatte 48 Well Cell culture plate Costar®	Corning Inc., Kennebunk, USA
Zellsieb BD Falcon™ 40 µm Nylon	BD Bioscience Discovery Labware, Bedford, USA
Zellsieb BD Falcon™ 70 µm Nylon	BD Bioscience Discovery Labware, Bedford, USA
Zählkammer Neubauer improved 0,1 mm Tiefe, 0,0025 mm <sup>3</sup>	Assistent Germany, Sondheim vor der Rhön, DE

*Tabelle 4 verwendete Verbrauchsmaterialien*

### 2.3 Geräte

Inkubator CB210	BINDER, Tuttlingen, DE
Steriler Abzug LaminAir HBB 2448	Holten LaminAir A/S, Allerød, DK
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3SR+	Thermo Fisher Scientific, Osterode, DE
Zentrifuge Heraeus Biofuge pico	Kendro Laboratory Products, Osterode, DE
Wasserbad Typ 1083	GFL, Burgwedel, DE
Motorisierte Pipette Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, DE
Mikroskop Axiovert 135	Zeiss Germany, Jena, DE
Fluoreszenzmikroskop Axiophot	Carl Zeiss, West Germany
Laborwaage Satorius BL 310	Sartorius AG, Göttingen, DE
Thermomixer comfort	eppendorf
Gewebeinfiltrationsautomat Leica TP 1020	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, DE
Paraffinausgießstation Leica EG 1150 H	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, DE
Gefrierplatte Leica EG 1150 C	Leica Biosystems Nussloch GmbH,

	Nussloch, DE
Mikrotom Leica RM2125 RT	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, DE
Feuchte Kammer	LabArt UG & Co. KG, Waldbüttelbrunn, DE
Kühlschränke 4°/-20°	Bosch
<b>Pathologie</b>	
ICH Färbesystem	Bench Mark Ultra, VENTANA
Axio Imager.A1 Mikroskop	Carl Zeiss, Göttingen, DE

*Tabelle 5 verwendete Geräte*

## 2.4 Antikörper

<b>Primärantikörper</b>	
GATA3 IgG rb	Abcam ab106625, polyclonal
TP53 IgG1 ms	Invitrogen MA5-15244, mono PAb240
TP63 IgG rb	Invitrogen 703809 recombinant mono 10H7L17
FGFR3 IgG1 rb	Abcam ab155960, mono EPR2281(3)
FGFR3 IgG1 ms	Invitrogen MA5-26493, mono OTI1B10
CK20 monoclonal, IgMk ms	Millipore, MABT845-25UG, monoclonal XQ1
CK5 rb (IgG and others)	BioLegend 905504/100mg poly 19055
CK7 rb IgG	Abcam ab68459 mono EPR1619Y
<b>Sekundärantikörper</b>	
Alexa Fluor 488, goat-anti-rabbit IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories INC. 115-165-166
Cy3, goat-anti-mouse IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories INC. 111-545-045
Dapi 10mg/28,6 ml H2O	Sigma D8417
<b>Immunhistochemie Pathologie</b>	
H/E Hämatoxylin Eosin	IHC
CK7 1:2000	IHC DAKO, Cat# M7018

CK20	1:400	IHC DAKO, Cat# M7019
TP53	1:400	IHC Novocastra, Cat# ndp53o7
TP63	1:400	IHC DCS, Cat# P106C002
GATA3	rtu (ready to use)	IHC ROCHE, Cat#07107749001
FGFR 3	1:50	IHC Santa Cruz, Cat# sc-13121

*Tabelle 6 verwendete Antikörper*

## 2.5 Zusammensetzung der Medien

### Blasentumormedium BTM 50 ml

22 ml advanced DMEM + 22,5 ml L-WRN konditioniertem Medium + 2,5 ml csFBS + 1 ml B27-Supplement + 50 µl L-Glutamin 20 MM + 500 µl HEPES 1 M + 500 µl Nicotinamid 1 M + 125 µl N-Acetylcystein 500 mM + 50 µl A31-01 5 mM + 50 µl Primocin + 50 µl FGF-10 µg/ ml + 25 µl FGF-7 µg/ ml + 12,5 µl FGF-2 µg/ ml + 5 µl Y-27632 mM + 0,5 µl EGF 500 µM

- L-WRN konditioniertes Medium basiert auf der Anreicherung des Nährmediums mit den Proteinen Noggin, Wnt und R-Spondin. Diese Wachstumsfaktoren werden von den fibroblastenartigen L-WRN-Zellen in das Medium abgegeben. Auf diese Weise werden die Wachstumsbedingungen von epithelialen Stammzellen optimiert(Sato et al., 2009).

### Transportmedium für Tumorgewebe (Menge nach Bedarf)

HBSS NaHCO<sub>3</sub> (als Basis) + 1 % HEPES 1 M + 20 KIU/ml Aprotinin + 1% Penicillin-Streptomycin

### Arbeitsmedium 50 ml

44,5 ml advanced DMEM + 5 ml FBS (5%) + 0,5 ml Penicillin-Streptomycin

### Splittingmedium 51,125 ml

50 ml advanced DMEM + 500 µl HEPES + 500 µl L-Glutamin +125 µl Primocin

### Freezemedium 50 ml

10 ml DMSO + 15 ml FBS + 25 ml RPMI 1640

### Permeabilisierungslösung 50,15 ml

50 ml BSA (5%) + 100 µl Triton-X-100 + 50 ml Tween 20 (0,1%)

### Demaskierungslösung 1000 ml

12,4 g Tris 100 mM + 50 g Urea (5%) + 1000 ml Aqua + pH mit HCL auf 9,5 einstellen

## **2.6 Gewebe in Kultur nehmen**

Die Gewebeproben für die Organoide wurden in dem Universitätsklinikum Tübingen durch eine TUR-B oder eine Zystektomie gewonnen. Die Studie wurde von der Ethik unter der Nummer 840/2020/BO2 genehmigt. Nachdem die Probe für die histologische Begutachtung in der Pathologie untersucht wurde, wurde Restgewebe, welches für die weitere klinische Aufarbeitung nicht notwendig war, in einem 15 ml Zentrifugationsröhrchen gefüllt mit Transportmedium am selben Tag in das Labor transportiert. Dort wurde das Gewebe mit 2 sterilen Skalpellen in eine Zellkulturplatte überführt und gewogen. Danach gab man zügig etwas Arbeitsmedium (1-2 ml) in die Schale und zerkleinerte die Probe mit 2 Skalpellen in ca. 1 mm große Stücke, oder bis eine trübe Masse entstand. Diese wurde mittels des Pipetus und einer 5 ml Pipette in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt, wobei die Zellkulturplatte mehrmals mit Arbeitsmedium gespült wurde. Dieses zentrifugierte man für 10 min bei 480 g, bis sich das Gewebe unten abgesetzt hatte. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen, das Gewebepellet in 1000 µl Arbeitsmedium und 15 µl Kollagenase pro 100 mg Gewebeprobe resuspendiert, mittels Schüttler vermischt und für 30 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Alle 10 min wurde die Probe erneut kurz gerüttelt. Nach 30 min wurde erneut dieselbe Menge Kollagenase dazugegeben und der Prozess für 30 min wiederholt. Anschließend wurde der Inhalt durch ein 70 µm Zellsieb in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt, mehrmals mit Arbeitsmedium gespült, und wieder in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen pipettiert. Die Probensuspension in dem 15 ml Zentrifugationsröhrchen wurde für 5 min bei 150 g zentrifugiert und anschließend der Überstand soweit es geht abgenommen. Das verbliebene Zellpellet wurde in 1000 µl Arbeitsmedium resuspendiert und 10 µl davon mit

10 µl Trypanblau in einer 96 Well Platte gemischt. Davon wurden 10 µl in einer Neubauer Zählkammer unter einem Axiovert 135 Mikroskop ausgezählt und rechnerisch das nötige Volumen bestimmt, um eine Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml zu erhalten. Die Zellsuspension wurde erneut für 5 min bei 150 g zentrifugiert und die nötige Menge Überstand abpipettiert. Nun wurden 5 µl der Probe je Dome im Verhältnis 1:3 mit 15 µl BME auf Eis vermischt. In der Regel waren es bis zu 12 Domes je Probe, alles Übrige wurde eingefroren. Die 20 µl Zellsuspension-BME Mischung wurde anschließend vorsichtig unter Vermeidung von Blasenbildung auf den Boden einer 48-Well-Platte pipettiert und 15 min kopfüber bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Den daraufhin stabil polymerisierten BME-Domes wurde je 250 µl BTM hinzugeführt und das Ergebnis fotodokumentiert. Die Proben wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

### **2.6.1 Zellen einfrieren**

Die Zellen wurden nach dem Protokoll „Organoide splitten“ bis nach der Abzentrifugation mit Arbeitsmedium und Abnahme des Überstandes gleichbehandelt. An diesem Punkt wurde die nicht zum Splitten benötigte Zellsuspension in 1000 µl Arbeitsmedium resuspendiert und 10 µl davon mit 10 µl Trypanblau in einer 96 Well Platte gemischt. Davon wurden 10 µl in einer Neubauer Zählkammer unter einem Axiovert 135 Mikroskop ausgezählt und rechnerisch das nötige Volumen bestimmt, um eine Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml zu erhalten. Die Zellsuspension wurde erneut für 7 min bei 150 g zentrifugiert und die ermittelte Menge abpipettiert. An diese Stelle knüpft auch das Protokoll „Gewebe in Kultur nehmen“ an, die dort übrig gebliebene Zellsuspension in dergleichen Konzentration wurde auf die gleiche Art zum Einfrieren weiterverarbeitet. Die Zellsuspension wurde, wenn nötig, mit BTM auf 500 µl aufgefüllt, in ein CryoVial überführt und auf Eis gestellt. Nach 10 min wurde 500 µl 4°C kaltes FreezeMedium dazupipettiert und das CryoVial sofort bei -80°C eingefroren.

### **2.6.2 Zellen auftauen**

Zum Auftauen der Zellen aus dem Stickstofftank wurde zunächst 10 ml kaltes, FCS haltiges Arbeitsmedium in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen vorgelegt. Die Zellen in einem Cryovial wurden dann auf Eis transportiert in ein auf 37°C vorgeheiztes Wasserbad gebracht, wo sie vorsichtig unter Beobachtung geschwenkt wurden, bis nur noch ein kleiner Eiskern im Vial vorhanden war. Dann wurde der Inhalt von 1 ml in das bereitgestellte 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und bei 150 g für 7 min und Raumtemperatur zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen und das verbliebene Zellpellet, wie im Protokoll „Gewebe in Kultur nehmen“ nach dem vorab festgelegten Splitverhältnis in BTM und BME resuspendiert und ausplattiert. Nach 15 min Inkubation im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde je Well 250 µl BTM hinzugegeben und das Ergebnis fotodokumentiert.

### **2.7 Organoide splitten**

Die ausgewählte Probe wurde fotodokumentiert, das Splitverhältnis abgeschätzt und im Anschluss das alte Nährmedium aus den Wells abpipettiert. Auf die Domes wurde dann 250 µl PBS und 50 µl Dispase II pipettiert und die Probe für 60 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator inkubiert. Danach wurde der Inhalt von 1 oder 2 Wells in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 200 µl TrypLE je Well pipettiert und die Zellen für 17 min bei 37°C und 1400 rpm auf dem Probenschüttler vereinzelt. Nach dem Prozess wurden die Proben in ein 15 ml oder 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt, in dem bereits je 1 ml Arbeitsmedium pro gesplittetem Well auf 37°C vorgelegt wurde. Anschließend wurde die Suspension für 7 min bei 150 g abzentrifugiert und der Überstand so weit möglich bis auf das Zellpellet abgenommen. Diesem wurde nach der vorab bestimmten Menge an zu entstehenden Domes Blasentumormedium BTM und BME im Verhältnis 1:3 mit jeweils 5 µl BTM und 15 µl BME pro Dome auf Eis hinzugefügt und vorsichtig resuspendiert. Die 20 µl Zellsuspension-BME Mischung wurde anschließend vorsichtig unter Vermeidung von Blasenbildung auf den Boden einer 48-Well-Platte pipettiert und 15 min kopfüber bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Den daraufhin stabil polymerisierten BME-

Domes wurde je 250 µl BTM hinzugeführt und das Ergebnis fotodokumentiert. Die Proben wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

## **2.8 Chamberslides**

Um eine Probe mittels einer Immunfluoreszenzfärbung in dem Format Chamberslides zu untersuchen, wurden 4 – 6 Wells einer gut wachsenden Organoidkultur ausgewählt und dem vorhandenen Nährmedium 100 µl Dispase pro Well dazupipettiert. Diese wurden 1 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Dieses wurde mit kaltem Splittingmedium gefüllt, bis der Inhalt 12 ml betrug, resuspendiert und für 5 min bei 150 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf abgeschätzte 20 – 30 µl abgenommen und 1160 µl Splittingmedium sowie 40 µl BME dazugegeben und resuspendiert. Im Anschluss wurde 150 µl der Lösung in jede der 8 Kammern einer Chamberslide mittig pipettiert und für 2 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach dieser Zeit, in der die Organoide sich am Boden abgesetzt haben sollten, wurde in jede Kammer 250 µl 4% PFA pipettiert und weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die 250 µl PFA abgenommen und 3-mal für je 5 min mit 250 µl PBS jede Kammer gewaschen. Um die fixierten Proben zu permeabilisieren wurde 250 µl Blockingsolution pro Kammer hinzugeführt und für 30 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, anschließend wieder abgenommen und einmal mit 250 µl PBS gewaschen. Somit waren die Proben vorbereitet für die sich unmittelbar anschließende Immunfluoreszenzfärbung.

## **2.9 Paraffinschnitte**

### **2.9.1 Organoide fixieren**

Den zu fixierenden Organoidkulturen wurde das Nährmedium abgenommen, in jedes Well 250 µl PBS und 50 µl Dispase II dazupipettiert und dann für 1 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator inkubiert. Währenddessen wurde ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen und ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 0,1% BSA-PBS beschichtet. Die inkubierten Domes wurden dann mittels einer ebenso mit 0,1% BSA-PBS beschichteten Pipettenspitze in das Falcon überführt und die Wells nochmals mit 0,1% BSA-PBS ausgewaschen. Die Probe wurde im Anschluss

bei 150 g für 2 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand abgenommen, auf das Zellpellet dann 500 µl 4% PFA pipettiert. Mit einer 0,1% BSA-PBS beschichteten Pipette wurde die Suspension dann in das Reaktionsgefäß überführt und für mindestens 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Probe für bis zu einer Woche im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

### **2.9.2 Organoide in Histogel überführen**

Die bei 4°C auf 4% PFA fixierten Proben nach dem Protokoll „Organoide Fixieren Paraffin“ wurden bei 2000 rpm für 2 min in der Zentrifuge Biofuge pico (Heraeus) zentrifugiert, im Anschluss der Überstand vorsichtig bis auf das Zellpellet abgenommen und in den PFA-Abfall verworfen. In der Zwischenzeit wurde ein Vial HistoGel in einem Wasserbad auf 60°C erhitzt, bis das HistoGel flüssig geworden ist. Aus diesem Vial wurden dann 300 µl zu dem Zellpellet im Reaktionsgefäß pipettiert, resuspendiert und in ein vorbereitetes und beschriftetes Cryomold Einbetttschälchen pipettiert. Dieses wurde mindestens 10 min im Kühlschrank bei 4°C erkaltet, bis der HistoGel-Block fest war. Dieser wurde vorsichtig in eine beschriftete Universal Einbettkassette transferiert und diese in einem Urin-Einmalgefäß mit 70% Ethanol gefüllt für bis zu einer Woche gelagert.

### **2.9.3 Organoide in Paraffin einbetten**

Die Organoide mussten in Paraffin eingebettet werden, um haltbar und in schnittfester Form gebracht zu werden, damit letztendlich Paraffinschnitte angefertigt werden konnten. Dafür wurden die im vorherigen Schritt gefüllten und in 70% Ethanol gelagerten Einbettkassetten nach spätestens einer Woche in den Gewebeeinfiltrationsautomaten gegeben. In diesem durchliefen sie das voreingespeicherte Programm #3 (Tab. 7). Dieses sah vor, dass die Proben in Bechern einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%,90%,100%) zunächst dehydriert, dann über 3 Becher Xylol und anschließend in 3 Bechern 60°C warmes, flüssiges Paraffin eingelegt wurden. Jede dieser Stationen wurde automatisch durchlaufen und dauerte 90 min, insgesamt 12 h. Nach Beendigung wurden die Proben entnommen und bei Raumtemperatur erkaltet.

Ethanol 70%	1:30 h
Ethanol 70%	1:00 h
Ethanol 96%	1:30 h
Ethanol 96%	1:00 h
Ethanol 100%	1:30 h
Ethanol 100%	1:00 h
Ethanol 100%	1:00 h
Xylol	1:30 h
Xylol	1:30 h
Xylol	1:00 h
Paraffin	1:30 h
Paraffin	1:30 h
Paraffin	1:30 h

*Tabelle 7 Programm des Gewebeinfiltrationsautomaten*

Die entwässerten Proben in den Einbettkassetten mussten nun herausgenommen und in einen Paraffinblock gegossen werden. Dazu wurden sie im Paraffineinbettungsgerät in einem Becken mit flüssigem Paraffin bei 60°C erhitzt. Im Anschluss wurde die Kassette geöffnet und die paraffinierte Probe vorsichtig mit einer Pinzette in eine metallene Ausgießform gegeben. Diese wurde nun mit 60°C warmen, flüssigen Paraffin gefüllt und mit dem beschrifteten Kassettenboden geschlossen. Die Blockformen wurden dann zum Erhärten für mindestens 1 h auf die Kühlfläche der Maschine gelegt. Danach konnten die fertigen Paraffinblöcke aus der Form gelöst und bei 4°C im Kühlschrank gelagert werden.

#### **2.9.4 Organoide in Paraffin einbetten**

Aus den gegossenen Paraffinblöcken wurden Schnitte angefertigt und auf einen Objektträger überführt, damit diese gefärbt und untersucht werden konnten. Dafür wurde ein Block mit Organoidproben in einem Leica RM2125RT Microtom eingespannt. Als Schnittdicke wurden 3 µm festgelegt und vorsichtig bis zu einer Stelle im Paraffinblock geschnitten, an der Organoide auffindbar waren. Diese Schnitte wurden mit Pinsel und Pinzette auf ein 45°C Wasserbad

überführt, damit sie sich strecken. Anschließend wurden mit einem Objektträger 3 bis 4 Schnitte möglichst zentral aufgezo- gen und zum Trocknen für bis zu einer Stunde bei Raumtemperatur gelagert. Für längere Zeit lagern konnte man sie in einer lichtundurchlässigen Aufbewahrungsbox.

### **2.9.5 Entparaffinierung von 3 µm Schnitten**

Zur Vorbereitung der Paraffinschnitte auf den Objektträgern für die Immunfluoreszenzfärbung mussten diese vorab entparaffiniert werden. Dazu wurden bis zu 10 Objektträger gleichzeitig in ein Gestell gegeben und stufenweise durch Behälter mit den nötigen Chemikalien nach folgendem Schema geführt:

Xylol	15 Minuten
Xylol	15 Minuten
Xylol	15 Minuten
Ethanol 100%	5 Minuten
Ethanol 100%	5 Minuten
Ethanol 95%	5 Minuten
Ethanol 95%	3 Minuten
Ethanol 75%	3 Minuten
Ethanol 30%	3 Minuten
H <sub>2</sub> O	10 Minuten

*Tabelle 8 Ablauf der Entparaffinierung*

Im Anschluss wurde das Gestell für die Demaskierung für 10 min in einen 87°C warmen, pH 9,5 Tris-Urea-Puffer gegeben. Danach wurden sie weitere 10 min bei Raumtemperatur in einem Behälter mit PBS gelagert. Im Anschluss waren die Objektträger bereit für die Immunfluoreszenzfärbung, welche unverzüglich geschah, da an der Luft Austrocknung drohte.

### **2.10 Immunfluoreszenzfärbung**

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden neben den vorbereiteten Proben auch die vorbereiteten Antikörperlösungen benötigt. Hierfür wurden auf Eis die Verdünnungen für Primär- als auch Sekundärantikörper in entsprechend großen Reaktionsgefäßen nach vorgegebenen Schemata hergestellt.

### **2.10.1 Objektträger mit Paraffinschnitten/Kryoschnitten**

Für die Verdünnung wurde PBS mit 0,1% BSA verwendet. Auf jeden Objektträger wurden 100 µl der entsprechenden Antikörperlösung aufpipettiert und mittels der verwendeten Kanüle vorsichtig so verstrichen, dass die gesamte Probe benetzt war. Anschließend wurden sie über Nacht bei Raumtemperatur in einer dunklen, feuchten Kammer inkubiert. Letzteres wurde dadurch erreicht, dass auf den Boden des Gefäßes destilliertes H<sub>2</sub>O, ohne Kontakt zu den Proben, gegossen wurde. Am Folgetag wurde die Lösung mit dem Erstantikörper von den Objektträgern abgeklopft, und diese 3-mal für je 3 min mit 250 µl PBS gewaschen. Im Anschluss wurde 100 µl der Lösung mit dem Zweitantikörper unter möglichst lichtarmen Bedingungen auf die Objektträger pipettiert und unter denselben Konditionen für 1 h inkubiert. Danach wurden wieder möglichst lichtarm die Lösung auf den Objektträgern abgeklopft und diese erneut 3-mal für je 3 min mit 250 µl PBS gewaschen. Zum Schluss wurde auf jeden Objektträger ein Tropfen Dako Mounting Medium appliziert und mit einem Deckglas versiegelt. Die Proben wurden dann lichtgeschützt in einem Ordner im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

### **2.10.2 Chamberslides**

Für die Verdünnung der Antikörper wurde PBS mit 1% BSA verwendet. 100 µl der Erstantikörperlösung wurde vorsichtig in eine Ecke der Kammer pipettiert, der Deckel geschlossen und die Chamberslide für 1 h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in einer dunklen, feuchten Kammer, identisch zu der in Variante 1 verwendeten, inkubiert. Anschließend wird die Lösung vorsichtig abgezogen. Dafür wird die Chamberslide wenn nötig schräg gehalten, und die Lösung vorsichtig und langsam aus der gefüllten Ecke abpipettiert. Darauf folgen 3-mal jeweils 3-minütige Waschschrte mit 250 µl PBS, welche ebenso vorsichtig auf- und abpipettiert werden. Die weiteren Schritte entsprachen im Wesentlichen denen in Variante 1 mit der Ausnahme, dass die Kammerbegrenzung der Chamberslide vor Auftragen des Mounting Medium und des Deckglases mittels des dafür mitgelieferten Gerätes entfernt werden musste.

## **2.11 Immunhistochemische Färbung**

Die immunhistochemischen Färbungen wurden am Institut für Pathologie der Universität Tübingen durchgeführt. Dafür wurde mittels des vollautomatischen Färbesystems VENTANA BenchMark ULTRA je nach vorliegendem Antikörper ein spezifisches, vorprogrammiertes Färbe-Assay durchgeführt (siehe IHC-Antikörper Herstellerangaben). Dieses beruht auf den grundlegenden Prinzipien der IHC-Färbung, bei denen die Gewebsschnitte nach der Entparaffinierung mit Rehydratisierung einem Antigenretrieval unterzogen werden, um durch den Fixierungsprozess verdeckte Antikörper freizulegen. Anschließend werden durch eine Blockierungslösung unspezifische Proteinbindungen im folgenden Färbeprozess reduziert. Daraufhin wird nach Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper durch eine enzymatische Farbreaktion das Zielprotein visualisiert. Zuletzt wird durch Gegenfärbung des Gewebes die Färbung komplettiert.

### **2.11.1 Histoscore**

Die immunhistochemisch nachgewiesenen Zellstrukturen wurden mit Hilfe des Histocores (H-score) ausgewertet, um eine semi-quantitative Analyse der Expression vorzunehmen. Der Wert der Originalprobe und der Organoide wurde gegenübergestellt.

Der Histoscore setzt sich zusammen aus der Intensität, mit der die Zellen /die Zielstrukturen angefärbt wurden, und der Prozentzahl der positiven Zellen an der Gesamtzahl der Zellen des entsprechenden Gewebes auf dem Objektträger. Die Intensität kann betragen: 0 = keine Färbung, 1 = schwache Färbung, 2 = moderate Färbung, 3 = starke Färbung. Die Zahl der jeweiligen Intensitäten wurde mit der prozentualen Anzahl dieser Zellen an allen Zellen multipliziert, und im Anschluss der Wert für jede der Intensitäten addiert. Auf diese Weise kann ein Wert zwischen 0 (in keiner Zelle ist das Merkmal ausgeprägt) und 300 (in allen Zellen ist das Merkmal stark ausgeprägt) für das Expressionslevel der untersuchten Zellstruktur entstehen

### 3 Ergebnisse

Im Laufe der praktischen Arbeit wurden 40 Gewebeproben von BCO#126 bis BCO#167 aus der Urologie aufgearbeitet und in BME angesetzt. Von diesen Proben war der Großteil malignes Gewebe, in 5 Fällen wurde zusätzlich benignes Gewebe, in 3 Fällen eine Lymphknotenresektion mitgesendet. Insgesamt handelte es sich um 49 Gewebeproben. 22 Proben wurden über eine TUR-B entnommen, 2 bei einer Nephroureterektomie, 25 bei einer Zystektomie.

Von diesen 49 Gewebeproben konnten 14 erfolgreich in die 2. Passage gebracht werden, und davon 5 in die 5. Passage und höher.

Die Proben wurden in 48 Well Platten kultiviert. Durch das zugesetzte Nährmedium wurde das Wachstum stimuliert, sodass sich die Zellen im besten Falle vermehrten. Zu Beginn der Arbeitswoche und mindestens alle 7 Tage wurde das alte Nährmedium um die Domes abpipettiert und durch 250 µl frisches Nährmedium ersetzt. Am Ende der Arbeitswoche vor dem Wochenende, spätestens nach 5 Tagen, wurde 50 µl frisches Nährmedium zu dem bereits Vorhandenen dazugegeben. Konnten die Zellen längere Zeit nicht gesplittet werden, wurde bis zu 500 µl Nährmedium auf die Domes gegeben. In unserem Falle betrug die längste Phase ohne Medienwechsel Zeit 10 Tage.

In einer gut wachsenden Probe lagen die Zellen irgendwann so dicht beieinander, dass das Zellwachstum stagnierte. Dies lag vermutlich an dem generellen Platzmangel und dem erhöhten Nährstoffbedarf, gekoppelt mit einem zunehmend kompetitiverem Diffusionsweg für letztere. Eine auf diese Weise zugewachsene Kultur wurde nach dem Protokoll gesplittet und in die nächsthöhere Passage gebracht. Dies war die Vorgehensweise bei den meisten Kulturen oberhalb der 5. Passage, da diese ein stabiles und vorhersehbares Wachstum aufwiesen. Die Zeit zwischen den Passagen betrug in etwa eine Woche.

Bei Proben mit weniger stabilem Wachstum wurde mindestens 3-mal pro Woche die Entwicklung der Probe kontrolliert. Konnte kein Wachstum

festgestellt werden, wurde die Probe weiterkultiviert und regelmäßig das Nährmedium gewechselt. Solange die Zellen unter dem Mikroskop vital erschienen und das Wachstum nicht zurückging, wurde bis zu 3 Wochen mit einer Entscheidung gewartet. Sind alle Zellen oder Zellcluster ohne vorheriges Wachstum abgestorben, wurde die Probe nach einer gewissen Wartezeit verworfen. Konnte in manchen Bestandteilen der Zellkultur Wachstum oder über längere Zeit stabil vital erscheinende Zellen festgestellt werden, wurden sie nach dem Protokoll gesplittet und in die nächste Passage überführt.

Der Grad der Verdünnung oder Konzentrierung beim Splitten wurde vorab nach individueller Einschätzung getroffen. Bei gut wachsenden Proben wurde nach dem Konzept vorgegangen, dass ein Well auf mehrere verdünnt wird. Die festgelegte Menge an Wells wurde nach dem Schema 1 zu 2 bis in Ausnahmefällen 1 zu 18 gesplittet. So wurde die Zellzahl reduziert und das Wachstum verbessert.

Es wurde die Beobachtung gemacht, dass in manchen Fällen eine zu dünn angelegte Zellkultur schlecht wuchs. Dies könnte generell an der Beschaffenheit der Probe gelegen haben, oder an dadurch erschwerter Zell-Zell-Interaktion, welche sich sonst positiv ausgewirkt hätte. Schlecht wachsende oder stagnierende, aber vitale, Proben wurden daher beim Splitten eher konzentriert, die Anzahl der Wells somit reduziert.

Proben in sehr frühen Passagen waren häufig mit Erythrozyten oder anderen, für die Arbeit nicht relevanten Bestandteilen, verunreinigt. Dies behinderte in manchen Fällen die Beurteilung am Mikroskop, verbesserte sich aber nach jedem Splitting.

BCO #	TUR-B	Zystektomie	≥2. Passage	≥5. Passage
127	X		X	
136	X			X
140	X			X
145	X		X	
147		X (Nx)		X
148		X	X	
149	X		X	
150 <b>benigne</b>		X	X	
152	X		X	
154		X		X
154 <b>benigne</b>		X		X
159		X	X	
161 <b>benigne</b>		X	X	
162		X	X	

*Tabelle 9 Übersicht relevanter Proben*

14 Proben konnten erfolgreich mindestens in die 2. Passage gebracht werden. Davon waren 6 durch eine TUR-B, 7 durch eine Zystektomie und eine mittels Nephroureterektomie gewonnen worden.

Von diesen 14 Proben konnten wiederum 5 in die 5. Passage oder höher gebracht werden, und gelten damit nach unserer Definition als Organoide. Von diesen fünf Proben waren 2 durch eine TUR-B und 3 durch eine Zystektomie gewonnen worden.

Von den 14 erfolgreich in die 2. Passage kultivierten Proben waren 11 von der Pathologie als malignes Gewebe und 3 als benignes Gewebe charakterisiert. In den 5 als Organoide etablierten Proben war eine initial als benigne deklarierte Probe enthalten.

Eine Probe wurde als erfolgreich gewertet, sobald nach dem Splitten mindestens eine vitale Zellstruktur vorhanden war oder sich aus Einzelzellen bildete. Frisch aufgearbeitete Proben in der primären Kultur bestanden aus einer Vielzahl der Gewebetrümmern und verschiedensten Zellen. Häufig

zeigten sich initial neben einzelnen Zellen auch größere Zellkonglomerate. Es wurde beobachtet, dass diese sich häufig im Laufe der Zeit zu sogenannten Spheroiden strukturierten. Sie organisierten sich kugelförmig und bildeten bei erfolgreichem Wachstum die Vorstufe der späteren Organoiden. Von Organoiden sprechen wir in diesem Kontext ab der 5. Passage.

### **3.1 BCO#140**

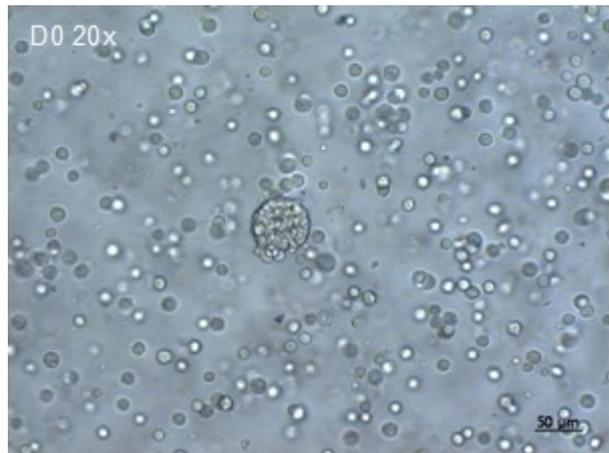
Eine Besonderheit stellt die Probe BCO#140 zusammen mit BCO#154 dar. BCO#140 wurde im Dezember 2020 durch eine TUR-B entnommen und am selben Tag durch meinen Laborkollegen nach Protokoll aufgearbeitet und in Kultur genommen. Die Probe BCO#154 wurde im Februar 2021 demselben Patienten wie BCO#140 durch eine Zystektomie entnommen. Sie stammt aus einer Zystektomie und wurde in zwei Teilen geliefert, ein maligner und ein mutmaßlich benigner Teil. Diese Proben 140 und 154 wurden somit mit einer zeitlichen Differenz von 49 Tagen mit unterschiedlichen Methoden entnommen und stammen aus demselben Patienten. Es ist fraglich, ob es sich bei der späteren Probe um einen residuellen Tumor der ersten Operation oder um eine neue, vom alten Tumor unabhängige Neoplasie handelt. Die wahrscheinlichere erste Annahme lässt interessante Fragestellungen und Vergleiche bezüglich möglicher Veränderungen des Tumors über die Zeit und Auswirkungen der Entnahmekategorie auf die Anzuchterfolge zu.

#### **3.1.1 Pathologie BCO#140**

Es wurden 3 Proben durch TUR-B entnommen und von der Pathologie untersucht. Diese ergaben, dass es sich in 2 der 3 Proben nach Tumorklassifikation um ein kleinzelliges Karzinom der Harnblase, Grading G3/high-grade und TNM mindestens pT1, L1, V1 handelt. Es fand kein muskelinvasives Wachstum statt. In der dritten Probe wurde ein urotheliales CIS in situ festgestellt.

### 3.1.2 Zellkultur BCO#140

Die Probe BCO#140 wurde im Dezember 2020 per TUR-B entnommen, von meinem Kollegen nach Protokoll aufgearbeitet und in Medium inkubiert. Es zeigten sich gut vereinzelt und verteilte Zellen mit vielversprechendem Wachstum. Ein Teil dieser ersten



Passage wurde von mir übernommen und insgesamt 18

Abbildung 1 BCO#140 1.P D0 20x

Tage lang inkubiert. Während dieser Zeit wuchsen aus den meisten Zellen langsam, aber kontinuierlich Sphäroide mit einem Durchmesser von bis zu 100 µm heran (Abb.1). Ihre äußere Begrenzung war gut abgrenzbar aber nicht komplett glatt, eher durch kleine Erhabenheiten geziert. Ihr Inneres wirkte dicht und gleichmäßig von zellulärer Masse gefüllt. Im weiteren Verlauf zeigte sich, dass die Vereinzelung der Sphäroide beim Passagieren nicht überall funktionierte. Trotz der vielen einzelnen Zellen lagen weiterhin Aggregate aus Zellen vor, diese mit Durchmesser von rund 50 bis 100 µm und rauer Oberfläche. Inkubiert wurde zwischen 7 und 10 Tage, in dieser Zeit wuchsen hauptsächlich aus den bereits vorhandenen Zellkonglomeraten, aber auch aus einzelnen Zellen, Sphäroide von bis zu 200 µm Durchmesser heran. In Passage 5 konnte die Zellkultur erfolgreich als Organoide etabliert werden., und setzte sich in ähnlichem Wachstum bis in die 6. Passage fort, hier mit den größten Organoiden von bis zu 300 µm Durchmesser (Abb.2).

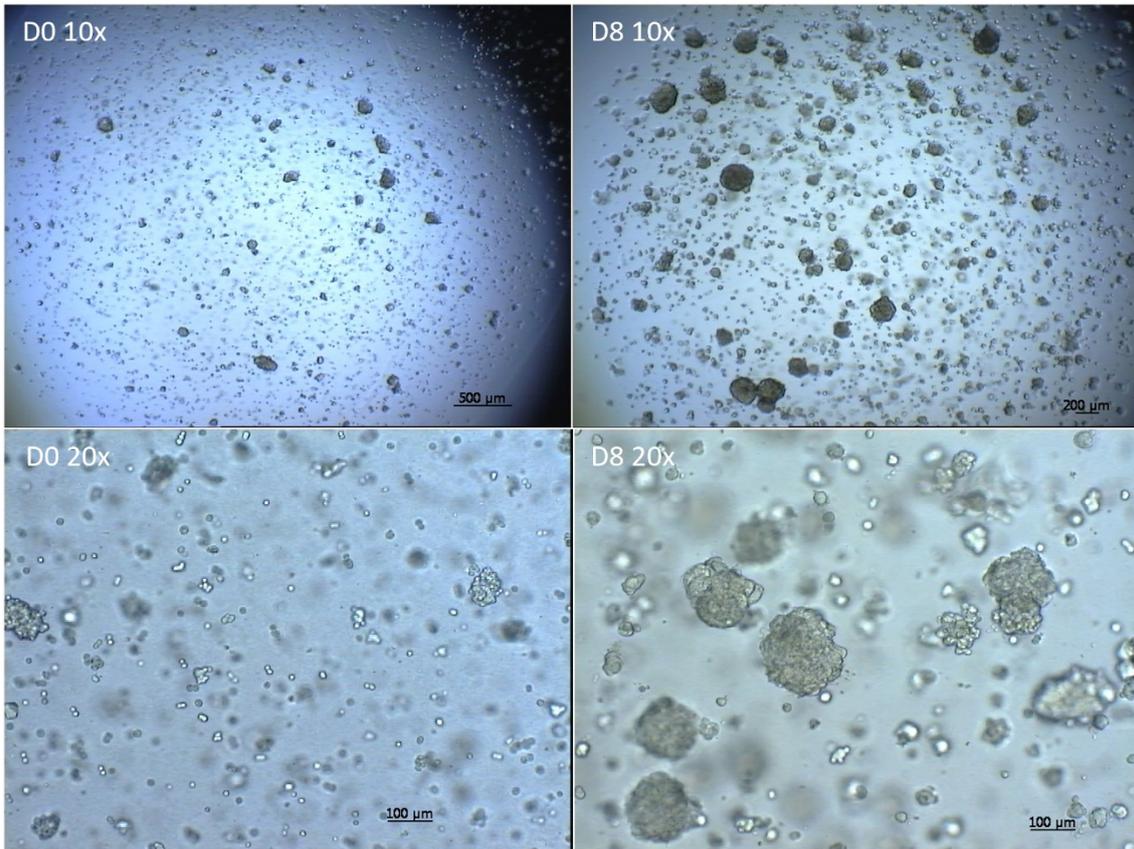


Abbildung 2 BCO#140 5.P D0 und D8

Ab der 7. Passage änderte sich der Ablauf insofern, als dass die Vereinzelnung nun durchgängig erfolgreich war. Es lagen direkt nach der Passage nur vereinzelt Zellen vor. Folglich wurde die Zellkultur dichter, was sich vermutlich auf das Wachstum der Organoide auswirkte. Ab diesem Zeitpunkt wurde auch mindestens 10 Tage inkubiert, die Größe der Organoide wurde bis zu diesem Zeitpunkt ca. 100 µm (Abb.3).

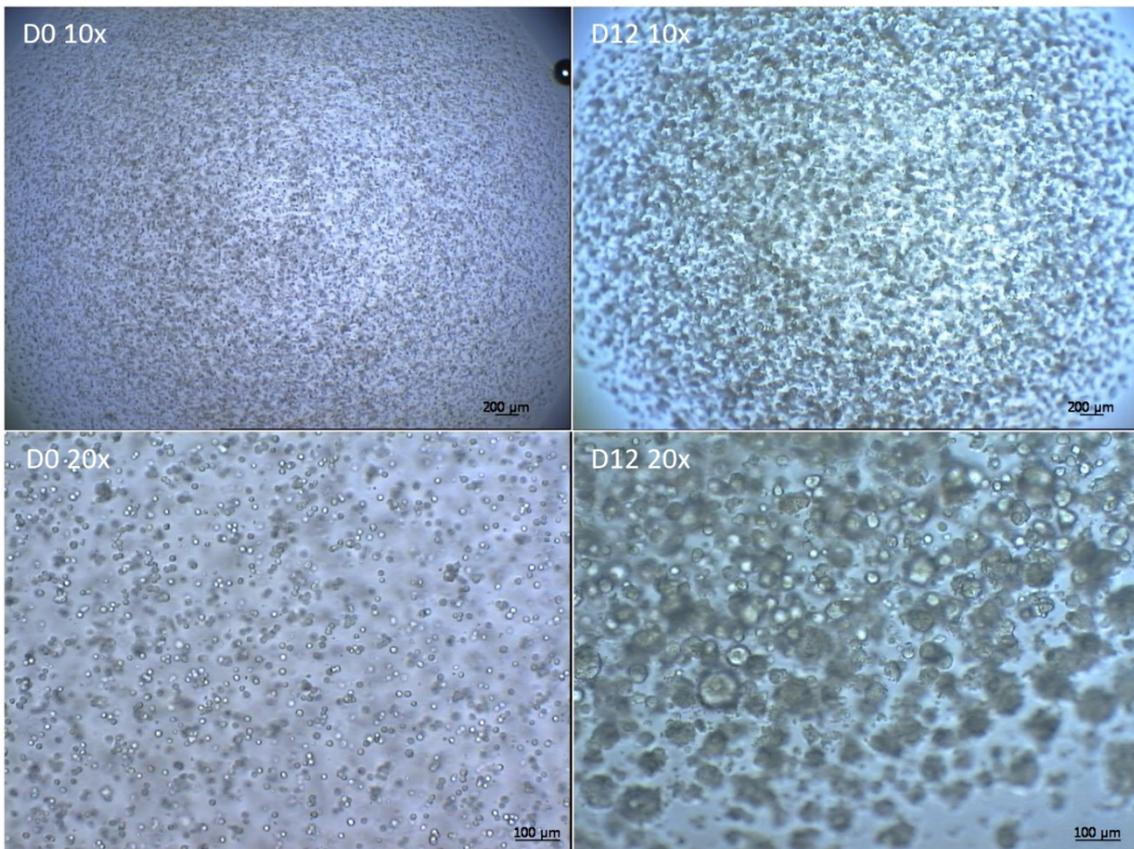


Abbildung 3 BCO#140 8.P D0 und D12

Darum wurde versucht, beim Splitten eine möglichst ausgedünnte Zellkultur zu erreichen, damit genug Platz für Wachstum entsteht. Passage 9 und 10 wurde 1 zu 6, Passage 11 1 zu 12 und Passage 12 1 zu 18 verdünnt. Bis auf die 1 zu 18 Verdünnung wirkte es sich kaum auf das Aussehen und die Größe der Kultur/Organoide am Tag des Splittings aus (Abb.4).

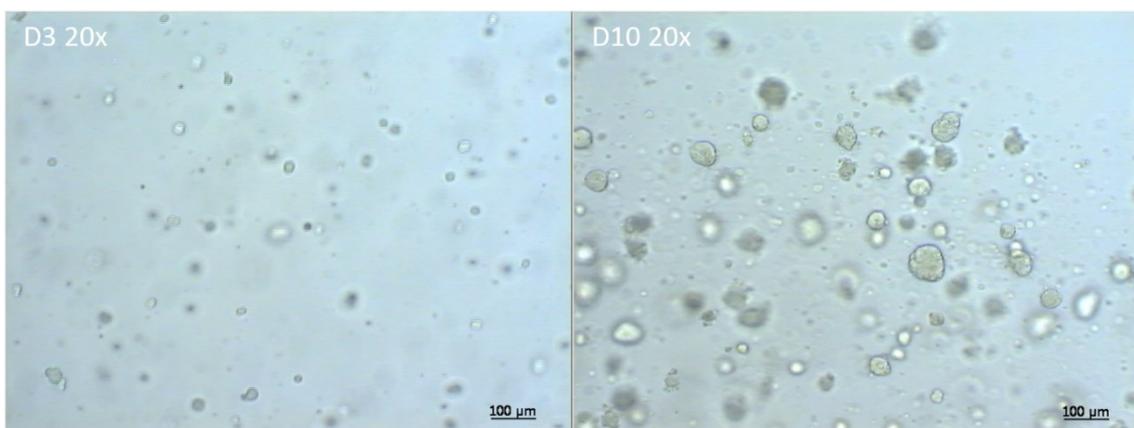


Abbildung 4 BCO#140 12.P D3 und D12

Zuletzt konnte die Kultur erfolgreich etwas ausgedünnt werden, die Organoide blieben jedoch bei einer Größe von ca. 100 µm. Nach dieser Passage wurde die Zellkultur von mir an meine Nachfolger abgegeben.

### **3.1.3 Immunhistochemische Färbungen und Vergleich mit Originaltumor**

Um der Fragestellung der Vergleichbarkeit eines Organoids mit dem Originaltumor gerecht zu werden, wurde auf immunhistochemische Färbungen zurückgegriffen (Abb.5+6+7). Ein Vorteil besteht in der Haltbarkeit einer in Paraffin eingebetteten Probe. Von dieser können zu jedem Zeitpunkt flexibel weitere Schnitte angefertigt werden. Auch verlieren auf diese Weise gefärbte Proben über einen längeren Zeitraum kaum an farblicher Intensität, wie es bei der Immunofluoreszenz der Fall sein kann.

Die Organoide wurden im Labor gezüchtet, nach Protokoll fixiert und in Paraffin eingebettet. Daraus wurden 3µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf Objektträger gezogen und in das Pathologische Institut der Universität Tübingen gebracht. Die Originaltumore lagen bereits in fixiertem Zustand vom Entnahmetag in der Pathologie vor. Dort wurden ebenfalls 3 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger gezogen. Beide Proben wurden im Anschluss immunhistochemisch auf folgende Proteinstrukturen gefärbt/untersucht: H&E – CK20 – CK7 – GATA3 – TP53 – TP63 – FGFR3

In der Originalprobe des Tumors BCO#140 ließen sich mit Konsultation einer ausgebildeten Fachärztin für Pathologie zwei distinkte Subtypen einer Neoplasie mit unterschiedlicher Morphologie und Expressionsverhalten identifizieren. Diese wurden als Teil 1 und Teil 2 unterteilt und jeweils immunhistochemisch untersucht (Abb.5+6, Tab.10+11).

Mit Hilfe des Histoscores wurde eine semi-quantitative Analyse der Expressionsrate der Zellen durchgeführt. Der Wert der Originalprobe und der Organoide wurde gegenübergestellt.

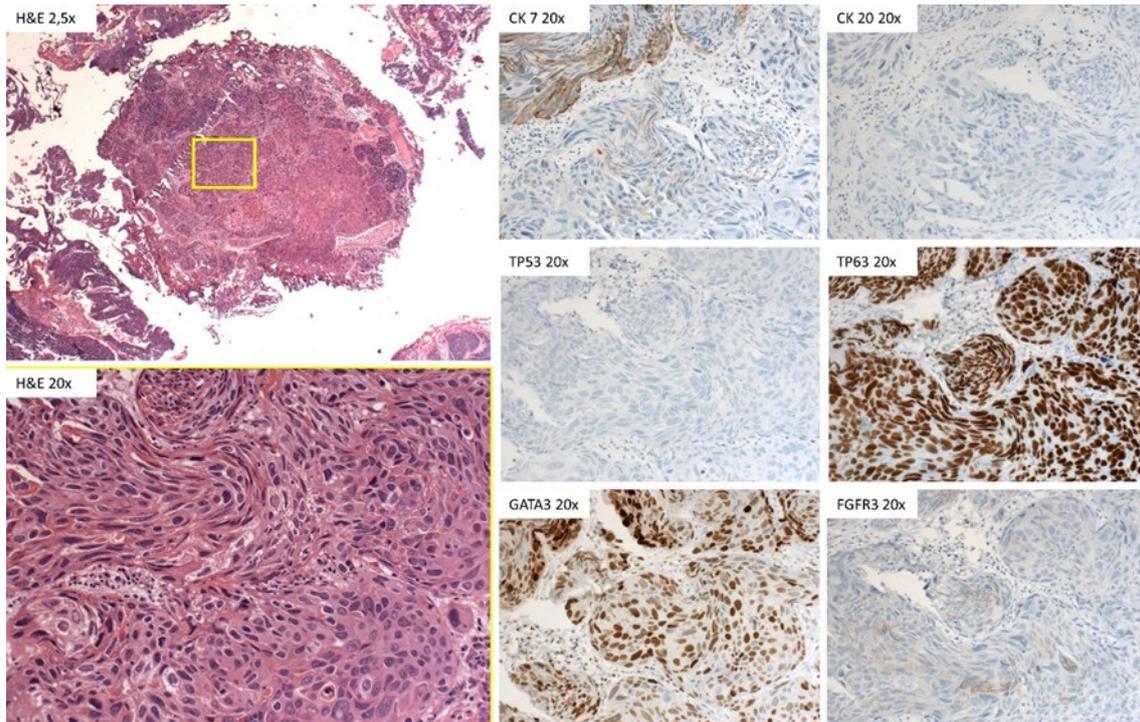


Abbildung 5 Originaltumor BC#140 Teil 1 Immunhistochemie

BC#140 I	Expression	+	++	+++	H-score
CK 7	Zellmembran, Zytosol	10%	10%	15%	75
CK 20	nicht exprimiert	0%	0%	0%	0
TP53	nicht exprimiert	0%	0%	0%	0
TP63	Zellkern	0%	20%	80%	280
GATA3	Zellkern	30%	50%	20%	190
FGFR3	Zellmembran, Zytosol	20%	10%	0%	40

Tabelle 10 Histoscore Originaltumor BC#140 Teil 1

Der Originaltumor BC#140 Teil 1 exprimiert stark den basalen Marker TP63 sowie etwas weniger stark den luminalen Marker GATA3. Schwach exprimiert wird Zytokeratin 7 und FGFR 3. CK20 und TP53 werden nicht exprimiert (Abb.5, Tab.10).

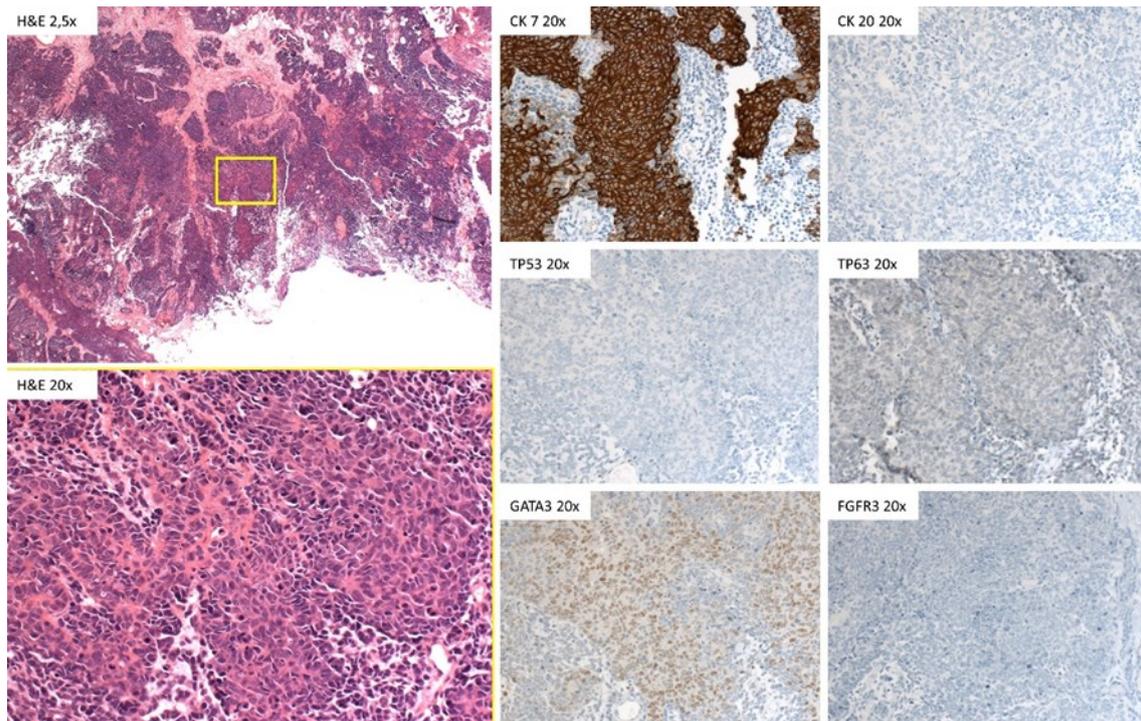


Abbildung 6 Originaltumor BC#140 Teil 2 Immunhistochemie

BC#140 II	Expression	+	++	+++	H-score
CK 7	Stark Zellmembran, Zytosol	0%	10%	90%	290
CK 20	nicht exprimiert	0%	0%	0%	0
TP53	nicht exprimiert	0%	0%	0%	0
TP63	nicht exprimiert	0%	0%	0%	0
GATA3	Zellkern, leicht Zytosol	10%	0%	10%	180
FGFR3	nicht exprimiert	0%	0%	0%	0

Tabelle 11 Histoscore Originaltumor BC#140 Teil 2

Der Originaltumor BC#140 Teil 2 exprimiert stark CK7 sowie etwas weniger stark den luminalen Marker GATA3. Andere Marker werden nicht exprimiert (Abb.6, Tab.11).

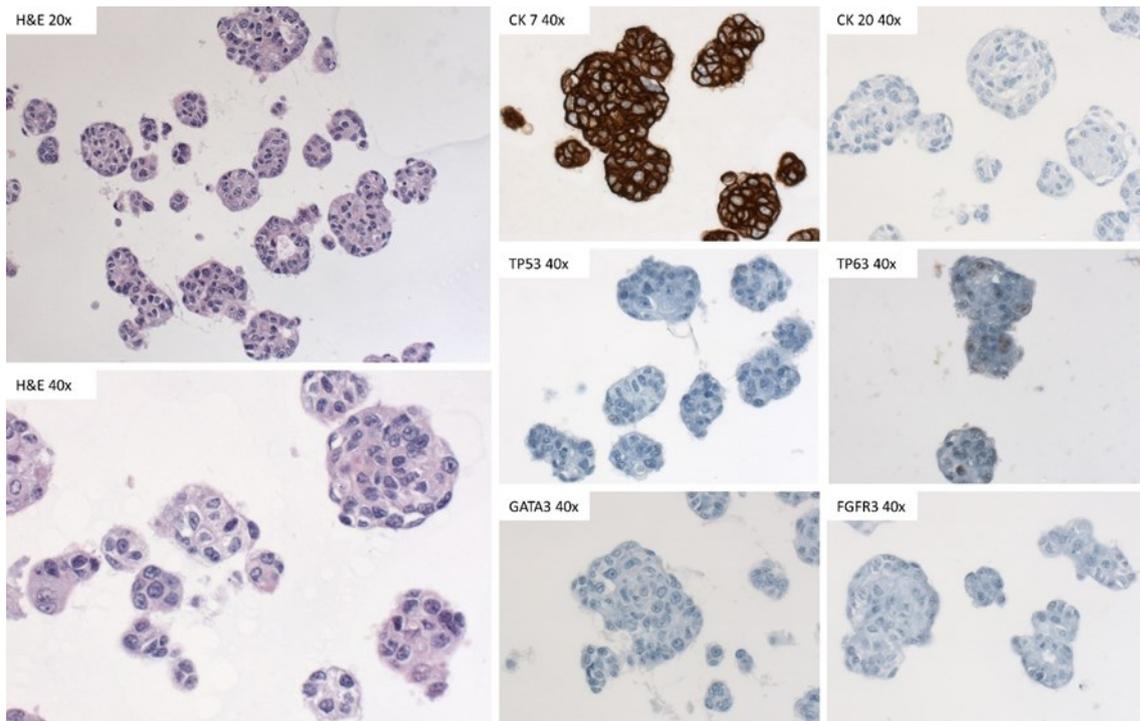


Abbildung 7 Organoid BCO#140 8.P Immunhistochemie

BCO#140 8.P	Expression	+	++	+++	H-score
CK 7	Stark Zellmembran, Zytosol	0%	0%	100%	300
CK 20	nicht exprimiert	0%	0%	0%	0
TP53	Zellkern	0%	0%	0%	0
TP63	Zellkern	10%	10%	0%	30
GATA3	nicht exprimiert	0%	0%	0%	0
FGFR3	nicht exprimiert	0%	0%	0%	0

Tabelle 12 Histoscore Organoid BCO#140 8.P

Das Organoid BCO#140 in der 8.Passage exprimiert in jeder Zelle stark CK7 und schwach den basalen Marker TP63. Keine anderen Marker werden exprimiert (Abb.7, Tab.12).

### 3.1.4 Vergleich der Expressionen

Im Folgenden werden die jeweiligen Histoscores der Marker von den Originaltumoren BC#140 Teil 1 und Teil 2 grafisch denen vom Organoid BCO#140 in der 8. Passage gegenübergestellt (Abb.8).

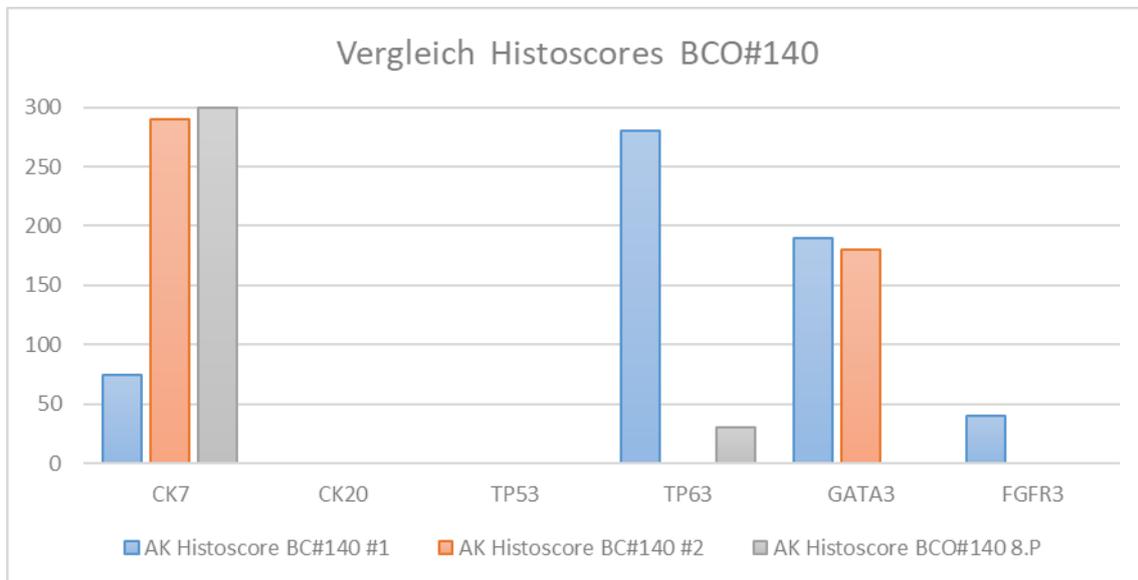


Abbildung 8 Vergleich Histoscores Originaltumor BC#140 Teil 1, 2 und Organoid BCO#140 8.Passage. X-Achse Antikörper, Y-Achse Histocore, blau = BC#140 #1, rot = BC#140 #2, grau = BCO#140 8.P

#### **Vergleich Histocore Originaltumor BC#140 Teil 1 zu BCO#140 8.P:**

BCO#140 8.P zeigt verglichen mit dem Originaltumor Teil 1 ein ähnliches Expressionsprofil hinsichtlich CK20 und TP53 insofern, als dass beide Marker in beiden Proben nicht exprimiert werden. Die Expression von CK7 ist im Organoid in jeder Zelle 100% vorhanden und hat sich somit im Vergleich sehr gesteigert. TP53 wird nur noch sehr schwach exprimiert und sowohl GATA3 als auch FGFR 3 können im Organoid nicht mehr nachgewiesen werden (Abb.8).

#### **Vergleich Histocore Originaltumor BC#140 Teil 2 zu BCO#140 8.P:**

BCO#140 8.P zeigt verglichen mit dem Originaltumor Teil 2 ein ähnliches Expressionsprofil hinsichtlich CK20, FGFR 3 und TP53 insofern, als dass diese Marker in beiden Proben nicht exprimiert werden. Auch die Expression von CK7 ist ähnlich stark, mit leichter Steigerung im Organoid. Die leichte Expression von TP63 im Organoid konnte im Originaltumor Teil 2 nicht nachgewiesen

werden. Hinsichtlich GATA3 fand ein Expressionsverlust im Organoid statt (Abb.8).

Um eine Übereinstimmung in Prozent zu erhalten, wurden die Histoscores der Marker der Organoide mit der Ursprungsprobe ins Verhältnis gesetzt. Stimmt der Histoscore für einen Marker genau überein ergibt das einen Wert von 1,0 bzw. 100%. Jede Abweichung, sowohl mehr als auch weniger Expression, resultieren in einer prozentual geringeren Übereinstimmung hinsichtlich der ursprünglichen Expression für diesen Marker. Die Ergebnisse für die 6 Marker wurden gemittelt und verglichen. Die Organoidreihe BCO#140 in der 8. Passage erzielte nach dieser Methode eine Übereinstimmung von 39% mit der Originalprobe BC#140 Teil 1. Mit der Originalprobe BC#140 Teil 2 betrug die Übereinstimmung der Markerexpression 66%.

Nach dieser Rechnung stimmt die Markerexpression von BCO#140 mehr mit Teil 2 als mit Teil 1 überein. Es lässt sich hier im Nachhinein nicht feststellen, von welchem Teil die Probe stammte, je nach Ursprung wäre es aber mit einem mehr oder weniger deutlichem Verlust der Markerexpression verbunden.

### **3.1.5 Immunfluoreszenzfärbungen**

Von der Probe BCO#140 wurde in der Zeit der Kultivierung in den Passagen 3, 6, und 9 Chamberslides angefertigt und mittels Immunfluoreszenzfärbung auf das Vorhandensein von spezifischen Proteinstrukturen untersucht. Aus den Passagen 0 und 8 wurden Paraffinschnitte für die Immunfluoreszenzuntersuchung angefertigt. Der Vergleich der verschiedenen Passagen untereinander lässt einen Schluss auf die Entwicklung der Zellpopulation über die Zeit und die Veränderlichkeit in der Ausprägung der Zielstrukturen zu (Abb.9-22).

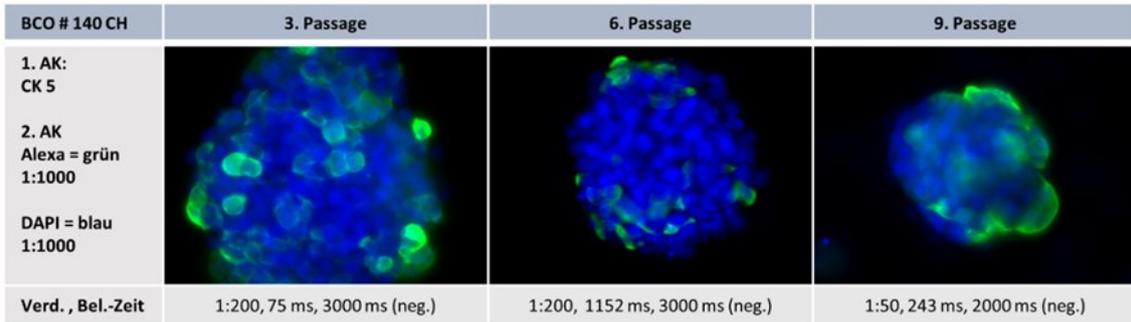


Abbildung 9 IFL-Färbung BCO#140, Chamberslide, CK5

Das Signal für Zytokeratin 5 ist über die Passagen auf einzelne Zellen im Zytosol begrenzt. Die Expressionshäufigkeit scheint abzunehmen, die Verdünnung des Primärantikörpers wurde von der 6. auf die 9. Passage um den Faktor 4 verringert, um ein verwertbares Signal zu erhalten (Abb.9).

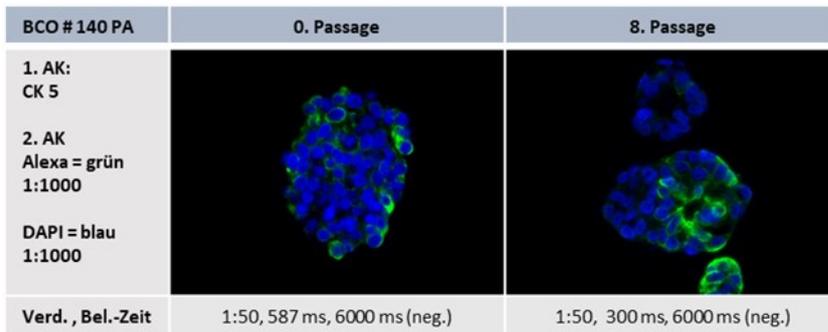


Abbildung 10 IFL-Färbung BCO#140, Paraffinschnitte 3 µm, CK5

Das Signal für Zytokeratin 5 ist auch im Paraffinschnitt über die Passagen auf einen Großteil der Zellen im Zytosol begrenzt. Die Expressionshäufigkeit scheint bei diesem Verfahren über die Passagen konstant (Abb.10).

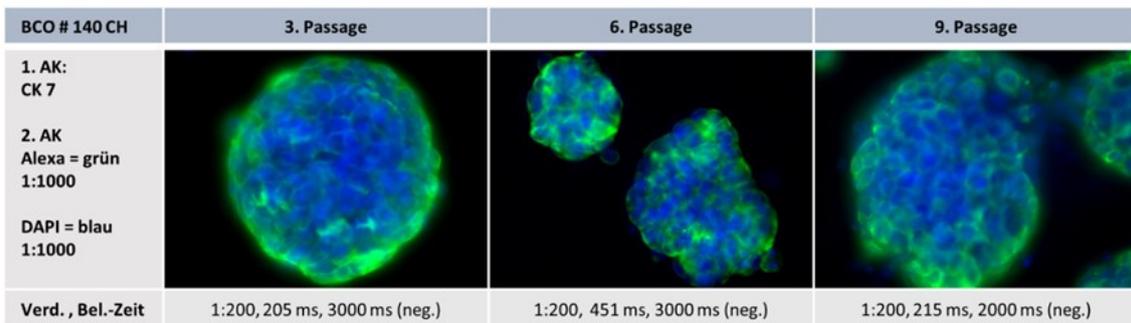


Abbildung 11 IFL-Färbung BCO#140, Chamberslide, CK7

Die Expressionshäufigkeit von Zytokeratin 7 scheint ubiquitär in allen Zellen zytosolisch und über die Passagen konstant vorhanden zu sein (Abb.11).

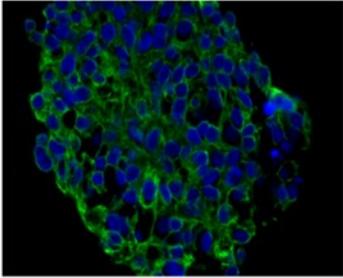
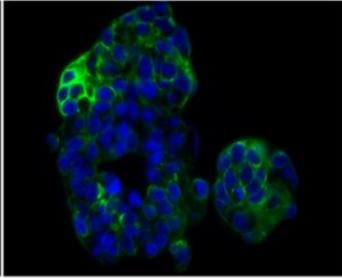
BCO # 140 PA	0. Passage	8. Passage
1. AK: CK 7		
2. AK Alexa = grün 1:1000		
DAPI = blau 1:1000		
Verd., Bel.-Zeit	1:100, 360 ms, 6000 ms (neg.)	1:100, 160 ms, 6000 ms (neg.)

Abbildung 12 IFL-Färbung BCO#140, Paraffinschnitt 3  $\mu$ m, CK5

Dasselbe Ergebnis konnte für Zytokeratin 7 mittels Paraffinschnitt nachgewiesen werden (ubiquitär zytosolisch konstant exprimiert) (Abb.12).

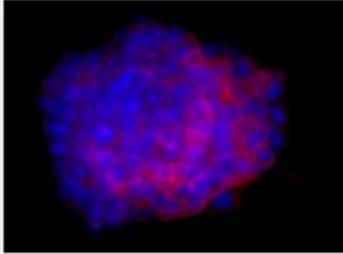
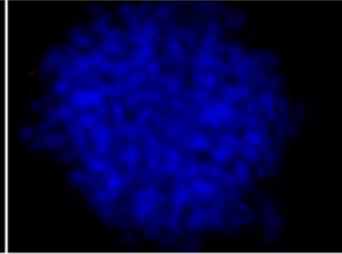
BCO # 140 CH	3. Passage	6. Passage
1. AK: CK 20		
2. AK Cy3 = rot 1:1000		
DAPI = blau 1:1000		
Verd., Bel.-Zeit	1:200, 1000 ms, 1000 ms (neg.)	1:200, 1500 ms, 1500 ms (neg.)

Abbildung 13 IFL-Färbung BCO#140, Chamberslide, CK20

Die Expressionshäufigkeit von Zytokeratin 20 nimmt ab. Ist in Passage 3 das Signal in fast jeder Zelle zytosolisch vorhanden, kann es in der 6. Passage bei gleicher Verdünnung nicht mehr nachgewiesen werden (Abb.13).

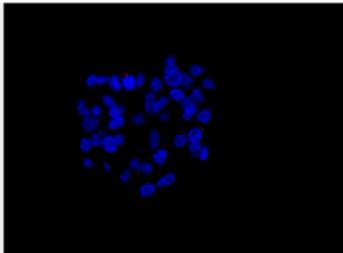
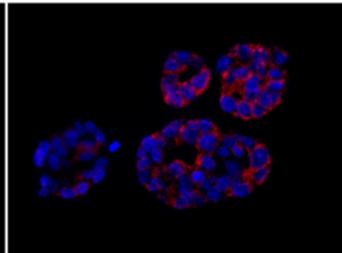
BCO # 140 PA	0. Passage	8. Passage
1. AK: CK 20		
2. AK Cy3 = rot 1:1000		
DAPI = blau 1:1000		
Verd., Bel.-Zeit	1:50, 5880 ms, 6000 ms (neg.)	1:50, 1467 ms, 6000 ms (neg.)

Abbildung 14 IFL-Färbung BCO#140, Paraffinschnitt 3  $\mu$ m, CK20

Mittels Paraffinschnitt scheint die Expressionshäufigkeit von CK 20 von der 0. zur 8. Passage zuzunehmen, wobei initial kaum Signal erkennbar war (Abb.14).

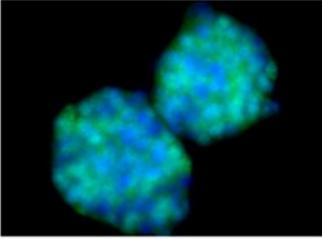
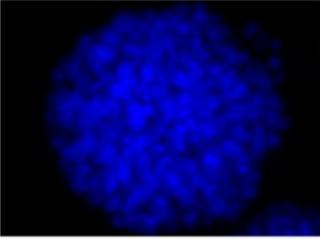
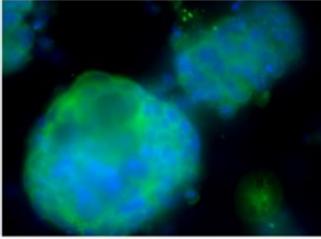
BCO # 140 CH	3. Passage	6. Passage	9. Passage
1. AK: GATA3			
2. AK Alexa = grün 1:1000			
DAPI = blau 1:1000			
Verd., Bel.-Zeit	1:200, 1435 ms, 3000 ms (neg.)	1:200, 3000 ms, 3000 ms (neg.)	1:50, 805 ms, 2000 ms (neg.)

Abbildung 15 IFL-Färbung BCO#140, Chamberslide, GATA 3

Die Expressionshäufigkeit von GATA3 scheint über die Passagen abzunehmen, die Verdünnung der Primärantikörpers wurde verringert, nachdem in der 6. Passage mit der ursprünglichen Verdünnung kein Signal feststellbar war. Dabei kann es sich aber auch um ein Artefakt bei fehlerhafter Färbung handeln. Initial scheint sich das Signal sowohl im Zytoplasma als auch nukleär im Großteil der Zellen zu befinden, in der 9. Passage erscheint es eher ubiquitär zytoplastisch (Abb.15).

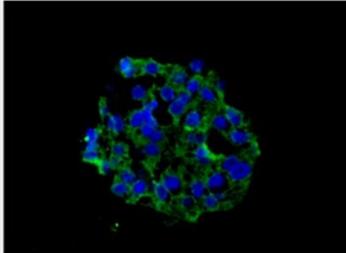
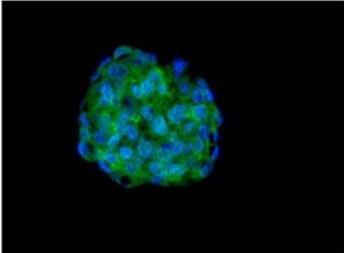
BCO # 140 PA	0. Passage	8. Passage
1. AK: GATA 3		
2. AK Alexa = grün 1:1000		
DAPI = blau 1:1000		
Verd., Bel.-Zeit	1:50, 1198 ms, 6000 ms (neg.)	1:50, 1304 ms, 6000 ms (neg.)

Abbildung 16 IFL-Färbung BCO#140, Paraffinschnitt 3 µm, CK20

Mittels Paraffinschnitt scheint die Expressionshäufigkeit von GATA3 zeitlich konstant. Das Signal ist initial ubiquitär zytoplastisch, später zudem auch nukleär vorhanden (Abb.16).

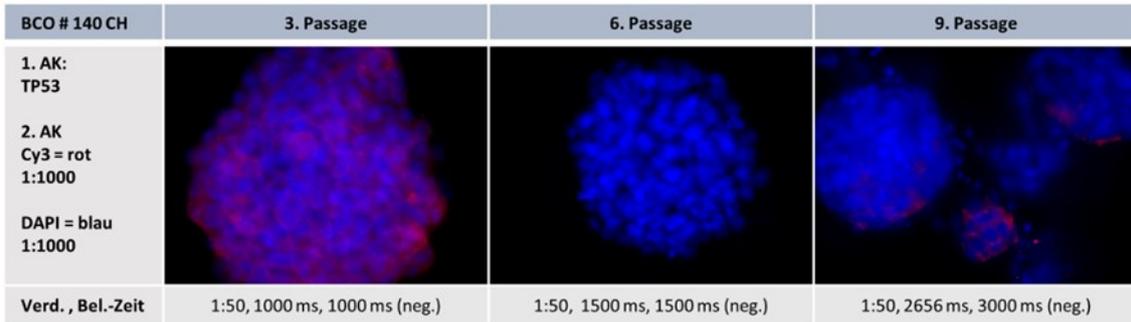


Abbildung 17 IFL-Färbung BCO#140, Chamberslide, TP53

Die Expressionshäufigkeit von TP53 scheint über die Zeit abzunehmen. Ist das Signal in Passage 3 noch ubiquitär zytosolisch vorhanden, kann es in der 6. Passage gar nicht, in der 9. Passage nur in wenigen Zellen nachgewiesen werden (Abb.17).

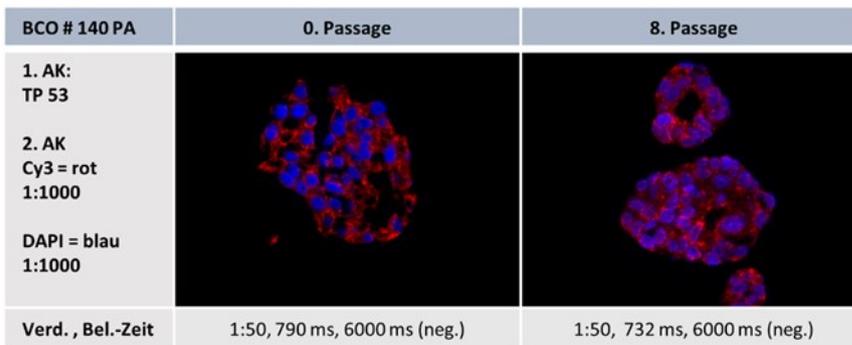


Abbildung 18 IFL-Färbung BCO#140, Paraffinschnitt 3 µm, TP53

Mittels Paraffinschnitt scheint die Expressionshäufigkeit von TP53 konstant, initial ubiquitär zytosolisch, später mit zusätzlicher nukleärer Komponente (Abb.18).

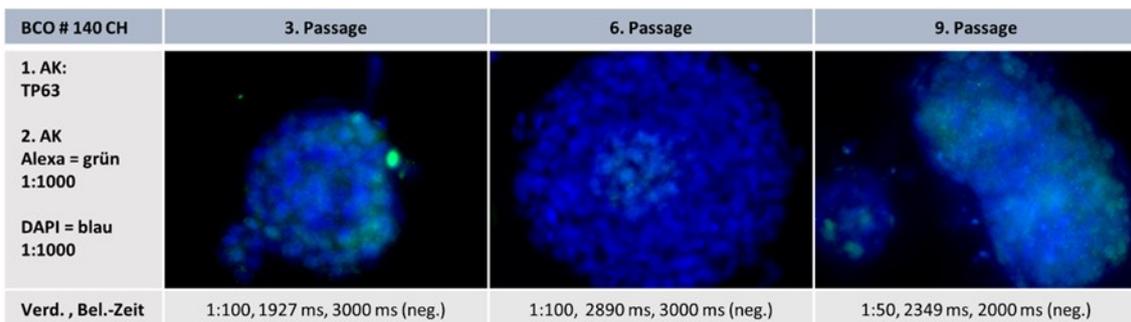


Abbildung 19 IFL-Färbung BCO#140, Chamberslide, TP63

Die Expressionshäufigkeit von TP63 scheint über die Passagen abzunehmen, die Verdünnung des Primärantikörpers wurde um den Faktor 2 verringert, um

ein ausreichendes Signal zu erfassen. Das Signal erscheint in der 3. und 9. Passage nukleär im Großteil der Zellen, in der mittleren 6. Passage nur auf einen kleinen Teil der Zellen begrenzt (Abb.19). Zu beachten ist, dass in der 9. Passage die Belichtungszeit die der Negativprobe übertraf. Dabei handelt es sich um einen methodischen Fehler, welcher jedoch die Abnahme der Expressionshäufigkeit nicht ausschließt.

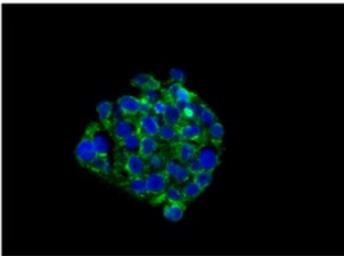
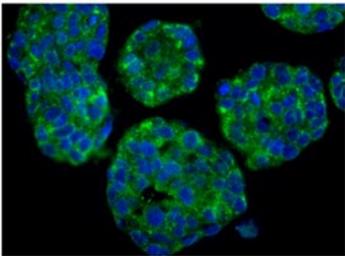
BCO # 140 PA	0. Passage	8. Passage
1. AK: TP 63		
2. AK Alexa = grün 1:1000		
DAPI = blau 1:1000		
Verd. , Bel.-Zeit	1:50, 805 ms, 6000 ms (neg.)	1:50, 786 ms, 6000 ms (neg.)

Abbildung 20 IFL-Färbung BCO#140, Paraffinschnitt 3 µm, TP63

Die Expressionshäufigkeit scheint über die Zeit konstant, ubiquitär zytosolisch mit potenziell leichter nukleärer Zunahme (Abb. 20).

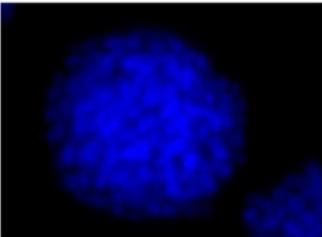
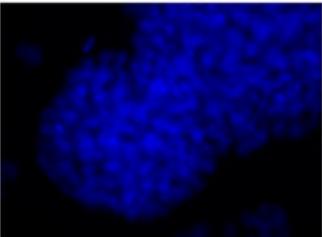
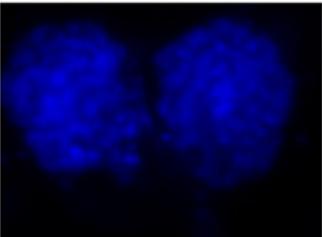
BCO # 140 CH	3. Passage	6. Passage	9. Passage
1. AK: FGFR3			
2. AK Alexa = grün 1:1000			
DAPI = blau 1:1000			
Verd. , Bel.-Zeit	1:100, 2000 ms, 3000 ms (neg.)	1:100, 3000 ms, 3000 ms (neg.)	1:50, 2000 ms, 2000 ms (neg.)

Abbildung 21 IFL-Färbung BCO#140, Chamberslide, FGFR 3

Mittels IFL Chamberslides konnte für FGFR3 konstant keine Expression nachgewiesen werden (Abb.21).

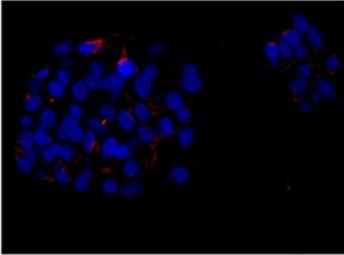
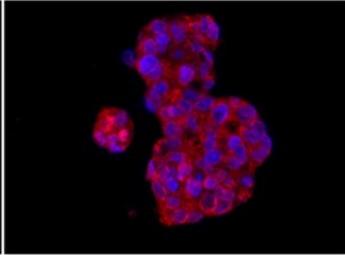
BCO # 140 PA	0. Passage	8. Passage
1. AK: FGFR 3  2. AK Cy3 = rot 1:1000  DAPI = blau 1:1000		
Verd. , Bel.-Zeit	1:50, 2208 ms, 6000 ms (neg.)	1:50, 750 ms, 6000 ms (neg.)

Abbildung 22 IFL-Färbung BCO#140, Paraffinschnitt 3  $\mu$ m, FGFR 3

Mittels Paraffinschnitt konnte eine Steigerung der Expressionshäufigkeit festgestellt werden. Das Signal ist initial leicht zytosolisch in den meisten Zellen vorhanden, in der 8. Passage dann ubiquitär sowohl zytosolisch als auch mit nukleärer Komponente (Abb.22).

### **3.1.6 Zusammenfassung des Expressionsverhaltens von BCO#140 über 8 Passagen in Immunfluoreszenz und Immunhistochemie**

Zusammenfassend muss festgehalten werden, dass mit den verschiedenen Methoden IFL Chamberslides und Paraffin, sowie der IHC teils widersprüchliches Expressionsverhalten nachgewiesen wurde. Übereinstimmend ist die starke Expression von CK7, welche nicht mit einem bestimmten molekularen Subtyp in Verbindung gebracht werden kann. In der IHC konnten weiterhin keine der ausgewählten luminalen, weniger aggressiven Marker nachgewiesen werden, eher ein Rückgang in Bezug auf GATA3 und möglicherweise FGFR3. Für GATA3 wurde mittels IFL allerdings eine Expression nachgewiesen, FGFR3 nur mittels IFL-Paraffinschnitten. Als einziger basaler Marker war TP63 im Organoid mittels IHC nachweisbar, im direkten Vergleich eine Steigerung zu BC#140 Teil 2 und eine Abnahme gegenüber BC#140 Teil 1. Dieser konnte auch in den IFL-Methoden nachgewiesen werden und deutet eine Selektion in Richtung aggressiverer, basaler Zelltypen hin. Dies wird unterstützt durch den Nachweis von CK5 mittels IFL. Die unterschiedliche Expression von TP53 in IFL zu IHC lässt Zweifel an der Aussagekräftigkeit einer der Methoden in diesem Fall aufkommen, hier wäre die Nichtexpression in der IHC als valideres Ergebnis anzusehen. CK20 konnte mittels IHC nicht nachgewiesen werden, in der IFL

gab es eine schwache Expressionshäufigkeit, welcher als luminaler Marker eher für einen weniger aggressiven Subtyp sprechen würde. Die geringe Ausprägung, vor allem in der IHC, lässt dies aber nicht als überwiegenden Faktor darstellen.

### **3.2 BCO#154**

Die Probe BCO#154 wurde im Februar 2021 per Zystektomie entnommen und am selben Tag im Labor nach Protokoll aufgearbeitet und in Kultur genommen. Dabei handelte es sich um 2 Proben, jeweils 270 mg schwer, die vorläufig laut Pathologie in benigne (b) und maligne (m) unterteilt wurden. Bei der malignen handelte es sich um ein solides Stück Tumor. Die benigne Probe bestand aus einem mutmaßlich unverändert gutartigem Stück Blasenwand. Zu diesem Zeitpunkt war nicht bekannt, dass es sich um eine Probe von demselben Patienten handelte, dem auch BCO#140 entstammte.

#### **3.2.1 Pathologie BCO#154**

Die Probe wurde durch eine En-bloc-Resektat mit Anteilen beider Harnleiter, Prostata, Blase mit perivesicalem Fettgewebe, rechte und linke Samenblase sowie Anteilen der Ductus deferentes entnommen. Mikroskopisch zeigte sich ein kleinzelliges, invasives Urothelkarzinom mit high-grade G3 Anteilen und ausgeprägter Cis -Komponente. Nebst Infiltration des perivesicalen Fettgewebes findet sich eine ausgedehnte Perineuralscheideninfiltration, Lymphangiosis carcinomatosa sowie Hämangiosis carcinomatosa. TNM: pT3b, pN0 (0/20LK), L1, V1, Pn1, R0, G3.

#### **3.2.2 Zellkultur BCO#154 (m)**

In der malignen Probe waren die Zellen von Anfang an sehr gut vereinzelt und in großer Zahl vorhanden (700 Zellen im Zählfeld der Neubauer-Zählkammer), es gab nur ein paar kleinere Aggregate von Gewebe. Die nullte Passage wurde 15 Tage lang inkubiert, an dessen Ende sich zahlreiche Sphäroide mit einem Durchmesser von bis zu 250 µm zeigten (Abb.23).

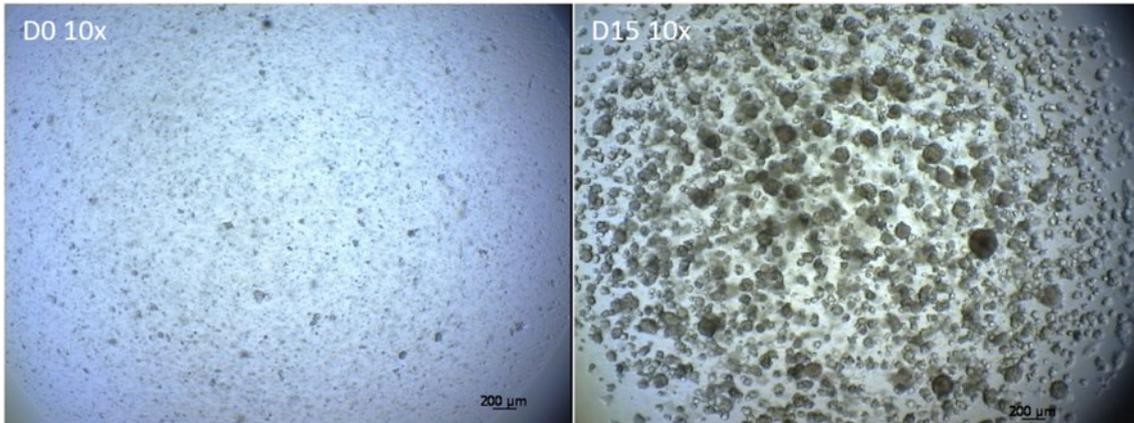


Abbildung 23 BCO#154 m 0.P D0 und D15

Bereits hier ist eine Ähnlichkeit mit der Zellkultur BCO#140 sichtbar, die Sphäroide sind kompakt und rundlich, Ihre äußere Hülle klar abgrenzbar, aber unregelmäßig. In der folgenden Passage konnten die Zellen erfolgreich vereinzelt werden, dadurch wurde die Zellkultur sehr schnell sehr dicht. Die Größe der Sphäroide erreichte so nur einen Durchmesser von bis zu 100 µm. Diese Art des Wachstums bestand während der weiteren Passagen. Die Inkubationszeit betrug durchschnittlich 10 Tage. Um die Zelldichte beim Splitten zu reduzieren, wurde die Verdünnung ab Passage 6 auf 1 zu 12 und in Passage 7 auf 1 zu 18 erhöht (Abb.24).

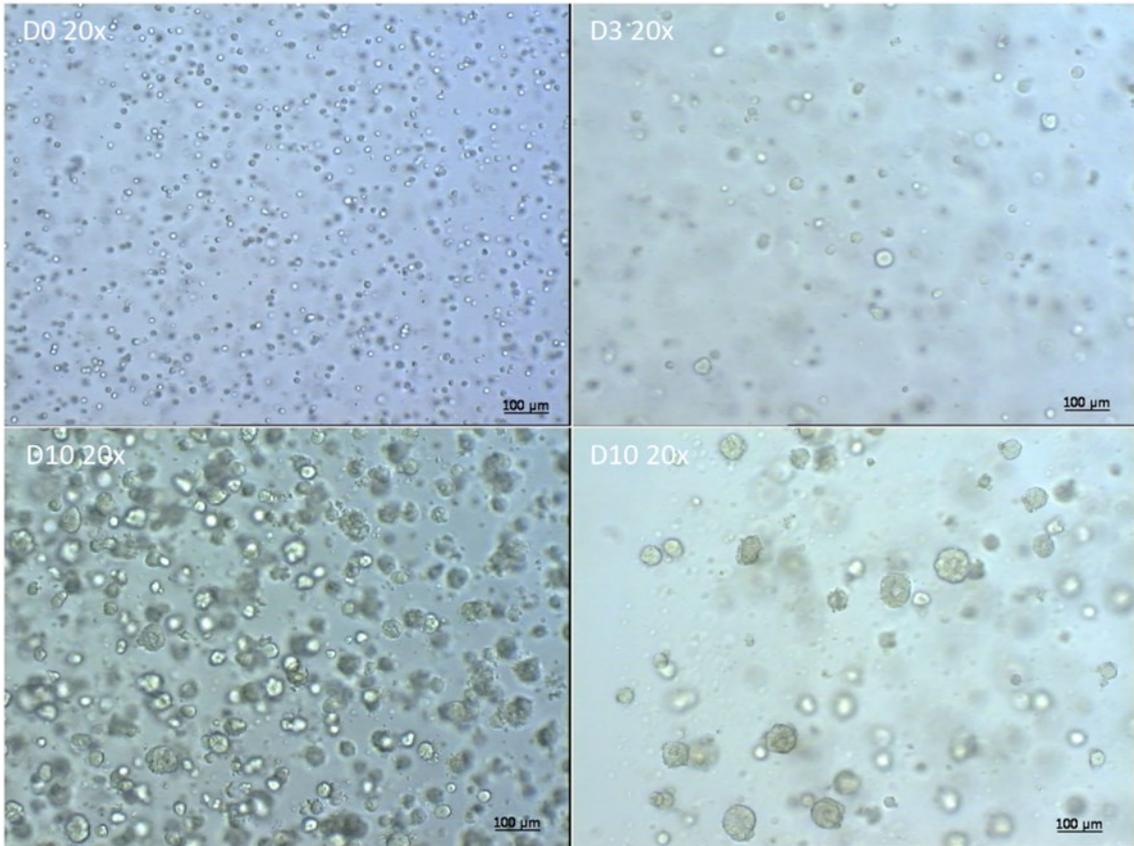


Abbildung 24 BCO#154 (m) links 6.P D0 und D10, rechts 7.P D3 und D10

Damit konnte die Größe der Organoide allerdings auch nicht über 100 µm erhöht werden. Die Zellkultur wurde von mir bis in die 8. Passage betreut.

### 3.2.3 Immunhistochemische Färbungen und Vergleich mit Originaltumor

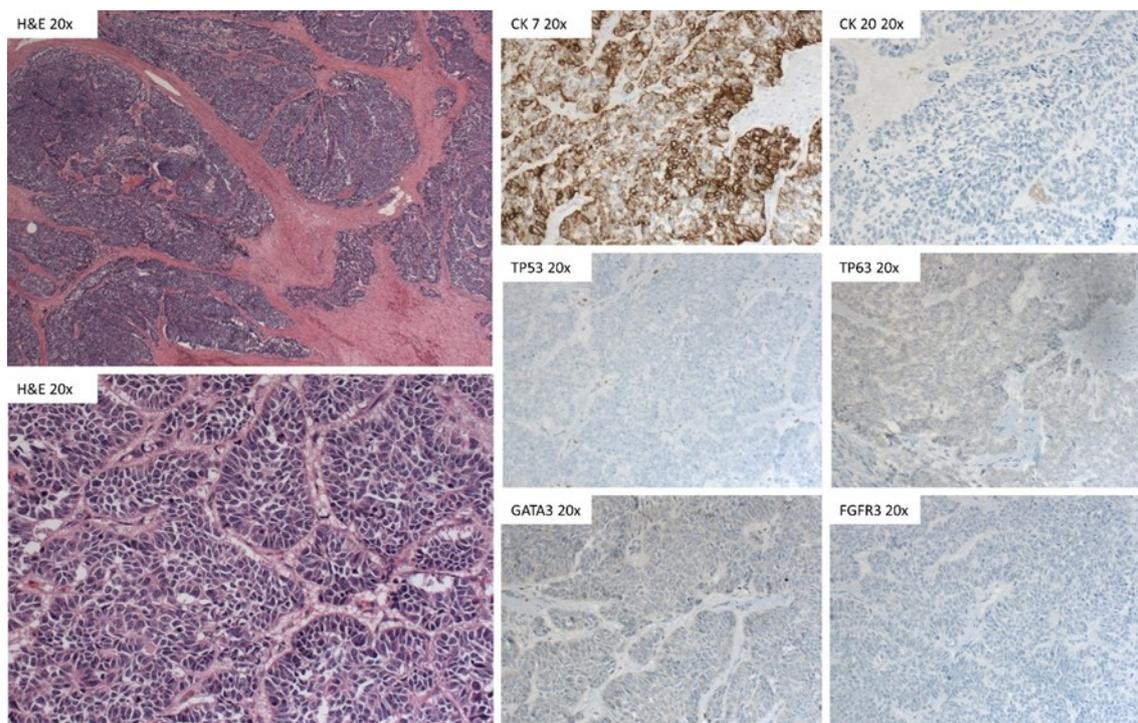


Abbildung 25 Originaltumor BC#154 (m) Immunhistochemie

BC#154 (m)	Expression	+	++	+++	H-score
CK 7	Zellmembran, Zytopsol	10%	20%	70%	260
CK 20	nicht exprimiert	0%	0%	0%	0
TP53	nicht exprimiert	0%	0%	0%	0
TP63	nicht exprimiert	0%	0%	0%	0
GATA3	nicht exprimiert	0%	0%	0%	0
FGFR3	nicht exprimiert	0%	0%	0%	0

Tabelle 13 Histoscore Originaltumor BC#154 (m)

Der Originaltumor BC#154 (m) exprimiert starkt CK7 als einzigen der ausgewählten Marker. Alle anderen Marker konnten immunhistochemisch nicht nachgewiesen werden (Abb. 25, Tab. 13).

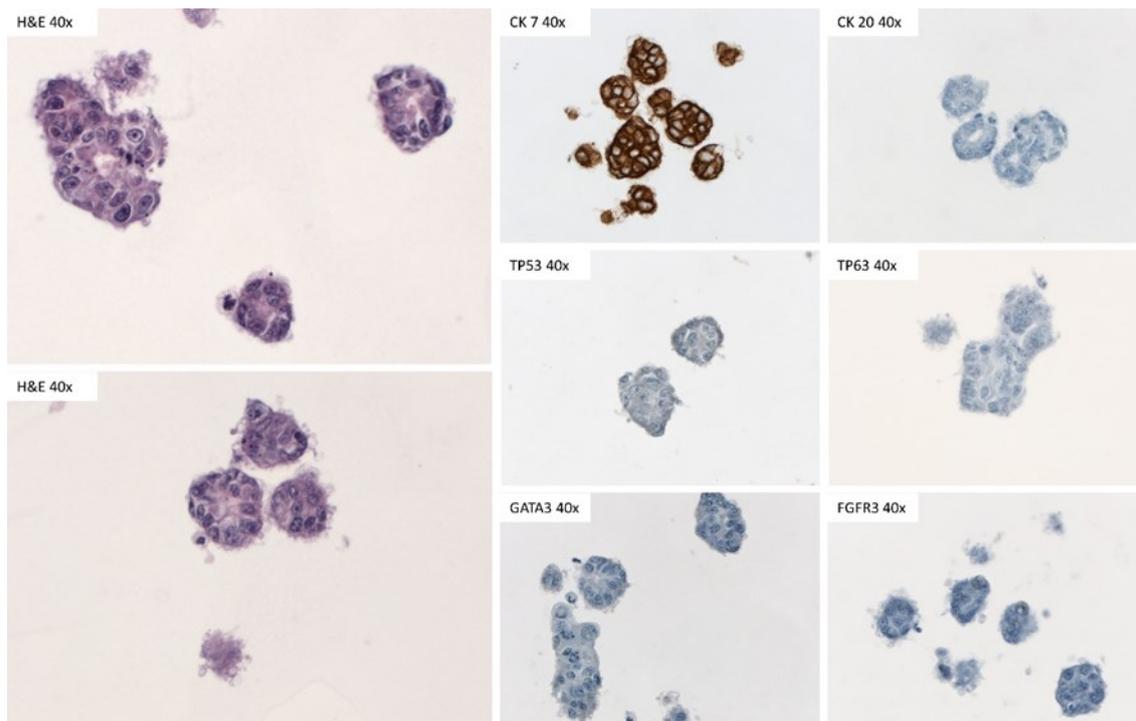


Abbildung 26 Organoid BCO#154 (m) Immunhistochemie

BCO#154 (m)	Expression	+	++	+++	H-score
5.P					
CK 7	stark Zellmembran, Zytosol	0%	0%	100%	300
CK 20	nicht exprimiert	0%	0%	0%	0
TP53	nicht exprimiert	0%	0%	0%	0
TP63	nicht exprimiert	0%	0%	0%	0
GATA3	nicht exprimiert	0%	0%	0%	0
FGFR3	nicht exprimiert	0%	0%	0%	0

Tabelle 14 Histoscore Organoid BCO#154 (m) 5.P

Das Organoid BCO# 154 (m) exprimiert CK7 zu 100% stark in jeder Zelle. Kein anderer der ausgewählten Marker konnte immunhistochemisch nachgewiesen werden (Abb. 26, Tab. 14).

### 3.2.4 Vergleich Histoscore Originaltumor BC#154 (m) zu BCO#154 (m) 5.P

Im Folgenden werden die jeweiligen Histoscores der Marker von den Originaltumoren BC#154 (m) grafisch denen vom Organoid BCO#154 (m) in der 5. Passage gegenübergestellt

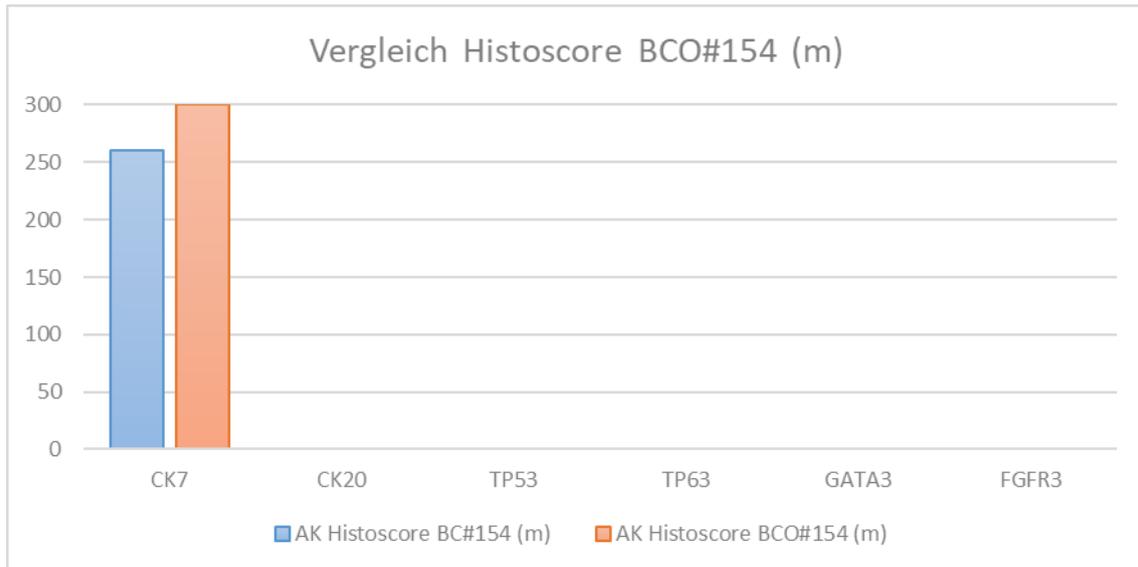


Abbildung 27 Vergleich Histocores Originaltumor BC#154 (m) und Organoid BCO#154 (m) 5.Passage. X-Achse Antikörper, Y-Achse Histocore, blau = BC#154 (m), rot = BCO#154 (m)

BCO#154 (m) 5.P zeigt verglichen mit dem Originaltumor BC#154 (m) generell ein ähnliches Expressionsprofil. Die Expression von CK7 ist im Organoid in jeder Zelle 100% vorhanden und hat sich im Vergleich somit leicht gesteigert, initial wurde CK7 bereits stark exprimiert. Alle anderen ausgewählten Marker wurden in keiner der beiden Proben exprimiert (Abb. 27). Somit stimmte das Expressionsprofil von BCO#154 (m) in der 5. Passage zu 98% mit dem Originaltumor BC#154 (m) überein.

### 3.2.5 Zellkultur BCO#154 (b)

Die benigne Probe enthielt bei der Aufarbeitung im Vergleich mit Probe (m) trotz selbem Gewicht mit 70 Zellen in der Neubauer-Zählkammer nur ein Zehntel der Zellen bei Auszählung. Diese waren zu Beginn auch weitestgehend vereinzelt und verteilt. Die 0. Passage wurde 20 Tage inkubiert. In dieser Zeit bildeten sich zwar nur an wenigen Stellen Sphäroide, diese dafür bis zu 200 µm im Durchmesser (Abb.28).

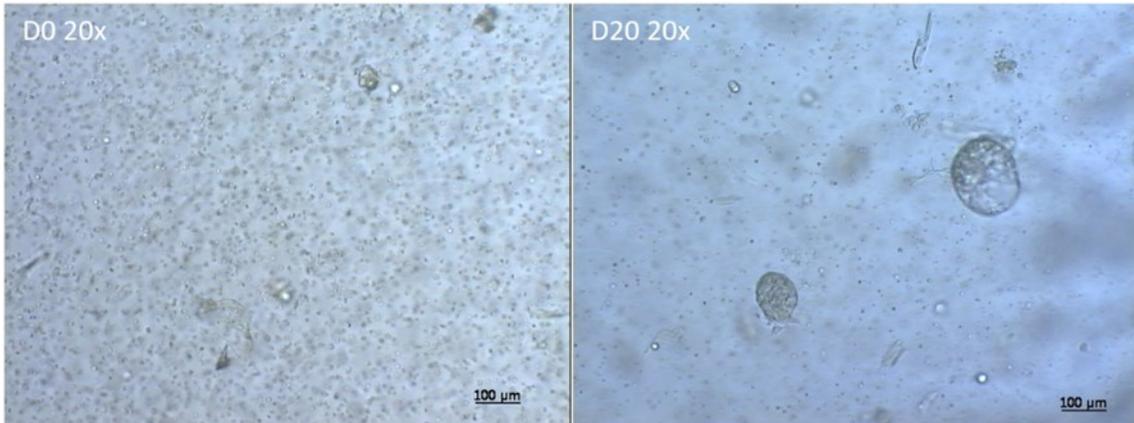


Abbildung 28 Organoid BCO#154 (b) 0. Passage D 0 und D 20

Bei der ersten Passagierung ließen sich diese Aggregate nur schlecht vereinzeln und blieben bis zu 100 µm groß. In den darauffolgenden 17 Tagen Inkubation vergrößerten sich diese auf bis zu 400 µm. Sie wirkten kompakt, ihre äußere Hülle unregelmäßig und teilweise mit tieferen Furchen (Abb. 29).

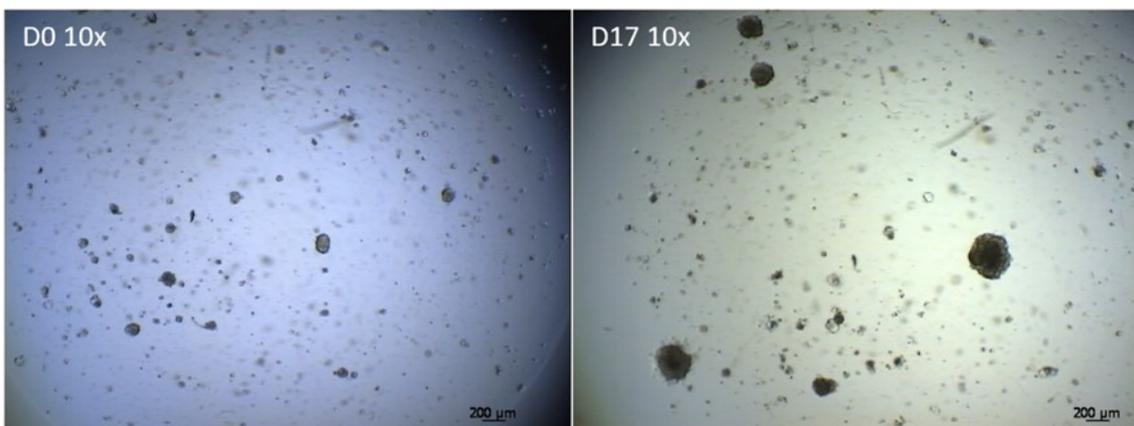


Abbildung 29 Organoid BCO#154 (b) 1. Passage D 0 und D 17

In den folgenden Passagen ließen diese sich sehr gut vereinzeln und es entstand dasselbe zeldichte Bild einer Zellkultur vergleichbar mit BCO#154 (m) und BCO#140 in späteren Passagen. Die Größe der Organoide ging nicht über 100 µm hinaus und es wurde mindestens 1 zu 6 verdünnt, um genug Platz zu gewährleisten (Abb. 30).

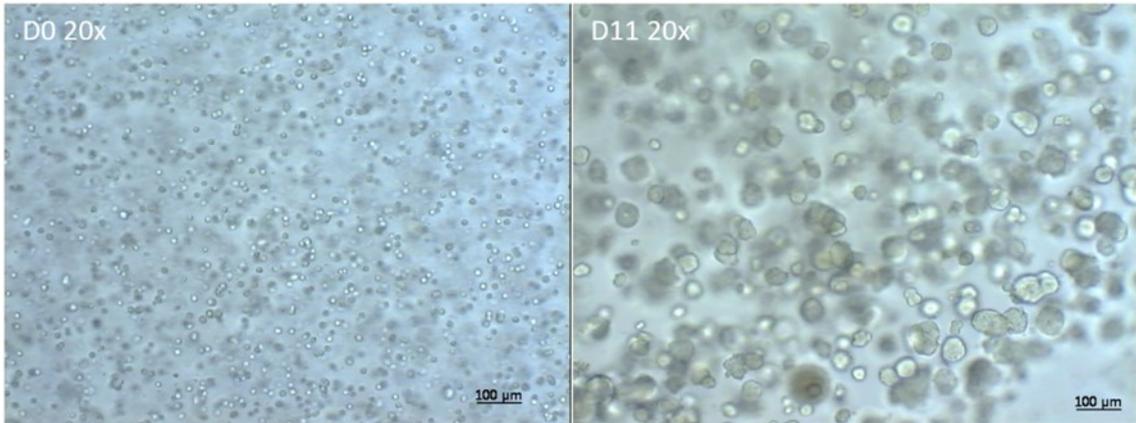


Abbildung 30 Organoid BCO#154 (b) 5. Passage D 0 und D 11

Diese Zellkultur wurde von mir bis zur 7. Passage betreut.

### 3.2.6 Immunhistochemische Färbungen und Vergleich mit Originaltumor

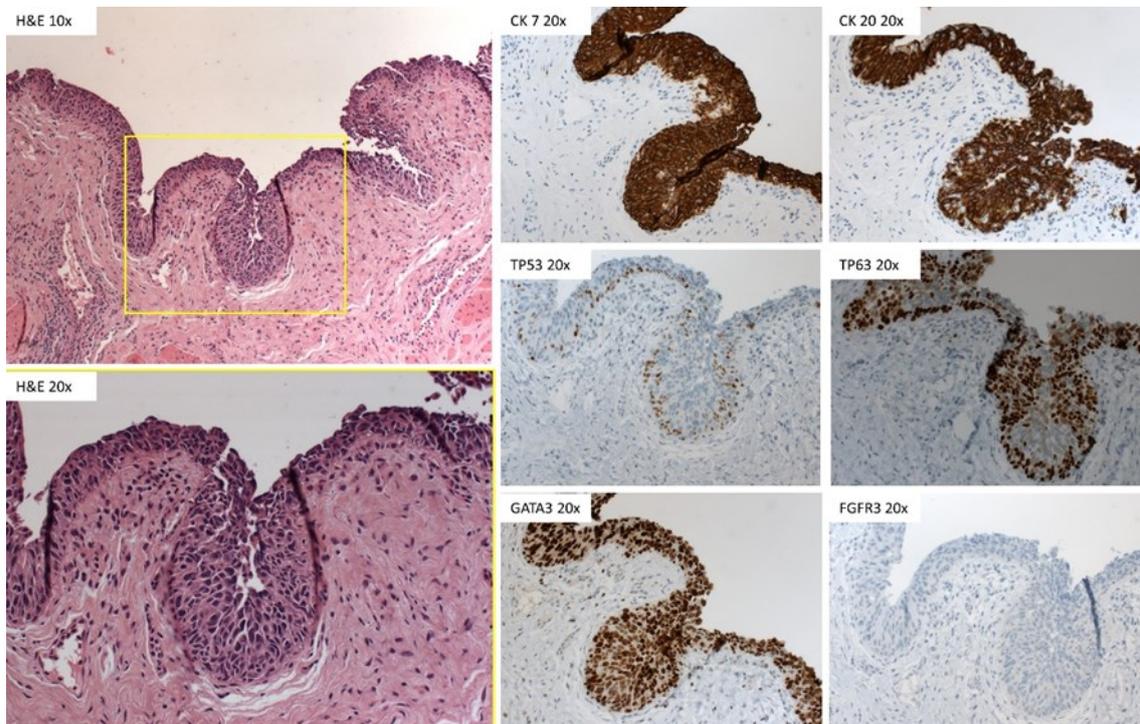


Abbildung 31 Originaltumor BC#154 (b) Immunhistochemie

BC#154 (b)	Expression	+	++	+++	H-score
CK 7	Zellmembran, Zytoplasma	0%	5%	95%	295
CK 20	Zellmembran, Zytoplasma	0%	10%	90%	290
TP53	Zellkern, basal	0%	15%	15%	75
TP63	Zellkern	5%	20%	30%	135
GATA3	Zellkern	5%	25%	70%	265
FGFR3	nicht exprimiert	0%	0%	0%	0

Tabelle 15 Histoscore Originaltumor BC#154 (b)

Die Originalprobe des Tumors BC#154 (b) exprimiert stark die Zytokeratine 7 und 20 sowie GATA3. Der Transkriptionsfaktor TP53 wird eher schwach, TP63 moderat exprimiert. FGFR3 konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 31, Tab. 15).

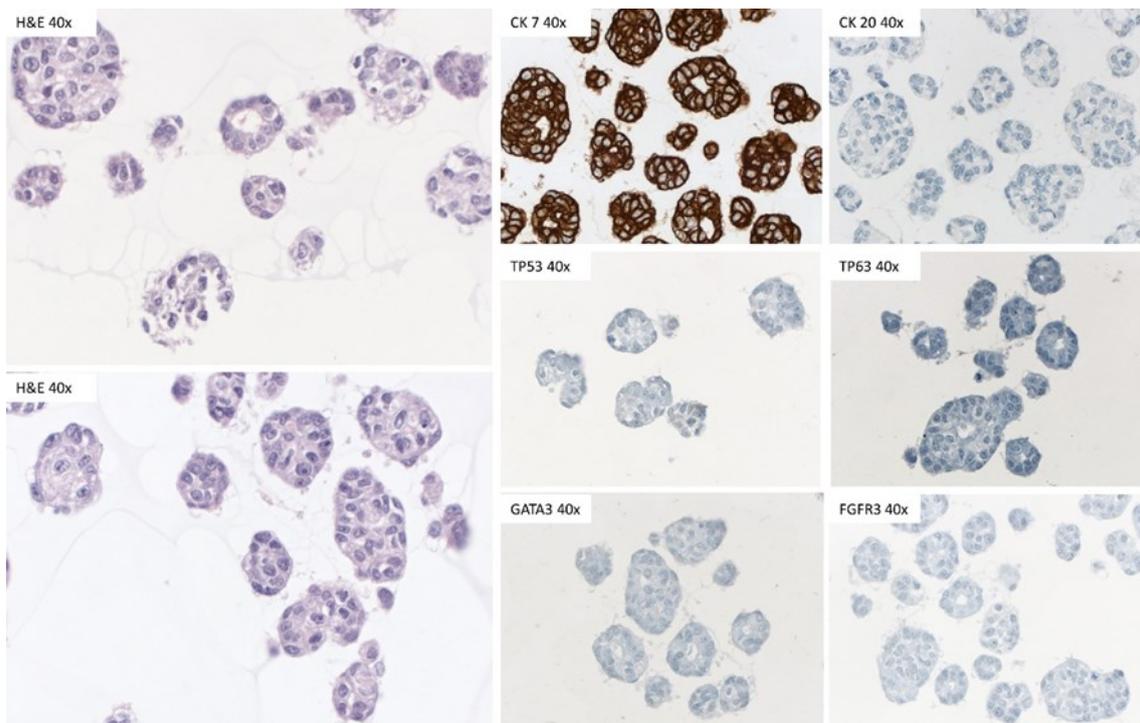


Abbildung 32 Organoid BCO#154 (b) 5.P Immunhistochemie

BCO#154 (b) Expression	+	++	+++	H-score	
5.P					
CK 7	stark Zellmembran, Zytosol	0%	0%	100%	300
CK 20	nicht exprimiert	0%	0%	0%	0
TP53	Nicht exprimiert	0%	0%	0%	0
TP63	nicht exprimiert	0%	0%	0%	0
GATA3	nicht exprimiert	0%	0%	0%	0
FGFR3	nicht exprimiert	0%	0%	0%	0

Tabelle 16 Histocore Organoid BCO#154 (b) 5.P

Auch das Organoid BCO#154 (b) in der 5. Passage exprimiert CK7 zu 100% in jeder Zelle. Kein anderer Marker konnte immunhistochemisch nachgewiesen werden (Abb. 32, Tab. 16).

### 3.2.7 Vergleich Histocore Originaltumor BC#154 (b) zu BCO#154 (b) 5.P

Im Folgenden werden die jeweiligen Histocores der Marker von den Originaltumoren BC#154 (b) grafisch denen vom Organoid BCO#154 (b) in der 5. Passage gegenübergestellt.

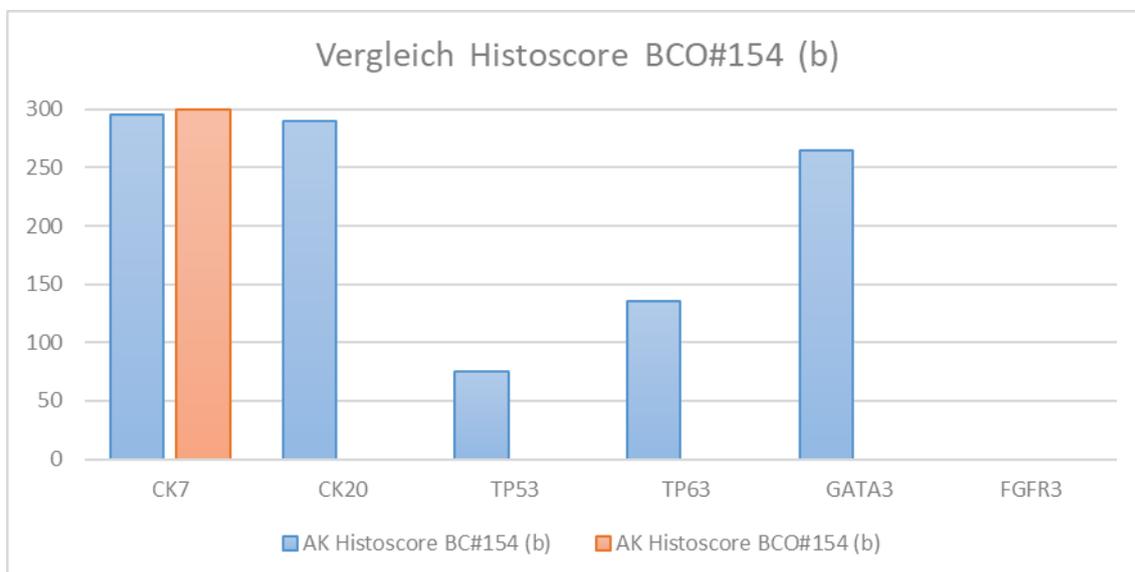


Abbildung 33 Vergleich Histocores Originaltumor BC#154 (b) und Organoid BCO#154 (b) 5.Passage. X-Achse Antikörper, Y-Achse Histocore, blau = BC#154 (b), rot = BCO#154 (b)

Das Organoid BCO#154 (b) in der 5. Passage stimmt mit der Originalprobe des Tumors BC#154 (m) hinsichtlich des Expressionsprofils von CK7, beide exprimieren stark, und FGFR3, keine Expression, überein. Hinsichtlich der

Marker CK20, TP53, TP63 und GATA3 fand bei initialer Expression der Originalprobe ein kompletter Expressionsverlust im Organoid statt (Abb. 33). Damit stimmt BCO#154 (b) in der 5. Passage in seinem Expressionsprofil zu 33% mit der Originalprobe BC#154 (b) überein.

### 3.2.8 Immunfluoreszenzfärbungen

Von der Probe BCO#154 (m) wurde in der Zeit der Kultivierung in den Passagen 0, 2, und 4 Chamberslides angefertigt und mittels Immunfluoreszenzfärbung auf das Vorhandensein von spezifischen Proteinstrukturen untersucht. Für BCO#154 (m) wurden aus den Passagen 3 und 5, für BCO#154 (b) aus der Passage 5 Paraffinschnitte für die Immunfluoreszenzuntersuchung angefertigt (Abb. 34-46).

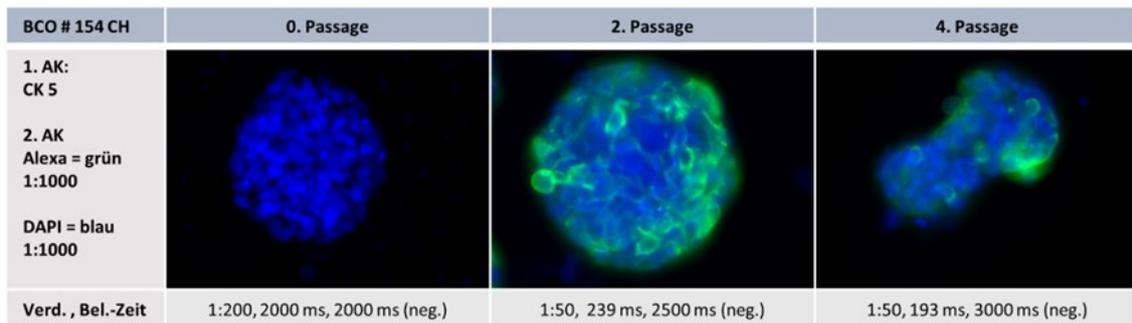


Abbildung 34 IFL-Färbung BCO#154 (m), Chamberslide, CK5

Zytokeratin 5 konnte in der IFL auf Chamberslides erst nach Verringerung der Verdünnung von 1:200 auf 1:50 detektiert werden. In Passage 2 und 4 scheint die Expressionshäufigkeit konstant, das Signal befindet sich zytosolisch in einem Großteil der Zellen (Abb. 34).

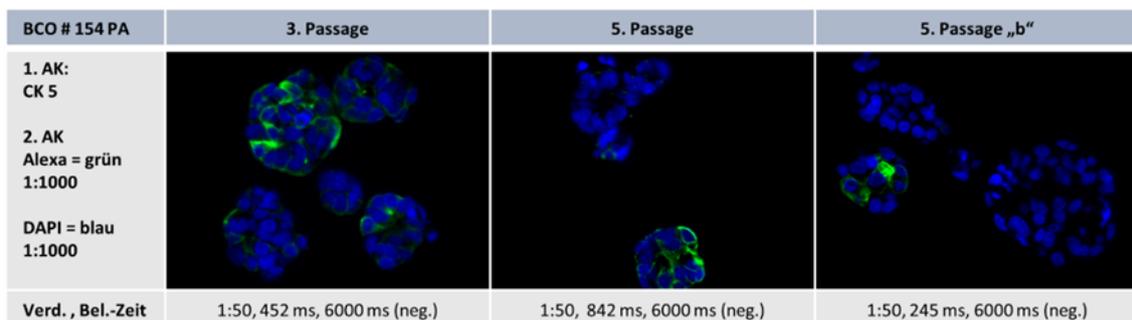


Abbildung 35 IFL-Färbung BCO#154 (m) + (b), Paraffinschnitt 3 µm, CK5

Auf Paraffinschnitten scheint die Expressionshäufigkeit von CK5 bei der Probe (m) über die Zeit konstant. Das Signal ist zytosolisch, bei beiden Proben ist es

in der 5. Passage nicht bei jedem Organoid vorhanden, wenn dann scheint es aber einen Großteil der Zellen eines Organoides zu betreffen (Abb. 35).

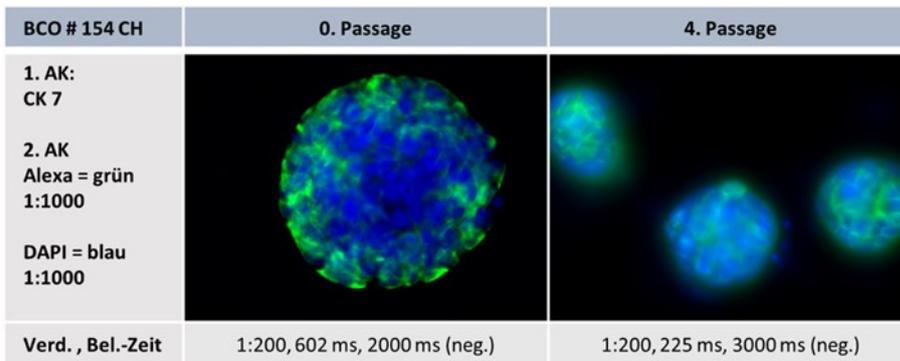


Abbildung 36 IFL-Färbung BCO#154 (m), Chamberslide, CK7

Die Expressionshäufigkeit von CK7 scheint zeitlich konstant, das Signal ist ubiquitär zytosolisch (Abb. 36).

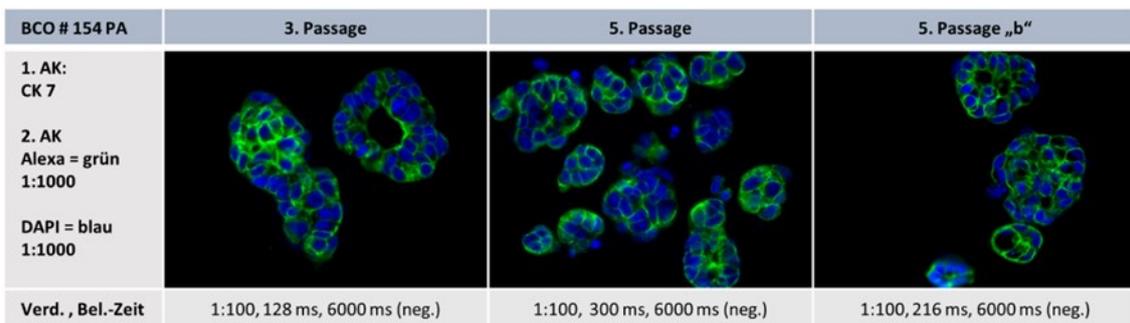


Abbildung 37 IFL-Färbung BCO#154 (m) + (b), Paraffinschnitt 3 µm, CK7

Die Expressionshäufigkeit von CK7 auf Paraffinschnitten ist zeitlich konstant und für die Proben (m) und (b) in der 5. Passage weitestgehend gleich. Das Signal ist zytosolisch in jeder Zelle vorhanden (Abb. 37).

BCO # 154 PA	3. Passage	5. Passage	5. Passage „b“
1. AK: CK 20			
2. AK Cy3 = rot 1:1000			
DAPI = blau 1:1000			
Verd., Bel.-Zeit	1:50, 3552 ms, 6000 ms (neg.)	1:50, 2349 ms, 6000 ms (neg.)	1:50, 6000 ms, 6000 ms (neg.)

Abbildung 38 IFL-Färbung BCO#154 (m) + (b), Paraffinschnitt 3  $\mu$ m, CK20

Zytokeratin 20 konnte auf Paraffinschnitten lediglich bei der Probe (m) leicht zytosolisch nachgewiesen werden, nachdem es initial nicht vorhanden war. Die Probe (b) zeigt keine Expression (Abb. 38).

BCO # 154 CH	0. Passage	2. Passage	4. Passage
1. AK: GATA 3			
2. AK Alexa = grün 1:1000			
DAPI = blau 1:1000			
Verd., Bel.-Zeit	1:200, 2000 ms, 2000 ms (neg.)	1:50, 780 ms, 2500 ms (neg.)	1:50, 383 ms, 3000 ms (neg.)

Abbildung 39 IFL-Färbung BCO#154 (m), Chamberslide, GATA 3

GATA3 konnte in der IFL auf Chamberslides erst nach Verringerung der Verdünnung von 1:200 auf 1:50 detektiert werden. In Passage 2 und 4 scheint die Expressionshäufigkeit konstant, das Signal befindet sich ubiquitär zytosolisch mit leichter nukleärer Komponente (Abb. 39).

BCO # 154 PA	3. Passage	5. Passage	5. Passage „b“
1. AK: GATA 3			
2. AK Alexa = grün 1:1000			
DAPI = blau 1:1000			
Verd., Bel.-Zeit	1:50, 567 ms, 6000 ms (neg.)	1:50, 1147 ms, 6000 ms (neg.)	1:50, 2742 ms, 6000 ms (neg.)

Abbildung 40 IFL-Färbung BCO#154 (m) + (b), Paraffinschnitt 3  $\mu$ m, GATA 3

Die Expressionshäufigkeit von GATA3 auf Paraffinschnitten ist zeitlich konstant und für die Proben (m) und (b) in der 5. Passage weitestgehend gleich. Das Signal ist weitestgehend zytosolisch in jeder Zelle vorhanden (Abb. 40).

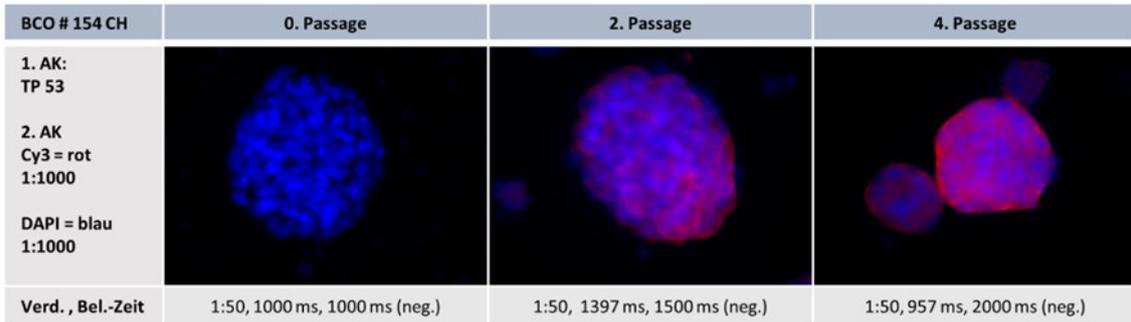


Abbildung 41 IFL-Färbung BCO#154 (m), Chamberslide, TP53

Die Expressionshäufigkeit von TP53 nimmt über die Zeit zu. Initial nicht vorhanden ist das Signal später ubiquitär zytosolisch detektierbar (Abb. 41).

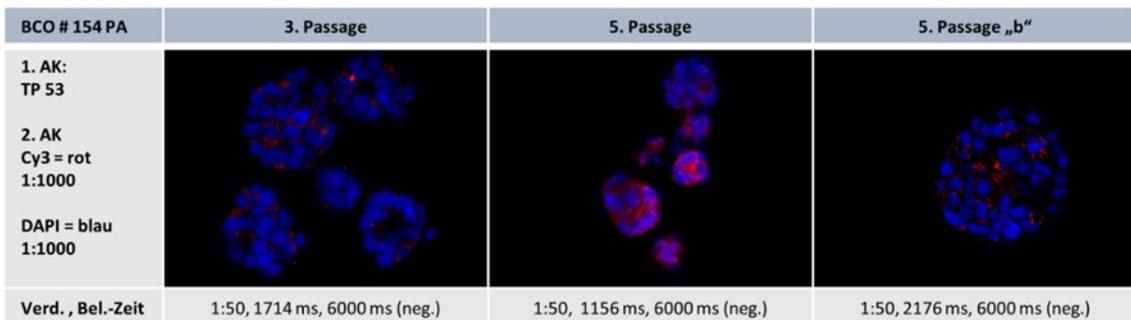


Abbildung 42 IFL-Färbung BCO#154 (m) + (b), Paraffinschnitt 3 µm, TP53

Die Expressionshäufigkeit von TP53 auf Paraffinschnitt scheint sich für die Probe (m) von der 3. auf die 5. Passage leicht zu steigern. Das Signal ist bei beiden Proben zytosolisch in einem Großteil der Zellen nachweisbar (Abb. 42).

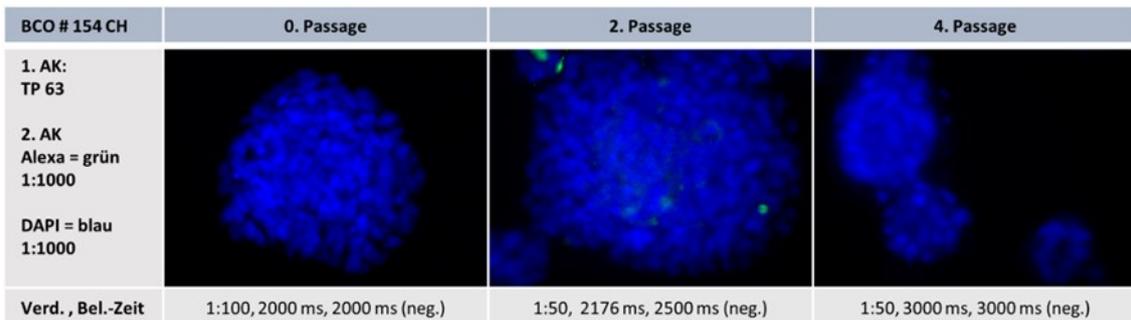


Abbildung 43 IFL-Färbung BCO#154 (m), Chamberslide, TP63

Die Expressionshäufigkeit von TP63 scheint über die Zeit abzunehmen und generell sehr gering ausgeprägt zu sein, nur in der 2. Passage konnte diffus ein leichtes Signal detektiert werden (Abb. 43).

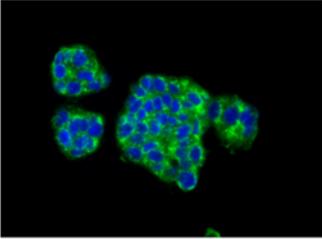
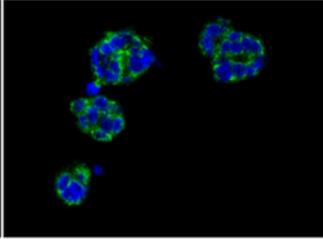
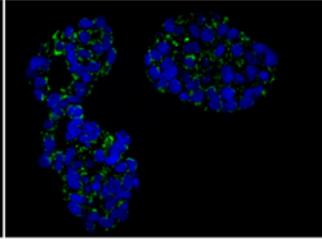
BCO # 154 PA	3. Passage	5. Passage	5. Passage „b“
1. AK: TP 63			
2. AK Alexa = grün 1:1000			
DAPI = blau 1:1000			
Verd. , Bel.-Zeit	1:50, 289 ms, 6000 ms (neg.)	1:50, 774 ms, 6000 ms (neg.)	1:50, 1213 ms, 6000 ms (neg.)

Abbildung 44 IFL-Färbung BCO#154 (m) + (b), Paraffinschnitt 3 µm, TP63

Die Expressionshäufigkeit von TP63 scheint für die Probe (m) von der 3. auf die 5. Passage konstant. Das Signal ist bei beiden Proben (m) + (b) zytosolisch in einem Großteil der Zellen nachweisbar, scheint bei (m) jedoch intensiver (Abb. 44).

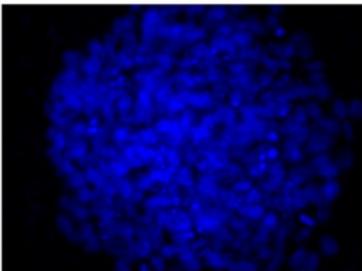
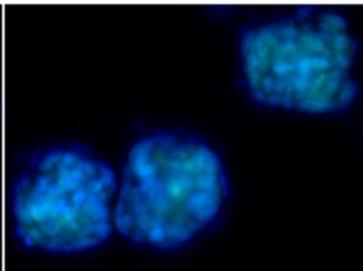
BCO # 154 CH	0. Passage	4. Passage
1. AK: FGFR 3		
2. AK Alexa = grün 1:1000		
DAPI = blau 1:1000		
Verd. , Bel.-Zeit	1:100, 2000 ms, 2000 ms (neg.)	1:50, 1560 ms, 3000 ms (neg.)

Abbildung 45 FL-Färbung BCO#154 (m), Chamberslide, FGFR 3

Die Expression von FGFR3 konnte initial nicht nachgewiesen werden, erst nach Verringerung der Verdünnung des Primärantikörpers um den Faktor 2 konnte im Großteil der Zellen nukleär ein Signal detektiert werden (Abb. 45).

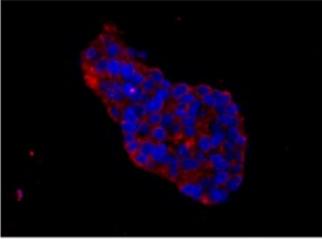
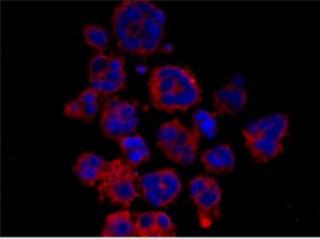
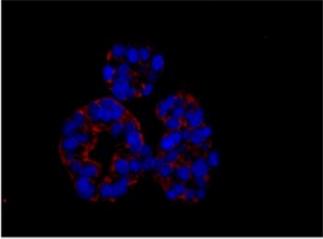
BCO # 154 PA	3. Passage	5. Passage	5. Passage „b“
1. AK: FGFR 3			
2. AK Cy3 = rot 1:1000			
DAPI = blau 1:1000			
Verd., Bel.-Zeit	1:50, 1076 ms, 6000 ms (neg.)	1:50, 896 ms, 6000 ms (neg.)	1:50, 2933 ms, 6000 ms (neg.)

Abbildung 46 IFL-Färbung BCO#154 (m) + (b), Paraffinschnitt 3 µm, FGFR 3

Die Expressionshäufigkeit von FGFR3 auf Paraffinschnitt ist für die Probe (m) zeitlich konstant etwas stärker verglichen mit Probe (b). Das Signal ist ubiquitär zytosolisch (Abb. 46).

### **3.2.9 Zusammenfassung des Expressionsverhaltens von BCO#154 (m) und (b) über 5 Passagen in Immunfluoreszenz und Immunhistochemie**

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Organoide der Proben (m) und (b) in der IHC-Untersuchung ein übereinstimmendes Expressionsverhalten an den Tag legten. Dies bestärkt die Hypothese, dass es sich bei der Probe (b), welche intraoperativ als benigne eingestuft wurde, ebenso um neoplastische Zellen und möglicherweise derselben Tumorentität wie die Probe (m) handelt.

Hinsichtlich der Ursprungsgewebeproben stimmen sie mit den untersuchten Stellen der Probe (m) überein, welche in der IHC auch ausschließlich eine Expression von CK7 bei den untersuchten Markern zeigte. Das Ursprungsgewebe der Probe (b) hingegen zeigt in der IHC eine vielseitige Expression von basalen Markern wie TP63 und TP53 neben luminalen Markern wie GATA3 und CK20 in einem epithelial anmutenden Zellverband, welcher aber bereits neoplastische Eigenschaften wie aufgehobene Kern-Zell-Relation und Polaritätsverlust zeigt. Würde dies als Ausgangsgewebe der Organoide angesehen werden, so bestünde bis auf CK7 und FGFR3 ein vollkommener Verlust der Markerausdrucks von TP53, TP63, GATA3 und CK20, somit also eher ohne ersichtliche Tendenz in luminale oder basale Richtung.

In der IFL-Untersuchung konnte ein glaubhaftes Expressionsverhalten von CK7, CK20 und CK5 dargestellt werden. Letzteres deutet auf das Vorhandensein von

basal orientierten Zellen hin. Bei den restlichen Markern GATA3 und TP53 sowie TP63 deckten sich die Ergebnisse der IFL nicht mit denen der IHC. Auch hier wäre kein eindeutiges Überwiegen eines bestimmten Markertyps hinsichtlich basaler oder luminaler Selektion möglich.

### 3.3 Vergleich Histocores der Originaltumore BC#140 #1, BC#140 #2, BC#154 (m), BC#154 (b)

Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei den Proben BC#140 und den Varianten (m) und (b) der Probe BC#154 um Gewebe desselben Patienten mit einem Zeitintervall zwischen den Entnahmen von 49 Tagen handelt, ist ein Vergleich dieser Originaltumore untereinander interessant. Daraus kann ein Verlauf der Entwicklung des Tumors hinsichtlich der ausgewählten Marker untersucht werden. Dafür werden die Histocores der jeweiligen Originalproben grafisch gegenübergestellt (Abb. 47).

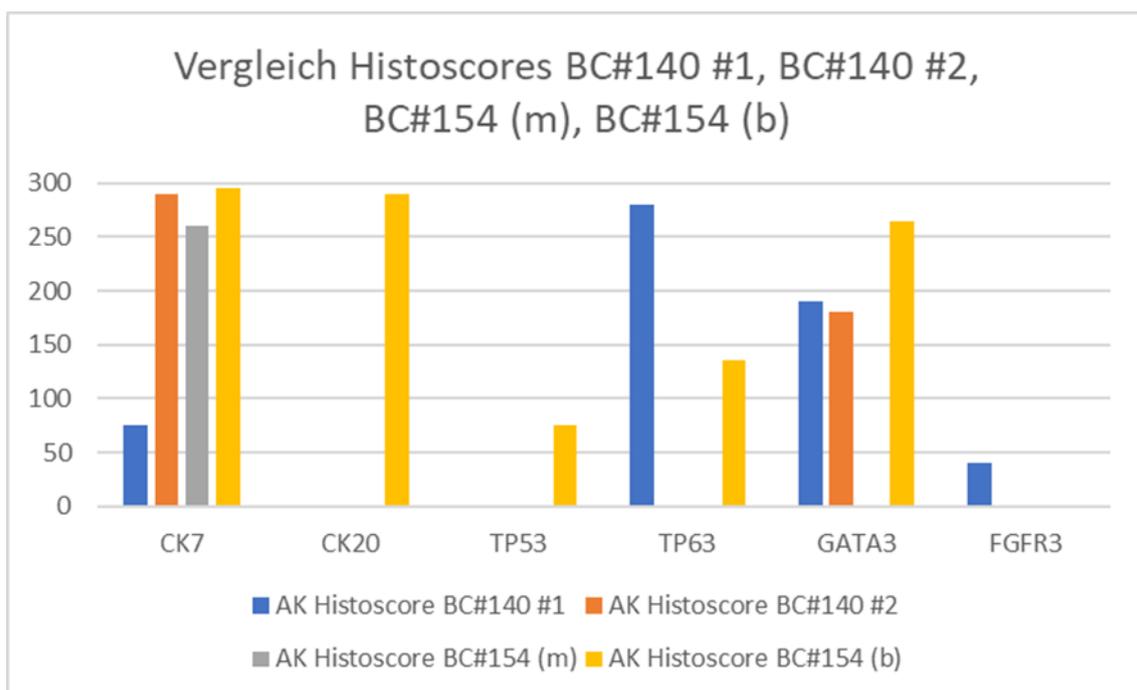


Abbildung 47 Vergleich Histocores Originaltumor BC#140 #1, BC#140 #2, BC#154 (b) und BC#154 (m). X-Achse Antikörper, Y-Achse Histocore, blau = BC#140 #1, rot = BC#140 #2, grau = BC#154 (m), gelb = BC#154 (b)

Die Markerexpression der unterschiedlichen Gewebeproben lassen erkennen, dass sich die Proben BC#140 #2 und BC#154 (m) hinsichtlich ihrer Proteinausstattung am ähnlichsten sind. Nur GATA3 ist initial in der früheren Probe BC#140 #2 nachweisbar, in Probe BC#154 (m) nicht mehr. BC#140 #1

weist im Vergleich zu den anderen Proben eine verminderte Expression von CK7 sowie eine gesteigerte Expression von TP63 und FGFR3 auf. Hinsichtlich GATA3 ähnelt sie sich mit BC#140 #2 und BC#154 (b). BC#154 (b) weicht durch die Expression von CK20 und TP53 von den anderen Proben ab, ähnelt sich aber im Expressionsmuster von CK7 und FGFR3 mit BC#140 #2 und BC#154 (m) und bei GATA3 mit BC#140 #1 und #2 (Abb. 47).

### **3.4 BCO#147**

#### **3.4.1 Pathologie BCO#147**

Die Probe wurde durch eine Nephrektomie der linken Niere bei Verdacht auf metastasiertes Urothelkarzinom im Nierenkelchsystem entnommen. Mikroskopisch zeigt sich ein 5 cm großes, mikropapilläres Urothelkarzinom mit CIS-Komponente, Infiltration des perirenenalen Fettgewebes, der Nebenniere und angrenzender Lymphknoten, sowie ausgedehnter Perineuralscheideninfiltration, Lymphangiosis carcinomatosa und Hämangiosis carcinomatosa. Grading: G2, TNM: pT4, pN2 (3/3 LK), L1, V1, Pn1.

#### **3.4.2 Zellkultur BCO#147**

Die Probe mit dem Namen BCO#147 wurde im Januar 2021 durch eine Nephroureterektomie im Uniklinikum Tübingen entnommen, am selben Tag im Labor nach Protokoll aufgearbeitet und in Kultur genommen. Die initiale Zellkultur der 0. Passage war verhältnismäßig klar, es waren einzelne Zellen und Zellbestandteile zu sehen, und es konnten vereinzelt Zellaggregate von ca. 50µm ausgemacht werden. Über diese Passage entwickelte sich das Wachstum erfolgsversprechend. Über die Tage 3 bis 5 formierten sich größtenteils aus den Zellaggregaten in jedem Well mehrere Sphäroide mit ca. 100µm Durchmesser. Diese entwickelten eine nach außen glatt abgegrenzte Oberfläche. An Tag 10 verdeutlichten sich diese Strukturen und wurden bis zu 200µm groß. Auffällig ist bereits hier, dass die Sphäroide teilweise in ihrem Inneren weniger dicht und eher inhomogen wirken als andere Proben dieser Größe (Abb. 48).

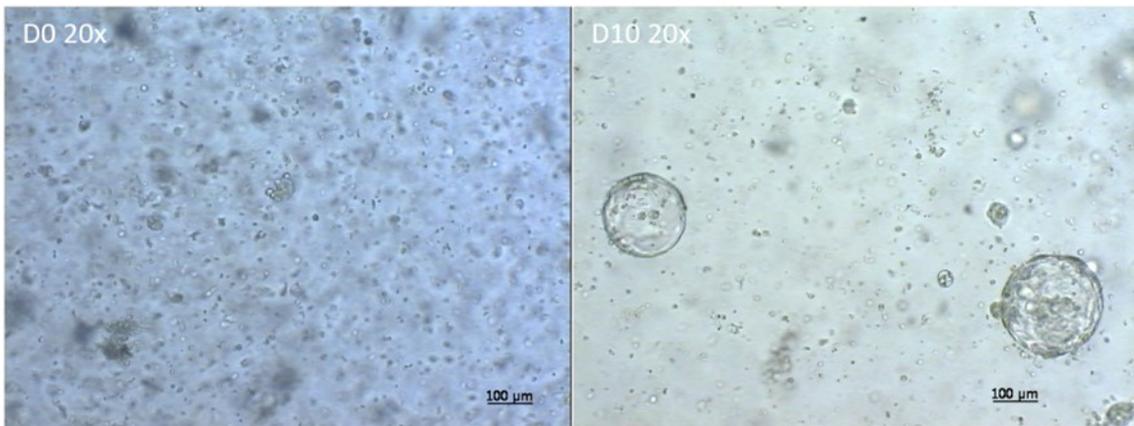


Abbildung 48 BCO#147 0.P D0 und D10

In der ersten Passagierung ließen sich die Zellaggregate größtenteils nicht wie geplant vereinzeln. Es blieben mehrere, bis zu 100 µm große Aggregate sichtbar, wobei die Zellkultur insgesamt sauberer wurde, was die Zell- und Gewebetrümmer im Hintergrund

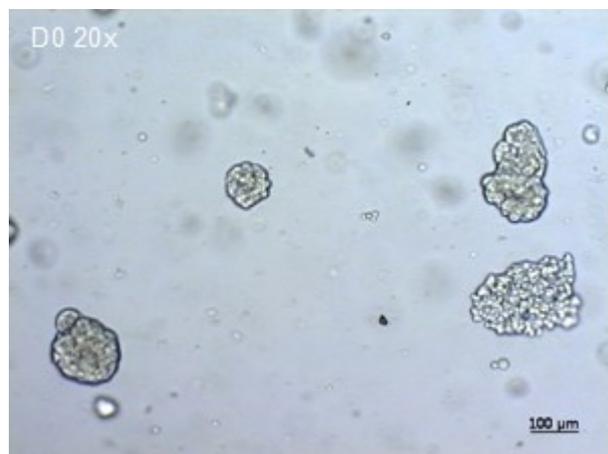


Abbildung 49 BCO#147 1.P D0 20x

betrifft. Dennoch sind auch vereinzelte Zellen präsent. Die

Aggregate wirken nun teilweise wieder sehr dicht, ohne die für diese Sphäroide typische glatte Außenhaut. Diese verändern sich größtenteils über die nächsten 6 Tage kaum (Abb. 49). Allerdings startet an manchen Stellen, teils aus Aggregaten, teils aus einzelnen Zellen, über den Zeitraum einer Woche ein starkes Wachstum von einzelnen Sphäroiden. Diese erreichen an Tag 6 eine Größe von 500µm. Sie bilden eine glatte Begrenzung nach außen durch eine scheinbar abgrenzbare Schicht an Zellen aus. Zum Inneren hin scheinen sie wieder weniger dicht, im Bild kann bei Fokus auf die Außenhaut keine Zelle im Innern scharf gestellt werden. Der Verdacht liegt nahe, dass diese ballonartigen Sphäroide im Innern hohl sind, oder zumindest wenige Zellen oder Zellkerne enthalten (Abb.50). Die anschließende 2. Passage gestaltet sich sehr ähnlich, allerdings sind an Tag 7 in fast jedem Well einige Sphäroide zu extremer Größe herangewachsen, mit Exemplaren von über 1000µm Durchmesser (Abb. 50).

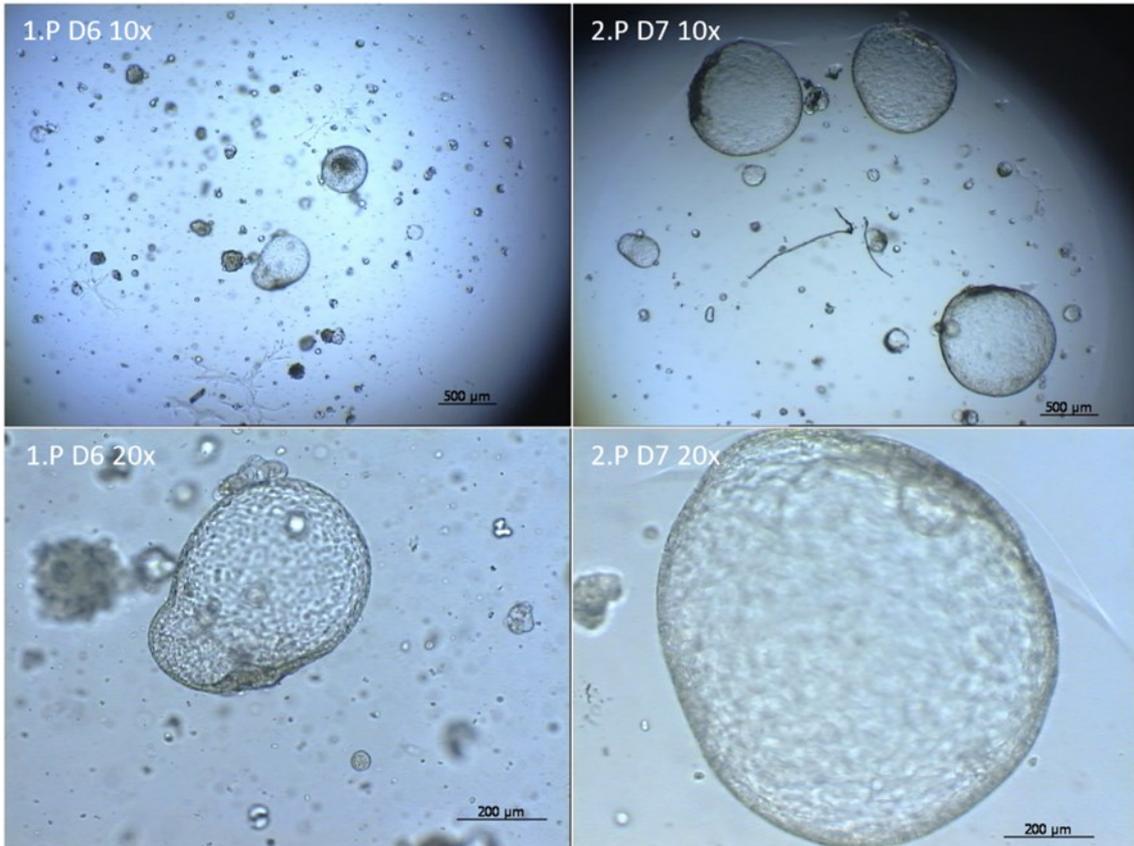


Abbildung 50 BCO#147 1.P D6 und 2.P D7

Dies überschreitet die Diffusionsgrenzen für Nährstoffe in avaskulärem Gewebe bei Weitem, es erhärtet sich der Verdacht, dass die Gebilde nicht durchgängig mit vitalen Zellen gefüllt sind. An der Außengrenze ist wieder eine gewisse Schicht Zellen auszumachen, die zentrale Fläche in der Draufsicht wirkt wie ein Netzwerk aus einschichtigen Zellen (Abb. 50).

Ab Passage 3 konnten die Zellen zunehmend besser vereinzelt werden, die Aggregate wurden besser verteilt und kleiner (ca. 10 Zellen), blieben in ihrer Form aber den vorangegangenen ähnlich. Darauf folgte ein auf die Kultur wesentlich verteilteres Wachstum von Sphäroiden, welche sich zahlenmäßig enorm steigerten. So konnten verglichen mit den vorherigen Passagen, in denen sich ca. 5 große Organoide pro Well bildeten, ihre Zahl auf bis über 200 - 300, in Form und Größe homogene Sphäroide gesteigert werden. Diese waren ca. bis zu 300 µm im Durchmesser, die Kultur war wesentlich dichter (Abb. 51).

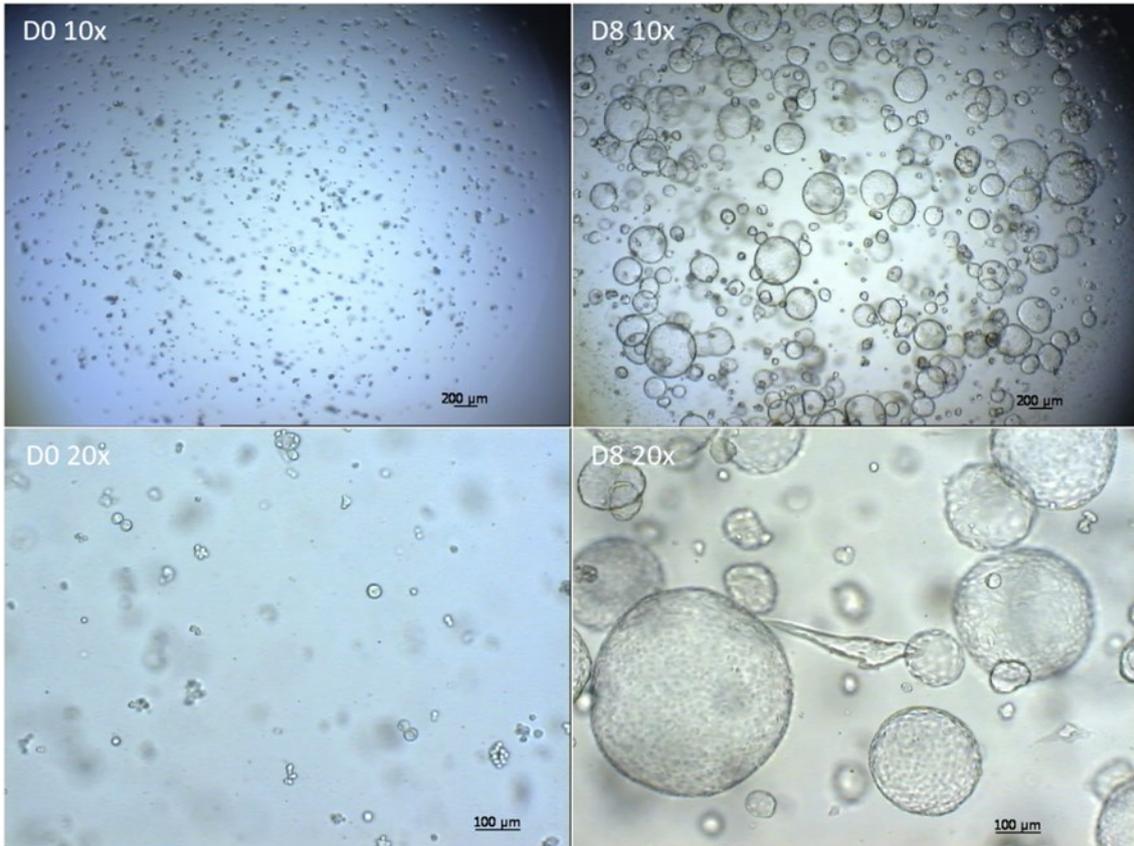


Abbildung 51 BCO#147 3.P D0 und D8

Diese Art des Wachstums setzte sich über die nächsten Passagen fort, die Zellen wurden sehr gut vereinzelt, dementsprechend dicht wurde die Kultur, und entsprechend angepasst kleiner war die Größe der Sphäroide, welche ab der 5. Passage erfolgreich als Organoide bezeichnet werden konnten. Durch das limitierte Wachstum der Kultur auf Grund der Dichte wurde bereits nach 4-5 Tagen gesplittet.

Ab der 8. Passage zeichnete sich ein reduziertes Wachstum in dem Sinne ab, dass zwar alle Zellen gut vereinzelt und verteilt wurden, verglichen mit den vorherigen Passagen abnehmend, nur noch sporadisch Organoide entstanden. Durch die geringere Dichte der Kultur erreichten diese aber teilweise wieder Größen von 500 µm. Dieses Phänomen setzte sich fort, bis pro Passage und Well nur noch sehr wenige, dafür teilweise wieder sehr große Organoide wuchsen, welche sich exzellent vereinzeln ließen (Abb. 52).

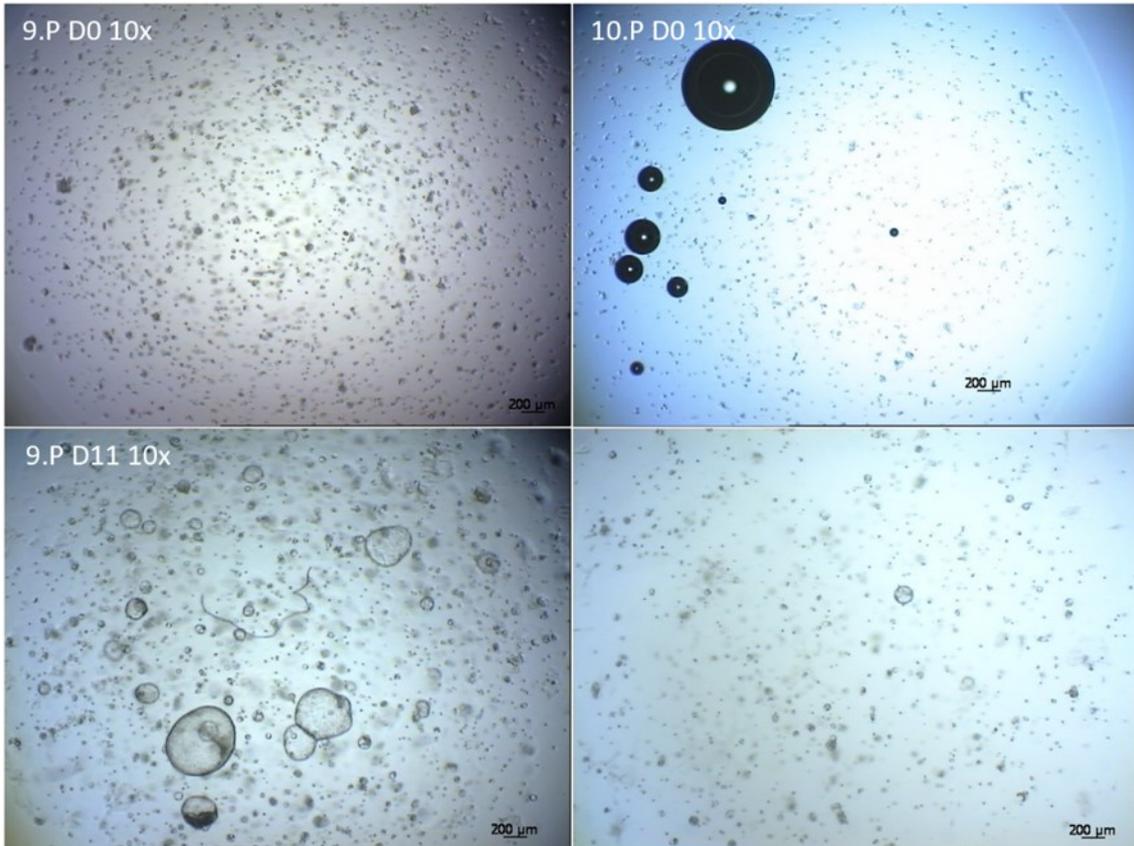


Abbildung 52 BCO#147 9.P D0 und D11 und 10.P D0 und D16

Ab der 10. Passage bildeten sich allerdings kaum noch erwähnenswerte Organoide, die Größe konnte 100 µm nicht überschreiten (Abb. 52). Dies änderte sich auch nach 16 Tagen Inkubation nicht, in der darauffolgenden 11. Passage wurde die Zellkultur nach weiterhin stagnierendem Wachstum von mir als für dieses Projekt nicht mehr nutzbar eingestuft und eingestellt.

### 3.4.3 Immunhistochemische Färbungen und Vergleich mit Originaltumor

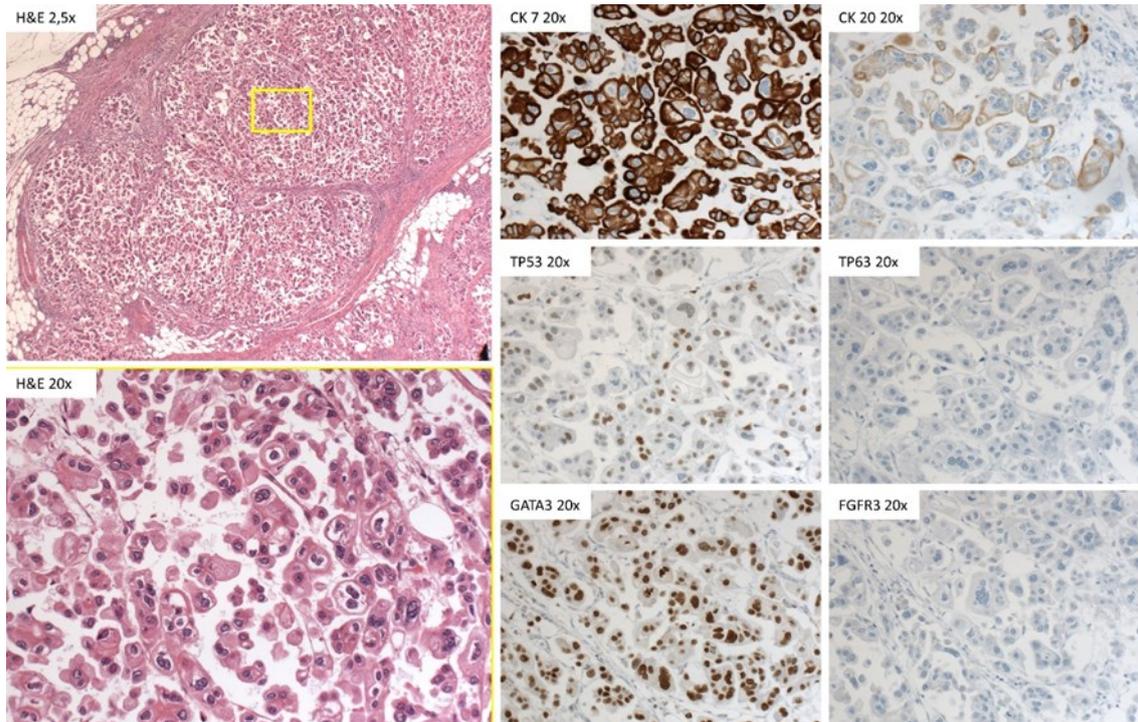


Abbildung 53 Originaltumor BC#147 Immunhistochemie

BC#147	Expression	+	++	+++	H-score
CK 7	stark Zellmembran, Zyosol	0%	0%	95%	285
CK 20	Zelmembran, Zyotosol	5%	30%	5%	80
TP53	Zellkern	30%	25%	20%	140
TP63	nicht exprimiert	0%	0%	0%	0
GATA3	stark Zellkern	10%	20%	70%	260
FGFR3	nicht exprimiert	0%	0%	0%	0

Tabelle 17 Histoscore Originaltumor BC#147

Die Probe des Originaltumors BC#147 exprimiert stark CK7 und GATA3. TP53 konnte mit moderater Intensität und CK20 schwach nachgewiesen werden. Die Marker TP63 und FGFR3 werden nicht exprimiert (Abb. 53, Tab. 17).

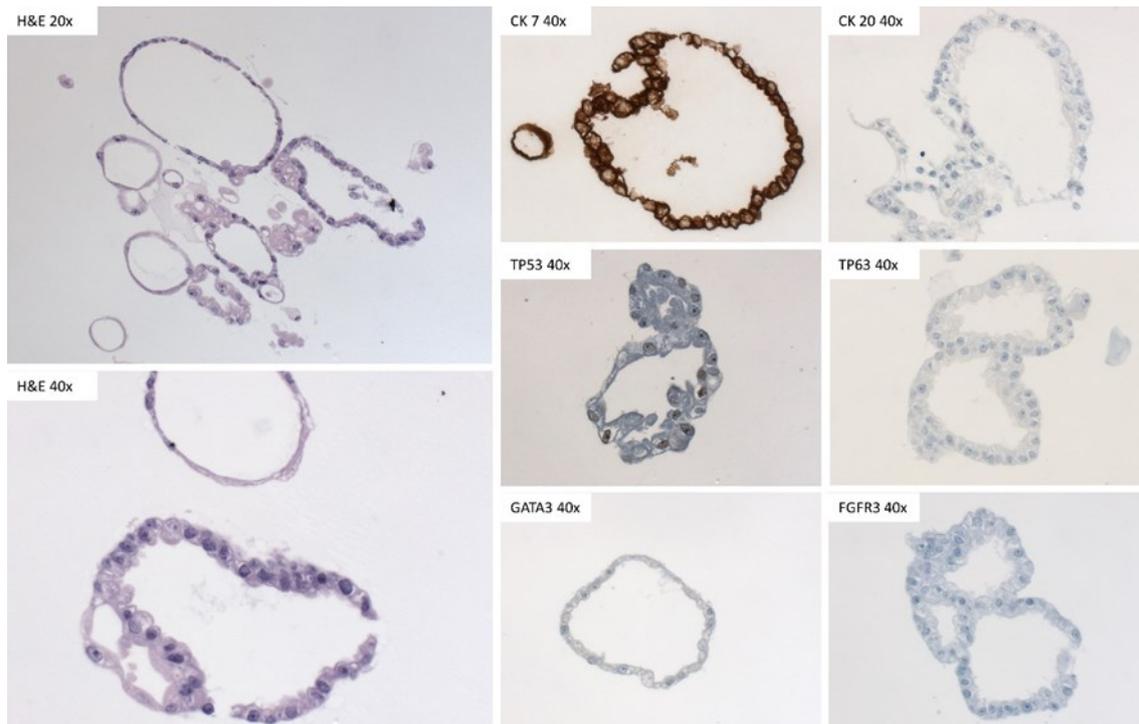


Abbildung 54 Organoid BCO#147 Immunhistochemie

BCO#147 7.P	Expression	+	++	+++	H-score
CK 7	Stark Zellmembran, Zytosol	0%	0%	100%	300
CK 20	nicht exprimiert	0%	0%	0%	0
TP53	Zellkern	25%	10%	0%	45
TP63	nicht exprimiert	0%	0%	0%	0
GATA3	nicht exprimiert	0%	0%	0%	0
FGFR3	nicht exprimiert	0%	0%	0%	0

Tabelle 18 Histoscore Organoid BCO#147

Das Organoid BCO#147 in der 7. Passage exprimiert CK 7 zu 100% in jeder Zelle stark. TP53 wird schwach exprimiert, die anderen Marker konnten immunhistochemisch nicht nachgewiesen werden (Abb. 54, Tab. 18).

#### 3.4.4 Vergleich Histoscore Originaltumor BC#147 zu BCO#147 7.P

Im Folgenden werden die jeweiligen Histoscores der Marker von den Originaltumoren BC#147 grafisch denen vom Organoid BCO#147 in der 7. Passage gegenübergestellt.

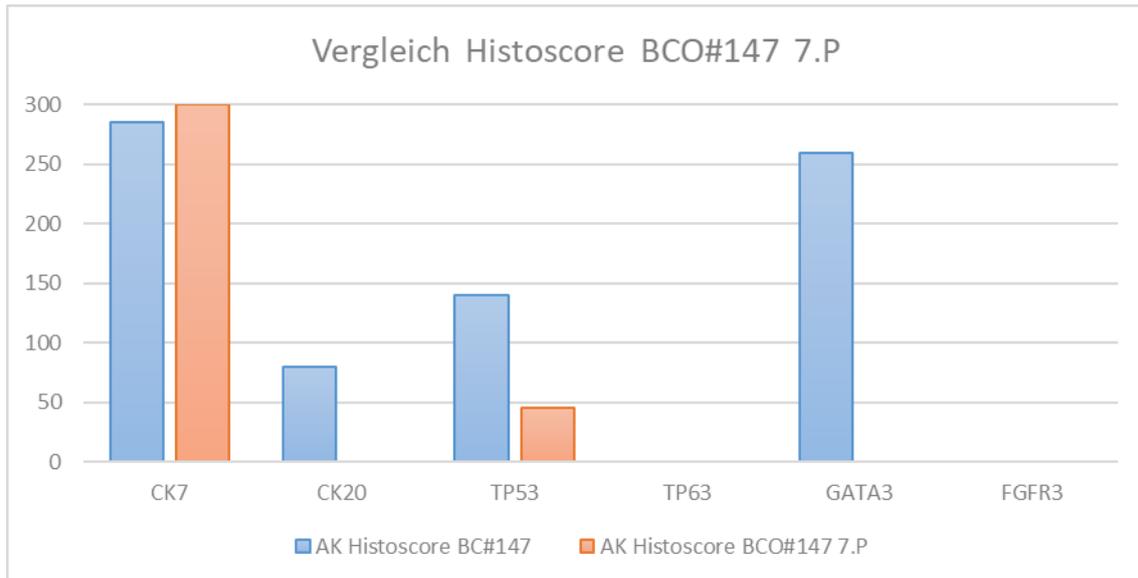


Abbildung 55 Vergleich Histoscores Originaltumor BC#147 und Organoid BCO#147 7.Passage. X-Achse Antikörper, Y-Achse Histoscore, blau = BC#147, rot = BCO#147 7.P

Das Organoid BCO#147 in der 7. Passage stimmt mit der Originalprobe des Tumors BC#147 hinsichtlich des Expressionsprofils von CK7, beide exprimieren stark, TP63 sowie FGFR3, keine Expression, überein. Hinsichtlich der Marker CK20 und GATA3 fand bei initialer Expression der Originalprobe ein kompletter Expressionsverlust im Organoid statt. Der in der Originalprobe moderat exprimierte Marker TP53 wird im Organoid nur noch schwach exprimiert (Abb. 55). Damit stimmt BCO#147 in der 7. Passage in seinem Expressionsprofil zu 55% mit der Originalprobe BC#147 überein.

### 3.4.5 Immunfluoreszenzfärbungen

Von der Probe BCO#147 wurden in der Zeit der Kultivierung in den Passagen 2, 4, und 5 Chamberslides angefertigt und mittels Immunfluoreszenzfärbung auf das Vorhandensein von spezifischen Proteinstrukturen untersucht. Aus den Passagen 2, 5 und 7 wurden Paraffinschnitte für die Immunfluoreszenzuntersuchung angefertigt (Abb. 56-69). Der Vergleich der verschiedenen Passagen untereinander lässt einen Schluss auf die Entwicklung der Zellpopulation über die Zeit und die Veränderlichkeit in der Ausprägung der Zielstrukturen zu. Zudem bestätigt der Vergleich der Färbungen auf Chamberslides und Paraffinschnitten den Verdacht, dass es sich um hohle Organoide handelt. Diese scheinen einschichtig mit zellfreiem Lumen zu sein.

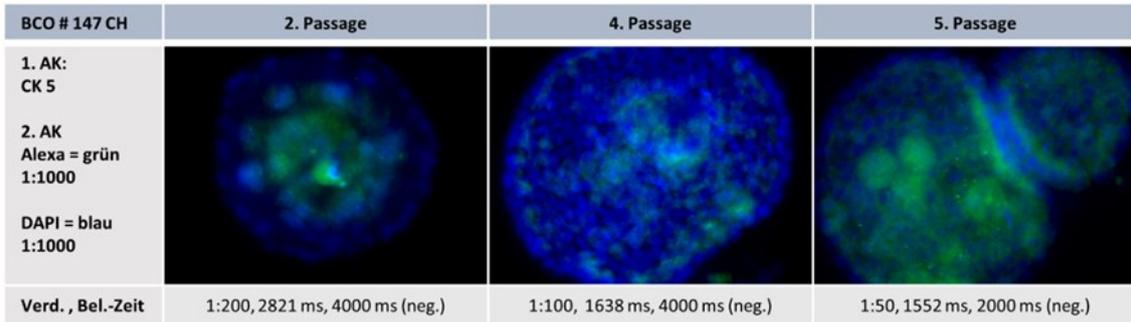


Abbildung 56 IFL-Färbung BCO#147, Chamberslide, CK5

Die Expressionsstärke von CK5 scheint über die Zeit leicht abzunehmen, die Verdünnung des Primärantikörpers wurde je Passage um den Faktor 2 verringert. Das Signal erscheint initial diffus zytosolisch mit leichter nukleärer Komponente, in Passage 5 dann ubiquitär zytosolisch (Abb. 56).

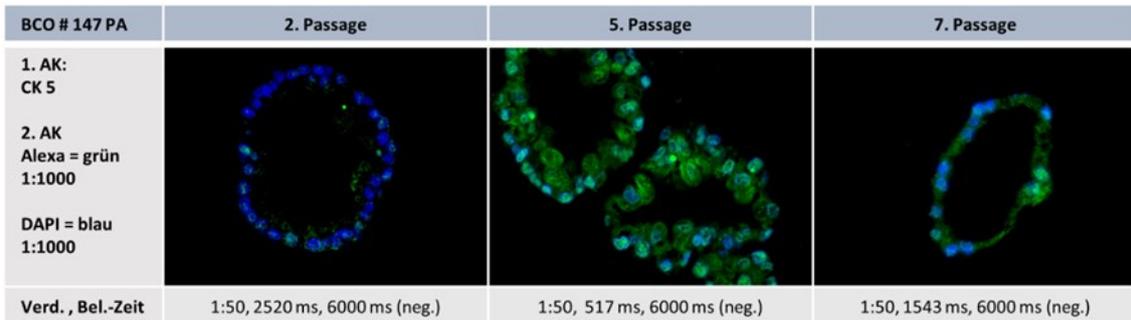


Abbildung 57 IFL-Färbung BCO#147, Paraffinschnitt 3 µm, CK5

Die Expressionshäufigkeit von CK5 im Paraffinschnitt nimmt über die Passagen zu. Das Signal kann initial im Großteil der Zellen schwach zytosolisch und nukleär detektiert werden und wird im Verlauf in jeder Zelle und intensiver (Abb. 57).

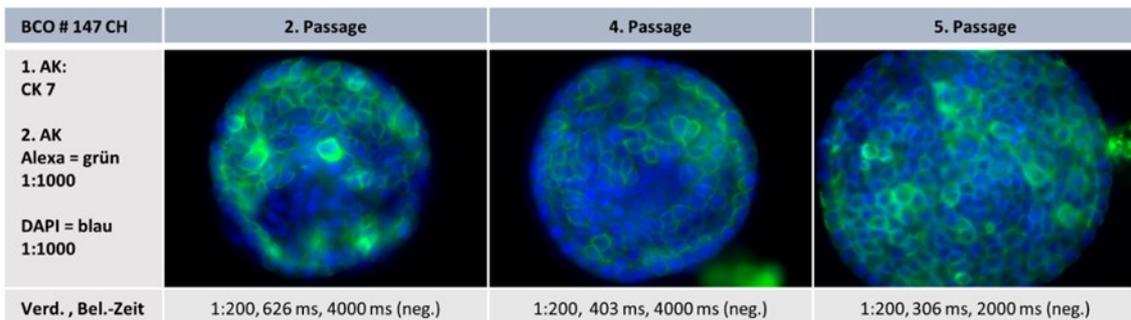


Abbildung 58 IFL-Färbung BCO#147, Chamberslide, CK7

Die Expressionshäufigkeit von CK7 über die Passagen ist konstant, im Großteil der Zellen zytosolisch (Abb. 58).

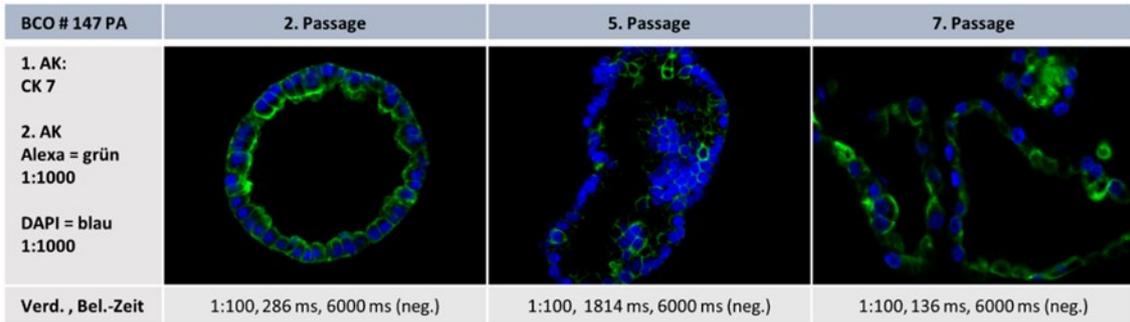


Abbildung 59 IFL-Färbung BCO#147, Paraffinschnitt 3 µm, CK7

Auch im Paraffinschnitt lässt sich die Expressionshäufigkeit von CK7 konstant, ubiquitär zytosolisch nachweisen (Abb. 59).

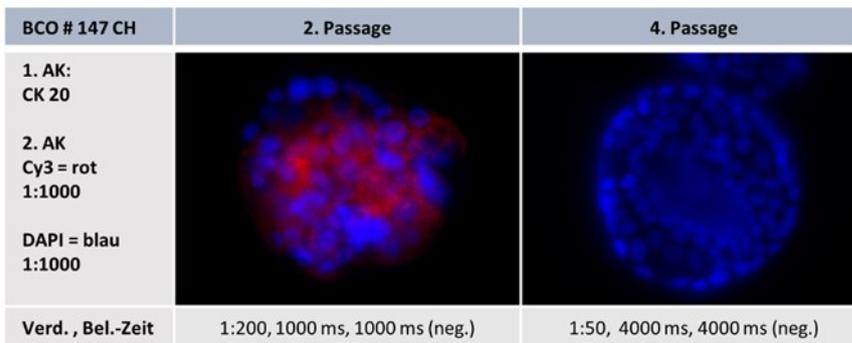


Abbildung 60 IFL-Färbung BCO#147, Chamberslide, CK20

Die Expressionshäufigkeit von CK20 nimmt ab. Initial noch diffus zytosolisch im Großteil der Zellen nachweisbar, ist in der 4. Passage trotz Verringerung der Verdünnung des Primärantikörpers um den Faktor 4 kein Signal nachweisbar (Abb. 60).

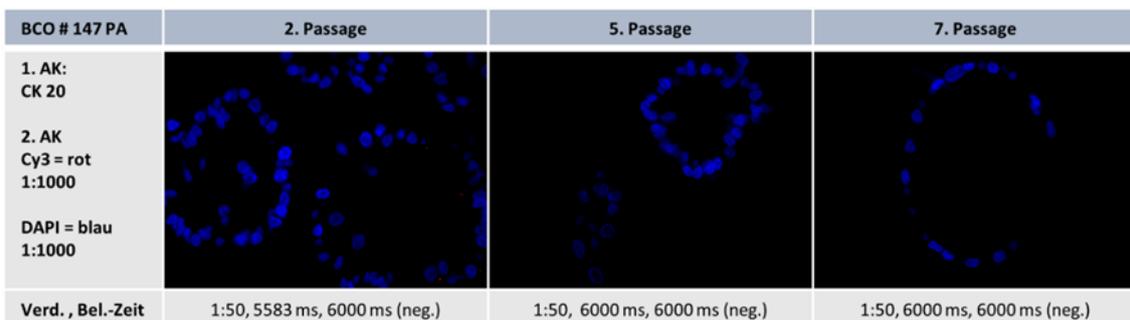


Abbildung 61 IFL-Färbung BCO#147, Paraffinschnitt 3 µm, CK20

Mittels Paraffinschnitt lässt sich initial kaum eine Expression von CK20 nachweisen. In den späteren Passagen ist kein Signal detektierbar (Abb. 61).

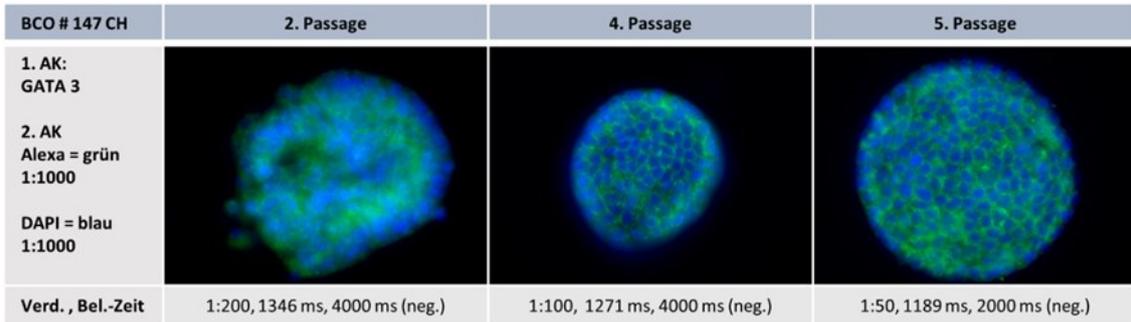


Abbildung 62 IFL-Färbung BCO#147, Chamberslide, GATA 3

Die Expressionshäufigkeit von GATA3 scheint konstant über die Passagen bei Verringerung der Verdünnung des Primärantikörpers je Passage um den Faktor 2. Das Signal erscheint initial diffus zytosolisch mit leicht nukleärer Komponente, später ubiquitär zytosolisch (Abb. 62).

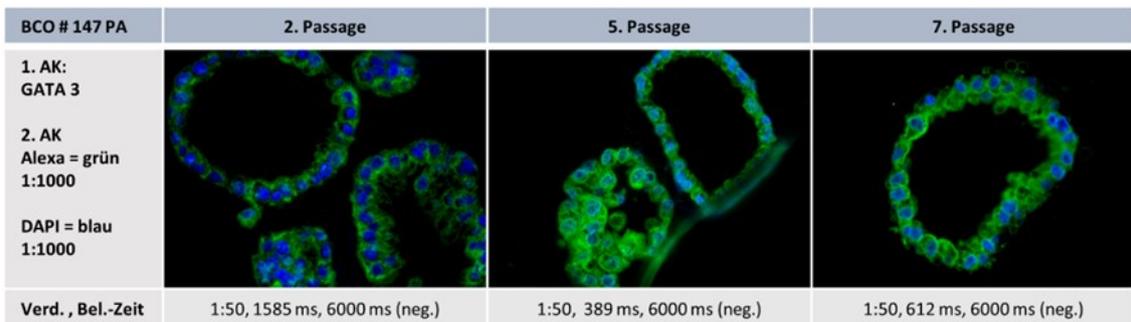


Abbildung 63 IFL-Färbung BCO#147, Paraffinschnitt 3 µm, GATA 3

Mittels Paraffinschnitt erscheint die Expressionshäufigkeit von GATA3 konstant, ubiquitär zytosolisch mit leichter nucleärer Komponente (Abb. 63).

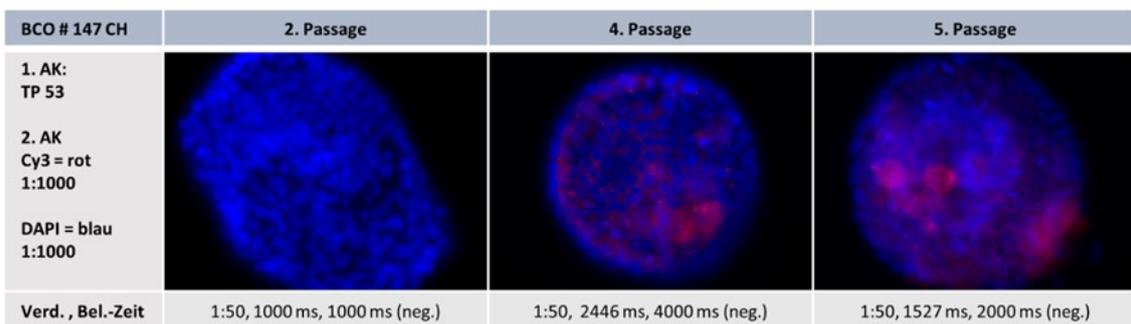


Abbildung 64 IFL-Färbung BCO#147, Chamberslide, TP53

Die Expressionshäufigkeit von TP53 scheint über die Passagen zuzunehmen. Initial nicht nachweisbar, ist ab Passage 4 im Großteil der Zellen zytosolisch ein Signal detektierbar (Abb. 64).

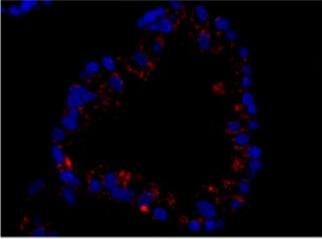
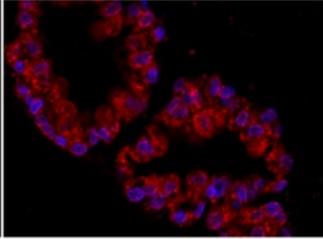
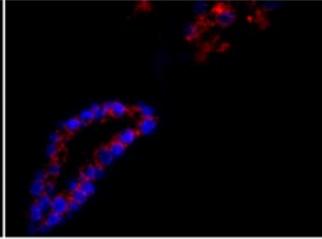
BCO # 147 PA	2. Passage	5. Passage	7. Passage
1. AK: TP 53  2. AK Cy3 = rot 1:1000  DAPI = blau 1:1000			
Verd., Bel.-Zeit	1:50, 1156 ms, 6000 ms (neg.)	1:50, 327 ms, 6000 ms (neg.)	1:50, 1084 ms, 6000 ms (neg.)

Abbildung 65 IFL-Färbung BCO#147, Paraffinschnitt 3 µm, TP53

Mittels Paraffinschnitt scheint die Expressionshäufigkeit von TP53 über die Passagen leicht zuzunehmen. Inital im Großteil der Zellen punktuell zytosolisch nachweisbar, ist das Signal (mit einem Peak bei Passage 5) später ubiquitär zytosolisch vorhanden (Abb. 65).

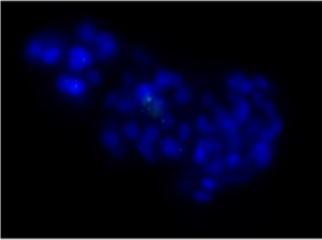
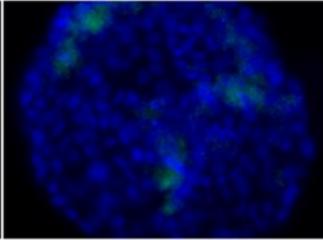
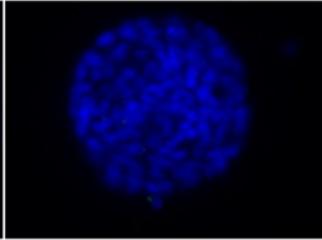
BCO # 147 CH	2. Passage	4. Passage	5. Passage
1. AK: TP 63  2. AK Alexa = grün 1:1000  DAPI = blau 1:1000			
Verd., Bel.-Zeit	1:100, 4000 ms, 4000 ms (neg.)	1:50, 2978 ms, 4000 ms (neg.)	1:50, 2500 ms, 2000 ms (neg.)

Abbildung 66 IFL-Färbung BCO#147, Chamberslide, TP63

Ein Signal für TP63 ist initial kaum merklich an wenigen Zellen nachweisbar. Nach Verringerung der Verdünnung des Primärantikörpers um den Faktor 2 kann in der 4. Passage diffus ein Signal in wenigen Arealen der Zellkultur detektiert werden. In der 5. Passage kann keine Expression erkannt werden (Abb. 66).

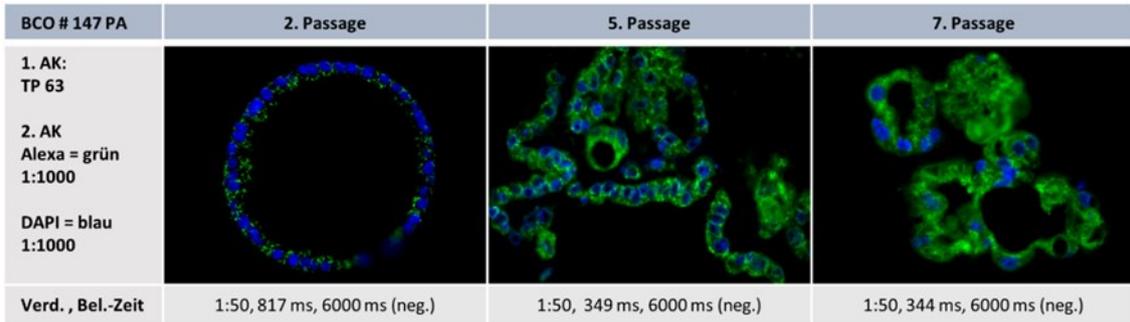


Abbildung 67 IFL-Färbung BCO#147, Paraffinschnitt 3 µm, TP63

Die Expressionshäufigkeit von TP63 im Paraffinschnitt nimmt von der 2. zur 5. Passage leicht zu und erscheint ab da konstant. Das Signal kann initial im Großteil der Zellen punktuell zytosolisch detektiert werden, im Verlauf in jeder Zelle mit zusätzlicher leichter nukleärer Komponente und intensiver (Abb. 67).

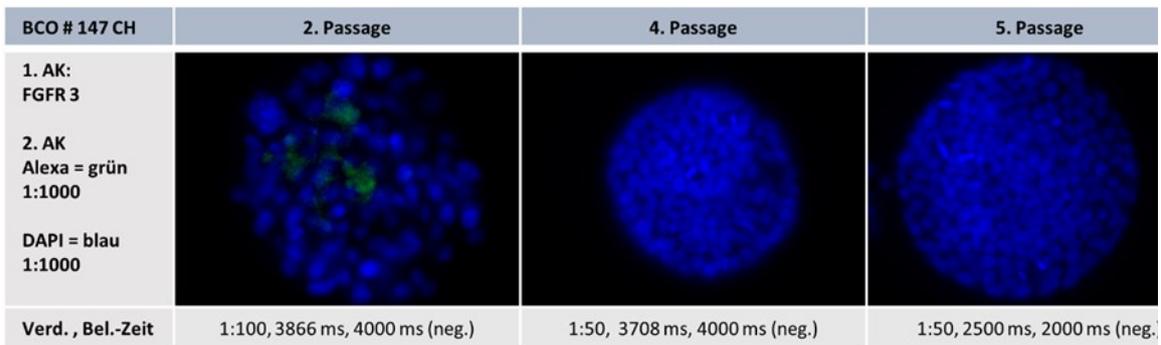


Abbildung 68 IFL-Färbung BCO#147, Chamberslide, FGFR 3

Die Expressionshäufigkeit von FGFR3 nimmt über die Passagen ab. Konnte initial noch diffus ein Signal in einem Teil der Zellen detektiert werden, kann ab Passage 4 keine Expression trotz Verringerung der Verdünnung des Primärantikörpers um den Faktor 2 nachgewiesen werden (Abb. 68).

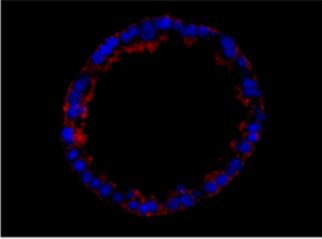
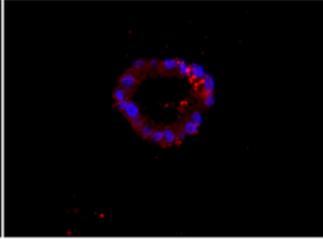
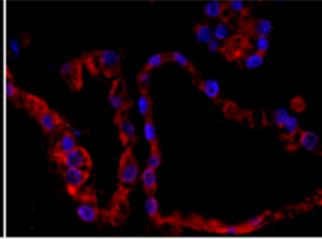
BCO # 147 PA	2. Passage	5. Passage	7. Passage
1. AK: FGFR 3			
2. AK Cy3 = rot 1:1000			
DAPI = blau 1:1000			
Verd., Bel.-Zeit	1:50, 2268 ms, 6000 ms (neg.)	1:50, 493 ms, 6000 ms (neg.)	1:50, 479 ms, 6000 ms (neg.)

Abbildung 69 FL-Färbung BCO#147, Paraffinschnitt 3  $\mu$ m, FGFR 3

Mittels Paraffinschnitt scheint die Expressionshäufigkeit von FGFR3 von Passage 2 zu 5 leicht zuzunehmen und dann zur 7. Passage konstant. Inital im Großteil der Zellen zytosolisch nachweisbar, ist das Signal später ubiquitär zytosolisch vorhanden (Abb. 69).

### 3.4.6 Zusammenfassung des Expressionsverhaltens von BCO#147 über 7 Passagen in Immunfluoreszenz und Immunhistochemie

Zusammenfassend kann bei der Probe BCO#147 mittels IHC keine eindeutige Tendenz der Entwicklung der Markerepression festgestellt werden. Luminale Marker wie GATA3 und CK20 als auch basale Marker wie TP53 erfahren einen Expressionsverlust, wobei dieser im Falle von TP53 geringer ausfällt. Verglichen damit konnte mittels IFL ein glaubhaftes Expressionsverhalten für die Zytokeratine 5, 7 und 20 nachgewiesen werden. Beachtet man dabei die Einschichtigkeit der Organoide, so zeigt es an manchen Stellen eine Koexpression vom basalen Marker CK5 und CK7. Mittels IFL konnte auch der eher basale Marker TP53 in seiner Expressionshäufigkeit vergleichbar mit der IHC dargestellt werden. Die Lokalisation weicht in den Verfahren allerdings auseinander. Die geringe Expression von FGFR3 und TP63 in IFL-Chamberslides ist vergleichbar mit der IHC und dem Verlust luminaler Marker, das IFL-Paraffinverfahren zeigt allerdings widersprüchliche Ergebnisse gegenüber der IHC, ebenso wie GATA3.

### **3.5 BCO#136**

#### **3.5.1 Pathologie BCO#136**

Die Probe wurde mittels TUR-B entnommen. Dabei handelte es sich um ein invasives Urothelkarzinom, welches bereits das perivesicale Binde- und Fettgewebe infiltriert hatte, und mutmaßlich Komponenten eines CIS besaß. Das Wachstum wurde als nestartig trabekulär mit mäßiggradiger Kernpleomorphie beschrieben, Lymphangioinvasion ist vorhanden. Grading G2, TNM mindestens pT2a, L1

#### **3.5.2 Zellkultur BCO#136**

Die Probe BCO#136 wurde im Dezember 2020 durch eine TUR-B entnommen und am selben Tag nach Protokoll aufgearbeitet. Das initiale Wachstum zeichnete sich als nicht sehr erfolgsversprechend ab, die meisten Zellaggregate verloren bis Tag 6 an Struktur und wirkten apoptotisch. Wachstum konnte nur an vereinzelt Stellen ausgemacht werden, dort schienen sich jedoch stabile Sphäroide zu halten (Abb. 70).

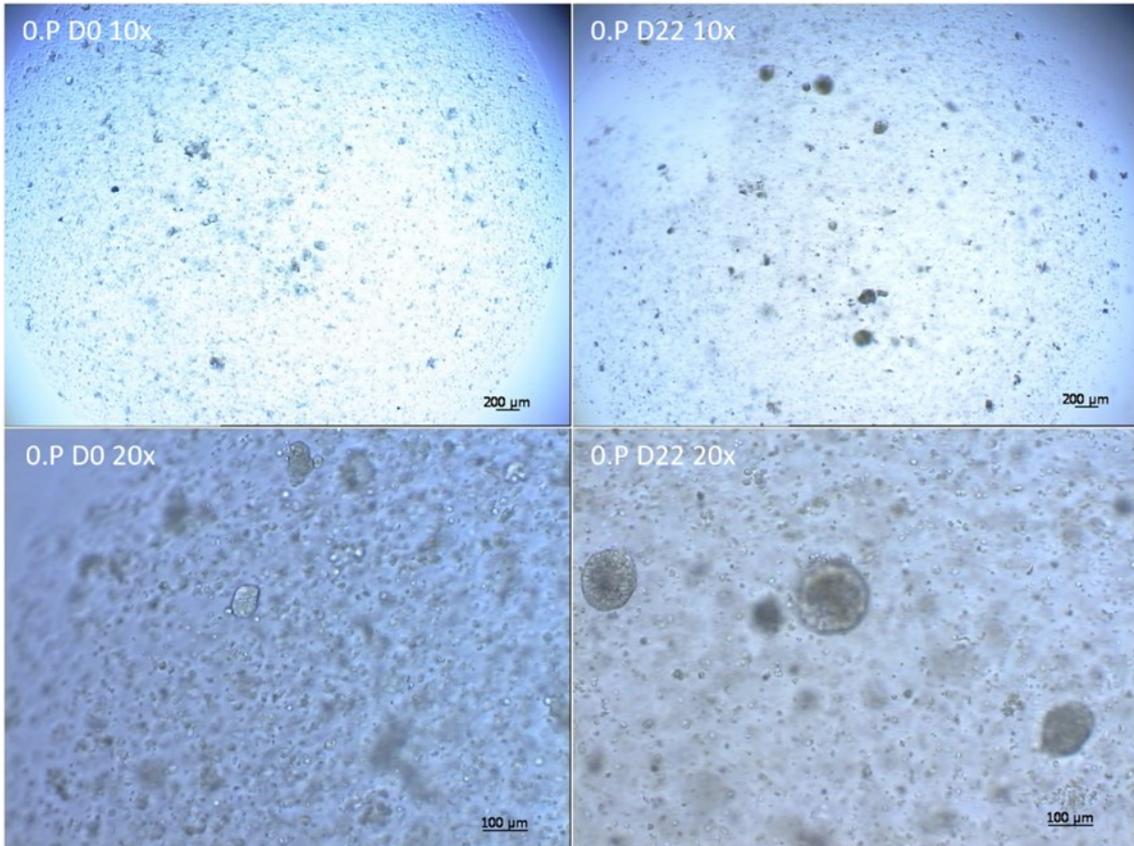


Abbildung 70 BCO#136 O.P D0 und D22

Nach einer längeren Inkubationszeit zwischen Tag 6 und 22 fiel auf, dass sich in jeder Kultur einige Sphäroide von einer Größe bis zu ca. 150  $\mu\text{m}$  gebildet hatten. Diese waren kreisförmig, bestanden aus mehreren Zellen und wirkten an ihrem Außenrand glatt gegenüber dem BME abgegrenzt (Abb. 70).

In den folgenden Passagen etablierte sich eine Zellpopulation, welche sukzessive Sphäroide generierte. Auffällig war, dass es bei einem Splitting nicht eindeutig war, ob die Zellen wirklich erfolgreich vereinzelt werden konnten. Zellkonglomerate hatten einen Durchmesser von bis zu 50  $\mu\text{m}$ , wuchsen im Laufe der Passage aber über die 100  $\mu\text{m}$  hinaus. Bis zur 4. Passage wurde nach ca. 10 Tagen gesplittet, mit einer Ausnahme, als die Vereinzelnung zu insuffizient erschien (Abb. 71).

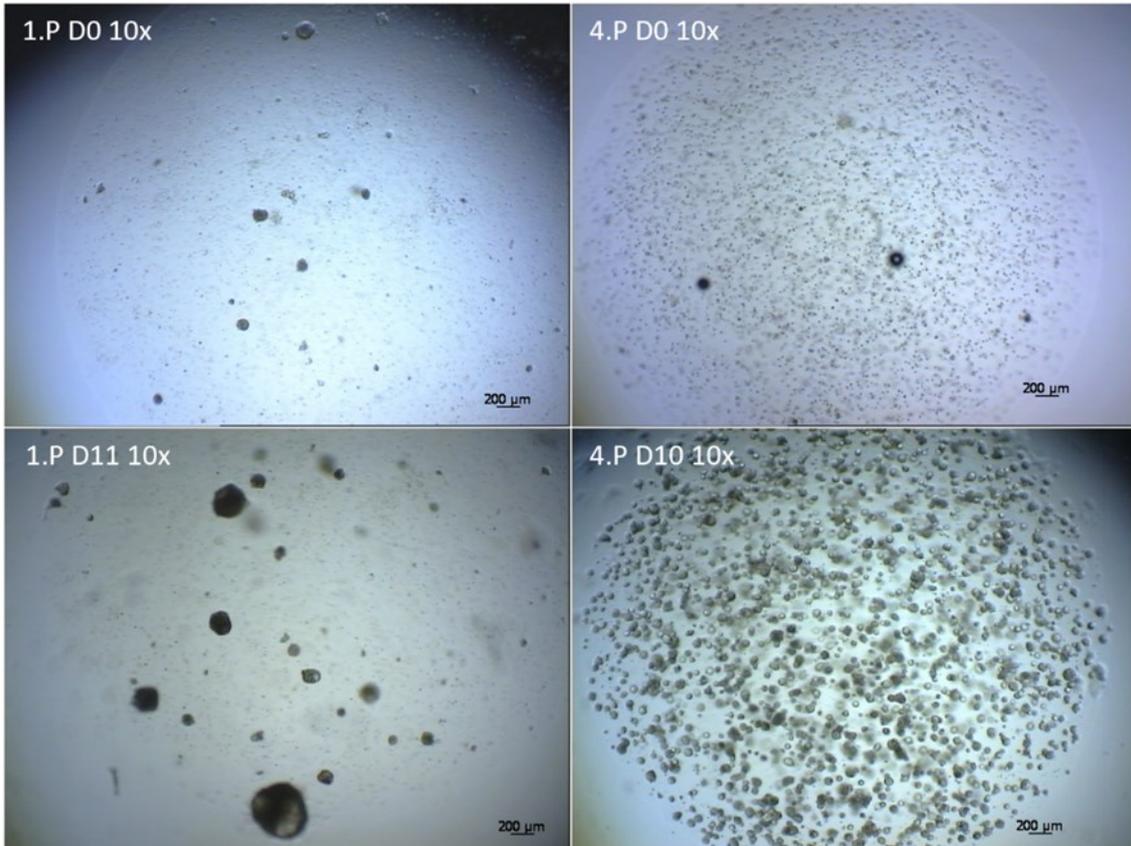


Abbildung 71 BCO#136 1.P D0 und D11, 4.P D0 und D10

Das Wachstumsmuster änderte sich kurz vor der 5. Passage, also unserer festgelegten Grenze zum Organoid. Die Zellen ließen sich beim Splitting besser vereinzeln, somit wurde die Zellkultur dichter. Auch wuchsen sie schneller, weshalb nach weniger Zeit gesplittet wurde, ca. 7 Tage. Die Organoiden wuchsen auf bis zu 500  $\mu\text{m}$  heran, wirkten sehr dicht und zentral etwas verdunkelt. Das kann durch die Lagen an Zellen hervorgerufen sein.

Mit ansteigender Passage schien sich das Wachstum zu beschleunigen. Die Zellen ließen sich sehr gut und dicht vereinzeln, die Organoiden erreichten ein beobachtbares Wachstum von ca. 100  $\mu\text{m}$ . Ab ca. Tag 6 erschienen auch größere, flächige Gebilde, die aber die Struktur und Abgrenzung der zuvor beobachteten Organoiden verloren hatten. Es zeigten sich dendritische Auswüchse an den äußeren Zellen, der Zellkontakt wirkte aufgelockert und die Zellen generell apoptotisch. Nach weiterem Zuwarten von 3 Tagen vermehrte sich die Zahl dieser Strukturen, es blieben aber weiterhin kleinere (100  $\mu\text{m}$ ) Organoiden stabil und sicher abgrenzbar (Abb. 72).

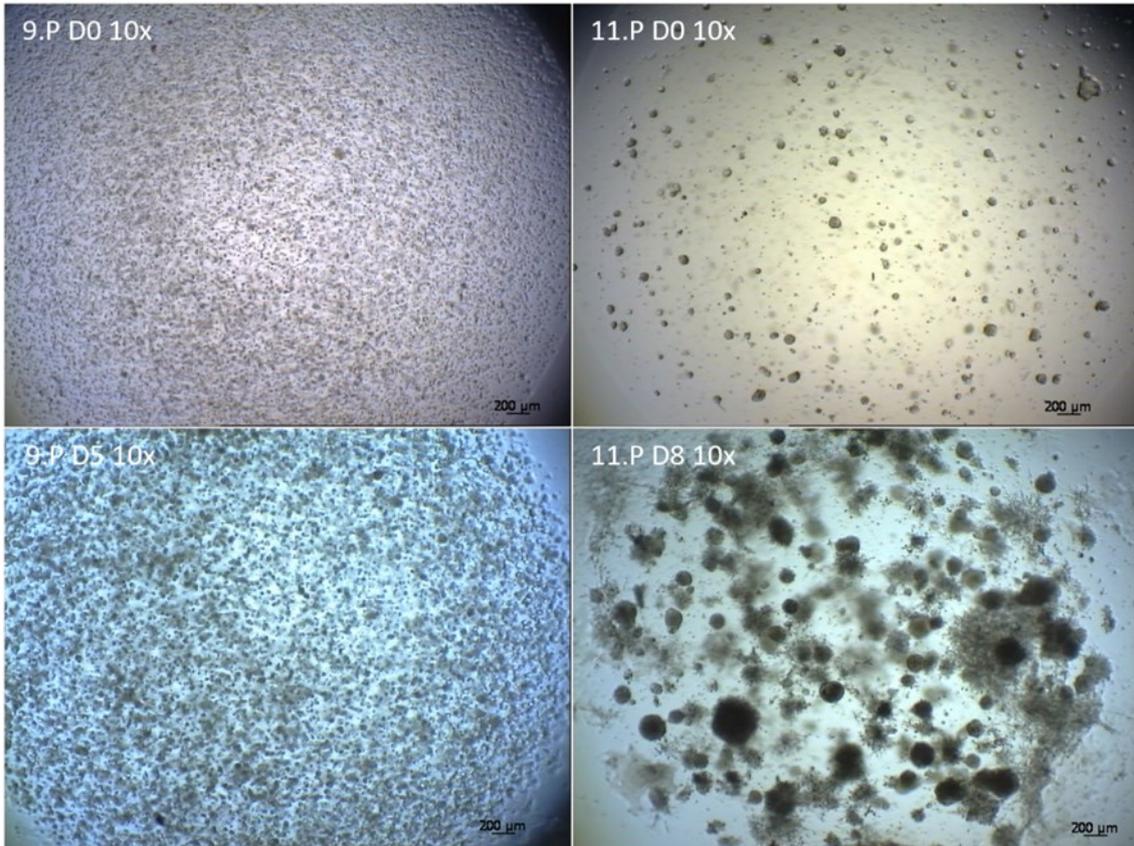


Abbildung 72 BCO#136 9.P D0 und D5, 11.P D0 und D8

Dieses Wachstumsmuster etablierte sich immer mehr, bis es zur Passage 13 kaum noch Organoidbildung gab. Die Zellen wurden nach der Vereinzelung spindelförmig und mit Auswüchsen und ohne Strukturbildung, an Tag 7 glich es dem Bild eines weitgehend apoptotischen Zellrasens (Abb. 73).

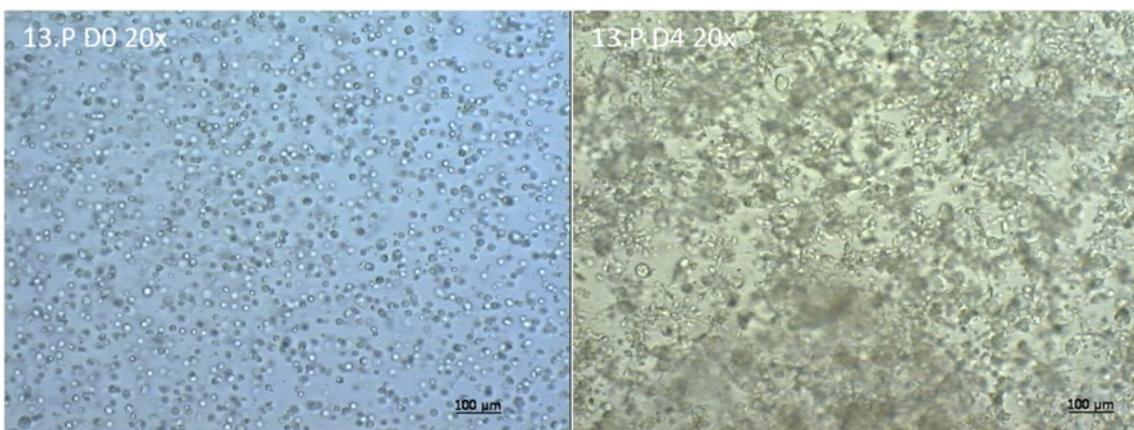


Abbildung 73 BCO#136 13.P D0 und D4

Danach war eine erfolgreiche Passagierung mit Aussicht auf Organoidbildung weitestgehend aussichtslos, diese Zellkultur wurde nach der 13. Passage beendet.

### 3.5.3 Immunhistochemische Färbungen und Vergleich mit Originaltumor

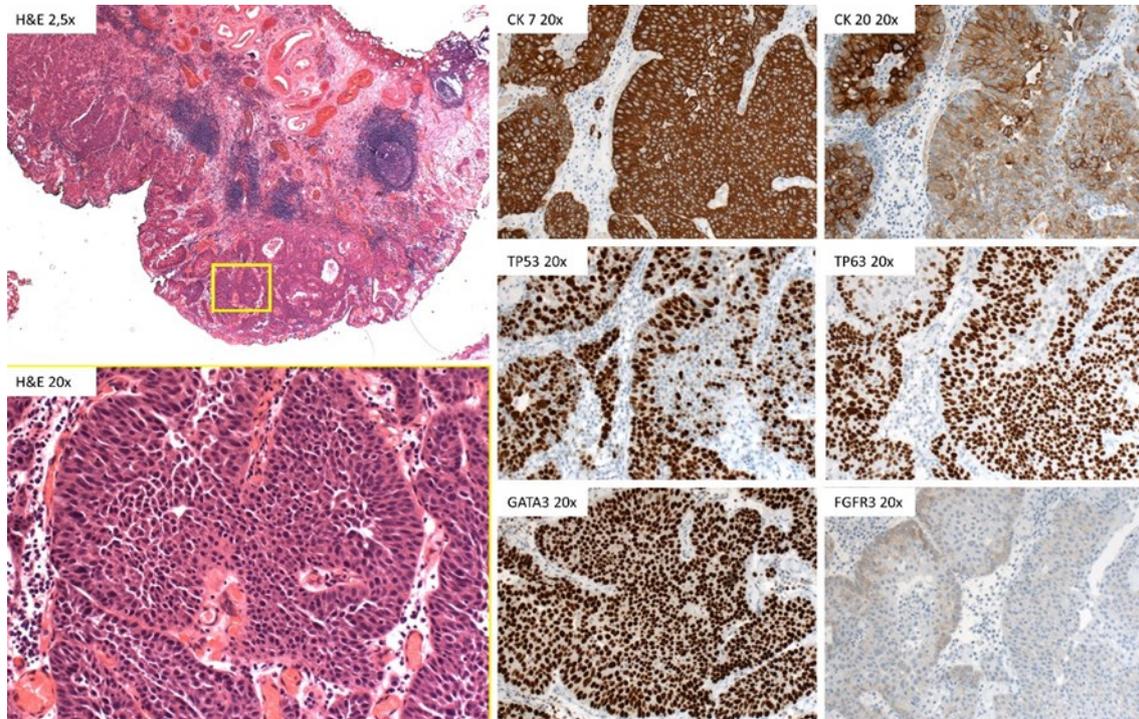


Abbildung 74 Originaltumor BC#136 Immunhistochemie

BC#136	Expression	+	++	+++	H-score
CK 7	Zellmembran, Zytosol	5%	5%	90%	285
CK 20	Zellmembran, Zytosol	40%	40%	20%	180
TP53	Zellkern	5%	10%	65%	220
TP63	Zellkern	0%	10%	80%	260
GATA3	Zellkern (Zytosol?)	0%	10%	90%	290
FGFR3	Zytosol (Zellmembran?)	80%	20%	0%	120

Tabelle 19 Histoscore Originaltumor BC#136

Die Probe des Originaltumors BC#136 exprimiert stark die Marker CK7, GATA3, TP63 und TP53. CK20 und FGFR3 konnten mittels Immunhistochemie in moderater Ausprägung nachgewiesen werden (Abb. 74, Tab. 19).

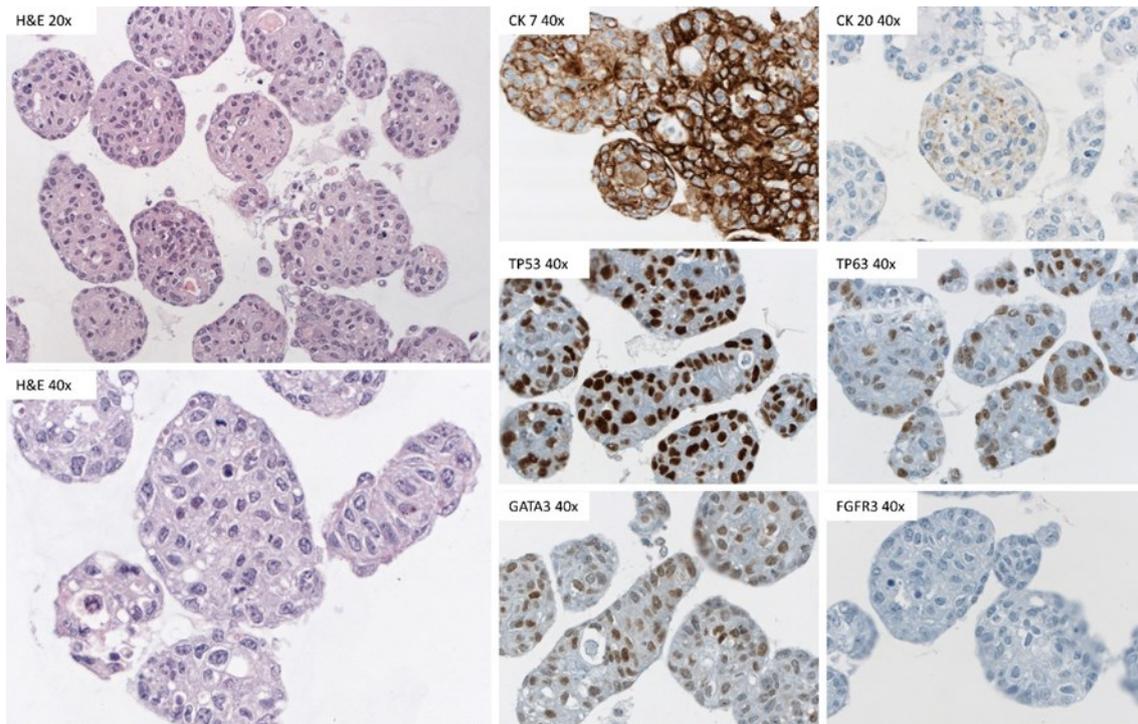


Abbildung 75 Organoid BCO#136 7.P Immunhistochemie

BCO#136 7.P	Expression	+	++	+++	H-score
CK 7	Zellmembran, Zytosol	10%	40%	50%	240
CK 20	Zellmembran, Zytosol	20%	30%	0%	80
TP53	Zellkern	5%	5%	85%	270
TP63	Zellkern	15%	40%	30%	185
GATA3	Zellkern	10%	80%	0%	170
FGFR3	nicht exprimiert	0%	0%	0%	0

Tabelle 20 Histocore Organoid BCO#136

Das Organoid BCO#136 in der 7. Passage exprimiert die Marker CK7 und TP53 stark. Moderat konnten GATA3 und TP63 nachgewiesen werden, CK20 nur schwach. FGFR3 wird nicht exprimiert (Abb. 75, Tab. 20).

### 3.5.4 Vergleich Histocore Originaltumor BC#136 zu BCO#136 7.P

Im Folgenden werden die jeweiligen Histocores der Marker von den Originaltumoren BC#136 grafisch denen vom Organoid BCO#136 in der 7. Passage gegenübergestellt.

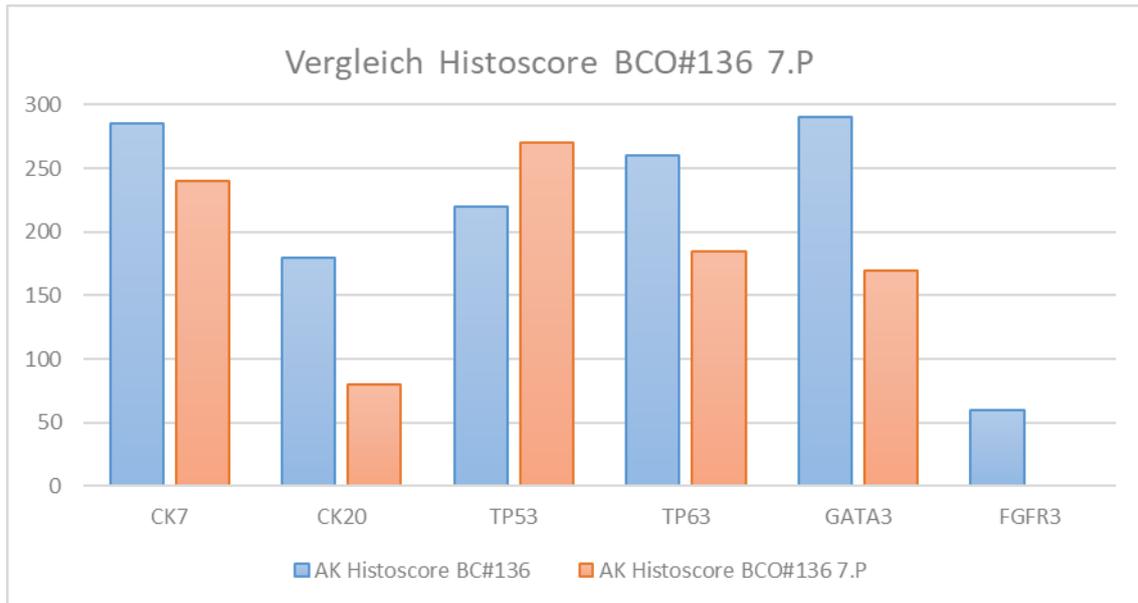


Abbildung 76 Vergleich Histoscores Originaltumor BC#136 und Organoid BCO#136 7.Passage. X-Achse Antikörper, Y-Achse Histoscore, blau = BC#136, rot = BCO#136 7.P

Das Organoid BCO#136 in der 7. Passage exprimiert generell das Markerprofil in der Originalprobe des Tumors BC#136. Eine leichte Minderung der Expressionsstärke fand bei CK7 und TP53 statt, eine starke Minderung bei CK20 und GATA3. TP53 wird stärker exprimiert als in der Originalprobe, FGFR3 konnte im Organoid im Gegensatz zur Originalprobe immunhistochemisch nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 76). Damit stimmt das Expressionsprofil des Organoids BCO#136 in der 7. Passage zu 57% mit dem der Originaltumorprobe BC#136 überein.

### 3.5.5 Immunfluoreszenzfärbungen

Von der Probe BCO#136 wurde in der Zeit der Kultivierung in den Passagen 2, 6 und 7 Chamberslides angefertigt und mittels Immunfluoreszenzfärbung auf das Vorhandensein von spezifischen Proteinstrukturen untersucht. Aus den Passagen 2, 7 und 9 wurden Paraffinschnitte für die Immunfluoreszenzuntersuchung angefertigt (Abb. 77-90). Der Vergleich der verschiedenen Passagen untereinander lässt einen Schluss auf die Entwicklung der Zellpopulation über die Zeit und die Veränderlichkeit in der Ausprägung der Zielstrukturen zu.

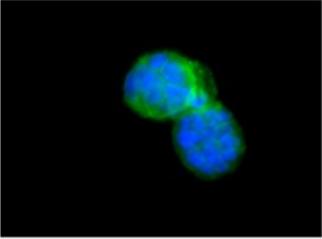
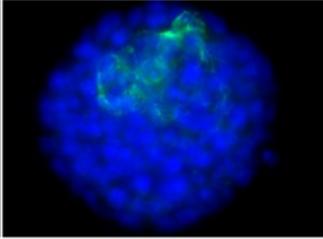
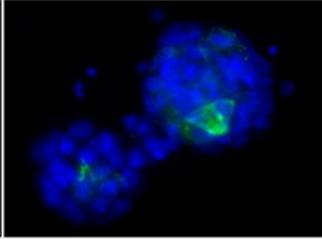
BCO # 136 CH	2. Passage	6. Passage	7. Passage
1. AK: CK 5			
2. AK Alexa = grün 1:1000			
DAPI = blau 1:1000			
Verd., Bel.-Zeit	1:200, 619 ms, 2000 ms (neg.)	1:200, 1000 ms, 1000 ms (neg.)	1:100, 538 ms, 3000 ms (neg.)

Abbildung 77 IFL-Färbung BCO#136, Chamberslide, CK5

Die Expressionshäufigkeit von CK5 nimmt über die Passagen ab. Initial diffus zytosolisch in jeder Zelle exprimiert, kann später ein Signal trotz Verringerung der Primärantikörperverdünnung um den Faktor 2 nur in einem kleinen Teil der Zellen zytosolisch detektiert werden (Abb. 77).

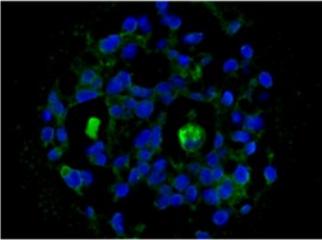
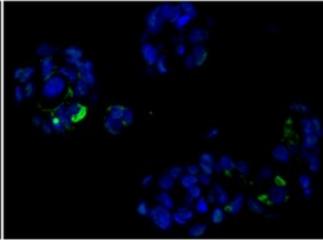
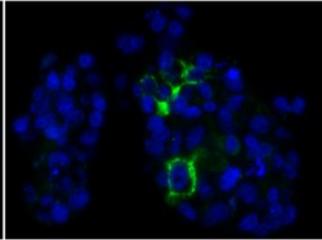
BCO # 136 PA	2. Passage	7. Passage	9. Passage
1. AK: CK 5			
2. AK Alexa = grün 1:1000			
DAPI = blau 1:1000			
Verd., Bel.-Zeit	1:50, 805 ms, 6000 ms (neg.)	1:50, 842 ms, 6000 ms (neg.)	1:50, 152 ms, 5000 ms (neg.)

Abbildung 78 IFL-Färbung BCO#136, Paraffinschnitt 3 µm, CK5

Mittels Paraffinschnitt scheint die Expressionshäufigkeit von CK5 über die Passagen leicht abzunehmen. Initial ist ein Signal zytosolisch in einem Großteil der Zellen vorhanden, ab der 7. Passage beschränkt es sich auf einzelne Zellgruppen innerhalb eines Organoids (Abb. 78).

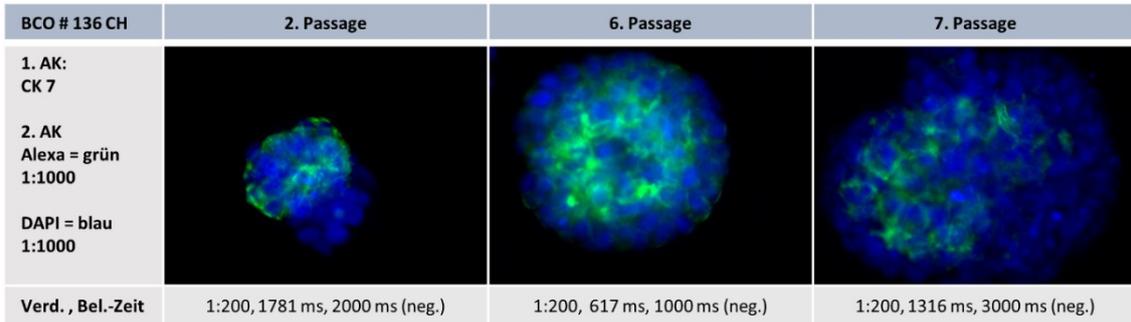


Abbildung 79 IFL-Färbung BCO#136, Chamberslide, CK7

Die Expressionshäufigkeit von CK7 scheint über die Passagen konstant zu sein. Das Signal ist zytosolisch in einem Großteil der Zellen nachweisbar (Abb. 79).

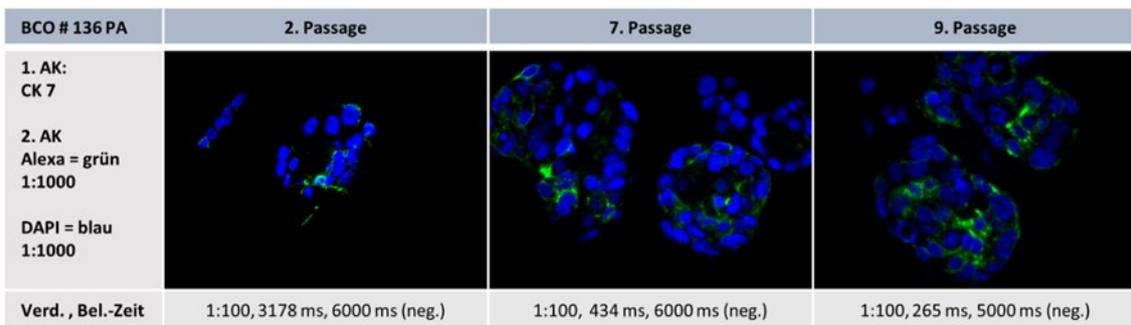


Abbildung 80 IFL-Färbung BCO#136, Paraffinschnitt 3 µm, CK7

Auch im Paraffinschnitt kann die Expressionshäufigkeit von Zytokeratin 7 über die Passagen konstant nachgewiesen werden. Das Signal ist zytosolisch in einem Großteil der Zellen detektierbar (Abb. 80).

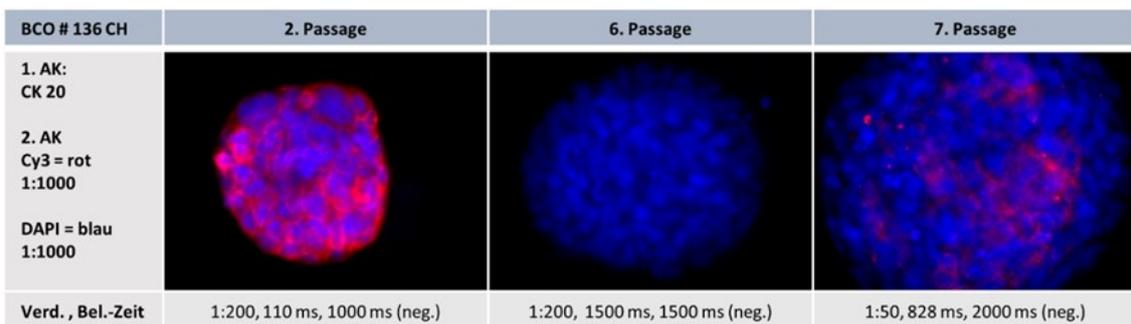


Abbildung 81 IFL-Färbung BCO#136, Chamberslide, CK20

Die Expressionshäufigkeit von CK20 nimmt über die Passagen ab. In der 2. Passage ist das Signal kräftig zytosolisch in jeder Zelle vorhanden. Mit derselben Primärantikörperverdünnung in der 6. Passage konnte keine Expression festgestellt werden. In Passage 7 wurde die Verdünnung um den

Faktor 4 verringert und es konnte wieder ein leichtes zytosolisches Signal in einem Teil der Zellen nachgewiesen werden (Abb. 81).

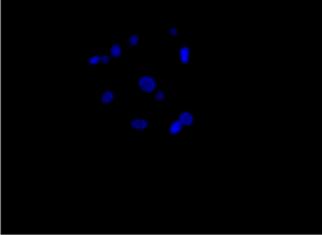
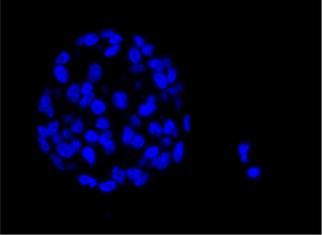
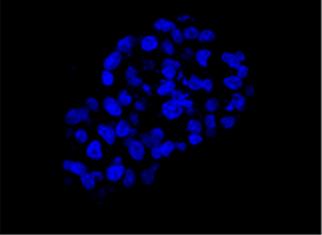
BCO # 136 PA	2. Passage	7. Passage	9. Passage
1. AK: CK 20			
2. AK Cy3 = rot 1:1000			
DAPI = blau 1:1000			
Verd., Bel.-Zeit	1:50, 6000 ms, 6000 ms (neg.)	1:50, 6000 ms, 6000 ms (neg.)	1:50, 4000 ms, 6000 ms (neg.)

Abbildung 82 IFL-Färbung BCO#136, Paraffinschnitt 3 µm, CK20

Mittels Immunfluoreszenz im Paraffinschnitt konnte zu keinem Zeitpunkt Zytokeratin 20 nachgewiesen werden (Abb. 82).

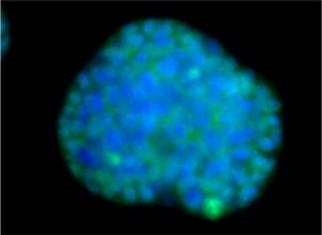
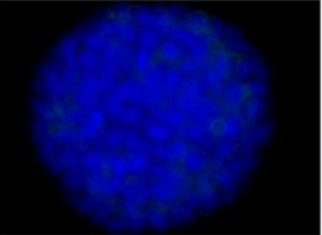
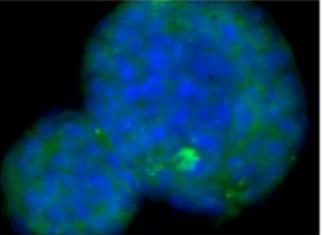
BCO # 136 CH	2. Passage	6. Passage	7. Passage
1. AK: GATA3			
2. AK Alexa = grün 1:1000			
DAPI = blau 1:1000			
Verd., Bel.-Zeit	1:200, 731 ms, 2000 ms (neg.)	1:200, 1000 ms, 1000 ms (neg.)	1:100, 667 ms, 3000 ms (neg.)

Abbildung 83 IFL-Färbung BCO#136, Chamberslide, GATA 3

Die Expressionshäufigkeit von GATA3 scheint über die Passagen abzunehmen. Initial in der 2. Passage ist das Signal ubiquitär nukleär vorhanden, bei derselben Primärantikörperkonzentration kann in der 6. Passage jedoch kein Marker mehr nachgewiesen werden. Nach Verringerung der Primärantikörperverdünnung um den Faktor 2 ist in der 7. Passage wieder ein Signal diffus zytosolisch in jeder Zelle detektierbar (Abb. 83).

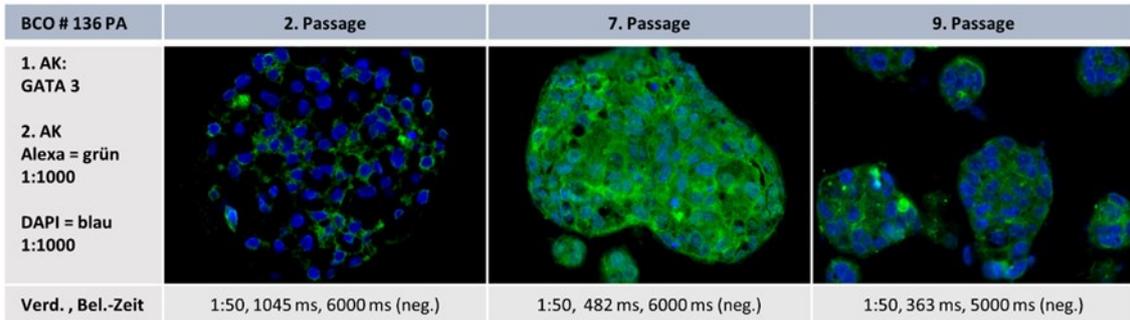


Abbildung 84 IFL-Färbung BCO#136, Paraffinschnitt 3 µm, GATA 3

Mittels Paraffinschnitt scheint die Expressionshäufigkeit von GATA3 über die Passagen zu steigen. Initial ist das Signal im Großteil der Zellen leicht zytosolisch vorhanden. Ab der 7. Passage nimmt es stark zu und ist ubiquitär sowohl zytosolisch als auch nukleär detektierbar. Die 9. Passage gestaltet sich ähnlich, wenn auch etwas weniger nukleäre Komponente (Abb. 84).

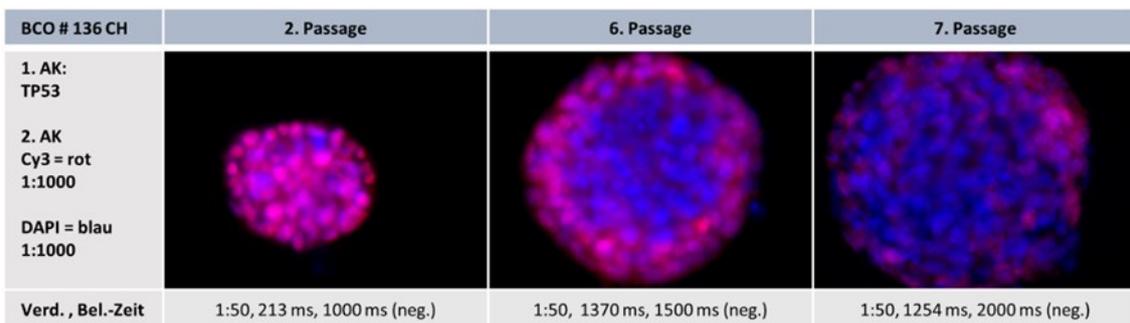


Abbildung 85 IFL-Färbung BCO#136, Chamberslide, TP53

Die Expressionshäufigkeit von TP53 scheint leicht abzunehmen. Initial ist das Signal ubiquitär nukleär vorhanden, später ist es weniger intensiv und scheinbar eher in den peripheren Zellen der Organotide nukleär nachweisbar, im zentralen Bereich schwächer (Abb. 85).

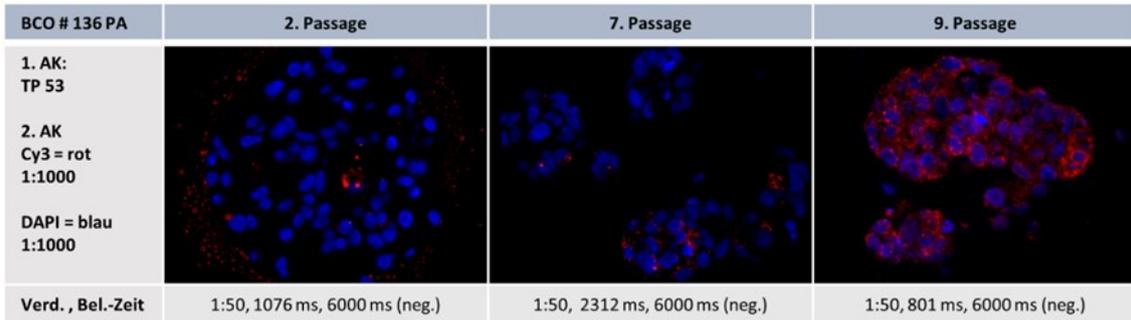


Abbildung 86 IFL-Färbung BCO#136, Paraffinschnitt 3  $\mu$ m, TP53

Mittels Paraffinschnitt scheint sich die Expressionshäufigkeit von TP53 zu steigern. Wird initial in den Passagen 2 und 7 ein Signal nur diffus vereinzelt zytosolisch nachgewiesen, ist es in der 9. Passage in jeder Zelle zytosolisch detektierbar (Abb. 86).

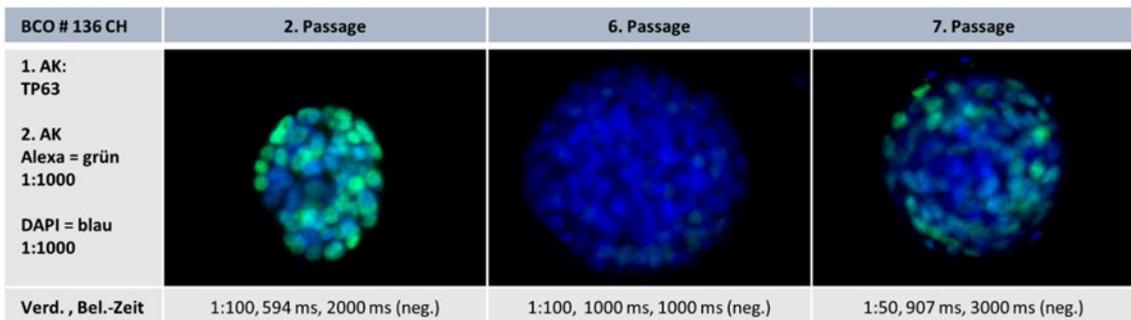


Abbildung 87 IFL-Färbung BCO#136, Chamberslide, TP63

Die Expressionshäufigkeit von TP63 nimmt scheinbar zunächst über die Passagen ab. In der 2. Passage ist das Signal in einem Großteil der Zellen nukleär vorhanden. Mit derselben Primärantikörperverdünnung in der 6. Passage konnte keine Expression festgestellt werden. In Passage 7 wurde die Verdünnung um den Faktor 2 verringert und es konnte wieder ein leichtes nukleäres Signal in einem Teil der Zellen nachgewiesen werden (Abb. 87).

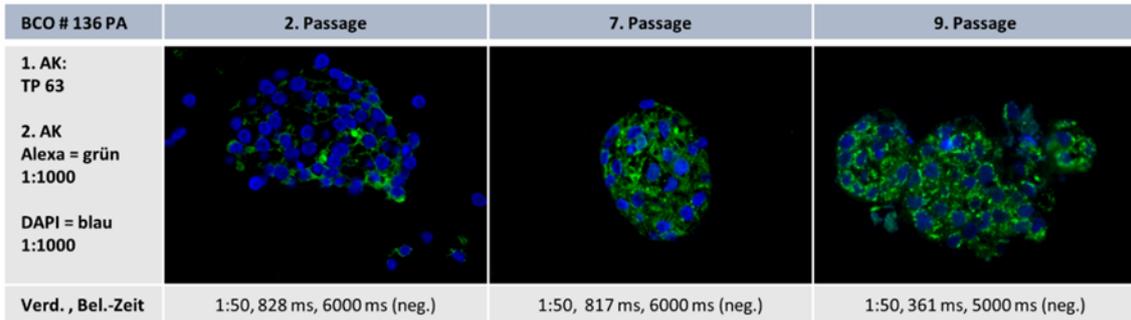


Abbildung 88 IFL-Färbung BCO#136, Paraffinschnitt 3 µm, TP63

Mittels Paraffinschnitt scheint dagegen die Expressionshäufigkeit von TP63 leicht zuzunehmen. Initial ist das Signal in einem Großteil der Zellen (punktuell) zytosolisches vorhanden, ab der 7. Passage dann ubiquitär zytosolisches (Abb. 88).

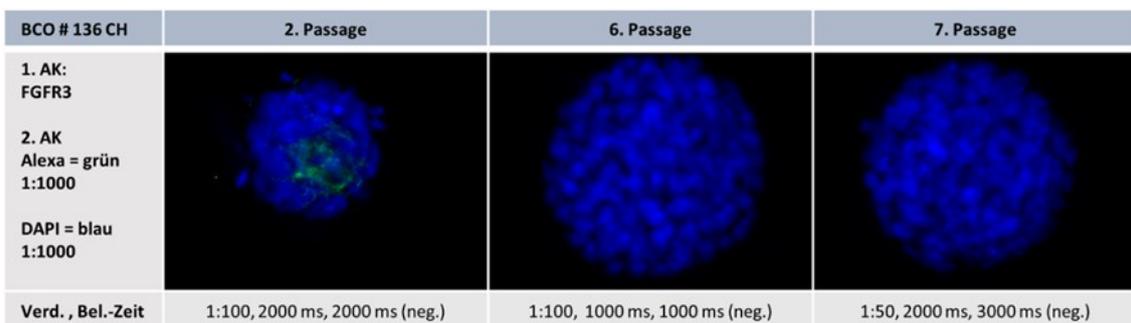


Abbildung 89 IFL-Färbung BCO#136, Chamberslide, FGFR 3

Die Expressionshäufigkeit von FGFR3 nimmt über die Zeit ab. Initial konnte diffus ein Signal in einem Teil der Zellen nachgewiesen werden, in den späteren Passagen auch mit Verringerung der Primärantikörperverdünnung um den Faktor 2 jedoch nicht mehr (Abb. 89).

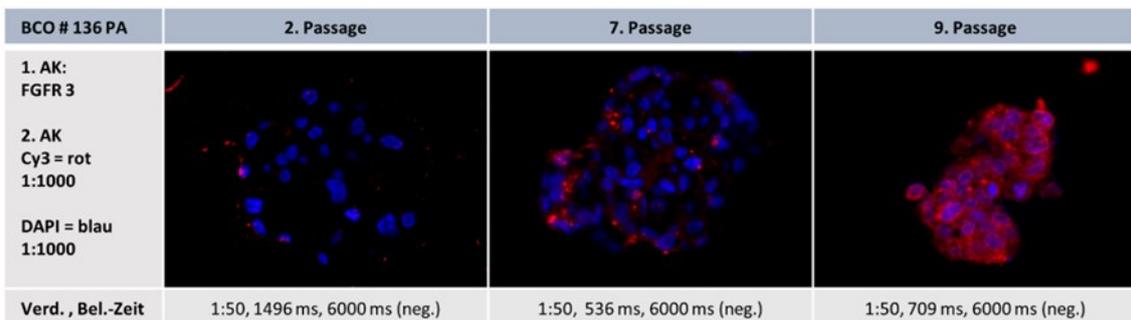


Abbildung 90 IFL-Färbung BCO#136, Paraffinschnitt 3 µm, FGFR 3

Mittels Paraffinschnitt scheint die Expressionshäufigkeit von FGFR3 zu steigen. Konnte initial nur diffus vereinzelt zytosolisches ein Signal nachgewiesen werden,

ist es in der 9. Passage ubiquitär zytosolisch mit nucleärer Komponente vorhanden (Abb. 90).

### **3.5.6 Zusammenfassung des Expressionsverhaltens von BCO#136 über 9 Passagen in Immunfluoreszenz und Immunhistochemie**

Zusammenfassend kann für die Probe BCO#136 in der 7. Passage mittels IHC ein ähnliches Markerprofil wie in dem Originalgewebe nachgewiesen werden, wenn auch mit leicht sinkender Expressionsstärke der meisten luminalen Marker sowie dem basalen Marker TP63. Dagegen steigt die Expression des basalen Markers TP53. Diese Entwicklung deckt sich mit dem Expressionsverhalten der Zytokeratine 5, 7 und 20 mittels IFL. Das basale CK5 bleibt punktuell vorhanden, während CK20 in seiner Expressionshäufigkeit abzunehmen scheint. Auch die Transkriptionsfaktoren GATA3, TP53 und TP63 konnten in vergleichbarer Weise in IFL mit abnehmender Expressionshäufigkeit dargestellt werden, wobei die Lokalisation im IFL-Paraffinverfahren verglichen mit der IHC divergiert. FGFR3 in IFL folgt jedoch nicht dem Expressionsverhalten in der IHC.

## 4 Diskussion

### 4.1 Anzuchterfolge

Hinsichtlich der Aufarbeitungsmethode der humanen Urothelproben haben wir uns nah an den publizierten Methoden der Forschungsgruppe um Mullenders et al (2019) gehalten. In diesem wegweisenden Paper wurde mit murinen Urothelproben eine fast 100-prozentige Etablierungsrate von Organoidkulturen erreicht. Bei humanen Proben wurde eine rund 50-prozentige Erfolgsquote verzeichnet. In der Arbeitsgruppe Lee et al und deren 2018 veröffentlichten Paper wurde eine Erfolgsquote von 70% bei der Generierung von humanen Urothelkarzinom-Organoiden erreicht. Dies galt für Organoide, welche erfolgreich über die sechste Passage kultiviert werden konnten. Dies steht im Kontrast zu den in dieser Arbeit verzeichneten Erfolgsraten. So haben hier von den insgesamt 49 humanen Urothelproben nur 5 die von uns in Anlehnung an die Arbeit von Lee et al (2018) per Definition auf die 5. Passage festgelegte Grenze, um als Organoidkultur zu gelten, erreicht (Lee et al., 2018). Dies ist eine Erfolgsrate von rund 10%. Diese Diskrepanz in den Anzuchterfolgen lässt sich schwer durch die generellen Kultivierungsmethoden erklären, da wir uns zum größten Teil an die von Mullenders et al 2019 publizierten Methoden gehalten haben. Ein Unterschied besteht in der Art der Probengewinnung. In unserer gesamten Stichprobenmenge von  $n = 49$  wurden 22 Proben durch eine TUR-B und 25 durch eine Zystektomie gewonnen. Die zwei Nephrektomiepräparate werden hier nicht eingeschlossen. Von den 5 erfolgreichen Organoidkulturen entstammten letztendlich 2 einer TUR-B und 3 einer Zystektomie. In der von Mullenders et al 2018 publizierten Biobank an erfolgreichen humanen Urothel-CA Organoiden stammten 11 von einer TUR-B und 42 aus einer Zystektomie. Somit scheint hier die Entnahmeart der Zystektomie oder die unterschiedliche Vortherapie im Vergleich zu einer TUR-B mit einem Anzuchterfolg bei Urothelorganoiden zu korrelieren.

Im Verfahren der TUR-B wird explizit nur das maligne Gewebe mit Sicherheitsabstand durch elektrischen Strom geschnitten. Dadurch wird das

Gewebe denaturiert, was durch eine schwarze Färbung an den Schnitträndern ersichtlich ist. Bei Zellen in relativer Nähe dazu kann man von einer Abnahme der Vitalität ausgehen. Da bei einer TUR-B der Tumor häufig eher klein war, war dies ein Faktor, der das spätere Anwachsen der Kultur negativ beeinflussen kann. Durch Absprache im Vorfeld mit dem Operateur wurde bei entsprechender Morphologie des Tumors versucht, vor dem Verwenden des Elektrokauters, Teile des exophytischen Anteils des Tumors rein mechanisch zu entnehmen. Auf diese Weise erhofften wir uns, vitalere Zellen zu gewinnen.

Bei einer Organentnahme durch radikale Zystektomie oder Nephrektomie kommt der Tumor im Normalfall nicht direkt in Kontakt mit elektrischem Strom. Das gesamte Organ inklusive des Tumors wurde mit gebührendem Sicherheitsabstand en bloc reseziert. Es kann bei einer auf diese Weise entnommenen Probe davon ausgegangen werden, dass die Zellen nicht durch den Faktor Strom in ihrer Vitalität beeinträchtigt worden sind.

Ein weiterer Aspekt, der das Wachstum der Organoidkulturen beeinflusst, ist die Zelldichte. Wie auch bei Mullenders et al (2019) beschrieben, wird die maximale Wachstumsgröße der Organoide durch eine zu dicht ausgesäte Zellkultur behindert. Um diesem Effekt vorzubeugen, wurde mit zunehmender Zelldichte das Splitverhältnis auf bis zu 1 zu 18 vergrößert. Hierdurch konnte insofern ein Unterschied in dem Wachstumsverhalten der Organoide festgestellt werden, als dass diese zu einem größeren Durchmesser heranwuchsen.

#### **4.2 Korrespondierende Organoidreihen mit zeitlich versetzter Entnahme**

Interessant ist der Fakt, dass aus den 5 erfolgreichen Proben 3 demselben Patienten entstammen, nämlich BCO#140 und BCO#154 (m) und (b). Diese wurden in einem Anstand von 49 Tagen zueinander entnommen, #140 via TUR-B und #154 (b) und (m) mittels Zystektomie. Alle 3 Proben weisen im Verlauf der Kultivierung ein ähnliches Wachstumsmuster auf, und auch die IHC – Färbungen der resultierenden Organoide haben hinsichtlich der Markerexpression eine hohe Übereinstimmung. So exprimierten die 3 Proben BCO#140 in der 8. Passage, sowie BCO# 154 (m) und (b) jeweils in der 5. Passage einzig CK7 sehr stark, nur für TP63 konnte in BCO#140 ein Histoscore

von 30 nachgewiesen werden. Die restlichen Marker wurden nicht exprimiert, in der IFL-Untersuchung zeigte sich auch ein ähnliches Spektrum hinsichtlich der basalen Marker CK5 und luminaler Marker wie CK20 und GATA3. Das Färbeverhalten von letzterem, sowie von TP63 und TP53 in der IFL müssen aber im Vergleich mit der IHC kritisch gewertet werden.

Diese Beobachtungen decken sich mit denen, welche von Lee et al 2018 publiziert wurden. Auch dort konnten in einigen Fällen mehrere Proben zeitlich getrennt von einem Patienten entnommen und mittels IFL sowie IHC ähnliche Expressionsmuster festgestellt wurden.

Auch die Originaltumore BC#140 # 2 und BC#154 (m) zeigen in der IHC ein ähnliches Expressionsprofil der untersuchten Marker. Einzig die Expression von GATA3 scheint in der späteren Probe abgenommen zu haben. Diese Reduktion eines luminalen, mit einem weniger aggressiven Subtyp assoziierten Markers deckt sich mit der Tendenz der Proben, in Richtung aggressiveren Subtyps zu progredieren. Generell muss jedoch bei den Originalproben auf die Schwierigkeit hingewiesen werden, die punktuelle Färbung einer initialen Probenentnahme der daraus resultierenden Zellpopulation oder einer Tumorprobe zu späterem Zeitpunkt zuzuweisen. Welcher Teil des heterogenen Tumors für den Progress oder die Persistenz verantwortlich ist, oder welche Zellen als Grundlage für die resultierenden Passagen dient, kann durch diese Methoden nicht mit Sicherheit bestimmt werden.

Dies lässt die Vermutung zu, dass neben den möglichen methodischen Faktoren bei der Anzucht die generellen Eigenschaften eines Tumors bzw. dessen individuelle, spezielle molekulare Ausstattung ein wesentlicher Faktor für die erfolgreiche Kultivierung ist. Welcher Marker dafür prognostisch sein kann, oder ob es einer der hier untersuchten Marker ist, lässt sich nicht vorhersagen und muss weiterführend untersucht werden.

#### **4.3 Expressionswandel und (basaler oder luminaler) Phänotypswitch**

Der Vergleich der Markerexpression der Organoide verglichen mit der Originalprobe, sowie deren Wandel mit steigender Kultivierungsdauer, lässt eine Tendenz in Richtung gewisser Phänotypänderungen erkennen. Mittels

IHC konnte in allen Proben eine unterschiedlich starke Abnahme der meisten Marker nachgewiesen werden. Eine Ausnahme bildet hier CK7, welches von allen Organoiden sowie dem Großteil der Originalproben in starker Weise exprimiert wurde, allerdings aktuell auch nicht mit einer Tendenz hinsichtlich basalem/aggressivem-, oder luminalem/weniger aggressivem Subtyp in Verbindung gebracht wird. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Lee et al (2018). Wenn initial exprimiert, konnte bei allen luminalen Markern GATA3, CK20 und FGFR3 mindestens eine verminderte Expression in der Organoidkultur mittels IHC festgestellt werden, häufig sistierte die Expression komplett. Eine Steigerung der Expression fand nicht statt. Auch bei den basalen Markern fand generell eine Minderung der Expression statt, doch fiel diese nicht so dramatisch wie bei den luminalen Markern aus, mit teilweise noch residualer Expression von TP63 oder TP53 im Organoid. In einem Falle konnte eine leichte Steigerung im von TP53 bei BCO# 136 nachgewiesen werden.

Mittels IFL konnten verlässliche Färbungen für die Zytokeratine 5, 7 und 20 erzeugt werden. Deren Ergebnisse deckten sich größtenteils mit denen der IHC, sowie der erwartbaren Verteilung der Marker in den Zellen. Neben dem Persistieren von CK7 und der generellen Abnahme von CK20 konnte eine weitestgehend stabile Expressionshäufigkeit des basalen Markers CK5 nachgewiesen werden.

Dieser Wandel des Expressionsprofils könnte den Selektionsprozess der Zellkultur in Richtung einer aggressiveren Population mit höherer Proliferation widerspiegeln. Dies wäre ein nachvollziehbarer Prozess, da Zellen mit eben jenen Fähigkeiten in den Umständen einer Zellkultur einen Überlebensvorteil besäßen und in einer kompetitiven Umgebung andere, weniger aggressive Zellen verdrängen.

Diese generelle Entwicklung des Verlusts der luminalen Markerexpression wurde von Lee et al (2018) auch in einem Großteil der untersuchten Organoiden beobachtet. Interessanterweise konnte dieser Phänotypswitch nach Implantation der Organoiden als Xenograft in Mäusen rückgängig gemacht werden. In der Publikation wird postuliert, dass sich diese Entwicklung durch die

unterschiedliche Zusammensetzung des TMC (tumor micro environment) in Organoid- oder Xenograftkultur bedingt. Dies würde auch die generell ähnliche Entwicklung der von uns hergestellten Organoiden erklären, da diese sich nach Probenentnahme alle derselben Extrazellulärmatrix, dem BME, ausgesetzt sahen.

Die Arbeitsgruppe um Mullender konnte 2019 ebenfalls eine signifikant veränderte Genexpression ihrer Organoiden verglichen mit originalem Urothel anhand PCR-Untersuchungen feststellen. Zusätzlich zeigte sich auch eine Dominanz basaler Marker, speziell CK5, und eine relativ verringerte Präsenz von CK20. Auch von Yoshida et al (2018) wurde eine Veränderung des Phänotyps der Organoiden hin zu einem basalen Subtyp beobachtet, wenn auch trotzdem ein allgemeines Beibehalten der im Originaltumor vorhandenen Genexpression angegeben wird.

#### **4.4 Fehleranalyse / Limitationen**

In dieser Arbeit wurden weitestgehend drei verschiedene Methoden angewandt, die Zellkultivierung, Färbung mittels Immunhistochemie und Färbung mittels Immunfluoreszenz.

Ein möglicher Störfaktor in der längeren Kultivierung von Zellen sind Kontaminationen mit anderen Organismen wie Bakterien, Viren oder Pilzen. Dies kann aber für die vorliegende Arbeit ausgeschlossen werden. In der immunhistochemischen Untersuchung konnte in jeder Organoidreihe in höheren Passagen in den Zellen das Zytokeratin 7 nachgewiesen werden. Dies zeichnet sie als Epithelzellen aus und schließt somit eine Kontaminierung der Proben durch fremdartige, den Urothelzellen extrazellulär gelegenen Zellen wie beispielsweise Pilzhyphen, zumindest in dem untersuchten Gebiet weitestgehend aus. Des Weiteren wird beschrieben, dass in infizierten Zellkulturen häufig eine Trübung des Nährmediums sowie eine Veränderung des pH-Wertes einsetzt (Mahmood and Ali, 2017). Weder eine Trübung noch eine drastische und schnelle pH-Wert-Änderung konnten beobachtet werden. Letzterer würde durch den im Nährmedium enthaltenen pH-Indikator Phenolrot als Farbumschlag dargestellt werden.

Die immunhistochemische Untersuchung wurde nach den standardisierten Protokollen im Pathologischen Institut Tübingen mittels des Färbesystems Benchmark Ultra der Firma VENTANA durchgeführt.

Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden in unserem Labor exakt nach unseren Protokollen durchgeführt. Dennoch scheint bei manchen Markern oder Färbereihen die Lokalisation der Zielstrukturen nicht mit den laut Literatur typischen oder den Ergebnissen der Immunhistochemie vom Originaltumor übereinzustimmen. Da die Negativkontrolle ohne Primärantikörper in den angegebenen Belichtungszeiten immer ohne Signal war, liegt die Vermutung nahe, dass der Primärantikörper in diesen Fällen entweder an anderen Strukturen gebunden hat, nicht genügend aus dem Gewebe oder Einbettmaterial gewaschen werden konnte, oder die Strukturen in manchen Fällen tatsächlich atypisch lokalisiert waren, eventuell auch bedingt durch den Färbeprozess. Durch die validierte Methode der IHC-Färbung würde ich Ihre Aussagekraft hinsichtlich der Lokalisation über die der IFL stellen.

Ein wichtiger Aspekt beim Vergleich der Originalprobe mit der resultierenden Organoidreihe ist die Auswahl des Referenzgewebes. Sind die Organoide einer Reihe in späteren Passagen faktisch Abkömmlinge einer Population, sind in der Originalprobe eine Vielzahl verschiedener Zelltypen, und potenziell auch verschiedener Tumorentitäten vorhanden. Eben jene Stelle zu finden und zu untersuchen, aus welcher letztendlich die Population der Organoide entstanden ist, lässt sich nicht eindeutig feststellen. Um hier die vielversprechendsten Teile der Probe zu lokalisieren, wurden mit Hilfe einer fachärztlich speziell ausgebildeten Pathologin die definitiv neoplastischen Areale identifiziert und sich bei der Auswertung auf eben jene fokussiert. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Zellkultur letztendlich von einer nicht untersuchten Stelle der Probe entsprungen ist.

## 5 Zusammenfassung

Fragestellung: ***Sind Organoide ein valides Forschungsmodell hinsichtlich ihrer Anzuchterfolge und der Vergleichbarkeit mit dem Originaltumor nach Passagierung?***

Mit der von uns erreichten Rate an erfolgreichen 3D-Zellkultivierungen konnten wir die Erfolge anderer Arbeitsgruppen wie 70% für Organoide  $\geq 6$ . Passage bei Lee et al (2018) oder 50% bei Mullender et al (2019) nicht reproduzieren (Lee et al., 2018, Mullenders et al., 2019). Kombiniert mit dem Zeit- und Materialaufwand dieser Methode muss für zeitnahe klinische Fragestellungen weitere Mühen für eine erfolgreichere und verlässliche Anzucht investiert werden. Zwar sind die Anzuchtraten für frühe Spheroide größer, allerdings kann hier bisher kein Fortbestand der Zellkultur garantiert werden. Des Weiteren ist es in diesem Stadium schwierig, genug Material für eine aussagekräftige Färbereihe, sowie potenzielle DNA-Analysen und Weiterkultivierung zu erlangen.

Wurde eine Probe erfolgreich als Organoidlinie etabliert tendierte diese zu einem quantitativ verlässlichen und vorhersagbaren Wachstum. Dies garantiert genug Material zum Weiterführen der Kultur über viele Passagen, sowie extensive Untersuchungen mittels DNA-Analyse und IHC oder IFL – Färbungen. Bis zu diesem Punkt war in dieser Arbeit ein Zeitraum von mindestens einem Monat nötig.

Hinsichtlich des Expressionsverhaltens ausgesuchter Zellstrukturen über die Zeit ist zu erkennen, dass es in höheren Passagen bis auf CK7 zu einer mehr oder weniger starken Änderung der Expressionshäufigkeit der hier interessanten Marker kommt. Die Markerexpression verringerte sich und zeigte eine Tendenz weg vom luminalen und hin zum basalen Subtyp, was sich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen deckt. Dies stellt einen wichtigen Punkt in der Vergleichbarkeit mit dem Originalgewebe dar. Die Mechanismen hinter diesem Verhalten, z.B. dem Einfluss der ECM, müssen tiefergehend studiert werden, um valide Vorhersagen treffen zu können.

## 6 Literaturverzeichnis:

- AGGARWAL, B. B., DANDA, D., GUPTA, S. & GEHLOT, P. 2009. Models for prevention and treatment of cancer: problems vs promises. *Biochemical pharmacology*, 78, 1083-1094.
- BABJUK, M., BURGER, M., COMPÉRAT, E. M., GONTERO, P., MOSTAFID, A. H., PALOU, J., VAN RHIJN, B. W. G., ROUPRÉT, M., SHARIAT, S. F., SYLVESTER, R., ZIGEUNER, R., CAPOUN, O., COHEN, D., ESCRIG, J. L. D., HERNÁNDEZ, V., PEYRONNET, B., SEISEN, T. & SOUKUP, V. 2019. European Association of Urology Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (TaT1 and Carcinoma In Situ) - 2019 Update. *Eur Urol*, 76, 639-657.
- BRIERLEY, J. D., GOSPODAROWICZ, M. K. & WITTEKIND, C. 2017. *TNM classification of malignant tumours*, John Wiley & Sons.
- BURCHILL, S. A. 2006. What do, can and should we learn from models to evaluate potential anticancer agents? *Future Oncol*, 2, 201-11.
- BURGER, M., CATTO, J. W., DALBAGNI, G., GROSSMAN, H. B., HERR, H., KARAKIEWICZ, P., KASSOUF, W., KIEMENEY, L. A., LA VECCHIA, C., SHARIAT, S. & LOTAN, Y. 2013. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol*, 63, 234-41.
- CASTILLO-MARTIN, M., DOMINGO-DOMENECH, J., KARNI-SCHMIDT, O., MATOS, T. & CORDON-CARDO, C. 2010. Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 28, 401-408.
- CHAVAN, S., BRAY, F., LORTET-TIEULENT, J., GOODMAN, M. & JEMAL, A. 2014. International variations in bladder cancer incidence and mortality. *Eur Urol*, 66, 59-73.
- CHENG, T., ROTH, B., CHOI, W., BLACK, P. C., DINNEY, C. & MCCONKEY, D. J. 2013. Fibroblast growth factor receptors-1 and -3 play distinct roles in the regulation of bladder cancer growth and metastasis: implications for therapeutic targeting. *PLoS One*, 8, e57284.
- CHOI, W., CZERNIAK, B., OCHOA, A., SU, X., SIEFKER-RADTKE, A., DINNEY, C. & MCCONKEY, D. J. 2014a. Intrinsic basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer. *Nature Reviews Urology*, 11, 400-410.
- CHOI, W., OCHOA, A., MCCONKEY, D. J., AINE, M., HÖGLUND, M., KIM, W. Y., REAL, F. X., KILTIE, A. E., MILSOM, I., DYRSKJØT, L. & LERNER, S. P. 2017. Genetic Alterations in the Molecular Subtypes of Bladder Cancer: Illustration in the Cancer Genome Atlas Dataset. *Eur Urol*, 72, 354-365.
- CHOI, W., PORTEN, S., KIM, S., WILLIS, D., PLIMACK, E. R., HOFFMAN-CENSITS, J., ROTH, B., CHENG, T., TRAN, M., LEE, I. L., MELQUIST, J., BONDARUK, J., MAJEWSKI, T., ZHANG, S., PRETZSCH, S., BAGGERLY, K., SIEFKER-RADTKE, A., CZERNIAK, B., DINNEY, C. P. N. & MCCONKEY, D. J. 2014b. Identification of distinct basal and luminal

- subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer cell*, 25, 152-165.
- CHU, P., WU, E. & WEISS, L. M. 2000. Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression in epithelial neoplasms: a survey of 435 cases. *Mod Pathol*, 13, 962-72.
- COLT, J. S., FRIESEN, M. C., STEWART, P. A., DONGUK, P., JOHNSON, A., SCHWENN, M., KARAGAS, M. R., ARMENTI, K., WADDELL, R., VERRILL, C., WARD, M. H., FREEMAN, L. E., MOORE, L. E., KOUTROS, S., BARIS, D. & SILVERMAN, D. T. 2014. A case-control study of occupational exposure to metalworking fluids and bladder cancer risk among men. *Occup Environ Med*, 71, 667-74.
- COMPÉRAT, E., LARRÉ, S., ROUPRET, M., NEUZILLET, Y., PIGNOT, G., QUINTENS, H., HOUÉDE, N., ROY, C., DURAND, X., VARINOT, J., VORDOS, D., ROUANNE, M., BAKHRI, M. A., BERTRAND, P., JEGLINSCHI, S. C., CUSSENOT, O., SOULIÉ, M. & PFISTER, C. 2015. Clinicopathological characteristics of urothelial bladder cancer in patients less than 40 years old. *Virchows Arch*, 466, 589-94.
- COMPÉRAT, E. M., BURGER, M., GONTERO, P., MOSTAFID, A. H., PALOU, J., ROUPRÊT, M., VAN RHIJN, B. W. G., SHARIAT, S. F., SYLVESTER, R. J., ZIGEUNER, R. & BABJUK, M. 2019. Grading of Urothelial Carcinoma and The New "World Health Organisation Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs 2016". *Eur Urol Focus*, 5, 457-466.
- DADHANIA, V., ZHANG, M., ZHANG, L., BONDARUK, J., MAJEWSKI, T., SIEFKER-RADTKE, A., GUO, C. C., DINNEY, C., COGDELL, D. E., ZHANG, S., LEE, S., LEE, J. G., WEINSTEIN, J. N., BAGGERLY, K., MCCONKEY, D. & CZERNIAK, B. 2016. Meta-Analysis of the Luminal and Basal Subtypes of Bladder Cancer and the Identification of Signature Immunohistochemical Markers for Clinical Use. *EBioMedicine*, 12, 105-117.
- DAMRAUER, J. S., HOADLEY, K. A., CHISM, D. D., FAN, C., TIGANELLI, C. J., WOBKER, S. E., YEH, J. J., MILOWSKY, M. I., IYER, G., PARKER, J. S. & KIM, W. Y. 2014. Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 3110-5.
- DEGEORGE, K. C., HOLT, H. R. & HODGES, S. C. 2017. Bladder Cancer: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician*, 96, 507-514.
- EL-MONIM, H. A., EL-BARADIE, M. M., YOUNIS, A., RAGAB, Y., LABIB, A. & EL-ATTAR, I. 2013. A prospective randomized trial for postoperative vs. preoperative adjuvant radiotherapy for muscle-invasive bladder cancer. *Urol Oncol*, 31, 359-65.
- FREEDMAN, N. D., SILVERMAN, D. T., HOLLENBECK, A. R., SCHATZKIN, A. & ABNET, C. C. 2011. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *Jama*, 306, 737-45.
- GANDHI, N., KRISHNA, S., BOOTH, C. M., BREAU, R. H., FLOOD, T. A., MORGAN, S. C., SCHIEDA, N., SALAMEH, J. P., MCGRATH, T. A. & MCINNES, M. D. F. 2018. Diagnostic accuracy of magnetic resonance

- imaging for tumour staging of bladder cancer: systematic review and meta-analysis. *BJU Int*, 122, 744-753.
- GIANCOTTI, F. G. & RUOSLAHTI, E. 1999. Integrin Signaling. *Science*, 285, 1028-1033.
- GOUTAS, D., TZORTZIS, A., GAKIOPOULOU, H., VLACHODIMITROPOULOS, D., GIANNOPOULOU, I. & LAZARIS, A. C. 2021. Contemporary Molecular Classification of Urinary Bladder Cancer. *In Vivo*, 35, 75-80.
- GRASSO, M. 2008. Bladder Cancer: A Major Public Health Issue. *European Urology Supplements*, 7, 510-515.
- GREAVES, P., WILLIAMS, A. & EVE, M. 2004. First dose of potential new medicines to humans: how animals help. *Nat Rev Drug Discov*, 3, 226-36.
- GRIFFITH, L. G. & SWARTZ, M. A. 2006. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 211-24.
- GUNTI, S., HOKE, A. T. K., VU, K. P. & LONDON, N. R. 2021. Organoid and Spheroid Tumor Models: Techniques and Applications. *Cancers*, 13, 874.
- GUO, C. C., BONDARUK, J., YAO, H., WANG, Z., ZHANG, L., LEE, S., LEE, J. G., COGDELL, D., ZHANG, M., YANG, G., DADHANIA, V., CHOI, W., WEI, P., GAO, J., THEODORESCU, D., LOGOTHETIS, C., DINNEY, C., KIMMEL, M., WEINSTEIN, J. N., MCCONKEY, D. J. & CZERNIAK, B. 2020. Assessment of Luminal and Basal Phenotypes in Bladder Cancer. *Sci Rep*, 10, 9743.
- GUO, C. C., DADHANIA, V., ZHANG, L., MAJEWSKI, T., BONDARUK, J., SYKULSKI, M., WRONOWSKA, W., GAMBIN, A., WANG, Y., ZHANG, S., FUENTES-MATTEI, E., KAMAT, A. M., DINNEY, C., SIEFKER-RADTKE, A., CHOI, W., BAGGERLY, K. A., MCCONKEY, D., WEINSTEIN, J. N. & CZERNIAK, B. 2016. Gene Expression Profile of the Clinically Aggressive Micropapillary Variant of Bladder Cancer. *Eur Urol*, 70, 611-620.
- HAMBURGER, A. W. & SALMON, S. E. 1977. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*, 197, 461-3.
- HAMMAM, O., WISHAHIZ, M., KHALIL, H., EL GANZOURI, H., BADAWY, M., ELKHQULY, A. & ELESAILY, K. 2014. Expression of cytokeratin 7, 20, 14 in urothelial carcinoma and squamous cell carcinoma of the Egyptian urinary bladder cancer. *J Egypt Soc Parasitol*, 44, 733-40.
- HARRISON, R. G. 1910. The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. *Journal of Experimental Zoology*, 9, 787-846.
- HASHMI, A. A., HUSSAIN, Z. F., IRFAN, M., EDHI, M. M., KANWAL, S., FARIDI, N. & KHAN, A. 2018. Cytokeratin 5/6 expression in bladder cancer: association with clinicopathologic parameters and prognosis. *BMC research notes*, 11, 207-207.
- HERMITTE, F., BRUNET DE LA GRANGE, P., BELLOC, F., PRALORAN, V. & IVANOVIC, Z. 2006. Very Low O<sub>2</sub> Concentration (0.1%) Favors G<sub>0</sub> Return of Dividing CD34<sup>+</sup> Cells. *STEM CELLS*, 24, 65-73.
- HSIEH, C.-H., CHEN, Y.-D., HUANG, S.-F., WANG, H.-M. & WU, M.-H. 2015. The effect of primary cancer cell culture models on the results of drug

- chemosensitivity assays: the application of perfusion microbioreactor system as cell culture vessel. *BioMed research international*, 2015, 470283-470283.
- IARC. 2020. *Cancer Today* [Online]. Available: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2020&mode=cancer&mode\\_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&group\\_cancer=1&include\\_nmsc=0&include\\_nmsc\\_other=1](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&group_cancer=1&include_nmsc=0&include_nmsc_other=1) [Accessed 05.10.2021 2021].
- IWATA, T., KIMURA, S., ABUFARAJ, M., JANISCH, F., KARAKIEWICZ, P. I., SEEBACHER, V., ROUPRÊT, M., NASU, Y. & SHARIAT, S. F. 2019. The role of adjuvant radiotherapy after surgery for upper and lower urinary tract urothelial carcinoma: A systematic review. *Urol Oncol*, 37, 659-671.
- JIANG, J., ULBRIGHT, T. M., YOUNGER, C., SANCHEZ, K., BOSTWICK, D. G., KOCH, M. O., EBLE, J. N. & CHENG, L. 2001. Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 in primary urinary bladder carcinoma and matched lymph node metastasis. *Arch Pathol Lab Med*, 125, 921-3.
- KAATSCH, P., SPIX, C., KATALINIC, A. & HENTSCHEL, S. 2012. Krebs in Deutschland 2007/2008. Robert Koch-Institut.
- KALLI, M. & STYLIANOPOULOS, T. 2018. Defining the Role of Solid Stress and Matrix Stiffness in Cancer Cell Proliferation and Metastasis. *Frontiers in Oncology*, 8.
- KAMOUN, A., DE REYNIÈS, A., ALLORY, Y., SJÖDAHL, G., ROBERTSON, A. G., SEILER, R., HOADLEY, K. A., GROENEVELD, C. S., AL-AHMADIE, H., CHOI, W., CASTRO, M. A. A., FONTUGNE, J., ERIKSSON, P., MO, Q., KARDOS, J., ZLOTTA, A., HARTMANN, A., DINNEY, C. P., BELLMUNT, J., POWLES, T., MALATS, N., CHAN, K. S., KIM, W. Y., MCCONKEY, D. J., BLACK, P. C., DYRSKJØT, L., HÖGLUND, M., LERNER, S. P., REAL, F. X. & RADVANYI, F. 2020. A Consensus Molecular Classification of Muscle-invasive Bladder Cancer. *Eur Urol*, 77, 420-433.
- KAPALCZYŃSKA, 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. *Archives of medical science : AMS*, 14, 910-919.
- KAUFMANN, O., FIETZE, E., MENGS, J. & DIETEL, M. 2001. Value of p63 and cytokeratin 5/6 as immunohistochemical markers for the differential diagnosis of poorly differentiated and undifferentiated carcinomas. *Am J Clin Pathol*, 116, 823-30.
- KAUSCH, I., SOMMERAUER, M., MONTORSI, F., STENZL, A., JACQMIN, D., JICHLINSKI, P., JOCHAM, D., ZIEGLER, A. & VONTHEIN, R. 2010. Photodynamic diagnosis in non-muscle-invasive bladder cancer: a systematic review and cumulative analysis of prospective studies. *Eur Urol*, 57, 595-606.

- KELLAND, L. R. 2004. Of mice and men: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. *Eur J Cancer*, 40, 827-36.
- KIM, J. K., PARK, S. Y., AHN, H. J., KIM, C. S. & CHO, K. S. 2004. Bladder cancer: analysis of multi-detector row helical CT enhancement pattern and accuracy in tumor detection and perivesical staging. *Radiology*, 231, 725-31.
- KLEINMAN, H. K. & MARTIN, G. R. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Seminars in cancer biology*, 2005. Elsevier, 378-386.
- KUNDRU, V., SILVERMAN, P. M., MATIN, S. F. & CHOI, H. 2007. Imaging in oncology from the University of Texas M. D. Anderson Cancer Center: diagnosis, staging, and surveillance of prostate cancer. *AJR Am J Roentgenol*, 189, 830-44.
- LAAKSONEN, M. A., MACINNIS, R. J., CANFELL, K., GILES, G. G., HULL, P., SHAW, J. E., CUMMING, R. G., GILL, T. K., BANKS, E., MITCHELL, P., BYLES, J. E., MAGLIANO, D. J., HIRANI, V., CONNAH, D. & VAJDIC, C. M. 2020. The future burden of kidney and bladder cancers preventable by behavior modification in Australia: A pooled cohort study. *Int J Cancer*, 146, 874-883.
- LAMM, D. L. 1992. Carcinoma in situ. *Urol Clin North Am*, 19, 499-508.
- LANE, E. B. & ALEXANDER, C. M. 1990. Use of keratin antibodies in tumor diagnosis. *Semin Cancer Biol*, 1, 165-79.
- LEE, R. K., ABOL-ENEIN, H., ARTIBANI, W., BOCHNER, B., DALBAGNI, G., DANESHMAND, S., FRADET, Y., HAUTMANN, R. E., LEE, C. T., LERNER, S. P., PYCHA, A., SIEVERT, K. D., STENZL, A., THALMANN, G. & SHARIAT, S. F. 2014. Urinary diversion after radical cystectomy for bladder cancer: options, patient selection, and outcomes. *BJU Int*, 113, 11-23.
- 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. 2018. Tumor evolution and drug response in patient-derived organoid models of bladder cancer. *Cell*, 173, 515-528. e17.
- LEVENTAL, K. R., YU, H., KASS, L., LAKINS, J. N., EGEBLAD, M., ERLER, J. T., FONG, S. F. T., CSISZAR, K., GIACCIA, A., WENINGER, W., YAMAUCHI, M., GASSER, D. L. & WEAVER, V. M. 2009. Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling. *Cell*, 139, 891-906.
- LIU, S., YANG, T., NA, R., HU, M., ZHANG, L., FU, Y., JIANG, H. & DING, Q. 2015. The impact of female gender on bladder cancer-specific death risk after radical cystectomy: a meta-analysis of 27,912 patients. *Int Urol Nephrol*, 47, 951-8.
- MACLENNAN, G. T., KIRKALI, Z. & CHENG, L. 2007. Histologic grading of noninvasive papillary urothelial neoplasms. *Eur Urol*, 51, 889-97; discussion 897-8.
- MAHMOOD, A. & ALI, S. 2017. Microbial and viral contamination of animal and stem cell cultures: common contaminants, detection and elimination. *J. Stem Cell Res. Ther*, 2, 1-8.

- MALMSTRÖM, P. U., SYLVESTER, R. J., CRAWFORD, D. E., FRIEDRICH, M., KREGE, S., RINTALA, E., SOLSONA, E., DI STASI, S. M. & WITJES, J. A. 2009. An individual patient data meta-analysis of the long-term outcome of randomised studies comparing intravesical mitomycin C versus bacillus Calmette-Guérin for non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol*, 56, 247-56.
- MASUDA, N., MURAKAMI, K., KITA, Y., HAMADA, A., KAMADA, M., TERAMOTO, Y., SAKATANI, T., MATSUMOTO, K., SANNO, T., SAITO, R., OKUNO, Y., OGAWA, O. & KOBAYASHI, T. 2020. Trp53 Mutation in Keratin 5 (Krt5)-Expressing Basal Cells Facilitates the Development of Basal Squamous-Like Invasive Bladder Cancer in the Chemical Carcinogenesis of Mouse Bladder. *Am J Pathol*, 190, 1752-1762.
- MCCAULEY, H. A. & WELLS, J. M. 2017. Pluripotent stem cell-derived organoids: using principles of developmental biology to grow human tissues in a dish. *Development*, 144, 958-962.
- MCCONKEY, D. J., CHOI, W., SHEN, Y., LEE, I. L., PORTEN, S., MATIN, S. F., KAMAT, A. M., CORN, P., MILLIKAN, R. E., DINNEY, C., CZERNIAK, B. & SIEFKER-RADTKE, A. O. 2016. A Prognostic Gene Expression Signature in the Molecular Classification of Chemotherapy-naïve Urothelial Cancer is Predictive of Clinical Outcomes from Neoadjuvant Chemotherapy: A Phase 2 Trial of Dose-dense Methotrexate, Vinblastine, Doxorubicin, and Cisplatin with Bevacizumab in Urothelial Cancer. *European urology*, 69, 855-862.
- MI, Y., ZHAO, Y., SHI, F., ZHANG, M., WANG, C. & LIU, X. 2019. Diagnostic accuracy of urine cytokeratin 20 for bladder cancer: A meta-analysis. *Asia Pac J Clin Oncol*, 15, e11-e19.
- MOCH H, H. P., ULBRIGHT TM, REUTER VE 2016. *WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs* International Agency for Research on Cancer.
- MOLL, R., FRANKE, W. W., SCHILLER, D. L., GEIGER, B. & KREPLER, R. 1982. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, 31, 11-24.
- MOMMSEN, S., AAGAARD, J. & SELL, A. 1983. Presenting Symptoms, Treatment Delay and Survival in Bladder Cancer. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, 17, 163-167.
- MOSCHINI, M., ROGHMANN, F. & XYLINAS, E. 2019. The need to improve TURB: a diagnostic and therapeutic fundamental first step in the disease's management. *Translational andrology and urology*, 8, 2-4.
- MOWATT, G., N'DOW, J., VALE, L., NABI, G., BOACHIE, C., COOK, J. A., FRASER, C. & GRIFFITHS, T. R. 2011. Photodynamic diagnosis of bladder cancer compared with white light cystoscopy: Systematic review and meta-analysis. *Int J Technol Assess Health Care*, 27, 3-10.
- MUILWIJK, T., AKAND, M., VAN DER AA, F., DE CONINCK, V., CLAESSENS, M., HENTE, R., ECKSTEIN, M., ALLORY, Y., LIBBRECHT, L., JONIAU, S. & GEVAERT, T. 2021. Cytokeratin 5 and cytokeratin 20 inversely correlate with tumour grading in Ta non-muscle-invasive bladder cancer. *J Cell Mol Med*, 25, 7890-7900.

- MULLENDERS, J., DE JONGH, E., BROUSALI, A., ROOSEN, M., BLOM, J. P., BEGTHEL, H., KORVING, J., JONGES, T., KRANENBURG, O. & MEIJER, R. 2019. Mouse and human urothelial cancer organoids: a tool for bladder cancer research. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116, 4567-4574.
- PAMPALONI, F., REYNAUD, E. G. & STELZER, E. H. K. 2007. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 839-845.
- PAN, J. S., SLOCUM, H. K., RUSTUM, Y. M., GRECO, W. R., GAETA, J. F. & HUBEN, R. P. 1989. Inhibition of implantation of murine bladder tumor by thiotepa in cauterized bladder. *J Urol*, 142, 1589-93.
- PARSA, R., YANG, A., MCKEON, F. & GREEN, H. 1999. Association of p63 with proliferative potential in normal and neoplastic human keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 113, 1099-105.
- PESCH, B., TAEGER, D., JOHNNEN, G., GAWRYCH, K., BONBERG, N., SCHWENTNER, C., WELLHÄUSSER, H., KLUCKERT, M., LENG, G., NASTERLACK, M., LOTAN, Y., STENZL, A. & BRÜNING, T. 2014. Screening for bladder cancer with urinary tumor markers in chemical workers with exposure to aromatic amines. *Int Arch Occup Environ Health*, 87, 715-24.
- PETERSEN, O. W., RØNNOV-JESSEN, L., HOWLETT, A. R. & BISSELL, M. J. 1992. Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 9064-9068.
- QUAIL, D. F. & JOYCE, J. A. 2013. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine*, 19, 1423-1437.
- ROBERTSON, A. G., KIM, J., AL-AHMADIE, H., BELLMUNT, J., GUO, G., CHERNIACK, A. D., HINOUE, T., LAIRD, P. W., HOADLEY, K. A., AKBANI, R., CASTRO, M. A. A., GIBB, E. A., KANCHI, R. S., GORDENIN, D. A., SHUKLA, S. A., SANCHEZ-VEGA, F., HANSEL, D. E., CZERNIAK, B. A., REUTER, V. E., SU, X., DE SA CARVALHO, B., CHAGAS, V. S., MUNGALL, K. L., SADEGHI, S., PEDAMALLU, C. S., LU, Y., KLIMCZAK, L. J., ZHANG, J., CHOO, C., OJESINA, A. I., BULLMAN, S., LERAAS, K. M., LICHTENBERG, T. M., WU, C. J., SCHULTZ, N., GETZ, G., MEYERSON, M., MILLS, G. B., MCCONKEY, D. J., NETWORK, T. R., WEINSTEIN, J. N., KWIATKOWSKI, D. J. & LERNER, S. P. 2017. Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cell*, 171, 540-556.e25.
- RYU, N.-E., LEE, S.-H. & PARK, H. 2019. Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells. *Cells*, 8, 1620.
- SATO, T., VRIES, R. G., SNIPPERT, H. J., VAN DE WETERING, M., BARKER, N., STANGE, D. E., VAN ES, J. H., ABO, A., KUJALA, P., PETERS, P. J. & CLEVERS, H. 2009. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, 459, 262-265.
- SHELLEY, M. D., KYNASTON, H., COURT, J., WILT, T. J., COLES, B., BURGON, K. & MASON, M. D. 2001. A systematic review of intravesical

- bacillus Calmette-Guérin plus transurethral resection vs transurethral resection alone in Ta and T1 bladder cancer. *BJU Int*, 88, 209-16.
- SOUTHGATE, J., HARNDEN, P. & TREJDOSIEWICZ, L. K. 1999. Cytokeratin expression patterns in normal and malignant urothelium: a review of the biological and diagnostic implications. *Histol Histopathol*, 14, 657-64.
- SPENCE, J. R., MAYHEW, C. N., RANKIN, S. A., KUCHAR, M. F., VALLANCE, J. E., TOLLE, K., HOSKINS, E. E., KALINICHENKO, V. V., WELLS, S. I., ZORN, A. M., SHROYER, N. F. & WELLS, J. M. 2011. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature*, 470, 105-109.
- STEIN, J. P., LIESKOVSKY, G., COTE, R., GROSHEN, S., FENG, A. C., BOYD, S., SKINNER, E., BOCHNER, B., THANGATHURAI, D., MIKHAIL, M., RAGHAVAN, D. & SKINNER, D. G. 2001. Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. *J Clin Oncol*, 19, 666-75.
- STENZL, A. 1999. Bladder substitution. *Curr Opin Urol*, 9, 241-5.
- STENZL, A., BURGER, M., FRADET, Y., MYNDERSE, L. A., SOLOWAY, M. S., WITJES, J. A., KRIEGMAIR, M., KARL, A., SHEN, Y. & GROSSMAN, H. B. 2010. Hexaminolevulinate guided fluorescence cystoscopy reduces recurrence in patients with nonmuscle invasive bladder cancer. *J Urol*, 184, 1907-13.
- STENZL, A., NAGELE, U., KUCZYK, M., SIEVERT, K.-D., ANASTASIADIS, A., SEIBOLD, J. & CORVIN, S. 2005. Cystectomy – Technical Considerations in Male and Female Patients. *EAU Update Series*, 3, 138-146.
- SYLVESTER, R. J., OOSTERLINCK, W., HOLMANG, S., SYDES, M. R., BIRTLE, A., GUDJONSSON, S., DE NUNZIO, C., OKAMURA, K., KAASINEN, E., SOLSONA, E., ALI-EL-DEIN, B., TATAR, C. A., INMAN, B. A., N'DOW, J., ODDENS, J. R. & BABJUK, M. 2016. Systematic Review and Individual Patient Data Meta-analysis of Randomized Trials Comparing a Single Immediate Instillation of Chemotherapy After Transurethral Resection with Transurethral Resection Alone in Patients with Stage pTa-pT1 Urothelial Carcinoma of the Bladder: Which Patients Benefit from the Instillation? *Eur Urol*, 69, 231-44.
- SYLVESTER, R. J., VAN DER, M. A. & LAMM, D. L. 2002. Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol*, 168, 1964-70.
- SYLVESTER, R. J., VAN DER MEIJDEN, A. P., WITJES, J. A. & KURTH, K. 2005. Bacillus calmette-guerin versus chemotherapy for the intravesical treatment of patients with carcinoma in situ of the bladder: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol*, 174, 86-91; discussion 91-2.
- TÊTU, B. 2009. Diagnosis of urothelial carcinoma from urine. *Mod Pathol*, 22 Suppl 2, S53-9.
- VAN BATAVIA, J., YAMANY, T., MOLOTKOV, A., DAN, H., MANSUKHANI, M., BATOURINA, E., SCHNEIDER, K., OYON, D., DUNLOP, M., WU, X. R., CORDON-CARDO, C. & MENDELSON, C. 2014. Bladder cancers

- arise from distinct urothelial sub-populations. *Nat Cell Biol*, 16, 982-91, 1-5.
- VAN OSCH, F. H., JOCHEMS, S. H., VAN SCHOOTEN, F. J., BRYAN, R. T. & ZEEGERS, M. P. 2016. Quantified relations between exposure to tobacco smoking and bladder cancer risk: a meta-analysis of 89 observational studies. *Int J Epidemiol*, 45, 857-70.
- VESKIMÄE, E., ESPINOS, E. L., BRUINS, H. M., YUAN, Y., SYLVESTER, R., KAMAT, A. M., SHARIAT, S. F., WITJES, J. A. & COMPÉRAT, E. M. 2019. What Is the Prognostic and Clinical Importance of Urothelial and Nonurothelial Histological Variants of Bladder Cancer in Predicting Oncological Outcomes in Patients with Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer? A European Association of Urology Muscle Invasive and Metastatic Bladder Cancer Guidelines Panel Systematic Review. *Eur Urol Oncol*, 2, 625-642.
- VON DER MARK, K., GAUSS, V., VON DER MARK, H. & MÜLLER, P. 1977. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature*, 267, 531-2.
- VON HOFF, D. D. 1998. There are no bad anticancer agents, only bad clinical trial designs--twenty-first Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Clinical Cancer Research*, 4, 1079-1086.
- WANG, C. C., TSAI, Y. C. & JENG, Y. M. 2019. Biological significance of GATA3, cytokeratin 20, cytokeratin 5/6 and p53 expression in muscle-invasive bladder cancer. *PLoS One*, 14, e0221785.
- WARRICK, J. I., SJÖDAHL, G., KAAG, M., RAMAN, J. D., MERRILL, S., SHUMAN, L., CHEN, G., WALTER, V. & DEGRAFF, D. J. 2019. Intratumoral Heterogeneity of Bladder Cancer by Molecular Subtypes and Histologic Variants. *Eur Urol*, 75, 18-22.
- WHITESIDE, T. L. 2008. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*, 27, 5904-5912.
- WOO, S., PANEBIANCO, V., NARUMI, Y., DEL GIUDICE, F., MUGLIA, V. F., TAKEUCHI, M., GHAFOOR, S., BOCHNER, B. H., GOH, A. C., HRICAK, H., CATTO, J. W. F. & VARGAS, H. A. 2020. Diagnostic Performance of Vesical Imaging Reporting and Data System for the Prediction of Muscle-invasive Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Eur Urol Oncol*, 3, 306-315.
- YAFI, F. A., BRIMO, F., STEINBERG, J., APRIKIAN, A. G., TANGUAY, S. & KASSOUF, W. 2015. Prospective analysis of sensitivity and specificity of urinary cytology and other urinary biomarkers for bladder cancer. *Urol Oncol*, 33, 66.e25-31.
- YANG, A., KAGHAD, M., WANG, Y., GILLETT, E., FLEMING, M. D., DÖTSCH, V., ANDREWS, N. C., CAPUT, D. & MCKEON, F. 1998. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell*, 2, 305-16.
- YANG, W. T., LAM, W. W., YU, M. Y., CHEUNG, T. H. & METREWELI, C. 2000. Comparison of dynamic helical CT and dynamic MR imaging in the evaluation of pelvic lymph nodes in cervical carcinoma. *AJR Am J Roentgenol*, 175, 759-66.

- ZAGHLOUL, M. S., CHRISTODOULEAS, J. P., SMITH, A., ABDALLAH, A., WILLIAM, H., KHALED, H. M., HWANG, W. T. & BAUMANN, B. C. 2018. Adjuvant Sandwich Chemotherapy Plus Radiotherapy vs Adjuvant Chemotherapy Alone for Locally Advanced Bladder Cancer After Radical Cystectomy: A Randomized Phase 2 Trial. *JAMA Surg*, 153, e174591.
- ZHAO, F., PATHI, P., GRAYSON, W., XING, Q., LOCKE, B. R. & MA, T. 2005. Effects of Oxygen Transport on 3-D Human Mesenchymal Stem Cell Metabolic Activity in Perfusion and Static Cultures: Experiments and Mathematical Model. *Biotechnology Progress*, 21, 1269-1280.

## **7 Erklärung zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde im Zentrum für medizinische Forschung der Urologischen Klinik Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. rer. nat. Wilhelm K. Aicher durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Graduiertenkolleg 2543 und Prof. Dr. rer. nat. Wilhelm K. Aicher.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder [Prof. Dr. rer. nat. Wilhelm K. Aicher, Dr. rer. nat. Christine Mayer, Tanja Abruzzese, Cornelia Boch] von mir eigenständig durchgeführt. Die Methode der Immunhistochemie wurde durch das Institut für Pathologie Tübingen durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte durch mich.

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

Tübingen, den

## 8 Danksagung

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Dr. h.c. Arnulf Stenzel und Prof. Dr.-Ing. habil. Dr. h.c. Oliver Sawodny, welchen Ich es verdanke im Rahmen des GRK-Projektes 2543 dieses interessante Thema überlassen bekommen zu haben.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. rer. nat. Wilhelm K. Aicher, Prof. Dr. med. Falko Fend, Dr. med. Niklas Harland, Dr. med. Yvonne Aidee Montes Mojarro, Dr. med. Bastian Amend und Dr. med. Simon Walz für die fortwährende Unterstützung, die vielen anregenden Diskussionen und die Zeit, die sie sich genommen haben, um mir an jedem Punkt meiner Arbeit nach besten Möglichkeiten behilflich zu sein.

Bei allen Mitarbeitern des Urologie-Labors Tübingen, insbesondere Dr. rer. nat. Christine Mayer, Tanja Abruzzese, Cornelia Bock, Ingrid Münz, Jasmin Knoll, Paul Pollehne, Johannes Schneider, Ruizhi Geng, möchte ich mich für die angenehme Zusammenarbeit und die geduldige Einarbeitung in die wissenschaftlichen Methoden Bedanken.

Ferner gilt mein Dank meiner Familie Mareike Lipke und Christa Lipke, sowie Nina Rödiger, für ihre unerlässliche Unterstützung und Verständnis.